

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14405

研究課題名(和文) 癌幹細胞を標的とするT細胞受容体様抗体迅速単離法の開発とその応用

研究課題名(英文) Development of the system for isolation of T-cell receptor like antibodies against tumor stem cells

研究代表者

磯部 正治 (Isobe, Masaharu)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・教授

研究者番号：70211050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、独自開発の抗原特異的な抗体産生細胞取得技術と抗体産生単一細胞由来抗体迅速単離システムを応用することで、がん幹細胞を標的とするTCR様抗体迅速単離法の開発を行った。がんの根治療法を開発するためには、がん細胞とがん幹細胞の両者で選択的発現を示す抗原を認識するTCR様抗体の取得が強く求められる。そこで本研究では既知のがん抗原の中から、がん幹細胞でも発現が認められる抗原を選択し、MHCクラスI分子と抗原ペプチドの複合体(pMHC)を認識する抗体の取得を行った。その結果、pMHCに対する高い親和性と高い特異性を示す、TCR様抗体を複数取得することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a rapid system for the isolation of TCR-like antibodies targeting cancer stem cells by applying our original high-throughput acquisition technology of antigen-specific antibody from single plasma cells. In order to develop radical curative therapy for cancer, it is strongly required to obtain TCR-like antibodies that recognize antigens that selectively express in both cancer cells and cancer stem cells. In this study, we selected antigens whose expression is also found in cancer stem cells from known cancer antigens, and have succeeded to obtain antibodies recognizing a complex of MHC class I and a tumor antigen-peptide (pMHC) with high affinity and specificity.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：T-cell receptor Antibody Tumor stem cell MHC class I

1. 研究開始当初の背景

近年、様々ながんを標的とする数多くの治療用抗体の開発が進められている。これまでの抗体療法における最大の課題は、患者を寛解に持ち込めても、治癒させることができないという点にある。それは、がんの元となる「がん幹細胞」を標的とする治療用抗体が存在しないためである。がん幹細胞の表面マーカーとしてこれまで知られている細胞表面抗原の多くは、がん幹細胞だけを攻撃するため目印としては特異性が不十分である。われわれはこれまで独自の「単一細胞由来抗体迅速単離システム」を開発し、がん細胞を標的とする抗体の取得を試みてきた。その過程で、広義のがん抗原の中には、がん細胞のみならず、がん幹細胞においても同様に発現しているものが存在することを見いだした。しかしそのほとんどは細胞内でしか発現していないため、細胞表面分子を標的とする従来の抗体療法では対応することができなかった。しかし近年のがん免疫学の進歩によって、たとえ細胞内でしか発現しないがん抗原であっても、がん抗原由来のペプチドの一部は主要組織適合性複合体(MHC)クラスI分子と複合体(pMHC)を形成した後、がん細胞の表面上で抗原提示され、それらのpMHC分子を認識するT細胞受容体(TCR)を細胞表面に発現する細胞障害性T細胞(CTL)によって、極めて効果的に腫瘍細胞の除去が引き起こされるということが明らかにされた。それを応用したのが、がんワクチン療法である。がんワクチン療法では、がん抗原由来のペプチドをがん患者に投与し、MHC上に抗原提示させることで、がん細胞を攻撃するT細胞を活性化し、がんの除去を目指す手法である。しかし、がんワクチン療法は能動免疫療法であるが故に、そのようながん抗原由来のpMHCに対する特異的なCTLが誘導されるか否かによって治療効果に大きな差違がもたらされる。そこで、もし任意のがん抗原由来ペプチドとMHCクラスI分子との複合体を選択的に認識するTCRと類似した特性を有するTCR様抗体を効率よく開発することができれば、この抗体をキメラ抗原受容体(Chimeric Antigen Receptor; CAR)の標的認識用の抗体や、T細胞誘引型二種特異性抗体(Bi-specific T-cell engager; BiTE)の作製に応用することで、T細胞にがん抗原由来のpMHCを認識させ、同時にそのT細胞を活性化することで、がん細胞やがん幹細胞を特異的に攻撃する、受動免疫型の治療法の開発が可能となると考えられた。

2. 研究の目的

われわれは、がん抗原の中には、がん細胞のみならず、がん幹細胞においても同様に発現しているものが存在することを見いだした。しかし、これらのがん抗原は細胞内でしか発現しておらず、従来の手法では抗体による

