

二重特異性抗体を用いた 標的組織へのピンポイント遺伝子導入法

日本医科大学 研究部 共同研究施設 分子解析研究室
助教 塩澤 裕介

研究分野の概要

遺伝子治療とは

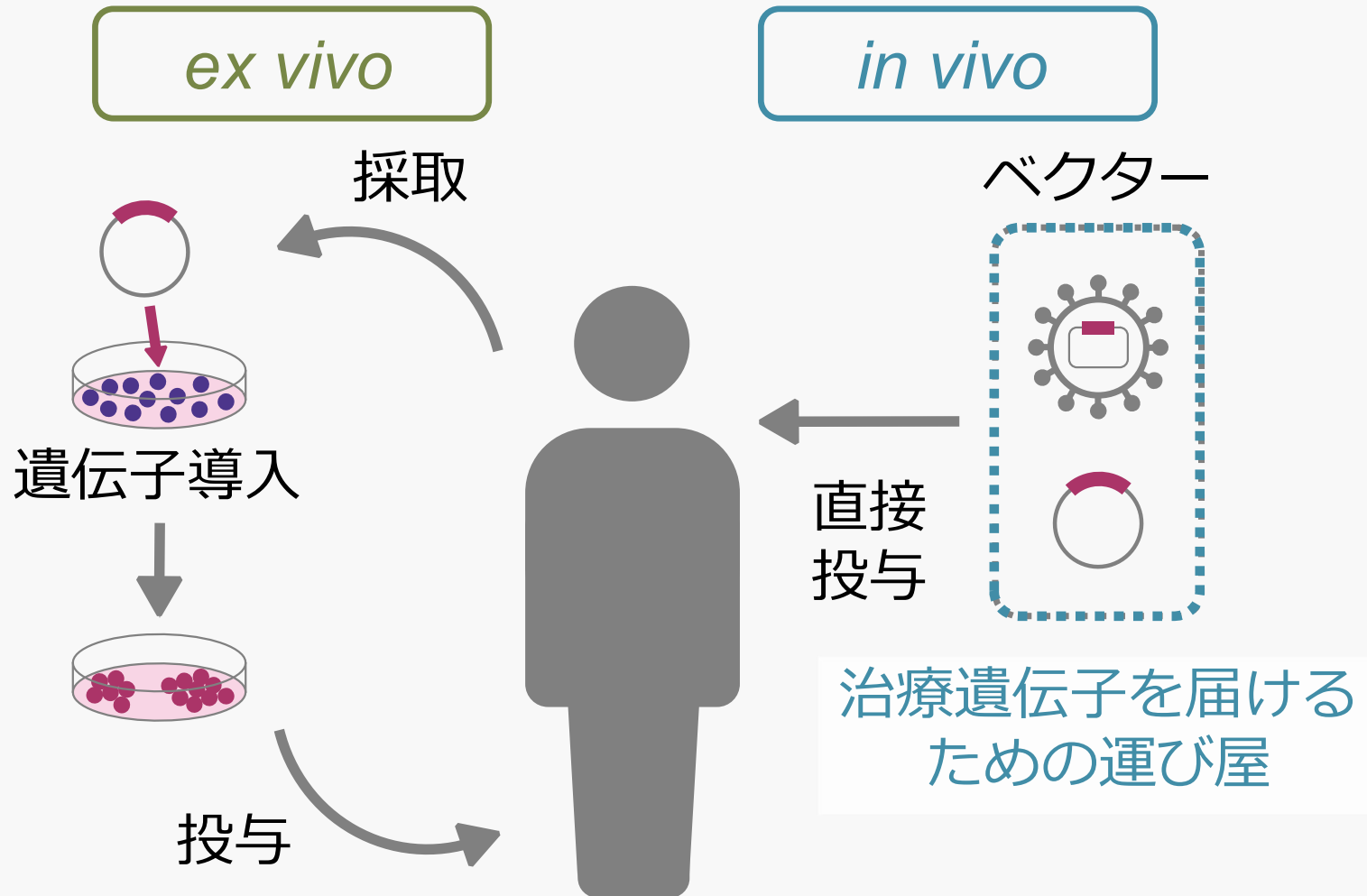
疾病の治療や予防を目的として

遺伝子または**遺伝子を導入した細胞**を人の体内に投与すること

厚生労働省「遺伝子治療等臨床研究に関する指針」

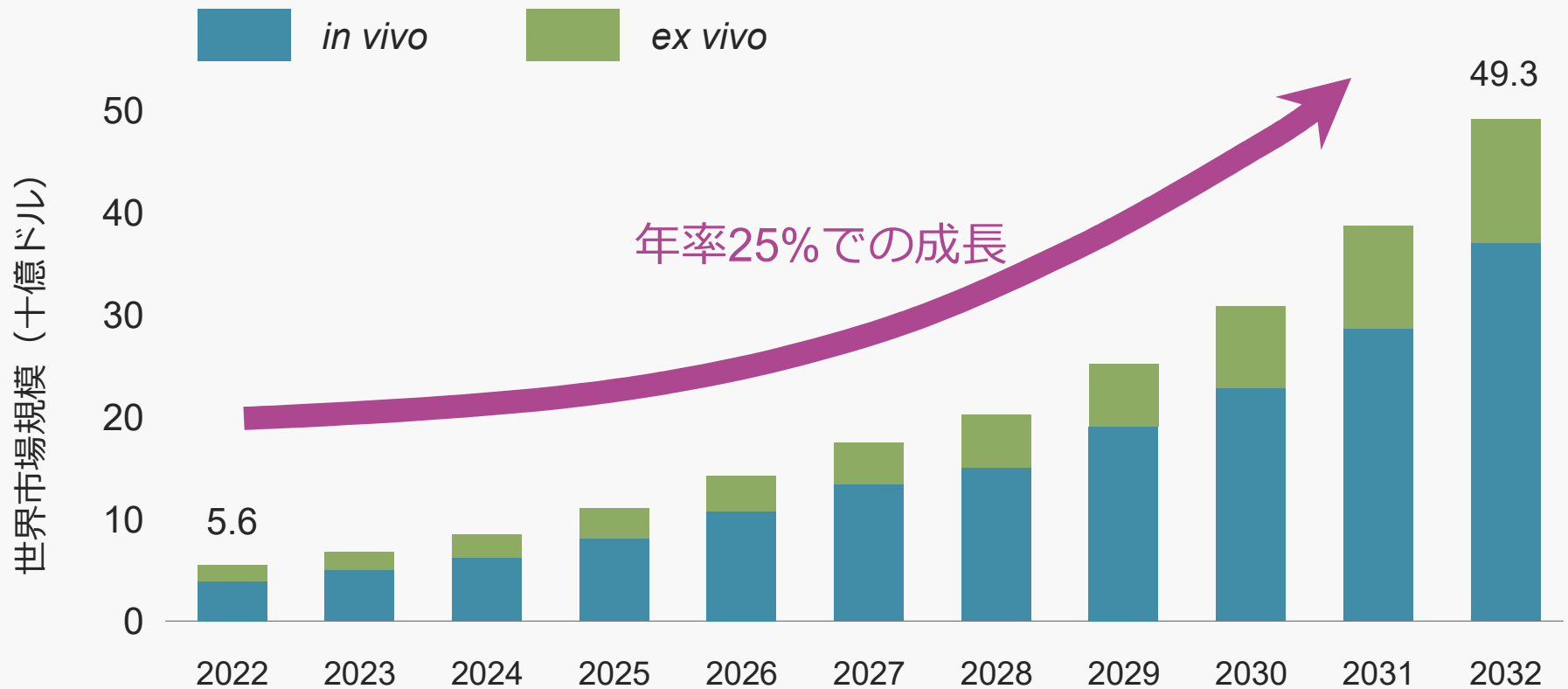
研究分野の概要

遺伝子治療とは



