

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：34417

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19424

研究課題名(和文)大腸がんに対する新規抗体医薬の開発を目指す標的分子の同定と立体構造基盤の構築

研究課題名(英文) Identification of target molecules aiming at development of new antibody medicine for colon cancer using structure biology

研究代表者

小林 拓也 (KOBAYASHI, Takuya)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：20311730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：大腸がん発生と悪性化に関与する既知ドライバー遺伝子数種類を組み合わせ導入したマウスモデルを作製し、大腸がん細胞の悪性化形質や転移能獲得にはApc、Kras、Tgfbr2 変異の組み合わせが重要である。これらのドライバー遺伝子すべてに変異が蓄積した大腸がんオルガノイドは、複数の膜タンパク質の発現亢進が顕著である。また、shRNAによる発現抑制実験等から大腸がん悪性化進展機構に特定の膜タンパク質の機能・相互作用が必須であった。そこで、腫瘍組織を抗原として使うのではなく、大腸がん転移抑制のための創薬標的候補として挙げられた膜タンパク質を絞り込み、機能性抗体作製およびX線結晶構造解析を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、治療薬の開発に強い社会的有用性のある「大腸がん」をモデルとした抗体医薬開発のための新しいシステムを立ち上げ、抗体医薬とターゲット分子の結合様式を原子レベルで理解するための技術基盤を構築する。一般的な創薬開発では、(1)標的分子を同定しアッセイ系を構築する、(2)リード化合物を探索し、(3)リード化合物の最適化を試みる。しかし、これら一連の過程は時間と労力がかかり成功する可能性も低い。そこで、抗体医薬の可能性のある抗体をスクリーニングし、「結晶化シャペロン」として構造解析に利用することで、新規抗体医薬の探索及びその分子メカニズムが解明され、抗体医薬の低分子化も実現可能となる。

研究成果の概要(英文)：Colorectal cancer is driven by the accumulation of driver mutations, but the contributions of specific mutations to different steps in malignant progression are not fully understood. Different combinations of key colorectal cancer driver mutations (Apc, Kras, Tgfbr2, Trp53, Fbxw7) in intestinal epithelial cells to comprehensively investigate their roles in the development of primary tumors and metastases. RNA sequencing analysis of tumor organoids defined distinct gene expression profiles characteristic for the respective combinations of driver mutations. We found many membrane proteins upregulated in tumor organoids. We have been trying to develop the monoclonal antibody recognizing the conformational epitope against these membrane proteins and determine the structure of these membrane proteins.

研究分野：生化学、構造生物学

キーワード：大腸がん 転移 膜タンパク質 機能性抗体 オルガノイド 抗体医薬 創薬 構造解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究では、治療薬の開発に強い社会的有用性のある「大腸がん」をモデルとした抗体医薬開発のための新しいシステムを立ち上げ、抗体医薬とターゲット分子の結合様式を原子レベルで理解するための技術基盤を構築する。市販されている医薬の7割程度が膜タンパク質を標的としている。一般的な創薬開発では、多数存在する膜タンパク質の中から(1)標的分子を同定し、アッセイ系を構築する、(2)リード化合物を探索し、(3)リード化合物の最適化を試みる。しかし、これら一連の過程は、非常に時間と労力がかかるうえ、成功する可能性も低い、失敗すればもう一度標的分子を探索する必要がある(ボトルネック)(図1)。そこで、抗体医薬の可能性のある抗体をスクリーニングし、本抗体を構造解析のための「結晶化シャペロン」として利用することが可能になれば、新規抗体医薬の探索及びその分子メカニズムが解明され、抗体医薬の低分子化も実現可能となる。実現すれば、将来、最短期間で確実に臨床試験に向けた開発研究へと進むことが期待される。

