

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32409

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19387

研究課題名（和文）核内へ移行するscFVモノクローナル抗体の開発研究

研究課題名（英文）Development of transportable scFV monoclonal antibody into nucleus

研究代表者

山田 健人（Yamada, Taketo）

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：60230463

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：モノクローナル抗体(MoAb)はバイオ医薬品の中で有望であるが、MoAb自体を核内に移行させる技術はなかった。そこで細胞膜から核移行する抗原の探索とそのMoAb作成を通じ、がん細胞でのMoAbの核内移行を解析した。細胞膜表面抗原に対するMoAbパネルおよびscFVライブラリーを用いて、MoAb処理後に核局在分子と抗原の核内共在を解析し、核内移行細胞膜表面抗原を選別した。その候補抗原を精製しマウスへ免疫後、蛍光分子付加ライブラリーを作成、クローンの選別を行い核内で抗原・抗体がする蛍光クローンを得た。その結果、13B1抗体はin vitroでがん細胞特異的に核内移行を示すことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

モノクローナル抗体(MoAb)はバイオ医薬品の中で有望であり、抗体-薬剤複合体(Antibody-Drug Conjugate;ADC)や二重特異性抗体へ発展を遂げている。しかし、これまでMoAb自体を核内に移行させる技術はなかった。MoAbを核内まで輸送させることができれば、ADC化や二重特異性抗体化により、これまで不可能であった核内への機能抗体/分子の核移行による核酸合成阻害や修復修飾、エンハンサー機能の修飾による転写調節、核輸送の促進・阻害などが可能となり、抗体治療の画期的技術革新になりうると考える。

研究成果の概要（英文）：Monoclonal antibodies (MoAbs) are promising biopharmaceuticals, however there was no technology to translocate MoAbs into the nucleus. We therefore analyzed the nuclear translocation of MoAbs in cancer cells by searching for antigens that translocate from the cell membrane to the nucleus and generating MoAbs. Using a MoAb panel and scFV library against cell membrane surface antigens, we analyzed the coexistence of nuclear localized molecules and antigens in the nucleus after MoAb treatment and selected cell membrane surface antigens that translocate into the nucleus. After immunizing mice with the purified candidate antigens, we created a fluorescent molecule-added library and selected clones to obtain fluorescent clones that interact with antigens and antibodies in the nucleus. As a result, it was revealed that the 13B1 antibody exhibits nuclear translocation in cancer cells specifically in vitro.

研究分野：分子病理学

キーワード：モノクローナル抗体 核内移行 single chain Fv がん細胞 免疫担当細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

核内に移行する細胞膜表面分子として、EGF 受容体、ErbB2、CD40、CD44 の報告があり、細胞外シグナル伝達分子の核内移行と転写への関与が報告されているが、いずれもリガンド依存性であり抗体による核移行の報告はない。応募者は、ヒトがん細胞において CD26 が核内に存在していることを見出し、この CD26 と抗 CD26 ヒト化モノクローナル抗体が、がん細胞の膜表面において抗原・抗体複合体を形成後に、カベオリン系エンドサイトーシスにより細胞質に移動し、さらにこの複合体が 1 時間以内に核内に移行することを明らかにした( )。さらに核輸送された CD26 は、RNA polymerase II (POL II) のサブユニット POLR2A の転写抑制を通じて、がん細胞の増殖抑制を引き起こすことを報告した( )。この CD26 と抗体の核移行には、CD26 c 末端領域が必須であり、またそのエピトープが CD26 中間域の限局した領域であることを見出した。これらの発見は抗体が抗原エピトープ依存的に核内に輸送されることを初めて明らかにしたものである。そこで本抗体にリンカーを介して抗がん分子を結合させた Antibody-Drug Conjugate (ADC) を合成したところ、抗がん分子を核内で効率よく作用させ、がん細胞の増殖を抑制することに成功した( )。しかし、この核移行抗体は偶然見出されたものであり、これらの研究の中から、1) 抗体の核移行の効率が低い、2) 抗原が限定されている、3) ADC ではライソゾームで薬剤が抗体と解離してしまう、などの問題点が明らかとなった。そこで、これらを解決するべく、1) 核移行する抗原の網羅的な探索によりライソゾームを経ずに後期エンドゾームから核へ(あるいは未知の経路で)移行する抗原を複数見出す、2) その scFV 抗体を作成し核移行を指標にスクリーニングする技法を開発する、ことで核内移行し核で機能する抗体を得ることを考案するに至った。

