177　ターゲット抗体医療を目指したBacBombシステムの開発	馬橋　英章

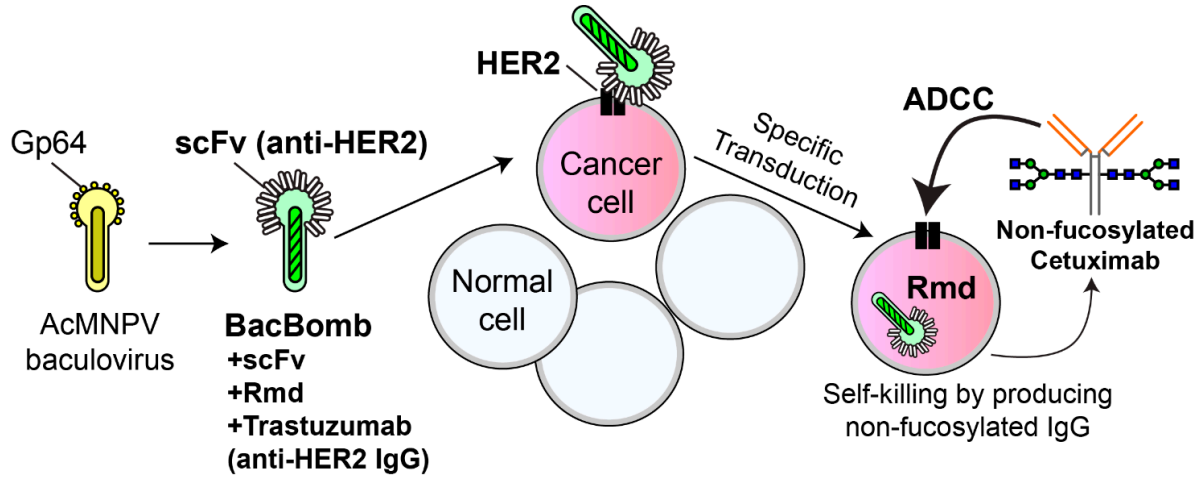
【目的】抗体医薬は病原体やがんマーカー分子に対する組換え体モノクローナル抗体であり、特にがんに対する有効な、副作用の少ない医薬品である。一方で抗体医薬は高額な薬価が問題であり、将来的な抗体医療システムを安定的に維持できるかどうかが不安視されている。

そこで本研究ではこの問題を解決すべく、精製したモノクローナル抗体を抗体医薬として用いるのではなく、患者のがん細胞特異的に自らを認識する抗体医薬をがん細胞自身に産生させ、さらには抗体医薬の糖鎖構造の改変も同時に行い、効率的な ADCC を誘導してがん細胞を死滅させる、新しい抗体医療法を提案し、その確立を目指した。

【方法】目標とするがん細胞を特異的に認識し、外来遺伝子を導入するデリバリーシステムの構築の第一歩として、HER2 発現細胞を特異的に認識することのできる組換え体バキュロウイルスを作製することとした。HER2 を特異的に認識することが明らかにされている 4D5 scFv、また scFv の代替として HER2 を特異的に認識する分子として DARPin 9_5_G を採用し、これらをバキュロウイルス Gp64 分子の膜貫通領域周辺部とキメラ構造をとることによりウイルス表面に提示することとした。

【結果】コドン最適化を行った 4D5 scFv、DAPRin 9_5_G の DNA 断片それぞれを Opie2 プロモーター下流へ接続し、目的とするバキュロウイルストランスファーベクターを単離した。このベクターにはがん細胞へ外来遺伝子を導入可能であることを確認するためのマーカーとして、CMV プロモーター下流に接続した蛍光タンパク質 mNeonGreen の配列を有している。これらの配列をバキュロウイルスゲノムへ相同組み換えにより導入し、それぞれのタンパク質を表面に提示したウイルス候補を作製した。

バキュロウイルスを改変した BacBomb システムの概要



177. ターゲット抗体医療を目指したBacBombシステムの開発

馬橋　英章

お茶の水女子大学 基幹研究院 自然科学系 食物栄養学科 応用栄養学研究室

Key words：バキュロウイルス，ドラッグデリバリー，抗体医療

緒　言

抗体医薬は病原体やがんマーカー分子に対する組換え体モノクローナル抗体であり、特にがんに対する有効な、副作用の少ない医薬品である。IgGに存在するN型糖鎖構造からコアフコースを取り除くことでantibody-dependent cell-mediated cytotoxicity（ADCC）が著しく上昇することが明らかになったことから、各製薬会社は競って糖鎖改変型抗体医薬の開発を行っている。一方で抗体医薬は高額な薬価が問題であり、将来的な抗体医療システムを安定的に維持できるかどうかが不安視されている。

そこで本研究ではこの問題を解決すべく、精製したモノクローナル抗体を抗体医薬として用いるのではなく、患者のがん細胞特異的に自らを認識する抗体医薬をがん細胞自身に産生させ、さらには抗体医薬の糖鎖構造の改変も同時に行い、効率的なADCCを誘導してがん細胞を死滅させる、新しい抗体医療法を提案し、その確立を目指す。

