

博士論文

抗体医薬開発におけるタンパク質発現系の改良を指向した
創薬基盤技術に関する研究

東京大学大学院 工学系研究科

バイオエンジニアリング専攻

永野 竜馬

目次

第一章	序論	5
1-1	論文の背景.....	5
	はじめに	5
	抗体作製技術の発展と抗体医薬開発の歴史	6
	抗体医薬の構造と特性	10
	抗体分子における品質	12
	抗体分子における糖鎖の役割.....	14
	抗体分子の物性プロファイリング	16
	大腸菌の抗体生産への活用	19
	動物細胞工学の進展と抗体生産の効率化.....	20
	抗体医薬開発における課題	21
1-2	論文の意義と目的	37
	本論文の意義.....	37
	本論文の目的.....	39
第二章	抗体生産基盤強化を目指したシグナルペプチドに関する研究	43
2-1	要旨	43
2-2	緒言	44
2-3	実験材料と方法	49
	シグナルペプチドの取得と配列設計	49

各種発現ベクターの構築.....	50
大腸菌による Fab 生産	53
可溶性 Fab タンパク質の定量.....	53
CHO 細胞による IgG 生産	54
IgG 発現量の定量	55
ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)	56
抗原結合活性評価.....	56
2-3. 結果と考察	57
抗原結合評価系の構築	57
大腸菌での Fab 発現検証.....	58
CHO 細胞での IgG 発現への適応性評価.....	65
創薬基盤への実装に関する考察.....	69
2-4. 結言	77
第三章 難発現性の Fc 受容体調製及び抗体との結合評価系構築に関する研究.....	79
3-1. 要約	79
3-2. 緒言	80
3-2. 実験材料と方法	84
Fc 受容体のクローニングと発現ベクターの構築.....	84
ハムスターFcγRIV発現細胞造成と培養.....	85
ハムスターFcγRIVの精製及び分析.....	86

バイオレイヤー干渉法 (BLI) による結合解析	86
細胞培養とフローサイトメトリー (FCM) 解析.....	88
アミノ酸配列の相同性解析 (BLASTP).....	89
3-3. 結果と考察	89
ハムスターFcγRIV発現細胞の造成と培養	89
ハムスターFcγRIVの精製及び分析.....	93
生体分子間相互作用の検出法の選定.....	95
ハムスターFcγRIVとヒト抗体 Fc との相互作用解析	96
ハムスターFcγRIV発現細胞によるヒト抗体 Fc との結合解析	100
3-5. 結言	105
第四章 総括	108
参考文献	113
謝辞	122

第一章

序論

第一章 序論

1-1 論文の背景

はじめに

1990 年代になって、世界中の研究組織や製薬会社によりヒトゲノム解析の取り組みが始まった。ヒト染色体には約 30 億という膨大な塩基対が存在し、その解読には膨大な時間と予算が必要であったが、ゲノムシーケンス技術の向上により様々な疾患に関与している遺伝子が同定された。現在は、遺伝子をコードするタンパク質を発現した細胞株及びマウスを始めとするモデル生物に対して遺伝子操作による実験動物作製を通じ、遺伝子とタンパク質の関連性が数多く明らかになってきている。更に、タンパク質は他の成分との作用を通じて機能発揮するものであることから、単離したタンパク質の相互作用から機能解析する研究手法も発展した。ツーハイブリッド法等の分子生物学的手法や表面プラズモン共鳴法等の物理化学的方法等、多岐に渡る学術領域において研究の進歩を遂げた。

進歩したバイオ関連の科学技術の向上によって、創薬という観点では新規同定された遺伝子から有用な生理活性物質を探索し、治療用タンパク質の開発が進められた。更に、疾患関連分子に特異的に作用する分子標的薬の開発も盛んに行われた。分子標的医薬の中で、抗体医薬は標的分子に対する高い結合選択性と少ない副作用という特性に加え、これまで低分子が狙えなかった細胞外領域のタンパク質相互作用を標的とすることが可能である。このような特性が活かされ、現在では最も注目されている医薬品の一つとして大きな市場を形成している。

本論文の序論では、まず抗体医薬の技術と開発の歴史について紹介する。続い

て、これまでの研究開発を経て顕在化した問題、従来の抗体医薬や技術では克服することができない課題について紹介する。最後に、現在も進化を続ける抗体医薬の創薬や生産において、バイオエンジニアリングに関連する技術開発の現状と展望についても概説するとともに、本研究との関連性を述べる。

遺伝子組換え技術の発展に伴うタンパク質医薬品の登場

治療用タンパク質の開発は遺伝子組換え技術という画期的技術の発展に支えられている。1973年にCohenらは試験管内で作製されたプラスミドを大腸菌に導入することができ、薬剤耐性によって維持しうることを見出した[1]。この発見は、真核生物や原核生物に関わらず異種のDNA配列をプラスミドとして大腸菌に挿入し、複製されることに用いられた。その後、大腸菌は遺伝子組換え医薬品の最初の生産宿主としても利用されることになり、FDAによってヒトインシュリンが認可された[2-4]。ヒト由来の遺伝子やタンパク質について微生物を利用した研究が可能になり、もう一つの画期的な基盤技術である抗体作製技術との融合により遺伝子組換え技術の医薬品応用が更に広がる事となった。

抗体作製技術の発展と抗体医薬開発の歴史

B細胞は生体内における抗体産生細胞で、白血球の一つである。B細胞が分化前の状態では抗体レパトリーの規模や特異性は限定されており、正常な免疫システムを保つには様々な抗原に対応して抗体を産生する仕組みが必要となる。外来抗原に曝された時、B細胞は刺激を受け特定の抗原に特異的に認識するようになる。刺激を受けたB細胞は最終的にプラズマ細胞に分化することで特定の抗原に結合するモノクローナル抗体を個々に産生する仕組みとなっている。

1975 年に Kohler と Milstein は、マウス脾臓から採取した B 細胞とマウス骨髄腫細胞 (ミエローマ) を細胞融合した後に単一化し、モノクローナル抗体を分泌し自立増殖能を有する不死化抗体産生細胞 (ハイブリドーマ) を作製する方法を確立した[5]。生体における抗体産生の仕組みを応用した当手法により、誰もがモノクローナル抗体を大量に取得することが可能になった。モノクローナル抗体をがんや自己免疫疾患治療に使用する試みが始まり、1986 年に抗ヒト CD3 抗体 (muromonab-CD3) が腎移植後の急性拒絶反応を適応疾患に、世界で初めての抗体医薬が米国にて承認された。がんに関しては、強力な薬剤を特異的に送達させるミサイル療法としての応用が期待された。しかしながら、マウス抗体によるがん治療の試みは失敗が続き、2002 年に抗ヒト CD20 抗体 (ibritumomab tiuxetan) の承認により放射免疫療法が確立されるまでに年月を要することとなった。

その背景として、これら疾患治療において薬効発揮するのに抗体医薬は反復投与を余儀なくされる。マウス抗体はヒト体内動態でのリサイクリングに寄与するヒト FcRn への結合が弱く血中濃度の維持が難しい[6]。更にヒトに対して免疫原性があるため抗薬物抗体 (Anti-Drug Antibody: ADA) の発生によって反復投与が難しいことなどを理由として、限定的な効果しか示さなかった[7]。

こうした状況のなか、1980 年代後半になると遺伝子工学的手法を駆使し、マウス抗体の可変領域以外をヒト抗体に置換したキメラ抗体、更には抗原結合に関与する抗原結合部位 (CDR) を残し殆どのアミノ酸配列をヒト抗体に置換したヒト化抗体作製技術が確立された。1990 年代以降には、ヒト抗体ライブラリーを M13 ファージ上に提示し抗体選抜する手法や、抗体遺伝子座をマウス染色体に移入し作製したヒト抗体産生マウスを利用した完全ヒト抗体作製技術が確立された[8, 9]。これらの技術開発により、1990 年代中頃には免疫原性の回避に

よる抗体製剤の反復投与と血中半減期延長の課題が克服され、医薬品開発が加速化した。

これに伴い、抗体医薬の様々な作用機序が注目されることになった。例えば、標的細胞の増殖や生存のためのシグナル伝達の遮断や、Fc 受容体を介した補体やエフェクター細胞の活性化による標的細胞の障害は代表的なものである。前述のミサイル療法については、従来の化学療法よりも広い治療領域を確保するため、抗体に結合させる薬剤の細胞障害作用を強化した抗体薬物複合体 (Antibody-Drug Conjugate: ADC) の開発が進められた。ADC は低分子医薬の強力な薬効と抗体医薬の標的選択性の特徴を併せもつパイプライン群の一つとして注目されている。ハイブリドーマ作製技術、ファージディスプレイ、完全ヒト抗体技術などの新しい技術は、創薬の基盤技術として研究組織や製薬会社にて実装され、およそ 10 年程度の研究開発期間を経て新技術を搭載した抗体医薬として承認されている (図 1-1.)。

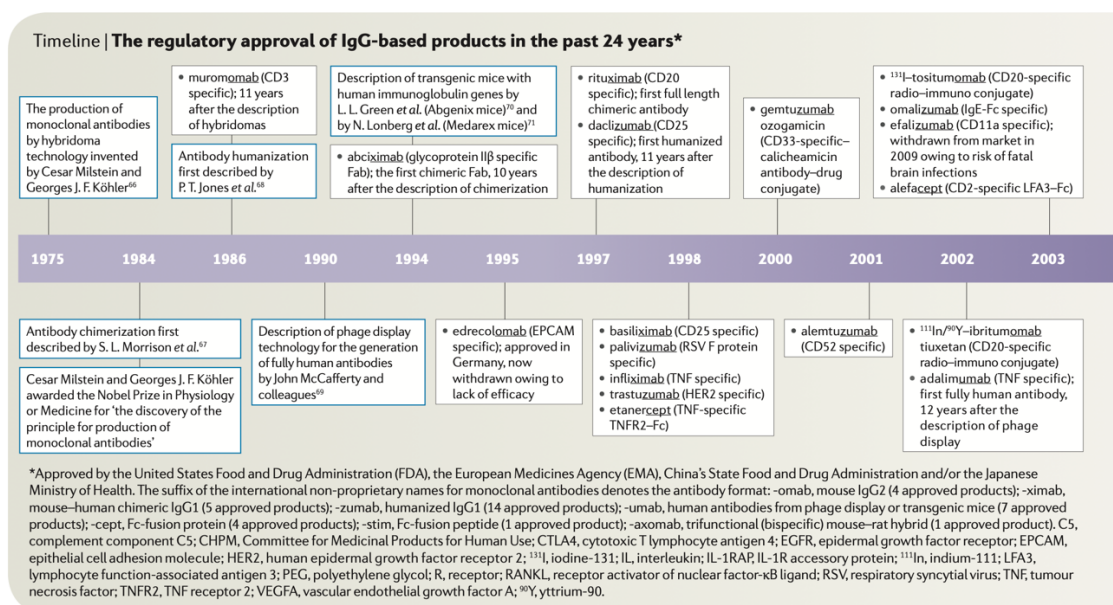


図 1-1. 2003 年までに承認された抗体医薬と推移。(文献[10]より引用)

2018 年時点で、日米欧で承認された抗体医薬品は 80 品目を越え (表 1-1)、様々な標的と適応に対する抗体医薬品が承認されている。2020 年には抗体医薬品のグローバルでの売り上げが\$125 billion に達すると予想されている。ヒトの遺伝子は 22000 を超えると予想されており、更なる科学技術の進歩や創薬基盤技術の進化により抗体医薬の拡大が期待されている[11, 12]。

表 1-1. 日米欧で認可された抗体医薬品 (国立医薬品衛生研究所 HP より引用)

これまでに日米欧で承認された抗体医薬品					2019年5月1日 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部						
分類	名称	商品名	構造	標的	主な適応疾患	承認年		US	EU	Japan	産生細胞
マウス抗体	muromonab-CD3	Orthoclone OKT3	IgG2a	CD3	腎移植後の急性拒絶反応	1986	NA	1991			mouse hybridoma
	ibritumomab tiuxetan	Zevalin yterium	IgG1k (MX-DTPA- ⁹⁰ Y標識)	CD20	B細胞性非ホジキンリンパ腫	2002	2004	2008			CHO
		Zevalin indium	IgG1k (MX-DTPA- ¹¹¹ In標識)		イブリツマブ・チウキセタンの集積部位の確認				2008		CHO
	iodine 131 Tositumomab	Bexxar	IgG2aλ (¹²⁵ I標識)	CD20	非ホジキンリンパ腫	2003	NA	NA			mammalian cell
	catumaxomab	Removab	mlgG2ak (EpcAM), rlgG2bλ (CD3)	EpCAM, CD3	癌性腹水	NA	2009	NA			mouse hybridoma
キヌキ抗体	blinatumomab	Blincyto	scFv-scFv	CD19, CD3	急性リンパ性白血病	2014	2015	2018			CHO
	moxetumomab pasudotox	LUMOXITI	Fv+Pseudomonas exotoxin	CD22	有毛細胞白血病	2018	NA	NA			E. Coli
	abciximab	ReoPro	IgG1 (Fab)	GP1Ib/IIla	心筋虚血	1994	(各国)	NA			mammalian cell
	rituximab	Rituxan/MabThera	IgG1k	CD20	B細胞性非ホジキンリンパ腫	1997	1998	2001			CHO
	basiliximab	Simulect	IgG1k	CD25	腎移植後の急性拒絶反応	1998	1998	2002			Sp 2/0
ヒト抗体	infliximab	Remicade	IgG1k	TNFα	関節リウマチ	1998	1999	2002			Sp 2/0
	cetuximab	Erbtux	IgG1k	EGFR	頭頸部癌、結腸・直腸癌	2004	2004	2008			Sp 2/0
	brentuximab vedotin	Adcetris	IgG1k (MMAE修飾)	CD30	ホジキンリンパ腫	2011	2012	2014			CHO
	siltuximab	Sylvant	IgG1k	IL-6	キャスルマン病	2014	2014	NA			CHO
	dinutuximab	Unituxin	IgG1k	GD2	神経芽細胞腫 (小児)	2015	2015	NA			Sp 2/0
ヒト抗体	obiltoximab	Anthim	IgG1k	B. anthracis toxin	吸入炭疽	2016	NA	NA			
	dacizumab	Zenepax, Zinbryta	IgG1k	CD25	腎移植後の急性拒絶反応、多発性硬化症	1997	1999	NA			NSO
	palivizumab	Synagis	IgG1k	RSV F protein	RSウイルス感染	1998	1999	2002			NSO
	trastuzumab	Herceptin	IgG1k	HER2	転移性乳癌	1998	2000	2001			CHO
	gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg	IgG4k (カリクアミン修飾)	CD33	急性骨髄性白血病	2017	efusec	2005			NSO
ヒト抗体	alemtuzumab	Campath	IgG1k	CD52	B細胞性慢性リンパ性白血病	2001	2001	2014			CHO
	omalizumab	Xolair	IgE	IGE	喘息	2003	2005	2009			CHO
	efalizumab	Raptiva	IgG1k	CD11	尋常性乾癬	2003	2004	NA			CHO
	bevacizumab	Avastin	IgG1k	VEGF	結腸・直腸癌	2004	2005	2007			CHO
	natalizumab	Tysabri	IgG4k	α4integrin	多発性硬化症	2004	2006	2014			NSO
ヒト抗体	tocilizumab	Actemra	IgG1k	IL-6R	キャスルマン病、関節リウマチ	2010	2009	2005			CHO
	ranibizumab	Lucentis	IgG1k Fab	VEGF-A	加齢黄斑変性	2006	2007	2009			E. Coli
	eculizumab	Soliris	IgG2/4k	CS	発作性夜間ヘモグロビン尿症	2007	2007	2010			NSO
	certolizumab pegol	Cimzia	Fab+PEG	TNFα	関節リウマチ、重症クローン病	2008	2009	2012			E. Coli
	mogamulizumab	Poteligeo	IgG1k (糖鎖改変)	CCR4	CCR4陽性成人T細胞白血病リンパ腫	2018	2018	2012			CHO
ヒト抗体	pertuzumab	Perjeta	IgG1k	HER2	HER2陽性手術不能または再発乳癌	2012	2013	2013			CHO
	trastuzumab emtansine	Kadcyla	IgG1k (メイタンシン修飾)	HER2	HER2陽性転移・再発乳癌	2013	2013	2013			CHO
	obintuzumab	Gazyva	IgG1k (糖鎖改変)	CD20	慢性リンパ性白血病	2013	2014	2018			CHO
	vedolizumab	Entyvio	IgG1k	α4β7 integrin	クローン病	2014	2014	2018			CHO
	pembrolizumab	Keytruda	IgG4k	PD-1	黒色腫	2014	2015	2016			CHO
ヒト抗体	idarubicin	Praxbind	IgG1 Fab	dabigatran	dabigatran (Pradaxa®)中和	2015	2015	2016			CHO
	neplizumab	Nucala	IgE	IL-5	喘息	2015	2015	2016			CHO
	elotuzumab	Empliciti	IgG1k	SLAMF7	多発性骨髄腫	2015	2016	2016			NSO
	ixekizumab	Taltz	IgG4k	IL-17A	尋常性乾癬	2016	2016	2016			CHO
	reslizumab	Cinqair	IgG4k	IL-5	喘息	2016	2016	NA			NSO
ヒト抗体	atezolizumab	Tecentriq	IgG1k (N298A)	PD-L1	肺癌、皮膚癌	2016	2017	2018			CHO
	ocrelizumab	Ocrevus	IgG1	CD20	多発性硬化症	2017	2018	NA			CHO
	inotuzumab ozogamicin	BESPOUSA	IgG4k (オゾガマイシン修飾)	CD22	急性リンパ性白血病	2017	2017	2018			CHO
	emicizumab	HEMLIBRA	IgG4k (二重特異性)	FIXa, FX	血友病A	2017	2018	2018			CHO
	benralizumab	Fasenra	IgG1k (糖鎖改変)	IL-5R α subunit	気管支喘息	2017	2018	2018			CHO
ヒト抗体	galcanezumab	EMGALITY	IgG4	CGRP	偏頭痛	2018	2018	NA			CHO
	fremanezumab	AJOVY	IgG2k	CGRP	片頭痛の予防	2018	2019	NA			CHO
	tiludronumab	ILUMYA	IgG1k	IL-23α (p19) subunit	乾癬	2018	2018	NA			CHO
	caplacizumab	CABLVI	VH-linker-VH	von Willebrand factor	血栓性血小板減少性紫斑病	2019	2018	NA			E. Coli
	ibalizumab	TROGARZO	IgG4	CD4 domain 2	HIV-1感染	2018	NA	NA			NSO
ヒト抗体	revlizumab	ULTOMIRIS	IgG2/4	CS	発作性夜間ヘモグロビン尿症	2018	NA	NA			CHO
	romosozumab	Evenity	IgG2k	sclerostin	骨粗鬆症	2019	NA	2019			CHO
	risankizumab	Skyrizi	IgG1k (Fc改変: 237A1a, 238A1a)	IL-23α (p19) subunit	乾癬	2019	NA	2019			CHO
	adalimumab	Humira	IgG1k	TNFα	関節リウマチ	2002	2003	2008			CHO
	panitumumab	Vectibx	IgG2k	EGFR	結腸・直腸癌	2006	2007	2010			CHO
ヒト抗体	golimumab	Simponi	IgG1k	TNFα	関節リウマチ	2009	2009	2011			Sp 2/0-Ag14
	ustekinumab	Stelara	IgG1k	IL12, IL23-p40	乾癬	2009	2009	2011			Sp 2/0
	canakinumab	Ilaris	IgG1k	IL-1β	クリオピリン関連周期性症候群	2009	2009	2011			Sp 2/0-Ag14
	ofatumumab	Azerra	IgG1k	CD20	慢性リンパ性白血病	2009	2010	2013			NSO
	denosumab	Prolia/Xgeva Runmark	IgG2	RANKL	骨病変、骨粗鬆症	2010	2010	2012			CHO
ヒト抗体	ipilimumab	Yervoy	IgG1k	CTLA4	黒色腫	2011	2011	2015			CHO
	belimumab	Benlysta	IgG1A	BlyS	全身性エリテマトーデス	2011	2011	2017			NSO
	raxibacumab	Raxibacumab	IgG1A	B. anthracis toxin	吸入炭疽、肺炎	2012	NA	NA			murine cell
	ramucirumab	Cyramza	IgG1	VEGFR2	胃癌	2014	2014	2015			NSO
	nivolumab	Opdivo	IgG4	PD-1	悪性黒色腫	2015	2015	2014			CHO
ヒト抗体	secukinumab	Cosentyx	IgG1k	IL17-A	尋常性乾癬、関節炎性乾癬	2015	2015	2014			CHO
	evokumab	Repatra	IgG2	PCSK9	高コレステロール血症	2015	2015	2015			CHO
	alirocumab	Praluent	IgG1	PCSK9	高コレステロール血症	2015	2015	2016			CHO
	neclitumumab	Portrazza	IgG1k	EGFR	非小細胞性肺癌	2015	2016	NA			NSO
	daratumumab	Darzalex	IgG1k	CD38	多発性骨髄腫	2015	2016	2017			CHO
ヒト抗体	brodalumab	Lumicef, Siliq, Kyntheum	IgG2k	IL17R	尋常性乾癬	2017	2017	2016			CHO
	olaratumab	Lartuvo	IgG1	PDGFR	軟部肉腫	2016	2016	NA			NSO
	bezlotoxumab	Zinplava	IgG1	C. difficile toxin B	クロストリジウム・ディフィシル感染症	2017	2017	NA			CHO
	aveumab	Bavencio	IgG1A	PD-L1	メラノーマ、肺癌	2017	2017	2017			CHO
	durvalumab	Imfinzi	IgG1k	PD-L1	尿路上皮癌	2017	2018	2018			CHO
ヒト抗体	dupilumab	Dupixent	IgG4	IL-4R α	アトピー性皮膚炎	2017	2017	2017			CHO
	bezlotoxumab	ZINPLAVA	IgG1k	Clostridium difficile toxin B	クロストリジウム・ディフィシル感染症の再発抑制	2017	2017	2017			CHO
	guselkumab	TRILMYA	IgG1A	IL-23	尋常性乾癬	2017	2017	2018			CHO
	sarlumab	KEYZARA	IgG1k	IL-6R α subunit	関節リウマチ	2017	2017	2017			CHO
	burosumab	FGF3VITA	IgG1k	FGF23	X 染色体遺伝性低リン血症	2018	2018	NA			CHO
ヒト抗体	erenumab	AIMOVIG	IgG2	CGRP receptor	偏頭痛	2018	2018	NA			CHO
	lanadelumab	TAKZYR	IgG1k	scFv	遺伝性血管性浮腫	2018	2018	NA			CHO
	emapalumab	GAMIFANT	IgG1	IFNγ	血球貪食症候群	2018	NA	NA			CHO
	byovimab	BYOVIM	IgG1k	CD3	急性骨髄性白血病	2019	2019	2019			CHO
	cemiplimab	LIBTAYO	IgG4	PD-1	皮膚扁平上皮癌	2018	NA	NA			CHO

NA: Not announced (未発表)

抗体医薬の構造と特性

抗体は IgA, IgE, IgD, IgG, IgM のクラスを有し、そのうち IgG は血中に最も多く含まれ、医薬品としても代表的な分子である。VH、CH1、CH2、CH3 からなる重鎖と VL、CL からなる軽鎖の 2 つのポリペプチドがそれぞれ 2 本ずつ、計 4 本で構成される。各々ポリペプチドは CH1 と CL 間、及びヒンジ領域にてジスルフィド結合で連結する。抗体分子において N 末側の 2 つの断片を Fab 領域として、C 末側の断片を Fc 領域として分けられ、Fab 領域の N 末端側のサブユニットは可変領域 (VH および VL) と呼ばれる。可変領域のアミノ酸配列、特に相補性決定領域 (CDR) 領域の多様性により、抗原に対する高い特異性と親和性が生み出される (図 1-2.)。

抗体分子の特性として、それ自体が生体内分子であること、Fab 領域での特異性を活かしオフターゲットの副作用が少なく高い安全性が期待できる。また、上述の様にヒト体内動態でのリサイクリングに寄与するヒト FcRn への結合を介して血中半減期が長く、効果の持続性が期待できる。更に、低分子化合物が標的にできないタンパク-タンパク相互作用を阻害することが可能である。最もユニークな特長は、抗体の Fc 領域を介したエフェクター作用である (図 1-3.)。NK 細胞やマクロファージ上の Fc レセプターに結合することにより、これらの細胞を活性化させ、抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC) や抗体依存性細胞貪食活性 (ADCP) を誘導する。エフェクター細胞ではなく、血液中の補体と呼ばれるタンパク質を活性化することによっても補体依存性細胞傷害活性 (CDC) を誘導する[13]。

抗体分子における品質

抗体分子はその大きさと複雑さのため、化成品と異なり医薬品としての品質を基本構造から規定することは困難である。創薬における抗体配列選抜や設計の段階において、可変領域や定常領域、ヒンジ領域へのアミノ改変又は抗体の可変領域や定常領域に結合する糖鎖構造の制御により、不均一性の改善が試みられている (図 1-4.)。

重要品質特性 (Critical Quality Attribute : CQA) とは、物理学的、化学的、生物学的、微生物学的特性又は性質のうち、目的とする製品の品質を保証するために、適切な限度内、範囲内、分布内にあるべき特性又は性質であると医薬品規制調和会議を経て説明されている (ICH-Q8)。開発候補抗体の選抜後の段階においては、プロセス開発における目標となり、プロセス変更においては同等性/同質性評価の目標となる。後述するバイオ後発品のコンパラビリティ、シミラリティは具体的には CQA を達成することにある。バイオ医薬品の CQA は、一般的に表 1-2. に示すような有効成分の変化や後述する糖鎖等の不均一性を生じるが、HPLC やキャピラリー電気泳動[14]を用いた理化学試験や LC/MS を用いたペプチドマップ法 (Multiple Attribute Monitoring : MAM) [15]で測定することが可能である。開発候補抗体の選抜後は、その配列に起因した化学反応を根本的に制御することが困難な為、培養や精製のプロセスや処方条件の最適化を通じて改善する必要がある。更に生産プロセス研究においては、宿主細胞由来タンパク質、宿主細胞由来 DNA、細胞培養液に由来する培地成分等、あるいは目的物質の抽出、分離、加工、精製工程に由来する不純物を含めて品質制御する必要がある。不純物に関する規格値は、非臨床試験や臨床試験にて用い

られた製造ロット並びに製造の品質に関する恒常性に基づいて設定することが求められる。

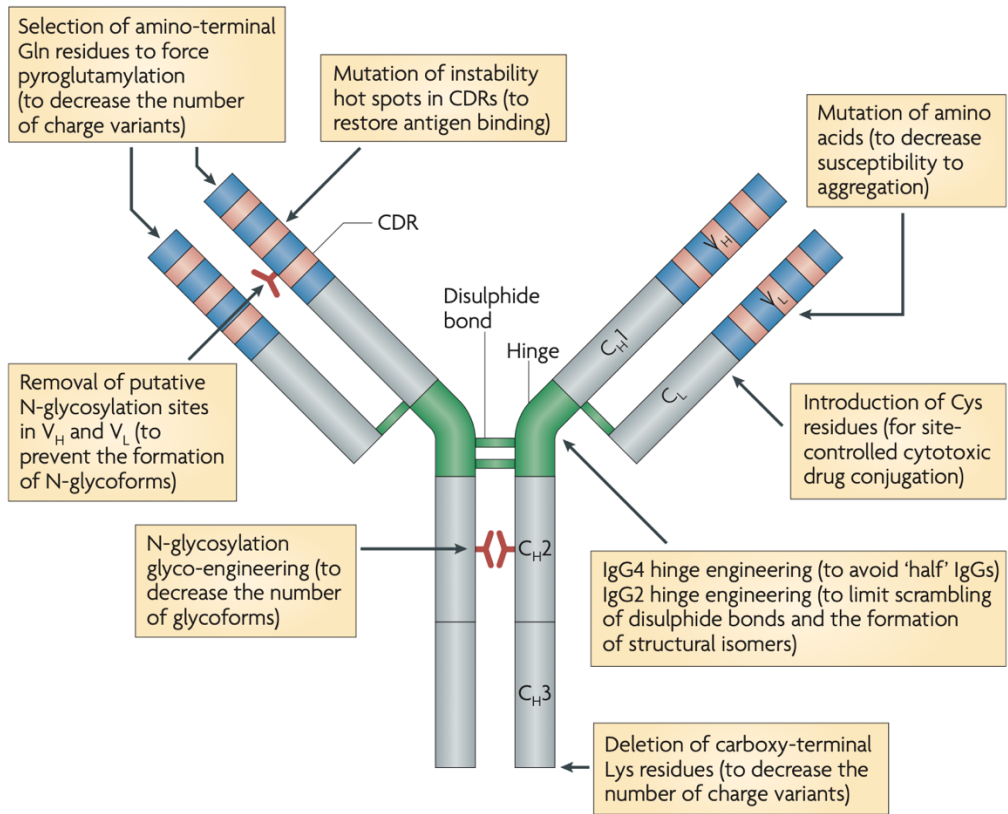


図 1-4. 抗体分子の不均一性 (文献[10]より引用)

表 1-2. 抗体医薬品の品質特性 (文献[16]より引用)

Table 2. Categories of mAb attributes.		
Categories	Structural features	Rational
Problematic (Especially in CDRs)		
Negatively impact safety or efficacy	<ul style="list-style-type: none"> • Asn deamidation 	<ul style="list-style-type: none"> • Decreased affinity and immunogenicity
Nonhuman	<ul style="list-style-type: none"> • Asp isomerization 	<ul style="list-style-type: none"> • Decreased affinity and immunogenicity
Degradation products	<ul style="list-style-type: none"> • Met oxidation • Trp oxidation • Variable domain glycosylation 	<ul style="list-style-type: none"> • Decreased affinity • Decreased affinity • Unpredictable impact on affinity, increased immunogenicity possibility and higher heterogeneity
Unnecessary	<ul style="list-style-type: none"> • Unpaired Cys 	<ul style="list-style-type: none"> • Decreased affinity and stability. Increased heterogeneity
Causing product heterogeneity without impacting safety and efficacy	<ul style="list-style-type: none"> • N-terminal Gln 	<ul style="list-style-type: none"> • Increased heterogeneity
Further considerations	<ul style="list-style-type: none"> • C-terminal Lys 	<ul style="list-style-type: none"> • Increased heterogeneity
Improving product quality	<ul style="list-style-type: none"> • Immunogenicity motif • Aggregation prone regions • Mutations to increase half-life 	<ul style="list-style-type: none"> • Immunogenicity • Aggregation and clearance • Patient convenience

抗体分子における糖鎖の役割

糖タンパクに結合している糖鎖は大きく分けて、N-結合型糖鎖と O-結合型糖鎖に分類される。グリコサミノグリカンとしてはヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸が代表的な多糖類である (図 1-5.)。抗体分子は Fc 部分 CH2 ドメインの 297 番目に位置するアスパラギン (Asn) 残基に N-結合型糖鎖を有しており、その構造の種類によって薬理活性や血中動態、免疫原性に影響を与えることが知られている。皮下投与する際には、皮膚中に存在するヒアルロン酸と抗体分子の相互作用が浸透性に影響を与えることが知られている[17, 18]。Asn 残基の N-結合型糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミン (GlcNac) に付加しているフコース (Fuc) を除去した抗体 (以下、フコース非修飾抗体) は、Fc 受容体との結合上昇により ADCC 活性が増強される。2 分岐型 GlucNac の付加量を増加させることでも同様の ADCC 増強効果が得られる。CDC 活性については、ガラクトース (Gal) の付加が補体第一成分 (C1q) への結合上昇により、活性増強に寄与することが知られている。

血中動態の観点としては、ハイマンノース型の糖鎖を有する抗体はマクロファージ等の細胞表面に存在するマンノース受容体に結合し、貪食されることで血中動態が低下する。CDR 中に結合する糖鎖は血中動態低下に影響を与えることが知られ、現在では抗原結合や活性に必須でない限り治療用抗体として開発されることは無い。

免疫原性の観点では、抗体に修飾する非ヒト型糖鎖の有無に留意しなければならない。特に SP2/0 細胞や NS0 細胞のような宿主で産生する場合、グリコリル型のシアル酸 Neu5Gc や Gal α 1-3Gal 等の非ヒト型糖鎖が付加される。非ヒト型糖鎖の人体への確率的影響については様々な知見に基づき科学的議論が展開

されている。Verkit らはヒトの多くが発症する動脈硬化や大腸癌の組織中から Neu5Gc が検出される事を報告してきた。ヒトにおいてシアル酸はアセチル型である Neu5Ac を有しているが、食肉等に含まれる Neu5Gc により体内に蓄積され、抗抗体の発生可能性があり、抗 Neu5Gc 抗体による微小炎症が動脈硬化進展に関与する可能性が示唆されている[19]。抗 EGFR 抗体である Cetuximab 投与で報告されたアナフィラキシー様症状には CDR 中に含まれる Gal α 1-3Gal が影響しており、注意すべきものと考えられている[20]。