研究分野の社会的位置付け

遺伝子治療の世界市場規模



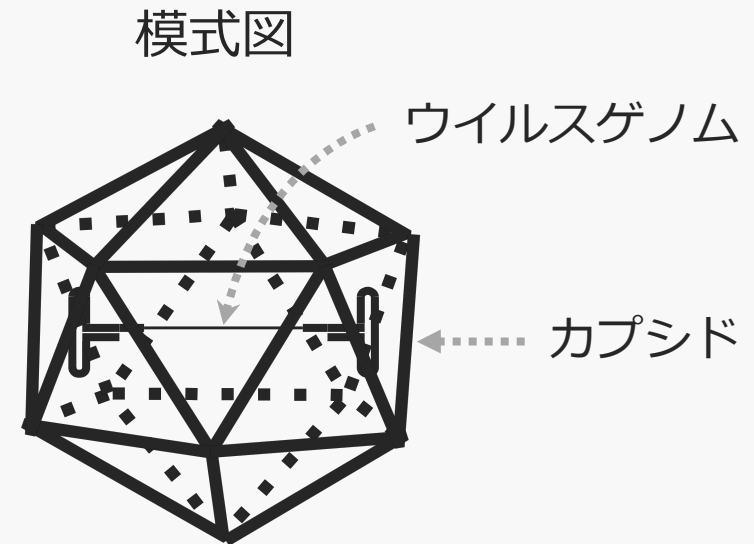
Market.usのデータから発表者が作成

従来技術とその問題点

アデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus: AAV) とは

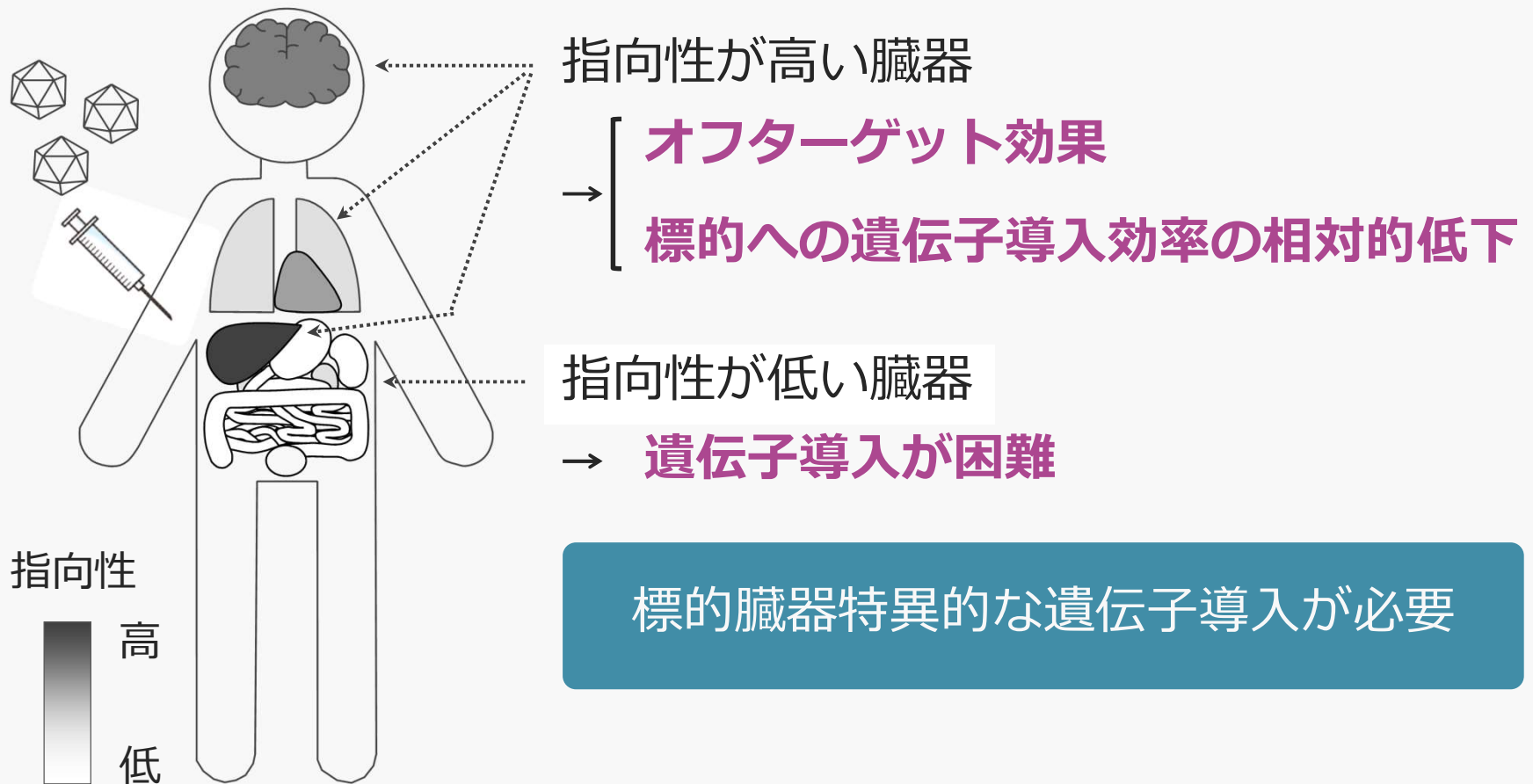
エンベロープを持たない小型の一本鎖DNAウイルス
ヒトや霊長類に感染するが、免疫反応を引き起こすことはまれ

