

令和元年度

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

「生きた細胞内へ導入可能な細胞膜透過性VHH型タグ抗体の開発・実用化」

研究開発成果等報告書

令和2年5月

担当局 近畿経済産業局

補助事業者 一般財団法人 大阪科学技術センター

## 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
1-1-1 研究開発の背景	1
1-1-2 研究目標	5
1-1-3 研究開発の取り組み、評価	6
1-2 研究体制	8
1-3 成果概要	9
1-4 当該研究開発の連絡窓口	9
第2章 本論	10
2-1 生きた細胞および生体に投与可能なレベルの高純度の VHH 型タグ抗体を得るための精製法の開発	10
2-1-1 大量生産法の開発	10
2-1-2 精製法の開発	11
2-1-3 夾雑物チェック	13
2-1-4 毒性チェック	14
2-2 VHH 型タグ抗体に膜透過性機能を付与するための技術開発	16
2-2-1 膜透過配列の付加法の開発	16
2-2-2 膜透過能の評価法の開発	18
2-3 VHH 型タグ抗体に核内移行機能を付与する技術の開発	22
2-3-1 核内移行配列の付加法の開発	22
2-3-2 核内移行能の評価法の開発	23
最終章 全体総括	26
3-1 複数年の研究開発成果	26
3-2 研究開発後の課題・事業化展開	27
3-2-1 想定している具体的ユーザー、マーケット及び市場規模等に対する効果	27
3-2-2 事業化展開	28

## 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

#### 1-1-1 研究開発の背景

##### 1) バイオ研究に不可欠なタグ及びタグ抗体

タンパク質はバイオ系の基礎研究や医薬品開発の中心となっている。そのタンパク質を研究するには、[図1](#)のように短いタグをつけて扱い易くするのが常法となっており、そのタグを認識するタグ抗体はタンパク質を追跡・可視化したり ([図2A-C](#))、単離精製したり ([図2D,E](#)) する際に不可欠となっている。

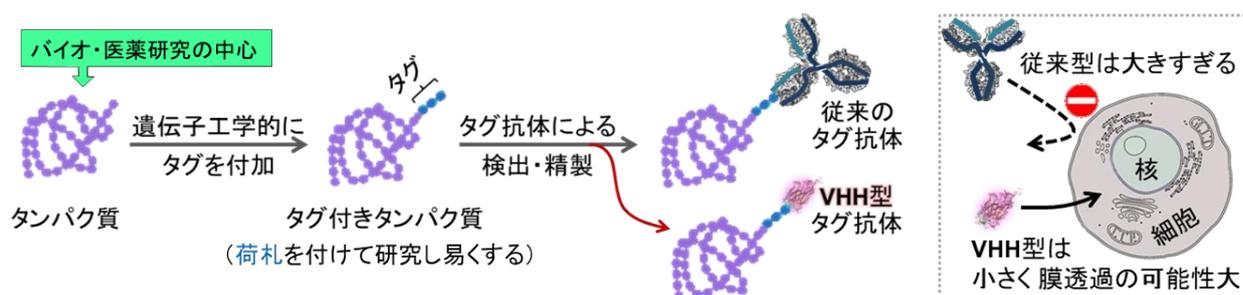


図1. タグ及びタグ抗体の役割と本研究開発の目的

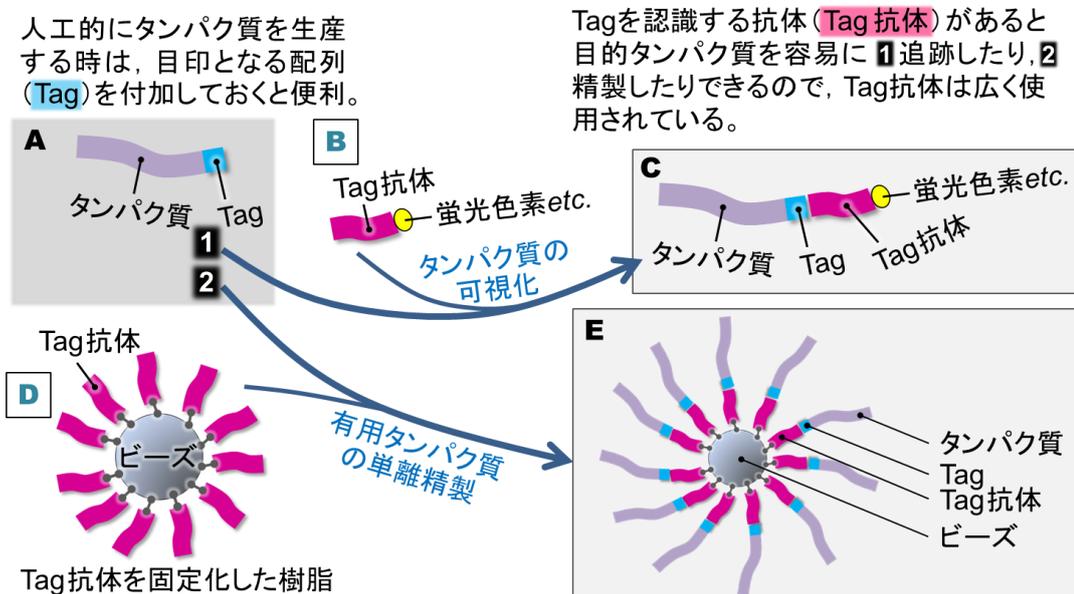


図2. タグ抗体の利用法。タグ抗体はタグを付加したタンパク質の可視化 (A-C) や単離精製 (D, E) に威力を発揮する。

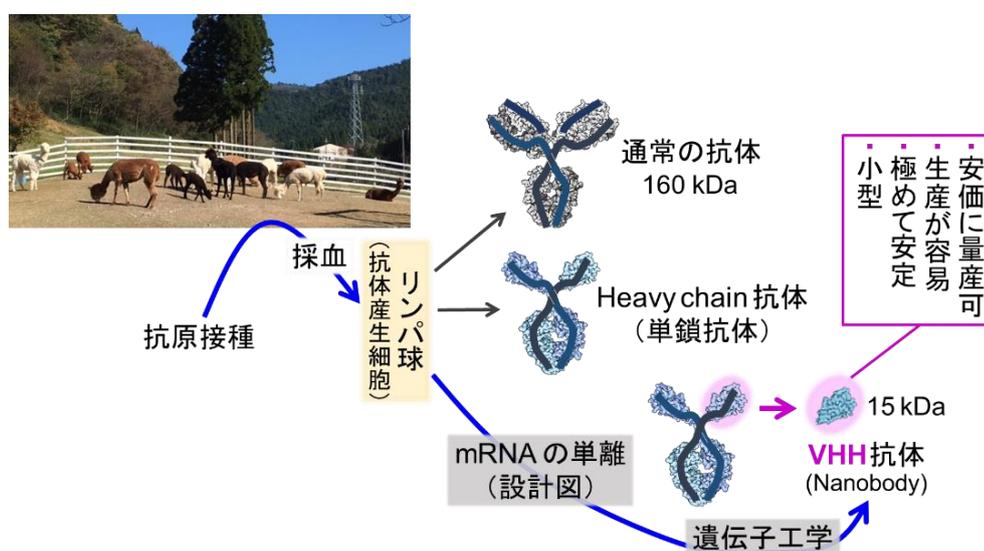
##### 2) 抗体の優れた性質と限界

従来型の抗体は Light chain と Heavy chain の組合せからなる巨大分子 (約 150 kDa、[図3](#)) であるが抗原に対する結合の特異性が極めて高いことから人類が手にした最高の分析試薬とよばれている。し

かし、熱や酸・アルカリに弱く、取り扱いには細心の注意が必要である。また生産コストも高い。さらに、巨大分子であるがゆえに細胞膜を透過できず、生細胞内で働いているタンパク質を標的にできないという原理的な弱点を有する（[図 1](#)、右枠内）。

### 3) 次世代抗体 VHH の登場

上述のように、通常の抗体は 2 本鎖の組合せになっているが、アルパカ等のラクダ科動物には Heavy chain のみからなるユニークな抗体が存在し、その抗原結合部位 ( $V_H$ ) のみを取り出しても抗原結合活性は保持されることから、 $V_H$  domain of heavy chain すなわち小型の VHH 抗体として注目されている（[図 3](#)）。VHH 抗体は通常抗体の約 1/10（約 15 kDa）と小型であるばかりでなく、熱や pH 変化に対しても安定で、生産が容易であるという優れたものであり、現在多用されている通常抗体にとって代わる次世代抗体と見なされている。



VHH: 単鎖抗体 (Heavy chain 抗体) の抗原結合部位

図 3. VHH 抗体の製造プロセスと特徴。VHH: variable domain ( $V_H$ ) of heavy chain antibody.

VHH 型タグ抗体のアミノ酸配列：COGNANO 社では、既に多数の VHH 型タグ抗体クローンを入手済みであるが、それらのアミノ酸配列の一例を [下図 4](#) に示す。

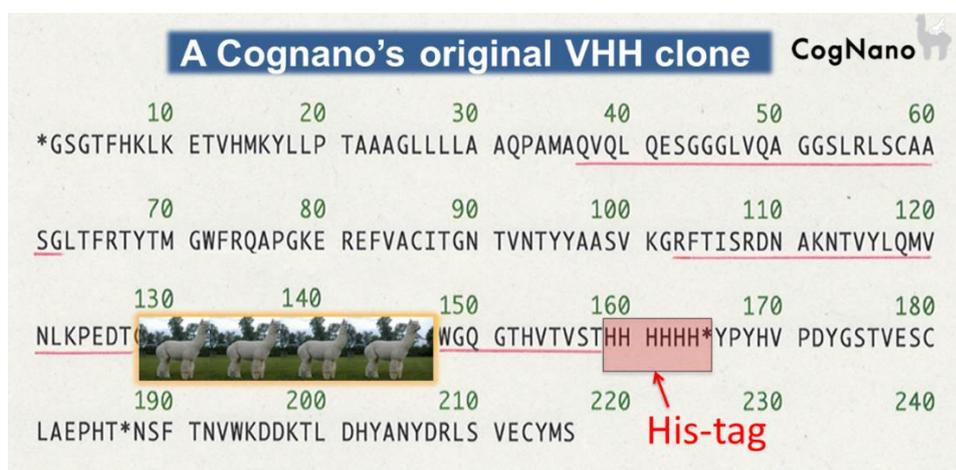


図 4. VHH 型タグ抗体のアミノ酸配列の一例。

## 4) VHH 抗体の作製法

COGNANO 社では米国のオレゴン州からアルパカを 18 頭輸入し、飼育繁殖体制を整えると共に（現在 22 頭に増えている）、以下のように VHH 抗体を作製する手順を確立済みである（[図 5](#)）。

- (i) アルパカへの抗原接種及び採血
- (ii) リンパ球の単離
- (iii) リンパ球からの mRNA の単離と VHH 抗体の作製：
  - [1] アルパカのリンパ球からの mRNA の単離
  - [2] mRNA から逆転写酵素による cDNA の合成
  - [3] cDNA を鋳型とする Polymerase chain reaction (PCR) による VHH DNA 配列（設計図）の取得
  - [4] Phage display による目的とする VHH 抗体の選別（[図 6](#)）
  - [5] 発現ベクターの構築と大腸菌への組込み
  - [6] 大腸菌のペリプラズムからの VHH 抗体の回収

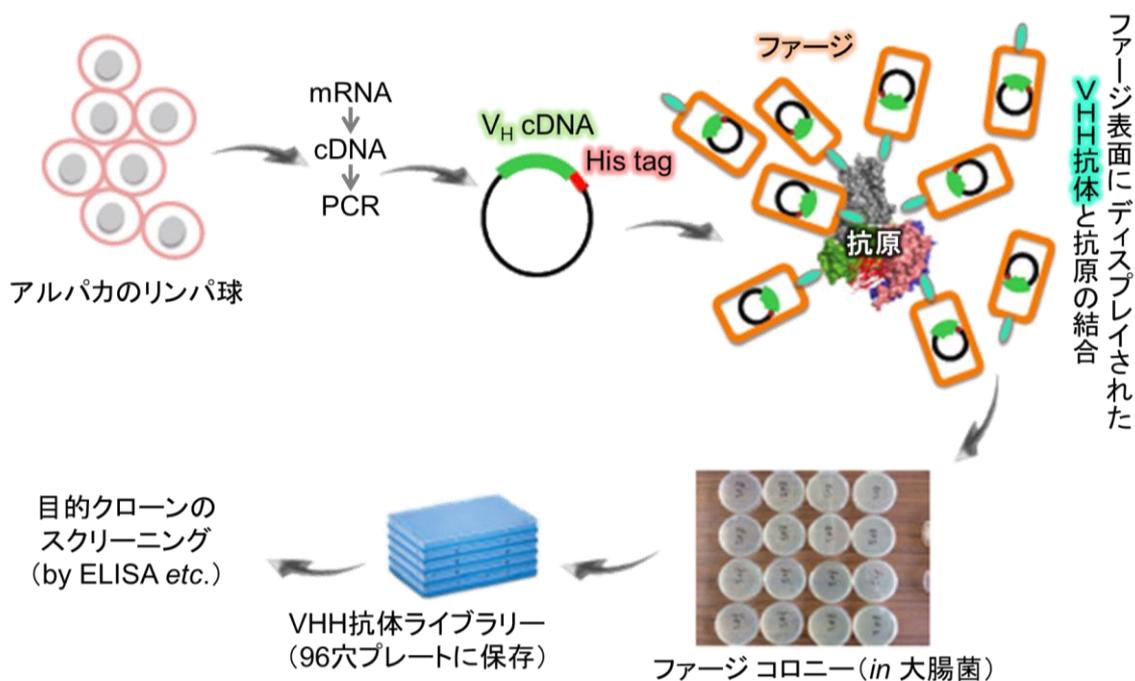


図 5. 抗原特異的 VHH 抗体ライブラリーの作製法。

【上段】：抗原を接種したアルパカのリンパ球から mRNA を単離し、cDNA に変換した後に、PCR (Polymerase chain reaction) を行い、VHH 抗体の設計図に相当する V<sub>H</sub> cDNA (緑色) を得る。これをファージベクターに挿入してファージの表面に発現させる（[図 6](#) 参照）。この状態のファージは抗原に結合するので目的のファージクローンを単離することができる。