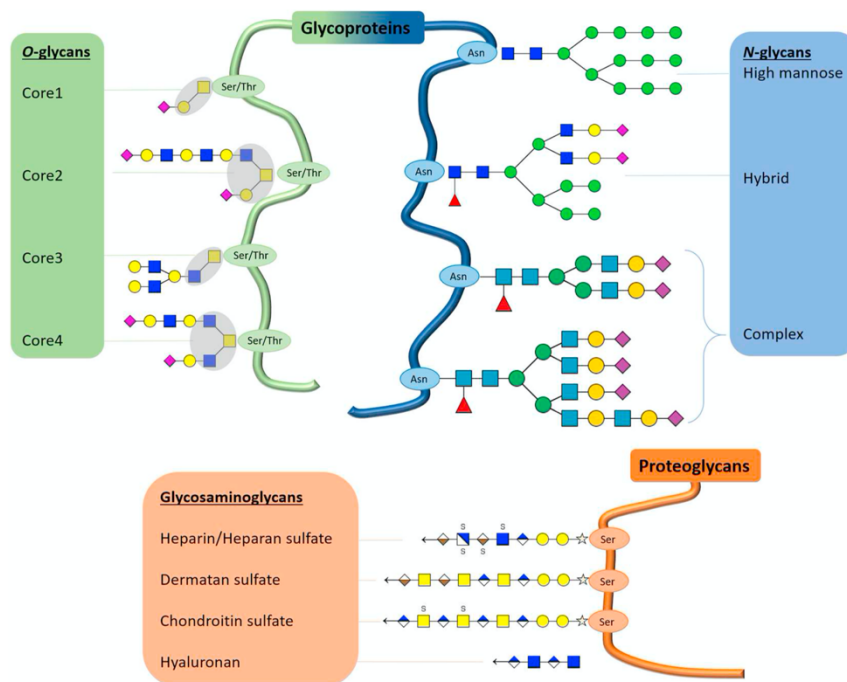


Fig. 8. Structures of glycans linked to proteins. Yellow circle = galactose (Gal); yellow square = N-acetylgalactosamine (GalNAc); blue square = N-acetylglucosamine (GlcNAc); green circle = mannose; red triangle = fucose, purple diamond = N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

図 1-5. 糖タンパク質の糖鎖構造 (文献[14]より引用)

抗体分子の物性プロファイリング

上記のように、抗体分子はサブクラスや CDR 中のアミノ酸残基に加え、糖鎖構造にも多様性を含み、抗体医薬の開発においては様々な品質の特性解析と制御が重要である。従来の創薬プロセスでは、様々な作製技術を通じて目的とする生物活性を有する抗体分子取得が進められ、PK (Pharmacokinetics) や PD (Pharmacodynamics)、安全性評価を踏まえて開発候補抗体が選抜されてきた。その一方で、研究開発の後期になって凝集体や切断体等の物性上の課題が発生すると、剤型や貯法が限定されるリスクが顕在化することで CMC (Chemistry manufacturing and controls) 開発において多大な時間と労力を要することから、創薬の段階で多面的な特性解析をすることが重要であるとの認識が高まっている。CMC を見据えて開発候補となる抗体物性をプロファイリングする取り組みは、Developability assessment と呼ばれ、近年の創薬基盤技術の一部となっている(図 1-6.)[16]。Jain らは臨床入りされている 50 品目程度の抗体分子を解析しており、特に PSR (poly-specificity reagent), CSI (clone self-interaction), AC-SIGN (affinity-capture self-interaction nanoparticle spectroscopy), CIC (cross-interaction chromatography) と呼ばれる自己会合性や血中動態や関連する一連の評価系を選抜クラスターの一つとして導入することが提案されている[21] (図 1-7.)。

低分子医薬開発において、Developability assessment はリード化合物開発の成功確率を上げる重要な戦略として既に認識されている [22]。かつて、Lipinski らは 1997 年に、医薬候補品リストと通常の有機化合物リストの比較を行い、経口医薬品になりやすい化合物の特性を Rule of five としてまとめ上げた[23]。Lipinski 則は創薬化学者にとって重要な指標となっているものの、ケミカルスペース拡張の観点で天然物ライブラリーの活用が再度注目され、また PPI (Protein-Protein interaction) 創薬への注目により Lipinski 則から外れるような化合物開発が増え

てきている[24]。このような状況の中で、Developability assessment の重要性が増しているものと考えられる。低分子医薬の歴史とは対照的に、Raybould らは 2018 年に、約 460 万のヒト抗体配列データセットと 137 の臨床段階の抗体配列を比較することで、配列から規定される開発可能性に関連する 5 つの指標 (表 1-3.) を提案した[25]。この指標は、抗体版 Lipinski 則とも称され、ヒト抗体配列データベースの拡充や上市された抗体医薬品の分析と蓄積された物性プロファイリングを統合的に解析するデータサイエンスの更なる進歩により、抗体選抜工程を含む応用研究の加速化が期待される[26,27]。また、将来的には新しい技術を搭載した次世代抗体についても CMC ワークフローが整備されることで、臨床試験での供給に耐える生産プロセス構築や、非臨床評価における作用機序解析並びに投与する医薬品候補の品質管理の効率化につながり、画期的な抗体医薬品の開発推進が期待される(図 1-7.)。

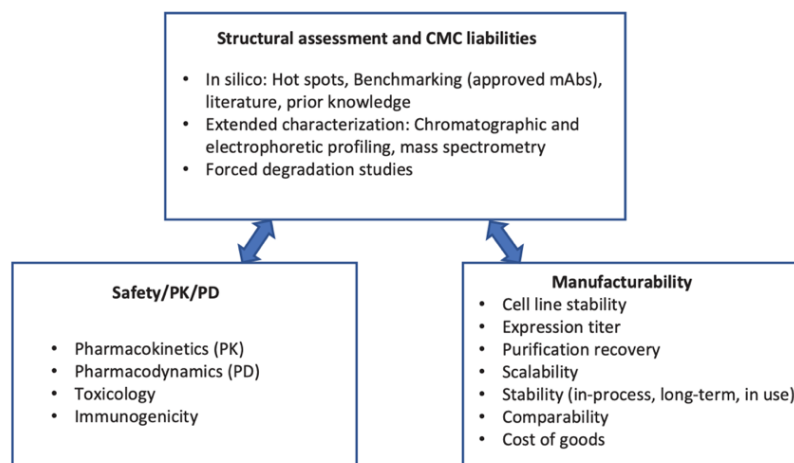


Figure 1. Major components of mAb developability assessment.

図 1-6. 抗体医薬の Developability Assessment の主要素 (文献[16]より引用)

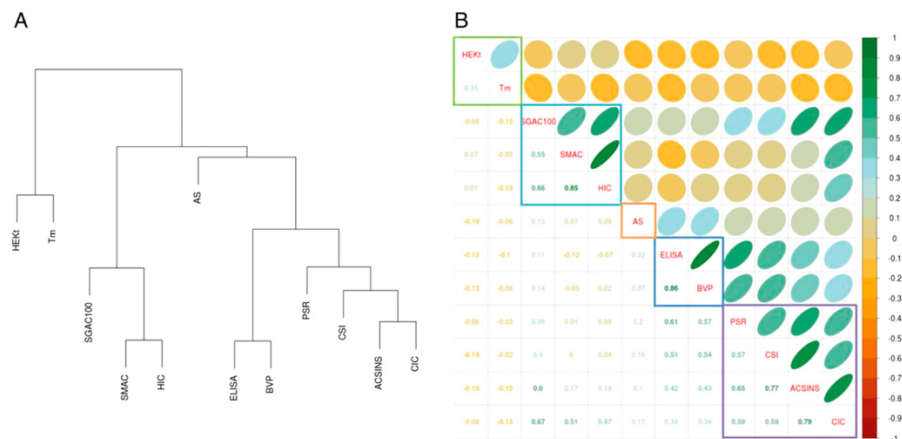


Fig. 2. (A) Hierarchical clustering of biophysical properties. (B) Matrix and clustering representation of biophysical properties. The lower triangle shows Spearman correlation coefficients, and the upper triangle shows a graphic representation of the same correlation values. The values for SGAC100 were negated before calculating the clustering and correlation coefficients, because its direction of favorability is opposite to HIC and SMAC. The eccentricity of the ellipses is proportional to the magnitude of the correlation coefficient. The slope of the major axis has the same sign as the correlation coefficient.

図 1-7. 物性評価における階層的なクラスタリング (文献[21]より引用)

表 1-3. 配列で規定した開発可能性に関連する 5 つの指標 (文献[25]より引用)

Table 1. TAP amber and red flag cut-off thresholds, with respect to the clinical-stage therapeutic distributions

Metric	Amber flag region	Red flag region
1. Total CDR length	Bottom 5%, top 5%	Above or below
2. PSH, CDR vicinity	Bottom 5%, top 5%	Above or below
3. PPC, CDR vicinity	Top 5%	Above
4. PNC, CDR vicinity	Top 5%	Above
5. SFvCSP	Bottom 5%	Below

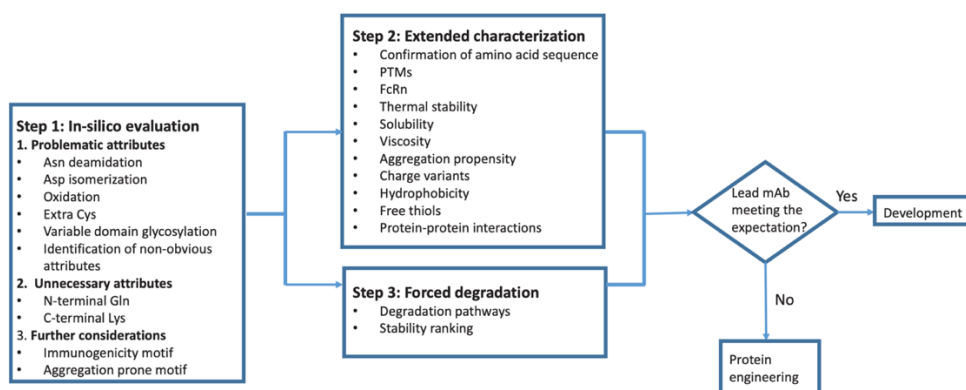


Figure 2. Workflow of structural and CMC liabilities assessment.

図 1-8. CMC に関連する物性評価のワークフロー (文献[16]より引用)

大腸菌の抗体生産への活用

大腸菌による抗体発現と生産研究は抗体創薬プロセスの様々な場面で応用されている。例えば、抗体選抜では試験管内人工選択系であるファージディスプレイが利用され、物性評価や構造解析に必要な Fab タンパク質は大腸菌より調製される場合がある。大腸菌は安価な培地で生育する、速い倍化時間、育種が比較的容易といった利点を有することから、当菌株を宿主とするタンパク質発現は基礎研究だけでなく、医薬品や化学品など幅広く産業分野で活用され、今なお産業応用を目指した宿主の改変が進められている[28]。医薬品については、がん治療におけるサイトカインや、関節リウマチ治療では TNF α を中和する PEG 化 Fab 製剤 (certolizumab)、近年ではバイスペシフィック抗体の開発が進み、これらの医薬品生産の一部に原核生物である大腸菌が採用されている (blinatumomab)。全長抗体及び糖タンパク質の発現には主に真核生物である CHO 細胞が用いられ、バイオ医薬の生産宿主には MCB (Master Cell Bank), WCB (Working Cell Bank) のセルバンクシステムとその安全性を担保する方法論や規制 (ICH-Q5) が確立されていることから、大腸菌又は CHO 細胞を選択するのが主流となっている[29]。がん領域においては、大腸菌をバイオ医薬品の生産宿主として採用されている例は少なく無い (図 1-9.) [30]。両細胞は分泌機構が異なる為、発現システムは根本的に異なる。しかしながら、工業細胞として抗体創薬のあらゆる場面において使い分けられ、タンパク質発現系の改良に関する研究は創薬基盤の効率化や医薬品生産向上に貢献することが期待される。

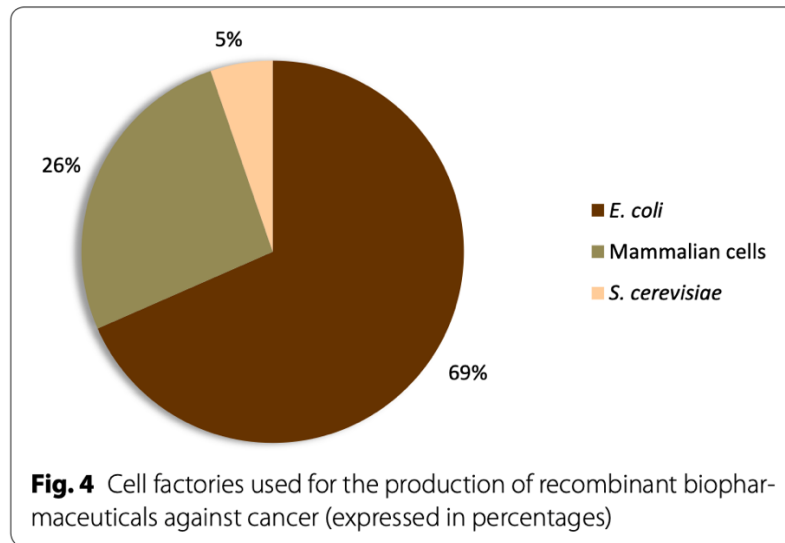


図 1-9. がんを使用されるバイオ医薬品の生産宿主の割合 (文献[30]より引用)

動物細胞工学の進展と抗体生産の効率化

動物細胞による物質生産は 1962 年の Capstic らによる Baby hamster kidney 細胞を用いたワクチン製造にさかのぼる。工業利用としての CHO 細胞は、1971 年に Thompson らが浮遊培養で増殖する細胞株の育種を発端とし、大腸菌や酵母では不可能なヒト型構造に類似した糖鎖を付加する生産宿主として産業応用されてきた[31]。創薬スクリーニングにおいてはヒト由来である HEK (Human human endothelial kidney) 細胞を用いられることがあるが、CHO 細胞と糖鎖プロファイルが異なる点に注意する必要がある。インフルエンザ B ウイルスに対する抗体を HEK293 と CHO 細胞を用いて生産した場合で比較し、糖鎖構造の違いにより CHO 細胞で生産された抗体にのみ抗ウイルス活性が確認された例がある[32]。安全面では、マウス由来のミエローマ細胞 (SP2/0, NS0) に比べると、糖鎖の構造がヒト型に類似していて抗原性が低いことがある。その一方で、ヒト細胞 (PERC.6 等) を製造に用いると生産過程でのヒト感染性ウイルスの混入した際

の汚染リスクが常に懸念されるという事情がある。この点、CHO 細胞ではげっ歯類に特有のレトロウィルス様粒子 (C 型、A 型または R 型) が電子顕微鏡にて観察されるが、これらはヒトには感染しないことが分かっており、安全性評価体制が確立されている (ICH-Q5)。

多様な抗体医薬品の成功により、製薬企業は研究開発における要求量の予測と生産面での対応について多くのチャレンジに取り組んでいる。投与量の予測が困難な第I相臨床試験の段階での設備化、適用疾患に応じた市場見込みからの設備スケール設計、上市後には販売実績から需要を予測し安定供給体制を整備しなければならない。加えて、抗体医薬品はその作用機序からサイトカインに比べて有効性を発揮する投与量が多い為、抗体生産プロセス改良による産生量増大が求められてきた[33]。動物細胞で抗体分子を生産する過程において多くのシャペロンが関わっており、細胞造成の過程において生産性を増大させるには技術的チャレンジを要してきた[34]。製薬業界においては、ここ 20 年間の開発競争を経て、数千から最大で 25000L スケールのステンレススチール製タンクを用い、生産培養槽の生産体制を整備することで要求量に应运えてきた[35]。加えて、抗体生産量は 10-13g/L に到達するレベルにまで改善され、培養槽スケールに依存しない抗体生産の最適化を推し進めている[36]。

抗体医薬開発における課題

抗体医薬品は約 550 種類を超える開発品目に達しているが、標的とする抗原は 20 種類程度に集中している。その一方で、有効な治療方法の無い疾患を含め解決すべき医療ニーズは未だに存在し、次世代抗体の開発や抗体生産技術の向上を通じて、より良い薬をできるだけ早く多くの患者に提供することが求めら

れている。抗体医薬開発における課題について、薬効の増強、投与量及び頻度の低減、コスト低減の3つに整理し、現状及び展望について概説する。

課題1：薬効の増強

抗体作製における技術開発は、可変領域の改良と定常領域の改良に分類することができる。可変領域は主に抗原に対する結合特性に関与しているが、同時に抗体分子の品質物性を規定するものであり、実験動物への投与後の薬物動態や保存安定性への影響を精査する必要がある。定常領域は主にエフェクター機能や薬物動態に関与していることから、Fc受容体に対する結合特性を制御することで薬効増強が期待できる。

抗原との結合親和性については、ファージディスプレイによる分子進化学と表面プラズモン共鳴等の相互作用解析を組み合わせることで改良することが可能である。主にCDR中アミノ酸残基にPCR等で人工変異を加え、抗体分子を提示したファージライブラリーと抗原を反応させた後に溶出し、大腸菌への再感染というパンニングと呼ばれる人工選択系を通じて結合親和性を成熟させ、多様な活性を有する抗体の中から増強するものを取得する事が可能となった。このような抗体技術は2000年前後には普遍化されるようになり、Fc融合タンパク質や異なるエピトープ認識、エフェクター機能を制御する等、同じ抗原に対して抗体分子が異なる差別化戦略に展開している(図1-10.)。

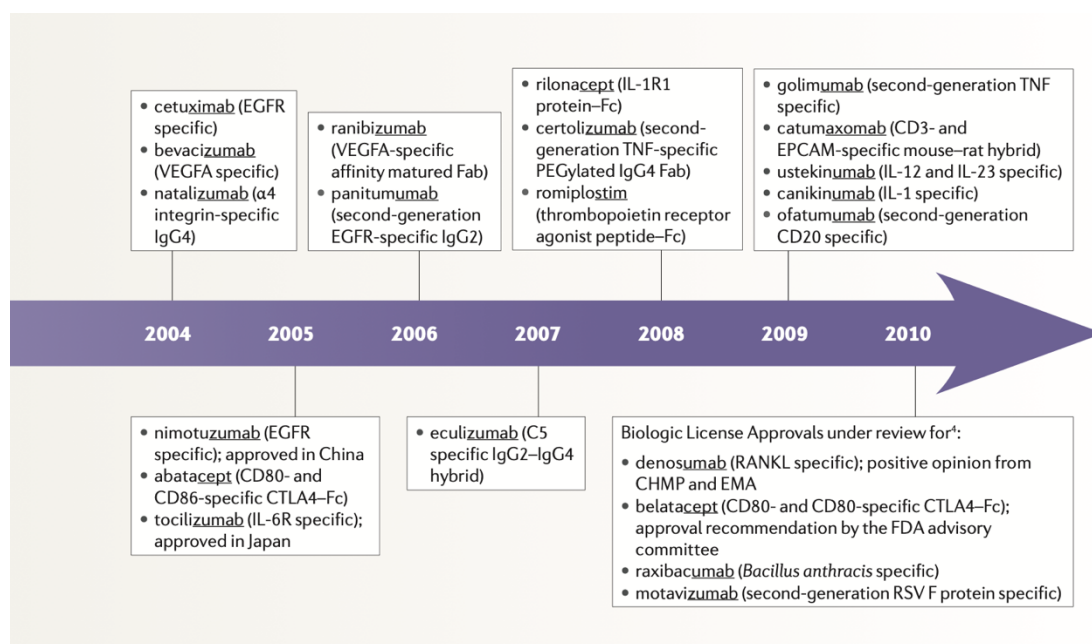


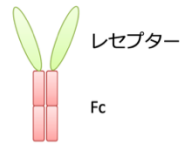
図 1-10. 2004 年から 2010 年までの承認品目の推移 (文献[10]より引用)

Fc 融合タンパク質は、Fc の機能と機能性タンパク質またはペプチドを融合させた医薬品となった人工フォーマットの一種である (図 1-11.)。標的となるリガンドに対するヒト受容体、作動薬やホルモン等の機能性ペプチド、ヒト酵素はそれ自体には生物活性を有するものの、分子量や安定性等の問題からそれ自体の分子構造では血中動態に課題があった。これら機能分子に Fc 融合させることで、分子量増大させて腎臓における尿細管濾過による排出を回避するだけでなく、FcRn を介した動態延長の機能付与が可能となる。更に、Fc 領域は ProteinA との結合領域を介した高効率なアフィニティー精製の実現だけでなく、イムノグロブリンフォールドを有することから、リフォールディング等の生産技術を適応することも可能である[37]。TPOR アゴニストペプチドを Fc の C 末端に融合させたロミプロスチム (romiplostim) は、大腸菌を生産宿主として開発されている (表 1-4.)。

Fc融合タンパク質

受容体 + Fc

エタネルセプト (TNFR+Fc)
 アバタセプト (CTLA4+Fc)
 アフリベルセプト (VEGFR+Fc)



サイトカイン + Fc

ロミプロスチム (Fc+TPORアゴニストペプチド)

ペプチド + Fc

デュラグルチド (改変GLP1ペプチド + Fc)



酵素 + Fc

エフラロクトグ アルファ (第VIII因子 + Fc)
 エフトレノナコグ アルファ (第IX因子 + Fc)
 アスホターゼ アルファ (ホスファターゼ + Fc)

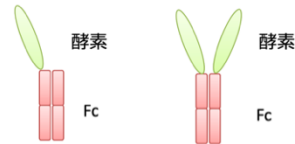


図 1-11. Fc 融合タンパク質の分子フォーマット

(国立医薬品衛生研究 HP より引用)

表 1-4. 日米欧で認可された Fc 融合タンパク質医薬品

(国立医薬品衛生研究 HP より引用)

これまでに日米欧で認可されたFc融合タンパク質医薬品						平成27年7月18日 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部			
分類	名称	商品名	構造	標的	主な適応疾患	承認年			産生細胞
						US	EU	Japan	
受容体 + Fc	etanercept	Enbrel	TNFR + Fc	TNF α, LT α	関節リウマチ	1998	2000	2005	CHO
	alefacept	Amevive	LFA3 + Fc	CD2	尋常性乾癬	2003	NA	NA	CHO
	abatacept	Orencia	CTLA4 + 改変Fc	CD80/CD86	関節リウマチ	2005	2007	2010	CHO
	rilonacept	Arcalyst	IL-1 R + IL-1 RAcP + Fc	IL-1	クリオピリン関連周期熱症候群	2008	2009	NA	CHO
	belatacept	Nulojix	改変CTLA4 + 改変Fc	CD80/CD86	腎移植拒絶の防止	2011	2011	NA	CHO
サイトカイン + Fc	afibercept	Eylea	VEGFR1R2+Fc	VEGF	加齢黄斑変性	2011	2012	2012	CHO
	romiplostim	NPLate	改変Fc+TPORアゴニストペプチド	TPOR	血小板減少性紫斑病	2008	2009	2011	E.Coli
ペプチド + Fc	dulaglutide	Trulicity	GLP-1アナログ + 改変IgG4 Fc	GLP-1R	2型糖尿病	2014	2014	2015	mammalian cell
	asfotase alfa	Strensiq	アルカリホスファターゼ + Fc		低ホスファターゼ症	NA	NA	2015	CHO
酵素 + Fc	efraloctocog alfa	Eloctate	F.VIII + Fc		血液凝固第VIII因子欠乏患者における出血傾向	NA	NA	2014	HEK
	eftrenonacog alfa	Alprolix	F. IX + Fc		血液凝固第IX因子欠乏患者における出血傾向	NA	NA	2014	HEK

バイスペシフィック抗体もまた、医薬品として確立しつつある人工フォーマットの一つであり、近年注目を集めている。バイスペシフィック抗体は 60 種以上の分子フォーマットが存在し、うち約 30 種ががんや免疫疾患を対象として臨床試験段階にある[38]。臨床段階にバイスペシフィック抗体は Triomab[39], BiTEs[40], TandAbs[40], ImmTac[41], CrossMab[42], DVD-Ig[40]等が代表的なものであり、作用機序としては 2 種の抗原に同時結合することによる薬効増強するものと、2 種の抗原の架橋による新規の薬効発現するものに大別される[40]。DVD-IgG は IgG をベースとして更に可変領域のドメインが付加されたフォーマットであり、最も臨床開発進められているバイスペシフィック抗体の一つである。VL 及び VH ドメインは適切に設計されたポリペプチドリンカーと結合しており、(2+2) 価数での抗原結合様式を有する[43]。このような結合様式は結合容量が増大され、体内にごく少量しか存在しないサイトカインの抑制作用を長期にわたって持続することや、より広い領域でのタンパク質—タンパク質相互作用に働きかけるものとして期待される。BiTE (Bispecific T cell Engager) は定常領域を持たず、比較的小さい分子量のバイスペシフィック抗体で、blinatumomab が上市に至っている[44]。T 細胞上の CD3 と癌細胞上の抗原を架橋する様にデザインした scFv 断片がタンデムに連なったフォーマットで、T 細胞を癌細胞にリダイレクトする作用機序を有する。

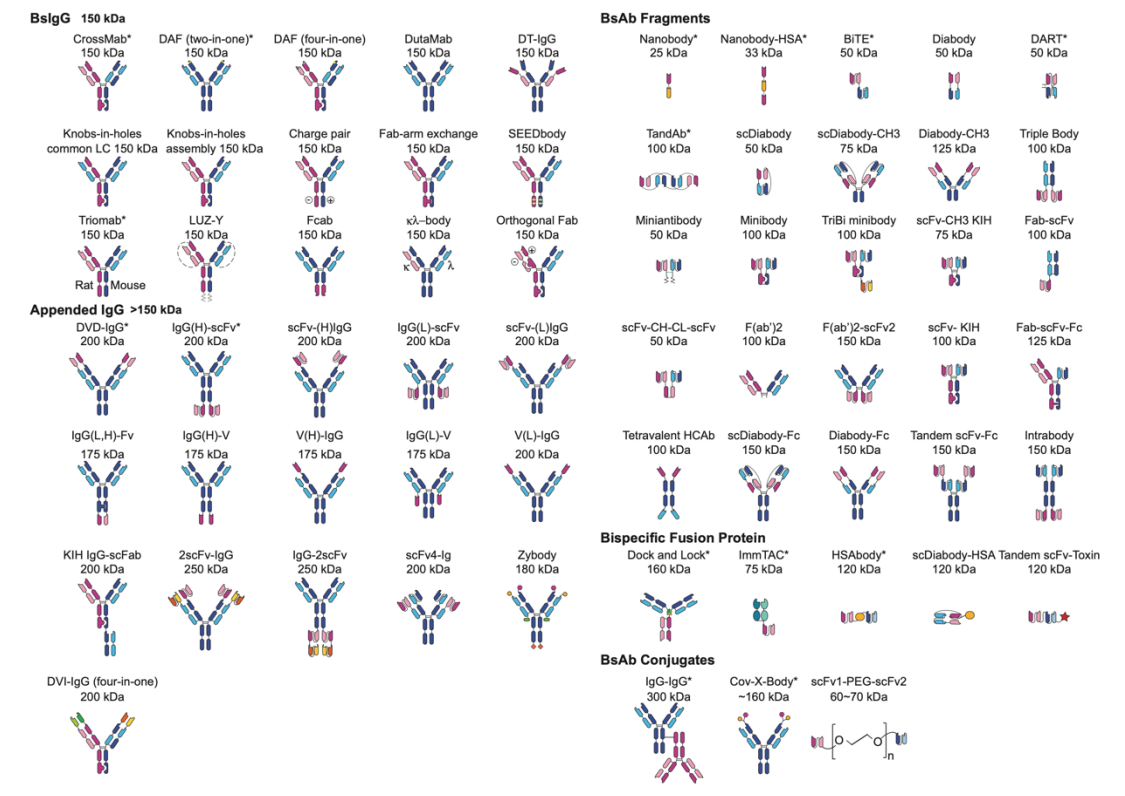


図 1-12. IgG の代替となる二重特異性抗体フォーマット (文献[38]より引用)

バイスペシフィック抗体は、BsIgG, Appended IgG, BsAb Fragments, Bispecific Fusion Protein, BsAb Conjugates の 5 つに大別される。臨床試験が進められているものは*でハイライトされている。

表 1-5. バイスペシフィック抗体の認可及び開発進捗 (文献[10]より引用)

BsAb (other names, sponsoring organizations)	BsAb format	Targets	Proposed mechanisms of action	Development stages	Diseases (or healthy volunteers)
Catumaxomab (Removab®, Fresenius Biotech, Trion Pharma, Neopharm)	BsIgG: Triomab	CD3, EpCAM	Retargeting of T cells to tumor, Fc mediated effector functions	Approved in EU	Malignant ascites in EpCAM positive tumors
Ertumaxomab (Neovii Biotech, Fresenius Biotech)	BsIgG: Triomab	CD3, HER2	Retargeting of T cells to tumor	Phase I/II	Advanced solid tumors
Blinatumomab (Blinicyto®, AMG 103, MT 103, MEDI 538, Amgen)	BiTE	CD3, CD19	Retargeting of T cells to tumor	Approved in USA Phase II and III Phase I	Precursor B-cell ALL ALL DLBCL NHL
Solitumab (AMG 110, MT110, Amgen)	BiTE	CD3, EpCAM	Retargeting of T cells to tumor	Phase I	Solid tumors
MEDI 565 (AMG 211, MedImmune, Amgen)	BiTE	CD3, CEA	Retargeting of T cells to tumor	Phase I	Gastrointestinal adenocarcinoma
BAY2010112 (AMG 212, Bayer; Amgen)	BiTE	CD3, PSMA	Retargeting of T cells to tumor	Phase I	Prostate cancer
MGD006 (Macrogenics)	DART	CD3, CD123	Retargeting of T cells to tumor	Phase I	AML
MGD007 (Macrogenics)	DART	CD3, gpA33	Retargeting of T cells to tumor	Phase I	Colorectal cancer
AFM11 (Affimed Therapeutics)	TandAb	CD3, CD19	Retargeting of T cells to tumor	Phase I	NHL and ALL
AFM13 (Affimed Therapeutics)	TandAb	CD30, CD16A	Retargeting of NK cells to tumor cells	Phase II	Hodgkin's Lymphoma
GD2 (Barbara Ann Karmanos Cancer Institute)	T cells preloaded with BsAb	CD3, GD2	Retargeting of T cells to tumor	Phase I/II	Neuroblastoma and osteosarcoma
pGD2 (Barbara Ann Karmanos Cancer Institute)	T cells preloaded with BsAb	CD3, Her2	Retargeting of T cells to tumor	Phase II	Metastatic breast cancer
EGFRBi-armed autologous activated T cells (Roger Williams Medical Center)	T cells preloaded with BsAb	CD3, EGFR	Autologous activated T cells to EGFR-positive tumor	Phase I	Lung and other solid tumors
Anti-EGFR-armed activated T-cells (Barbara Ann Karmanos Cancer Institute)	T cells preloaded with BsAb	CD3, EGFR	Autologous activated T cells to EGFR-positive tumor	Phase I	Colon and pancreatic cancers
rM28 (University Hospital Tübingen)	Tandem scFv	CD28, MAPG	Retargeting of T cells to tumor	Phase II	Metastatic melanoma
IMCp100 (Immunocore)	ImmTAC	CD3, peptide MHC	Retargeting of T cells to tumor	Phase I/II	Metastatic melanoma
DT2219ARL (NCI, University of Minnesota)	2 scFv linked to diphtheria toxin	CD19, CD22	Targeting of protein toxin to tumor	Phase I	B cell leukemia or lymphoma
Duligotuzumab (MEHD7945A, Genentech, Roche)	DAF	EGFR, HER3	Blockade of 2 receptors, ADCC	Phase I and II Phase II	Head and neck cancer Colorectal cancer
LY3164530 (Eli Lilly)	Not disclosed	EGFR, MET	Blockade of 2 receptors	Phase I	Advanced or metastatic cancer
MM-111 (Merrimack Pharmaceuticals)	HSA body	HER2, HER3	Blockade of 2 receptors	Phase II Phase I	Gastric and esophageal cancers Breast cancer
MM-141, (Merrimack Pharmaceuticals)	IgG-scFv	IGF-1R, HER3	Blockade of 2 receptors	Phase I	Advanced solid tumors
RG7221 (RO5520985, Roche)	CrossMab	Ang2, VEGF A	Blockade of 2 proangiogenics	Phase I	Solid tumors
RG7716 (Roche)	CrossMab	Ang2, VEGF A	Blockade of 2 proangiogenics	Phase I	Wet AMD
TF2 (Immunomedics)	Dock and lock	CEA, HSG	Pretargeting tumor for PET or radioimaging	Phase II	Colorectal, breast and lung cancers
ABT-981 (AbbVie)	DVD-Ig	IL-1α, IL-1β	Blockade of 2 proinflammatory cytokines	Phase II	Osteoarthritis
ABT-122 (AbbVie)	DVD-Ig	TNF, IL-17A	Blockade of 2 proinflammatory cytokines	Phase II	Rheumatoid arthritis
COVA322	IgG-fynomer	TNF, IL17A	Blockade of 2 proinflammatory cytokines	Phase I/II	Plaque psoriasis
SAR156597 (Sanofi)	Tetravalent bispecific tandem IgG	IL-13, IL-4	Blockade of 2 proinflammatory cytokines	Phase I	Idiopathic pulmonary fibrosis
GSK2434735 (GSK)	Dual-targeting domain	IL-13, IL-4	Blockade of 2 proinflammatory cytokines	Phase I	(Healthy volunteers)
Ozoralizumab (ATN103, Ablynx)	Nanobody	TNF, HSA	Blockade of proinflammatory cytokine, binds to HSA to increase half-life	Phase II	Rheumatoid arthritis
ALX-0761 (Merck Serono, Ablynx)	Nanobody	IL-17A/F, HSA	Blockade of 2 proinflammatory cytokines, binds to HSA to increase half-life	Phase I	(Healthy volunteers)
ALX-0061 (AbbVie, Ablynx)	Nanobody	IL-6R, HSA	Blockade of proinflammatory cytokine, binds to HSA to increase half-life	Phase I/II	Rheumatoid arthritis
ALX-0141 (Ablynx, Eddingpharm)	Nanobody	RANKL, HSA	Blockade of bone resorption, binds to HSA to increase half-life	Phase I	Postmenopausal bone loss
RG6013/ACE910 (Chugai, Roche)	ART-Ig	Factor IXa, factor X	Plasma coagulation	Phase II	Hemophilia

ALL, acute lymphoblastic leukemia; AMD, age-related macular degeneration; AML, acute myeloid leukemia; ART-Ig, asymmetric reengineering technology immunoglobulin; CLL, chronic lymphocytic leukemia; DAF, dual action Fab; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; HSA, human serum albumin; ImmTACs, immune-mobilizing monoclonal T cell receptors against cancer; MAPG, melanoma-associated proteoglycan; NHL, non-Hodgkin's lymphoma. BsAb that are no longer in clinical trials are not included in this table. Data sources: clinicaltrials.gov, Roots Analysis and web sites for sponsoring companies.

