

平成28年度採択

戦略的基盤技術高度化・連携支援事業

戦略的基盤技術高度化支援事業

「抗体遺伝子迅速単離システムを応用した機能性抗GPCR抗体製造の高度化」

研究開発成果等報告書

令和元年5月

担当局 北海道経済産業局

補助事業者 公益財団法人北海道科学技術総合振興センター

目次

第1章 研究開発の概要	1
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標	1
1-2 研究体制	3
1-3 成果概要	4
1-4 当該研究開発の連絡窓口	4
第2章 本論	4
第3章 全体総括	6

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

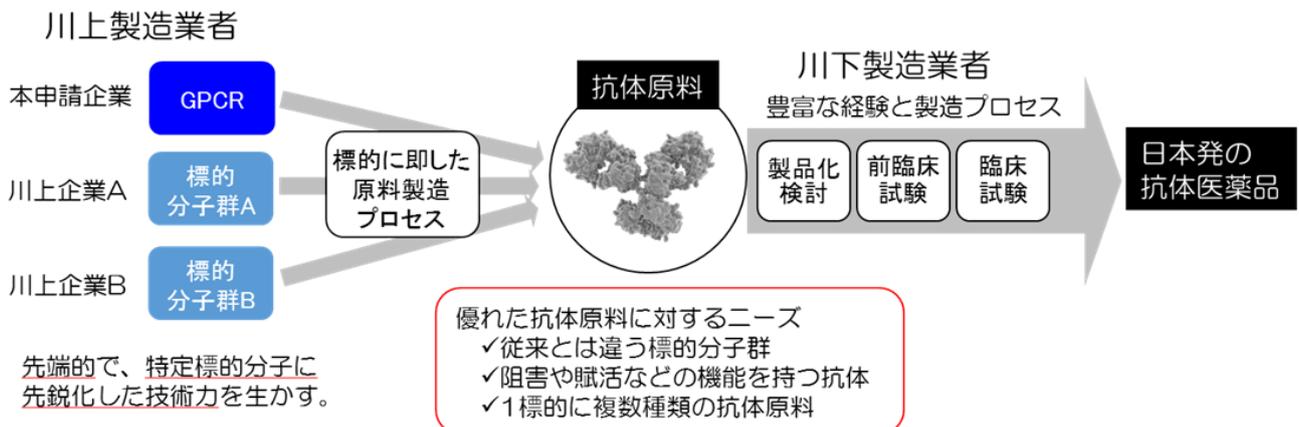
【川下製造業者の抱えるニーズとその背景】

近年医薬品の分野では、タンパク質や生物由来の成分を原料とする「バイオ医薬品」の市場拡大が著しい。中でも免疫機能の主要成分である抗体を使用した「抗体医薬」は、その安全性や従来薬にはなかった劇的な効果などにより「バイオ医薬品」のメインとなっている。抗体医薬を開発するための素となるのが、各標的分子に対する「抗体原料」である。

標的分子の多様化に伴い、優れた抗体原料を得るためには各標的分子に即した探索手法や要素技術が必要であることが見え始め、川下製造業者（製薬企業）にさらなる研究投資が求められることとなった。このためバイオ医薬品の先端企業であっても、特定の標的分子群に対する抗体原料については、独自の探索製造技術を持つバイオ企業から抗体原料を購入するという企業が国内外で増えつつある（国内例では協和発酵キリン）。購入した抗体原料に関する製品化検討、前臨床試験、臨床試験は標的分子が異なっても共通であるため、抗体医薬の経験をもつ大手製薬企業はこれまでの製品開発で培ったノウハウや既存設備を利用できるうえ、リソースをそこに集中することができる。

法認定申請企業のような川上製造業者の、先端的かつ特定標的分子に先鋭化した抗体原料製造技術と、川下製造企業である製薬企業の医薬品開発力とを組み合わせれば、抗体医薬開発の効率を向上し、日本発の抗体医薬品の新薬の開発につながる（図1）。

図1：抗体医薬開発と、川上・川下製造業者の役割分担



そんな中、川下製造業者（各製薬企業）の抗体原料に対して求めるニーズは多様化しつつある。最近では従来の抗体医薬とは違うタイプの標的分子（GPCR、イオンチャンネルあるいはトランスポーター）を目標し、さらに受容体阻害機能、受容体活性化機能などの機能性を兼ね備えた抗体原料が求められるようになった。加えて、抗体医薬の製造開発段階での成功確率を高めるために、同一標的分子に対して複数種類の遺伝子配列の異なる抗体原料を同時に開発したいというニーズが高まっている。また従来の医薬原料の探索法として、不死化した抗体産生細胞（ハイブリドーマ）を作製することで抗体を得たのちに、有用抗