【下段】：ファージは大腸菌のコロニーとして単離し、特定の抗原に対する VHH 型抗体ライブラリーとして保存し（青色）、必要に応じてスクリーニングに回す。

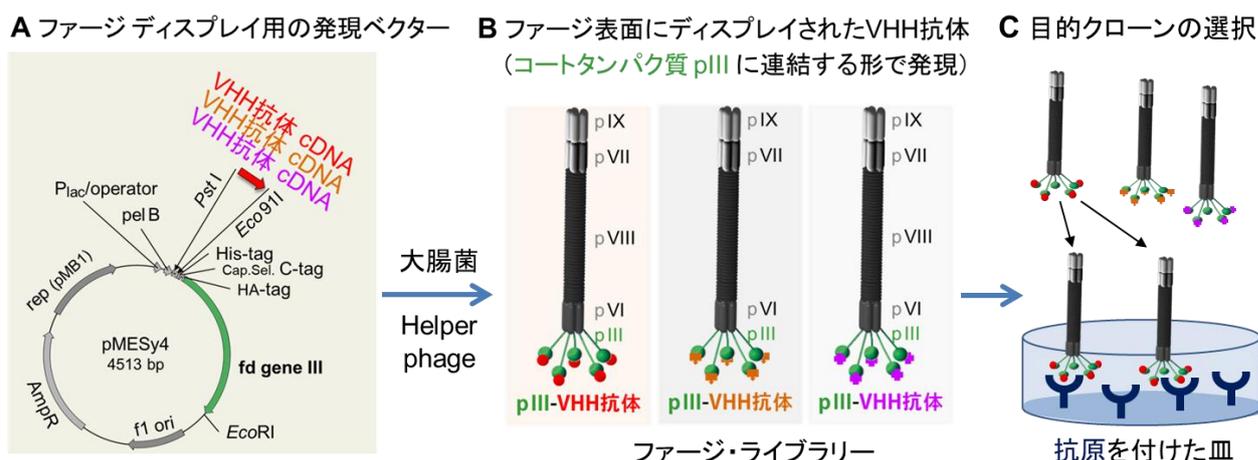


図 6. ファージディスプレイによる抗原特異的 VHH 抗体の選択。

大腸菌に感染するウイルスであるバクテリオファージの表面に、VHH 型タグ抗体を、ファージのコートタンパク質 pIII との融合タンパク質として発現させ、抗原であるタグ配列と相互作用できる形で提示し、目的とする VHH 型タグ抗体クローンのスクリーニングを効率よく行うことができる。

## 5) よく使用されるタグの種類

目的とするタンパク質を見分け、扱いやすくするために付加する比較的短い配列を“タグ”と呼んでいる。代表的なタグを表 1 に掲げる。研究や製品開発を容易にするためにタンパク質に付ける目印がタグであるが、この“タグ”とそれを認識し結合する“タグ抗体”がセットとなって初めて意味をなす故、バイオ業界では各種のタグ抗体が開発され上市されている。タグ抗体の世界市場は約 400 億円、国内市場はその約 1 割の 40 億円と推定されている（日経バイオ年鑑 2016）。

表 1. 汎用されているタグ配列と性質

タグ (Tag)	配列と特徴
Flag	Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (人工の配列で 8 アミノ酸からなる)
HA	Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala (ウイルス タンパク質由来の 9 アミノ酸からなる配列)
Myc	Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu (がん遺伝子産物c-Myc由来で、10 アミノ酸からなる)
Fc	抗体分子のC末端部で、Protein Aに結合する。タンパク質製剤など医薬品に多用される。
GFP	緑色の蛍光を発するタンパク質で、追跡・可視化用の目印となる。
His	His-His-His-His-His-His (6 アミノ酸と小さく、Ni <sup>2+</sup> カラムに親和性を有するので、精製に使われる)

現在、比較的大きなタグである GFP (Green fluorescent protein) に対する VHH 型タグ抗体が開発されているが、小型のタグに対する VHH 型タグ抗体については今後の課題となっている。さらに、細胞内タンパク質分子のライプメイジングや細胞内タンパク質を標的とした抗体医薬の開発の観点から細胞膜透過性の抗体の開発が待たれている。

## 6) 膜透過配列の例

VHH 型タグ抗体は分子量が約 15,000 で、比較的小さなタンパク質であるが、それでもそれ自身では細胞膜を透過できない。この状況を打開するためのヒントとなる知見が集積されつつあることに着目して本研究開発に着手した。すなわち、蛋白質の細胞膜透過を助ける短いペプチド配列（膜透過配列）が天然のタンパク質中に見いだされている（[図7](#)）。

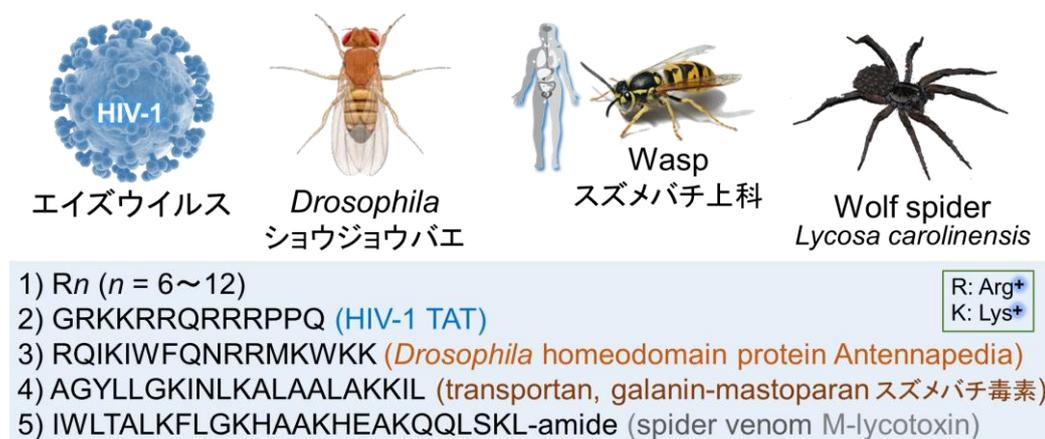


図7. 膜透過配列の候補と由来

本研究開発では、小型で安定な VHH 抗体に上記の膜透過配列ないしはその誘導体を付加してやれば、細胞内に入り、抗体の応用範囲が格段に広がると考え、将来的には抗体医薬への応用も視野に入れつつ、当座の試みとして膜透過性の VHH 型タグ抗体を作製し、商品化を目指すことにした。

## 1-1-2 研究目標

タンパク質の研究に欠かせないタグ抗体を、次世代抗体として注目されより安定で低コストな小型 VHH 抗体に置き換え、従来のタグ抗体では実現できなかった細胞膜透過性で細胞内タンパク質をも可視化できる VHH 型タグ抗体を開発する。具体的には、以下の 3 課題からなる目標を設定し、研究開発を行うことにした（[図8](#)）。

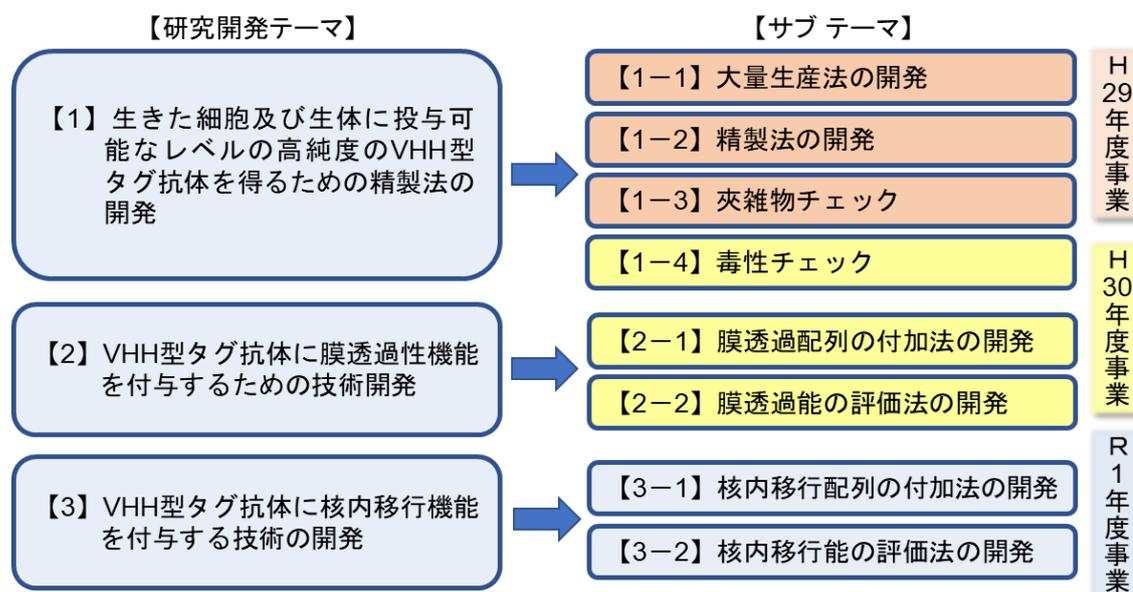


図8. 研究目標を達成するための開発項目

◆ 技術開発の目標値は次のように設定した：

## 【1】 生きた細胞および生体に投与可能なレベルの高純度のVHH型タグ抗体を得るための精製法の開発

## 【1-1】 大量生産法の開発【平成29年度 実施】

培養条件の至適化（最適化）と、大腸菌で生産したものに比べ、LPS (Lipopolysaccharide) を含まない酵母等で生産したVHH型タグ抗体は90%以上のタグ結合活性を有すること。

## 【1-2】 精製法の開発【平成29年度 実施】

ヒスチジン (His) アフィニティカラム、ゲル濾過等により98%の純度を達成すること。

## 【1-3】 夾雑物チェック【平成29年度 実施】

パイロジェン（内毒素 = エンドトキシン = LPS）フリーであること。

## 【1-4】 毒性チェック【平成30年度 実施】

対照試験物質と同程度ないしはそれ以下の毒性であること。

## 【2】 VHH型タグ抗体に膜透過性機能を付与するための技術開発

## 【2-1】 膜透過配列の付加法の開発【平成30年度 実施】

短いアミノ酸配列を付加することで実現し、未加工のVHH型タグ抗体に比べて90%以上の親和活性を保持していること。

## 【2-2】 膜透過能の評価法の開発【平成30～令和1年度 実施】

蛍光顕微鏡で30分以内に観察可能であること、培養細胞に添加後24時間経過しても細胞毒性が現れないこと。

## 【3】 VHH型タグ抗体に核内移行機能を付与する技術の開発

## 【3-1】 核内移行配列の付加法の開発【令和1年度 実施】

20アミノ酸残基程度の短い配列を付加して、生産及び精製は上記【1-1】 & 【1-2】の方法に従い98%以上の純度で90%以上の親和活性を保持していること。また未加工のVHH型タグ抗体に比べて80%以上の親和活性を保持していること。

## 【3-2】 核内移行能の評価法の開発【令和1年度 実施】

蛍光顕微鏡で30分以内に観察可能であること、培養細胞に添加後12時間経過しても細胞毒性が現れないこと。

## 1-1-3 研究開発の取り組み、評価

平成29～令和1年度の実施結果を表2に示す。上記のような主テーマとサブテーマを設定し研究開発を遂行した結果、次章で詳述するように、当初の目標を達成することができた。