抗体の Fc 領域を介したエフェクター作用のうち、アミノ酸改変や糖鎖改変により抗体の CDC 活性 ADCC 活性を増強することが可能である。C1q タンパク質への結合性を高めた Fc アミノ酸改変を作製することで、CDC 活性の調節を可能としている。ADCC 活性には FcγRIIIa への結合が関与しているが、糖鎖改変によりフコース除去した rituximab や trastuzumab はフコース修飾抗体よりも ADCC 活性が増強されることが確認されている。更に、Fc アミノ酸改変によっても FcγRIIIa への結合性を高めることが数多く報告されている。クローン病を対症とした infliximab の臨床試験において、FCGR3A の遺伝子多型が抗体医薬の薬効に影響を与える報告があることから、これらの知見は抗体 Fc 領域と親和性の低い FCGR3A 遺伝子多型を持つ患者に対する薬効減弱の課題を克服するものとして期待される[45]。そして、糖鎖改変による複数の抗体医薬が本邦を含めて上市されたことで、糖鎖改変技術の臨床上の有用性が証明され数多くの臨床試験が進められている (表 1-6.)。また薬理面では、これまでワクチンの臨床試験では明らかとなっていなかった生体内での ADCC 活性の役割に注目が集まっている[46]。特に、ウイルス感染後に中和抗体が発生した患者が再び感染すると感染症状が重症化する事は ADE (Antibody Dependent Enhancement) と呼ばれ問題となっており、そのような患者には ADCC 活性を作用機序とする抗ウイルス抗体が再感染時の重症化を予防できる可能性が提唱されている[47]。更に、近年では上述のようなバイスペシフィック抗体に糖鎖改変を組み合わせることで薬効増強を狙った次世代抗体の臨床試験も進行中である[48]。Fc 受容体を介して ADCC 活性に関する理解を深めることで次世代抗体の作用機序解析やヒトでの臨床応用が進展することが期待される。

表 1-6. フコース非修飾抗体の開発進捗 (文献[48]より引用)

Table 1 Selected afucosylated antibodies in clinical development				
Company	Agent	Target	Indication	Stage
Kyowa Hakko Kirin Pharma	Poteligeo (mogamulizumab)	CCR4	Mycosis fungoides, Sézary syndrome	Approved Japan 2012, US 2018
Genentech (Roche)	Gazyva (obinutuzumab)	CD20	Chronic lymphocytic leukemia (2013), follicular lymphoma (2016, 2017)	Approved 2013
MedImmune (AstraZeneca),	Fasenra (benralizumab)	IL-5 receptor-α	Severe eosinophilic asthma	Approved 2017
Five Prime Therapeutics	Bemarituzumab (FPA144)	FGFR2	Gastric and gastroesophageal cancer	Phase 3
TG Therapeutics	Ublituximab (TG-1101)	CD20	Multiple sclerosis (MS), B cell cancers	Phase 3 (MS), phase 1/2 (blood cancers)
Viela Bio	Inebilizumab (MEDI-551)	CD19	Neuromyelitis optica	Phase 2b
GlaxoSmithKline	GSK2857916 (ADC)	BCMA	Multiple myeloma	Phase 2
Merus	MCLA-128	Her2, Her3 (bispecific)	Breast cancer	Phase 2
Argenx (Breda, the Netherlands)	ARGX-110	CD70	T cell lymphoma, acute myeloid leukemia	Phase 2
Bristol-Myers Squibb	BMS-986218	CTLA4	Advanced solid tumors	Phase 1/2
Cantargia (Lund, Sweden)	CAN04 (nidanilimab)	IL1RAP	Solid tumors	Phase 1/2
Argenx	ARGX-111	c-Met	Advanced cancer	Phase 1 complete
Janssen (Johnson & Johnson)	JNJ-61186372 (CNT04424)	EGFR, cMet (bispecific)	Non-small cell lung cancer	Phase 1
Five Prime Therapeutics	FPA150	B7-H4	Solid tumors	Phase 1
Seattle Genetics	SEA-CD40	CD40	Solid tumors	Phase 1
Seattle Genetics	SEA-BCMA	BCMA	Multiple myeloma	Phase 1
Viela Bio	VIB7734	ILT7	Myositis	Phase 1
Merus	MCLA-158	EGFR, Lgr5 (bispecific)	Solid tumors	Phase 1

Source: company websites; Clinical trials.gov; Proceedings, American Association for Cancer Research 2018 annual meeting

課題 2：投与量及び頻度の低減

抗体医薬品の投与法は適応疾患や処方に応じて点滴静注と皮下注射があり、皮下投与は低用量化や投与頻度の削減によって可能となる。皮下投与製剤のうち、自己注射が可能になるプレフィルトシリンジタイプの注射剤は慢性疾患において利便上好ましいものである。プレフィルトシリンジタイプの注射剤の場合、抗体濃度は 50-100mg/mL 以上となるが、このような高濃度では粘度上昇や凝集体のリスクが増加し、低用量化と品質管理の両立が求められる。高濃度溶液で顕在化するリスクについては、創薬の段階から物理化学的安定性を Developability assessment の項目の一つとして評価することが望ましい。中でも、コロイド安定性を評価する第二ビリアル係数 (B_{22}) は高濃度化製剤における分子内反発を予測する指標としての活用が期待されている[49]。

投与頻度は抗原と抗体の体内動態に大きく影響を受ける。Fc 受容体の一つである FcRn（胎児性 Fc 受容体）は生体内 IgG の分解抑制に関わり、数日～数週間という長い血中半減期に寄与している[50]。図には既に承認された抗体医薬品の例を示したが、受容体タンパク質を抗体 Fc と融合させた Fc 融合タンパク質医薬品の開発も進んでいる。IgG 結合に関与する FcRn 上のアミノ酸残基は、FcRn α 2 ドメインの Glu115, Glu116, Asp130, Trp131, Leu135 とされているが、この部位のアミノ酸配列には種によって差異が生じ、FcRn と IgG の結合には種差がある一因と考えられている。現在では、ヒト IgG 抗体はマウス FcRn への結合が減弱していることが判っており、創薬の段階からヒト FcRn への結合及び乖離を *in vitro* 評価し、ヒト FcRn ノックインマウスを用いた *in vivo* 評価を導入する等、体内動態低下のリスク評価を実施している製薬企業による研究例は多い[51, 52]。

血液中に存在する可溶性抗原を標的とする抗体を投与した場合、抗原に結合した抗体は FcRn を介したリサイクリング経路で血中に戻ってくるが、抗原結合したままである。また、細胞表面の膜型抗原を標的とする抗体を投与した場合、細胞内に取り込まれた後、リソソーム経路を辿って分解されてしまう場合がある。よって、細胞での発現量が多い抗原を標的とするアンタゴニスト抗体を投与する場合にも抗体医薬の血中滞留性に限界がある。CDR 中にヒスチジン残基を導入し、pH 依存的な抗原乖離によってリソソーム分解経路を回避することで投与量や投与頻度を低減するリサイクリング技術が抗体医薬に応用されている[53, 54]。製剤に関連する技術としては、真皮中のヒアルロン酸を分解するヒアルロニダーゼと抗体を共投与することで、ヒアルロン酸との非特異結合回避と投与スペースの確保により徐放性を付与し、投与頻度を低減する製剤技術も開発されている[55]。以上の取組みは、熾烈な開発競争の中で製品の付加価値を高める為、LCM (Life cycle management) の一環とした取組みとしても重要視され、活発に研究されている。

課題 3：コスト低減

近年、バイオ医薬品を取り巻く環境は大きく変化しており、開発競争の激化、薬価の毎年改定、医療費の抑制圧力など厳しさを増している。2014 年に発売された「オプシーボ」は費用対効果を含めた度重なる薬価改定により、2019 年の時点では承認当初より 1/4 以下となっている。また 2019 年に CAR-T 細胞療法「キムリア」が承認され、1 回 5000 万円の治療費について公的医療保険としてどのように使うべきか議論になっている[56]。このような流れの中で、分子標的薬は確実に効く患者を提示し使用してもらう個別化医療が進展してくる

ものと思われる。抗体医薬に対しては更なるコスト低減が求められ、先行品と同等の薬効を有するバイオシミラーの開発や少量多品目の開発に対応した連続生産技術への期待を後押しするものとなっている。

バイオ後発品は、先行品と同一のアミノ酸配列だが生産細胞や製造プロセスの異なるバイオ医薬であり、特許満了とともに承認数は増加傾向にある。結果として、抗体の糖鎖プロファイルや電荷異性体等において同一でなく、これら品質の類似性を出来るだけ担保する必要がある。先行品との品質に差異がある場合、有効性や安全性への影響を考察する必要がある。低分子医薬品のジェネリックとは対照的で、全く同一の品質を有するものではないが、非臨床試験や臨床試験の簡略化、他の疾患への適応拡大が期待できることから新薬開発よりも研究開発費用を抑えることが可能となる。企業間のバイオ後発品開発の競争からも、更なる薬価低減が期待されている。その一方、宿主・ベクター系や生産プロセスについては改善の余地があることから、他社との差別化において生産技術は重要な位置を占める。加えて、先行品との品質比較試験においては、高いレベルでの分析技術を要し、総じて CMC がバイオシミラー開発の成否を分けると言われている。2005 年以降、欧州医薬品庁 EMA (European Medicine Agency) がバイオ後発品に関する規制を整備し、その後インド、韓国、米国でも開発が進められている。米国 FDA での承認数は 2015 年以降急速に増加し 15 品目が承認され、その後も拡大するものと思われる(図 1-13.)[57]。本邦においては、2009 年にバイオ後発品ガイドラインが発信されてから 10 年ほど経過し、抗体医薬 12 品目が承認されている (表 1-7.)。日本は薬剤費本体の伸びが医療費本体の伸びを上回る数少ない先進国であり、デンマークやノルウェーは既に入札方式を導入していることから、生産技術向上と伴にバイオ後発品の使用促進の政策は強化されていく可能性がある。

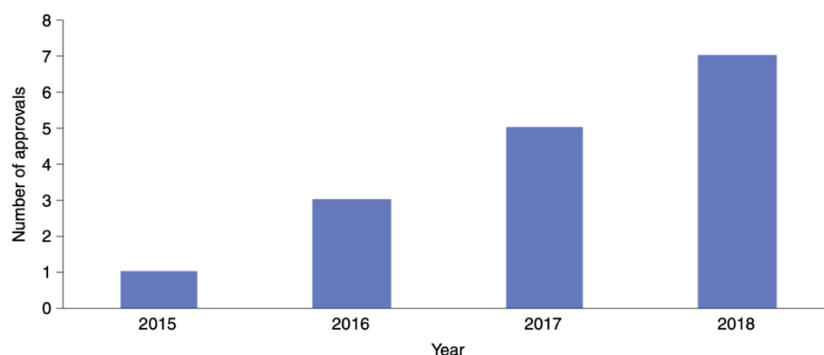


Fig. 4 | Biosimilar approvals in the US. Biosimilars are establishing themselves in the US, with annual increases in the numbers of approvals.

図 1-13.米国におけるバイオ後発品の承認数 (文献[57] より引用)

表 1-7. 日本で認可されたバイオ後発品 (国立医薬品衛生研究所 HP より引用)

日本で承認されたバイオ後続品			
2019年10月21日 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部			
先行バイオ医薬品	一般名	商品名	承認年
ジェネトロビン	ソマトロピン	ソマトロピンBS皮下注「サンド」	2009
ランタス	インスリン グラルギン [インスリン グラルギン後続1]	インスリン グラルギンBS注「リリー」	2014
	インスリン グラルギン [インスリン グラルギン後続2]	インスリン グラルギンBS注「FFP」	2016
グラン	フィルグラスチム [フィルグラスチム後続1]	フィルグラスチムBS注「モチダ」, 「F」	2012
	フィルグラスチム [フィルグラスチム後続2]	フィルグラスチムBS注「NK」, 「テバ」	2013
	フィルグラスチム [フィルグラスチム後続3]	フィルグラスチムBS注「サンド」	2014
フォルテオ	テリパラチド [テリパラチド後続1]	テリパラチドBS皮下注「モチダ」	2019
エスポー	エボエチン カッパ [エボエチン アルファ後続1]	エボエチン アルファBS注「JCR」	2010
ネスブ	ダルベボエチン アルファ [ダルベボエチン アルファ後続1]	ダルベボエチン アルファBS注「JCR」	2019
	ダルベボエチン アルファ [ダルベボエチン アルファ後続2]	ダルベボエチン アルファBS注「三和」	2019
	ダルベボエチン アルファ [ダルベボエチン アルファ後続3]	ダルベボエチン アルファBS注射液「MYL」	2019
ファブラザイム	アガルスダーゼ ベータ [アガルスダーゼ ベータ後続1]	アガルスダーゼ ベータBS点滴静注「JCR」	2018
レミケード	インフリキシマブ [インフリキシマブ後続1]	インフリキシマブBS点滴静注「NK」, 「CTH」	2014
	インフリキシマブ [インフリキシマブ後続2]	インフリキシマブBS点滴静注「あゆみ」, 「日医工」	2017
	インフリキシマブ [インフリキシマブ後続3]	インフリキシマブBS点滴静注「ファイザー」	2018
リツキサン	リツキシマブ [リツキシマブ後続1]	リツキシマブBS点滴静注「KHK」	2017
	リツキシマブ [リツキシマブ後続2]	リツキシマブBS点滴静注「ファイザー」	2019
ハーセプチン	トラスツズマブ [トラスツズマブ後続1]	トラスツズマブBS点滴静注「NK」, 「CTH」	2018
	トラスツズマブ [トラスツズマブ後続2]	トラスツズマブBS点滴静注「第一三共」	2018
	トラスツズマブ [トラスツズマブ後続3]	トラスツズマブBS点滴静注「ファイザー」	2018
アバステン	ペバシズマブ [ペバシズマブ後続1]	ペバシズマブBS点滴静注「ファイザー」	2019
	ペバシズマブ [ペバシズマブ後続2]	ペバシズマブBS点滴静注「第一三共」	2019
エンブレル	エタネルセプト [エタネルセプト後続1]	エタネルセプトBS皮下注, 皮下注用「MA」	2018
	エタネルセプト [エタネルセプト後続2]	エタネルセプトBS皮下注「TY」, 「日医工」	2019

日本医薬品一般名称の(遺伝子組換え)は省略して表記

連続生産は製造中に連続的な原料供給と同時に生産物も連続的に取り出すことが可能な生産方法で、バイオ医薬品生産に革新をもたらすことが期待されている次世代バイオプロセスである。プロセスの長期稼働と品質の担保が鍵であり、特に低分子医薬において RTRT (Real-time release testing) を含めた API (Active pharmaceutical ingredient) 原薬生産の有用性が見出されつつある[58]。低分子医薬品における試算によると、機器や設備の支出や溶媒使用量を削減するとともに、収率向上が期待された。また、バッチ毎の管理工程を必要としない、スケールアップを必要としない等の利点も有する。バイオ医薬における連続製造技術は上流と下流に分かれ、上流は小さな培養槽でも大量生産が可能なパーフュージョン (灌流) 培養システム活用と培地開発(図 1-14.)、下流は複数のカラムを同時に実行する連続法を支援する PCC (Periodic counter-current) 精製システムの活用が検討されている (図 1-15.) [59]。連続生産自体は古くから提唱されている培養技術であり[60, 61]、既にバイオ医薬生産において導入している製薬会社も存在する (図 1-16. Example1)。近年になって、Konstantin らがバイオ医薬生産への実装に関する White paper を発信後、製薬会社やベンダーを巻き込んだ生産研究として活発化している[62]。特に精製工程の連続化 (図 1-16. Example2) や高生産プロセスに対応した ProteinA アフィニティー精製の連続化 (図 1-16. Example3) は、既存の手法と連続プロセスを組み合わせた Hybrid approach と呼ばれ、ベンターを中心として技術開発が盛んとなっている。最終的に、RTRT を含めた理想とする連続生産システムは、小量多品種のバイオ医薬を可能にする次世代生産プロセスとして提唱されている(図 1-16. Example4)。規制面としては、独立法人医薬品医療機器総合機構 (PMDA) がワーキンググループを立ち上げ、医薬品規制調和会議においても ICH Q13 ガイドラインにて連続生産の導入をサポートする動きがある。今後は、規制動向を把

握しつつ競争優位性を確保するためにバイオ医薬品の連続生産に関する研究を進める必要がある。

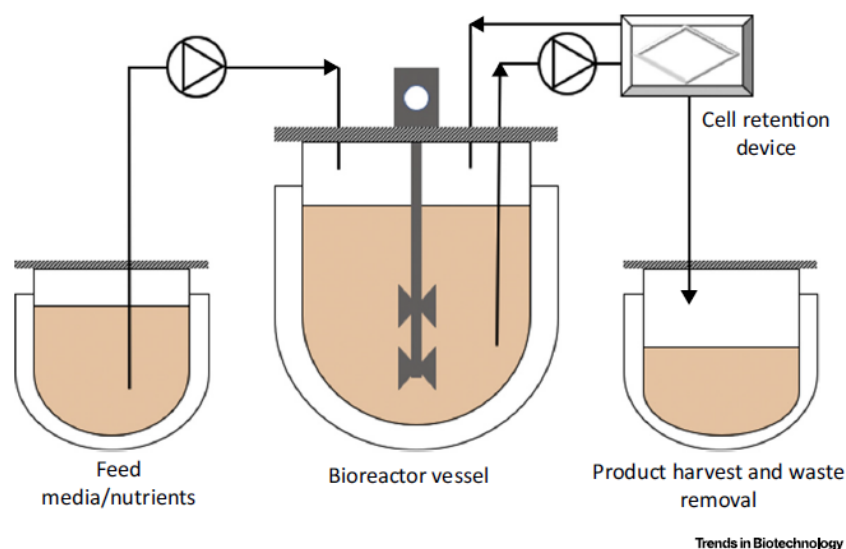


Figure 1. **Perfusion Setup.** In perfusion bioreactor processes, a pump adds media containing nutrients into the bioreactor while another pump flows a mixture of cells and spent media from the bioreactor through a cell retention device. The retention device separates the cells from spent media. The spent media are harvested while the cells are returned to the bioreactor.

図 1-14. パーフュージョン (灌流) 培養システム (文献[59]より引用)

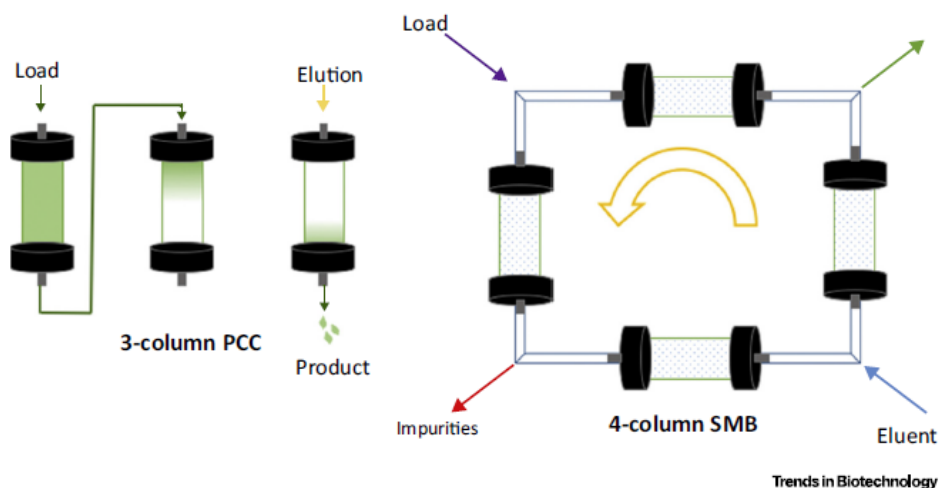
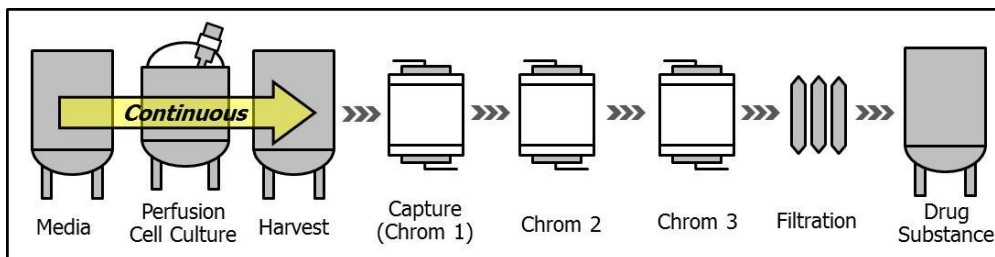
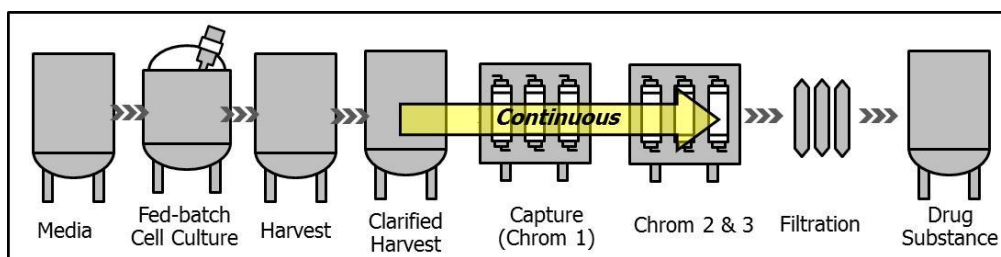


Figure 3. **PCC and SMB Chromatography.** Two important continuous chromatography processes gaining steam are the three-column PCC and SMB. In PCC, flow-through from a column is reloaded into subsequent columns to improve process yield. However, each column still undergoes the load-wash-elute-equilibrate cycle. In SMB, the inlet to each column is periodically 'moved', permitting continuous loading, elution, and harvesting, and resulting in lower buffer and resin use. PCC, periodic countercurrent chromatography; SMB, simulated moving bed.

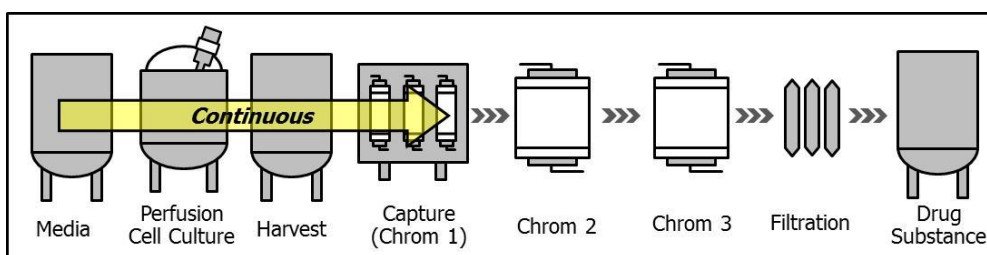
図 1-15. PCC (Priodic counter-current) 精製システム (文献[59]より引用)



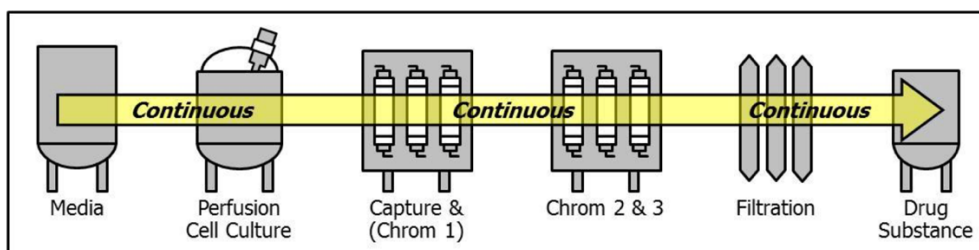
Example 1: Continuous upstream (perfusion), batch downstream



Example 2: Batch upstream, continuous downstream



Example 3: Continuous upstream + capture, batch downstream



Example 4: Continuous upstream and downstream

図 1-16. バイオ医薬における連続生産方式のコンセプト (文献[62]より引用)

1-2 論文の意義と目的

本論文の意義

抗体医薬は現在では最も注目されている医薬品の一つとして大きな市場を形成しているが、いまだ有効な治療方法がない疾患を含め医療ニーズは数多く存在する。このアンメットメディカルニーズに応え、世界中の人々の健康と笑顔に貢献するためには、これまで以上に病態を理解する研究と創薬を支える技術の構築が必要不可欠である。抗体医薬の創製においては、抗体作製・抗体生産・品質物性・作用機序解析等、多岐にわたる基盤技術が存在する。それらの科学技術は総じて創薬基盤技術と呼ばれ、開発開発によって得られた新たな知見は、革新的な医薬品の創出という形として新たな価値を生み出すことが期待される。

抗体医薬品は遺伝子組換え技術の登場により発展したバイオ医薬品の一つであり、全長抗体や抗原結合断片等の分子形態に応じて動物細胞や微生物を選択し、異種となるヒト抗体等を組換え発現させることで医薬品の候補となる有用物質が得られる。よって、タンパク質発現系は創薬基盤技術の中核に位置するとともに、その改良は生産基盤だけでなく、抗体以外のタンパク質分子創製への展開についても期待できる。本論文においては、様々な技術シーズから上記の背景や先行研究を踏まえてバイオエンジニアリング分野の問題を整理し、抗体生産強化を目指したシグナルペプチド研究及び難発現性のFc受容体調製と抗体との結合評価系構築に関する研究について課題設定し、研究を開始した(図 1-17.)。

本論文の研究成果として得られた知見は創薬基盤技術として実装され、抗体医薬開発の効率化につながることを期待する。

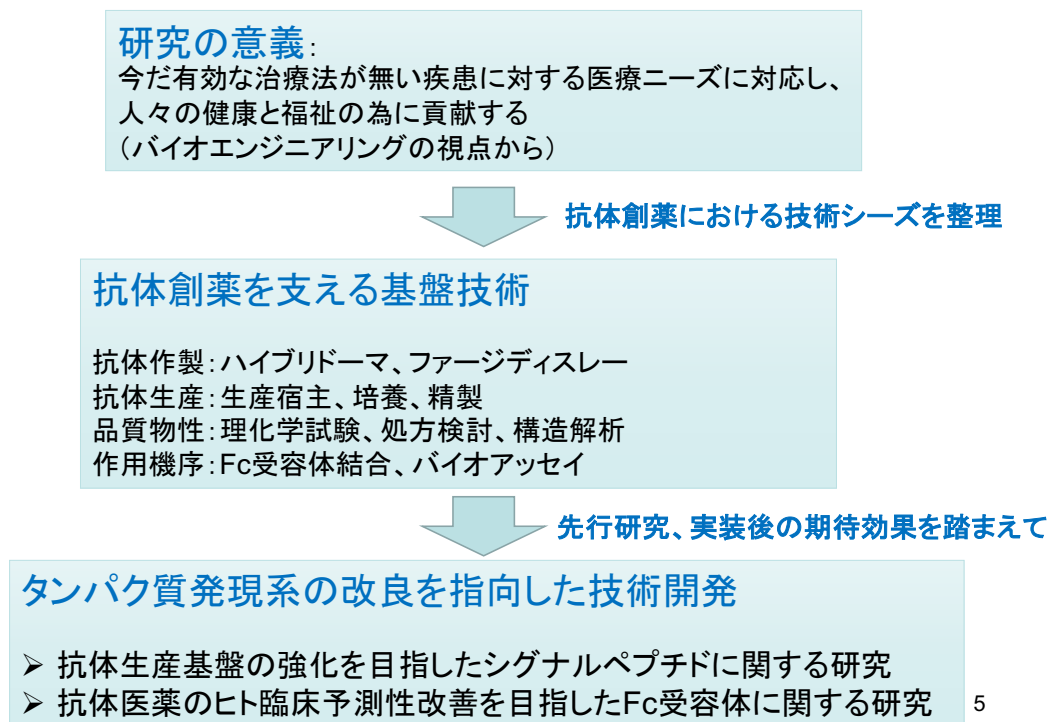


図 1-17. 本論文における研究課題の設定

本論文の目的

抗体生産基盤強化を目指したシグナルペプチドに関する研究

抗体医薬は遺伝子組み換え技術をベースとしており、近年の創薬プロセスにおいても CHO 細胞又は大腸菌を宿主とした個別の発現システム改良が進み、抗体選抜及び評価に必要とするレベルでの抗体分子の取得は十分量かつ迅速に実施可能となっている。近年では、高付加価値型の抗体創製を目指し、ヒト抗体や次世代抗体の作製の需要に伴って抗体選抜にファージディスプレイを活用することも多い。このような抗体選抜工程においては、CHO 細胞と大腸菌の双方を活用する場合もあり、発現システムの設計は宿主を考慮して個別に実施しなければならない。特に、シグナルペプチドはタンパク質の発現量に関わる重要な発現システムの構成要素であるにも関わらず、宿主の種選択性を考慮しなければならないのが現状である。

工業用細胞という観点で、大腸菌は安価な培地で生育する、速い倍化時間、育種が比較的容易といった利点を有し、医薬品の分野ではかつてはインシュリンや G-CSF 等の単純タンパク生産に活用されてきた。近年では、Fab や低分子抗体等の研究利用で大腸菌を宿主とするタンパク質発現への利用が進み、バイオフィック抗体やバイオシミラーでの生産宿主への活用として見直されている[10, 63]。そのような場合においても、大腸菌で機能するシグナルペプチドの研究は重要な生産技術と言える。

以上の背景から、本論文第二章では上記の抗体生産基盤の強化を目的として、アミノ酸残基の改変により CHO 細胞と大腸菌の双方で発現機能するシグナルペプチド創出や発現増強の方法論について検討した。

抗体医薬のヒト臨床予測性の改善を目指した Fc 受容体に関する研究

抗体医薬は標的分子に対する高い選択性と少ない副作用が謳われているものの、新しい標的を狙った新薬をヒトで初めて試験する際には十分に薬効や毒性を評価することが重要である。製薬企業は非臨床の動物実験で副作用を示さない無毒性量 (NOAEL: No Observed Adverse Effect Level) をもとにヒト等価用量を算出する方法、又は推定最小薬理作用量 (MABEL: Minimal Anticipated Biological Effect) を用いて算出し、ヒト初回試験を開始する (ICH-S6)。しかしながら、発現量や発現プロファイル等の種差の問題により、必ずしも非臨床試験から薬効や安全性に関する十分な情報が得られないこともある。ヒト臨床予測性を改善するには、適切な動物評価に加えて抗体医薬の場合は Fc 受容体への結合を精査することが重要である。

Fc 受容体は抗体 Fc 部位に対する受容体タンパク質であり、細胞表面に存在する。IgG の Fc 受容体である FcγR 群は細胞シグナルや免疫複合体の除去等の機能を担う。アレルギー、炎症、自己免疫、がん免疫における FcγR 群の関連が追究され、免疫応答の重要な調節システムを形成していることが明らかになりつつある。創薬研究の過程においては、Fc 受容体タンパク質又は強制発現細胞との結合評価に加え、ADCC 評価等の Fc 受容体が関与するバイオアッセイを活用することで開発候補抗体の評価の為に実施されている。

ハムスターはマウスよりウイルス感受性が高いことや、ハムスター間で飛沫伝播することから、近年ではインフルエンザウイルスを始めとする伝播の動物モデルとしての利用が盛んとなっている[64]。ハムスターFcγRIVはヒト FcγRIIIa のオーソログであり、抗体 Fc 機能をハムスターで薬理評価する際に重要な分子であるが、当受容体を可溶性タンパク質として取得した報告例はみあ

たらない。更にハムスターFcγRIVとヒト抗体Fcとの結合解析並びにADCC活性増強型であるフコース非修飾抗体との解析については検証例がない。上述のように、フコース非修飾抗体は3剤が上市され、抗ウイルス薬としての抗体医薬の期待の高まりと共にADCC活性等の薬効増強作用に注目が集まっている。

以上より、本論文第三章では抗体医薬のヒト臨床予測性の改善を目的として、ハムスターFc受容体について、細胞外ドメインタンパク質の調製と結合評価系の構築について検討し、抗体のフコース修飾の有無による影響を評価した。