- 安全性が高い
- 遺伝子発現が長く持続する
- 非分裂細胞にも遺伝子導入可能
- ✗ 組織指向性が広い



従来技術とその問題点

AAVベクターの欠点：広い組織指向性



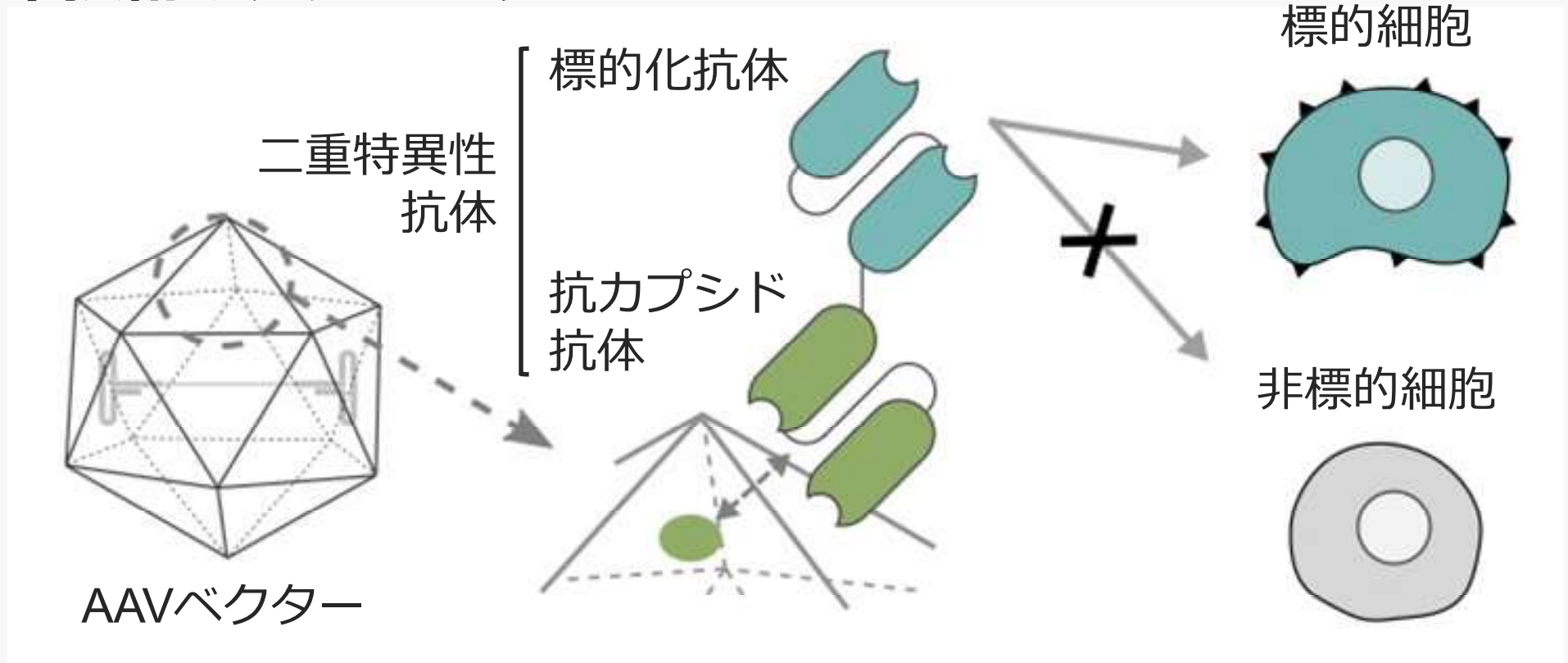
従来技術とその問題点

AAVベクターの組織指向性改変法：従来のアプローチ

指向性改変法	欠点
カプシドの指向性進化 (directed evolution)	指向性の「修飾」にとどまり、 非標的組織への取り込みをなくすことはできない
カプシドへの 標的指向性分子の挿入	任意の表面抗原に利用できる手法ではない (特定の表面抗原で報告されているのみ) ※ カプシドには抗体などの大きな分子は挿入できない

新技術の特徴・従来技術との比較

本技術のアプローチ



Bispecific vector Homing Platform (BISHOP)

新技術の特徴・従来技術との比較

1. 膨大なレパートリーを有する抗体を利用することで、
幅広い細胞が潜在的な標的になる

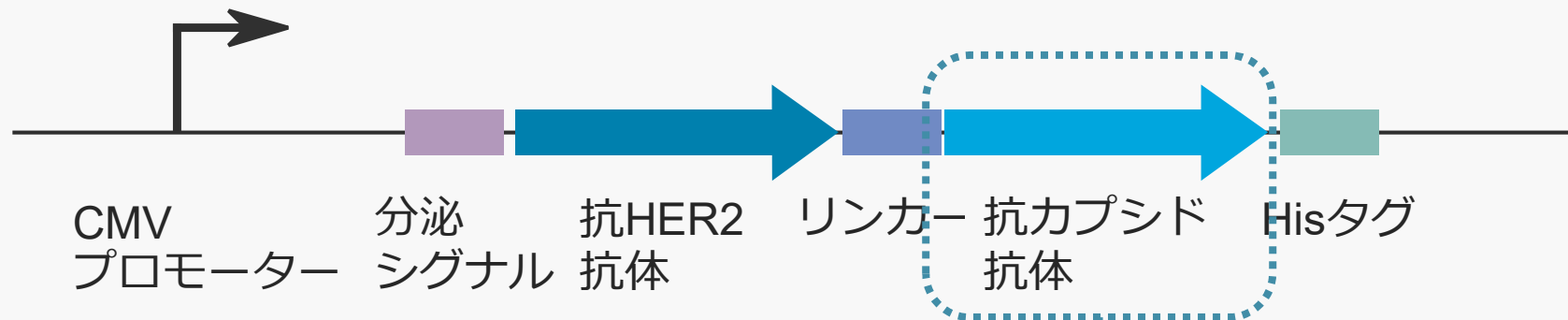
細胞表面抗原に対するフローサイトメトリー用の抗体に限っても、
1万種類を超えるモノクローナル抗体が市販されている

