

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(開拓)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K20599

研究課題名(和文)革新的抗がん抗体開発スキームの確立

研究課題名(英文) Establishment of innovative development scheme of anti-cancer antibody

研究代表者

松田 知成 (Matsuda, Tomonari)

京都大学・工学研究科・准教授

研究者番号：50273488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗がん抗体はCAR-T細胞療法など未来の癌治療に欠かせない存在である。しかし、魅力的なターゲット分子の枯渇により、新規抗がん抗体の開発は停滞している。われわれは独自の抗体スクリーニング法「抗体配列進化追跡法」を用いて、癌患者の血液解析により抗がん抗体を取得することを目指して研究を行った。本研究ではまず、抗体配列進化追跡法の解析アルゴリズムに改良を加え、少ない計算量でより正確にヒット抗体を同定できるようにした。また、抗体の重鎖と軽鎖の組合せ決定法の開発を行った。これら方法を用いて、放射線治療を受ける食道癌患者の血液から、17種類の抗癌抗体候補の配列を取得し、試作した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が目指すのは、クリニカルバイオバンクなどに保管されている癌患者の血液や癌組織から直接有用な抗癌抗体を数多く取得する体制を整えることである。本研究により抗体配列進化追跡法による抗癌抗体開発スキームを一通り実施し、改良を加えたことにより、本開発スキームが実用化に一步近づいたと言える。本方法の最大の特徴は抗体開発に抗原を用いないことであり、ターゲット分子がわからなくても抗癌抗体が取れることである。今後、この抗体を用いて癌抗原を濃縮、決定する方法を開発することで、癌の新たな創薬ターゲットの発見も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Anticancer antibodies are essential for future cancer therapies such as CAR-T cell therapy. However, the development of new anti-cancer antibodies has stagnated due to the lack of attractive target molecules. We conducted a study to obtain anti-cancer antibodies by analyzing blood samples from cancer patients using our original antibody screening method, "Tracing Evolution of Antibody along time course (TEA-time)". In this study, we first improved the analysis algorithm of the TEA-time method to more accurately identify hit antibodies with fewer calculations. We also developed a method for determining the combination of heavy and light chains of antibodies. Using these methods, we obtained the sequences of 17 anti-cancer antibody candidates from the blood of esophageal cancer patients undergoing radiotherapy and produced a prototype.

研究分野：環境毒性学

キーワード：抗体配列進化追跡法 抗体親和性成熟 癌抗体 抗体スクリーニング 抗体レパトア解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗がん抗体は CAR-T 細胞療法など未来の癌治療に欠かせない存在である。しかし、魅力的なターゲット分子の枯渇により、新規抗がん抗体の開発は停滞している。

われわれが開発した抗体スクリーニング法「抗体配列進化追跡法」は、動物に抗原を免疫後、経時的な採血、次世代 DNA シーケンサー (NGS) による抗体配列解析のみで、ヒット抗体を予測する方法である。この方法を用いれば、ターゲット分子 (がん抗原) をあらかじめ決めることなく、癌患者の血液解析により抗がん抗体を取得できるかもしれない。

2. 研究の目的

本研究では、がん患者血液の解析により、抗癌抗体を取得する方法論を開発することを目的とした。具体的には、放射線治療を行う食道癌患者の血液中の抗体配列を経時的に解析し、抗体配列進化追跡法を用いて、癌抗体候補の配列を取得しようというものである。解決すべき課題としては、重鎖・軽鎖の組み合わせ決定法の開発、がん抗原特定法が挙げられる。

3. 研究の方法

(1) 放射線治療を受ける食道癌患者の血液採取

われわれは、もしも癌の免疫応答が起きるタイミングで癌患者の血液を採取できれば、抗体配列進化追跡法により抗がん抗体配列を取得できるのではないかと考えた。そこで着目したのが、放射線治療におけるアプスコパル効果である。放射線を癌に照射すると非照射の遠隔転移がんの病巣まで縮退することがある。これは、放射線照射によって癌抗原が露出し、免疫が活性化するためであると考えられている。

放射線治療中の食道がん患者の血液を、放射線の照射前、照射期間中、および照射終了後 1 週間のタイミングで、約 1 週間おきに 6 回採血を行い、速やかに末梢血単核球 (PBMC) を単離し、そのうち 9 割は RNA 抽出に用い、残り 1 割は重鎖・軽鎖組み合わせ実験用にそのまま凍結保存した。