### 2. 研究の目的

モノクローナル抗体 (MoAb) はバイオ医薬品の中で有望であり、抗体-薬剤複合体 (Antibody-Drug Conjugate; ADC) や二重特異性抗体などへ発展を遂げてきている。治療用抗体は、投与後に血流から組織へ至り、細胞膜表面分子や細胞外分子に特異的に結合し、その効果を発揮する。また ADC では抗体に結合した薬剤が、細胞膜表面抗原と抗体とともに細胞質に運ばれ作用し、薬剤によってはさらに核内に移行することで効果を発揮する。しかし、これまで抗体自体を核内に移行させる技術はなかった。そこで、本研究では、1) 細胞膜から核内移行する抗原分子の探索とその MoAb 作成、2) 核内移行する MoAb スクリーニング法の開発とエピトープ解析、3) 免疫細胞、がん細胞での新規 MoAb の核内移行とその機能解析を行うものである。細胞膜表面分子が核内に移行する分子として、EGF 受容体、ErbB2、FGF 受容体、CD40 の報告があるが、抗体処理後の抗原と抗体の核移行についての報告はなく、これまでに細胞に作用させた抗体が核内で検出され、生物学的な作用を引き起こすという報告は、がん細胞での抗 CD26 抗体による細胞増殖抑制効果についての本研究者の報告のみである( )。しかしこの抗 CD26 抗体では、抗体の核移行が一部に限られ、その 80% は細胞質に止まる( )。抗体は細胞表面抗原に特異的に結合するため、抗体を核内まで輸送させることができれば、その ADC 化や二重特異性抗体化により、これまで不可能であった核内分子への機能抗体・分子の直接作用を利用した DNA の合成阻害や修復促進、エンハンサー機能の改変や阻害による

転写調節、核輸送の促進・阻害などが可能となる。また薬剤を効率よく核内輸送しうることで、標的到達性を飛躍的に上昇させることが可能となりうる。

### 3. 研究の方法

まず細胞膜から核内移行する抗原分子の探索とその MoAb 作成を行った。細胞膜表面抗原に対する MoAb パネルまたは single chain Fv(scFV)ライブラリー（大腸癌、リンパ球）を用いて、細胞を MoAb 処理後に核局在マーカー（核膜孔 Nup98、核膜 Lamin A、核スペckル SC35、核小体 Fibrillarlin、エンハンサー領域 RNA polymerase II）と抗原の核内共在を Duolink in situ 法で明らかにすることで、核内に移行し局在する細胞膜表面抗原を網羅的に選別する。候補抗原を Baculo ウイルス発現系で作出・精製し Balb/c マウスへ免疫後、蛍光分子付加ライブラリーを作成し、scFv クローンを得た。次に核内移行する MoAb スクリーニング法の開発とエピトープ解析を行った。上記の scFv クローンについて核内移行を指標にスクリーニングした。スクリーニングは、抗原発現細胞による CODEX technology 解析を用いて、抗原・抗体の核内共存クローンの反復選別を行い、さらに各種核局在マーカーとの核内共在を Duolink in situ 法にて確定した。得られた scFv クローンは抗原とその変異体との結合解析からエピトープマッピングを行った。最後にがん細胞での新規 MoAb の核内移行とその機能解析を行った。得られたクローンの中から、親和性や核移行効率が高いものについて、in vitro での抗原発現細胞（免疫担当細胞由来株、がん細胞株）における抗原/抗体の経時的局在変化と各細胞分画での測定を行った。

### 4. 研究成果

細胞膜表面抗原に対する MoAb パネルおよび single chain Fv(scFV)ライブラリー（大腸癌、リンパ球）を用いて、細胞を MoAb 処理後に核局在マーカー（核膜孔 Nup98、核膜 Lamin A、核スペckル SC35、核小体 Fibrillarlin、エンハンサー領域 RNA polymerase II）と抗原の核内共在を Duolink in situ 法で解析し、核内に移行し局在する細胞膜表面抗原を選別した。その候補抗原を Baculo ウイルス発現系で作出・精製し Balb/c マウスへ免疫後、蛍光分子付加ライブラリーを作成した。2023 年度は、scFv クローンの選別を行い、抗原発現細胞による CODEX technology 解析により、抗原・抗体の核内共存クローンの反復選別を行い、核内に同時に抗原・抗体の蛍光発色を示す scFv クローンを得た。このクローンのうち、13B1 抗体は in vitro でがん細胞特異的に核内移行を示すことが明らかとなった（図 1）。また予想外に抗体の核移行が確認されないものの抗原の核内移行を示すクローンも複数得られており（図 2）、今後、認識分子の同定とエピトープマッピングを通じて核内移行抗体の機能を明らかにする予定である。