第二章

抗体生産基盤強化を目指したシグナル ペプチドに関する研究

第二章 抗体生産基盤強化を目指したシグナルペプチドに関する研究

2-1 要旨

シグナルペプチドは分泌タンパク質の N 末端側に位置する約 20 残基程度の短いペプチド断片で、生体内においてタンパク質の局在や輸送等重要な役割を担い、医薬品開発においては抗体を含む遺伝子組換えタンパク質の合成における要素技術の一つである。一次配列上の特徴として 3 つのドメインを有し、N 末端の塩基性領域 (n-region)、中央に位置する疎水的アミノ酸が集中する疎水コア領域 (h-region)、シグナルペプチダーゼによる切断反応の生じる C 末端の領域 (c-region) に分類される。これまで数多くの様々なシグナルペプチドが同定されてきたものの、それらの特徴がどのようにタンパク質の分泌発現効率に影響を与えるのかという事について十分に理解されていない。ヒトやマウス抗体由来のシグナルペプチドは、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を始めとする真核細胞を宿主として遺伝子組換えタンパク合成において良く利用される。その一方で、ファージディスプレイやマウス抗体のヒト化、組換えタンパク質の生産等、抗体医薬における様々な創製プロセスにおいて、真核生物である大腸菌 (*Escherichia coli*) が用いられる場合も多く、各々の発現系にあわせてシグナルペプチドを個別に選択しているのが現状である。以上の背景より、抗体医薬の生産基盤においてシグナルペプチドの種選択性を改善することを目的に、真核生物の CHO 細胞と原核生物の大腸菌の双方で抗体分子の分泌発現に機能しうるシグナルペプチドの創出を試みた。本研究では、シグナルペプチドの c-region の特にアラニンの重要性に着目し、CHO 細胞と大腸菌の双方で抗 HER2 抗体関連分子を発現させ、HER2 抗

原への結合活性を保持するシグナルペプチド創出に成功した。まず始めに、大腸菌発現において機能しうるシグナルペプチドの配列情報から、分泌機能に重要な配列の法則性について仮説を立て、アラニンの重要性に着目した。今回、あるマウス抗体軽鎖由来を題材に c-region 中にある 2 箇所のセリンをアラニンに改変することで、劇的に抗 HER2 抗体の抗原結合断片 (antigen binding fragment: Fab) の大腸菌発現を増強できることを確認した。加えて、当該シグナルペプチドを抗 HER2 全長抗体の CHO 細胞発現においても活用したところ、改変前と同様に分泌発現の機能を保持していることを確認した。結果として、原核生物である大腸菌と真核生物である CHO 細胞の双方で結合活性を有する抗体分子の発現を可能にするシグナルペプチド創出を達成した。これらの知見により、生体内におけるシグナルペプチドの更なる理解に加え、抗体医薬研究の強化や加速化に貢献することを期待する。

2-2. 緒言

抗体医薬はがんやアレルギー疾患等、これまで十分な効果が得られない治療効果に対する医療ニーズに対する治療薬として開発されている。Fab は抗体の抗原結合ドメインであり、近年になって治療用タンパク質として開発が進められている抗体関連分子フォーマットのの一つである[65]。タンパク質の発現効率は、主に抗体医薬や Fab を含む抗体関連分子の生産改善などを目的とする研究開発において重要な研究対象の一つである。抗体創薬において、タンパク質発現の宿主は原核生物も真核生物も双方の特徴を活かして利用されている。例えば、ファージディスプレイにおける大腸菌を基盤とした抗体クローン選択を始めとして[66]、開発候補となるリード抗体としてマウス抗体のヒト化 Fab クローンを迅速

に作製する際に大腸菌は使用されている[67]。従来、大腸菌は合理的かつ経済的な物質生産プロセスの宿主として最も広く活用されている原核細胞であり[68]、アミノ酸発酵生産に留まらず、インシュリンや成長因子、G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) をはじめとしてヒト医療用タンパク質の生産にも成功している[3, 69, 70]。一方で、CHO 細胞は組み換えタンパク質の中でも、翻訳後修飾である糖鎖付加を必要とするエリスロポエチンを始めとする生理活性物質や数多くのモノクローナル抗体の医薬品生産の宿主として利用されている[71, 72]。

遺伝子組換えタンパク質を分泌タンパク質として取得する場合、その N 末端には 15-30 程度のアミノ酸残基で構成されるシグナルペプチドが連結されている[73]。シグナルペプチドは原核生物や真核生物を問わず、分泌経路を辿る産生タンパク質の全ての局在や移行を制御している[74]。様々なシグナルペプチドの配列が抽出され、アミノ酸の特徴から塩基性アミノ酸残基を有する n-region、続いて疎水性アミノ残基を有する h-region、最後に中性で非極性アミノ酸残基を有する c-region の 3 つのドメインに分類される[75] (図 2-1.)。

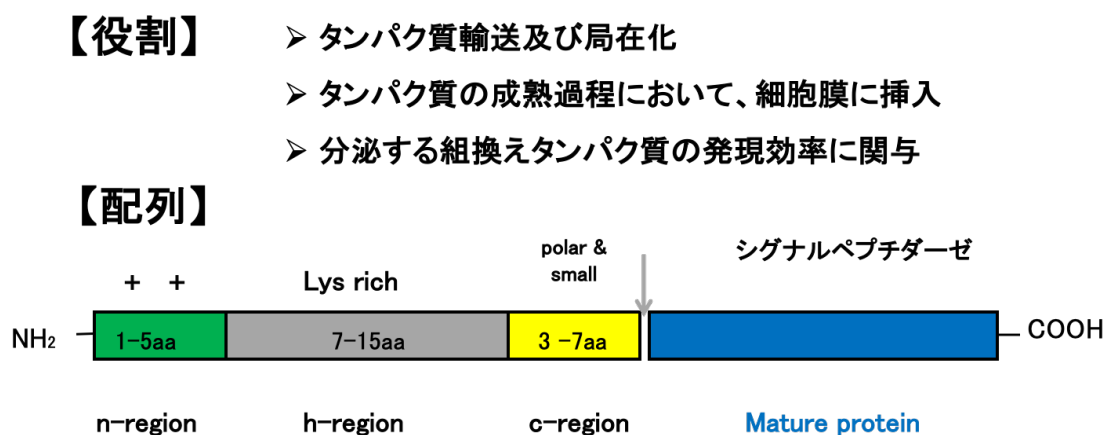


図 2-1. シグナルペプチドの役割と配列

シグナルペプチドはタンパク質が細胞膜を通過後にシグナルペプチダーゼによって切断され、それ自体は分泌タンパク質中に残存しない。シグナルペプチダーゼの切断部位や切断反応は、当部位から N 末端方向に数えた 3 番目 (-3 番目) 及び 1 番目 (-1 番目) に位置するアミノ酸残基で規定される事が多い。菌由来のシグナルペプチダーゼ I (Lep) との効率的な切断反応には、-3 及び -1 番目におけるアミノ酸残基は中性で比較的分子量の低いグリシン (Gly) やセリン (Ser)、アラニン (Ala) であることが好ましい[76-78]。シグナルペプチダーゼ I と II との反応性を比較したシグナルペプチド研究によると、-3 及び -1 番目の含む c-region 中のアミノ酸配列が高度に保存される事は、シグナルペプチダーゼの基質特異性に関連性があることが示されている。例えば、c-region においてロイシン (Leu) – アラニン (Ala) – グリシン又はアラニン (Gly, Ala) を有し、システイン (Cys) がそれに続く配列を有するシグナルペプチドは、シグナルペプチダーゼ II (Lsp) との特異的反応が同定されている[79]。長さに関しては、真核生物由来のシグナルペプチドは原核生物のうちグラム陰性細菌由来のものと比較すると、各ドメイン (n-, h-, c-regions) において僅かに短い傾向にある。また、グラム陰性細菌由来のシグナルペプチドはグラム陽性細菌のシグナルペプチドと比較して更に短いドメインを有する[80]。上記の様にドメイン内での特性や配列相同性に関する知見があるものの、効率的な分泌タンパク質取得を目的として宿主の種を越えて由来が異なるシグナルペプチド活用を試みると、かえって分泌効率が悪く低発現の結果となる場合が多い。数多くのシグナルペプチドが同定され配列比較されているにも関わらず、宿主の種を越えたシグナルペプチド活用が進まない背景として、先行研究は細菌や酵母を対象にしたものが殆どであることも要因の一つである。個別の研究例としてヒトの癌細胞株 MDA-MB-435 を用いた例はあり、ヒト IL-2 のシグナルペプチドを題材として、改変による配列特性とエン

ドスタチン及びアルカリホスファターゼの分泌効率との関連性が精査されている[81]。当研究ではヒト由来シグナルペプチドとそれを基質とするヒト由来シグナルペプチダーゼの切断反応に **h-region** におけるアミノ酸の塩基性及び疎水性が重要であることを示している。

宿主の種を越えたシグナルペプチドの応用検証については、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を宿主としたコメ由来 α アミラーゼの発現やバキュロウイルス発現システムにおいてグラム陽性細菌である *Staphylococcal protein A* 由来シグナルペプチドを用いてヒト **CD23** の発現研究した例等、個別には検討が実施されている[82, 83]。しかしながら、抗体発現に多用される大腸菌において、特に哺乳動物由来のシグナルペプチドが種を越えて機能しうるかについては殆ど理解されておらず、抗体発現検討に時間を要する要因となっている。その一方で、前述のように大腸菌発現システムは抗体医薬の創薬研究プロセスのあらゆる場面で大いに活用されており、シグナルペプチドの宿主の種選択性の課題解決に向けた研究が進めば大腸菌やCHO細胞を宿主とすることが多いバイオ医薬の生産技術としての活用も期待される (図 2-2.)。

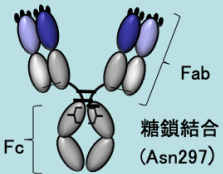

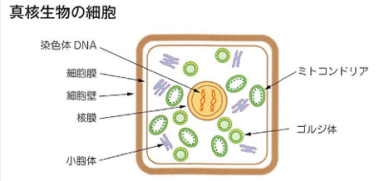
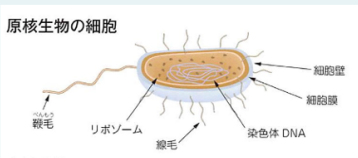
目的生産物質	全長抗体 (IgG)	抗原結合断片 (Fab)
		
分子量	約150000	約50000
糖鎖	あり	なし
宿主	CHO細胞 (真核生物)  <small>講談社サイエンティフィック「Q & Aで学ぶやさしい微生物学」より引用</small>	E. coli. (原核生物)  <small>誠文堂新光社「図解でよくわかる 発酵のきほん」より引用</small>

図 2-3. 抗体分子に対応した宿主の利用

以上の背景より、これまで抗体研究を進めてきた中で、あらゆる大腸菌由来や哺乳動物由来のシグナルペプチドを大腸菌での Fab 生産と同時に CHO 細胞での IgG 生産に試してきたものの、宿主を越えて互換的に活用できるシグナルペプチド取得には至らなかった。c-region における-3 番目と-1 番目のアミノ酸残基の重要性については、先行研究において大腸菌由来シグナルナルペプチダーゼIの認識と切断に重要であることが報告されている[84]。特に、-1 番目のアミノ酸については、グリシン (Gly) やセリン (Ser)、アラニン (Ala) の様な小さい側鎖を有する分子が効率的なタンパク質の分泌に重要である。本研究においては、まずはシグナルペプチドの-1 番目から-3 番目にセリン (Ser) が連続するマウス抗体軽鎖由来のシグナルペプチドを用いて抗体発現における種を越えた互換性の可能性について検証した。Fab 発現ベクターに当シグナルペプチドを連結させ、大腸菌にて発現させたにもかかわらず、実際には Fab 発現は確認されなかった。次に、-3 番目と-1 番目のセリンをアラニンに置換して同じく大腸菌にて発現させ

たところ、Fab 発現が劇的に向上する結果となった。更に、この改変したシグナルペプチドは CHO 細胞における IgG 発現においても機能を保持し、抗原結合を有する IgG 抗体調製での利用にも可能であることを確認した。詳細な結果は後述するが、原核生物である大腸菌と真核生物である CHO 細胞の種を越えて、抗体発現を目的に相互利用可能なシグナルペプチド取得に成功したと言える。

2-3. 実験材料と方法

シグナルペプチドの取得と配列設計

大腸菌で機能することが報告されている各種シグナルペプチドを抽出し、疎水性アミノ酸や C 末端配列を比較した。これら既知配列にはある程度類似性があるものの、決定的要素は見当たらない。本研究では、C 末端側から数えた 1 番目 (-1 番目) 及び 3 番目 (-3 番目) の c-region に位置するアラニンに着目した (表 2-1)。別の抗体研究におけるマウス抗体取得を通じて、抗体軽鎖由来に c-region にセリンが連続するシグナルペプチドを取得した。当シグナルペプチドを題材にセリンをアラニンに改変することによる影響を、下記発現ベクターを用いて CHO 細胞と大腸菌にて確認した。

表 2-1. 大腸菌で機能する各種シグナルペプチド及び本試験で使した配列

名称	配列	C 末端
大腸菌として機能するシグナルペプチド		
OmpA	MKKTAIAIAVALAGFATVAQA	AQA
Alkali Phosphatase	MKQSTIALALLPLETEPVTKA	TKA
yBGL1	MRFSTTLATAATALFFTASQVSA	VSA
mBip	MMKFVTVVAAALLLLGAVRA	VRA
M13 bacteriophage	MKKSLVLKASVAVATLVPMLSFA	SFA
PelB	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	AMA
マウス抗体軽鎖由来シグナルペプチド		
a native mouse antibody	MKLPVRLLVLMFWIPASSS	SSS
Ala at position -3	MKLPVRLLVLMFWIPAASS	ASS
Ala at position -1	MKLPVRLLVLMFWIPASSA	SSA
Ala at positions -3 and -1	MKLPVRLLVLMFWIPAASA	ASA

各種発現ベクターの構築

抗 HER2 ヒト化抗体 (4D5、Herceptin) の Fab 領域の遺伝子配列を発現宿主に
 応じてコドン最適化して DNA 合成し、シグナルペプチドを付加して各々の発
 現ベクターに挿入した[85]。シグナルペプチドを含む抗 HER2Fab の可変領域を
 L 鎖、H 鎖の順番で連結して pFLAG (Sigma Aldrich) をベースとした発現ベク
 ターに挿入した (図 2-4.)。pFLAG は Tac プロモーターを有しており、IPTG に
 よる強制発現誘導が可能である。本コンストラクトは基礎検討をベースに最適
 化したもので、軽鎖と重鎖のそれぞれがプロモーターによってポリペプチドを発
 現させるモノシストロニックな発現系である。調製したプラスミドベクターは
 大腸菌 W3110 株にヒートショック法によって挿入し、形質転換した。

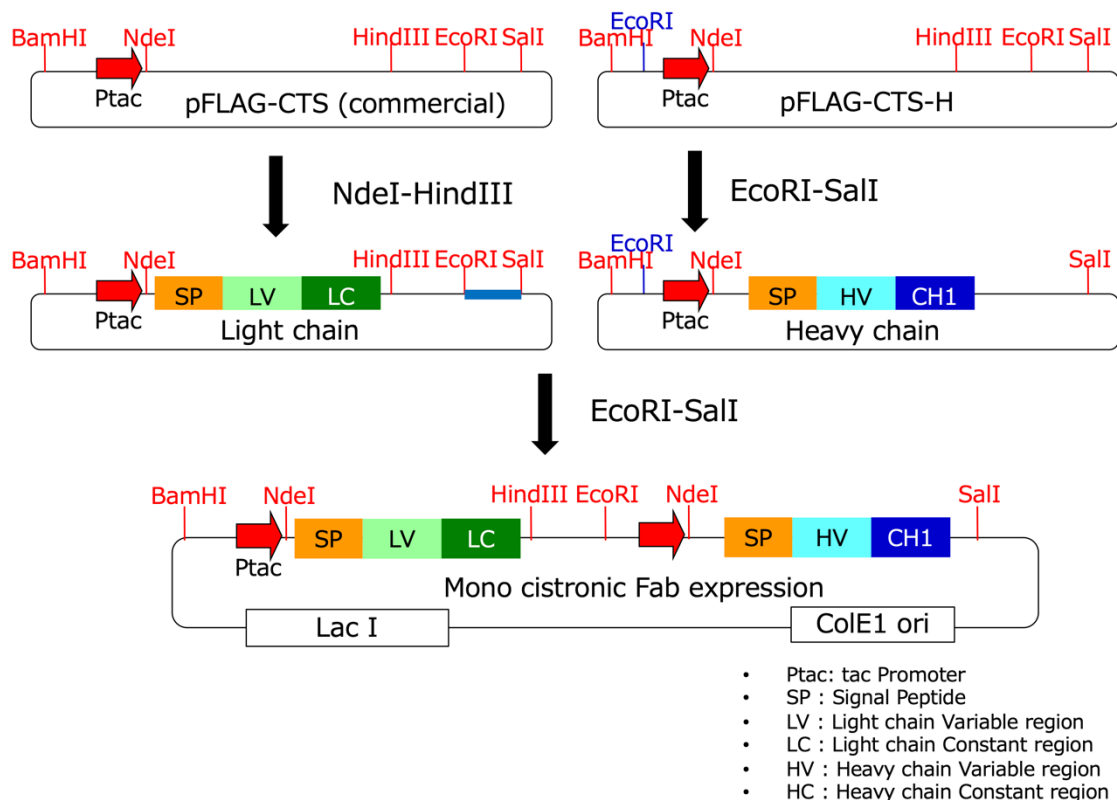


図 2-4. Fab 発現ベクターの調製法と構成

大腸菌を宿主とした Fab 発現には、一つのプロモーターから一つのポリペプチドを発現するモノシストロニックな発現システムを採用。

CHO 細胞を宿主とする場合、抗 HER2 ヒト化 IgG 抗体の発現ベクターを pKANTEX93 ベクターに挿入して作製した。CHO-DG44 細胞株は、各種動物細胞のうち、発現レベルが高い構成的要素が含まれる (表 2-2.)。プラスミドベクターはエレクトロポレーションによって導入し、G418 ニ硫酸塩溶液 (Nacalai) とメトトレキセート (MTX) (Sigma Aldrich) の薬剤耐性により抗体産生株を取得した。当細胞株は接着細胞で、エレクトロポレーション後の細胞は IMDM 培地 (Gibco) に 10% FBS と PenStrep (Gibco) を加えた培地で T フラスコを用いて培養後、十分にフラスコ底面に接着していることを確認した。ヒト

HER2 細胞外ドメインに His タグを付加した可溶性タンパクを発現させるため、コードする遺伝子をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) にて生成し、pKANTEX93 ベクターに導入した。このベクターをラットハイブリドーマ細胞株 YB2/0 に導入し、G418 薬物耐性クローンを取得した。HER2 タンパク質を取得する為、培養上清を 0.5 mL の TALON レジン(Clontech) に添加し精製した。

表.2-2 種々の動物遺伝子の導入・発現系の発現レベルと用途

(Takara 「ラボマニュアル 動物細胞の遺伝子工学」より引用)

細胞株	DNA の導入法	最適な発現レベル ($\mu\text{g/ml}$)	主な用途
サル細胞/ヒト細胞			
CV-1	SV ウイルス感染	1~10	野生型蛋白質および変異蛋白質の発現
CV-1/293	アデノウイルス感染	1~10	
COS	DEAE-デキストラン法による一過性 トランスフェクション	1	哺乳動物細胞における発現 クローニング； cDNA クローンの迅速な同定； 変異蛋白質の発現
CV-1	DEAE-デキストラン法による一過性 トランスフェクション	0.05	
マウス線維芽細胞			
MOP	DEAE-デキストラン法による一過性 トランスフェクション	—	cDNA クローンの迅速な同定； 変異蛋白質の発現
C127	BPV 安定トランスフォーマント	1~5	高レベルの構成的発現
3T3	レトロウイルス感染	0.1~0.5	動物への遺伝子導入； 異なる細胞型での発現
CHO-DHFR	安定 DHFR+トランスフォーマント MTX による増幅	0.01~0.05 10	高レベルの構成的発現
霊長類/齧歯類			
	ワクシニアウイルス	1	ワクチン
	EBVベクター	—	発現クローニング
ニューロン			
	HSVベクター	—	遺伝子導入

出典：Kaufman, *Methods Enzymol.*, Vol. 185, Table 1, p.509. Copyright © 1990 by Academic Press, Inc. より引用。

大腸菌による Fab 生産

調製した発現ベクターを大腸菌 W3110 株に形質転換後、アンピシリンを含む LB (Luria-Bertani) プレート及び LB 培地を用いて 37°C インキュベートし、数 mL の培養液を取得した。これを前培養液として、MOPS による緩衝作用を持つ Super Broth 培地 (1L 当たり 35g Tryptone, 20g Yeast Extract, 5g NaCl, 10g MOPS) 200mL に播種し、1L 三角フラスコによって回転数を 180rpm、培養温度を 37°C として、旋回培養を開始した。600nm での吸光度を菌体濁度 (OD) として、OD (600nm) が 2.0 に達したところで、培養温度を 20°C に、回転数を 100rpm に設定し、0.1mmol/L となるようにイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加後、培養を一晩継続した。遠心分離によって培養液から集菌後、菌体のペレットを B-PER extraction reagent (Thermo Scientific) を添加し、遠心分離 (4500 \times g, 20 min.) 後の上清を取得することでペリプラズム画分を回収した。孔径 0.22- μ m のフィルトレーション処理後、TALON レジン (Clontech) に添加し、目的の Fab タンパク質を精製した。当精製のバッファーは His Buffer Kit (GE Healthcare) を用いた。

可溶性 Fab タンパク質の定量

培養液から得られた Fab タンパク質の取得量はサンドイッチ ELISA によって測定された。平底の 96-well プレートに炭酸重炭酸緩衝液で 1000 倍に希釈した anti-human IgG F(ab)'2 fragment (Jackson Immuno Research) 100 μ l を添加してコートした。Super blocking buffer in PBS (Thermo scientific) で非特異結合を防ぐためにブロッキング後、精製した Fab タンパク溶液をプレートの各ウェルに添加して 1 時間、室温でインキュベートした。0.05% Tween 20 を含む PBS で洗浄後、

固相化抗体に結合した Fab タンパク質を HRP-labeled goat anti-human kappa antibody (Southern Biotech) と TMB 試薬 (Wako) との反応で検出した。発色反応を 0.5 mmol/L 硫酸 (Wako) で停止後、Sunrise plate reader (Tecan) を用いて 450nm / 595nm の吸光度を測定した。得られた値に PBS のみでの測定値をレファレンスとして差し引き、検量線から Fab タンパク質の取得量を計算した。

CHO 細胞による IgG 生産

Gene Pulser II (Bio-rad) を用いたエレクトロポレーションによる遺伝子導入後、RPMI 培地 (Gibco) に 10% FBS と 0.5% Penicillin Streptomycin (PenStrep) (Gibco) を加えた培地をベースに、G418 薬剤耐性による培養を継続し、十分に細胞が得られたところでメトトレキセートを添加した。dhfr 変異遺伝子は MTX 耐性として、IgG 細胞株を取得する際の優性選択マーカーとして使用され、MTX 濃度を 50nM から始めて 200nM まで上昇させつつ、拡大培養を実施した。

IgG 取得の本培養は 10 層フラスコ HYPERFlask M Cell Culture Vessel (Corning) を用い、マニュアルに従って細胞を播種し、セミコンフルエントになったところで EX-CELL302 CHO Serum-Free Medium (SAFC Biosciences) に培地交換し、5 日間培養を継続した。培養終了後の上清は遠心分離 (2000rpm, 10min, 4°C) によって回収し、ボトルトップフィルターによる 0.22μm フィルター処理によってその後の IgG 精製に使用した。

IgG 精製にはアルカリ耐性の ProteinA アフィニティー精製用レジンである MabSelect SuRe (GE Healthcare) を用い、当レジン 4mL をエコノパックカラム (Bio-rad) に充填し、カラム出口には三方活栓を取り付けた。カラムにフィルタ

一処理後の培養上清を添加後バルブで流速を適度に調節しつつ通塔し、80mL DPBS で洗浄した。4mL の溶出バッファー (100mL Gly-HCl (pH3.0), 150mM NaCl) を添加して、IgG を溶出した。溶出液を回収するチューブには予め 800 μ L の 1M Tris-HCl (pH8.0) (Nacalai) を入れておき即時中和を行うとともに、Amicon Ultra - MWCO 50K (Merck Millipore) を用いて、20mM クエン酸 (pH6.0)、150mM NaCl 溶液へのバッファー交換と濃縮を実施した。

IgG 発現量の定量

Fab の場合と同様の原理で、細胞培養後の上清から得られた IgG 取得量をサンドイッチ ELISA によって測定した。平底の 96-well プレートに重炭酸緩衝液で 1000 倍に希釈した anti-human IgG F(ab)'2 fragment (Jackson Immuno Research) 100 μ l を添加してコートした。Super blocking buffer in PBS (Thermo scientific) で非特異結合を防ぐためにブロッキング後、精製した IgG 溶液をプレートの各ウェルに添加して 1 時間、室温でインキュベートした。0.05% Tween 20 を含む PBS で洗浄後、固相化抗体に結合した IgG については HRP-labeled goat anti-human kappa light chain antibody (Bethyl Laboratories) と TMB 試薬 (Wako) との反応で検出した。発色反応を 0.5 mmol/L 硫酸 (Wako) で停止後、Sunrise plate reader (Tecan) を用いて 450nm / 595nm の吸光度を測定した。得られた値に PBS のみでの測定値をレファレンスとして差し引き、検量線から IgG 取得量を算出した。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

精製サンプル 10 μ L を 2 μ L の 6 \times sample buffer (Nacalai) と混合し、ランニング緩衝液中に浸した Mini-PROTEAN TGX gels (Bio-rad) のウェルに添加した。分子量マーカーとして、SpectraTM Multicolor Broad Range Protein ladder marker (Thermo scientific) を同時にウェルに添加し、泳動を開始した。泳動条件は Bio-rad の推奨する標準プロトコル (300V, 25min) に従った。電気泳動後のゲルをクマシーブルー溶液に 1 時間浸して染色後、1 時間脱染した。脱線後のゲルは LAS-3000 system (FUJI FILM) を用いて撮影された。

抗原結合活性評価

IgG 及び Fab 分子の抗原結合活性については、以下に示す ELISA によって評価した。平底の 96-well プレートに TBS に溶解したヒト HER2 タンパク質を室温で 1 時間以上インキュベートして固相化後、非特異的吸着を防ぐために Super blocking buffer in TBS (Thermo scientific) を添加し室温で 1 時間静置した。精製したタンパク質の溶液を定量し、同量の抗体または Fab 溶液をプレートに添加し、室温で 1 時間インキュベートした。0.05% Tween 20 を含む TBS (TBS-T) 溶液で洗浄後、結合した抗体および Fab 分子を HRP-labeled goat anti-human light chain antibody (Bethyl Laboratories) 又は HRP-labeled goat anti-human IgG antibody (American Qualex) と TMB 溶液 (Wako) を用いて検出した。発色反応は 0.5 mmol/L 硫酸 (Wako) で停止後、Sunrise plate reader (Tecan) を用いて 450nm / 595nm の吸光度を測定した。得られた値に PBS のみでの測定値をレファレンスとして差し引き、検量線から Fab タンパク質の取得量を計算した。

2-3. 結果と考察

抗原結合評価系の構築

ELISA による抗原結合評価系を構築する際において、抗原に結合した抗体を選択的に認識する検出抗体の選定が重要となる。これまで、ヒト IgG を用いた抗原結合評価系として HRP-labeled goat anti-human IgG antibody (American Qualex) を用いてきた。今回、Fab の抗原への結合活性を評価する際、複数の検出抗体を用いて比較検討を実施した。今回、上記 American Qualex 社の検出抗体に加えて、HRP-labeled goat anti-human light chain antibody (Bethyl Laboratories), goat anti-human IgG-HRP (Southern Biotech), Polyclonal Rabbit anti-Human IgG-HRP (Dako) を使用し、各試薬の取扱い指示に従い TBS-T への希釈倍率をそれぞれ 1/2000, 1/10000, 1/6000, 1/6000 に設定して比較した。各検出抗体によるシグナル強度を指標に、0.1 μ g/mL から 1/2 ずつ希釈して作成した Fab 標準溶液の希釈系列に対するシグナル強度を比較した。その結果、Fab の抗原への結合活性を評価する際、American Qualex 社に加えて Southern Biotech 社の検出抗体がシグナル強度を得て、良好なシグモイド曲線を示すことを確認した。American Qualex 社の検出抗体の試薬には人体に有害な有機水銀化合物 0.02% Thimerosal を含有しており、本評価系での有用性を確認したのち、基本的に Southern Biotech 社の検出抗体を選択することとした。

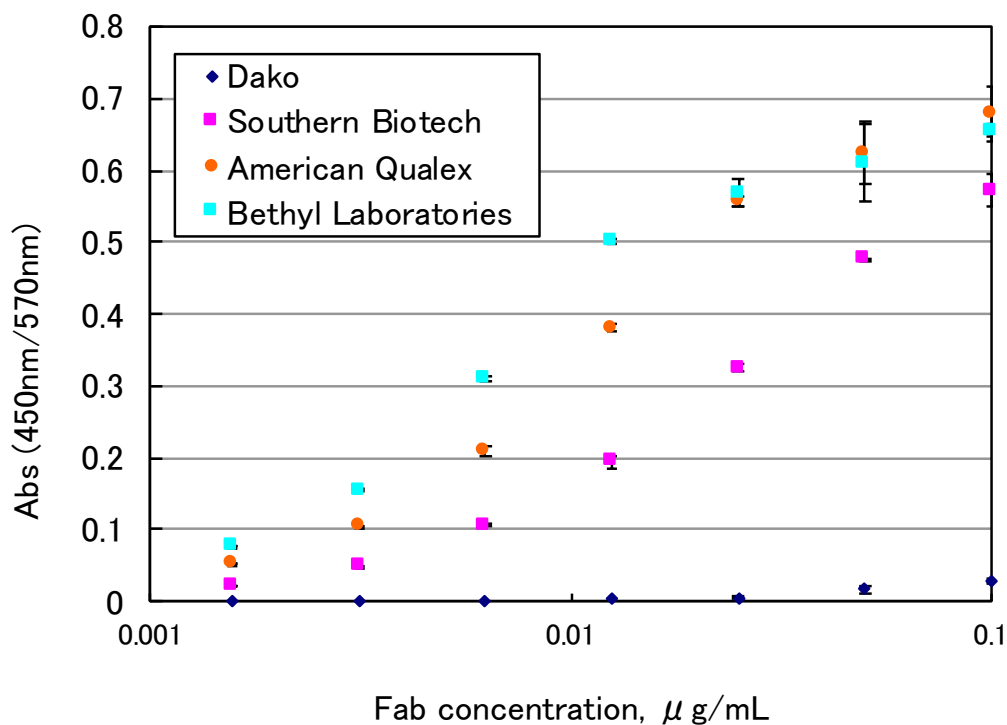


図 2-5. 抗原結合評価系における H R P 標識検出抗体の比較検討

0.1μg/mL から 1/2 ずつ希釈して作成した Fab 標準溶液の希釈系列に対するシグナル強度を各社 HRP 標識抗体を比較した結果、従来 IgG 抗体に利用してきた American Qualex 社に加えて Southern Biotech 社の検出抗体がシグナル強度を得て、良好なシグモイド曲線を示すことを確認した。

大腸菌での Fab 発現検証

一般的に、シグナルペプチドは共通の特徴を有しており、ペプチドの N 末端側に位置し塩基性アミノ酸残基が集中する n-region、中央に位置し疎水性アミノ酸残基が集中する h-region を有する。シグナルペプチドの C 末端側に位置する c-region においては、原核生物及び真核生物ともにグリシン (Gly, G)、セリン (Ser, S)、アラニン (Ala, A) 等、分子量が比較的小さく中性アミノ酸残基を含む。

例えば、OmpA や PelB は原核生物において効率的に機能する代表的なシグナルペプチドで、上記アミノ酸残基を有する。本研究において、我々は c-region においてセリン残基が 3 連続した配列 (SSS) を含むマウス抗体軽鎖由来のシグナルペプチドを選択した (表 2-1.)。シグナルペプチダーゼIの反応より推定される切断部位から-3 番目と-1 番目にセリン残基を有している。他にも、20 残基程度の長さ (19-20) 、疎水性アミノ酸の数 (13-15) 、N 末端に塩基性残基 (リジン、アルギニン) 等の条件を有することから、我々はこのシグナルペプチドが原核生物である大腸菌での Fab 発現を目的として機能することを当初期待した。しかしながら、このシグナルペプチドは大腸菌での Fab 発現において、意外にも殆ど機能していないことが判明した。よって、その原因を探るべく、配列改変によって大腸菌での効率的な Fab 発現を目的としたシグナルペプチドの配列最適化を試みた。先行文献によると、c-region における-3 番目と-1 番目に位置するアミノ酸残基としてアラニンを指向する傾向にある事が原核生物に共通していた。その場所におけるアラニンの重要性を検証するため、当シグナルペプチドをベースに-3 番目と-1 番目のセリンをアラニンに改変した。つまり、本来は真核生物で機能するマウス抗体軽鎖由来のシグナルペプチドの C 末端におけるセリンが連続した配列 (SSS) を Ala-Ser-Ser (ASS)、Ser-Ser-Ala (SSA)、及び Ala-Ser-Ala (ASA) に改変し、原核生物である大腸菌における Fab 発現への影響を比較した。これらのシグナルペプチドを発現ベクターに搭載して大腸菌内ペリプラズム画分に分泌発現させ、B-PER extraction reagent で抽出後の試料の Fab タンパク量をサンドイッチ ELISA によって定量することを試みた。その結果、c-region 内の配列を SSS から ASA に改変することで、大幅に Fab の分泌発現量を向上させることに成功した (図 2-6 A.)。次に、金属キレートアフィニティークロマトグラフィーによって精製し、その試料を非還元条件下で SDS-PAGE に供した。SDS-