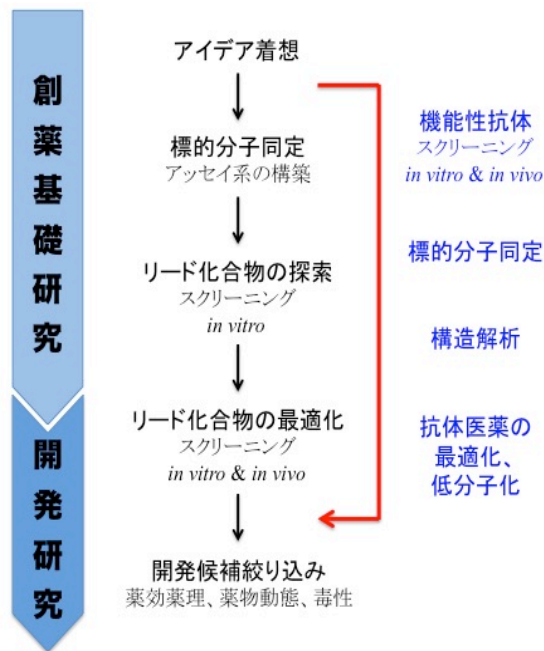


図1. 本研究の目指す新薬開発のプロセス

2. 研究の目的

本研究の目的は、抗体医薬等を開発するために、「大腸がん」をモデルとして、革新的な戦略システムを構築することにある。大腸がんオルガノイド由来腫瘍組織とは、ヒト大腸がんを高頻度に変異が認められる4種類のドライバー遺伝子(Apc, Kras, Tgfbr2, Trp53)に変異を導入し、三次元培養した細胞を免疫不全マウスに移植して、ヒト大腸がん極めて近い病態を再現したものである。このように創成した腫瘍と(報告者らが開発した)抗体作製技術を組み合わせる。獲得した立体構造認識抗体の中から *in vivo*において、「大腸がん」の発生・転移を抑制する機能制御抗体を探索する。抑制効果のあった抗体については、そのターゲット分子を同定し、ターゲット分子/抗体の結晶化及び構造解析を試みる。機能制御抗体の結合様式を原子レベルで解明することにより、抗体医薬の最適化や低分子化を実現することが可能になる。また、ここで取得した抗体は、肝臓転移腫瘍組織の組織学的な解析などにも使用することができる他、「大腸がん」の発生・転移に関与するターゲット分子の同定は、疾病発症のメカニズム解明にも寄与する。さらに、その他のがん(乳がん、前立腺がん、膵がんなど)の治療薬開発にも適応範囲を広げることが期待される。

3. 研究の方法

研究の全体計画と研究体制を図2にまとめる。マウス腸管オルガノイドは、ヒト大腸がんを高頻度に変異が認められる4種類のドライバー遺伝子(Apc, Kras, Tgfbr2, Trp53)を組み合わせることで発生する腸管腫瘍である。樹立したオルガノイドを同系マウスやNOGマウス(完全免疫不全マウス)の腸管あるいは脾臓に移植することで、ヒト大腸がんの原発巣およ

び肝転移に極めて近い病態を再現することができる。このマウス由来オルガノイドシステムを用いて、構造解析にも使用できる立体構造認識抗体を取得する。創薬のターゲットの7割が膜タンパク質であるということに注目し、腫瘍組織（原発巣、転移巣）を摘出して、膜画分を調整した後、界面活性剤で可溶化する。摘出した腫瘍組織は、研究協力者の大島正伸（金沢大）が提供する。超遠心機で不溶性画分を除いた後、ホスファチジルコリンと *Salmonella* 菌

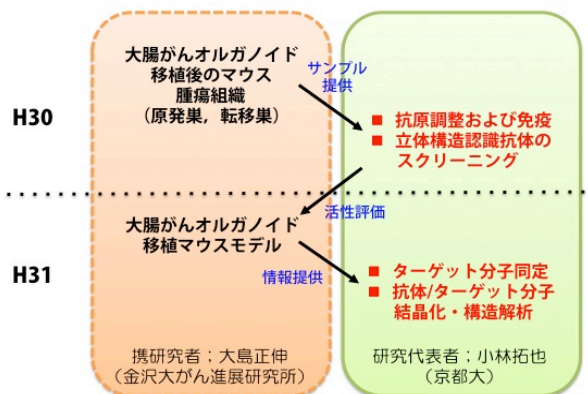


図2. 研究の全体計画と研究体制

由来の lipid A と共に再構成したプロテオリポソームを抗原としてマウス腹腔内に複数回投与する。リポソーム抗原を用いた場合、lipid A が強い免疫刺激を与えて抗原性を増強するとともに、特に B 細胞抗原受容体に対して未変性の膜タンパク質表面の立体構造を有効に提示できるため、所望の抗体が産生されやすい。マウスが自己のタンパク質として抗原のホモログを持っている場合には、BALB/c マウスではなく lpr 系統などの自己免疫疾患マウスに免疫し、免疫寛容を回避する。スクリーニング工程では、可溶化した腫瘍組織をビオチン化脂質含有リポソーム中に再構成した上で、安定かつ強固にストレプトアビジン-マイクロプレートのウェルに固定化した抗原を用いて ELISA (リポソーム ELISA) を行う (図3)。リポソーム ELISA 法では陽性、ウェスタンあるいはドットブロット法では陰性となるクローンを選抜することにより、膜タンパク質の部分ペプチド配列ではなく、立体構造を認識する抗体を 20 種類以上選抜する。2018 年度は、上記の実験を 3 回以上繰り返す。