図1 13B1抗体の細胞膜からの核移行

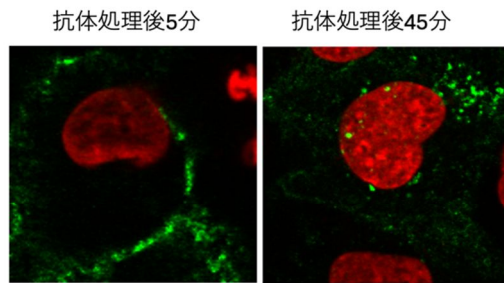
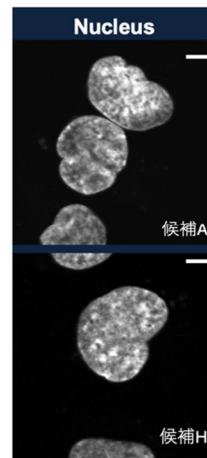


図1 クローン13B1抗体は、短時間で細胞膜から核内へ移行した。

図2 抗体の核移行が確認されないが、抗体処理後に抗原が核内に発現増強するクローンが複数得られた。

図2 核移行抗原の選別



### <引用文献>

Yamada K , Hayashi M , Du W , Ohnuma K , Sakamoto M , Morimoto C , Yamada T. Localization of CD26/DPPIV in nucleus and its nuclear translocation enhanced by anti-CD26 monoclonal antibody with anti-tumor effect. *Cancer Cell Int.*9:17,2009

Yamada K, Hayashi M, Madokoro H, Nishida H, Du W, Ohnuma K, Sakamoto M, Morimoto C, Yamada T. Nuclear Localization of CD26 Induced by a Humanized Monoclonal Antibody Inhibits Tumor Cell Growth by Modulating of POLR2A Transcription. *PLoS One.* 8 e62304, 2013

Hayashi M, Madokoro H, Yamada K, Nishida H, Morimoto C, Sakamoto M, Yanagawa H, Yamada T. Novel antibody-drug conjugate with anti-CD26 humanized monoclonal antibody and transcription factor IIH (TFIIH) inhibitor, triptolide, inhibits tumor growth via impairing mRNA synthesis. *Cancers* 11, 1138, 2019

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Okayama Mikio, Fujimori Kota, Sato Mariko, Samata Koichi, Kurita Koki, Sugiyama Hiromu, Suto Yutaka, Iwasaki Genji, Yamada Taketo, Kiuchi Fumiyuki, Ichikawa Daiju, Matsushita Maiko, Hirao Maki, Kunieda Hisako, Yamazaki Kohei, Hattori Yutaka	4. 巻 -
2. 論文標題 GTN057, a komaroviquinone derivative, induced myeloma cells' death in vivo and inhibited c-MET tyrosine kinase	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.5691	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 -

1. 著者名 Hatano Ryo, Itoh Takumi, Otsuka Haruna, Saeki Harumi, Yamamoto Ayako, Song Dan, Shirakawa Yuki, Iyama Satoshi, Sato Tsutomu, Iwao Noriaki, Harada Norihiro, Aune Thomas M., Dang Nam H., Kaneko Yutaro, Yamada Taketo, Morimoto Chikao, Ohnuma Kei	4. 巻 22
2. 論文標題 Humanized anti-IL-26 monoclonal antibody as a novel targeted therapy for chronic graft-versus-host disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Transplantation	6. 最初と最後の頁 2804 ~ 2820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ajt.17178	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 -

1. 著者名 Tsuchiya Tami, Saisho Yoshifumi, Inaishi Jun, Sasaki Hironobu, Sato Midori, Nishikawa Masaru, Masugi Yohei, Yamada Taketo, Itoh Hiroshi	4. 巻 69
2. 論文標題 Increased alpha cell to beta cell ratio in patients with pancreatic cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 1407 ~ 1414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ22-0170	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林 睦、間所裕子、坂元亨宇、山田健人
2. 発表標題 CD26陽性がんに対する新規抗体-抗がん剤結合分子ADCの開発
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
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	林 睦  (Hayashi Mutsumi)  (60327575)	埼玉医科大学・医学部・助教   (32409)	
研究 分担者	山田 幸司  (Yamada Koji)  (90570979)	東京慈恵会医科大学・医学部・准教授   (32651)	

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
---------	---------