表2. 本各サブテーマごとの実施結果（まとめ）

サブテーマ	目標値	実施結果
1-1. 大量生産法の開発	<ul style="list-style-type: none"> <li>培養条件の至適化</li> <li>90%以上の活性保持</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>至適化されたほ乳類培養細胞でVHH型タグ抗体の量産に成功。</li> <li>大腸菌で生産したものとほぼ同程度（<math>\geq 90\%</math>）の抗原結合活性を有することをELISAで確認。</li> <li>酵母による発現系も構築。</li> </ul>

1-2. 精製法の開発	<ul style="list-style-type: none"> <li>98%以上の純度</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>アフィニティークロマトグラフィーとゲル濾過を組み合わせることにより純品を得た。</li> <li>精製品は SDS-PAGE で夾雑バンドが認められなかった（純度 <math>\geq</math> 98%）。</li> </ul>
1-3. 夾雑物チェック	<ul style="list-style-type: none"> <li>パイロジェンフリー</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>原理的に LPS を含まないヒト培養細胞及び酵母による生産品であり、期待どおりパイロジェンは検出されなかった。</li> </ul>
1-4. 毒性チェック	<ul style="list-style-type: none"> <li>培養細胞レベルで対照試験物質と同程度</li> <li>動物実験レベルでも急性毒性や組織沈着が起きないこと</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ほ乳類培養細胞は VHH 型タグ抗体の存在下でも正常に生育し、毒性は検出されず。</li> <li>マウスへの投与実験で急性毒性は現れなかった。</li> <li>腎臓や肝臓への沈着も認められなかった。</li> </ul>
2-1. 膜透過配列の付加法の開発	<ul style="list-style-type: none"> <li>90%以上の活性</li> <li>膜透過 CPP ペプチドないしはその誘導体で実現</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>表面プラズモン SPR 測定により、膜透過配列を付加してもタグ結合活性は 90%以上 保持されることが確かめられた。</li> <li>CPP の誘導体を VHH 型タグ抗体の C 末端に挿入することにより、膜透過能を付与することに成功した。</li> </ul>
2-2. 膜透過能の評価法の開発	<ul style="list-style-type: none"> <li>CCD カメラで 30 分以内に観察可能なシグナル取得</li> <li>有効濃度の算出</li> <li>培養細胞系で毒性が無く、24 時間継続観察が可能</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>CCD カメラではもちろん、裸眼での観察でも膜透過配列を付加した VHH 型タグ抗体が細胞内に取り込まれることを確かめた。</li> <li>有効濃度は 1 <math>\mu\text{g}/\text{ml}</math> で十分と判明。</li> <li>24 時間の継続観測が何の支障もなく可能。</li> </ul>
3-1. 核移行配列の付加法の開発	<ul style="list-style-type: none"> <li>98%の純度</li> <li>30 分以内に観察可能な配列の開発</li> <li>80%以上の活性保持</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>98%の純度及び 80%以上の活性保持を達成した。</li> <li>30 分以内に核膜も透過することを見出した。</li> <li>付加部位としては C 末端が適当であることを明らかにした。</li> </ul>
3-2. 核内移行能の評価法の開発	<ul style="list-style-type: none"> <li>上記 2-2 の場合と同様、CCD カメラで 30 分以内に観察可能なシグナル取得</li> <li>有効濃度の算出</li> <li>培養細胞系では、12 時間経過しても毒性が現れないこと</li> <li>事業化に向けた VHH 型タグ抗体大量生産法の改良</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>CCD カメラではもちろん、裸眼での観察でも膜透過配列を付加した VHH 型タグ抗体が 6~12 分で核内に取り込まれることを確かめた。</li> <li>有効濃度は 1 <math>\mu\text{g}/\text{ml}</math> で十分と判明した。</li> <li>12 時間では細胞毒性が現れず、長時間の核内移行実験が可能であると判明した。</li> <li>Pichia 酵母株によるタンパク質発現系を構築することで、細胞毒性が低く、培養細胞発現系や従来型の酵母発現系と比較して、より低コストとなる生産法への改良を行った。</li> </ul>

CCD : charge-coupled device    CMOS : complementary metal oxide semiconductor    CPP : cell-penetrating peptide

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay    LPS : lipopolysaccharide

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis    SPR : surface plasmon resonance

VHH : variable domain of heavy chain of heavy chain antibody

VHH-CPP : VHH with a cell-penetrating peptide at its C terminus

## 1-2 研究体制

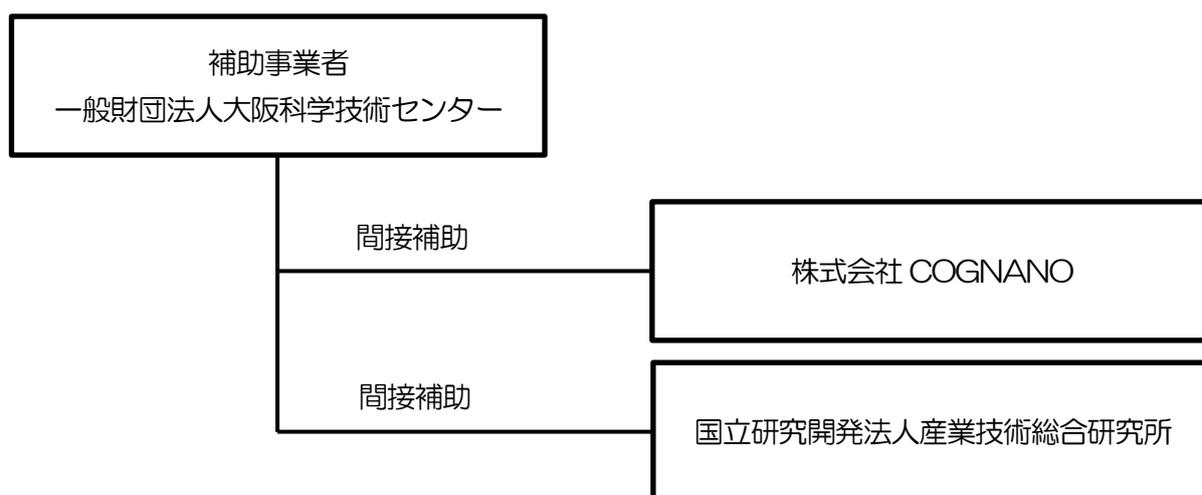


図9. 研究体制

## 総括研究代表者 (PL)

機関名	氏名	所属役職
株式会社 COGNANO	広瀬茂久	代表取締役社長

## 副総括研究代表者 (SL)

機関名	氏名	所属役職
国立研究開発法人産業技術総合研究所	新木和孝	創薬分子プロファイリング研究センター 主任研究員

## 1-3 成果概要

当初の目標値に対しての実施結果は、1-1-3 に言及している。ここでは、具体的な取り組み内容の観点からその成果についての概要を以下の一覧表（表3）にまとめて示す。

表3. 取り組み内容、重点事項、および成果（まとめ）

1. 生きた細胞及び生体に投与可能なレベルの高純度のVHH型タグ抗体を得るための精製法の開発		
サブテーマ	重点事項	成果概要
1-1. 大量生産法の開発	1) 酵母での発現系の構築 2) 動物培養細胞での生産*	1) メタノール資化酵母とメタノール誘導性プロモーターを使用した生産系を構築。 2) ヒト培養細胞 HEK293 と分泌シグナルの導入で期待以上の成果を得た。
1-2. 精製法の開発	1) アフィニティカラムからの溶出条件の検討 2) ゲル濾過に用いる担体の選択	1) 溶出液：0.3 モルのイミダゾールが最適であることを見出した。 2) 低圧で高流速が得られるゲルろ過カラム Sephacryl S-200 を採用した。
1-3. 夾雑物チェック	1) SDS-PAGE による純度検定 2) パイロジェン(=エンドトキシン=LPS)フリーであることの保証	1) SDS-PAGE で単一バンドの標品を得た。 2) LPS による TNF $\alpha$ 誘導活性の測定によって、LPS の混入は認められなかった。
新機軸：迅速な多種類生産*	1) エンドトキシン LPS を含まない VHH 型タグ抗体の少量 多種類 生産	1) 小麦胚芽抽出液の利点を生かした VHH 型タグ抗体の無細胞タンパク質合成系を確立した。
1-4. 毒性チェック	1) 培養細胞を用いた毒性評価 2) 動物を用いた毒性評価	1) VHH の有無で、培養細胞の形態・増殖速度・アポトーシスの頻度に差異は認められなかった。 2) マウスの体重・外見・組織所見で急性毒性は現れず。
2. VHH 型タグ抗体に膜透過性機能を付与するための技術開発への対応		
サブテーマ	重点事項	成果概要
2-1. 膜透過配列の付加法の開発	付加部位の決定 (N 末端 or C 末端)	C 末端に付加した方が良いことが判明
2-2. 膜透過能の評価法の開発	細胞内に取り込まれた VHH 型タグ抗体を蛍光顕微鏡で可視化	細胞内への取り込みを裸眼レベルで観察することに成功
3. VHH 型タグ抗体に膜透過性機能を付与するための技術開発への対応		
サブテーマ	重点事項	成果概要
3-1. 核移行配列の付加法の開発	最適な核移行配列及び挿入部位の決定	陽電荷数を増加させた CPP (cell-penetrating peptide) を VHH 型タグ抗体の C 末端に付加したものが効率よく核内に浸透することを見つけた。
3-2. 核内移行能の評価法の開発	核内に取り込まれた VHH 型タグ抗体を蛍光顕微鏡で可視化	核内への取り込みを 15 分以内で観察できるようにした。
新機軸：量産系の構築*	事業化に向けた VHH 型タグ抗体大量生産法の改良	Pichia 酵母株によるタンパク質発現系を構築した。

\* 緑色の欄は、研究開発実施中に新たに有効性を見出した技術・知見・研究手法で、研究開発テーマへ反映させたもの。

## 1-4 当該研究開発の連絡窓口

株式会社 COGNANO 伊村泰子 TEL: 090-3849-7017 Fax: 075-741-6962  
E-mail: cognano@cognano.co.jp

## 第2章 本論

### 2-1 生きた細胞および生体に投与可能なレベルの高純度のVHH型タグ抗体を得るための精製法の開発

#### 2-1-1 大量生産法の開発

(i) 酵母による生産系：

##### 方法

外来タンパク質の遺伝子工学的生産によく利用されているメタノール資化酵母（ピキア酵母、*Pichia pastoris*）を用いた。ピキア酵母によるタンパク質の発現系は、強力なメタノール誘導性プロモーターである AOX1 プロモーターを用いた遺伝子発現系により外来タンパク質の遺伝子を高発現させることができる点で優れている。発現ベクターには、メタノールで誘導のかかる AOX1 遺伝子のプロモーターと菌体外への分泌シグナル（Signal sequence）を組み込み、生産効率と回収操作が容易になるようにした。

##### 成果

メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いて、VHH タグ抗体の生産系を構築した。狙いどおり、メタノール誘導性プロモーター  $P_{AOX1}$  の下流に目的とする VHH 型タグ抗体の cDNA 配列を挿入することにより（[図 10](#)）、高発現させることができた。

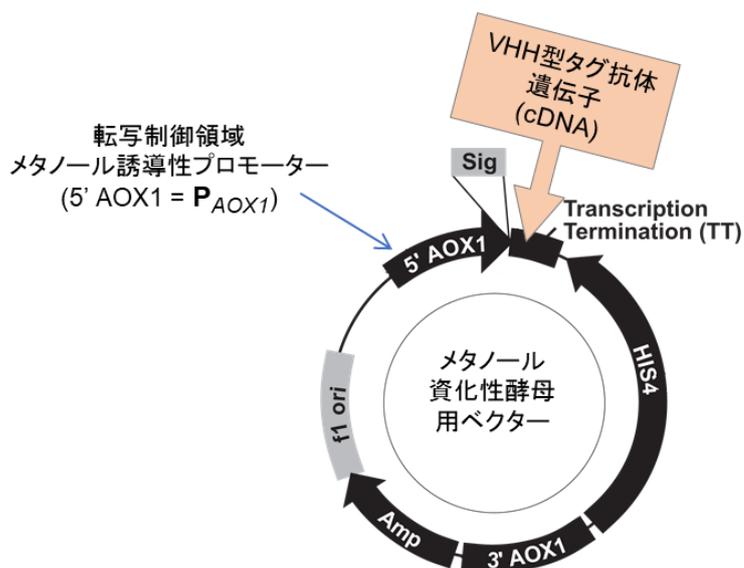


図 10. 酵母用の発現ベクター（VHH 型タグ抗体の設計図に相当）。Sig: signal peptide.