2. 標的特異的な遺伝子送達の実現によりAAVベクターの
安全性が向上した

非標的臓器での合併症のリスク低減につながる

AAVカプシド抗体の選定

二重特異性抗体のコンストラクト



軽鎖・重鎖の順 (LH) または重鎖・軽鎖の順 (HL) でつなげた

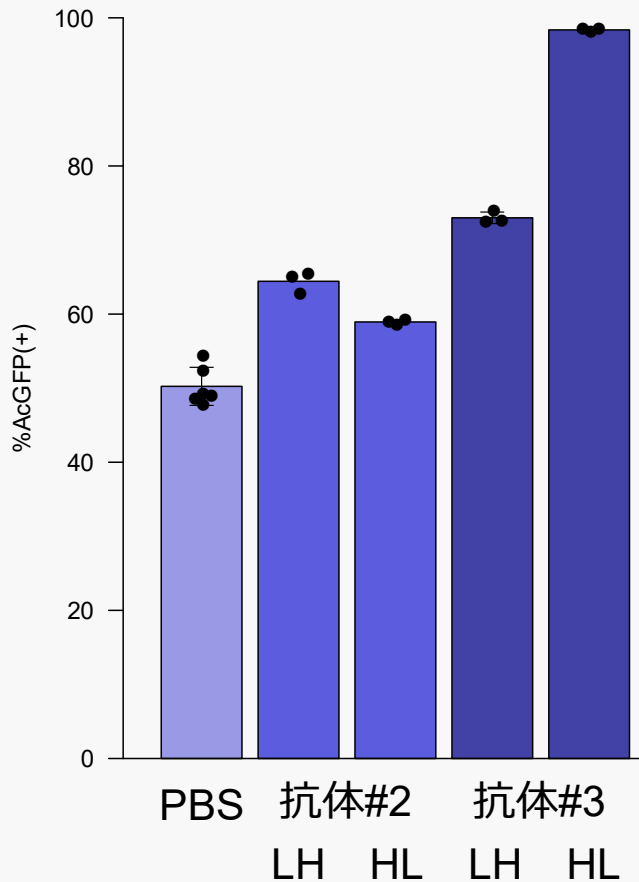
抗体#1
抗体#2
抗体#3

浮遊培養に適した細胞にトランスフェクションし、培地から精製

→ 抗体#2と#3は十分な純度・収量、抗体#1は収量が著しく低かった

AAVカプシド抗体の選定

野生型AAVベクターと二重特異性抗体による遺伝子導入



Methods

培養細胞株：SK-BR-3（HER2高発現）

多重感染度：1e5 vg/cell

抗体濃度：100 nM

mean \pm SD (n = 3)