体原料を選び出し配列解析をする手法が取られてきた。しかし上述したように抗体原料の多様性を保つために、多種類の抗体構造に関する DNA オミックス情報の収集、解析をするような、網羅的な方法が求められている。

【法認定申請企業のこれまでの取り組み】

法認定申請企業では、抗体原料の探索技術として、「MoGRAA[®]製造エンジン」という機能性抗体製造法を作り上げた(図2)。この製造法は医薬品開発の上で、魅力的だが難易度が高いとされてきた標的グループ「GPCR」(Gタンパク質共役型受容体)を対象としていることもあり、川下製造業者からも技術的に高い評価を受けている。

しかし、抗体医薬品原料に対する川下製造業者(製薬会社)のニーズが、上述のように多様化していく中で、現行

図2: MoGRAA 製造エンジンの全体像と技術課題



の「MoGRAA[®]製造エンジン」ではそれを満たせないケースも出てきた。社内での検討の結果、その一因としてスクリーニング(図2の赤い四角部分)のステップに改善点があるという結論に達した。

【従来技術の問題点】

「MoGRAA[®]製造エンジン」においても、スクリーニング部分の要素技術には「ハイブリドーマ法」を使用している。この「ハイブリドーマ法」は、1980年代に確立された手法であり、複雑な構造を持つ標的分子(GPCR、イオンチャンネルあるいはトランスポーター)に対する抗体を取得することや、それらの標的分子の動きを制御する機能性を有した抗体を、効率よく多数取得することが困難である。これは、従来法で得られる抗体産生細胞の数に限りがあること、また得られる抗体の多様性が少ないことが原因であると考えられる。

【研究開発の目的】

抗体医薬品の原料として疾病治療に使用される生理活性物質「抗体」の探索技術の高度化を図る。複雑な構造をもつ標的分子(GPCR、イオンチャンネルあるいはトランスポーターなど)に対する優れた抗体医薬原料を、より効率よく大量生産するために、従来の抗体スクリーニング技術である「ハイブリドーマ法」にかわる新たな抗体スクリーニング法を開発する。

【研究開発の方法】

富山大学 磯部教授らの特許技術である「抗体遺伝子迅速単離法」をベースに、ハイブリドーマ法とは技術コンセプトが全く違う、新たな抗体スクリーニング法を開発する。富山大学では、インスリンのような

精製が容易な可溶性タンパク質を標的分子とし、このシステムが有効であることを証明して、実用段階に入っている。

しかしながら法認定申請企業は、川下製造企業のニーズをもとに、より難易度の高い不溶性膜タンパク質（GPCR など）を標的とした、抗体原料製造技術を目指している。このため富山大学の特許技術について部分的に取り入れつつ、今までに蓄積してきた GPCR を標的分子とする抗体作製方法に則った研究開発を行うことで、技術の改良と高度化を図る。

開発した技術は最終的に「MoGRAA[®]製造エンジン」の新たな要素技術として取り入れ、「次世代 MoGRAA[®]製造エンジン」へと進化させる。「次世代 MoGRAA[®]製造エンジン」により、川下の製薬企業に優れた抗体原料を提供する。

【実施結果】

従来の抗体スクリーニング技術である「ハイブリドーマ法」にかわる新たな抗体スクリーニング法を開発するために、1～4の技術要素に分け、それぞれの課題解決に対応した。さらに1～4で完成した技術を統合して、5の項目において次世代 MoGRAA[®]製造エンジンを完成させた。

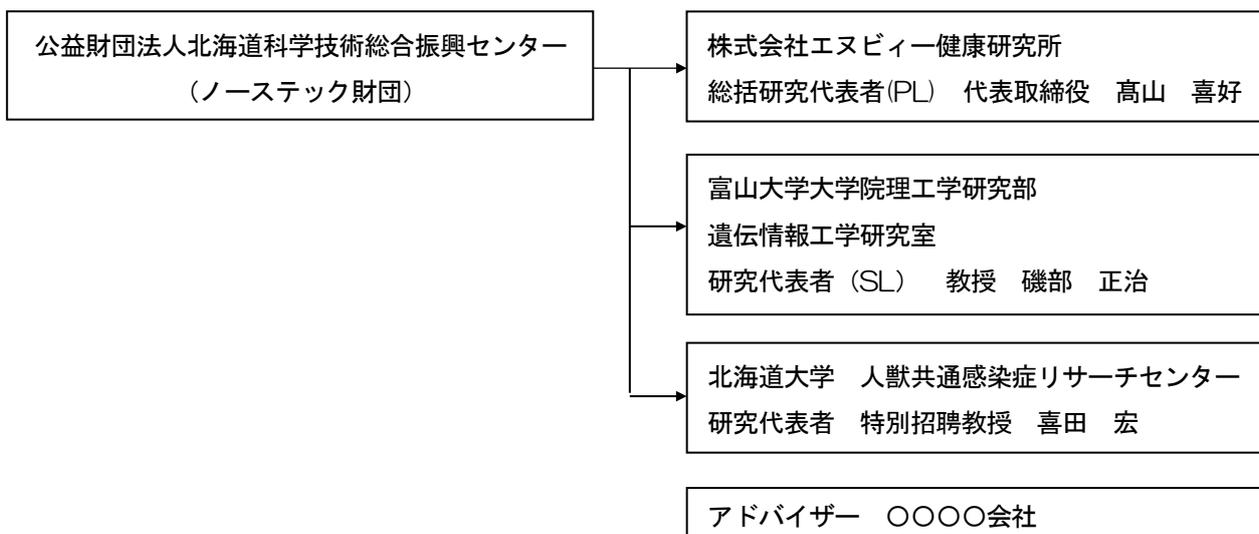
1. 標的 GPCR に対する抗体を産生する形質細胞（ASPC）の濃縮に対する対応
2. 網羅的な抗体遺伝子の単離に対する対応
3. 抗体遺伝子からの抗体生産に対する対応
4. 機能性抗体が得られるかの確認に対する対応
5. 高度化された機能性抗 GPCR 抗体製造の汎用に対する対応

