

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19405

研究課題名（和文）生体内抗体医薬産生技術の開発とアルツハイマーへの治療応用

研究課題名（英文）Development of In Vivo Antibody Production Technology and Its Therapeutic Application for Alzheimer's Disease

研究代表者

鈴木 啓一郎（Suzuki, Keiichiro）

大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授

研究者番号：70433654

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、独自開発したHITI法を利用して、抗体やペプチドといったバイオ薬を発現する遺伝子を生体内の安全なゲノム部位に組み込み、1回の投与で継続的にアルツハイマー病（AD）に対するバイオ薬を自己製造できる技術の開発を目指した。まず、アルツハイマー病に有効な既存の抗A抗体薬を発現するベクターを開発し、ゲノム編集技術でゲノムDNAに組み込んだが、十分な抗体産生量が得られなかった。そこでゲノム編集に適した1本鎖抗体に改良した結果、ADの原因物質であるA凝集体に特異的に結合する機能を保持することが分かった。以上の成果により、生体内の持続的産生に適した抗A抗体発現ベクターの開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体薬を生体内の安全な場所で適切な時期・量を発現制御する必要があり様々な困難が予想されるが、本研究目標が達成されれば、糖尿病や血友病、癌、感染症など抗体医薬の存在する数多くの疾患に対して次世代の予防的治療法となるため、極めて大きな波及効果を考えている。

研究成果の概要（英文）：This study aims to develop a technology that uses the HITI method, an innovative genome editing technique we have developed, to integrate genes expressing biologics such as antibodies and peptides into safe genomic locations in the body. This technology aims to enable continuous self-production of biologics for Alzheimer's disease (AD) with a single administration. Initially, we developed a vector expressing an existing anti-A antibody effective against Alzheimer's disease and integrated it into the genome DNA using genome editing technology. However, the antibody production was insufficient. Therefore, we modified it into a single-chain antibody suitable for genome editing, which retained the function of specifically binding to A aggregates, the causative agents of AD. As a result of these efforts, we successfully developed an anti-A antibody-expressing vector suitable for continuous production in vivo.

研究分野：ゲノム編集

キーワード：ゲノム編集 バイオ医薬品 抗体医薬 アルツハイマー病

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝子組換え技術や細胞培養技術など生物の生理活性を用いて製造したタンパク質を有効成分とする「バイオ医薬品」は、化学合成された「低分子医薬品」に比べて、分子が大きく構造が複雑であり、製造が困難であることから、一般的に開発・製造費用が非常に高価な医薬品である。世界初のバイオ医薬品は、1982年に開発された糖尿病の治療薬「ヒトインスリン」であり、その後、インターフェロン（抗ウイルス・抗がん作用をもつ治療薬）、成長ホルモン（低身長症の治療薬）など次々と新しいバイオ医薬品が誕生し、現在では世界の医薬品売上額 Top10 の半数以上を「バイオ医薬品」が占める状況にある。特に近年では、抗体を模することで疾患関連分子と特異的に結合する「抗体医薬品」がバイオ医薬品の主流であり、現在日米欧で 70 品目以上の抗体医薬品が承認されてきている。

糖尿病治療薬であるインスリンに代表されるように、多くの慢性疾患や難治性遺伝子疾患（血友病等）など従来の医薬品では改善が得られなかった疾患に対しても、バイオ医薬品を用いることで大きな治療効果が得られた。その一方で、バイオ医薬品は生体内での半減期が短く、慢性的な先天性及び後天性疾患に対しては、注射による長期間の繰り返し投与が必要であり、患者の身体的・経済的負担が非常に大きいことが課題である。

2. 研究の目的

本研究では、生体内組織・臓器の標的ゲノムに外来 DNA 配列を挿入できるノックイン技術である独自技術 HITI 法 (Suzuki et al, *Nature* 2016) を用いて、抗体医薬品を生体内で生産する基盤技術の開発に取り組む。具体的には、アルツハイマー病 (AD) の新規抗体医薬品として承認されたが、頻回投与が必要な抗体薬をモデル薬とし、生体内で持続して抗体薬を発現させる技術の検証を行う。これにより、根治が現状不可能であるアルツハイマー病に対する画期的な根治的治療法の基盤技術確立を目指す。