(ii) ヒト培養細胞 HEK293 による生産：

##### 方法

既に確立し広く研究開発に利用されている哺乳類培養細胞に、VHH 型タグ抗体遺伝子を含むプラスミドベクターをトランスフェクション試薬（Lipofectamine 3000 Transfection Reagent, Invitrogen L3000075）を用いて導入し、目的とする VHH 型タグ抗体を生産する方法をとった。

## 成果

動物培養細胞での大量生産は非常に難しいとされているので、申請書では触れていなかったが、試みとして、ほ乳類培養細胞を用いて、トライしたところ、良好な結果を得ることができた（収量：約 100  $\mu\text{g}/\text{dish}$ ）。大腸菌以外の系で VHH 型タグ抗体を生産し、パイロジェンフリーの標品を得るには非常に有用な系を構築できたといえる。

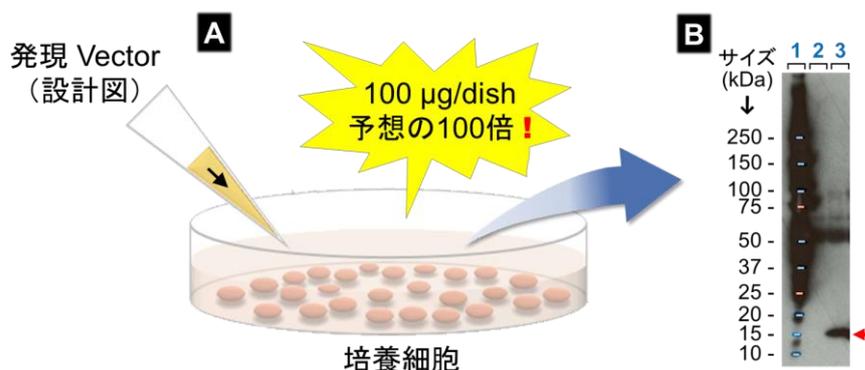


図 11. (A) VHH 型タグ抗体の動物培養細胞を用いた生産。(B) その産物の SDS-PAGE による解析: Lane 1: サイズ マーカー, Lane 2: ベクター無添加時のサンプル, Lane 3: ベクター添加時のサンプル。赤矢印が VHH 型タグ抗体のバンド。

## 2-1-2 精製法の開発

## 方法

目的とする VHH 型タグ抗体を酵母や動物培養細胞の培養上清から効率よく回収するために、アフィニティー カラム HisTrap HP を用いることにした。アフィニティー カラムへの吸着条件及びカラムからの溶出条件を、競合的溶出剤であるイミダゾールの濃度を変えながら、詳細に検討し確立することにした。

精製の第 2 段階目は、多孔質の微粒子を詰めたカラムの分子ふるい効果を利用して、分子の大きさで分けるゲル濾過を用い、タンパク質の中では比較的 low molecular weight である VHH 型タグ抗体の精製を試みることにした。

精製品の確認は、常法の (i) SDS-PAGE と (ii) ウェスタンブロットングによって行うことにし、それぞれ、(i) Extra PAGE One Precast Gel 5-20% とラピッドステイン CBB 染色液キットを用いて、SDS-PAGE のスラブゲル上のタンパク質を高感度に染色するとともに、(ii) VHH 型タグ抗体に特異的なバンドを検出するウェスタンブロットングには ECL Prime Western Blotting Detection Reagent を使用した。ECL: enhanced chemiluminescence.

## 成果

サブテーマ【1-2】精製法の開発では、[図 12](#) に示すように、1st step: アフィニティークロマト ([図 12A, B](#))、2nd step: ゲルろ過 ([図 12C & 13](#)) を行うことにより、SDS-PAGE ([図 12D](#)) で単一バンドを与える高純度標品を得ることができた (純度  $\geq 98\%$ )。特に第 1 段階目のアフィニティークロマトでは、カラム担体に結合した VHH 型タグ抗体を溶出する際のイミダゾールの濃度を詳細に検討し、最適濃度を 0.3 M (モル) と決定した ([図 12A](#))。

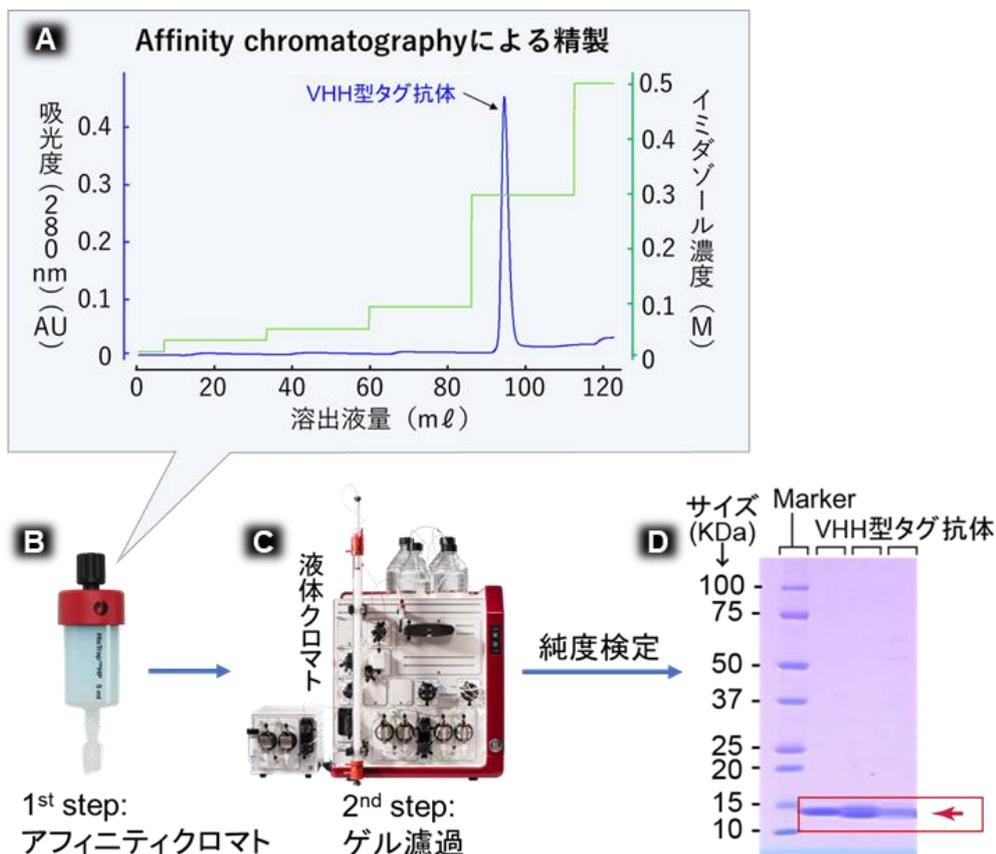


図 12. VHH 型タグ抗体の 2 段階精製：

アフィニティークロマトグラフィー (A & B) とゲル濾過 (C)。D: 精製品の SDS-PAGE による純度検定。1st step のアフィニティークロマト (Ni-chelate affinity chromatography) には HisTrap HP カラム、2nd step のゲル濾過には Sephacryl S-200 HR カラムを用いた。分取には GE ヘルスケア・ジャパン社の HPLC (high performance liquid chromatography) AKTA pure 25 高速液体クロマトグラフィーシステムを使用した。

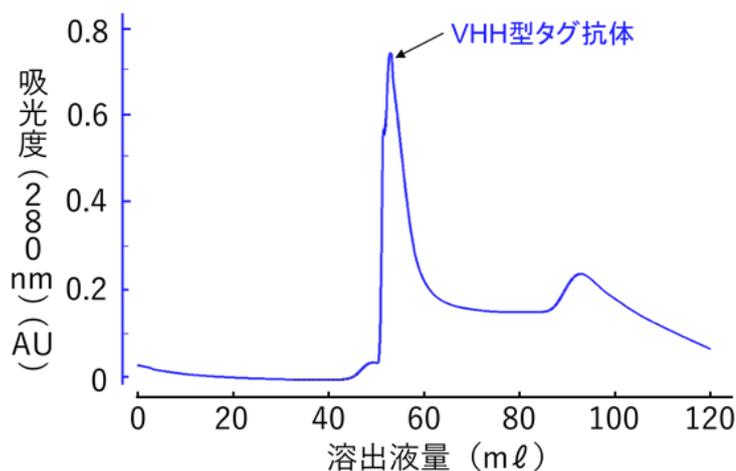


図 13. ゲルろ過カラム Sephacryl S-200 HR (Bed volume: 120 ml) からの溶出パターン。

## ◆ 精製で失活せず：

大腸菌で VHH 型タグ抗体を生産した場合の活性を 100 とすると、酵母ないしは無細胞タンパク質合成系で生産した場合の活性が 90% を下回らないことを目標としている。酵母で生産したもの及び動物培養細胞で生産したもの、いずれも比較の対照となる VHH 型タグ抗体（大腸菌で生産したもの）と同じレベルの活性（ $\geq 90\%$ ）を有することを ELISA（Enzyme-linked immunosorbent assay）で確認した（[図 14](#)）。

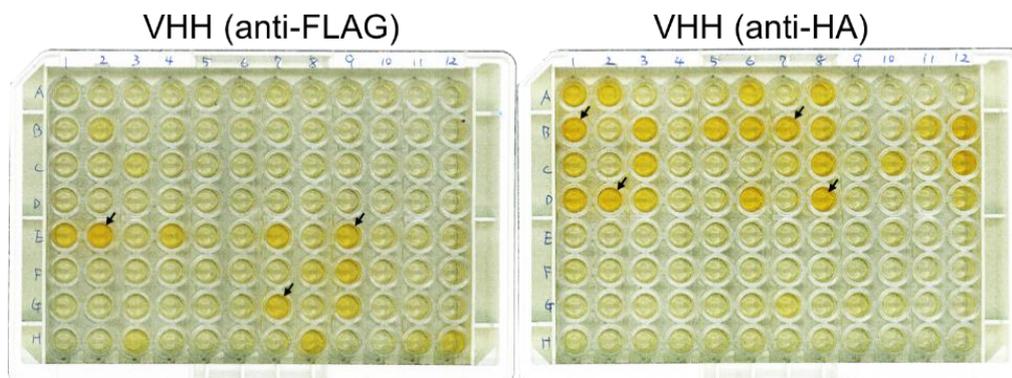


図 14. VHH 型タグ抗体の ELISA による活性チェック。黄色が濃いものほど抗原（タグ）結合活性が強い。

## 2-1-3 夾雑物チェック

## 方法

精製した VHH 型タグ抗体を (i) SDS-PAGE 分析にかけてタンパク質標品としての純度を検定した後、(ii) RAW264.7 マウス マクロファージ様細胞株を用いてエンドトキシン LPS によって発現が誘導される TNF  $\alpha$  量を ELISA によって測定し、エンドトキシンの有無を調べた。

## 成果

SDS-PAGE による分析では、単一バンドとなり、98%以上の純度であることが確認できた（[図 12D](#)）。エンドトキシンの混入も認められなかった。

## 新しい試み 1： 迅速な多種類生産 &lt;無細胞タンパク質合成系による VHH タグ抗体の生産&gt;

## 方法

RNase フリーの環境下で、試薬は氷上に置いて作業を行った。タンパク質発現用 mRNA を転写反応により調整するため、1.5 ml チューブに、5× 転写バッファー、NTP 混合液、RNase 阻害剤、SP6 RNA ポリメラーゼ、VHH プラスミドを計 20  $\mu$ l 混合し、37° C で 6 時間反応させた。反応済み mRNA の半量 10  $\mu$ l を回収し、コムギ胚芽抽出液、クレアチンキナーゼを含む 10  $\mu$ l の翻訳反応液とゆっくりピペティングして 20  $\mu$ l に混和調整した（mRNA 翻訳反応液）。別途、96-well プレートに 200  $\mu$ l の 20 種類の L アミノ酸、ATP、GTP、マグネシウム、DTT 等を含むバッファー溶液を添加し、そのバッファー溶液の下層に mRNA 翻訳反応液を加えた。2 層の状態のまま 15° C で 20 時間インキュベートしタンパク質を合成させた。反応後、サンプルを 1.5 ml チューブに回収し、可溶性・不溶性画分に分けてサンプル調製を行った。

## 成果

無細胞タンパク質合成系の具体的方法に記載したとおりの VHH タンパク質発現の検討実験を行った。その結果を図 15 に示す。2 種類の VHH タンパク質を用いた発現実験の結果、いずれも可溶性画分にタンパク質発現が行われることを CBB 染色にて確認した。また、可溶性画分を回収し His タグビーズを用いたタンパク質精製を試みたところ、VHH タンパク質がメジャーバンドとして回収されることが確認された (図 15B)。75 kDa 付近にもコンタミネーション タンパク質が確認されたが、ゲルろ過等を用いることで分離可能と考えられる。しかしながら、この粗精製状態のサンプルであっても、エンドトキシンを含まないため、VHH タンパク質の細胞膜透過実験や核移行実験に利用可能なサンプルであり、今後のスクリーニング等で、本無細胞タンパク質合成系を十分活用できる状況になった。