1-2 研究体制

研究組織

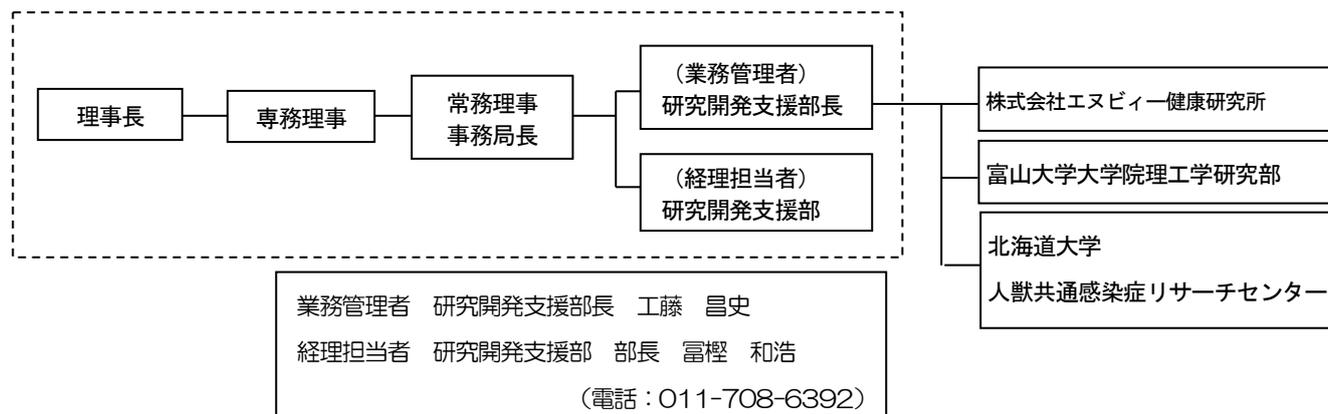
[事業管理機関：補助事業者]

[研究実施機関：間接補助事業者]



管理体制

公益財団法人 北海道科学技術総合振興センター



1-3 成果概要

「単細胞解析技術 (Single Cell 解析技術)」を用いて、標的 GPCR に対する特異抗体を産生する形質細胞 (ASPC) の分離に成功した。富山大学で開発された「抗体遺伝子迅速単離システム」と組み合わせ、従来の「機能性抗体製造技術 (MoGRAA[®]製造エンジン)」の高度化に成功し、商用化可能な技術として当初の計画通り完成した。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

株式会社エヌビーイー健康研究所 研究開発部 研究推進グループマネージャー 佐々木 昌子
担当者電話番号：011-708-7156 担当者のメールアドレス：kanri@nbhl.co.jp

第2章 本論

1. 標的 GPCR に対する抗体を産生する形質細胞 (ASPC) の濃縮に対する対応

【研究内容】

- ① DNA 免疫技術の改良
- ② 「単細胞解析技術」を活用して、標的 GPCR に対する抗体を産生する B 細胞・形質細胞 (ASPC) を分離、回収する。
- ③ 目的 GPCR に対する形質細胞を分析機器を使わず濃縮する方法の確立を目指している。具体的には、標的 GPCR を発現した CHO 細胞に形質細胞を選択的に認識する抗体を遺伝子組み換え技術で導入した細胞株の樹立。
- ④ 富山大学の技術に従い、リンパ球細胞を ER-tracker と抗マウス IgG 抗体で蛍光 2 重染色する。fluorescence-activated-cell-sorting (FACS) により、細胞 1 つ 1 つを個別に識別し、染色状態を基準に形質細胞を分離する。