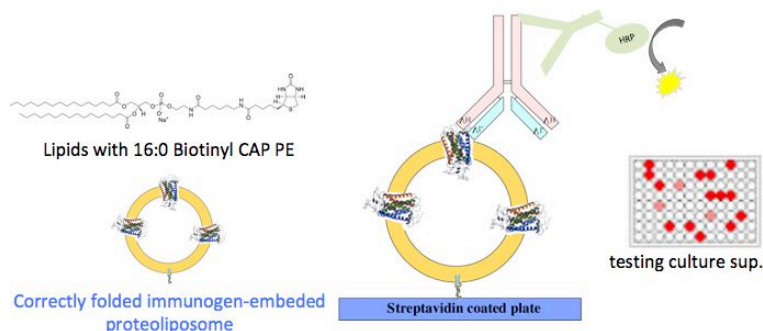


図3. リポソーム ELISA 法の概略図

2019 年度は、研究協力者の大島正伸（金沢大）が開発した大腸がんオルガノイド移植マウスモデルにおいて、立体構造認識抗体の中から、大腸がんの増殖、転移などを抑える機能制御抗体が含まれているか否かを評価する。最初は、全ての抗体（20 種類以上）を同時にマウスに腹腔内投与し、効果が認められた場合は、サブグループに分けて再評価し、抗体を絞り込む。活性が認められた抗体は、免疫沈降、質量分析などにより結合するターゲット分子を同定する。次に、ターゲット分子の発現系を立ち上げ、抗体/ターゲット分子の共結晶化を行う。高分解能結晶が得られた場合は、構造解析へと進める。本抗体を「結晶化シャペロン」として利用することで、結晶化を加速すると共に結合様式から抗体医薬の低分子化を目指したい。研究期間中までに、少なくとも 2~3 種類の共結晶化をスタートする。

4. 研究成果

大腸がん発生と悪性化に関与する既知ドライバー遺伝子数種類を組み合わせ導入したマウスモデルを作製し、大腸がん細胞の悪性化形質や転移能獲得には Apc、Kras、Tgfr2 変異の組み合わせが重要であることを明らかにした (Cancer Res, 2018)。これらのドライバー遺伝子す