また本予備実験は産業技術総合研究所 (臨海) で進めたが、技術移転を進めるため、京都大学医学部の COGNANO 社の共同実験室でも同様の実験を行い、同等の結果を得ることに成功した。

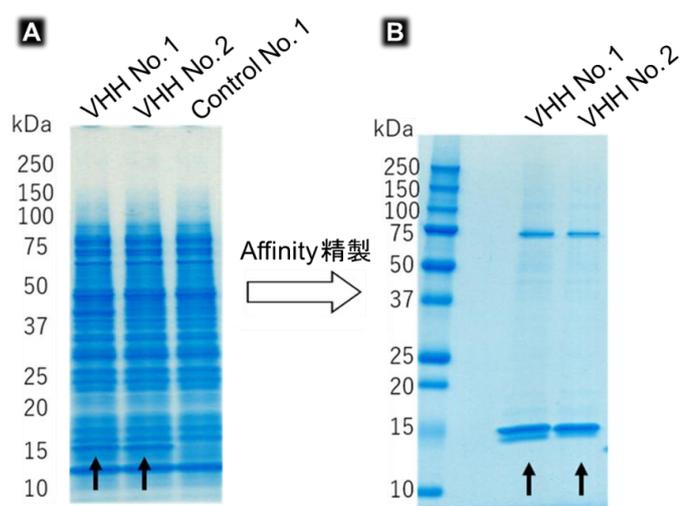


図 15. 無細胞タンパク質合成系 (Cell-free translation system, CFTS) を利用した VHH 型タグ抗体の合成。

A: CFTS 溶液を含む試験管に何も加えないコントロール (対照) と VHH タグ抗体の設計図を加えたもの (VHH No. 1 & 2) を一定時間反応させた後、可溶性画分を SDS-PAGE によって分析した。矢印が新しく現れたバンド。B: 上記産物をアフィニティークロマトグラフィー (His-tag 吸着担体) で粗精製した後に SDS-PAGE にかけたもの。

## 2-1-4 毒性チェック： 毒性なし

## (i) 培養細胞系による毒性チェック

## 方法

一般的な培養細胞である HEK293 細胞 (ヒト胎児腎臓由来) に、大過剰 (2 mg/ml) の VHH 型タグ抗体を添加し、48 時間後に、形態・増殖速度・アポトーシスについて調べ、無添加のものと比較することにより毒性の有無を評価した。

## 成果

培養細胞 (HEK293、ヒト胎児腎臓由来) に、大過剰 (2 mg/ml) の VHH 型タグ抗体を添加しても影響は現れず、正常な形を保ったまま、無添加のものと同じ速さで成長を続けた。

図 16 にその結果を示す。図 16A は、培養細胞を用いた実験系の概要。図 16B は、培養細胞 HEK293 に図 12 で得た VHH 型タグ抗体を添加し、毒性の有無を調べた結果、細胞の形状・アポトーシス・分裂速度等において変化は見られず、毒性は検出されなかった。

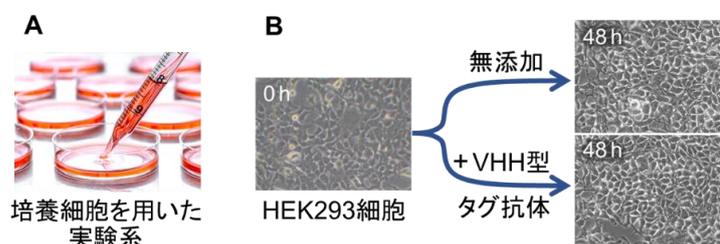


図 16. 培養細胞系による毒性チェック

(ii) 動物実験系による毒性チェック：通常濃度の 3 倍でも毒性は現れず、投与可能

#### 方法

マウスを用いて一般毒性試験（単回投与急性毒性試験）を行った。試験は、3 日間の試験期間中に、一般状態の観察、体重及び摂取量の測定を行い、試験終了時に腎臓と肝臓の病理学的検査等を行った。

#### 成果

マウスを 4 群に分け（図 17A）、0~300  $\mu\text{g}$  の VHH 型タグ抗体を静脈注射し、標準評価法\*\*に従い、3 日間経過観察及び体重測定を行うことにより急性毒性試験を行った。

300  $\mu\text{g}$ （抗体医薬の通常投与量の 15 倍）の時は 1 日目で有意な体重減少を認めたが（図 17B, \*印）、2 日目以降では回復した。60  $\mu\text{g}$ （通常投与量の 3 倍）以下では影響が見られなかった。

\*\*標準評価法、すなわち一般毒性試験（単回投与急性毒性試験）：試験期間中、一般状態の観察、体重及び摂取量の測定を行い、試験終了時に必要に応じ、病理学的検査等を行う（今回は肝臓・腎臓の組織像を顕鏡した）。

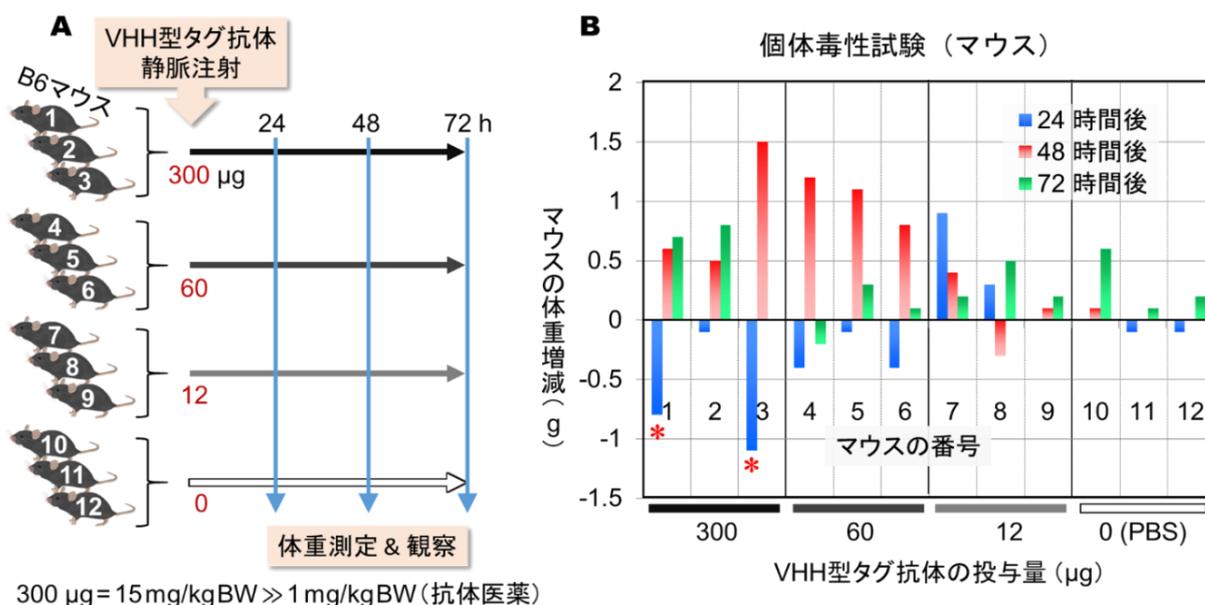


図 17. マウスを用いた個体毒性試験の手順 (A) と結果 (B)

B6: 一般的な近交系実験用マウス C57BL/6 (C57 black 6) の略称。

PBS: phosphate-buffered saline (リン酸緩衝生理食塩水)。BW: body weight (体重)。

## 2-2 VHH型タグ抗体に膜透過性機能を付与するための技術開発

## 2-2-1 膜透過配列の付加法の開発

## 方法

これまでに知られている膜透過配列は塩基性アミノ酸であるアルギニン (R) に富むという特徴を有する(図7)。これらの中から4種類の配列を候補として取り上げ、下図18のような手順に従い、すなわち (i) 膜透過配列を組み込んだ設計図(遺伝子DNA)を化学的に合成し、(ii) 菌体や培養細胞で生産するための発現ベクターに組み込み、(iii) 遺伝子工学的に生産した後、(iv) アフィニティークロマトグラフィーとゲル濾過で精製し、膜透過性のVHH型タグ抗体を作製した。

膜透過配列としては、表1(p.4)に示すR9(RRRRRRRR)、TAT(GRKKRRQRRRPQ)、TP10(AGYLLGKINLKALAALAKKIL)、及びL17E(IMLTALKFLGKHA AKHEAKQQLSKL)の4種類を候補とし、それら(総称としてCell-penetrating peptideを略して、CPPと呼ぶ)の挿入部位としてはVHH型タグ抗体のN末端とC末端の2か所を検討することにした。

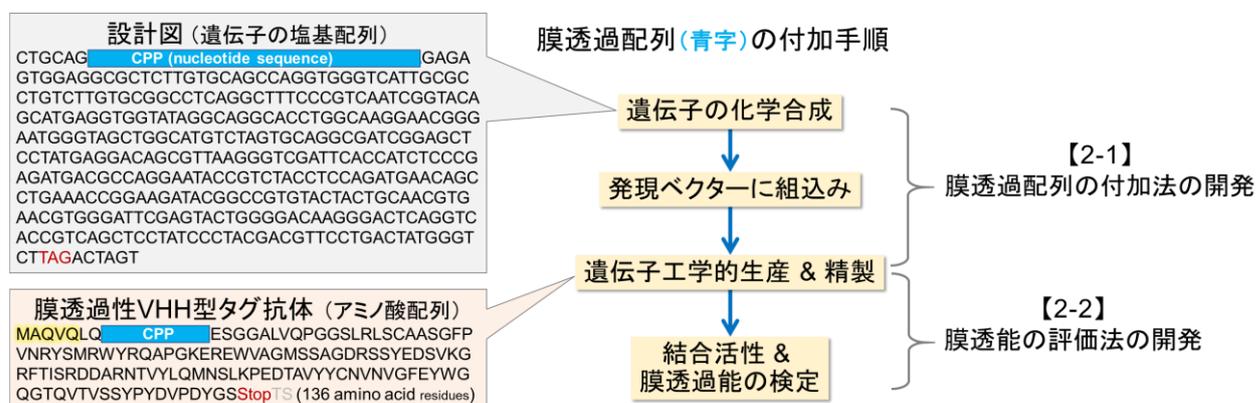


図18. 膜透過性VHH型タグ抗体の作製と活性評価の手順

VHH型タグ抗体のN末端にCPP(cell-penetrating peptide)を付加する場合を例として、具体的な操作手順を示している。

## 成果

膜透過配列としては、R9(RRRRRRRR)、TAT(GRKKRRQRRRPQ)、TP10(AGYLLGKINLKALAALAKKIL)、及びL17E(IMLTALKFLGKHA AKHEAKQQLSKL)の4種類を候補として検討した。膜透過配列の挿入部位としては、図19のようにN末端とC末端の2か所が考えられるので、組み合わせとしては8種類となる。

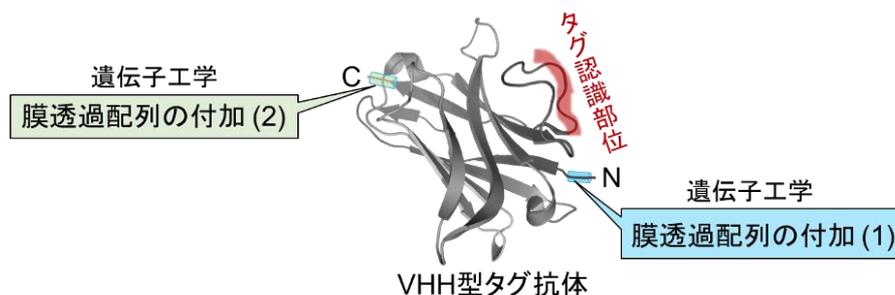


図19. VHH型タグ抗体の立体構造と膜透過配列の付加部位

上記8種類の遺伝子（設計図、DNA）を化学的に合成し、それらを発現ベクターに組み込んで、平成29年度に確立したVHH型タグ抗体の生産法（[図10, 11](#)）と精製法（[図12](#)）に従って調製したサンプルを用いて、膜透過能を評価するのが最も単純な進め方であるが、遺伝子の合成費用が比較的高価であることを考慮して、先ずR9とTAT配列をN末端に挿入したVHH型タグ抗体（GFPタグを認識するR9-VHHとTAT-VHH）を作製し、以下のようにそれらの性質を調べた。

- (i) **N末端への付加**：活性は保持されたが、発現量（生産量）は減少した。

R9-VHH及びTAT-VHHはともに、タグであるGFP（緑色蛍光タンパク質、Green fluorescent protein）に強く結合することが、SPR（表面プラズモン共鳴、Surface plasmon resonance, [図20A](#)）及び蛍光顕微鏡観察（[図20B](#)）で確かめられた。