PAGE で確認された結果はサンドイッチ ELISA による測定結果と対応するもので、分泌量の向上を確認した。ASS 及び SSA 配列は SSS と比較して僅かに分泌発現を向上した程度にとどまった一方、ASA を有するシグナルペプチドによって顕著に高い分泌効率を示した (図 2-6 B.)。更に、-3 番目と-1 番目のセリンをアラニンに改変することが、相乗的に大腸菌における Fab 発現の分泌効率向上をもたらす結果となった。次に、HER-2 への結合を確認する為、ELISA による抗原結合評価を実施した。抗原結合において、シグナルペプチド配列の c-region における ASS 及び SSA 、ASA 配列の影響は同等であった。(図 2-6 C.)。

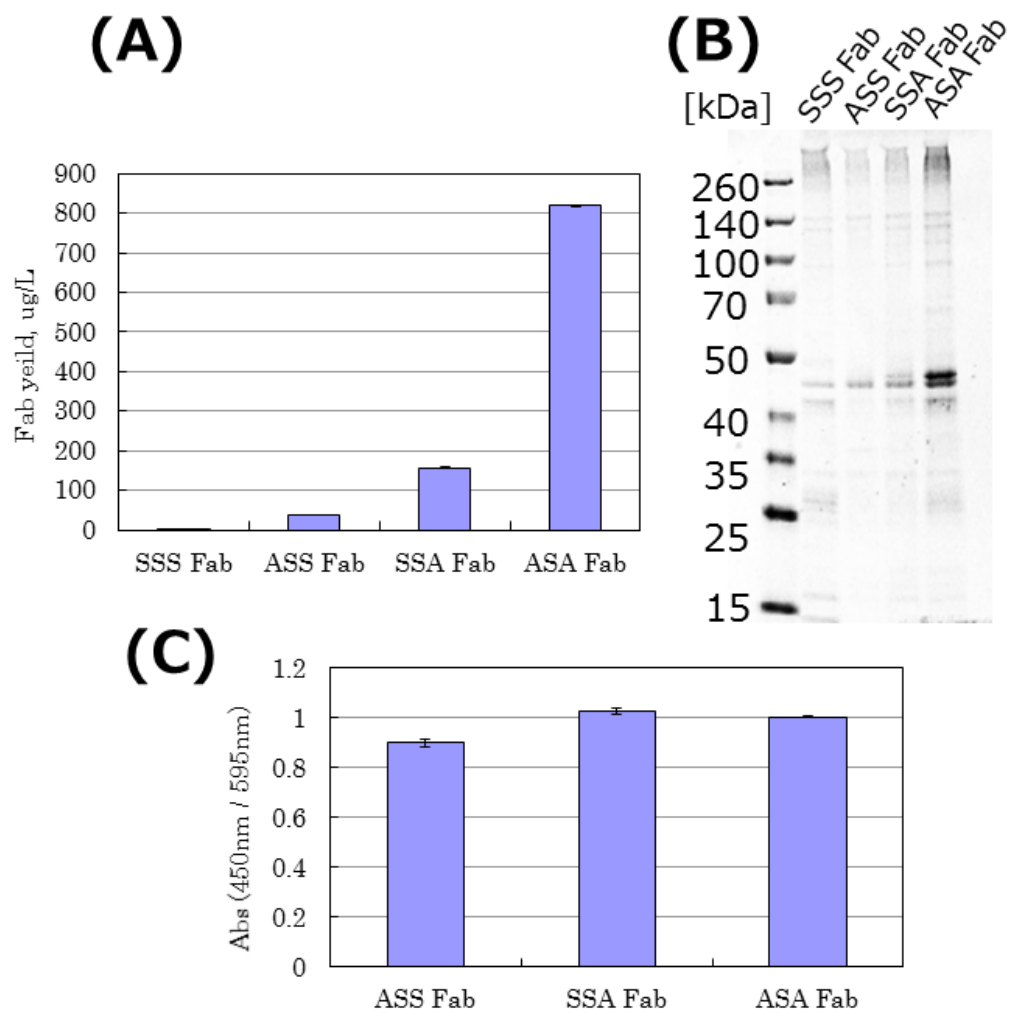


図 2-6. シグナルペプチド改変による抗 HER2 抗体 Fab 生産への影響

培養液 200mL から金属キレートアフィニティー精製した Fab タンパク質をサンドイッチ ELISA で定量後 (A)、非還元条件下で SDS-PAGE に供した (B)。抗原結合活性については、HER-2 を固定化した 96 ウェルプレートを用いて ELISA に供した (C)。595nm をリファレンス波長とし、450nm の吸光値を測定した。

表 2-3. シグナルペプチダーゼの認識配列に関するルール

➤ **-3, -1 rule (Gunnar von Heijne (1983, 1984))**

-3 : Charged (D/Q/K/R) , large polar (N/Q)

-1 : A/S/G/C/T/Q, must not have aromatic (F/H/W)

Under the condition of no P residues from -3 to -1 positions

➤ **A-x-B rule (Perlman and Halvorson (1983))**

A : A/G/S or larger aliphatic (L,V,I)

B : A/G/S

この結果は、アラニンやセリンが共に分子量が小さい中性アミノ酸残基であり先行研究の提唱するルールにおいては差異が規定されていない[86] (表 2-3.

)。それにも関わらず-3 番目と-1 番目におけるアラニン置換によって相乗的に Fab 発現が向上したことを見出し、シグナルペプチダーゼや分泌機構の決定的要因を示唆する新規の知見を得るに至った。そして、特に-1 番目において認められた発現向上の影響は、シグナルペプチドの改変において-1 番目のアミノ酸改変がシグナルペプチダーゼの切断反応に関わっているという先行例と類似している点があり、本研究での発現向上は切断効率の改善が一因である事を示唆している。アミノ酸側鎖に着目すると、セリンは極性アミノ酸であるのに対し、アラニンは非極性アミノ酸であり、この差異が菌由来シグナルペプチダーゼI (Lep) の基質特異性に作用し、切断反応効率が高まったことにより Fab 分泌量が増加したと考える。当シグナルペプチダーゼの切断機構については、シグナルペプチドの C 末端に対し、Ser90 でアシル化反応が起こり、Lys145 で反応全体の基盤と脱アシル化に関与することで、シグナルペプチドの切断反応を生ずる事が知られている (図 2-7.) [87]。切断部位の近傍には S1, S3 ポケットが存在し、それぞれ c-region における-1 番目と-3 番目のアミノ酸残基と結合することが知られている。これらの情報を基に、OmpA と大腸菌由来シグナルペプチダーゼIの複合

体構造を精査すると、シグナルペプチダーゼIは S1, S3 ポケットにおいて OmpA の-1 番目及び-3 番目のアラニンと相互作用し、S1 ポケットは非極性アミノ酸残基で構成されており、その疎水ポケットが非常に小さいという特徴が示されていた (図 2-8.) [88]。よって、C 末端認識において OmpA と同じ配列を有している当シグナルペプチドは、非極性の側鎖を有するアラニンが S1, S3 に効率的に認識し、結果として発現向上につながったと考えている。別の観点としては、機能タンパク質の発現効率に関わる要素として、切断処理前のタンパク質の二次構造も重要だと言われている。他には、生産宿主やシグナルペプチドの c-region 以外の構成要素である n-region や h-region、タンパク質のフォールド自体もタンパク質の分泌効率に影響を与えうる。表 2-1. に示す様に、選択されたシグナルペプチドは h-region の中央又は大腸菌由来 Lep 認識部位からおよそ-7 から-4 に位置するヘリックス分割残基 (殆どの場合、グリシン) を含まないという点でも特徴的である。実際に、OmpA や PelB 等の代表的なシグナルペプチドは h-region の中央にヘリックス分割残基を有している。従って、-3 番目及び-1 番目のアミノ酸残基のアラニン改変による Fab 分泌発現向上効果が全ての真核生物由来シグナルチドに当てはまるとは考えていない。しかしながら、今回の検討において作製したシグナルペプチドは抗原結合活性のある Fab を発現させ、H 鎖や L 鎖に同じコンセンサス配列を有する多くの Fab にも適応可能できる点では、大腸菌を活用した抗体創薬研究において十分活用可能である。

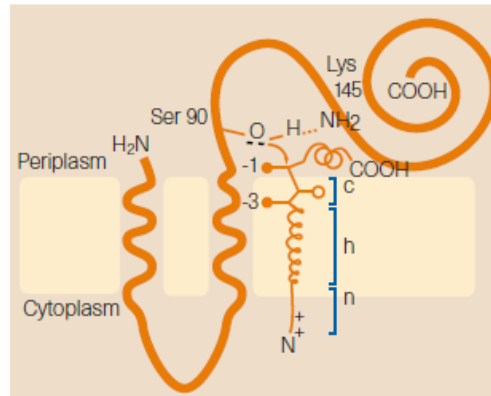


図 2-7. シグナルペプチダーゼの切断メカニズム (文献[87]より引用)

シグナルペプチドの C 末端に対し、シグナルペプチダーゼの Ser90 でアシル化反応が起こり、Lys145 で反応全体の基盤と脱アシル化に関与することで、シグナルペプチドの切断が生ずる。切断部位の近傍には S1, S3 ポケットが存在し、それぞれ c-region における-1 番目と-3 番目のアミノ酸残基と結合する。

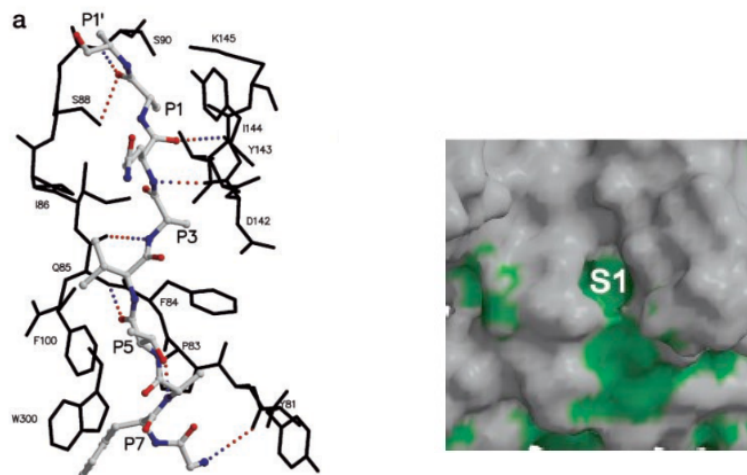


図 2-8. シグナルペプチダーゼの構造 (文献[88]より引用)

(左) OmpA とシグナルペプチダーゼとの共結晶構造。P1, P3 はアミノ酸側鎖を示す。

(右) S1 ポケットの疎水領域。緑色は疎水領域を示し、多くの非極性残基で構成される。

CHO 細胞での IgG 発現への適応性評価

セリンからアラニンへの改変による c-region の ASA 配列により、大腸菌を宿主とした場合において Fab 発現が向上する結果となった。創薬研究において全長抗体を発現する場合、一般的には分子サイズや糖鎖構造等の理由から真核生物である CHO 細胞を宿主として選択され、シグナルペプチドは天然の抗体由来配列を用いる場合が多い。本研究においては、c-region の SSS 配列を有するマウス抗体由来のシグナルペプチドを選択した。グラム陰性菌やグラム陽性菌と比較して、真核生物由来のシグナルペプチドは一般的に c-region の ASA 配列を有する傾向は無い。実際に、CHO 細胞を用いた抗体生産研究においても、数 g/L を達成したシグナルペプチド配列に c-region の法則性はない[89]。それ故、真核生物における C 末端のシグナルペプチダーゼの配列認識は不明な部分が多く、原核生物と真核生物との互換性は容易に推定できるものではない。以上により、今回大腸菌にて発現増強するように改変したシグナルペプチドについて、全長抗体発現させる CHO 細胞への種選択性を越えた互換性について検証した。

本検討においては、SSS 及び ASA 配列の CHO 細胞発現の影響を確認すべく、同じく HER-2 を標的とした全長抗体を題材に精査した。G418 薬剤耐性による抗体生産細胞株を選定後、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーにて精製した。精製した抗体試料を還元条件下で SDS-PAGE に供したところ、抗体の H 鎖及び L 鎖の分子量に相当する位置でのバンドを確認した (図 2-9.A)。また、得られた抗体及び Fab の N 末端のアミノ酸配列をエレクトロスプレーイオン化 (ESI) での Orbitrap (+) MS 解析を実施し、H 鎖 L 鎖ともに指定したアミノ配列で始まり、シグナルペプチダーゼによる切断が想定通りの位置で生じている事を確認した (data not shown)。抗 HER2 抗体の抗原結合について ELISA によって測定したところ、SSS 及び ASA 配列を有するシグナルペプチドによって

全長抗体の抗原結合は同等であった (図 2-9. B)。

CHO 細胞由来のシグナルペプチダーゼの特徴は不明な部分が多いが、微生物よりも基質特異性が低い点は分子進化的には興味深い。Technical University of Denmark 配列解析センターではシグナルペプチドの予測プログラム開発が進められており[90]、表 2-4 に示す遺伝子配列データから複数の解析モデルを試行している。ニューラルネットワークによって切断部位の予測プログラムを作製した Nielsen らの研究によると、真核生物由来のシグナルペプチドはグラム陰性菌やグラム陽性菌のそれよりも **c-region** における-3 番目、-1 番目アラニンの頻度が明らかに低い[78]。また、彼らは分泌タンパク質と細胞質や核に局在する非分泌タンパク質との配列の違いも解析しており、真核生物では **h-region** にロイシンリッチな配列を有する事で、非分泌タンパク質と区別した特性を有する事を明らかにしている (図 2-10.)。以上を踏まえて総合的に考察すると、全体の約 30% の内在性タンパク質が内膜と外膜を含むペリプラズム周辺に発現していると言われる大腸菌は、**c-region** にアラニンを厳格に必要とする事でシグナルペプチドの基質特異性を巧みに利用し、ペリプラズム周辺への輸送や局在を制御していると考えられる。その一方で、細胞内小器官が発達している真核生物では、**h-region** にロイシン等の疎水性アミノ酸を特徴残基とする事で細胞膜への親和性を高め、小胞体内腔への輸送機能を重視するようになった進化の仮説が考えられる。結果としては、**c-region** のセリンをアラニンに改変したシグナルペプチドは CHO 細胞を用いた抗体発現にも活用可能であり、これまで研究の前例がない方法論でシグナルペプチドを創出することに成功した。

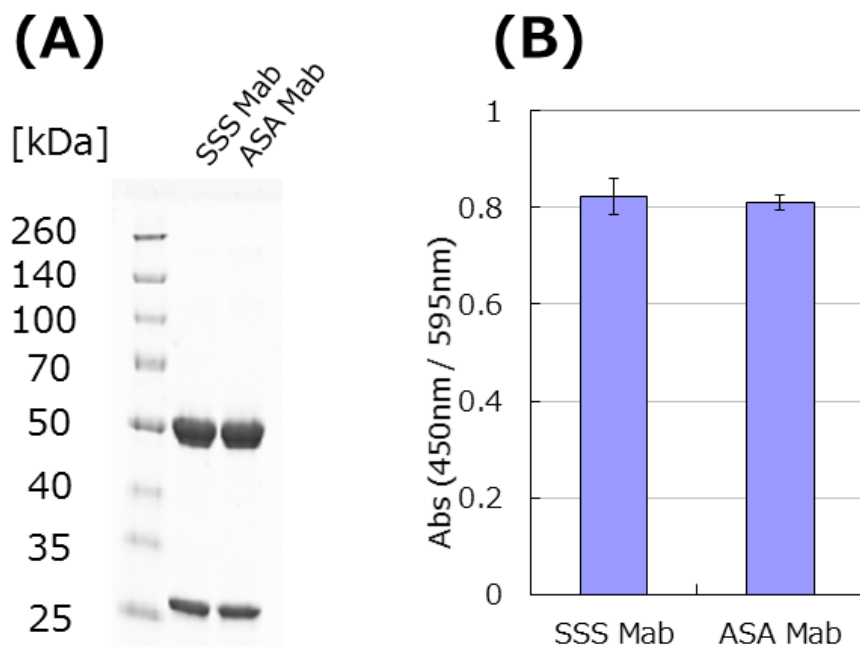


図 2-9. シグナルペプチド改変による抗 HER2 IgG1 生産への影響

シグナル改変前 (SSS) と改変後 (ASA) の CHO 細胞における IgG 抗体生産への影響を確認すべく、培養上清をアフィニティー精製した抗体試料を還元条件下で SDS-PAGE に供したところ、抗体の H 鎖及び L 鎖の分子量に相当する位置でのバンドを確認した (A)。更に、精製後の抗体試料濃度を揃えて HER2 に対する結合活性を測定したところ、その結合シグナルは同等であった (B)

表 2-4. 配列解析に用いた SWISS-PROT データ (文献[78]より引用)

Table 1. Data and performance values						
Source	Data		Network architecture (window/hidden units)		Performance	
	(Number of sequences)		C-score	S-score	Cleavage site location (% correct)	Signal peptide discrimination (correlation)
	Signal peptides	Non-secretory proteins				
Human	416	251	15+4/2	27 / 4	68.0 (67.9)	0.96 (0.97)
Eukaryote	1011	820	17+2/2	27 / 4	70.2	0.97
<i>E.coli</i>	105	119	15+2/2	39 / 0	83.7 (85.7)	0.89 (0.92)
Gram-	266	186	11+2/2	19 / 3	79.3	0.88
Gram+	141	64	21+2/0	19 / 3	67.9	0.96

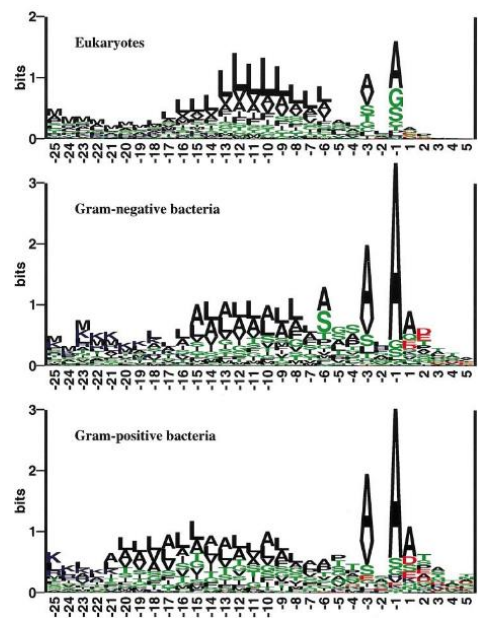


図 2-10. ニューラルネットワークによるシグナルペプチド配列予測 (文献[78]より引用)

解析プログラムによると、大腸菌も含む原核生物は C 末端から 1 番目及び 3 番目に Ala への選択性が高く、ヒトも含む真核生物では対照的に Ala の選択性は高くない事を明らかにしている。また、真核生物の h-region にはロイシンリッチな配列を有しており、非分泌タンパク質と区別した特性を有する事を明らかにしている。

創薬基盤への実装に関する考察

本研究において、CHO 細胞と大腸菌の双方に機能しうるシグナルペプチドを確立し、特に原核生物においては **c-region** の改変が重要であることを実験的に明らかにしてきた。真核生物と原核生物の種を越えて対応可能なシグナルペプチドの構築はタンパク質発現系の改良として創薬基盤へ実装する事で、研究開発の効率化に寄与するものと考えられるが、その実現可能性と期待効果について考察する。両細胞はタンパク質の分泌機構が異なる為、発現システムは根本的に異なるものの、工業細胞として抗体創薬のあらゆる場面において使い分けられているのは前に述べたとおりである。タンパク質発現系の改良に関する研究は創薬基盤の効率化や医薬品生産向上に貢献することが期待されるが、本研究にて得られた知見は短期的には抗体スクリーニングの工程に、中長期的には生産基盤に寄与するものとする。

抗体医薬開発のうち、上市された製剤の多くは CHO 細胞によって生産されている (表 1-1.)。その一方で、創薬研究における宿主は真核生物である CHO 細胞も原核生物である大腸菌も双方の特徴を活かして利用されている。例えば、ファージディスプレイにおける大腸菌を基盤とした抗体クローン選択を始めとして、開発候補となるリード抗体をベースにヒト化工程にて Fab や scFv を迅速に作製する際に大腸菌は使用されている。よって、IgG 抗体を開発する場合においても、抗体選抜やヒト化、品質物性評価という創薬基盤においても研究ツールとして大腸菌を勢力的に使用する場面があり、これらシステムにおいて本研究で確立したシグナルペプチドの実装が効果的と考える。抗体結合断片を用いた抗体スクリーニングの効率化については、様々なアプローチがあるが、その顕著な例として、大腸菌発現系自体を省略した方法論が報告されている(図 2-11.)[91]。ファージディスプレイは機能性抗体を取得するにあたって、Fab や scFv 抗体ラ

ライブラリーから目的の抗原に結合した抗体提示ファージを濃縮し、得られたファージを大腸菌に感染後にファージ調製して再度選抜するパンニングという工程を実施する。scFv ライブラリーを用いたパンニングは、ファージミドベクターでのコンストラクト作製及び選抜後クローンの大腸菌発現が簡便であるところが利点である一方、大腸菌に scFv 発現させた場合に凝集体形成や、低発現の場合がある。また、根本的には重鎖と軽鎖を(G4S)₃ リンカー等につないだ人工フォーマットであるために、最終的に IgG 抗体の形に変換して評価する段階（リフォーマット）で活性低下する等の課題も指摘されている。ハイスループットスクリーニングにおけるリフォーマットを省略した創薬プロセスを SiPF (Screening In Product Format) と称し、scFv を提示するファージミドベクターライブラリーから重鎖定常領域 CH1-3 と軽鎖発現用のプロモーターとシグナルペプチド及び C 末端の軽鎖定常領域を付加することで、効率的な動物細胞発現系のプラットフォームを提案している (図 2-12.)。Expi293F 細胞を用いた一過性発現系にて 0.06mg-1g/L の生産性を示し、6 日間の培養で平均 70mg/L の発現量を示す (図 2-13.)。

上記研究を参照した考察として、本研究で構築した大腸菌発現系は Fab を対象としている。天然型の抗原結合ドメインであることから、scFv 特有の凝集体形成やリフォーマット後の抗原結合能低下の問題を回避可能と考える。発現量は上記には及ばないものの、一次スクリーニングとしての結合や生化学評価には充分であり、培養期間が 2 日間という点では動物発現系よりも迅速性に長けている。SiPF にも適用できる重要な観点としては、ファージミドベクターから動物発現用ベクターに移し替える際に、本シグナルペプチドを活用することで宿主の種選択性を回避したプラットフォームを提供することが期待できる。

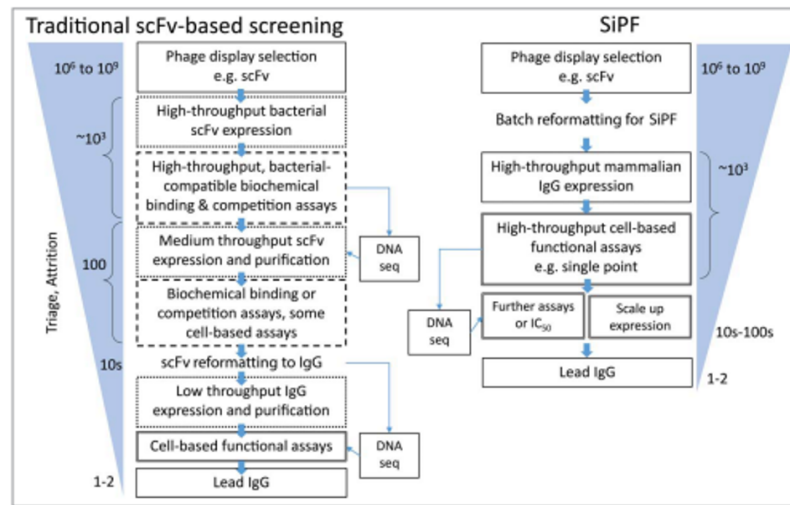


Figure 6. Flow diagrams comparing typical routes from phage display selection to the identification of functional antibodies, highlighting the utility of the SiPF platform in reducing surrogate steps (e.g., scFv format, binding based / biochemical) assays. Rapid conversion of phage scFv to IgG allows earlier analysis of larger numbers of IgG in more relevant, functional cell-based assays.

図 2-11. 大腸菌発現工程を省略した抗体スクリーニング (文献[91]より引用)

大腸菌で scFv 抗体断片を発現する場合、抗体断片から IgG に再変換 (再変換) する必要があり、この工程を省略し効率化した抗体スクリーニングが提案されている。

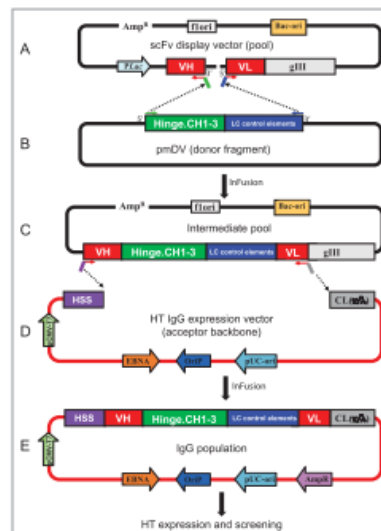


図 2-12. ファージミドベクターからの効率的な動物発現系の構築スキーム (文献[91]より引用)

scFv 提示ライブラリーから重鎖定常領域と軽鎖発現用のプロモーターとシグナルペプチド及び C 末端の軽鎖定常領域を付加し、効率的な動物細胞発現プラットフォームを提案している。

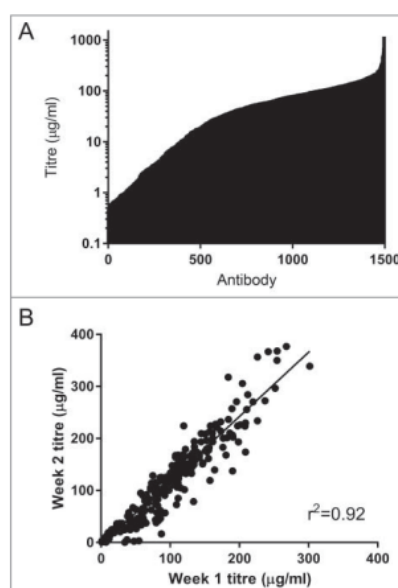


図 2-13. Expi293F 細胞を用いた一過性発現系の生産性分布 (文献[91]より引用)

1496 個の IgG に対し、Expi293F 細胞を用いて 6 日間の培養を実施後、BLI を原理とする octet proteinA で生産性が測定された。6 日間の培養で平均 70mg/L の発現量を示した。

生産基盤として、動物発現系は高分子量の IgG 抗体分子を発現可能とする点で有利であるが、大腸菌発現系についてもまた全長抗体の技術可能性が検討されている。表 2-4.に大腸菌による全長抗体発現の研究例を示しているが、2-4 日間の培養で 0.05-150mg/L の発現量を示すことが報告されている。よって、SiPF の様な抗体スクリーニング工程に対しては代替可能性があるものの、臨床試験に耐えうる生産基盤というレベルではまだ実用段階には至っていないと考える。

大腸菌発現による全長抗体 Fc の機能面においては、FcRn に結合する (図 2-14.)。その一方で、C1q や Fc γ RI に対する結合能を有していないことが知られている (図 2-15.)。これは、大腸菌が翻訳後修飾として Fc 領域の 297Asn に N 結合型糖鎖を付加する機能を有していない為である。この課題に対して、大腸菌に転移酵素を始めとする糖鎖生合成系を導入する方向性に加え、糖鎖を機能として必要としない抗体をデザインする必要があると考える。薬効として糖鎖を必

要としない創薬の応用例としては、One-armed antibody が挙げられる (図 2-16.)[92]。これは、Fc 領域に軽鎖を有する重鎖と重鎖のみのドメインを選択的に結合させることで、一価 (monovalent) の抗原結合能を有する抗体である。c-MET は HGF をリガンドに二量体化することで、がん細胞増殖に関わる受容体である。c-MET に対するアンタゴニストは創薬としての可能性があるが、副作用につながると考えられるアゴニスト活性を回避する為には通常の二価 (bivalent) で結合する抗体よりも一価抗体の方が有利である。Genentech によって取得された抗 c-MET One-armed antibody 5D5 は 5.8 時間程度の半減期を有し (図 2-17.)、ゼノグラフトモデルの動物評価において one-armed antibody 投与によるグリオブラストーマの退縮効果が認められた (図 2-18.)。また、腫瘍の脳室内投与モデルでも one-armed antibody 投与による生存率の延長が認められた (図 2-19.)

