

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏 名 永野 竜馬

抗体医薬は現在最も注目されている医薬品の一つとして医療に貢献している。抗体作製及びヒト化技術の完成により、特定の抗原に結合する単一のヒト抗体分子であるモノクローナル抗体への医薬応用が進められた。化成品と異なる作用機序を特長として多種多様な抗体が医薬品として上市されたものの、治療効果を満足に得ることができない疾患は存在し、薬剤が貢献しうる医療ニーズは数多く存在する。これらニーズに応え、人々の健康と福祉に貢献するためには、研究開発を効率化する創薬を支える技術の強化が重要となる。抗体医薬の創製過程には、抗体作製・抗体生産・品質物性・作用機序解析等が存在し、特定のアミノ酸に結合する糖鎖を含めタンパク質分子を巧みに制御している。それらの科学技術は総じて創薬基盤技術と称され、技術開発を通じて得られた新たな知見は、革新的な医薬品への貢献という形で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宿主として選択し、異種となるヒト抗体遺伝子を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。本研究においては、タンパク質発現系において未だ解明されていない事象に着目し、その探究を通じて改良を指向する研究を進めた。本論文においては、様々な技術シーズからバイオエンジニアリング分野の問題を整理し、抗体生産基盤強化を目指したシグナルペプチド研究、ヒト臨床予測性の改善を目指したハムスターFc受容体の評価系構築について研究を実施した。

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の役割を担う。タンパク質発現系においては、抗体を含むタンパク質の合成における重要な発現要素の一つである。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・分類されてきたものの、発現を増強する方法論や法則性については完全に理解されていない。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全長抗体 (IgG) 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、抗体の抗原結合断片 (Fab) 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、原核生物である大腸菌 (*Escherichia coli*) が用いられる場合も多く、各々の宿主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。今回、抗体発現に使用する宿主の種選択性を改善することを目的に、c-region に 3 つ連続したセリンを有するマウス抗体由来のシグナルペプチドに着目した。通常、マウス抗体由来の配列は種々の動物細胞でも機能しうる上、主に微生物で機能するとして提唱されている配列の法則性にも従うため大腸菌で機能しうると考えられた。よって、抗 HER2 抗体をモデルとして、Fab 発現ベクターに当シグナルペプチドを連結させ、大腸菌にて分泌発現させたが実際には Fab 発現は確認されなかった。そこで、c-region の C 末端から数えて-3 番目と-1 番目にアラニン残基への選択性がある可能性に着目し、当該箇所のセリンをアラニンに置換して発現させたところ、個々の改変が Fab 発現向上に寄与する上、その組み合わせによって相乗的に発現が上昇する結果となった。精製した試料を ELISA による HER2 抗原への結合活性を評価したところ、同等の結合活性を有していることが確認された。更に、この改変したシグナルペプチドは CHO 細胞における全長抗体 (IgG) の安定発現系においても機能を保持し、同じく ELISA による HER2 抗原への結合を有することを確認した。c-region における改変と発現上昇は、切断反応の酵素であるシグナルペプチダーゼの厳密な基質特異性が関与していると考えられる。先行文献からは、当該領域のアラニンへの改変がシグナルペプチダーゼの反応近傍にある結合ポケットへの親和性を高めた可能性が考えられた。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可能にした先行研究例はみあたらず、前例のないシグナルペプチド構築に成功した。当該シグナルペプチドは、生産基盤を始めとして、ファージディスプレイによる抗体選抜やヒト化工程等、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応用されることが期待できる。次の研究として、独自に構築したシグナルペプチドを抗体以外のタンパク質分子創製に応用すべく、Fc 受容体調製に展開した。

Fc 受容体は抗体の Fc 領域に結合する受容体タンパク質で、細胞表面に存在する。IgG の Fc 受容体である Fc γ R 群は、抗体 Fc との結合を介して、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 Fc γ R 群の作用機序が追究され、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が完全には理解されていない。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。しかしながら、薬剤と相互作用する分子の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少なくない。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受容体の中で、本研究ではハムスターFc γ RIVを研究対象にした。Fc γ RIVはヒトFc γ RIIIa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Fc γ RIV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。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活用されている。近年では、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特長から、インフルエンザウイルスを始めとする飛沫感染及び治療の動物モデルとしての利用が盛んに行われている。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。生物活性としては、抗体はFc受容体を介して様々な抗ウイルス作用を有することが知られている。中でもNK細胞等のエフェクター細胞を介した抗体依存性細胞障害活性 (ADCC: Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity) は、疫学研究や非臨床研究、獣医学研究において予防や治療に関わるものとして知られている。ヒトFc γ RIIIaとの結合を高めることで抗体のADCC活性が増強されることが可能となるが、抗体のN結合型糖鎖のフコース修飾を抑制する事によってADCC活性を飛躍的に高める技術はその代表例である。フコース非修飾抗体はがんや自己免疫疾患を適応とする医薬品として、既に临床上の有効性や安定性が認められている事から、抗ウイルス作用にも期待が高まっている。その一方で、動物評価での薬理作用のみならず、ハムスターFc γ RIVとヒト抗体Fcとの結合性については理解されていないため、ヒト臨床予測性は十分とは言えない。今回、ヒト臨床予測性の改善を目指して、CHO細胞の安定発現系によりハムスターFc γ RIV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との結合評価系を構築することで影響評価を実施した。本研究では、ハムスターFc γ RIV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を設計し、独自に見出したシグナルペプチドを用いることで始めて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。その一方で、精製後のタンパク質取得量は少なく、精製レベルも良好でなかったため、タンパク質の結合解析としてバイオレイヤー干渉 (BLI) 法を採用した。抗DNP抗体をモデルに抗体FcとハムスターFc γ RIV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ハムスターFc γ RIV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、当受容体の発現プロファイル情報に基づいて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。フローサイトメトリー (FCM) 解析によって、同じく抗体FcとハムスターFc γ RIVとの結合性を評価したところ、フコース非修飾抗体による結合上昇が確認された。ハムスターFc γ RIVとヒトFc γ RIIIaのアミノ酸

配列を比較したところ、フコースを修飾しない事で新たに発生する 128 番目のリジン残基 (K128) の相互作用部位についてヒトとハムスターで保存していた。このことから、フコース非修飾抗体によるハムスターFc γ RIVへの結合上昇は、ヒト Fc γ RIIIa と同様のメカニズムによるものと考えられた。本研究で初めてハムスターFc γ RIV 取得に成功する事で、BLI 及びFCM による結合評価系を構築し、フコース非修飾抗体の結合上昇を確認するに至った。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。