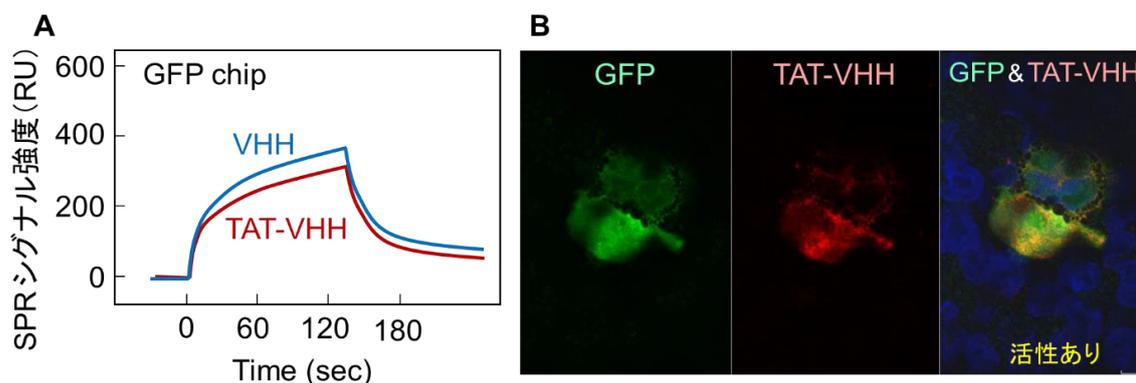


図20. TAT-VHHの活性検定

(A) GFPを固定した測定チップとTAT-VHHを用いて両者の結合をSPR（表面プラズモン共鳴、Surface plasmon resonance）で測定した結果；TAT-VHHは対照（VHH）の90%以上の活性を有していた。

(B) GFPに対するVHH型タグ抗体（TAT-VHH）を培養細胞（HEK293）内でGFPと共に発現させ、活性の有無を検定した。GFPとTAT-VHHが結合すると黄色になることから活性の有無が判定できる。実際に黄色となり、結合活性を有することが確認できた。

しかし、N末端にプラス電荷に富む膜透過配列（R9 & TAT）を付加すると、R9-VHH及びTAT-VHHの生合成が遅くなり、収量（生産性）が大きく減少することが明らかになった（[図21](#)）。原因としては、R9-VHH及びTAT-VHHの生合成過程の初期でリボソーム（細胞内のタンパク質合成装置）が膜透過配列のプラス電荷につかまり動きが遅くなるためと考えられたので、以降の実験では、C末端への付加を中心に進めることにした。

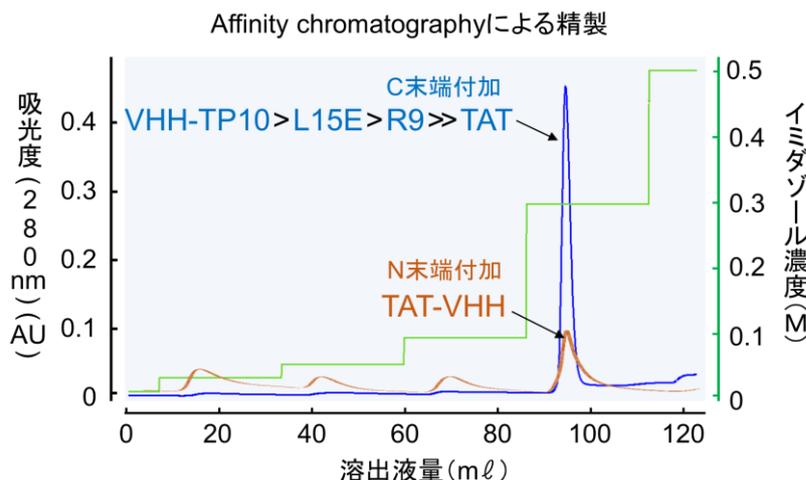


図 21. N 末端付加標品と C 末端付加標品の発現量の比較

膜透過配列を VHH 型タグ抗体の N 末端に付加したもの (—) と C 末端に付加したもの (—) をアフィニティークロマトグラフィー (HisTrap カラム使用) によって精製し収量を比較した。N 末端付加の場合は収量が 1/4 以下に減少した。C 末端付加の場合も収量は膜透過配列に依存した。

(ii) C 末端への付加： N 末端付加に比べ良好な結果が得られた。

C 末端付加の場合は、付加した膜透過配列に依存する形で、発現量の減少が見られたが、VHH-TP10 及び VHH-L15 等では減少は比較的小さく、実用的には満足すべき結果が得られた(図 22)。

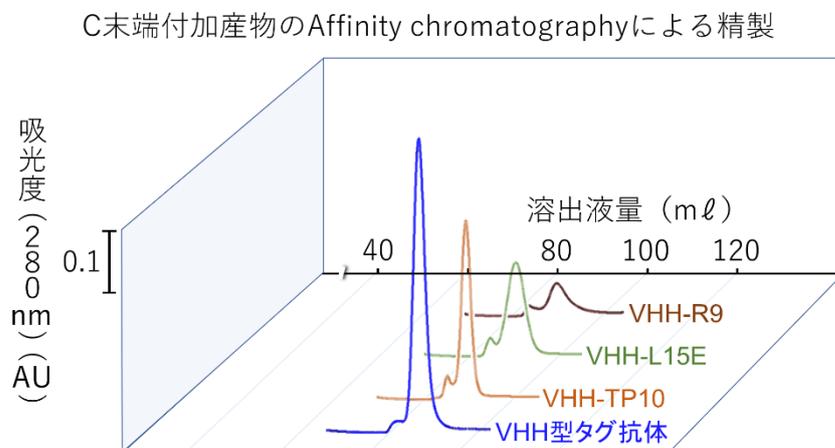


図 22. C 末端付加産物の収量 (HisTrap カラムからの溶出パターンの比較)

## 2-2-2 膜透過能の評価法の開発

### 方法

細胞内に取り込まれたタンパク質を可視化するために一般的に用いられるのは蛍光顕微鏡であるが、そのためには [i] 目的タンパク質を直接 蛍光色素で標識するか、[ii] 蛍光色素で標識した抗体を用いて間接的に蛍光標識する必要がある。後者は目的タンパク質に特異的に結合する抗体を利用することから免疫組織化学的方法と呼ばれる。

本研究開発では、上記の直接標識法と間接標識法の両方を試みることにし、蛍光顕微鏡としてはオリンパス社の共焦点レーザー顕微鏡 FV3000 を用い、膜透過性 VHH 型タグ抗体の蛍光標識は市販の試薬 (Alexa Fluor 488 NHS) を用いて行った。

## 成果

### (i) N 末端への付加：膜透過活性は比較的弱い。

N 末端付加型の R9-VHH 及び TAT-VHH の膜透過活性を蛍光顕微鏡で調べた結果、いずれも弱い膜透過性しか示さず、30 分後に裸眼で観察できるレベルには達しなかった。

しかし、免疫蛍光抗体法では弱いシグナルながらも TAT-VHH の細胞内取り込みは確認できた (図 23 の白矢印部分)。

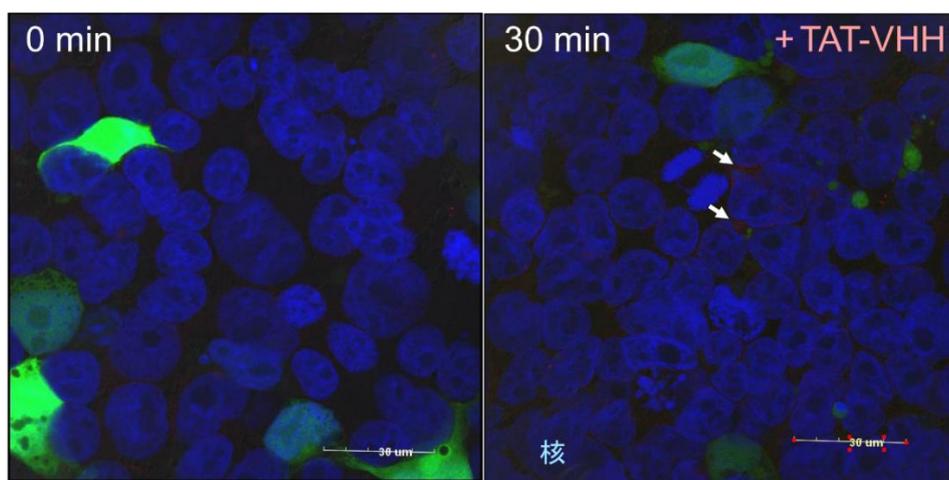


図 23. N 末端付加型 TAT-VHH の細胞内への取り込み

赤：細胞内に取り込まれた TAT-VHH (矢印)；緑：GFP 発現細胞；青：細胞核。

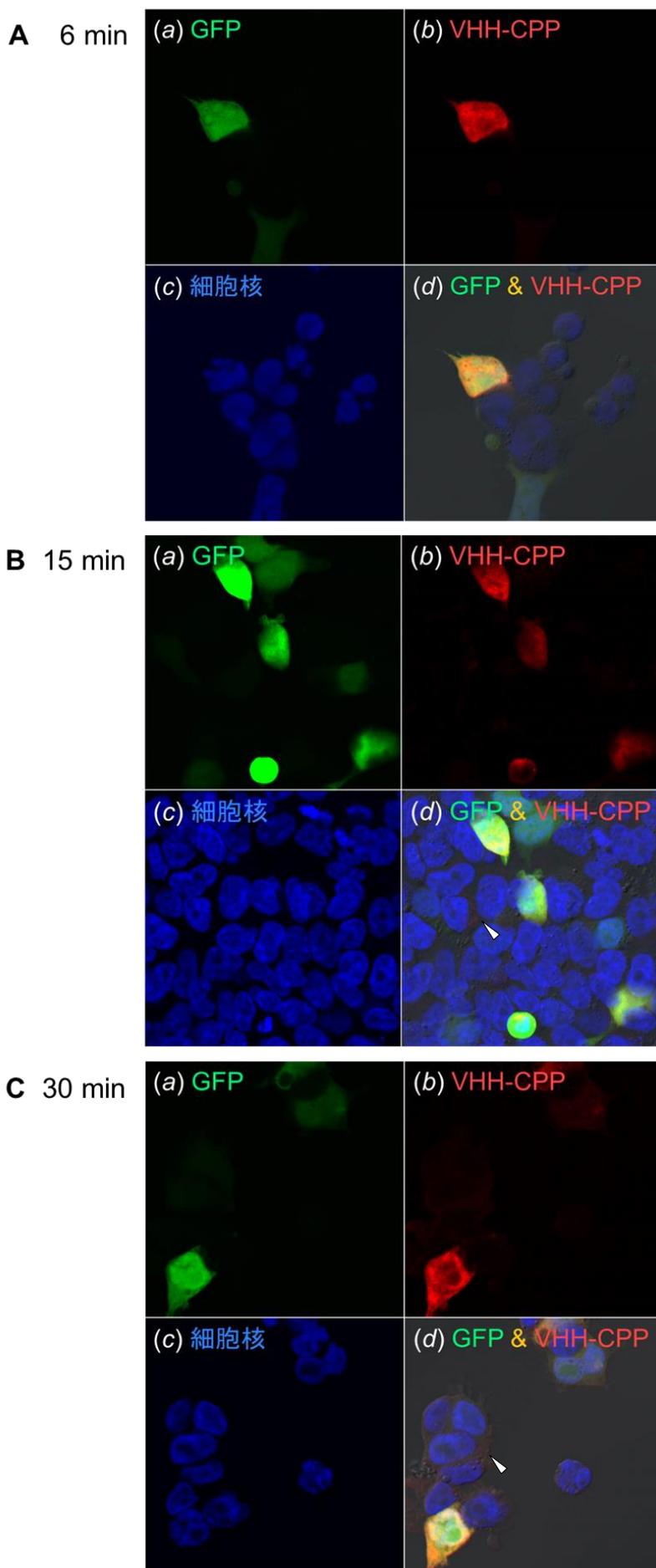
### (ii) C 末端への付加：極めて良好な膜透過能を有し裸眼で細胞内取込の観察が可能。

ここでは 4 種類の膜透過配列 (R9, TAT, TP10, L17E) とその誘導体を便宜上 CPP (cell-penetrating peptide) と総称することにする。用いた培養細胞は HEK293 で、タグとして用いられる GFP を一過性に発現させ、GFP タグと VHH 型タグ抗体の相互作用も解析できるようにした。

#### <注目すべき成果>

- C 末端付加型の VHH 型タグ抗体の場合は、期待以上に強い膜透過能を有することが分かった (図 24)。一過性に GFP を発現した培養細胞 HEK293 に C 末端付加型の VHH-CPP を添加後、時間を追って細胞内への浸透度を免疫組織化学的方法で調べたところ、わずか 6 分で、細胞内に取り込まれた VHH-CPP シグナルは裸眼で観察できるレベルに達することが判明した (図 24A、パネル b)。
- GFP シグナル (緑) と VHH-CPP シグナル (赤) を重ねると黄色 (図 24、パネル d) になることから、VHH-CPP はタグ結合活性を保持しており、細胞内に入って GFP-VHH-CPP 複合体を形成することが明らかになった。
- 時間経過とともに、図 24B & 24C に示すように、GFP を発現していない HEK293 細胞にも弱い VHH-CPP のシグナルが観察されるようになった。GFP 発現細胞とそうでない細胞では