このシステム（以下BacBombとする）の構築には3つの遺伝子を異なるタイミングで制御することが要求される。それに適しているのが哺乳類細胞に遺伝子誘導を可能とするバキュロウイルスを用いたBacMamシステムである[1]。通常BacMamはVSV-Gをウイルス表面に発現させることで哺乳類細胞への高効率での形質導入を達成しているが、BacBombではVSV-Gをがんマーカー特異的なscFv（今回の場合はanti-HER2 scFv, 4D5またはDARPin 9_5_G）に置換することで、ウイルス粒子を効率よくがん細胞へデリバリーすること、またターゲットとしたがん細胞への特異的な遺伝子誘導を可能とする。さらにRmdの発現によりがん細胞内のGDP-フコースを枯渇させ、IgGのN糖鎖へのコアフコースの付加を低減し［2］、同時に自身を認識するIgG（例えばTrastuzumab）を産生させる。

BacBombが正しく機能するのであれば、高濃度な抗体医薬の投与は不要となり、効率的で特異的ながん細胞の排除が可能となる。

方法および結果

1.　バキュロウイルス表面に提示するHER2特異的結合タンパク質の選定

バキュロウイルス表面にタンパク質を提示する方法は複数報告があるが、最も用いられているものは、バキュロウイルスのウイルス表面に存在するGp64タンパク質のシグナルペプチドとC末端近傍の膜貫通領域から下流を組み合わせたタンパク質断片（以下Gp64断片）とのキメラを作製する方法である。今回はモデルがん細胞としてHER2を高発現したものを設定し、HER2を特異的に認識する分子として、scFvである4D5［3］と、2つの異なるDARPinを融合させたDARPin 9_5_G［4］の2種類を採用し、これらをGp64断片とキメラにすることでバキュロウイルス表面に提示することとした。どちらもファージディスプレイ法によりHER2特異的に結合する分子として単離されたものであり、特にDARPin 9_5_Gはその分子自体だけでもHER2発現細胞の生存効率を下げることが可能である。これらの分子がウイルス表面に提示されることにより、ウイルス粒子がHER2を高発現する細胞に効率よくデリバリーされ、またその後細胞内へと侵入し、ウイルスゲノムに組み込まれた外来遺伝子を導入できると期待した。

2. HER2 を特異的に認識し、形質導入を可能とする組換え体バキュロウイルスの単離

まず、組換え体ウイルス作製に必要な、バキュロウイルストランスファーベクターの作製を行った。このベクターには 2 つの遺伝子発現カセットが組み込まれており、片側の発現カセットはウイルス表面に提示する HER2 を特異的に認識するタンパク質を発現するもの、もう片方の発現カセットには、がん細胞（哺乳類細胞）にウイルス粒子が侵入後、その侵入を簡便に検出するために哺乳類細胞でのみ発現する蛍光タンパク質が組み込まれるように設計した。4D5 scFv または DARPin 9_5_G をコードする遺伝子配列は、バキュロウイルス粒子が形成される時点でウイルス表面に提示される必要があるため、昆虫細胞で恒常的に活性をもつ Opie2 プロモーターの下流に接続した。またこれらの遺伝子は昆虫培養細胞 Sf9 にて高発現することを期待して、これらのコドンを Sf9 ゲノムの賓用コドンに最適化した。一方、もう片方の発現カセットには、ウイルス粒子ががん細胞に侵入したことを確認するため、哺乳類細胞で活性をもち、昆虫細胞では活性を示さない CMV プロモーターの下流に強い蛍光をもつ mNeonGreen を接続した。mNeonGreen の配列はヒトのコドンに最適化したものを合成した。

これらの遺伝子発現カセットは、pAcP（-）FASTR ベクターをベースとして、段階的に連結した。最終的に mNeonGreen と Gp64 断片-4D5 scFv キメラタンパク質をコードする pAcP（-）mNG_Gp64-4D5scFv（図 1）と、mNeonGreen と Gp64 断片-DARPin 9_5_G キメラタンパク質をコードする pAcP（-）mNG_Gp64-DARPin95G を単離することができた。