【成果】

DNA 免疫技術を改良し、目的 GPCR に対する形質細胞のリンパ組織へ 10 倍以上濃縮に成功した。リンパ組織から形質細胞集団を濃縮後、「単細胞解析技術 (Single Cell 解析技術)」を組み合わせ、標的 GPCR に対する抗体を産生する形質細胞 (ASPC) を効率的に単離する方法を確立、工程の標

準化に成功した。さらに、富山大学で ASPC の単離に有用な、GPCR を発現する細胞株の表面に形質細胞を付着させるための要素技術を開発した。

2. 網羅的な抗体遺伝子の単離に対する対応

【研究内容】

富山大学で確立した MAGrahd 法による、標的 GPCR に対する抗体産生細胞より、抗体遺伝子を単離する。

【成果】

1 で確立した標的 GPCR に対する抗体を産生する形質細胞から、MAGrahd 法により抗体遺伝子の単離に成功した。

3. 抗体遺伝子からの抗体生産に対する対応

【研究内容】

2 で単離したり抗体遺伝子に基づいて富山大学で確立した TS-jPCR 法と呼ばれる、抗体遺伝子発現ユニット作製方法を取り入れる。TS-jPCR 法を用いることで、GPCR に対する抗体を生産する細胞が得られるか検証する。

【成果】

形質細胞集団 100 万個あたり ASPC を 200 個単離することができた。単離した ASPC の抗体遺伝子からの発現ユニットを作った。そのうち 52% の抗体が IgG をサブタイプにもち、標的 GPCR に結合することが確認できた。

4. 機能性抗体が得られるかの確認に対する対応

【研究内容】

3 で結合陽性だった抗体について、効率よく機能性を評価し単離できるかを検証する。

【成果】

3 で単離できた結合陽性発現ユニットと HEK293 株化細胞を組み合わせ、標的 GPCR に対して結合陽性クローンから、効率的に機能性評価できる技術を確認した。P-001mAb については、機能性抗体の単離に成功した。

5. 高度化された機能性抗 GPCR 抗体製造の汎用に対する対応

【研究内容】

研究項目 1～4 までで完成した技術要素を組み合わせ自社内で、複数の標的 GPCR に対して試作品を作成する。

【成果】

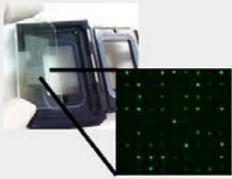
研究項目 1～4 までで完成した技術要素を組み合わせがん免疫療法に応用可能な抗体(P-001mAb)、網膜症治療薬 (P-O16mAb) 抗体の試作品製造に成功した。さらに、商用化可能な工程の標準化に成

功した。

第3章 全体総括

株式会社エヌビー健康研究所、富山大学大学院 理工学研究部、北海道大学人獣感染症リサーチセンター の3機関が協力して、「単細胞解析技術 (Single Cell 解析技術)」を用いて、標的 GPCR に対する特異抗体を産生する形質細胞 (ASPC) の分離に成功した。さらに富山大学で開発された「抗体遺伝子迅速単離システム」と組み合わせ、従来の「機能性抗体製造技術 (MoGRAA[®]製造エンジン)」の高度化に成功し、商用化可能な技術「次世代 MoGRAA[®]製造エンジン」 として当初の計画通り完成した。図3に示す通り、同数の免疫細胞を用いて、次世代 MoGRAA[®]製造エンジンと従来のハイブリドーマ法で解析を実施した場合、図3に示す通り、次世代 MoGRAA[®]製造エンジンは従来のハイブリドーマ法と比較して、1st スクリーニングまでの所要日数および結合抗体取得までの所要日数を飛躍的に短縮させた。また開発に必要な材料であるスクリーニングに用いる発現細胞の調整を軽減することにも成功した。

図3 MoGRAA[®]開発エンジンの特徴

ハイブリドーマ法 (従来技術)			
1 st スクリーニングまでの所要日数	10日	スクリーニング用細胞培養数 数百枚 (10cmdish)	結合抗体の取得までの所要日数 45日
↓	↓	↓	↓
1 st スクリーニングまでの所要日数	1日	スクリーニング用細胞培養数 2枚 (10cmdish)	結合抗体の取得までの所要日数 3日
MoGRAA [®]			

より『短期間』で、より『効率的』に機能性抗体の開発が可能になりました

「次世代 MoGRAA[®]製造エンジン」を用いて、研究項目5に示したがん免疫療法に応用可能な抗体 (P-001mAb)、網膜症治療薬 (P-O16mAb) 抗体の川下企業への導出を目指した本格的医薬シーズの開発を開始した。さらに、「次世代 MoGRAA[®]製造エンジン」を用いた、共同創薬を川下企業と実施するために、国内外の製薬企業 40 社と交渉を開始した。