本研究では、大腸菌において c-region の改変が重要である事を明らかにしてきた。全長抗体や一価抗体を大腸菌発現させる場合においても、ペリプラズムへの分泌効率が重要であり、本知見を生産基盤強化に活用することで、将来的には従来技術で達成できない抗体分子の生産効率化に寄与することが期待される。

表 2-4. 大腸菌による全長抗体発現の研究例 (文献[92-96]より引用)

Full size antibody	Expression	Institute	Reference
Bivalent	Periplasm	Genentech	J Immunol Methods 263 133–147 (2002)
		University of Texas	Nat Biotechnol 25: 563–565 (2007)
		National University of Singapore	PLoS One. (2010), 5(4) e10261
	Cytoplasm	New England Biolab	Nature comm. (2015), 8072
Monovalent	Periplasm	Genentech	PNAS (2013), 110 (32) E2987-96

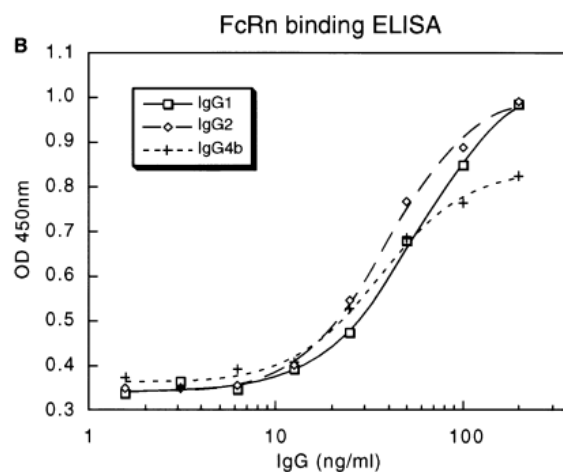


図 2-14. 大腸菌発現 IgG 抗体の FcRn との結合評価 (文献[93]より引用)

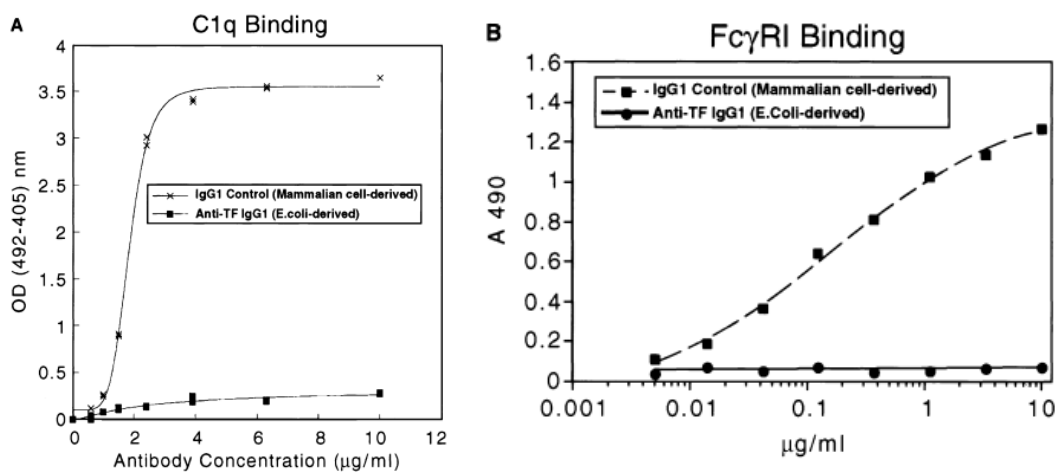


図 2-15. 大腸菌発現 IgG 抗体の C1q (A) 及び FcγRI (B)との結合評価 (文献[93]より引用)

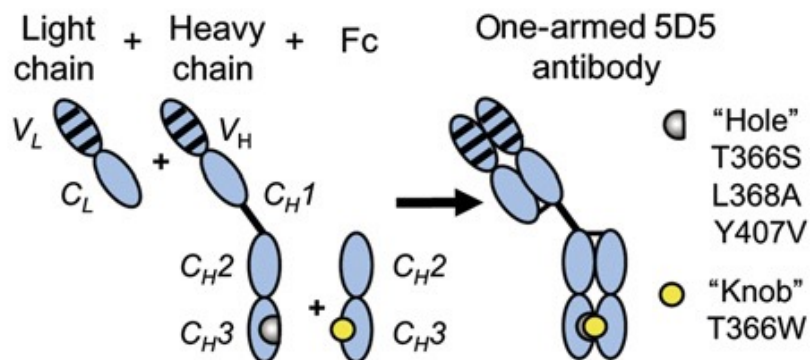


図 2-16. One-armed antibody の模式図 (文献[92]より引用)

アミノ酸改変をベースとした Knobs-into-holes 技術により、ヘテロダイマー形成による一価抗体を作成することが可能となる。

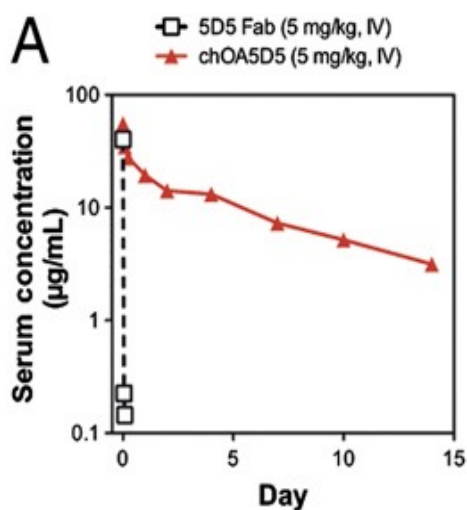


図 2-17. One-armed antibody の血中動態 (文献[92]より引用)

抗体の半減期は通常数時間～数週間程度あるといわれているが、大腸菌発現による 5D5 one-armed antibody の半減期は 5.8 時間であり、Fc を有しない 5D5 Fab と比較してキメラ型の一価抗体 chOA5D5 は血中半減期を長く保持可能であることが確認されている。

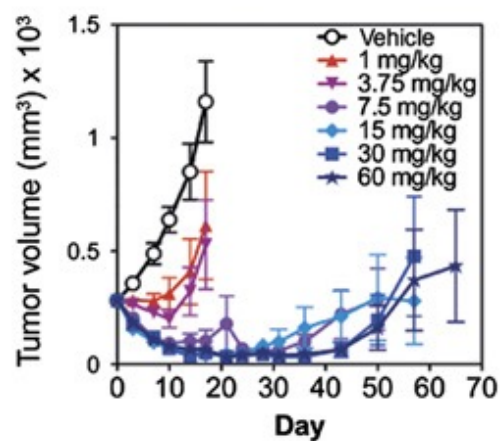


図 2-18. U-87 MG ゼノグラフトでの c-MET One-armed antibody の *in vivo* 評価
(文献[92]より)

脳腫瘍細胞株 U-87MG をヌードマウス (N=10) に移植したゼノグラフトモデルについて、OA5D5 を 1-60mg/kg で投与したところ、腫瘍退縮効果が確認されている。

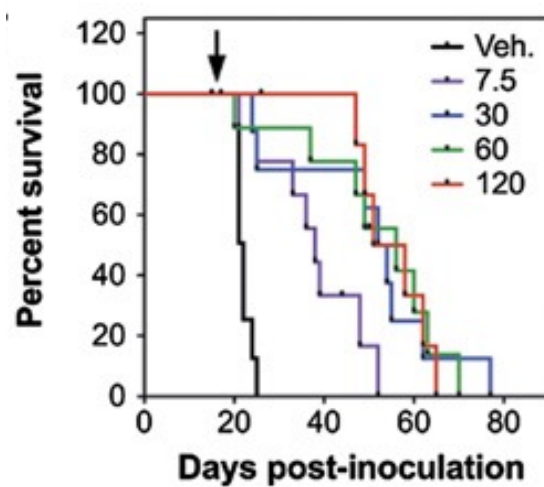


図 2-19. 腫瘍脳室内投与モデルでの c-MET One-armed antibody の *in vivo* 評価
(文献[92]より)

ヌードマウスの脳室内に U-87 MG を移植したモデルについて、OA5D5 を 7.5-120mg/kg で投与して生存率を測定。カプラン・マイヤー法により分析したところ、生存期間の延長が確認されている。

2-4. 結言

本検討では、**c-region** にセリンが連続する真核生物由来シグナルペプチドを題材に、当領域の-3 番目及び-1 番目は非極性アミノ酸であるアラニンに改変することが大腸菌における Fab 発現に重要であることを明らかにした。先行のシグナルペプチド研究において、どのような特徴が抗体発現に影響を与えるかについて精査した例は殆どない。今回、**c-region** にセリンが連続する SSS 配列を有するマウス抗体を題材に、当領域のアミノ酸改変による抗体発現への影響を検証した。**c-region** の-3 番目と-1 番目のセリンをアラニンに置換したところ、ASA 配列によって劇的に大腸菌における Fab の分泌発現を改善した。ASS や SSA 配列と比較すると、ASA 配列は相加的でなく、相乗的に効率的な分泌改善効果を示した。更に、これらの改変を有したシグナルペプチドは CHO 細胞での全長抗体の分泌発現する機能を改変前の場合と同様に保持していることを確認した。これは、真核生物由来のシグナルペプチドについて原核生物を宿主とした抗体発現にも適合するよう人為的な改変を可能にしたという点で、ユニークなものである。この改変したシグナルペプチドは、ファージディスプレイによる抗体選抜、マウス抗体のヒト化工程、抗体生産等、タンパク質発現系を必要とするあらゆる創薬基盤技術に貢献しうるものである。また、これらの知見により、生命におけるタンパク質の分泌過程が探究され、更なる生体機能分子の創製にもつながっていく事を期待する

第三章

難発現性の Fc 受容体調製及び 抗体との結合評価系に関する研究

第三章 難発現性の Fc 受容体調製及び抗体との結合評価系構築に関する研究

3-1. 要約

抗体医薬の創薬開発において、ヒトでの臨床予測性は重要課題の一つであり、適切な疾患モデル動物による評価に加え、実験動物とヒトとの種差に関して Fc 受容体への結合性を評価することが重要であるが、Fc 受容体の中には発現不良などによって調達が困難な場合が見られる。実験動物の一つであるハムスターは、主にウイルス感染の病態解析や治療薬の薬理評価に広く利用されているものの、マウスやサルに比べて Fc 受容体研究および抗体との結合評価への活用は進んでいない。ハムスターFcγRIVはヒト FcγRIIIa のオーソログであり、抗体機能をハムスターで薬理評価する際に重要な Fc 受容体分子であるが、これまでにハムスターFcγRIVを可溶性タンパク質として取得した報告例はみあたらない。今回、高 ADCC 活性を示すフコース非修飾抗体の機能解析への活用を目的として、ハムスターFcγRIVのタンパク質取得及び当分子を活用した結合評価を試みた。

本研究では、ハムスターFcγRIVの細胞外ドメインの C 末端に His タグを融合したタンパク質 (略称 ham FcγRIV) を設計し、CHO 細胞の安定発現系により可溶性タンパク質として取得することに成功した。Fc 受容体を可溶性タンパク質として得る利点は、分析カラムや各種センサーチップに固定化することで抗体 Fc との結合解析の迅速分析が可能となる。抗体の各種 Fc 受容体との結合性は、動物投与時における血中動態や薬効及び毒性に関連することが知られており、候補となる抗体の品質物性と薬理作用の関連を精査することで、生産時の

品質を制御することも期待できる。分析系としては、微量かつ粗精製レベルでもタンパク質の結合解析が可能である BLI 法を選択した。抗 DNP 抗体をモデルに抗体 Fc と ham FcγRIV との結合性を評価したところ、フコース非修飾抗体はフコース修飾抗体に比べて ham FcγRIV への結合が濃度換算で約 3 倍程度に上昇した。この結果を別の評価系で確認するため、げっ歯類 FcγRIV がマクロファージ細胞上に発現している報告があることから、ハムスター由来マクロファージ細胞株 HM-1 を抗体結合評価に用いた。HM-1 の細胞培養法を確立後、FCM 解析によってもフコース非修飾抗体による結合上昇が確認された。

以上の結果より、フコース非修飾抗体のハムスター Fc 受容体に対する結合機能解析への活用を目的として、ham FcγRIV 及び HM-1 細胞株を用いた結合評価系を構築した。当結合評価系は、ハムスターを用いた薬理評価において投与した抗体の作用機序解析や Fc 受容体における種差の解析に応用することができ、抗体医薬のヒト臨床予測性の改善、特に高 ADCC 活性抗体の研究開発に貢献することが期待される。

3-2. 緒言

抗体医薬の創薬開発において、ヒトでの臨床予測性は重要課題の一つである。において、一般的に、ヒトでの臨床効果を予測できる動物を使用した薬効モデルの報告例は僅かである[97, 98]。ヒトに投与する前には示す様な非臨床試験にて動物を用いた毒性評価を十分に精査することが重要であるが、その毒性評価の妥当性について複数の製薬企業で構成されたワークショップの報告例がある。第Ⅰ～Ⅲ相臨床試験にて開発された 150 化合物に対する 221 項目の毒性所見のうち 71% は非臨床の動物試験でも認められた[99]。しかしながら、当開発品の分子

形態について層別解析されておらず、抗体医薬の実態については不明である。また、AstraZeneca による創薬における研究生産性に関する解析では、非臨床試験で十分に安全性プロファイルを評価した場合、臨床試験において安全性が原因で失敗するプロジェクトの割合が減ることから、臨床試験での奏効率は非臨床試験における毒性試験での確度と関連性があることが示唆されている (図 3-1.)[100]。

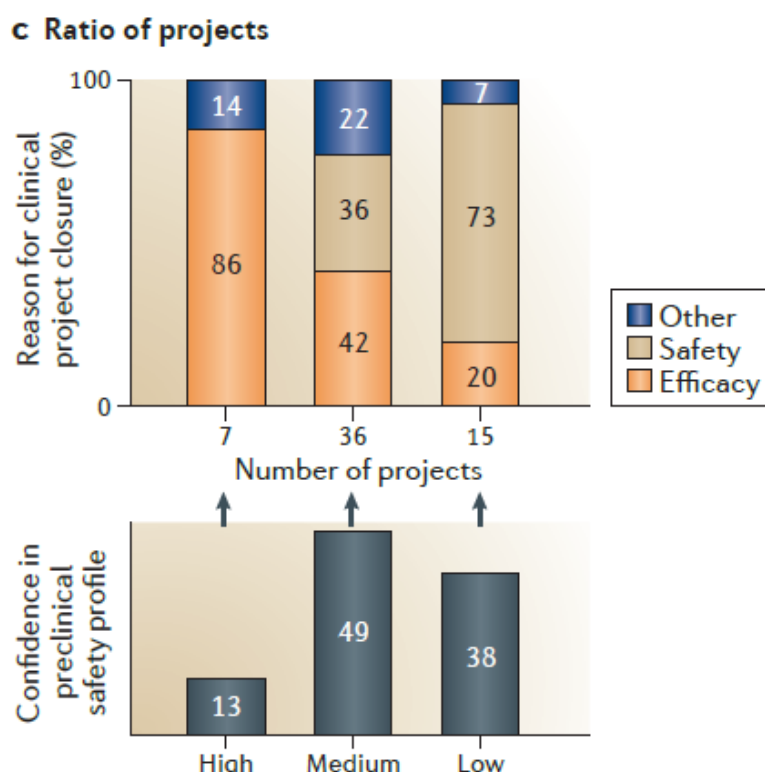


図 3-1. 臨床試験の奏効率と非臨床試験における毒性プロファイルとの関連 (文献[100]より引用)

AstraZeneca における R&D 生産性に関する解析によると、非臨床試験での安全性に関するアラートは臨床試験での安全性担保の低下につながり、問題となる所見がない場合は臨床試験で少なくとも安全性で中止する可能性は低くなる傾向にあることが示されている。

抗体医薬の臨床試験で見られた重大な毒性所見として、抗 CD28 抗体 (TGN1412) 投与後に発生したサイトカインストームの例がある[101]。カニクイザルを用いた毒性試験では当所見は認められず、サル毒性評価の妥当性に疑問が投げかけられた。TGN1412 は IgG4 型であるが、当サブクラスに関するヒトとサルの違いとしてサル FcγRI 及び FcγRIII が IgG4 に対する結合性がより高いことが知られている。その後、TGN1412 投与によるサイトカインストームは Fc 受容体における種差との関連性は結合評価によって否定され、サイトカインストームを惹起するのは CD4 陽性メモリーT 細胞の可能性があり、当細胞上の CD28 においてサルがヒトよりも発現量が低いことが示された。他には、IgG4 のヒンジ領域変化によって CD28 認識が変化し、T 細胞刺激につながった可能性を示唆する報告がされている[102]。このように、抗体医薬のヒトへの外挿性を改善するには、適切な疾患モデル動物に加えて実験動物及びヒト由来 Fc 受容体と医薬品の候補となる抗体との結合性を事前に評価することが重要である。

日米欧医薬品規制調和国際会議の定める非臨床における安全性評価 (ICH-S6)においては、ヒトに投与する際の安全な投与量設定、毒性の恐れのある臓器の特定と可逆性の評価、臨床でのモニタリングを想定した安全性の評価が求められている。医薬品の開発する上で、毒性試験においては適切な動物種を選択することが重要であり、*in vivo* 試験に加え *in vitro* 試験と併せて検討する事が知見をヒトに外挿する上で有用と考える。

ハムスターはラットやマウスと同じげっ歯類で、病態や生理機能の解明にあたり実験動物として大いに役立ってきた。例えば、SV40 が癌ウイルスとして注目を浴びたのは新生ハムスターへの SV40 接種実験がきっかけであり、ハムスターのあらゆる部位に腫瘍が発生することにより証明された[103]。それ以来、ゴールデンハムスター (別名シリアンハムスター) は寄生虫やウイルス感染の病

態解析に利用されている[104-107]。最近になって、抗体やワクチンを用いたエボラ出血熱や HIV に対する抗ウイルス薬に注目が集まり、有効性や安全性を検証する上でハムスターを用いて開発が進められている[108-110]。しかしながら、ハムスターに関する Fc 受容体研究はマウスやサルに比べて進んでいないのが現状である。Fc 受容体研究の意義として、抗体は生体内で Fc 受容体を介して機能を発揮することが知られている。抗体の Fc 受容体を介した抗ウイルス作用機序として、NK 細胞等のエフェクター細胞による ADCC (Antibody-dependent cellular cytotoxicity) や ADCVI (Antibody-dependent cell-mediated virus inhibition) 、 ADCP (Antibody-dependent cellular phagocytosis) が挙げられる[111, 112]。Baum らの AIDS コホート研究によると、病態の進行が早い患者体内では ADCC 活性を有する抗体が顕著に少ないことが知られている[113]。獣医学の分野においても、アフリカ豚コレラ熱予防を目的として ADCC 活性を有する抗体の抗ウイルス作用が確認されている[114]。非臨床の動物試験では、ADCC 活性を増強したフコース非修飾体とフコース修飾体の比較についてサルに投与した研究例があり、SHIV (Simian-human immunodeficiency virus) に対する抗ウイルス作用は確認されなかった[115]。しかし、サルやマウスを用いた別の疾患モデルでは ADCC 活性増強抗体によってより高い薬効が確認されている[116, 117]。よって、抗体の ADCC 活性が抗ウイルス作用に重要であることは知られているものの、ADCC 活性増強抗体の抗ウイルス作用への寄与については不明な部分が多い。今後、ADCC 活性増強型の抗ウイルス抗体を研究開発する際には、Fc 受容体研究を及び抗体との結合評価系を構築する事がヒト外挿性改善の鍵となる。ADCC 活性に関与する Fc 受容体研究例としては、ヒト FcγRIIIa やサル FcγRIII を可溶性タンパク質として調製し、ヒト抗体 Fc との相互作用解析に使用されている[118, 119]。げっ歯類では FcγRIV がヒト FcγRIIIa のオーソログで、マウス FcγRIV については

マウス IgG サブクラス解析時に可溶性タンパク質が調製され、マウス IgG2a と IgG2b に結合する受容体として特定された[120, 121]。一方で、ハムスターFcγRIV については、細胞外ドメインを可溶性タンパク質として取得した報告例は見当たらず、更にハムスターFcγRIVとヒト抗体 Fc との結合解析並びに ADCC 活性増強型であるフコース非修飾抗体との結合解析については殆ど検討されていない。以上の背景より、フコース修飾抗体のハムスターでの抗ウイルス作用検証等への活用を目的として、今回 CHO 細胞の安定発現系によりハムスターFcγRIV タンパク質 (以下、ham FcγRIV) の取得を試み、糖鎖フコース有無による抗体 Fc への結合性の影響を評価した。

3-2. 実験材料と方法

Fc 受容体のクローニングと発現ベクターの構築

ハムスターFcγRIV細胞外ドメインに該当するアミノ酸配列を文献より入手した[28]。バイオインフォマティクスツールを使用してシグナルペプチダーゼ認識箇所の推定及び CHO 細胞に対応する至適コドンに変換後、C 末端側にヒスチジン残基が 6 つ連続した His タグを付加した配列を設計した。シグナルペプチドについては、ハムスターFcγRIV由来天然配列及び本論文第二章における研究で使用したマウス抗体軽鎖由来天然配列とその改変配列を選択した (表 3-1.) [122]。pKANTEX ベースの動物発現用ベクター[118]を使用し、人工合成した上記インサートを In-Fusion HD Cloning Kit (Takara) で挿入後、シーケンス確認してハムスターFcγRIV発現ベクターとして遺伝子導入に使用した。

表 3-1. 大腸菌で機能する各種シグナルペプチド及び本試験で使した配列

名称	配列	C 末端
Eukaryotic signal peptides		
Hamster FcγRIV (Original)	MWQLLLPTALLLVSSGIRA	IRA
a native mouse antibody (SSS)	MKL <u>P</u> VRLLVLMFWIPASSS	SSS
Ala at positions -3 and -1 (ASA)	MKL <u>P</u> VRLLVLMFWIP <u>A</u> ASA	ASA
Prokaryotic signal peptides		
OmpA	MKKTAIAIAVALAGFATVAQA	AQA
Pel B	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	AMA

ハムスターFcγRIV発現細胞造成と培養

難発現性を回避すべく、宿主細胞として ECACC (European Collection of Cell Cultures) より入手し、無血清馴化した CHO-K1 細胞株を用いた。エレクトロポレーション装置 GENE PULSERII (Bio-rad) を用いて上記発現ベクターを当細胞に遺伝子導入後、IS CHO-CD XP (Irvine Scientific) をベースに 2 mM (mmol/L) L-glutamine (Gibco)、50 µg/mL Gentamicin sulfate solution (Nacalai) を添加した培地に播種して旋回培養した。生存率が 90%に回復したところで、500 µg/mL Hygromycin B solution (Wako) を上記培地に添加したもので培養し、薬剤選抜後に再び生存率が回復するまで旋回培養を継続してハムスターFcγRIV発現細胞株を安定発現プールとして調製した。次に、ham FcγRIVタンパク質取得を目的として生産用培地 BalanCD CHO GROWTH A (Irvine Scientific)、2 mM L-glutamine、50 µg/mL Gentamicin sulfate、200 µg/mL Hygromycin B solution に上記安定発現細胞を 3×10^5 cells/mL となるように播種して、250 mL 培養を 1 L 三角フラスコ (Corning) 2 本で開始した。培養 1, 3, 6 日目にフィード培地として BalanCD CHO FEED 1 (Irvine Scientific) をマニュアルに従って添加した。培養 13 日目に培養上清を回収し、0.22 µm ボトルトップフィルター (Thermo

Scientific) でろ過処理したものを精製に使用した。

ハムスターFcγRIVの精製及び分析

培養上清中の ham FcγRIV発現を His-Tag Detection ELISA Kit (Cayman chemical) を用いて確認後、Ni NTA Agarose (Invitrogen) を用いた金属キレートアフィニティークロマトグラフィー (IMAC) によって以下の方法で精製した。His Buffer Kit (GE healthcare) に含まれる平衡化バッファーでレジン平衡化し、培養上清を通塔した後に洗浄バッファーで洗浄した。続いて、イミダゾールを含む溶出バッファーで ham FcγRIVを溶出させ、Nanodrop8000 (Thermo Scientific)で 280nm の吸光値を測定し、吸光値の高い溶出画分を回収した。NAP10 (GE healthcare) を用いて D-PBS (Nacalai、以下 PBS) にバッファー交換し、濃度調整する為に Amicon Ultra -4 Ultracel -3K (MilliporeF)で遠心濃縮した。ham FcγRIVの分析には、Mini-PROTEAN TGX gels と Mini-PROTEAM System 及び Trans-Blot Turbo Transfer Pack と Trans-Blot Turbo Transfer system (Bio-rad) を用いて、SDS-PAGE 及び Western Blotting を実施した。マーカーには Precision Plus Protein Standards (Bio-rad) を、His タグ検出抗体は Anti-His (C-term) -HRP (Novex by Life Technologies) 、発光試薬は Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore) を用いた。CBB 染色後のゲルや PVDF 膜上の発光画像は LAS4000 mini (FUJI FILM) で検出し、付属ソフトウェアで解析した。

バイオレイヤー干渉法 (BLI) による結合解析

BLI を測定原理とする BLItz (Pall ForteBIO) は光ファイバーセンサーの干渉波を検出する装置であり、センサー表面に分子が結合すると波長シフトの変化が

生じ、リアルタイムに結合反応を測定することができる (図 3-2.) [123]。センサー上に結合した ham FcγRIV と抗体 Fc との結合性を BLI 法にて解析するため、His タグを認識するビオチン化抗体がストレプトアビジンを介して固相表面上に結合された anti-Penta-HIS (HIS1K) バイオセンサー (Pall ForteBIO) を使用した。まず、PBS で水和したバイオセンサーに同バッファーに溶解した 0.3 mg/mL ham FcγRIV を波長シフトが 1nm に達するまで浸し、固定化条件を一定にした。抗体 Fc との結合を測定するため、DNP を標的とするヒト IgG1 型のフコース非修飾抗体及びフコース修飾抗体を PBS で各濃度に調製して添加し 60 秒間インキュベートした。その後、PBS を添加したチューブにバイオセンサーを浸して 30 秒間インキュベートし乖離の様子を観察した。レファレンスとして、PBS バッファーのインキュベーションで得たシグナルを差し引いたセンサグラムを取得すると同時に、抗体結合飽和時のシグナル値をグラフ化した。His タグ融合タンパク質のコントロールとして使用した HER2 は既報文献[122]の方法で調製したものを使用した。

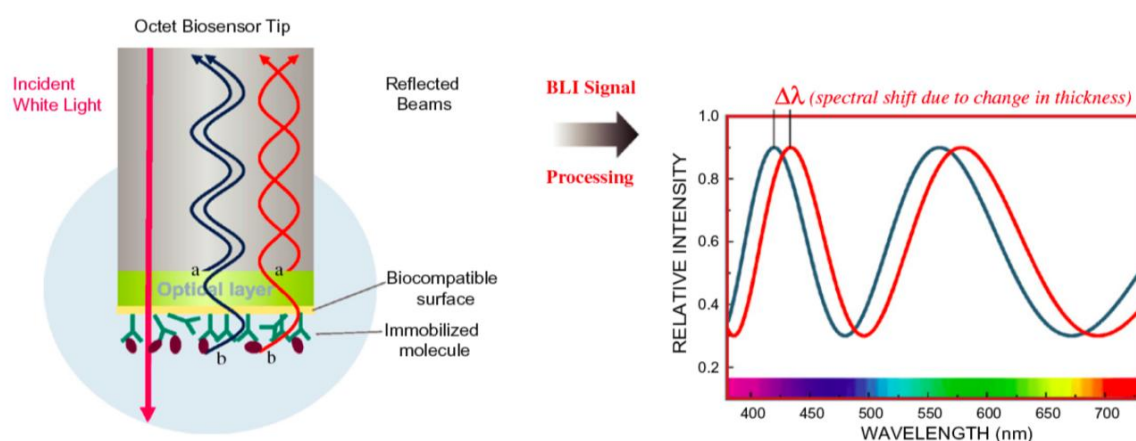


図 3-2. Bio-Layer Interferometry によるシグナル検出の原理 (文献[123]より引用)

細胞培養とフローサイトメトリー (FCM) 解析

げっ歯類 FcγRIVはマクロファージ細胞上に発現している報告[124]があるため、ハムスター由来マクロファージ細胞株 HM-1 を結合評価に用いた。JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources) より HM-1 (JCRB1208) を入手し、10% FBS, 0.5% PenStrep (Gibco) を添加した RPMI1640 培地 (Nacalai) で CELLSTAR 静置用培養フラスコ 250 mL (Greiner bio-one) を用いて培養した。細胞バンクの指定する方法で継代後、安定かつ十分に細胞が増殖してきた段階で FCM 評価に以下の方法で供した。まず、HM-1 細胞を細胞用溶液 (1% BSA-PBS (Nacalai), 0.02% azide) に調製し、セルストレーナー (Falcon) に通した細胞液を 50 μ L/well で 96 well U-Bottom プレート (Falcon) に添加した。当細胞液に対し、各種濃度に調製した DNP を標的とするヒト IgG1 型の低フコース抗体及びフコース付加抗体を 50 μ L/well で 3 ウェルずつ添加して、1 時間 4°C でインキュベートした。その後、プレートを遠心分離し上清除去後に細胞用溶液 200 μ L/well で 3 回洗浄した。続いて、同溶液に 4000 倍希釈した Alexa Fluor 488 Goat Anti-Human IgG (H+L) (Invitrogen by Thermo Scientific) を 50 μ L/well 添加して懸濁後、遮光して 1 時間、4°C インキュベートした。その後、上記と同様の遠心分離と洗浄操作を実施し、FCM 装置である BD FACS CantoII (Becton Dickinson) を用いて HM-1 細胞への抗体結合を検出した。取得したヒストグラムの FCS データを FlowJo ソフトウェアで解析した後、各ウェルから得られたヒストグラムの中央値を棒グラフ化した。

アミノ酸配列の相同性解析 (BLASTP)

BLAST は相同性を有する配列比較のプログラムであり、BLASTP は相同性を持つアミノ酸配列を検索するプログラムである。NCBI (National Center for Biotechnology Information) より各種 Fc 受容体のアミノ酸配列を取得し、ハムスターFcγRIVの配列をクエリーとして、マウス FcγRIV及びカウンターパートとなるヒト FcγIIIa の配列を並べて比較した。ハムスターFcγRIVの糖鎖付加部位については、N 型及び O 型糖鎖付加のコンセンサス配列から予測するプログラムを用いて特定し、その部位を表記した。

3-3. 結果と考察

ハムスターFcγRIV発現細胞の造成と培養

Fc 受容体発現細胞の造成にあたり先行例を参照すると、サル Fc 受容体の一部は細胞膜上への発現細胞株で結合評価を実施している[119]。よって、Fc 受容体の中には可溶性タンパク質として取得困難な場合が想定され、ham FcγRIV発現ベクター構築においては複数のシグナルペプチドを検討した。シグナルペプチドはタンパク質の移行や局在に関与し、リコンビナントタンパク質の発現量に大きな影響を与えることが知られている。しかしながら、シグナルペプチド中のアミノ酸残基の特徴と発現量の関連性は十分に解析されておらず、個別に検討しているのが現状である。今回、ハムスターFcγRIV由来のシグナルペプチドに加え、第二章の研究で使用したマウス抗体軽鎖由来のシグナルペプチドとその改変ペプチドを検討した。表 3-1. に、本検討で使用したシグナルペプチドの特徴を示すため、原核生物を宿主とする場合に良く利用される OmpA 及び pelB と比較した。下線部は疎水領域 (h-region) を指すが、ハムスターFcγRIVの

シグナルペプチド (Original) は疎水領域が N 末側に偏っている。更に、太字で示した C 末側はシグナルペプチダーゼ切断に関わるアミノ酸配列だが、アルギニン(R) やイソロイシン (I) を含み、アラニン (A) やセリン (S) よりも比較的大きいアミノ酸残基を含んでいるという点でも特徴的である。OmpA 及び pelB の C 末端に位置する 3 つの配列は AXA となっており、これは原核生物でのタンパク質発現にて重要な配列の一つである。マウス抗体軽鎖由来のシグナルペプチドの C 末端側はセリンが 3 連続続いた配列 (SSS) を有しており、本報告書著者の別の研究で CHO 細胞では抗体発現を確認したものの大腸菌での抗体発現では顕著な発現量低下を確認した。C 末端側の 1 番目と 3 番目をアラニンに改変した配列 (ASA) は、大腸菌と CHO 細胞の双方で抗体発現できるように人工設計したものであり、今回 CHO 細胞を用いた ham FcγRIV 発現への適応について評価した。ham FcγRIV には一次配列から糖鎖結合予測サイトが 6 箇所あり、糖鎖が Fc 受容体結合に関与する可能性を否定できないことから、糖鎖の翻訳後修飾がされない大腸菌発現検討は本研究では実施しなかった。また、宿主の CHO 細胞について補足すると、大きく CHO-K1, -DXB11, -DG44 の系統に分類され、工業用細胞として用いられる。CHO-DXB11, DG44 は葉酸代謝の要求性を利用した選択系として、広く使用されているものの、細胞増殖速度が低い傾向にあることが知られている[125]。今回、高密度培養による収率向上を期待して、宿主の系統として CHO-K1 の亜株を選択した (図 3-3.)。

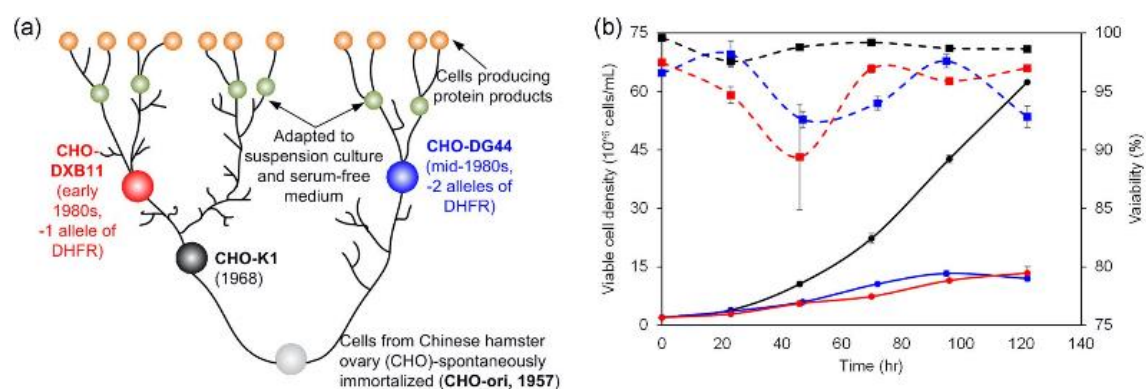


図 3-3. CHO 細胞の各種亜株と細胞増殖特性 (文献[125]より引用)

CHO 細胞は CHO-ori (1957) を起点として、主要な亜株として大きく CHO-K1 (1968), -DXB11 (early-1980s), -DG44 (mid-1980s) の系統に分類され、工業用細胞として用いられる (a)。CHO-DXB11, DG44 は当初は葉酸代謝の要求性を利用した選択系として使用されてきたが細胞増殖速度が低く、選択系を含むベクター改良と共に CHO-K1 の宿主利用が見直されている (b)

シグナルペプチドを付与した発現ベクターは、エレクトロポレーションによって細胞に導入され、ハイグロマイシン B 添加によってベクターがゲノムに組み込まれた細胞のみが選抜される。ハムスターFcγRIV由来のシグナルペプチド (Original) を付加した場合にはハイグロマイシン B 添加後に生存率が回復せず、結果として耐性株を得ることができなかった。その一方で、マウス抗体軽鎖由来のシグナルペプチド (SSS) と改変ペプチド (ASA) については、タンパク質発現が改善されたものと推察され、結果として薬剤耐性株を取得することが可能となった (図 3-4.A)。次に、当安定発現株を用いて 13 日間のフェドバッチ培養を実施したところ、培養 9 日目で 10⁷cells/mL レベルに到達し、その後の生存率も 85%以上を維持して培養終了した (図 3-4.B)。His-Tag Detection ELISA Kit は His タグ融合タンパク標品との競合により、培養上清中の His タグ融合タ

ンパク質を簡易的に検出できる測定系である。測定の結果、暫定値として培養上清中の ham FcγRIVタンパク質はマウス抗体由来の未改変シグナルペプチド (SSS) で約 2.5 mg/L, 改変ペプチド (ASA) で約 5.3 mg/L と算出された。今回の培養液から ham FcγRIVタンパク質の取得見込みが得られたことから、IMAC 精製に供した。