(2) 抗体配列進化追跡法

がん患者血液の mRNA を逆転写し、抗体の各サブタイプを PCR で増幅し、次世代 DNA シーケンサー-Miseq を用いてシーケンスし、抗体配列可変領域の配列を取得した。このデータを用いて抗体配列進化追跡法で解析し、放射線治療により、親和性成熟が進行しているヒット抗体クラスターを予測した。

(3) 重鎖・軽鎖組み合わせの決定

重鎖と軽鎖の組み合わせを決定するため、限界希釈法を用いた。すなわち、PBMC を平均 100 細胞程度になるように 96 ウェルプレートに分注し、それぞれのウェルで RNA 抽出、逆転写、抗体配列の PCR 増幅を行い、Miseq でシーケンスを行った。これにより、各ウェルで数種類の重鎖・軽鎖の配列が出現するが、複数のウェルにおける組合せ情報と、バルク解析における各抗体の出現頻度の情報と合わせて、組み合わせを決定した。

4. 研究成果

(1) 抗体配列進化追跡法の改良

抗体配列進化追跡法では、まず、数十万ある抗体レパトア配列の分子系統樹を作り、よく似た配列のかたまり (抗体クラスター) を、計算により取得する。その後、各抗体クラスターについて、抗体の親和性成熟が進行中の抗体クラスターに特徴が一致するかどうか評価を行う。本研究では、抗体クラスター取得のプロセスに改良を加え、少ない計算量で、正確なクラスター分離を実現した。これにより、ヒットクラスターの同定精度が向上した。

(2) 重鎖・軽鎖組み合わせ決定法の開発

これまでに、我々は抗体配列進化追跡法をアルパカの重鎖抗体開発に適用し、その有用性を実証してきたが、通常抗体にこの方法を適用するためには重鎖と軽鎖の組み合わせを決定する必要がある。本研究では、まず、数百万個の PBMC から mRNA を抽出して抗体遺伝子解析を行うバルク解析により、重鎖と軽鎖の抗体クラスターの、各サンプリングタイミングにおける出現頻度と、細胞を 96 ウェルプレートに希釈して分注し、各ウェルの重鎖・軽鎖組み合わせの情報を合わせて、ヒット抗体の重鎖・軽鎖の組み合わせを決定する方法を作り、後述するヒトサンプルの解析に適用した。この方法でも、出現頻度の高い幾つかの抗体については重鎖・軽鎖の組み合わせを決定することができたが、出現頻度の低い抗体について組み合わせを決定するのは困難であった。

そこで、より効率よく重鎖・軽鎖の組み合わせを決定するため split-pool-barcoding 法を抗体解析にアレンジした方法を考案した。この方法は、一種の単一細胞 RNA シーケンスであり、

in situ で細胞の mRNA を逆転写し、逆転写プライマーにライゲーションにより、細胞特異的バーコードをつけていく方法である。細胞を 96 ウェルプレートに分注 (split) し、それぞれのウェルで異なるバーコードをライゲーションし、再び一つにまとめる (pool) ことを 3 回繰り返すことにより、96 の 3 乗通りのバーコードを細胞に付加することが可能である。

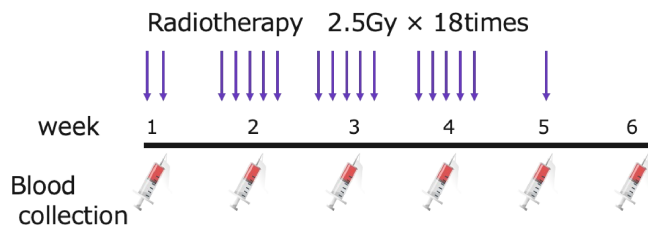


図1 放射線治療における照射と採血のタイミング

これを次世代 DNA シーケンサーで解析した後、細胞特異的バーコードに分割し、細胞毎の抗体配列を確認することが可能である。この方法をウサギの PBMC に適用したところ、バーコード付加は一応成功した。しかしながら、その効率はあまり高くなく、その理由を検討したところ、ホルマリンによる細胞固定による RNA のダメージが考えられた。この問題を解決し効率を上げることが今後の課題である。

(3) ヒト癌患者血液の解析

放射線治療を受ける食道癌患者 4 名について、図 1 のような、放射線照射と採血のスケジュールで採血を行い、血液中の抗体配列の解析を行った。

放射線治療の効果は、患者によってまちまちであり、たとえば図 2 に示す例では患者 01 は放射線治療の効果が高く、予後が良かったが、患者 02 では効果がなく、予後が悪かった。

