

研究成果概要

1. 研究課題

和文
シアノバクテリアを用いた次世代低分子抗体医薬の生産
英文
Production of next-generation small therapeutic antibody using cyanobacteria

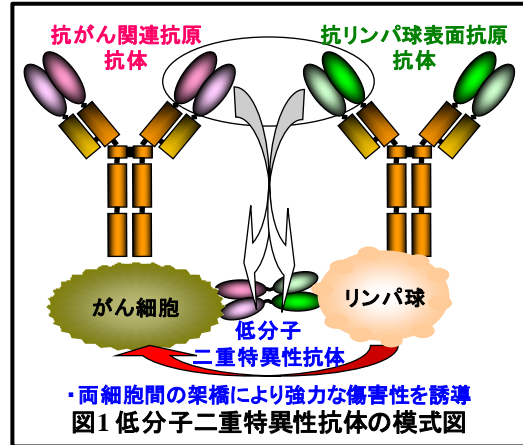
2. 申請者名(代表研究者)

氏名	ローマ字表記
浅野 竜太郎	ASANO Ryutaro
所属大学・機関名	英訳表記
東京農工大学	Tokyo University of Agriculture and Technology
研究科専攻名・部課名等	英訳表記
大学院工学研究院生命機能科学部門	Department of Biotechnology and Life Science, Graduate School of Engineering,
役職名	英訳表記
准教授	Associate Professor

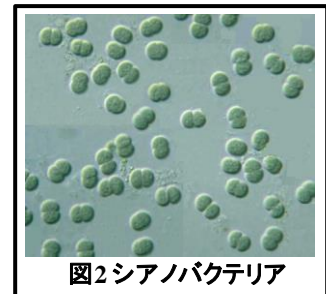
3.研究目的、成果、今後の見通し

研究目的

抗体医薬は、本邦でも増加の一途を辿っている「がん」に対する効果的な治療薬としても利用されているが、高分子量のタンパク質であるため動物細胞を用いて製造せざるを得ず、このことに起因する抗体医薬のコスト高は世界的な問題となっている。また従来型の IgG 抗体では治療効果が限界との見方もある。低コスト化に向けては主に薬効の向上による投与量の軽減を目指した高機能化と、腫瘍への高い浸透性と安価な微生物を用いた製造を期待した低分子化の観点から研究が進められており、前者の例としては高機能な人工抗体の開発が挙げられる。そのひとつである二重特異性抗体は、例えばがん細胞とリンパ球を標的とした抗体を用い、両細胞間を強制的に架橋させるようにデザインすることで特異的な抗腫瘍効果を誘導することができ、遺伝子組換え技術を駆使することで低分子型も作製可能である(図 1)。



この低分子二重特異性抗体は高機能性と低分子性を兼ね備えた魅力的な分子である。これまで既に米国食品医薬品局(FDA)で 1 件認可されているが、期待された安価な微生物を用いた製造は、大腸菌発現系では実現できておらず、結果動物細胞発現系を用いているため、極めて高価な医薬品のひとつとなっている。そこで本研究では、新たな微生物宿主として、僅かな栄養素と二酸化炭素および光で物質生産可能な光合成細菌であるシアノバクテリア(図 2)を用いた低分子二重特異性抗体の生産検討を行うことを目的とした。



研究成果

モデル低分子二重特異性抗体として申請者がこれまでに開発に注力してきた、がん関連抗原としてヒト上皮増殖因子受容体(EGFR)と、T リンパ球表面抗原である CD3 を認識する Ex3 を用いた(*Clin. Cancer Res.*, **12**(13), 4036-4042 (2006), *J. Immunother.*, **31**(8), 752-761 (2008)他)。シアノバクテリアとしては、モデル生物であり組換え手法が良く確立されている淡水性の *Synechocystis sp. PCC 6803* (PCC 6803)を用いた。本提案では、1. 目的遺伝子が挿入されたベクターを用いた発現と、2. 目的遺伝子のゲノムへの挿入、の観点から研究を進めた。