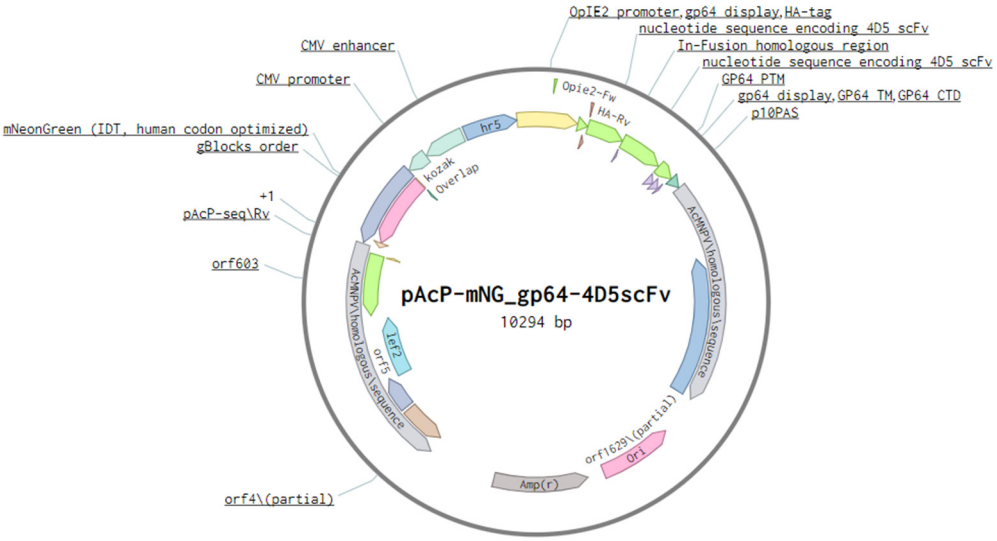


図 1. pAcP（-）mNG_Gp64-4D5scFv のベクターマップ

バキュロウイルス hr5 エンハンサーを中心として、左側に CMV プロモーターと mNeonGreen が、右側に Opie2 プロモーターと Gp64 断片、4D5 scFv の融合タンパク質が連結されている。pAcP（-）mNG_Gp64-DARPin95G では、4D5 scFv 部分が DARPin 9_5_G の配列に置き換わっている。

作製したバキュロウイルストランスファーベクターを、バキュロウイルスゲノム DNA と共に Sf9 細胞にトランスフェクションし、相同組み換えを行った。組換え体ウイルス候補プラークをそれぞれ複数単離し、それぞれ想定した外来遺伝子が挿入されていることを確認した（図 2）。

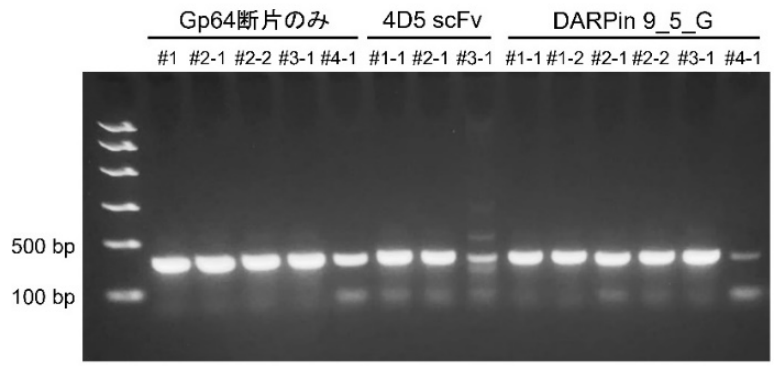


図 2. 組換え体ウイルス候補分子のスクリーニング
組換え体ウイルス候補のゲノム DNA を抽出し、相同組み換えにより挿入される外来遺伝子の 330 bp 断片を PCR にて増幅した。

考　察

がん細胞を特異的に認識し、遺伝子導入を行い、がん細胞自身に医療抗体を発現させるシステムを作製するため、HER2 発現細胞をモデルとし、HER2 発現細胞を特異的に認識し、遺伝子導入を行うための組換え体バキュロウイルスを作製した。HER2 を特異的に認識する分子として、4D5 scFv と DARPin 9_5_G を採用し、これらをバキュロウイルス粒子の膜状に提示するようにデザインした。想定したバキュロウイルストランスファーベクターを作製し、組換え体ウイルス候補の単離に至った。今後は、このウイルス粒子が実際に HER2 発現細胞に侵入し、外来遺伝子である mNeonGreen を発現するかを確認する必要がある。

文　献

1) Mansouri M, Berger P. Baculovirus for gene delivery to mammalian cells: Past, present and future. Plasmid. 2018 Jun;98:1-7. doi: 10.1016/j.plasmid.2018.05.002. Epub 2018 May 26.
2) von Horsten HH, Ogorek C, Blanchard V, Demmler C, Giese C, Winkler K, Kaup M, Berger M, Jordan I, Sandig V. Production of non-fucosylated antibodies by co-expression of heterologous GDP-6-deoxy-D-lyxo-4-hexulose reductase. Glycobiology. 2010 Dec;20(12):1607-18. doi: 10.1093/glycob/cwq109. Epub 2010 Jul 15.
3) Carter P, Kelley RF, Rodrigues ML, Snedecor B, Covarrubias M, Velligan MD, Wong WL, Rowland AM, Kotts CE, Carver ME, et al. High level *Escherichia coli* expression and production of a bivalent humanized antibody fragment. Biotechnology (N Y). 1992 Feb;10(2):163-7. PubMed PMID: 1368228.
4) Jost C, Schilling J, Tamaskovic R, Schwill M, Honegger A, Plückthun A. Structural basis for eliciting a cytotoxic effect in HER2-overexpressing cancer cells via binding to the extracellular domain of HER2. Structure. 2013 Nov 5;21(11):1979-91. doi: 10.1016/j.str.2013.08.020. Epub 2013 Oct 3. PubMed PMID:24095059.