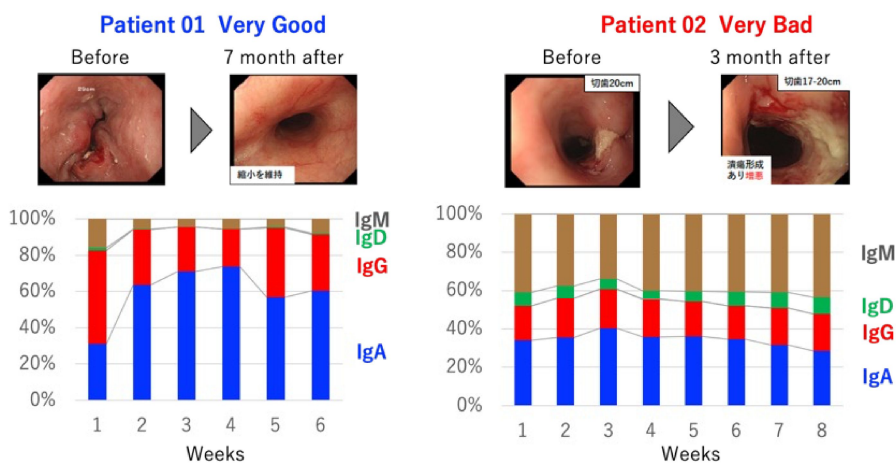


図2 放射線治療の予後と抗体産生の関係

調べた 4 例の患者のうち、2 例は放射線治療がよく効き、2 例はあまり効かなかった。放射線治療の効果が高かった患者では、そうでない患者と比較して、血中抗体レパートリーにおける IgA と IgG の割合が高く、時間経過とともにこれら抗体タイプの誘導が認められる傾向にあった。この結果だけから、これら抗体タイプの誘導が、がんの制御に役割を果たしていることを断定はできないが、それを示唆する結果である。

さらに、抗体配列進化追跡法を用いて、放射線照射により、親和性成熟が進行していると思われる抗体クラスターの解析を行った。図 3 にその一例を示す。これらヒットクラスターについて、重鎖と軽鎖の組み合わせを決めたところ、放射線治療がよく効いた患者 2 名から、それぞれ 11 種類と 6 種類の抗体配列を決定した。

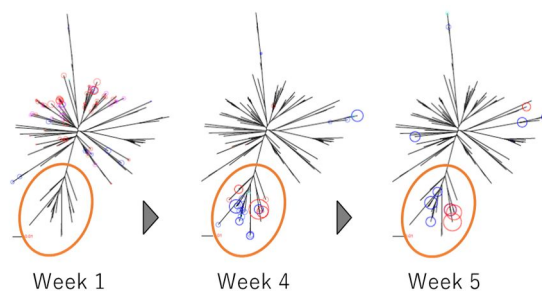


図3 ヒットクラスターの一例

これら抗体を試作するため、重鎖と軽鎖の人工遺伝子合成を行い、ヒト培養細胞株にトランスフェクトして Fab 抗体を試作した。得られた Fab 抗体について、癌組織アレイや培養細胞株の免疫染色によるスクリーニングを行ったが、実験上の困難も多く、未だ癌を特異的に染める抗体は得られていない。今後は、より効率の良い重鎖・軽鎖の組み合わせ決定法を実用化し、出現頻度の低いヒットクラスターの抗体を取得することと、確実性の高い抗体評価方法の開発が課題となる。

以上まとめると、本研究では抗体配列進化追跡法を用いて、癌患者の血液解析から抗癌抗体を取得する一連のプロトコルを実施した。今後はさらに改良を重ね、多くの有用な抗癌抗体を取得することを目指す。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Lim SY, Yamaguchi K, Itakura M, Chikazawa M, Matsuda T, Uchida K.	4. 巻 298
2. 論文標題 Unique B-1 cells specific for both N-pyrrolylated proteins and DNA evolve with apolipoprotein E deficiency.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 101582
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.101582	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松田知成
2. 発表標題 抗体配列進化追跡による画期的抗体スクリーニング法の開発
3. 学会等名 日本環境変異原ゲノム学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田知成
2. 発表標題 抗原に依存しない抗体スクリーニング法
3. 学会等名 日本抗体学会（招待講演）
4. 発表年 2022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
研究分担者	大橋 真也 (Ohashi Shinya) (20435556)	京都大学・医学研究科・特定准教授 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	武藤 学 (Muto Manabu) (40360698)	京都大学・医学研究科・教授 (14301)	
研究分担者	萩原 義久 (Hagihara Yoshihisa) (50357761)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・副研究部門長 (82626)	
研究分担者	赤澤 陽子 (Akazawa Yoko) (50549897)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員 (82626)	
研究分担者	井倉 毅 (Ikura Tsuyoshi) (70335686)	京都大学・生命科学研究所・准教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関