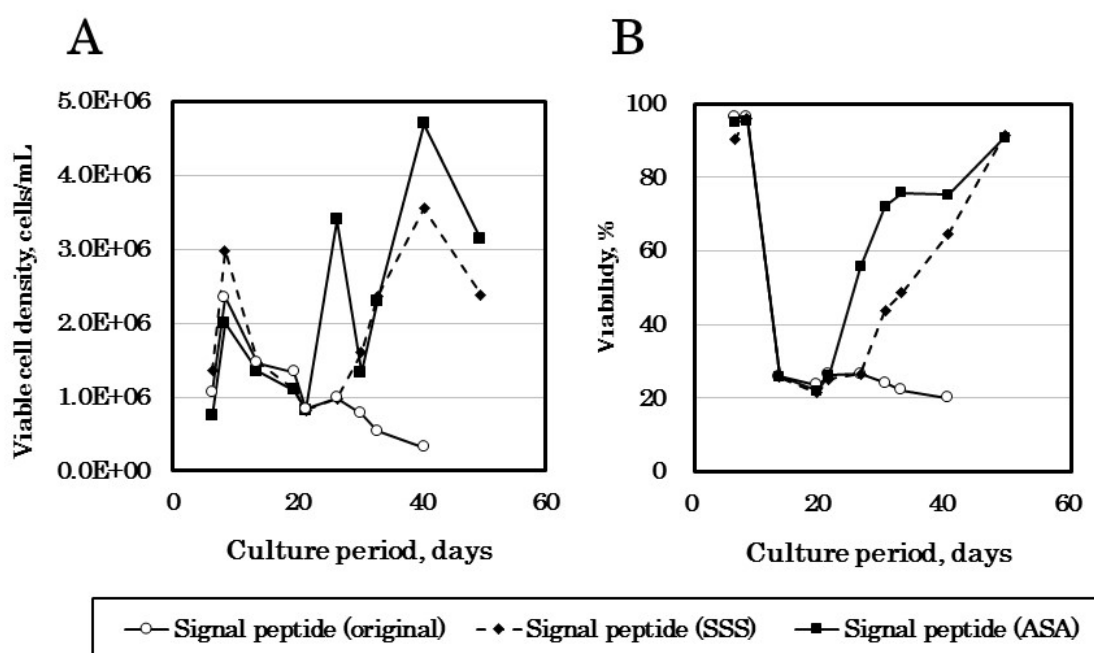


図 3-4. 薬剤耐性によるハムスターFcγRIV安定発現株プールの調製

シグナルペプチドを設計した発現ベクターをエレクトロポレーションにて遺伝子導入後、安定発現株プールを取得するため、ハイグロマイシンを添加した培養で培養を継続した。細胞プールの(A) 生細胞密度及び(B)生存率を測定したところ、シグナルペプチドによって安定発現株調製に影響を与える事が判明した。original はハムスターFcγRIV由来のシグナルペプチドを、SSS は c-region 中に Ser 残基が連続するシグナルペプチドを、ASA は本論文第二章で改変したシグナルペプチドを指す。

ハムスターFcγRIVの精製及び分析

オープンカラムにレジンを 3 mL 添加後、フィルターろ過した培養液を合計 500 mL 通塔したが、目詰まり等の問題は認められなかった。溶出後の試料を Nanodrop で吸光度測定し、5 つの溶出画分のうち最初の 3 つを回収後、NAP10 で PBS に置換した。レジン通塔後の溶液 (Flow through) と溶出画分の試料 (Elution) をゲルに展開して SDS-PAGE (図 3-5.A) と Western Blotting (図 3-5.B) に供したところ、溶出画分の試料にて約 30 kDa 付近に目的のバンドを検出した。一次配列から計算された ham FcγRIV の理論分子量は 19231 であるが、6 箇所 N 型糖鎖結合サイトがあり N 型糖鎖の平均分子量 1800 を 6 つ分加算すると合計 30kD 程度となる。よって、想定分子量と一致すると算出され、目的の ham FcγRIV を取得できたと考えた。一方で、糖鎖ヘテロ性に加え切断体と思われるバンドが含まれることも確認した。更に、バッファー交換と濃縮後の収率が悪く、最終的な取得量が 0.3mg 以下であった。

よって、本試料には目的の品質を含む分子を含む可能性があるものの、SDS-PAGE (図 3-5.A) の結果の通り、夾雑物も含まれている。再度培養を実施したり、洗浄条件を変更したもののこの点は改善できず、根本的にはアミノ酸改変等による物性改善を通じた発現向上を必要とする可能性も考えられる。しかしながら、本研究は種差解析の一助として抗体との結合評価系を構築する目的であることから、天然型に拘わって当試料の粗精製レベルに対応した検出法を選択することとした。

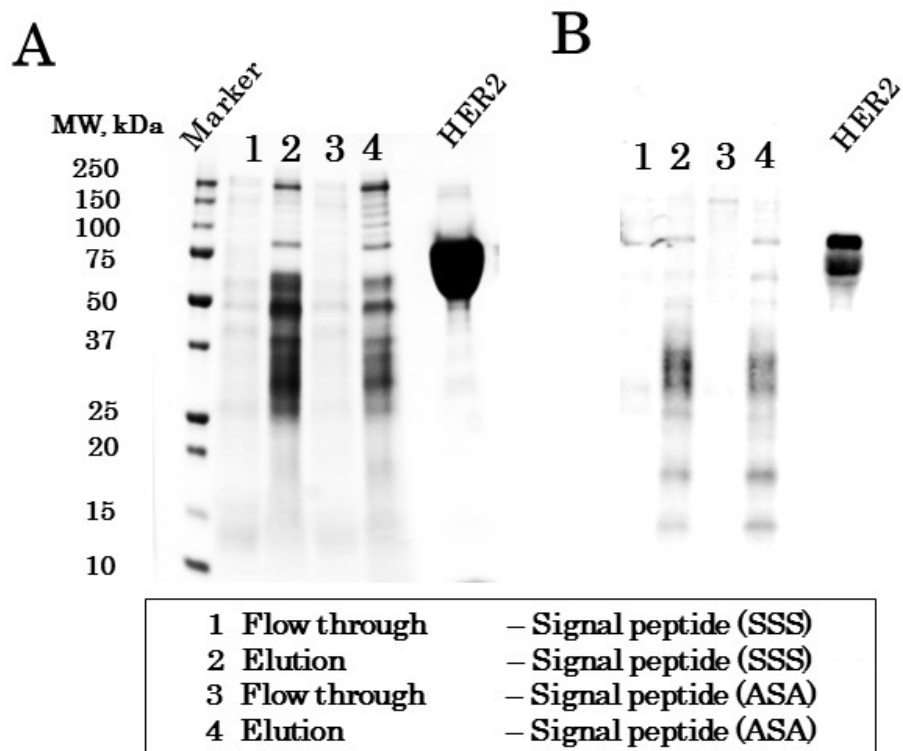
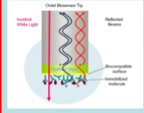
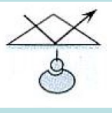






図 3-5. ハムスターFcγRIVの SDS-PAGE と Western Blotting 分析

IMAC 精製後の素通り画分 (Flow through) と溶出画分 (Elution) を、自家調製した HER2 タンパク質とともに(A) SDS-PAGE と(B) Western Blotting に供した。Western Blotting にて抗 His (C-term) 抗体を用い、約 30kDa 付近にある目的バンドを検出した。

表 3-2. 生体分子間相互作用の検出法の比較 (文献[123]及び東京化学同人「ポストシーケンスタンパク質実験法」より引用)

	BLI	SPR	ITC	QCM	ELISA	Gel shift assay
						
プローブ	不要	不要	不要	不要	酵素結合抗体	放射性同位体
感度	~10ng	~10ng	~1mg	~10ng	~100pg	~100pg
試料の高度な精製	不要	必要	必要	必要	不要	不要
結合の絶対量	×	△ RI標識	×	○	×	×
速度論解析	△ 高度な精製	○	×	○	×	×

生体分子間相互作用の検出法の選定

序章で述べた通り、ポストゲノムシーケンス時代においてタンパク質を始めとする相互作用を解析する研究手法が発展した。表 3-2.に生体分子間相互作用の検出法について特長をまとめた。ELISA や Gel shift assay による高感度の検出法が従来用いられていたが、プローブを必要とする。SPR, ITC, QCM はそれぞれ原理を異とするものの、プローブを必要としない点で共通する。しかしながら、複数のクロマトグラフィー工程を経る等して試料を高度に精製する必要があった。BLI は光ファイバーを基盤としたラベルフリーによる生体分子間相互作用の検出法であり、BLItz はマイクロ流路を使用せず、試料中の非結合分子は干渉波に一切影響を及ぼさない。細胞抽出液や血清などのクルードサンプルでも使用が可能という点で利点がある。よって、微量でかつ粗精製レベルでも結合解析が期待できる装置として BLItz を選択し、目的とする抗体 Fc との結合解析に使用可能かどうか検証する事とした。

ハムスターFcγRIVとヒト抗体Fcとの相互作用解析

バイオセンサーへのリガンド固定化を目的として ham FcγRIV の結合を確認すべく、取得した試料に加えて HER2 を 120 秒間インキュベートさせた。当センサーは His タグを認識する抗体が固定化されたもので、HER2 を用いて結合確認された条件において、マウス抗体軽鎖由来シグナルペプチドを付加して調製した ham FcγRIV (SSS ham FcγRIV) 及び改変ペプチドを付加して調製した ham FcγRIV (ASA ham FcγRIV) がともにセンサーに結合することを確認した (図 3-6.)。両者を比較すると、SSS ham FcγRIV が ASA ham FcγRIV よりも飽和後の結合シグナルが高い値を示したことから、前者を以降の結合解析に使用することとした。

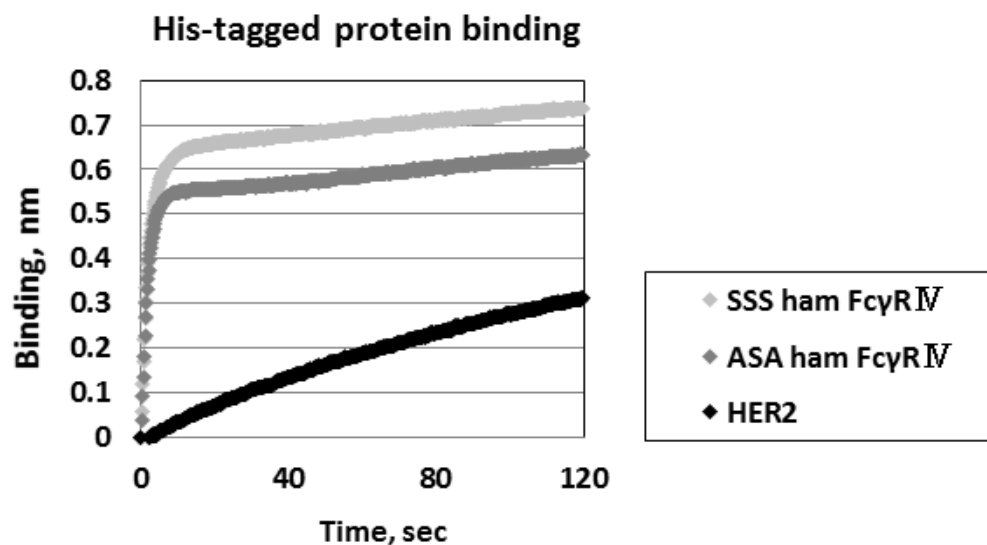


図 3-6. ハムスターFcγRIVのバイオセンサーへの結合確認

バイオセンサーへの結合を BLItz を用いて実施した。同濃度に調製してインキュベートしたところ、マウス抗体軽鎖由来シグナルペプチドを付加して調製した ham FcγRIVタンパク質 (SSS ham FcγRIV) で高い結合シグナルが得られた為、以降の実験ではこのサンプルを抗体との結合実験に使用することとした。

次にフィージビリティ評価として、ham FcγRIVと HER2 を同定度の波長シフトまで固定化したバイオセンサーに、アナライトとして HER2 を標的としな
いヒト IgG1 抗体を 120 秒間反応させ、続いて 80 秒間 PBS 中に浸して乖離させ
た。その結果、ham FcγRIVと当抗体の結合を検出し、BLI 法による結合評価が
機能することを確認した (図 3-7.)。

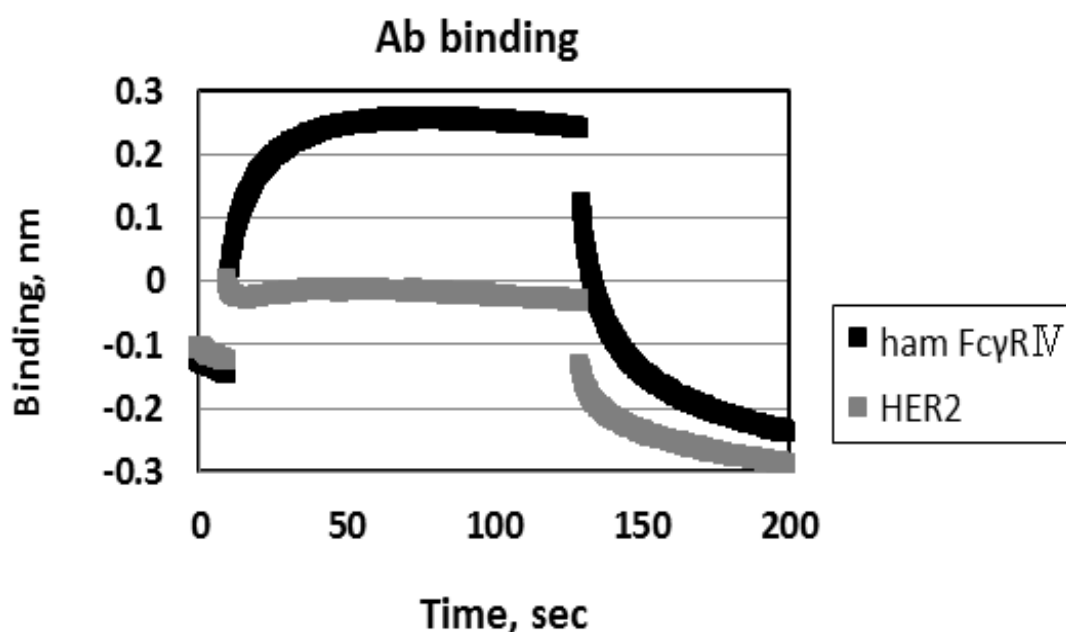


図 3-7. 固定化した ham FcγRIVタンパク質とヒト抗体との結合確認

BLItz を用いてバイオセンサーに固定化した ham FcγRIVとヒト抗体 IgG1 型抗体との結合を確認した。HER2 及び ham FcγRIVを波長シフト 1nm に達するまで結合後、ヒト IgG1 抗体 0.3mg/mL を添加したところ、ham FcγRIVとの結合を検出した。

最後に、抗体 Fc に結合する糖鎖フコースの有無による結合性を評価するため、DNP を標的とするヒト IgG1 型のフコース非修飾抗体及びフコース修飾抗体を使用して 0.02 mg/mL から濃度を 3 倍ずつ上昇させて結合シグナルを得た後、レファレンスとして PBS 添加時の値を差し引く事でバックグラウンドを補正した。その結果、フコース非修飾抗体では 0.56 mg/mL で結合シグナルが飽和したのに対し (図 3-8. A)、フコース修飾抗体では同レベルの結合性には至らなかった (図 3-8. B)。抗体濃度 0.02–0.56 mg/mL の条件で得られたシグナル比較を棒グラフで示したが、低フコース抗体はより高い結合を示し、濃度換算でフコース付加抗体の約 3 倍程度のレベル可能性が示された (図 3-8. C)。しかしながら、サンプルの制限上から統計処理を行う程の測定回数は実施できず、結合上昇は定性的なものといえる。よって、ハムスターFc γ RIVとヒト抗体 Fc の結合を別の評価系で解析する必要があると考え、研究材料を変えて結合評価系を構築することを試みた。

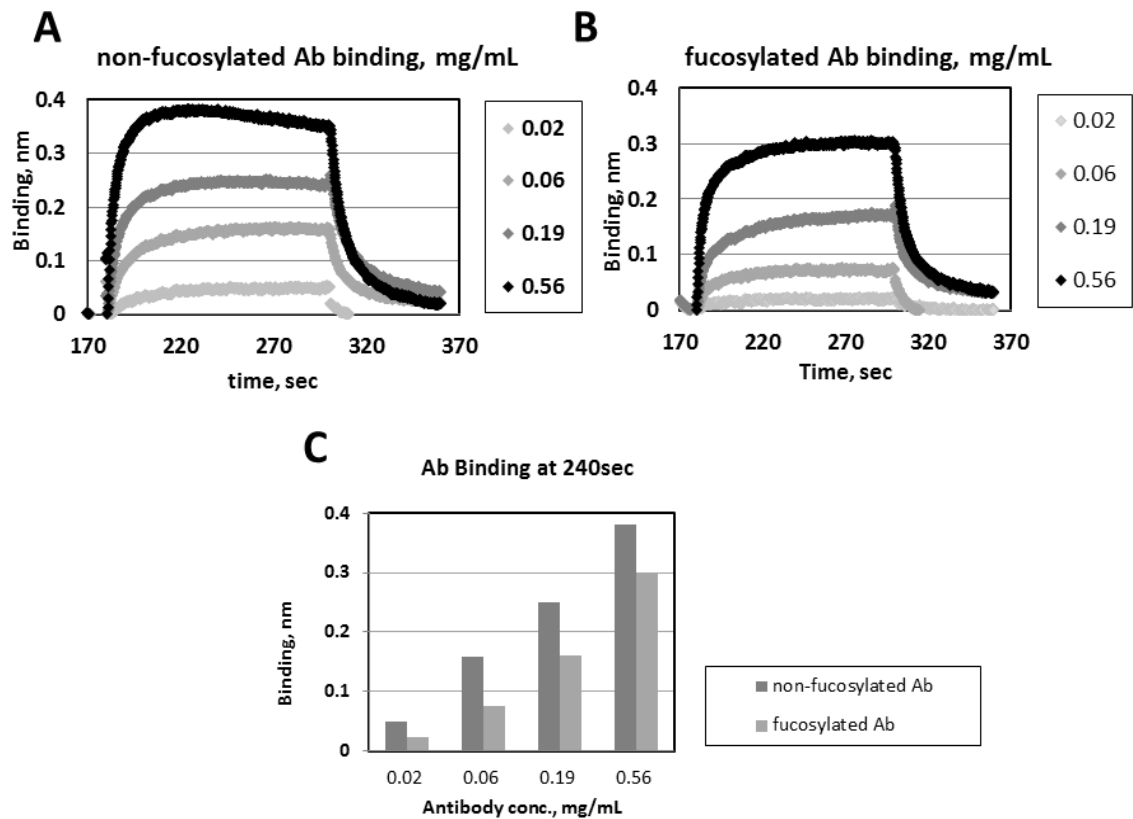


図 3-8. ハムスターFcγRIVタンパク質と DNP 抗体を用いた BLI 解析

DNP を標的とするヒト IgG1 抗体を用いて、バイオセンサーに固定化した ham FcγRIVと (A) フコース非修飾抗体及び (B) フコース修飾抗体との結合について BLItz を用いて測定し、(C) 抗体結合反応の平衡を示す時点での結合値をグラフ化した。0.06mg/mL と 0.19mg/mL の比較において、フコース非修飾抗体はフコース修飾抗体より高い結合活性を示した。

ハムスターFc γ RIV発現細胞によるヒト抗体Fcとの結合解析

ハムスターFc γ RIVとヒト抗体Fcの結合を別の評価系で解析する為、ハムスターFc γ RIV発現細胞を用いた結合解析を試みた。マウスFc γ RIVはマクロファージに発現していることは知られているが、そもそもハムスター血球細胞のCDマーカーに関する情報や試薬がなく自前で揃える必要がある。ハムスター由来のマクロファージを入手するには、ブリューワーチオグリコレート培地添加によって刺激した数日後に安楽死処置の上、PBSで腹腔内を洗浄して初代腹腔マクロファージを回収する方法があるが操作は煩雑である[126]。別の手法として、不死化して樹立した細胞株を入手する方法があり、Miyoshiらはシリアンハムスター由来マクロファージ細胞株HM-1とHM-2を樹立した[127]。両者の見た目は生体内のマクロファージと相違ないが、倍化時間及び染色体数は異なる。今回は、JCRBより入手可能であるHM-1を使用することとした(図3-9.)。

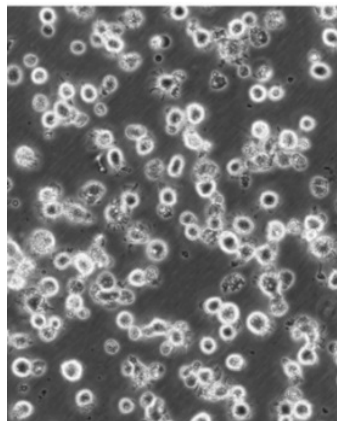


図 3-9. HM-1 細胞画像

フラスコで静置培養中の細胞を用い、顕微鏡画像を撮影した。

当細胞は浮遊しているもののフラスコ底面に付着しやすく、フラスコのタッピングと培養液の回収操作を注意深く行うことによって十分量の細胞を回収した。フコース非修飾抗体及びフコース修飾抗体を添加し、HM-1 との結合を解析したところ、抗体濃度 20, 40 $\mu\text{g/mL}$ の条件で抗体と HM-1 の相互作用が糖鎖フコースの有無で異なり、フコース非修飾抗体でより高い結合性を示す事を確認した (図 3-10.)。溶液中に遊離した抗体が残存すると、Alexa488 標識抗体と競合する懸念がある。そのため、注意深く洗浄操作を実施し、洗浄回数を増やすことでバックグラウンド値は低下したが、フコース非修飾抗体の結合性にばらつきが生じた。フコース修飾抗体での結合シグナルには同様のばらつきが生じていない為、実験操作上は問題ないと考えており、HM-1 細胞の接着し易さが影響を与えている可能性が考えられる。最後に、当細胞上のハムスターFc γ RIV発現確認を目的として、抗マウス Fc γ RIV (CD16-2) 抗体を用いて FCM 解析の可能性を検証したが、アイソタイプコントロールよりも高い結合性を確認することは出来なかった (data not shown)。従って、入手可能な試薬の制約上から HM-1 細胞上の Fc γ RIV発現を直接確認できなかったものの、糖鎖フコース有無によって HM-1 との結合が変化することを示した。その結合変化には BLI 解析結果より細胞表面上のハムスターFc γ RIVが関与している可能性が示唆された。

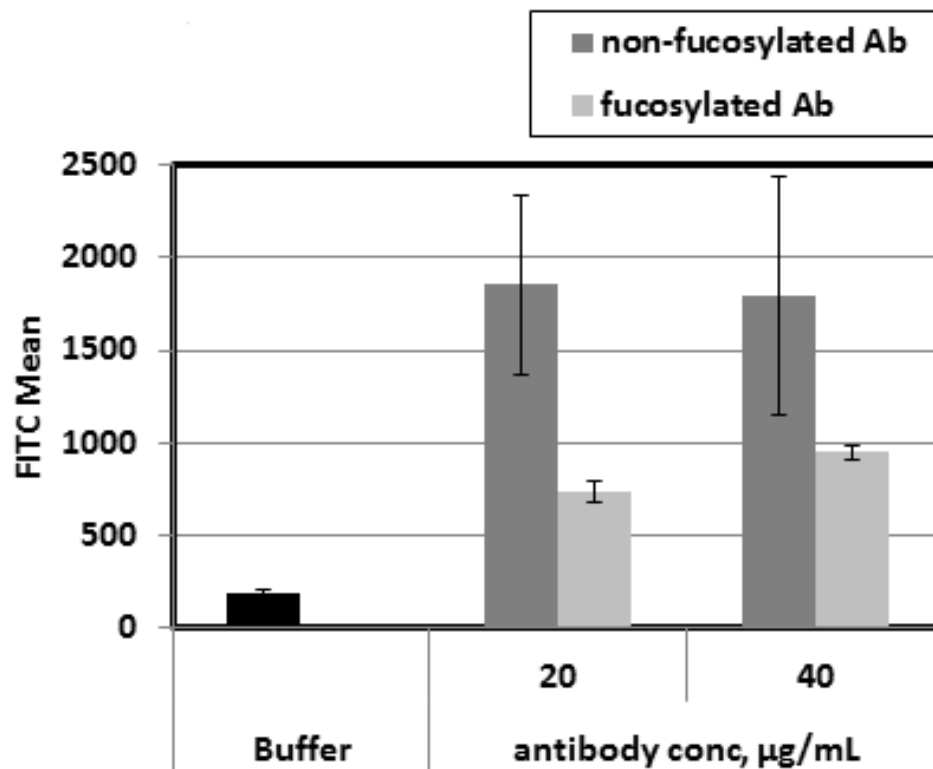


図 3-10. ハムスター細胞株 HM-1 と DNP 抗体を用いた FCM 解析

ハムスター由来マクロファージ細胞株 HM-1 と DNP 抗体を用いて、フコース修飾抗体及びフコース非修飾体との結合を BD FACS CantoIIを用いて測定した。抗体濃度 20, 40µg/mL の条件において、フコース修飾抗体はフコース非修飾抗体よりも高い結合性を示した

以上の実験で示した、フコース非修飾抗体によるハムスターFcγRIVへの結合上昇の結果を考察するため、BLASTP を用いてハムスター及びマウス FcγRIV とヒト FcγRIIIa のアミノ酸配列を比較した (図 3-11.)。ヒト FcγRIIIa における 127～132 番目の GKGRKY 配列に注目すると、130 番目のアルギニン残基 (R130) 以外はヒト、マウス、ハムスターで保存されている。図 3-12.に GKFRKY 配列におけるヒト抗体 Fc との相互作用箇所を示しており、チロシン残基 (Y296) はフコース除去によって新たに相互作用する部位である。Mizushima らによると、抗体 Fc 領域の 297 番目のアスパラギン残基 (N297) に結合する N 型糖鎖中のフコースが欠損すると、隣に位置する 296 番目のチロシン残基 (Y296) の側鎖の方向変化が生じ、ヒト FcγRIIIa における 128 番目のリジン残基 (K128) を介してヒト抗体 Fc との相互作用が新たに生ずることが提唱されている (図 3-13.)[128]。つまり、フコース非修飾抗体によるハムスターFcγRIVの結合上昇は、ヒト FcγRIIIa やマウス FcγRIVと同様のメカニズムで糖鎖フコース欠損によって新たな相互作用が生じた事によるものと考えられた。以上により、ハムスターを用いた疾患モデルで ADCC 活性増強抗体による抗ウイルス作用を検証する際には、本研究で構築した結合評価を事前に実施することでヒトの臨床予測性を高めることが期待できる。

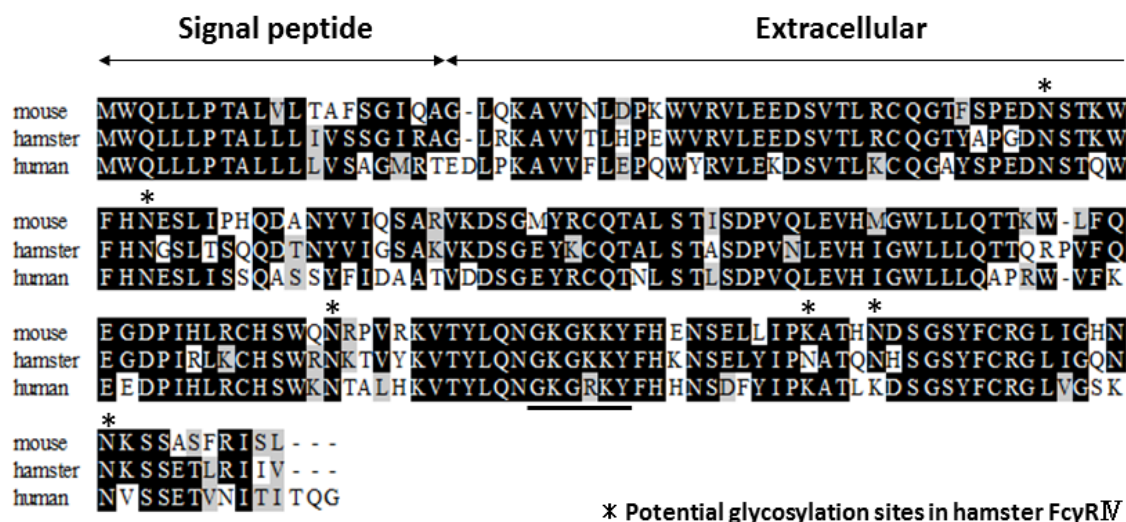


図 3-11. ハムスターとマウス、ヒトとのアミノ酸配列比較

シグナルペプチドを含むハムスター及びマウス FcγRIV とヒト FcγRIIIa のアミノ酸配列を BLAST で並べ比較した。社内バイオインフォマティクスツールで推測したハムスター FcγRIV における糖鎖付加部位をアスタリスク (*) で示した。ヒト FcγRIIIa 中の 127～132 番目である GKGRKY 配列 (下線部) のうち 130 番目のアルギニン残基 (R130) 以外はハムスター及びマウス FcγRIV において保存されており、特に 128 番目のリジン残基 (K128) はフコース非修飾抗体との相互作用に重要な役割を果たすことが知られている。

G127	Y296
K128	E294, Q295, <u>Y296</u> , N297, S298
G129	Y296, N297, S298
R130	S298
K131	E269, H268, S298
Y132	G237, P238, D265, V266,

図 3-12. GKFRKY 配列とヒト抗体 Fc の相互作用部位 (文献[128]より引用)

ヒト FcγRIIIa 中の 127～132 番目 GKGRKY 配列はヒト抗体 Fc の様々なアミノ酸残基と相互作用する。下線で示すチロシン残基 (Y296) はフコース除去によって相互作用が発生する。

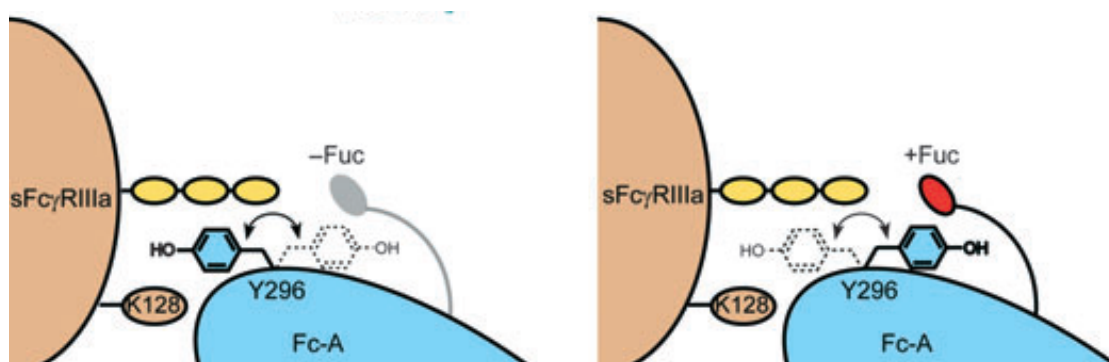


図 3-13. フコース有無による抗体 Fc とヒト $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ との相互作用 (文献[128]より引用)

抗体 Fc 中のフコースは非修飾体の場合、近傍にあるチロシン残基 (Y296) が反転することになり、ヒト $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ 中の K128 との相互作用が新たに発生する。

3-5. 結言

本研究では、ハムスター由来 $\text{Fc}\gamma\text{RIV}$ を初めて可溶性タンパク質として取得し、抗体との結合評価系を構築した。抗体医薬の創薬開発において、ヒトでの臨床予測性は喫緊の課題の一つであり、本評価系はハムスター Fc 受容体における種差を精査するための利用価値があると考えられる。ハムスターはウイルス治療抗体の薬理評価に欠かせない実験動物だが、ハムスター由来の Fc 受容体研究は進んでいないのが現状である。その要因として、Fc 受容体の一部は難発現性であることが先行研究より考えられた。今回、シグナルペプチドを含むタンパク質発現系の改良によって、ham $\text{Fc}\gamma\text{RIV}$ タンパク質を取得することに初めて成功した。更に、BLI 及び FCM 解析によって高 ADCC 活性を示すフコース非修飾抗体がフコース修飾抗体よりハムスター $\text{Fc}\gamma\text{RIV}$ に対して高い結合を示し、配列解析よりそのメカニズムがヒト $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ と同様である可能性を示した。今後の研究展開としては、更なるベクター要素の改善により ham $\text{Fc}\gamma\text{RIV}$ タンパク質

の取得量と品質を向上させ、それを免疫源とした抗ハムスターFcγRIV抗体取得が考えられる。以上より、本研究を基盤として画期的な抗ウイルス作用を目指す次世代抗体の作用機序として高 ADCC 活性の検証が進展することを期待する。

第四章

総括

第四章 総括

抗体医薬はモノクローナル抗体だけでなく ADC や Fc 融合タンパク質、バイスペシフィック抗体等、多種多様に発展して医療に貢献してきたものの、未だにアンメットメディカルニーズは数多く存在する。抗体医薬の課題として薬効増強、副作用低減、コスト低減を挙げて論じたが、医薬品としての有効性と安全性を担保する為には、創薬過程において抗体作製・抗体生産・品質物性・作用機序解析等、多岐にわたる基盤技術と相当な開発期間を必要とする。それら基盤技術の改良や研究を通じて新たな知見を得ることで更なる革新的創薬や開発の効率化が期待される。

本学位論文では、抗体医薬の創薬基盤技術の中核に位置するタンパク質発現系に着目して CHO 細胞と大腸菌の双方に機能しうるシグナルペプチドを確立し、シグナルペプチドや宿主を含めたタンパク質発現系の改良によって抗体生産基盤だけでなく、難発現性の Fc 受容体の調製法、フコース非修飾抗体との結合活性測定系を構築することで、創薬基盤技術への実装や研究開発の効率化を目指している (図 4-1.)。