3. 研究の方法

- 薬事承認されている抗アミロイドβ抗体薬「アデュカヌマブ」と「レカネマブ」をモデルとし、発現ベクターを数種類作製し、細胞外への分泌能を評価した。
- 分泌した抗体を精製し、AD を引き起こす原因と考えられているアミロイドβ (Aβ) との特異的結合能から、機能性を評価した。
- マウス肝細胞由来 Hepa1-6 に対して、HITI 法を用いて高発現するアルブミン (Alb) 遺伝子の下流に上記抗体をノックインし、分泌能を評価した。
- 抗体の抗原認識部位のみを人工的に結合した 1 本鎖抗体 (single-chain variable fragment, scFv) を作製し、分泌能および Aβ 特異的な結合能を有していることを評価した。

4. 研究成果

- マウス IgG 分泌ペプチドの下流に「アデュカヌマブ (Adu)」と「レカネマブ (Lec)」の H 鎖 (H)、L 鎖 (L) をコードする遺伝子断片を挿入し、CMV promoter 下で IgG 型抗体を発現、分泌させるベクター 4 種類 (pCMV-Adu-H, pCMV-Adu-L, pCMV-Lec-H, pCMV-Lec-L) を作製した。これらのベクターを HEK293 にトランスフェクションし、培地上清中に分泌されている抗体を Slot blot 法で測定した。その結果、それぞれの H 鎖

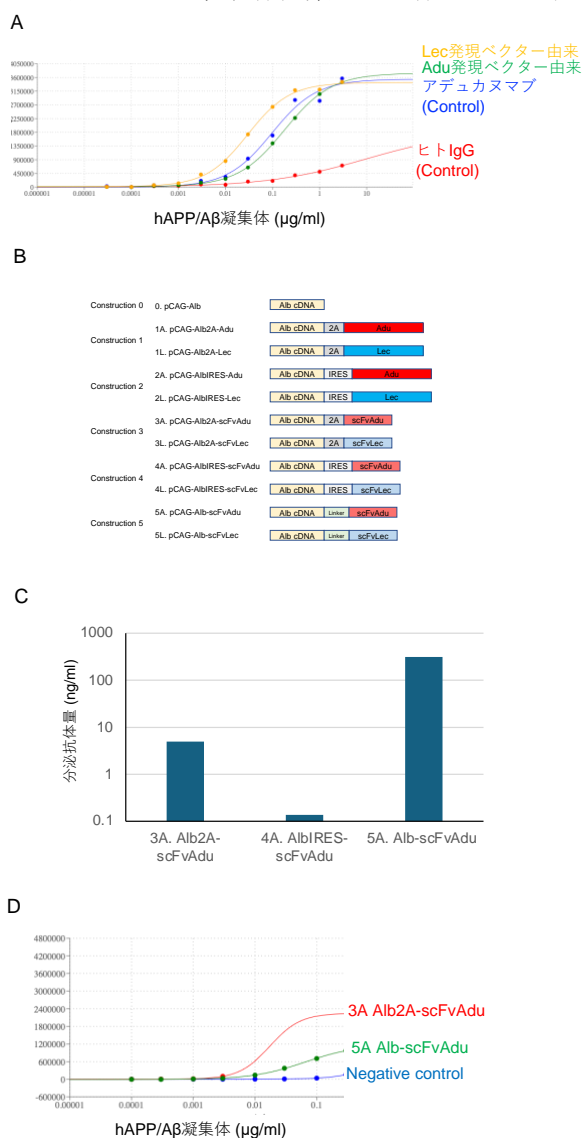


図1 抗アミロイドβ抗体発現ベクターの最適化
A. Aβ凝集体タンパク質に対する結合能
B. 作製したscFv発現ベクター
C. scFv発現ベクターを用いた分泌量
D. scFv発現ベクターを用いたAβ凝集体タンパク質に対する結合能

とL鎖を同時に細胞内で発現させることで、Aduが292.7 ng/ μ l, Lecが97.6 ng/ μ lの培地中への分泌量が得られた。

(2) 上記分泌抗体を精製し、A β タンパク質との選択的結合力をELISA法で評価した。その結果、A β タンパク質凝集体に対して、市販のアデュカヌマブ抗体と同等の結合能を示した(図1A)。