標的化が困難であった。そこで本課題では、既知のがん抗原の中から、このような、がん細胞とがん幹細胞の両者で発現する抗原を選定し、TCR様抗体の取得法を行うことで、がん細胞とがん幹細胞を同時に標的化できるTCR様抗体取得法の開発を目的に研究を行った。

3. 研究の方法

抗原で免疫された実験動物からリンパ球を含む細胞集団を採取し、セルソーターを用いて抗原特異的抗体産生細胞を単一細胞として分離した。次に、懸垂液滴アレイ式磁気ビーズ反応(MAGrahd)法と命名した手法を用いて、得られた多数の単一細胞から5' RACE用のcDNAを自動合成した。このcDNAを鋳型に5' RACE法を適用し、免疫グロブリン軽鎖ならびに重鎖可変領域の増幅をそれぞれ行った。得られた抗体可変領域遺伝子断片を用いて、抗体定常領域とポリA付加シグナルならびにプロモーター配列を含む直鎖状DNA断片との間で、独自開発の標的配列選択的連結PCR(TS-jPCR)法を適用し、一切の精製や大腸菌を介したクローニング操作なしに、プロモーター、抗体可変領域、抗体定常領域、ポリA付加シグナルの順で正確に配置された、直鎖状二本鎖DNA分子からなる抗体発現ユニットを、重鎖と軽鎖についてそれぞれ作製した。

得られた発現ユニットを293FT細胞株へ遺伝子導入し2日間培養を行い、培養上清中に分泌された抗体について、ELISA法を用いて抗原との結合能を解析した。さらに各抗体クローンの特異性を解析するため、TAP遺伝子の欠損により小胞体に抗原ペプチドが運ばれず、細胞表面に抗原ペプチドを載せていないMHCクラスI分子を発現することで知られるT2細胞株を用いて、培地中に様々なクラスI拘束性の抗原ペプチドを加えることで、T2細胞の表面上で種々のpMHCを形成させ、この複合体に対する、各抗体クローンの反応性を解析した。

次に、各抗体クローンのエピトープを決定するため、がん抗原由来のペプチドの配列を1アミノ酸ずつGlyまたはAla残基に変化させたペプチドを用いて、T2細胞上でpMHC形成させた後、これらの複合体に対する各抗体クローンの反応性を解析した(GlyスキャンまたはAlaスキャン)。

また、各抗体クローンのがん抗原由来pMHCに対する親和性を測定するためBiacore装置を用いた解析を行った。

4. 研究成果

(1) 標的がん抗原の選択

既知のがん抗原の中から、がん幹細胞でも発現している抗原を選定するため、がん細胞株よりALDH2強陽性、CD133またはCD44 v8-10陽性の細胞集団をソーティングし、この細胞

に対し、がん抗原に対する抗体を用いた免疫染色法を行い、がん細胞のみならず、がん幹細胞でも発現している、がん抗原を1種類選択した。

(2) TCR 様抗体クローンの単離

選択されたがん抗原に由来するペプチドと HLA-A の pMHC を認識する抗体を多数単離した。得られたクローンの中から、ELISA 法を用いて、共通の HLA 上に異なるペプチドが載っている複合体には反応せず、抗原由来ペプチドが載った複合体とのみ反応するクローンの選択を行った。その結果、抗原と高い特異性で反応するクローンを4クローン単離した。

(3) 各抗体クローンの特異性解析

T2細胞表面上で発現している空の HLA 分子上に、各種抗原ペプチドを添加することで形成させた pMHC に対する各抗体クローンの反応性を解析し、より特異的な反応性を示す抗体クローンを選別した。その結果 T2 細胞表面上で形成させた、がん抗原由来ペプチドと HLA の複合体だけを、特異的に認識する抗体を3クローン得ることに成功した。

(4) 各抗体クローンのエピートブ解析

高い特異性を示した各抗体クローンについて、T2 細胞株を用いたがん抗原と HLA の pMHC に対する Gly スキャンならびに Ala スキャンを行った。その結果、高い特異性を示した3つの抗体クローンはいずれも、がん抗原由来ペプチドの配列の中の概ね5箇所のアミノ酸残基が認識に必須であることが明らかとなった。