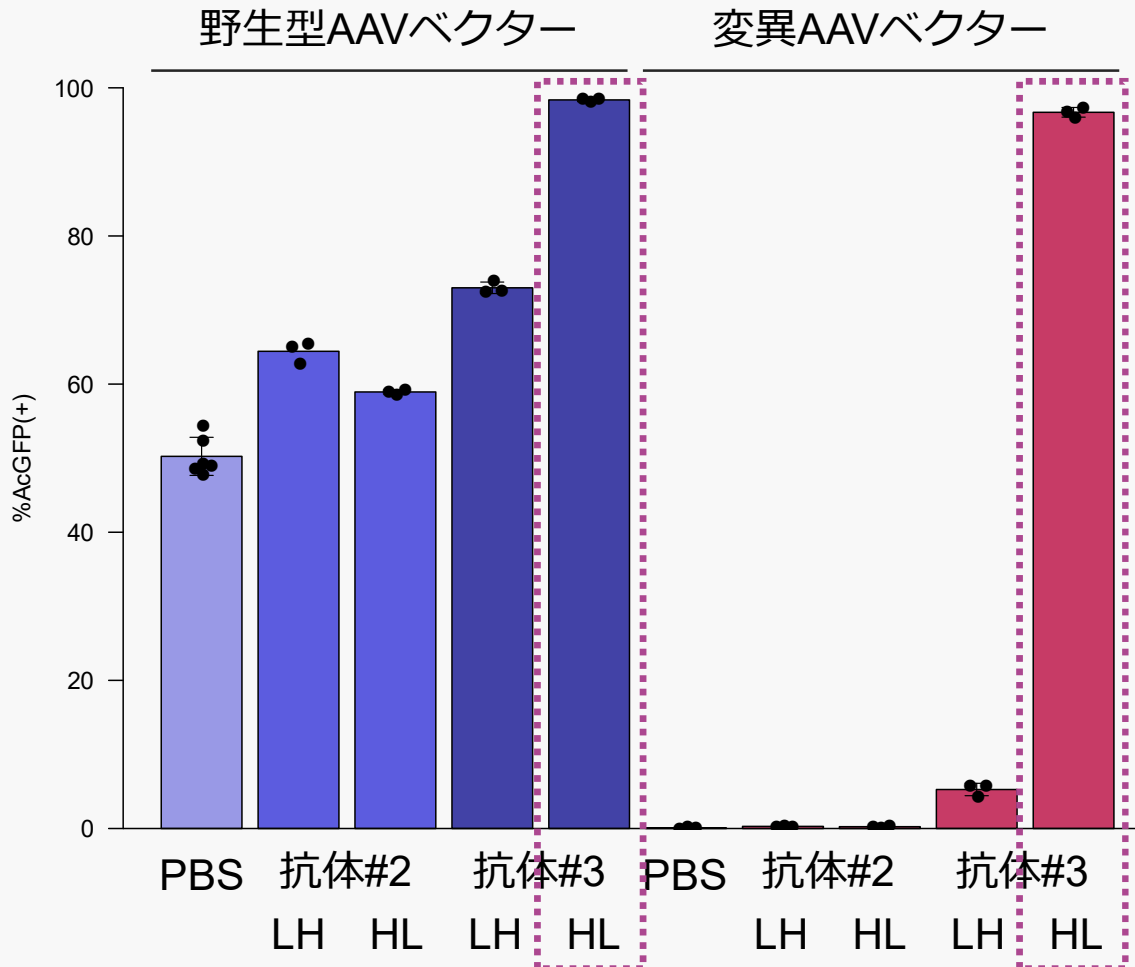
AAVカプシド抗体の選定

変異AAVベクターと二重特異性抗体による遺伝子導入

非標的細胞への取り込みを防ぐため、AAVカプシドの生理的なリガンド（ヘパラン硫酸）への結合部位に変異を導入した

AAVカプシド抗体の選定

変異AAVベクターと二重特異性抗体による遺伝子導入

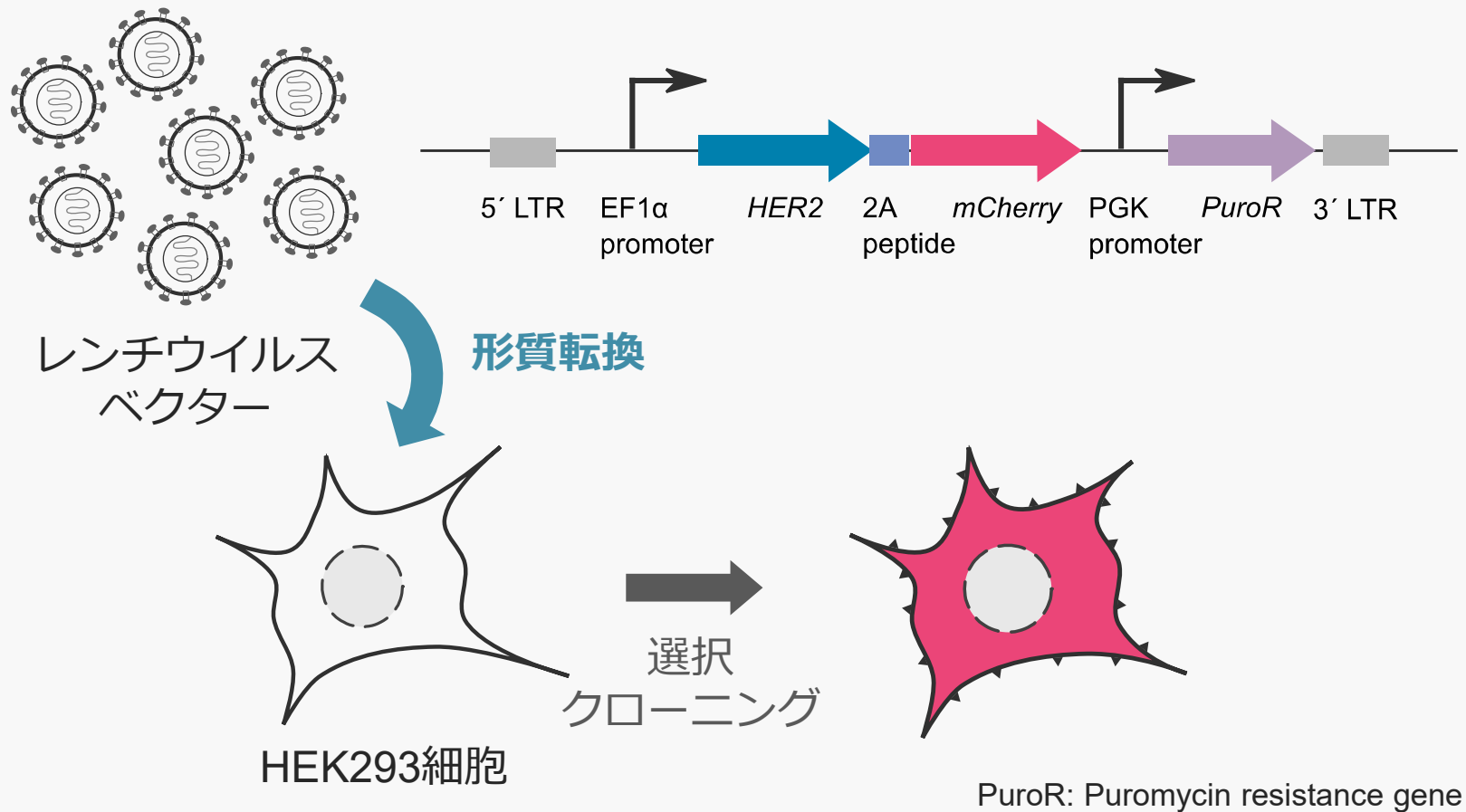


■ Methods

培養細胞株 : SK-BR-3
多重感染度 : 1e5 vg/cell
抗体濃度 : 100 nM
mean ± SD (n = 3)