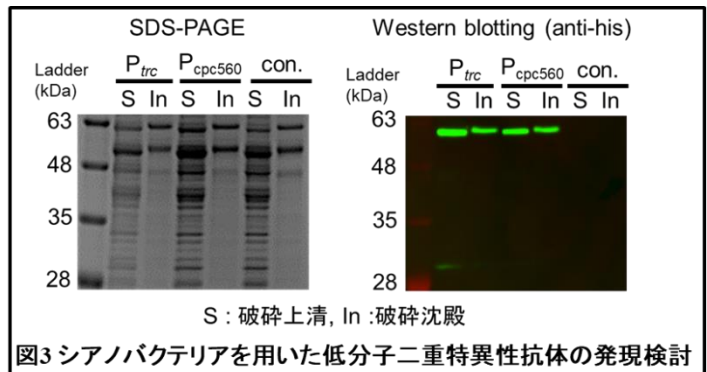
1. 大腸菌用発現ベクターを鋳型に Ex3 遺伝子を増幅させ、シアノバクテリア用発現ベクターに制限酵素を用いて挿入した。シーケンス解析により遺伝子配列に問題がないことを確認した後、エレクトロポレーション法により PCC6803 を形質転換したところ、コロニーを得ることは出来なかった。Ex3 遺伝子挿入前の発現ベクターをコントロールとして形質転換したところ、同様にコロニーを得ることが出来なかったため、ベクターの複製起点に変異が挿入されている可能性等を考え、いったん断念することとした。

2. Ex3 遺伝子のゲノムへの挿入を行うベクターとして、それぞれ強度の異なる恒常性プロ

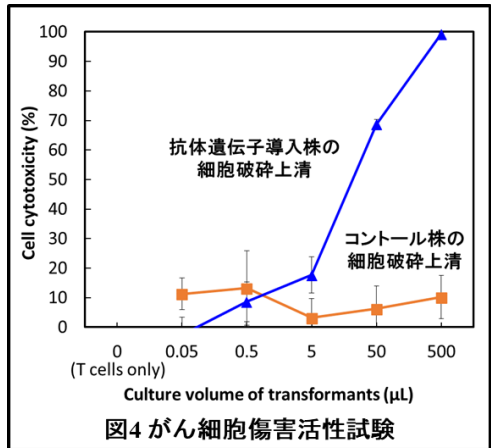
3.研究目的、成果、今後の見通し

モーターである *trc* プロモーターと *cpc560* プロモーターが組み込まれたベクターを用いた。ベクターを構築後、同様にエレクトロポレーション法により PCC6803 を形質転換した後、ゲノム PCR を行うことで目的遺伝子のゲノムへの挿入を確認した。得られた形質転換体をそれぞれ液体 BG11 培地で培養し、集菌ペレットに PBS バッファーを加えて再懸濁した後に遠心分離し洗浄した。続いて、ペレットに PBS バッファーを加えて再度懸濁した後、シリカビーズを加え懸濁することで菌体を破碎し、遠心分離後の上清を破碎上清サンプルとした。一方、ペレットをバッファーで懸濁したものを破碎沈殿サンプルとした。サンプルは OD 値をもとに同量の菌体量となるように調製し、電気泳動を行った。結果を図 3 に示す。いずれも破碎上清および破碎沈殿に目的タンパク質である Ex3 が発現している様子が観察された。

cpc560 プロモーターの方が強度が高いことが予想されたが、結果は *trc* プロモーターの方がやや発現量が多かったため、以後の実験は *trc* プロモーターを用いて行った。シアノバクテリアを用いて生産した低分子二重特異性抗体が、がん細胞傷害活性を有することを確認するため、構築した



株の細胞破碎上清を用いたがん細胞傷害活性評価を行った。申請者らは近年、網羅的な低分子二重特異性抗体のスクリーニングを容易とするため、二重特異性抗体発現大腸菌の超音波破碎溶液を用いた簡易的ながん細胞傷害性試験法を確立し報告している(*J. Biosci. Bioeng.*, 126, 153 (2018)). 本手法を用いて評価した結果、抗体遺伝子導入株の細胞破碎上清をがん細胞と T 細胞の共培養下に添加した際に、抗体遺伝子を導入していない株の場合と比較して優位ながん細胞傷害活性がみられた(図 4)。これにより、シアノバクテリアを用いて生産させた低分子二重特異性抗体が細胞傷害活性を有していることが示された。



本研究により、低分子二重特異性抗体遺伝子がゲノム上に挿入された PCC6803 を構築し、目的抗体の発現、および細胞傷害活性を有することが確認された。

今後の見通し

本研究により、PCC6803 を用いた低分子二重特異性抗体の発現に成功したが、PCC6803 に発現させた Ex3 が大腸菌を用いて調製した Ex3 と結合活性等も含めて同等の機能を保持しているかを確認するためには、PCC6803 から精製 Ex3 を得る必要がある。そのためには発現量をさらに向上させる必要があり、汎用性をもたせるためにも今後は複製起点の変異の有無等を確認した後、再度ゲノムへの挿入を伴わない発現、およびシグナルペプチド配列の検討も行う予定である。