VHH-CPP シグナル強度に大きな差異がみられたが、その理由としては GFP 発現細胞の場合は GFP と VHH-CPP が細胞内で複合体を形成することによって (図 25)、分子サイズが大きくなり細胞内に留まるのに対し、GFP が無い場合は VHH-CPP が一旦細胞内に入っても、洗浄等の実験操作中に再び細胞外に漏れ出てしまうためと解釈されるが、詳細なメカニズムは今後明らかにしていきたい。



**図 24.** 膜透過配列を C 末端に付加した VHH 型タグ抗体(VHH-CPP)の細胞内への浸透。

ここでは膜透過配列を Cell-Penetrating Peptide の頭文字をとって CPP と略する。

**A, B, C** は培養細胞に VHH-CPP を添加後、それぞれ 6, 15, 30 分後の顕微鏡写真で、以下の 4 枚セットからなる:

パネル(a)緑: GFP 発現細胞。

パネル(b)赤: 膜透過性 VHH 型タグ抗体 VHH-CPP は、培養細胞に添加後、数分後から GFP 発現細胞に有意に取り込まれているのが確認でき、強い膜透過能を有することが確かめられた。

パネル(c)青: DNA に結合する蛍光色素 Hoechst 33342 による核染色。

パネル(d)黄色: 黄色は緑色の蛍光を発する GFP タグに赤色の VHH-CPP 抗体が結合していることを示す。従って細胞内に浸透した VHH-CPP 抗体がタグ結合活性を保持していることが確認できた。

-----

白矢印(B-d & C-d): GFP を発現しない HEK293 細胞内に浸透した VHH-CPP の弱いシグナル。

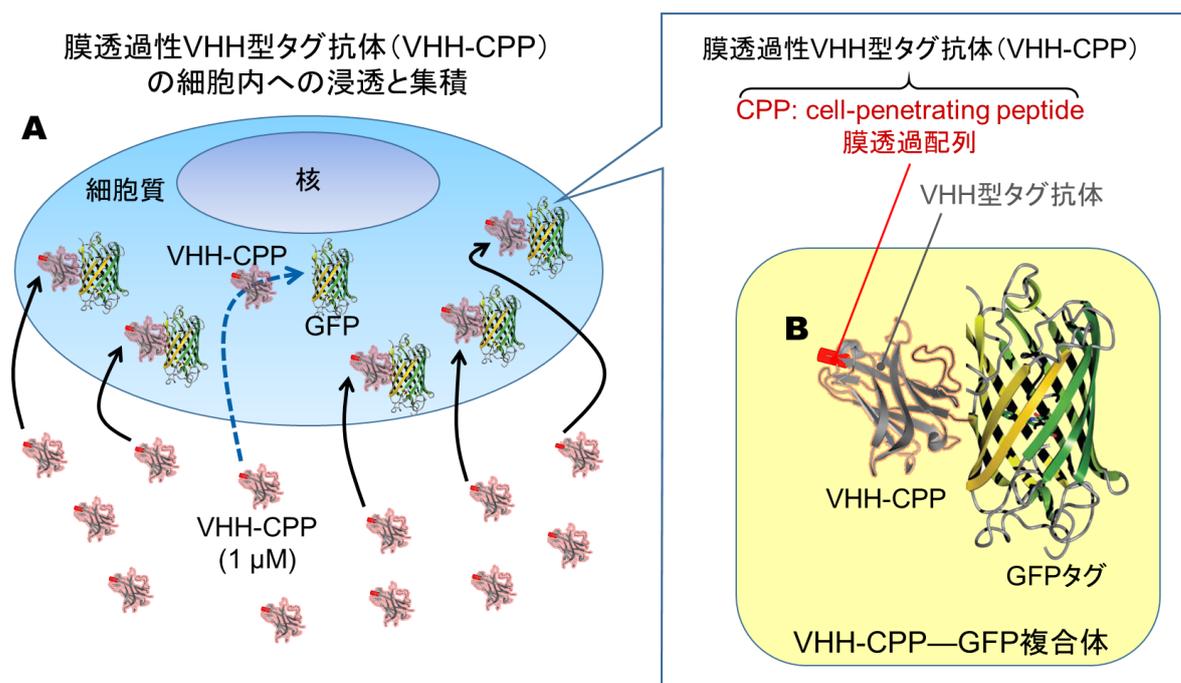


図 25. C 末端に膜透過配列 CPP を付加した VHH 型タグ抗体 (VHH-CPP) の細胞内への浸透と集積メカニズム (A)。膜透過性 VHH 型タグ抗体 VHH-CPP とその標的 (結合相手) となる GFP タグとの複合体の模式図 (B)。

## 2-3 VHH 型タグ抗体に核内移行機能を付与する技術の開発

### 2-3-1 核内移行配列の付加法の開発

#### 方法

まず、典型的な核移行配列 (核膜透過配列 or 核移行シグナル = NLS, Nuclear localization signal) である PPKKKKRV を VHH-CPP の N 末端に付加した NLS-VHH-CPP を遺伝子工学的に生産することを試みたが、NLS を N 末端に付加したものでは生産量が低下し、望ましくないことが判明した。C 末端に付加する方法では、CPP と NLS が隣接する (VHH-CPP-NLS) ことになる；CPP と NLS はともに陽電荷に富むことに着目し、両者を直接結合させる前に、CPP の陽電荷数を増やすことにより (図 26B)、核移行能を向上させることを試みた。

#### 成果

上記の改変型 VHH-CPP<sup>+</sup> (核局在性 VHH 型タグ抗体) を、図 18 の方法を踏襲して、以下のように調製した：(i) 膜透過配列を組み込んだ設計図 (遺伝子 DNA) を化学的に合成し、(ii) 菌体や培養細胞で生産するための発現ベクターに組み込み、(iii) 遺伝子工学的に生産した後、(iv) アフィニティークロマトグラフィーとゲル濾過で精製し、膜透過性の VHH 型タグ抗体を得た (図 26)。

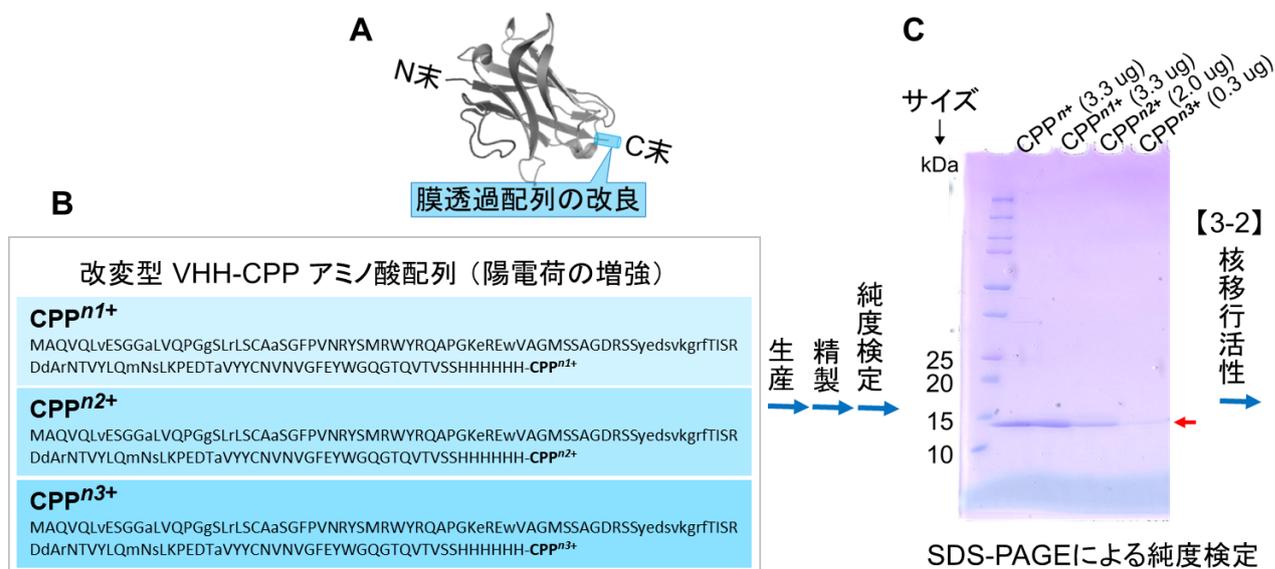


図 26. 核膜透過性 VHH 型タグ抗体の構造、生産、及び精製品の純度検定

## 2-3-2 核内移行能の評価法の開発

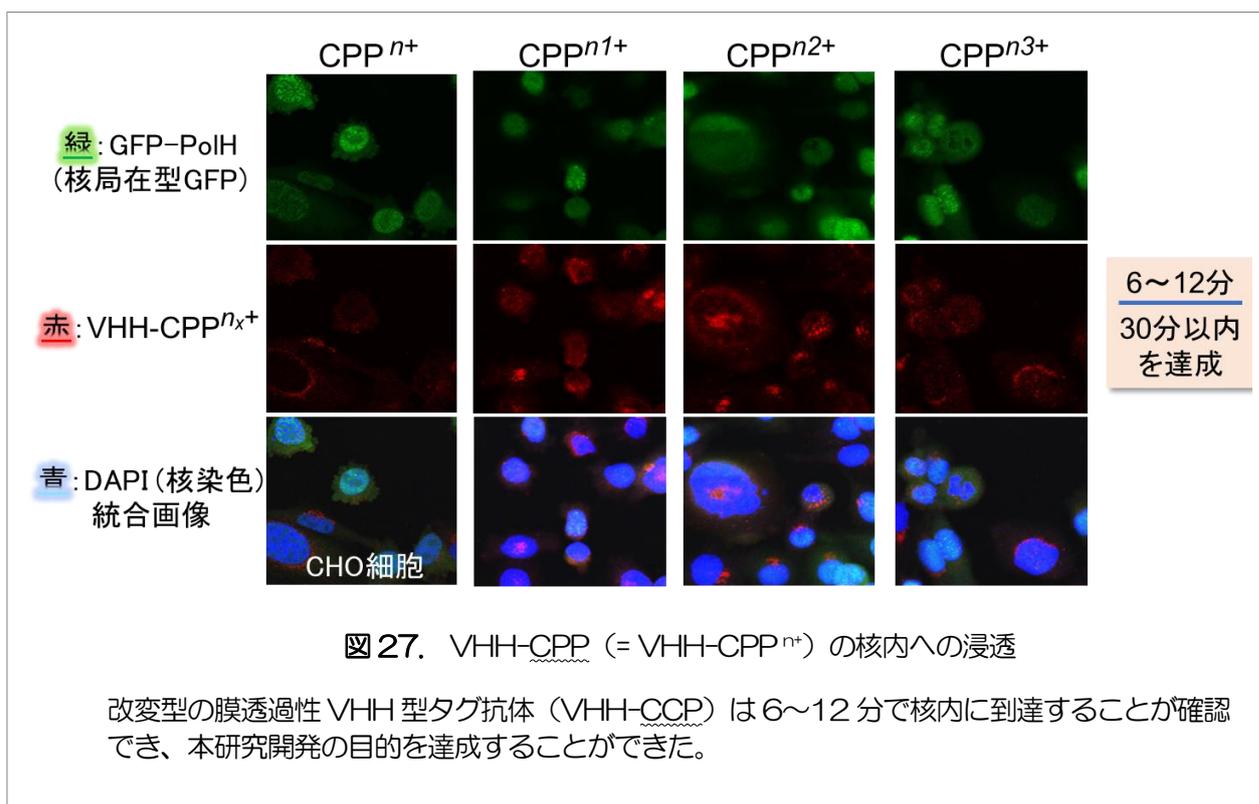
### 方法

細胞内の核に取り込まれたタンパク質を可視化するための方法も、基本的には前述(2-2-2 節参照)の蛍光顕微鏡法と同じである。ここでは、主として間接標識法(免疫組織化学的方法)を用い、蛍光顕微鏡としては 3D デコンボリューション機能を搭載したオリンパス社の共焦点レーザー顕微鏡 FV3000 を用いた。

### 成果

改変型 VHH-CPP アミノ酸配列として、C 末端の His タグの後に陽電荷を増強させた CPP<sup>n1+</sup>, CPP<sup>n2+</sup>, CPP<sup>n3+</sup> を連結したベクターを作製し(図 26B)、それぞれを発現・精製した。VHH-CPP<sup>n3+</sup> では発現量が かなり少なくなる傾向が観察された(図 26C)。精製 VHH-CPP を用いて、細胞膜透過性及び核移行性を確認したところ、VHH-CPP<sup>n1+</sup>、VHH-CPP<sup>n2+</sup> では強い核移行を示す染色像が得られた(図 27)。また、VHH-CPP<sup>n3+</sup> では核移行能の低下がみられた。結論として、VHH-CPP<sup>n1+</sup> 及び VHH-CPP<sup>n2+</sup> (図 27) を用いれば、細胞内のみならず核内にも VHH 型タグ抗体を送達できることが明らかになった。