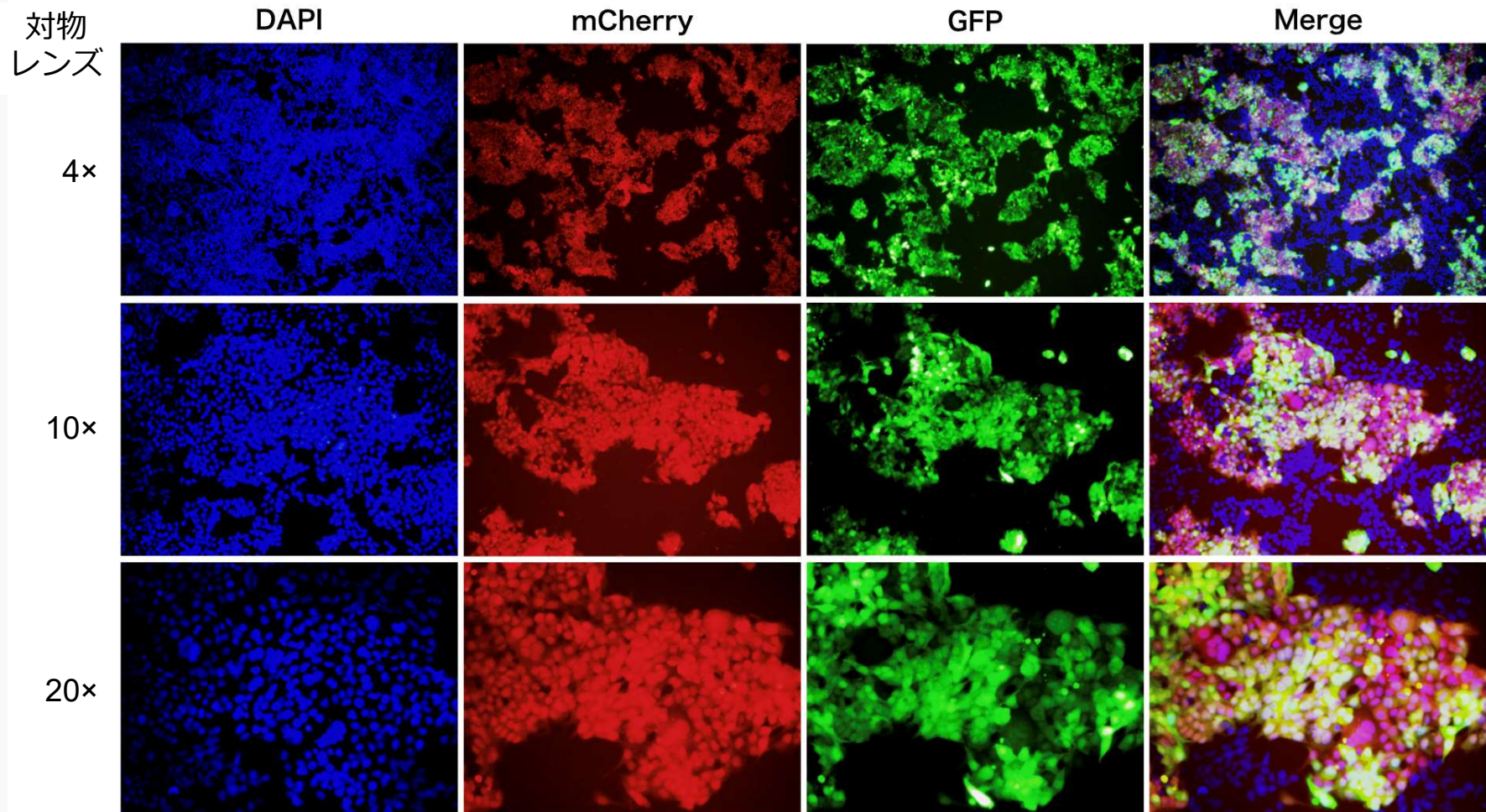
HER2発現細胞株に対する遺伝子導入

HER2 + mCherry共発現細胞株 (HEK293-HER2) の作製



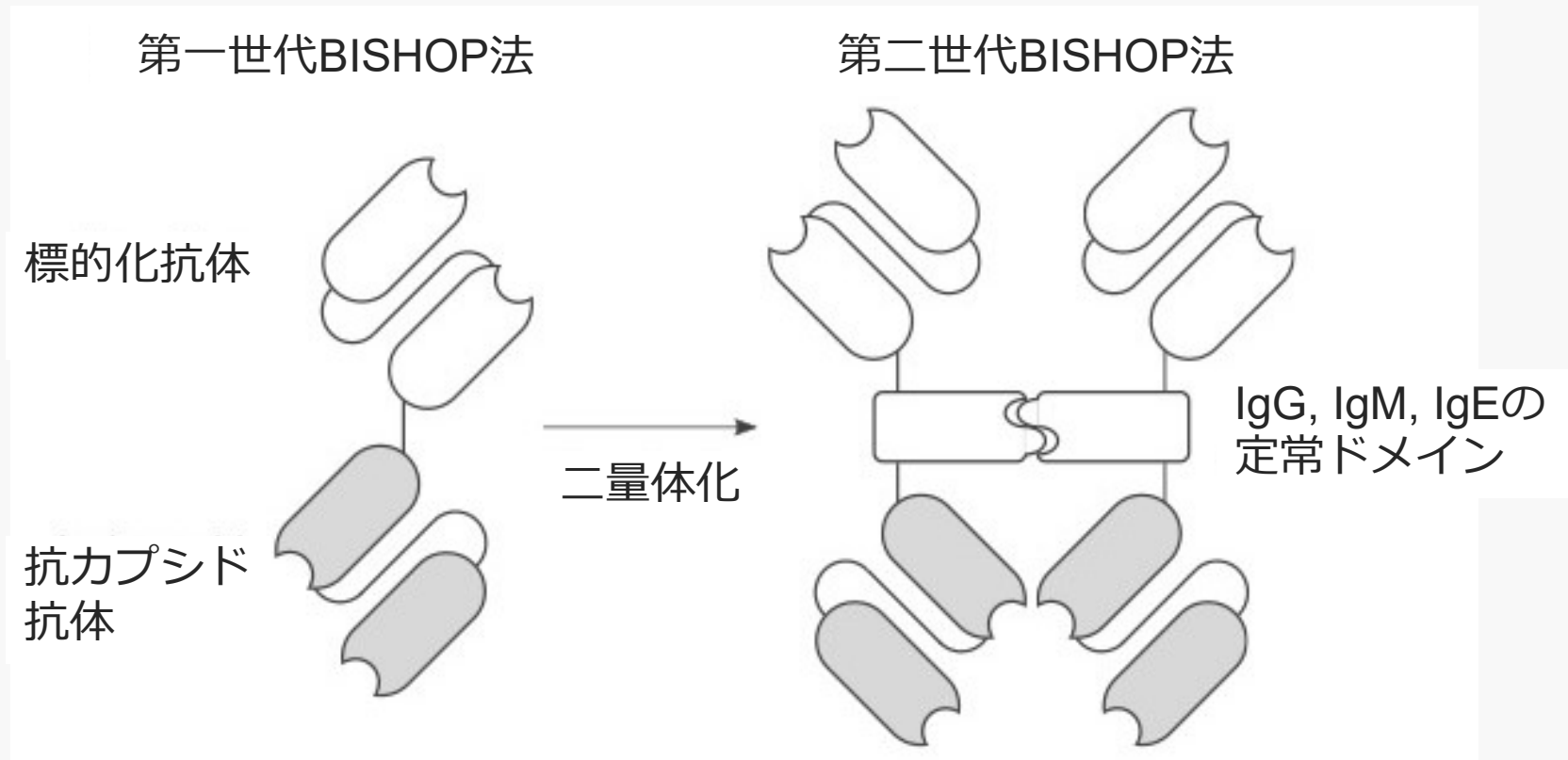
HER2発現細胞株に対する遺伝子導入

HEK293-HER2細胞 + HEK293細胞への遺伝子導入



二重特異性抗体の二量体化

第二世代BISHOP法のコンセプト



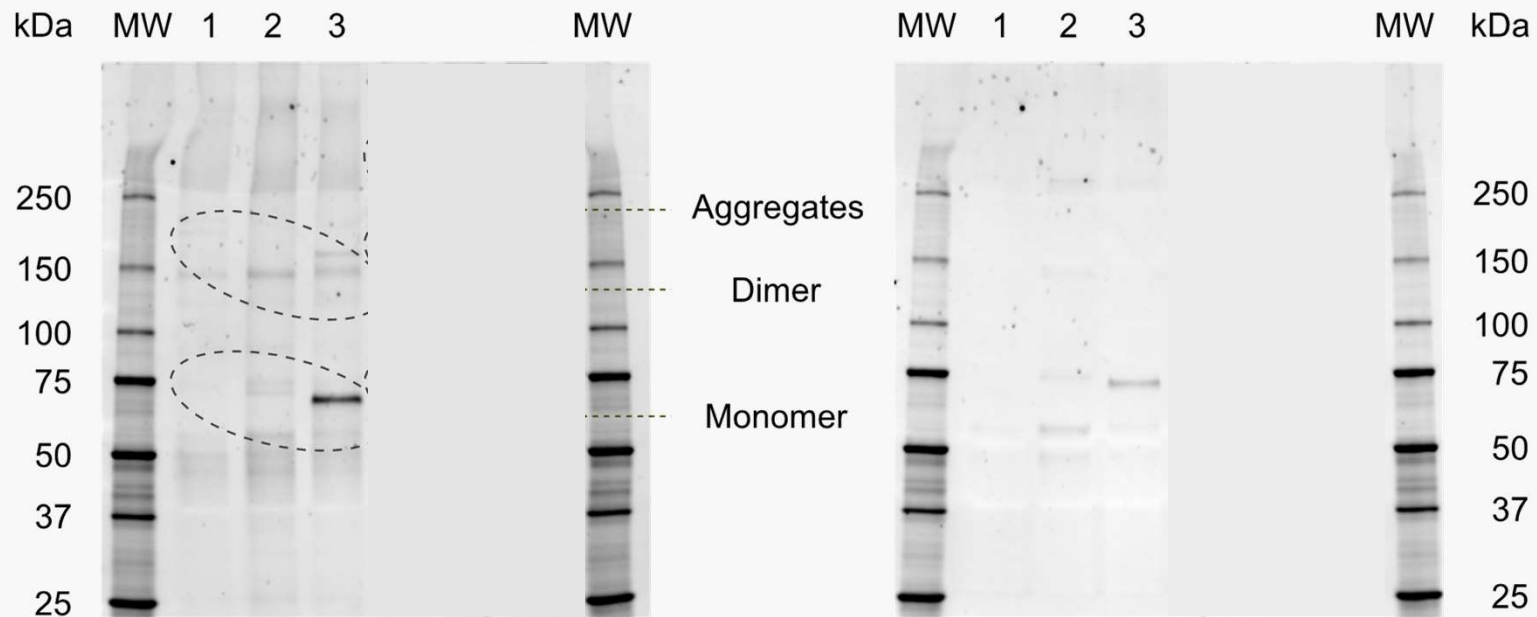
二重特異性抗体の二量体化によって
表面抗原に対する親和性とエンドサイトーシスの効率改善を図る

二重特異性抗体の二量体化

二量体化ドメインを用いた二重特異性抗体の二量体化

Non-reduced (ジスルフィド結合を保持)