べてに変異が蓄積した大腸がんオルガノイドでは、複数の膜タンパク質の発現亢進が顕著であることが明らかとなった。また、shRNAによる発現抑制実験等から大腸がん悪性化進展機構に特定の膜タンパク質の機能・相互作用が必須であることが証明された。そこで、腫瘍組織を抗原として使うのではなく、大腸がん転移抑制のための創薬標的候補として挙げられた膜タンパク質を絞り込み、機能性抗体作製およびX線結晶構造解析を実施することにした。まず初めに、昆虫細胞 Sf9 発現系を用いた膜タンパク質の大量発現・精製法を確立した。一例として膜タンパク質 A に関して、最終精製物のゲル濾過クロマトグラフィーは良好（分子サイズ分布は単分散）で、精製品の SDS-PAGE 泳動像も単一バンドであった（精製収量 2.5 mg/L）。次に、膜タンパク質 A の高品質精製標品および我々が独自に開発した抗体スクリーニング技術（リポソーム免疫、リポソーム ELISA、蛍光ゲル濾過分析等）を用いて、膜タンパク質 A に対する立体構造認識抗体（膜タンパク質の部分ペプチド配列ではなく、膜タンパク質の親水性表面の立体構造を特異的に認識し結合するモノクローナル抗体）を 5 株取得した。さらに、当該抗体が膜タンパク質の細胞外ドメイン／細胞外ドメインのいずれに結合しているかを識別する新技術を確立し、それを用いて少なくとも 3 株が細胞外ドメインの立体構造に結合する（すなわち、抗体医薬候補として有望である）ことを明らかにした。当該抗体のエピトープ解析を進めているが、1 株の抗体はエピトープが LEL (long extracellular loop; 細胞外第二ループ) の立体構造であることが明らかになっている。さらに、取得した抗体を大量生産し、Fab 抗体フラグメントを調製した。膜タンパク質 A/Fab フラグメント複合体の精製品を調製し、この試料を用いて脂質キュービック相結晶化法により結晶化条件のスクリーニングを実施中であるが、現在のところはまだ結晶が得られていない。結晶化実験と並行して、膜タンパク質 A/Fab フラグメント複合体を脂質ナノディスクに再構成し、クライオ電子顕微鏡単粒子解析のための試料調製を進めている。また、取得した抗体の薬理活性評価に必要な大腸がんオルガノイドを用いた実験系を確立した。*in vitro* 薬理活性評価（高転移性オルガノイドの培地に抗体を添加することによる増殖阻害効果、形態変化、浸潤能の変化を観察）と *in vivo* 薬理活性評価（高転移性オルガノイドをマウス脾臓に移植後に抗体投与による治療実験）を実施可能である。転移抑制が観察される場合、どこに効いているのか（colonization、expansion、間質形成能など）を組織学的に見極めることができる。今後、取得した抗体 IgG の精製品を用いて、大腸がん転移抑制の薬理効果の有無を解析する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Toyoda Y, Morimoto K, Suno R, Horita S, Yamashita K, Hirata K, Sekiguchi Y, Yasuda S, Shiroishi M, Shimizu T, Urushibata Y, Kajiwara Y, Inazumi T, Hotta Y, Asada H, Nakane T, Shiimura Y, Nakagita T, Tsuge K, Kobayashi T et al,	4. 巻 15
2. 論文標題 Ligand binding to human prostaglandin E receptor EP4 at the lipid-bilayer interface.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature chemical biology	6. 最初と最後の頁 18-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morimoto K, Suno R, Hotta Y, Yamashita K, Hirata K, Yamamoto M, Narumiya S, Iwata S, Kobayashi T	4. 巻 15
2. 論文標題 Crystal structure of the endogenous agonist-bound prostanoid receptor EP3.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature chemical biology	6. 最初と最後の頁 8-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suno R, Lee S, Maeda S, Yasuda S, Yamashita K, Hirata K, Horita S, Tawaramoto MS, Tsujimoto H, Murata T, Kinoshita M, Yamamoto M, Kobilka BK, Vaidehi N, Iwata S, Kobayashi T	4. 巻 14
2. 論文標題 Structural insights into the subtype-selective antagonist binding to the M2 muscarinic receptor.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature chemical biology	6. 最初と最後の頁 1150-1158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Asada H, Horita S, Hirata K, Shiroishi M, Shiimura Y, Iwanari H, Hamakubo T, Shimamura T, Nomura N, Kusano-Arai O, Uemura T, Suno C, Kobayashi T, Iwata S.	4. 巻 25
2. 論文標題 Crystal structure of the human angiotensin II type 2 receptor bound to an angiotensin II analog.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature structural & molecular biology	6. 最初と最後の頁 570-576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakagita T, Ishida A, Matsuya T, Kobayashi T, Narukawa M, Hirokawa T, Hashimoto M, Misaka T.	4. 巻 14
2. 論文標題 Structural insights into the differences among lactisole derivatives in inhibitory mechanisms against the human sweet taste receptor.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PloS one	6. 最初と最後の頁 e0213552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hatae H, Inaka K, Okamura R, Furubayashi N, Kamo M, Kobayashi T, Abe Y, Iwata S, Hamasaki N	4. 巻 559
2. 論文標題 Crystallization of Human Erythrocyte Band 3, the anion exchanger, at the International Space Station "KIBO".	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Analytical biochemistry	6. 最初と最後の頁 91-93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida S, Kuribara T, Morita T, Matsuzawa T, Morimoto K, Kobayashi T, Hosoya T	4. 巻 8
2. 論文標題 Expanding the synthesizable multisubstituted benzo[b]thiophenes via 6,7-thienobenzynes generated from o-silylaryl triflate-type precursors.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 RSC advances	6. 最初と最後の頁 21754-21758
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katayama Kota, Suzuki Kohei, Suno Ryoji, Tsujimoto Hirokazu, Iwata So, Kobayashi Takuya, Kandori Hideki	4. 巻 10
2. 論文標題 Ligand Binding-Induced Structural Changes in the M2 Muscarinic Acetylcholine Receptor Revealed by Vibrational Spectroscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 7270 ~ 7276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.9b02942	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中北 智哉、成川 真隆、小林 拓也、三坂 巧
2. 発表標題 1. 抗炎症剤イブプロフェンは甘味受容体の強力な阻害剤である
3. 学会等名 日本味と匂学会第52回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中北 智哉、竹谷 千晶、成川 真隆、小林 拓也、三坂 巧
2. 発表標題 2. 抗炎症剤イブプロフェンの甘味受容体に対する阻害剤としての作用機構解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片野泰代、今野幸太郎、西田和彦、渡辺雅彦、崎村建司、小林拓也、伊藤誠二
2. 発表標題 脊髄後角における疼痛関連タンパクBEGAIN陽性細胞の機能的特徴
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会 / 第62回日本神経化学大会 / NEURO2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----