(3) HITI法を用いて、上記Adu-HとAdu-LもしくはLec-HとLec-Lを連続してアルブミン(*Alb*)遺伝子にノックインした。その後、分泌された抗体をSlot blot法で測定したが、培地上清中への分泌は見られなかった(data not shown)。この結果より、ゲノムに組み込んだ連続した2つのH鎖、L鎖をコードする遺伝子を用いると、細胞内で成熟した抗体が産生できないことが示唆された。

(4) 上記の結果を受け、抗体の抗原認識部位のみを人工的に結合した1本鎖抗体(single-chain variable fragment: scFv)を作製し、1遺伝子をノックインすることで細胞外に分泌できる技術の確立を目指した。ここでは、Adu-HとAdu-Lの抗原認識部位のみを取り出し間をGGGSリンカーで結合させたAdu-scFv及び、同様にLec-HとLec-Lの抗原認識部位のみ利用したLec-scFv抗体を作製した。ここでは*Alb*遺伝子座の下流にノックインした後のタンパク質を模倣するため、全長*Alb* cDNAとの間を2AペプチドもしくはIRES配列により分断するもの、linker配列を用いてAlbと直接融合するタンパク質など、合計11種類のIgG型およびscFv発現ベクターを作製した(図1B)。

これら発現ベクターをHEK293にトランスフェクションし、培地上清中に分泌されている抗体をSlot blot法で測定した。その結果、Alb-scFvAdu融合型(5A)>Alb-2A-scFvAdu分割型(3A)>Alb-IRES-scFvAdu分割型(4A)の順で分泌量が多いことがわかった(図1C)。特に融合型は他に比べ100倍以上分泌効率が高いことがわかった。これはAlbタンパク質が元々肝臓で産生され、血液中に分泌される特徴を持つからである。

次に、これら分泌抗体を精製し、A β タンパク質との選択的結合力をELISA法で評価した。その結果、分泌量の多いAlb-scFvAdu融合型(5A)はA β 特異的な結合能が低く、Alb-2A-scFvAdu分割型(3A)が分泌、A β 特異的な結合能ともに高い構造であることが示された(図1D)。

今後は、この2A-scFvAdu分割型を最適なノックイン用カセットとして用い、肝臓細胞の*Alb*遺伝子座にノックインすることで、アルツハイマー病の治療効果を評価する予定である。

<引用文献>

Suzuki, K., Tsunekawa, Y., Hernandez-Benitez, R., Wu, J., Zhu, J., Kim, J. E., Hatanaka, F., Yamamoto, M., Araoka, T., Li, Z., Kurita, M., Hishida, T., Li, M., Aizawa, E., Guo, S., Chen, S., Goebel, A., Soligalla, R.D., Qu, J., Jiang, T., Fu, X., Jafari, M., Esteban, C.R., Berggren, T., Lajara, J., Nuñez, E., Guillen, P., Campistol, J.M., Matsuzaki, F., Liu, G.H., Magistretti, P., Zhang, K., Callaway, E.M., Zhang, K. and Izpisua Belmonte, J.C. In vivo genome editing via CRISPR-Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature*, 540, 144-149 (2016)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kodera Tomoki, Takeuchi Ryosuke F., Takahashi Sara, Suzuki Keiichiro, Kassai Hidetoshi, Aiba Atsu, Shiozawa Seiji, Okano Hideyuki, Osakada Fumitaka	4. 巻 657
2. 論文標題 Modeling the marmoset brain using embryonic stem cell-derived cerebral assembloids	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 119 ~ 127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.03.019	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 Furuno Kotoko, Suzuki Keiichiro, Sakai Shinji	4. 巻 216
2. 論文標題 Gelatin nanofiber mats with Lipofectamine/plasmid DNA complexes for in vitro genome editing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Colloids and Surfaces B: Biointerfaces	6. 最初と最後の頁 112561 ~ 112561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.colsurfb.2022.112561	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 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Keiichiro Suzuki
2. 発表標題 Development of in vivo genome editing technology in somatic cells
3. 学会等名 日本生理学学会第100回記念大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木 啓一郎
2. 発表標題 ゲノム編集技術を用いた体細胞遺伝子操作
3. 学会等名 BPCNP4学会合同年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 廣瀬淳, 中村惇, 鈴木 啓一郎
2. 発表標題 単一遺伝性疾患及び多因子性疾患におけるゲノム編集治療技術の開発
3. 学会等名 第7回日本ゲノム編集学会(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
---------------------------	-----------------------	----

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