Reduced (ジスルフィド結合を切断)



1. IgG Fc domain
2. IgM heavy chain domain 2
3. IgE heavy chain domain 2

二重特異性抗体の二量体化

二重特異性抗体の二量体化における問題点

培養細胞を用いて作製する際の収量が著しく低かった
二量体化ドメインを加えたことで、抗体のフォールディングに
支障をきたしていると考えられた

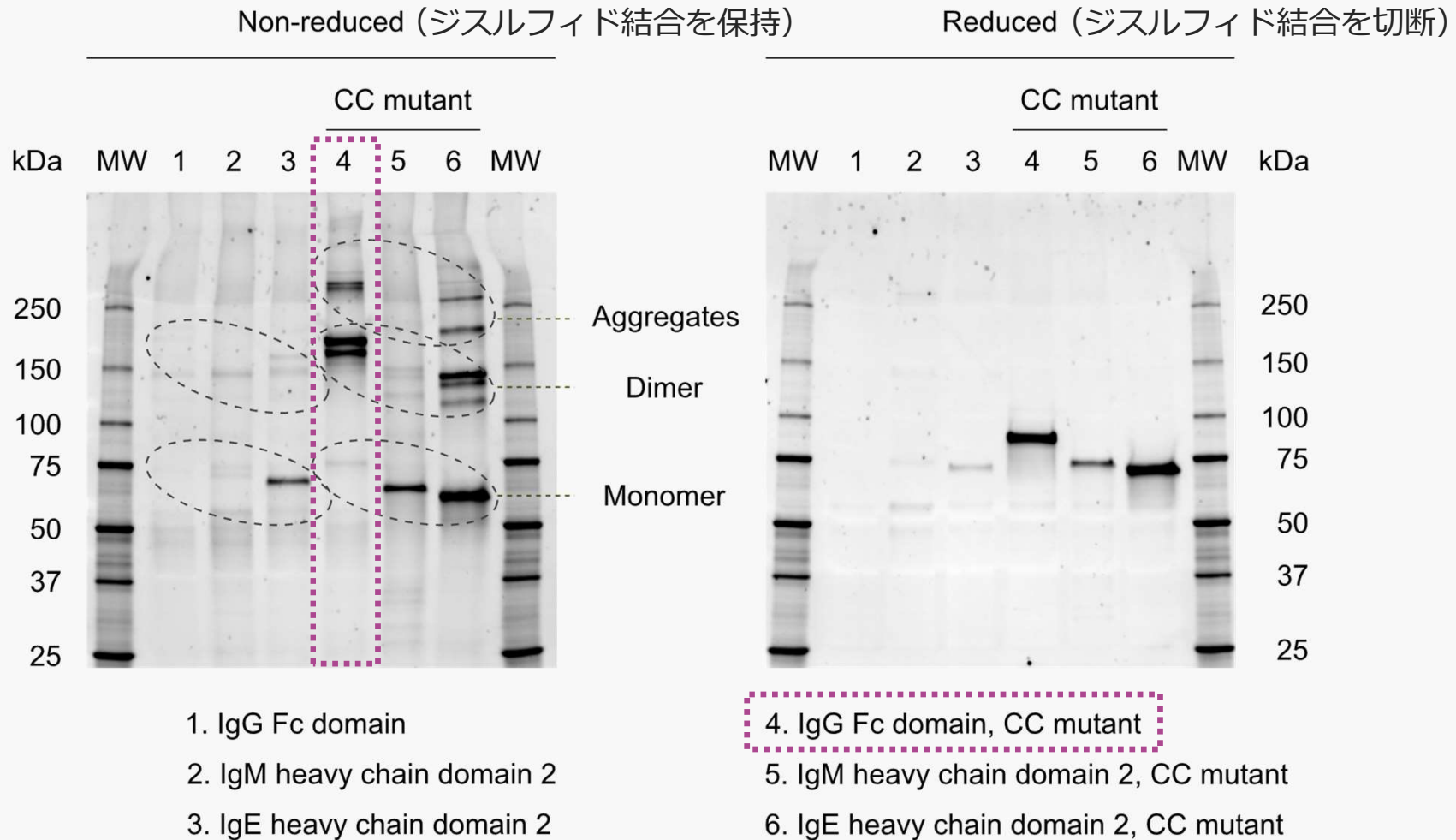
→ 抗体の重鎖と軽鎖の間にジスルフィド結合を導入することで
フォールディングが安定化することが知られている