本論文第二章では、抗体生産におけるシグナルペプチドの研究に着目した。抗体分子はそのサイズや特性、目的に応じて、生産宿主として CHO 細胞と大腸菌の双方を使い分ける場合があり、生産システムの設計は宿主を考慮して個別に実施しなければならない。その過程において、シグナルペプチドはタンパク質発現系において重要な発現構成要素であるにも関わらず、宿主の種選択性について十分に研究されていなかった。多数のシグナルペプチドが同定され配列比較されてきたが、宿主の種を越えたシグナルペプチド活用が進まない背景として、先行研究は細菌や酵母を対象にしたものが殆どであることも要因の一つである。

今回、シグナルペプチドの C 末端である **c-region** の重要性に着目し、アミノ酸残基の改変により CHO 細胞と大腸菌の双方で発現機能するシグナルペプチド創出に成功した。**c-region** における-3 番目と-1 番目のアミノ酸残基の重要性については、先行研究において大腸菌由来シグナルペプチダーゼIの認識と切断に重要であることが報告されていた。特に、-1 番目のアミノ酸については、グリシン (Gly) やセリン (Ser)、アラニン (Ala) の様な小さい側鎖を有する分子が効率的なタンパク質の分泌に重要である。本研究においては、最初にシグナルペプチドの-1 番目から-3 番目にセリン (Ser) が連続するマウス抗体軽鎖由来のシグナルペプチドを用いて抗体発現における種を越えた互換性の可能性について検証したが、大腸菌での Fab 発現は確認されなかった。Ala は Ser や Gly に比べると側鎖が小さく非極性という意味で特徴的である。実際に、-3 番目と-1 番目のセリンをアラニンに置換することで大腸菌での Fab 発現が劇的に向上する結果となった。Ala への改変に当改変シグナルペプチドは CHO 細胞における IgG 発現においても機能を保持し、抗原結合を有する IgG 抗体調製での利用にも可能であることを確認した。決定的に Ala が重要であった理由としては、シグナルペプチダーゼIの基質特異性によるものと考ええる。シグナルペプチダーゼIでの **c-region** における-1 番目と結合する S1 ポケットはとても小さく、非極性残基で囲まれていることから妥当と考える。上記の結果により、原核生物である大腸菌と真核生物である CHO 細胞の種を越えて、抗体発現を目的に相互利用可能なシグナルペプチド取得に成功した。

本論文第三章では、取得したシグナルペプチドを起点として、難発現性の Fc 受容体の取得および抗体との結合評価系の構築を試みた。抗体医薬開発において、ヒトでの臨床予測性は重要課題の一つであり、適切な疾患モデル動物による評価に加え、実験動物とヒトとの種差に関して Fc 受容体への結合性を評価する

ことが重要である。ハムスターFcγRIVはヒト FcγRIIIa のオーソログであり、抗体機能をハムスターで薬理評価する際に重要な Fc 受容体分子であるが、これまでにハムスターFcγRIVを可溶性タンパク質として取得した報告例はみあたらなかった。更にハムスターFcγRIVとヒト抗体 Fc との結合解析並びに ADCC 活性増強型であるフコース非修飾抗体との結合解析については殆ど検討されていない。

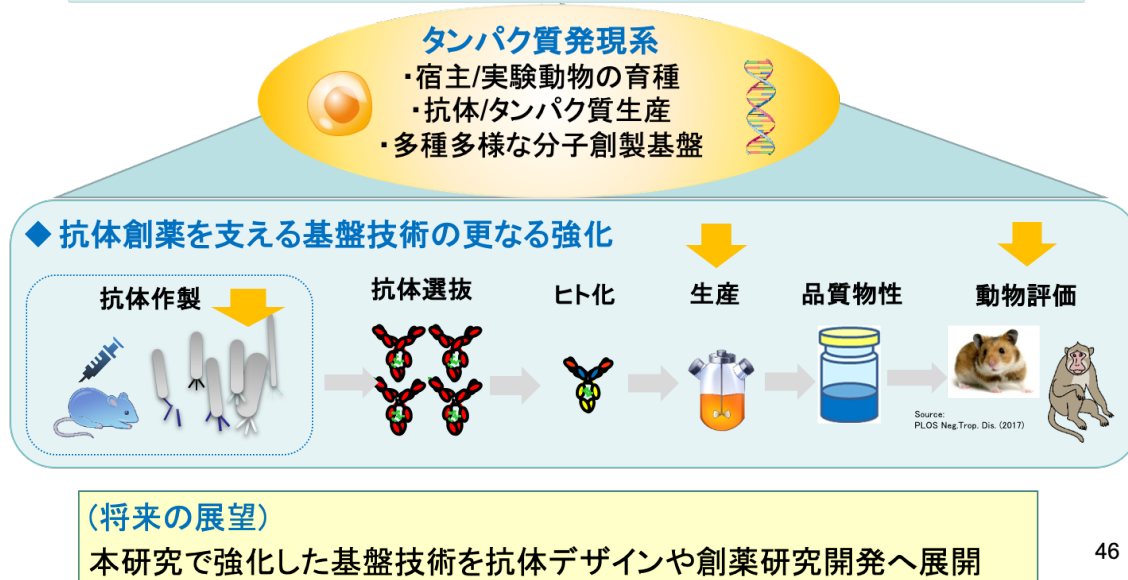
フコース修飾抗体のハムスターでの抗ウイルス作用検証等への活用を目的として、今回 CHO 細胞の安定発現系によりハムスターFcγRIVタンパク質の取得を試み、糖鎖フコース有無による抗体 Fc への結合性の影響を評価した。当初、ハムスターFcγRIV由来シグナルペプチドを用いて安定発現細胞の取得を試みたが、薬剤耐性株を取得することができなかった。そこで、第三章で使用したシグナルペプチドを検討したところ、薬剤耐性株を取得することができ、それによって抗体 Fc との結合評価系を構築することを可能にした。ヒト IgG1 型抗体には DNP を標的とするフコース非修飾抗体及びフコース修飾抗体を用いた。微量かつ粗精製レベルでもタンパク質の結合解析が可能である BLI 法を選択し、ham FcγRIVの IgG1 ヒト抗体 Fc に対する結合性を評価したところ、フコース非修飾抗体はフコース修飾抗体に比べて ham FcγRIVへの結合が濃度換算で約 3 倍程度に上昇した。げっ歯類における FcγRIV発現プロファイル情報より、ハムスター由来マクロファージ細胞株 HM-1 を抗体結合評価に用いたところ、FCM 解析によってもフコース非修飾抗体による結合上昇が確認された。以上の結果より、ham FcγRIV及び HM-1 細胞株を用いた結合評価系を構築し、フコース非修飾抗体の当受容体に対して結合上昇する事を示した。

本論文を通じて強化した抗体創薬基盤は、更なる研究や革新的創薬を推進する際の研究ツールとして活用することができる。例えば、大腸菌は安価な培地において増殖速度が速いことや、ファージディスプレイとの組み合わせが可能であ

ることから、その生産基盤を活かして特殊な作用機序を有する独自の抗体フォーマットのスクリーニングへの応用が期待できる[92]。抗体医薬はエフェクター機能以外にも注目して、IgG 以外のサブクラスの創薬の可能性が検証されており、近年では天然型フォーマットに囚われない次世代抗体開発も進められている[108, 129]。

抗ウイルス抗体はエボラ出血熱や HIV、インフルエンザウイルス、最近では SARS-CoV-2 に対する創薬研究が盛んに実施されている[130]。しかしながら、抗ウイルス作用はヒトでの効果を確認する前に、動物を用いて十分に安全性や作用機序について検討しなければならない[131]。ウイルス感染後に体内で中和抗体が発生した患者が再び感染すると感染症状が重症化することが知られているが、ADCC 活性を作用機序とする抗ウイルス抗体はその症状を予防する可能性が提唱されている。そのような作用機序を有する抗体医薬品を目指す際に、本研究で構築したハムスター由来 Fc 受容体との結合評価系を活用し、高機能性抗体の創薬研究を推進していきたい。

- 抗体生産基盤の強化を目指したシグナルペプチドに関する研究
 - 難発現性のFc受容体と抗体との結合評価系に関する研究
- タンパク質発現系に未だ明らかとなっていない学術的要素が存在
分子生物学的手法により創薬基盤技術を強化する方法論を提示



46

図 4-1. 本研究の総括と展望

参考文献

1. Cohen, S.N., et al., *Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. **70**(11): p. 3240-4.
2. Chance, R.E., et al., *Chemical, physical, and biologic properties of biosynthetic human insulin*. Diabetes Care, 1981. **4**(2): p. 147-54.
3. Goeddel, D.V., et al., *Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(1): p. 106-10.
4. Johnson, I.S., *Human insulin from recombinant DNA technology*. Science, 1983. **219**(4585): p. 632-7.
5. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. **256**(5517): p. 495-7.
6. Lobo, E.D., R.J. Hansen, and J.P. Balthasar, *Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics*. J Pharm Sci, 2004. **93**(11): p. 2645-68.
7. 三嶋雄二, *抗体医薬の効果と支える機序*. 医学のあゆみ, 2018. **265**(1): p. 5-16.
8. Tomizuka, K., et al., *Double trans-chromosomal mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(2): p. 722-7.
9. Ishida, I., et al., *Production of human monoclonal and polyclonal antibodies in TransChromo animals*. Cloning Stem Cells, 2002. **4**(1): p. 91-102.
10. Beck, A., et al., *Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(5): p. 345-52.
11. Dubel, S., *ANTIBODY PRODUCTION: HUMAN, RECOMBINANT*. Encyclopedia of Industrial Biotechnology, 2009. **2010**: p. 1-15.
12. *Finishing the euchromatic sequence of the human genome*. Nature, 2004. **431**(7011): p. 931-45.
13. Wang, Q., et al., *Design and Production of Bispecific Antibodies*. Antibodies (Basel), 2019. **8**(3).
14. Sastre Torano, J., R. Ramautar, and G. de Jong, *Advances in capillary electrophoresis for the life sciences*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2019. **1118-1119**: p. 116-136.
15. Yang, X. and M.G. Bartlett, *Glycan analysis for protein therapeutics*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2019. **1120**: p. 29-40.
16. Xu, Y., et al., *Structure, heterogeneity and developability assessment of therapeutic antibodies*. MAbs, 2019. **11**(2): p. 239-264.
17. Kinnunen, H.M., et al., *A novel in vitro method to model the fate of subcutaneously*

- administered biopharmaceuticals and associated formulation components*. J Control Release, 2015. **214**: p. 94-102.
18. Bown, H.K., et al., *In vitro model for predicting bioavailability of subcutaneously injected monoclonal antibodies*. J Control Release, 2018. **273**: p. 13-20.
 19. Kawanishi, K., et al., *Human species-specific loss of CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase enhances atherosclerosis via intrinsic and extrinsic mechanisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(32): p. 16036-16045.
 20. Chinuki, Y. and E. Morita, *Alpha-Gal-containing biologics and anaphylaxis*. Allergol Int, 2019. **68**(3): p. 296-300.
 21. Jain, T., et al., *Biophysical properties of the clinical-stage antibody landscape*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(5): p. 944-949.
 22. Saxena, V., et al., *Developability assessment in pharmaceutical industry: An integrated group approach for selecting developable candidates*. J Pharm Sci, 2009. **98**(6): p. 1962-79.
 23. Lipinski, C.A., et al., *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. **46**(1-3): p. 3-26.
 24. 戸邊雅則, *創薬化学の側面から見た低分子医薬の将来像 —低分子から中分子への広がり—*. 医薬産業政策研究所、政策研ニュース No.72, 2018.
 25. Raybould, M.I.J., et al., *Five computational developability guidelines for therapeutic antibody profiling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(10): p. 4025-4030.
 26. Finlay, W.J.J. and A.A. Lugovskoy, *De novo discovery of antibody drugs - great promise demands scrutiny*. MAbs, 2019. **11**(5): p. 809-811.
 27. Kovaltsuk, A., et al., *Observed Antibody Space: A Resource for Data Mining Next-Generation Sequencing of Antibody Repertoires*. J Immunol, 2018. **201**(8): p. 2502-2509.
 28. Fujiwara, R., et al., *Metabolic engineering of Escherichia coli for shikimate pathway derivative production from glucose-xylose co-substrate*. Nature Communications, 2020. **11**(1).
 29. Ferrer-Miralles, N., et al., *Microbial factories for recombinant pharmaceuticals*. Microb Cell Fact, 2009. **8**: p. 17.
 30. Sanchez-Garcia, L., et al., *Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update*. Microb Cell Fact, 2016. **15**: p. 33.
 31. Dhara, V.G., et al., *Recombinant Antibody Production in CHO and NS0 Cells: Differences and Similarities*. BioDrugs, 2018. **32**(6): p. 571-584.

32. Blundell, P.A., et al., *Choice of Host Cell Line Is Essential for the Functional Glycosylation of the Fc Region of Human IgG1 Inhibitors of Influenza B Viruses*. J Immunol, 2020.
33. Kelley, B., *Industrialization of mAb production technology*. mAbs, 2009. **1**(5): p. 443-452.
34. Dinnis, D.M. and D.C. James, *Engineering mammalian cell factories for improved recombinant monoclonal antibody production: lessons from nature?* Biotechnol Bioeng, 2005. **91**(2): p. 180-9.
35. Farid, S.S., *Process economics of industrial monoclonal antibody manufacture*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. **848**(1): p. 8-18.
36. Yang, O., M. Qadan, and M. Ierapetritou, *Economic Analysis of Batch and Continuous Biopharmaceutical Antibody Production: A Review*. J Pharm Innov, 2019. **14**: p. 1-19.
37. Kouhei Tsumoto, K.S., Hidemasa Kondo, Makoto Uchikawa, Takeo Juji, Izumi Kumagai, *Highly efficient recovery of functional single-chain Fv fragments from inclusion bodies overexpressed in Escherichia coli by controlled introduction of oxidizing reagent—application to a human single-chain Fv fragment*. Journal of Immunological Methods, 1998. **219**(1-2): p. 119-129.
38. Spiess, C., Q. Zhai, and P.J. Carter, *Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies*. Mol Immunol, 2015. **67**(2 Pt A): p. 95-106.
39. Rolf Linke, A.K.a.D.S., *Catumaxomab Clinical development and future directions*. mAbs, 2010. **2**(2): p. 129-136.
40. Jakob, C.G., et al., *Structure reveals function of the dual variable domain immunoglobulin (DVD-Ig) molecule*. MAbs, 2013. **5**(3): p. 358-63.
41. Oates, J. and B.K. Jakobsen, *ImmTACs: Novel bi-specific agents for targeted cancer therapy*. Oncoimmunology, 2013. **2**(2): p. e22891.
42. Klein, C., et al., *Engineering therapeutic bispecific antibodies using CrossMab technology*. Methods, 2019. **154**: p. 21-31.
43. Wu, C., et al., *Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(11): p. 1290-7.
44. Buie, L.W., et al., *Blinatumomab: A First-in-Class Bispecific T-Cell Engager for Precursor B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia*. Ann Pharmacother, 2015. **49**(9): p. 1057-67.
45. Moroi, R., et al., *FCGR3A-158 polymorphism influences the biological response to infliximab in Crohn's disease through affecting the ADCC activity*. Immunogenetics, 2013. **65**(4): p. 265-71.

46. Haynes, B.F., et al., *Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial*. N Engl J Med, 2012. **366**(14): p. 1275-86.
47. Sun, P., et al., *NK Cells Activated through Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity and Armed with Degranulation/IFN-gamma Production Suppress Antibody-dependent Enhancement of Dengue Viral Infection*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 1109.
48. Garber, K., *No added sugar: antibody makers find an upside to 'no fucose'*. Nat Biotechnol, 2018. **36**(11): p. 1025-1027.
49. 内山進, *抗体医薬品などのバイオ医薬品の物理化学的評価*. YAKUGAKU ZASSI, 2016. **136**(3): p. 443-448.
50. Sockolosky, J.T. and F.C. Szoka, *The neonatal Fc receptor, FcRn, as a target for drug delivery and therapy*. Adv Drug Deliv Rev, 2015. **91**: p. 109-24.
51. Dostalek, M., T. Prueksaritanont, and R.F. Kelley, *Pharmacokinetic de-risking tools for selection of monoclonal antibody lead candidates*. MAbs, 2017. **9**(5): p. 756-766.
52. Kamath, A.V., *Translational pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies*. Drug Discov Today Technol, 2016. **21-22**: p. 75-83.
53. Igawa, T., et al., *Antibody recycling by engineered pH-dependent antigen binding improves the duration of antigen neutralization*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(11): p. 1203-7.
54. Sampei, Z., et al., *Antibody engineering to generate SKY59, a long-acting anti-C5 recycling antibody*. PLoS One, 2018. **13**(12): p. e0209509.
55. Locke, K.W., D.C. Maneval, and M.J. LaBarre, *ENHANZE((R)) drug delivery technology: a novel approach to subcutaneous administration using recombinant human hyaluronidase PH20*. Drug Deliv, 2019. **26**(1): p. 98-106.
56. Morrison, C., *CAR-T field booms as next-generation platforms attract big players*. Nat Biotechnol, 2015. **33**(6): p. 571-2.
57. Morrison, C., *Fresh from the biotech pipeline-2018*. Nat Biotechnol, 2019. **37**(2): p. 118-123.
58. Nasr, M.M., et al., *Regulatory Perspectives on Continuous Pharmaceutical Manufacturing: Moving From Theory to Practice: September 26-27, 2016, International Symposium on the Continuous Manufacturing of Pharmaceuticals*. J Pharm Sci, 2017. **106**(11): p. 3199-3206.
59. Fisher, A.C., et al., *The Current Scientific and Regulatory Landscape in Advancing Integrated Continuous Biopharmaceutical Manufacturing*. Trends Biotechnol, 2019. **37**(3): p. 253-267.
60. Himmelfarb, P., P.S. Thayer, and H.E. Martin, *Spin filter culture: the propagation of mammalian cells in suspension*. Science, 1969. **164**(3879): p. 555-7.

61. Knazek, R.A., et al., *Cell culture on artificial capillaries: an approach to tissue growth in vitro*. Science, 1972. **178**(4056): p. 65-6.
62. K. B. Konstantinov, C.L.C., *White Paper on Continuous Bioprocessing*. ISCMP White paper 4, 2014.
63. Fujii, H., et al., *Compact Seahorse-Shaped T Cell-Activating Antibody for Cancer Therapy*. Advanced Therapeutics, 2018. **1**(3).
64. Iwatsuki-Horimoto, K., et al., *Syrian Hamster as an Animal Model for the Study of Human Influenza Virus Infection*. J Virol, 2018. **92**(4).
65. Nelson, A.L. and J.M. Reichert, *Development trends for therapeutic antibody fragments*. Nat Biotechnol, 2009. **27**(4): p. 331-7.
66. Muller, Y.A., et al., *VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 Å resolution and mutational analysis of the interface*. Structure, 1998. **6**(9): p. 1153-67.
67. Kelley, R.F., et al., *Antigen binding thermodynamics and antiproliferative effects of chimeric and humanized anti-p185HER2 antibody Fab fragments*. Biochemistry, 1992. **31**(24): p. 5434-41.
68. Swartz, J.R., *Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins*. Curr Opin Biotechnol, 2001. **12**(2): p. 195-201.
69. Salomon, F., et al., *The effects of treatment with recombinant human growth hormone on body composition and metabolism in adults with growth hormone deficiency*. N Engl J Med, 1989. **321**(26): p. 1797-803.
70. Leader, B., Q.J. Baca, and D.E. Golan, *Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(1): p. 21-39.
71. Eschbach, J.W., et al., *USA multicenter clinical trial with recombinant human erythropoietin (Amgen). Results in hemodialysis patients*. Contrib Nephrol, 1989. **76**: p. 160-5; discussion 212-8.
72. Chu, L. and D.K. Robinson, *Industrial choices for protein production by large-scale cell culture*. Curr Opin Biotechnol, 2001. **12**(2): p. 180-7.
73. Briggs, M.S. and L.M. Gierasch, *Molecular mechanisms of protein secretion: the role of the signal sequence*. Adv Protein Chem, 1986. **38**: p. 109-80.
74. Gierasch, L.M., *Signal sequences*. Biochemistry, 1989. **28**(3): p. 923-30.
75. von Heijne, G., *The signal peptide*. J Membr Biol, 1990. **115**(3): p. 195-201.
76. von Heijne, G., *Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites*. Eur J Biochem, 1983. **133**(1): p. 17-21.
77. von Heijne, G., *Signal sequences. The limits of variation*. J Mol Biol, 1985. **184**(1): p. 99-105.

78. Nielsen, H., et al., *A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites*. Int J Neural Syst, 1997. **8**(5-6): p. 581-99.
79. Duffaud, G. and M. Inouye, *Signal peptidases recognize a structural feature at the cleavage site of secretory proteins*. J Biol Chem, 1988. **263**(21): p. 10224-8.
80. von Heijne, G. and L. Abrahmsen, *Species-specific variation in signal peptide design. Implications for protein secretion in foreign hosts*. FEBS Lett, 1989. **244**(2): p. 439-46.
81. Zhang, L., Q. Leng, and A.J. Mixson, *Alteration in the IL-2 signal peptide affects secretion of proteins in vitro and in vivo*. J Gene Med, 2005. **7**(3): p. 354-65.
82. Kumagai, M.H., et al., *Expression and secretion of rice alpha-amylase by Saccharomyces cerevisiae*. Gene, 1990. **94**(2): p. 209-16.
83. Allet, B., et al., *A bacterial signal peptide directs efficient secretion of eukaryotic proteins in the baculovirus expression system*. Protein Expr Purif, 1997. **9**(1): p. 61-8.
84. Choi, J.H. and S.Y. Lee, *Secretory and extracellular production of recombinant proteins using Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol, 2004. **64**(5): p. 625-35.
85. Carter, P., et al., *Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(10): p. 4285-9.
86. Paetzel, M., *Structure and mechanism of Escherichia coli type I signal peptidase*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(8): p. 1497-508.
87. Heijne, G.v., *Life and death of a signal peptide*. Nature, 1998. **396**: p. 111-113.
88. Paetzel, M., R.E. Dalbey, and N.C. Strynadka, *Crystal structure of a bacterial signal peptidase apoenzyme: implications for signal peptide binding and the Ser-Lys dyad mechanism*. J Biol Chem, 2002. **277**(11): p. 9512-9.
89. Kober, L., C. Zehe, and J. Bode, *Optimized signal peptides for the development of high expressing CHO cell lines*. Biotechnol Bioeng, 2013. **110**(4): p. 1164-73.
90. Petersen, T.N., et al., *SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions*. Nat Methods, 2011. **8**(10): p. 785-6.
91. Xiao, X., et al., *A high-throughput platform for population reformatting and mammalian expression of phage display libraries to enable functional screening as full-length IgG*. MAbs, 2017. **9**(6): p. 996-1006.
92. Merchant, M., et al., *Monovalent antibody design and mechanism of action of onartuzumab, a MET antagonist with anti-tumor activity as a therapeutic agent*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(32): p. E2987-96.
93. Laura C. Simmons, D.R., Laura Klimowski, T. Shantha Raju, Gloria Meng, Paul

- Sims, Kyu Hong, Robert L. Shields, Lisa. Damico, and D.G.Y. Patricia Rancatore, <p>RyumaNagano_Expression of full-length immunoglobulins in Escherichia coli.pdf>. Journal of Immunological Methods, 2002. **263**: p. 133-147.
94. Mazor, Y., et al., *Isolation of engineered, full-length antibodies from libraries expressed in Escherichia coli*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(5): p. 563-5.
 95. Chan, C.E., et al., *Optimized expression of full-length IgG1 antibody in a common E. coli strain*. PLoS One, 2010. **5**(4): p. e10261.
 96. Robinson, M.P., et al., *Efficient expression of full-length antibodies in the cytoplasm of engineered bacteria*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 8072.
 97. Perrin, S., *Preclinical research: Make mouse studies work*. Nature, 2014. **507**(7493): p. 423-5.
 98. Sena, E.S., et al., *Factors affecting the apparent efficacy and safety of tissue plasminogen activator in thrombotic occlusion models of stroke: systematic review and meta-analysis*. J Cereb Blood Flow Metab, 2010. **30**(12): p. 1905-13.
 99. Olson, H., et al., *Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals*. Regul Toxicol Pharmacol, 2000. **32**(1): p. 56-67.
 100. Cook, D., et al., *Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline: a five-dimensional framework*. Nat Rev Drug Discov, 2014. **13**(6): p. 419-31.
 101. Suntharalingam, G., et al., *Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412*. N Engl J Med, 2006. **355**(10): p. 1018-28.
 102. Ball, C., et al., *Antibody C region influences TGN1412-like functional activity in vitro*. J Immunol, 2012. **189**(12): p. 5831-40.
 103. Diamandopoulos, G.T., *Leukemia, lymphoma, and osteosarcoma induced in the Syrian golden hamster by simian virus 40*. Science, 1972. **176**(4031): p. 173-5.
 104. Kokova, D.A., et al., *Exploratory metabolomics study of the experimental opisthorchiasis in a laboratory animal model (golden hamster, Mesocricetus auratus)*. PLoS Negl Trop Dis, 2017. **11**(10): p. e0006044.
 105. Xiao, S.Y., et al., *West Nile virus infection in the golden hamster (Mesocricetus auratus): a model for West Nile encephalitis*. Emerg Infect Dis, 2001. **7**(4): p. 714-21.
 106. Tesh, R.B., et al., *Persistent West Nile virus infection in the golden hamster: studies on its mechanism and possible implications for other flavivirus infections*. J Infect Dis, 2005. **192**(2): p. 287-95.
 107. Chan, J.F., et al., *Simulation of the clinical and pathological manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility*. Clin Infect Dis, 2020.

108. Xu, L., et al., *Trispecific broadly neutralizing HIV antibodies mediate potent SHIV protection in macaques*. Science, 2017. **358**(6359): p. 85-90.
109. Furuyama, W., et al., *Discovery of an antibody for pan-ebolavirus therapy*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 20514.
110. Tsuda, Y., et al., *Protective efficacy of a bivalent recombinant vesicular stomatitis virus vaccine in the Syrian hamster model of lethal Ebola virus infection*. J Infect Dis, 2011. **204 Suppl 3**: p. S1090-7.
111. Forthal, D.N. and C. Moog, *Fc receptor-mediated antiviral antibodies*. Curr Opin HIV AIDS, 2009. **4**(5): p. 388-93.
112. van Erp, E.A., et al., *Fc-Mediated Antibody Effector Functions During Respiratory Syncytial Virus Infection and Disease*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 548.
113. Baum, L.L., et al., *HIV-1 gp120-specific antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity correlates with rate of disease progression*. J Immunol, 1996. **157**(5): p. 2168-73.
114. Wardley, R.C., et al., *The role of antibody in protection against African swine fever virus*. Vet Immunol Immunopathol, 1985. **9**(3): p. 201-12.
115. Moldt, B., et al., *A nonfucosylated variant of the anti-HIV-1 monoclonal antibody b12 has enhanced FcγRIIIa-mediated antiviral activity in vitro but does not improve protection against mucosal SHIV challenge in macaques*. J Virol, 2012. **86**(11): p. 6189-96.
116. Zalevsky, J., et al., *The impact of Fc engineering on an anti-CD19 antibody: increased Fcγ receptor affinity enhances B-cell clearing in nonhuman primates*. Blood, 2009. **113**(16): p. 3735-43.
117. Junttila, T.T., et al., *Superior in vivo efficacy of afucosylated trastuzumab in the treatment of HER2-amplified breast cancer*. Cancer Res, 2010. **70**(11): p. 4481-9.
118. Shibata-Koyama, M., et al., *The N-linked oligosaccharide at Fc γRIIIa Asn-45: an inhibitory element for high Fc γRIIIa binding affinity to IgG glycoforms lacking core fucosylation*. Glycobiology, 2009. **19**(2): p. 126-34.
119. Warncke, M., et al., *Different adaptations of IgG effector function in human and nonhuman primates and implications for therapeutic antibody treatment*. J Immunol, 2012. **188**(9): p. 4405-11.
120. Bruhns, P., *Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models*. Blood, 2012. **119**(24): p. 5640-9.
121. Nimmerjahn, F., et al., *FcγRIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity*. Immunity, 2005. **23**(1): p. 41-51.
122. Nagano, R. and K. Masuda, *Establishment of a signal peptide with cross-species*

- compatibility for functional antibody expression in both Escherichia coli and Chinese hamster ovary cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **447**(4): p. 655-9.
123. Nirschl, M., F. Reuter, and J. Voros, *Review of transducer principles for label-free biomolecular interaction analysis*. Biosensors (Basel), 2011. **1**(3): p. 70-92.
 124. Hirano, M., et al., *IgEb immune complexes activate macrophages through FcγRIII binding*. Nat Immunol, 2007. **8**(7): p. 762-71.
 125. Lakshmanan, M., et al., *Multi-omics profiling of CHO parental hosts reveals cell line-specific variations in bioprocessing traits*. Biotechnol Bioeng, 2019. **116**(9): p. 2117-2129.
 126. Kasbi Chadli, F., et al., *Omega 3 fatty acids promote macrophage reverse cholesterol transport in hamster fed high fat diet*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e61109.
 127. Miyoshi, I., et al., *Establishment and characterization of two hamster macrophage cell lines*. Cancer Lett, 1978. **4**(5): p. 253-7.
 128. Mizushima, T., et al., *Structural basis for improved efficacy of therapeutic antibodies on defucosylation of their Fc glycans*. Genes Cells, 2011. **16**(11): p. 1071-80.
 129. Lu, L.L., et al., *Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(1): p. 46-61.
 130. Meng Yuan, N.C.W., Xueyong Zhu, Chang-Chun D. Lee, Ray T. Y. So, Huibin Lv, Chris K. P. Mok, Ian A. Wilson, *A highly conserved cryptic epitope in the receptor-binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV*. Science, 2020. **eabb7269**.
 131. Group, P.I.W., et al., *A Randomized, Controlled Trial of ZMapp for Ebola Virus Infection*. N Engl J Med, 2016. **375**(15): p. 1448-1456.

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始ご指導を賜りました東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻教授津本浩平先生に心より深謝の意を表します。津本先生におかれましては、バイオテクノロジーの研究に従事する事を夢見た東北大学大学院生の頃からご指導いただいております、今日に至るまで抗体工学やバイオ医薬に携わる研究者として大きな機会を作っていただいただけでなく、バイオ医薬品を研究開発する企業に入社後も社会人として博士課程入学をご了承下さり、今回抗体医薬の創薬基盤技術に関する本研究を博士論文にまとめる機会を頂きました。また、博士論文の内容のみならず、研究者としてのあり方、製薬企業に求める役割と責任、抗体エンジニアリングを通じた将来のバイオ医薬の方向性など、多岐にわたりご助言を賜りました。今後ともご指導いただく事もあるかと存じますが、改めまして感謝の意を表します。

バイオエンジニアリング専攻、医学系研究科疾患生命工学センター専攻伊藤大知先生、化学生命工学専攻、バイオエンジニアリング専攻平林祐介先生、化学生命工学専攻山口哲志先生、医科学研究所専攻、バイオエンジニアリング専攻長門石曉先生には副査としてご助言を頂くとともに、研究発表での論理性や本論文では細部にわたりご指導を賜りました。ここに感謝の意を表します。

本研究の第2章においてご指導を賜りました梶田和宏博士に心より感謝の意を表します。本研究を構想し、大腸菌を Fab 発現系として創薬利用された梶田先生には、分子生物学の基礎からご指導いただき、タンパク質発現に活用されている大腸菌を様々な医薬応用に活かす研究についてご助言いただきました。更には創薬を志す研究者としての心構えや熾烈な競争の中で取り組むべき企業研究としての研究立案や課題設定、緻密な進め方について数多くの助言を賜りま

した。梶田先生とは同じ事業所に在籍した期間が長く、大変お世話になりました。そして、技術開発や創薬研究に奮闘し没頭した日々は、掛け替えのない財産となっております。ここに感謝の意を表します。また、本章にて発現ベクターを供与いただきました白石泰久博士、MS 解析でサポートいただきました斎藤誠司博士に感謝申し上げます。

本研究の第 3 章についてご指導、ご助言を賜りました飯田茂博士に感謝の意を表します。本研究を構想し、抗体医薬における受容体調製と抗体 Fc との結合性に関する研究、研究開発における有効性や安全性についてのヒト臨床予測性の課題について多くのご助言を賜りました。そして、本研究にも触れている抗体医薬の創薬基盤技術に関しご指導いただきました。特に、創薬研究を経て選出された抗体分子を如何に薬の候補として仕上げ、初期開発につなげるかという重要な仕事についてご指導いただきました。更には、これまでバイオ医薬研究で身につけてきた知識や技術を今後のキャリアにどう活かしていくべきか導いて下さいました。現在、私はバイオ医薬の生産研究に従事していますが、飯田先生には CMC においても求められるサイエンスの重要性についてご指導いただいたと本論文を書きながら振り返っています。今後ご指導いただく機会があるかと存じますが、ここに改めまして感謝申し上げます。また、本章における FCM 解析について、サポート頂いた橋詰由美子氏に感謝の意を評します。

最後に、常にサポートしてくれた家族に心より感謝の意を表します。妻の直子はここ数年で環境が大きく変わった中でも家族を支え、学業と仕事の両立の支援、家族の安全と健康を見守り、安心を与えてくれました。息子の海智、娘の舞理は家族を更に明るくしてくれる掛け替えのない存在です。家族とともに歩む今後の明るい未来を願い、我が子として生まれてきてくれた事に感謝します。