- ◆本研究開発では タグ抗体に的を絞って研究開発を進めてきたが、以上の成果は、近年、注目度が急速に高まりつつある VHH 型抗体一般の有用性を飛躍的に高める技術にもなる点を強調しておきたい。



## 新しい試み 2： 事業化に向けた VHH 型タグ抗体大量生産法の改良 — 分泌系

### 方法

これまでの研究成果をうけて、迅速に製品化への事業を進めるうえでも、大量培養生産技術の確立が必要であると考え、*Pichia pastoris* という Ablynx 社 (VHH 開発の最大手) が採用している酵母を膜透過性 VHH 型タグ抗体の発現系として採用し、大量生産法の改良を進めた。

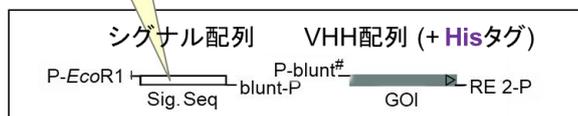
### 成果

生産タンパク質を分泌させるために、8 種類の分泌シグナル配列 (図 28-1) をそれぞれ用いた発現ベクターを作製 (図 28-2) し、形質転換、発現クローンの選別を行った (図 28-3, 4)。発現クローンを PCR (polymerase chain reaction, 図 28-5) で確認後、ゲル電気泳動 (SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) によって VHH 型タグ抗体の内在性発現を確認した。

最終目標である分泌生産は 今後の課題であるが、以下のように対応する計画である：〔1〕シグナル配列 (Sig. Seq., signal sequence) やコドンの最適化・タグ位置の変更、及び〔2〕酵母発現株の変更 (X-33, GS115 株等) などによって、分泌発現系を構築し、量産と精製プロセスを簡素化する。

① α-amylase シグナル配列:	クロコウジカビ由来	20 a.a.
② Serum albumin シグナル配列:	ヒト由来	18 a.a.
③ Inulinase シグナル配列:	子囊菌酵母由来	16 a.a.
④ Invertase シグナル配列:	出芽酵母由来	19 a.a.
⑤ Killer シグナル配列:	出芽酵母由来	26 a.a.
⑥ Lysozyme シグナル配列:	ニワトリ由来	26 a.a.
⑦ Glucoamylase シグナル配列:	アワモリコウジカビ由来	18 a.a.
⑧ α-mating factor シグナル配列:	出芽酵母由来	19 a.a.

1 最適なシグナル配列 (Sig. Seq.) の選抜



2 発現ベクターの構築

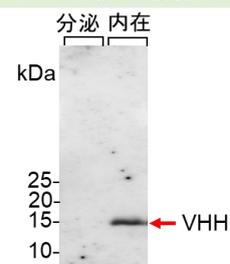
3 酵母への導入



4 種類の発現株 (いずれも選択マーカー: ade2欠損株)

- Strain **A**
- Strain **B** (-pep4)
- Strain **C** (-prb1)
- Strain **D** (-prb1, -pep4 ← タンパク質分解酵素)

5 SDS-PAGE (抗His抗体検出)



5 発現クローン株 の選抜



酵母ゲノムPCR (VHH配列の確認)

4 安定発現株 の選抜

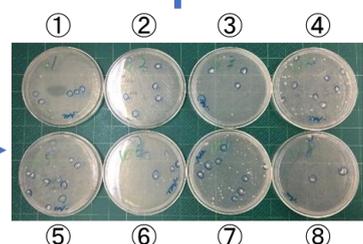


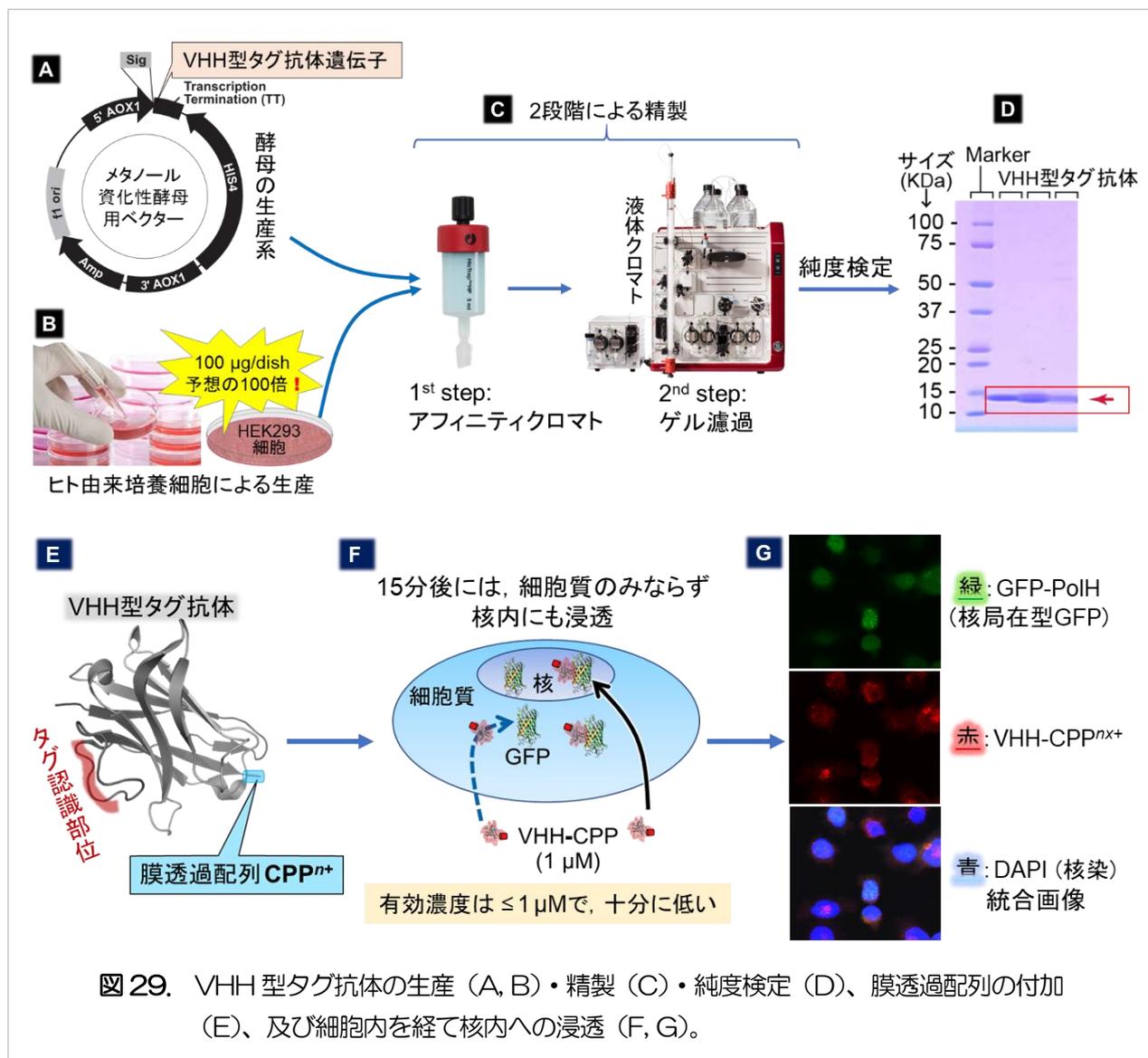
図 28. 改良中の酵母 VHH 発現系の概要

VHH 型タグ抗体及びその誘導体である膜透過性 VHH 型タグ抗体には、アフィニティー精製用や SDS-PAGE でのバンド検出用に C 末端付近にヒスチジンが 6 個 (His×6 = HHHHHH, His タグ) 付いている。この配列の有無は ほとんどの場合無視できるが、ユーザーによっては無いものを望む場合もあるので、製品化に際しては除去したものも作れるように工夫されている。

## 最終章 全体総括

## 3-1 複数年の研究開発成果

◆パイロジェン (LPS, lipopolysaccharides) フリーの産物が得やすい発現系として、酵母 (図 29A) 及び培養細胞 (29B) を用いる VHH 型タグ抗体の生産系を確立し、2 段階による精製を経て (29C)、純度 98% 以上の標品 (29D) を得ることに成功した。



◆精製した VHH 型タグ抗体は、培養細胞 HEK293 及びマウスを用いた動物実験のいずれにおいても毒性を示さなかった。

◆VHH 型タグ抗体の C 末端に、膜透過配列 (CPP, cell-penetrating peptide) の電荷を変化させた誘導体 (CPP\*) を付加した VHH-CPP\* を作製し、それらが 15 分以内に細胞内及び核内にまで浸透することを確認した。CPP\* 付加による毒性は認められなかった。

◆VHH-CPP\* の細胞膜及び核膜透過能は極めて高く、通常の蛍光顕微鏡下で裸眼で観察することができた。

- ◆従来の技術では、抗体を生きた細胞内に効率よく導入することは出来ず、研究や治療標的としては細胞外分子に限定されていた。本研究開発の成果は、抗体の応用範囲を細胞内や核内で働く分子にまで広げるものであり、基礎研究のみならず抗体医薬の開発等にも大きな可能性を開くものと期待される。

## 3-2 研究開発後の課題・事業化展開

### 3-2-1 想定している具体的ユーザー、マーケット及び市場規模等に対する効果

#### 想定ユーザー：

国内外の (i) バイオ系の基礎研究を行っている大学や研究機関、(ii) バイオ関連の研究開発に取り組んでいる食品・化学・材料系企業、及び (iii) 製薬関連のベンチャー企業と既存の製薬企業などで研究開発業務に携わっている研究者。

#### マーケットとその規模：

製薬企業で、タンパク質および抗体医薬を扱っている企業は、年間の研究開発費のうち、タグ抗体に日本国内で 30 億円、世界で 200 億円かけていると推定される。さらに、大学・研究所・公的研究機関など、タンパク質を研究対象としている機関は、タグ抗体に日本国内で 10 億円、世界で 200 億円かけているものと推定される（日経バイオ年鑑 2016、研究開発と市場・産業動向）。

現在の世界市場は約 400 億円（国内市場はその約 1/10）で、年平均成長率が 6.0%である。この割合で成長が続くと 5 年後の 2025 年には、医薬品（抗体医薬 2.5 兆円、シード・プランニング社 2017）を除く研究用の抗体関連試薬（タグ抗体を含む）だけでも 1.65 兆円に達すると推定されている（Meticulous Research 社の調査、January 2020）。

研究用の抗体関連試薬会社のトップ 10 は以下のようになっている：

[1] Abcam plc	(UK)
[2] Merck KGaA	(Germany)
[3] Cell Signaling Technology, Inc.	(USA)
[4] GE Healthcare	(USA)
[5] Thermo Fisher Scientific Inc.	(USA)
[6] F. Hoffmann-La Roche AG	(Germany)
[7] Santa Cruz Biotechnology, Inc.	(USA)
[8] Becton Dickinson and Company	(USA)
[9] Rockland Immunochemicals Inc.	(USA)
[10] Johnson and Johnson	(USA).

#### 市場規模に対する拡大効果：

現在市販されているタグ抗体は従来型の 2 本鎖抗体であり、これらは間違いなく VHH 型タグ抗体に置き換えられていく。

さらに本研究開発の成果によって、新しく膜透過性 VHH 型タグ抗体が加われば、市場規模は少なくとも 2 倍近くに膨れ上がると予想される。

本研究開発の成果である膜透過能付与技術は、タグに対する抗体に限らず、VHH 抗体一般に応用が可能であると考えられる。膜透過性 VHH 型抗体医薬の開発をも加速し抗体市場の大幅な拡大につながると期待している。

### 3-2-2 事業化展開

#### 価格的・性能的な優位性：

アルパカ由来の特殊抗体 VHH は従来型抗体に比べ極めて安定で安価に大量生産できるという特徴を有する。さらに本事業ではそのような VHH 型タグ抗体に膜透過機能を付与して付加価値を格段に高めた上で市場に送り出すことを目的としており、性能面での優位性も際立っている。

#### 事業化に至るまでの遂行方法や今後のスケジュール：

本事業化において製品化する細胞膜透過性 VHH 型タグ抗体の有用性が市場で認知されるまでの最初の 2 年間（2021～2022 年度）は、当社の設備で生産するが、それ以後の急速な市場の拡大に対しては、抗体の製造・販売に関して国内最大手メーカーに徐々にライセンスしていく比率を増やしていく。2025 年度以降は市場規模が 10～20 億円と飛躍的に伸びていると思われるので、川下製造業者のプラントでのライセンス生産に移行し世界に向けた供給体制を整える計画である。