(5) 抗体親和性解析

Biacore 装置を用いて、がん抗原由来 pMHC に対する各抗体クローンの親和性を解析した。その結果、各抗体クローンは数 nM 程度の KD 値を示した。

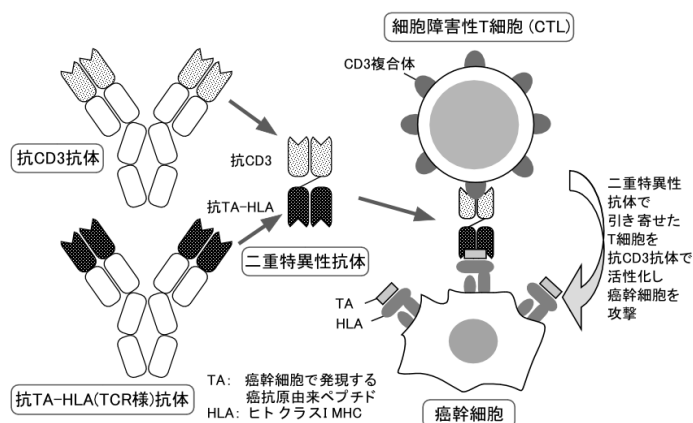
本研究の結果、高い特異性と親和性を兼ね備えた TCR 様抗体クローンの取得に成功した。これらの結果は、従来法によって取得が極めて困難であると考えられてきた TCR 様抗体の取得に、本抗体単離システムが非常に有用であることを示しており、がん幹細胞を標的とする TCR 様抗体の取得に大きな力を発揮すると期待される。

MHC クラス I 分子には多数の多型が存在する。ヒトの HLA-A 分子にも数多くの多型が存在する。そのため TCR 様抗体を用いた治療用抗体は、各個人の HLA-A 型ごとに TCR 様抗体を開発する必要がある。しかしながら、日本人集団では、HLA-A*24:02 と HLA-A*02 の遺伝子頻度が高く、それぞれ 36.1% と 24% を占める。したがって、これら2種類の HLA-A 多型をカバーする TCR 様抗体を準備すれば、約半数の日本人に適用可能な、がん幹細胞を標

的とする TCR 様抗体を用意できると考えられる。

抗体の標的となる抗原ペプチドを提示する MHC 分子は細胞表面に極わずかしかないことから、TCR 様抗体の効果を発揮させるためには、下図に示すように、目的のがん抗原を提示した pMHC に対する TCR 様抗体と抗 CD3 抗体とを結合させた二重特異性抗体を介した活性化 T 細胞の標的細胞への誘引が高い細胞障害活性を得るために必須であると考えられる。したがって、今回取得に成功した抗体についても、この手法を適用し、がん細胞とがん幹細胞に対する細胞障害活性を調べる予定である。

TCR様抗体を用いたCTL誘引型癌幹細胞攻撃法の原理



がん幹細胞とがん細胞の両者を標的とできる TCR 様抗体の実用的取得法の開発に道を開いた本研究の成果は、次世代の革新的がん治療薬の開発に大いに貢献すると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Novel method for the high-throughput production of phosphorylation site-specific monoclonal antibodies. Nobuyuki Kurosawa, Yuka Wakata, Tomonao Inobe, Haruki Kitamura, Megumi Yoshioka, Shun Matsuzawa, Yoshihiro Kishi & Masaharu Isobe Scientific Reports 6, Article number: 25174 (2016) : doi:10.1038/srep25174 PMID: 27125496

[学会発表](計 3 件)

第68回日本生物工学会 「テンプレートスイッチ反応と懸垂液滴アレイ式磁気ビーズ反応法を用いた抗体 cDNA 迅速合成システムの開発」 松原 悠紀、黒澤 信幸、磯部 正治 平成 28 年 9 月 30 日(富山市)

第 68 回日本生物工学会 「形質細胞内発現抗体を利用した抗原特異的モノクローナル抗体新規単離法(FIXAA)の開発」 塚本 薫、黒澤 信幸、磯部 正治 平成 28 年 9 月 30 日 (富山市)

第 68 回日本生物工学会 「取得困難な修飾部位特異的モノクローナル抗体の新規効率的作製法の開発」 藤 聡志、黒澤 信幸、磯部 正治 平成 28 年 9 月 30 日 (富山市)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：抗原特異的モノクローナル抗体作製方法

発明者：黒澤信幸、磯部正治

権利者：国立大学法人富山大学

種類：PCT 出願

番号：PCT/JP2016/73664

出願年月日：平成 28 年 8 月 10 日

国内外の別：国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯部 正治 (Isobe, Masaharu)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・

教授

研究者番号： 70211050