Jung SH, et al. *Proteins* 1994

→ 抗カプシド抗体にジスルフィド結合のためのシステインを導入した

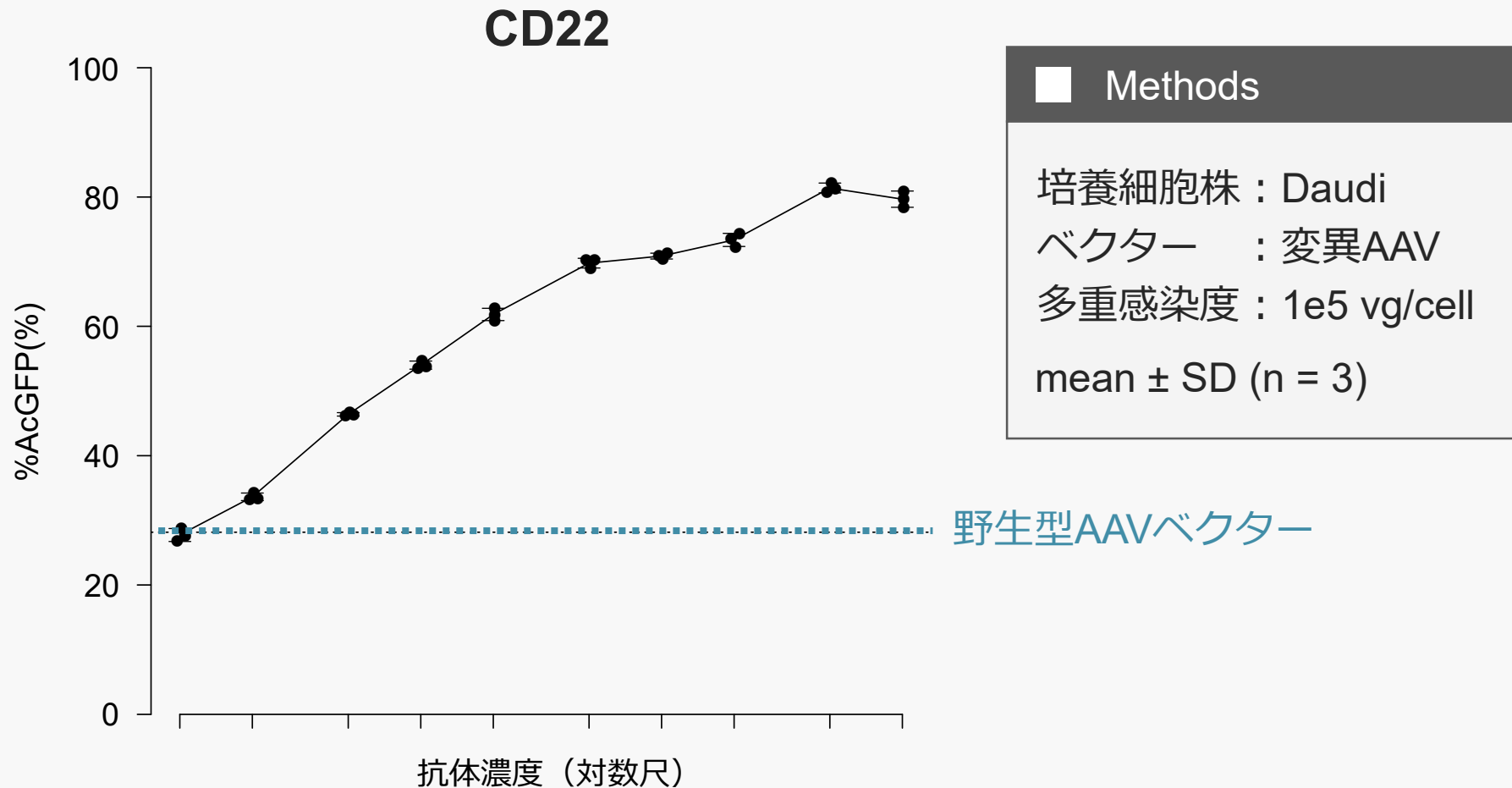
二重特異性抗体の二量体化

分子間架橋による二重特異性抗体二量体の収量増加



種々の抗原を標的とした遺伝子導入

HER2のほか、EGFR, CD19, CD22の標的化に成功している



新技術の特徴・従来技術との比較

3. 二重特異性抗体の二量体化により必要な抗体濃度が約1/1000に減少した

HER2抗体では 10^{-14} Mオーダーの抗体濃度で遺伝子導入を実現

4. 本来はAAVベクターの指向性が低いはずのB細胞で**80%を超える効率**での遺伝子導入を実現した

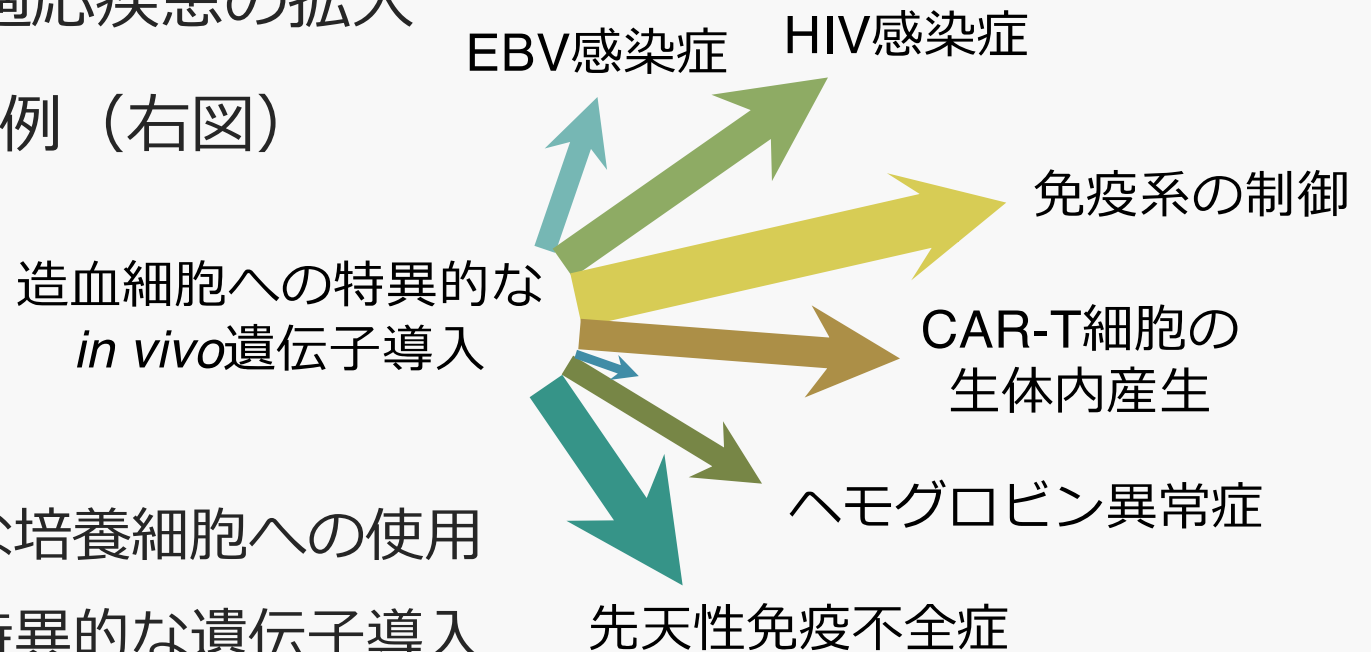
想定される用途

1. 遺伝子治療

- 特異的遺伝子送達によりオフターゲット効果の低減が可能
- 幅広い組織、細胞が潜在的な標的となる

→ 遺伝子治療の適応疾患の拡大

- 造血細胞での応用例（右図）



2. バイオ実験

- 遺伝子導入が困難な培養細胞への使用
- 実験動物での組織特異的な遺伝子導入

実用化に向けた課題

- 現在、マウスを用いた*in vivo*での検証を行なっている
- どのような性質をもつ抗体が本法で利用できるのか、preliminaryな知見を得ており、検証を進めている
- さまざまな表面抗原に対する抗体を多数集めて、本法で利用できるのかどうかスクリーニングを進めていく必要がある
- 効率的なスクリーニング系を確立するのが望ましい

企業への期待

以下のような企業さまとの**共同研究**を希望します

- **遺伝子治療薬**、特にAAVベクターを開発している企業
- **抗体医薬**の開発にノウハウを有する企業
- **抗体のライブラリー**を保有している企業
- **バイオ実験用の試薬**を開発、販売している企業

企業への貢献、PRポイント

- 遺伝子治療薬を開発中、またはこの分野への参入をご検討中の企業さまにとって有用かと思われます
- 非標的臓器での有害事象のリスクを低減できます
- AAVベクターで遺伝子導入できなかった細胞も標的にできる可能性があります
- どのような抗体が適しているかのノウハウがあります
- バイオ実験用の試薬として販売することも可能です

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：アデノ随伴ウイルスベクターの
標的指向性を改変する二重特異性抗体
- 出願番号： 未公開
- 出願人： 学校法人日本医科大学
- 発明者： 塩澤 裕介

お問い合わせ先

学校法人日本医科大学
知的財産推進センター

TEL: 03-5814-6637

e-mail: nms-tlo@nms.ac.jp