

論文の内容の要旨

論文題目 マルチドメイン膜蛋白質に対する抗体医薬の抗体工学的研究

氏 名 新井 修

第1章 序論

抗体医薬はがんや免疫性疾患だけでなく、さまざまな疾患治療において期待されている。従来の抗体医薬は中和反応、抗体依存性細胞傷害 (ADCC)、補体依存性細胞傷害 (CDC) などの作用機序による治療を中心として発展した。近年、抗体-薬物複合体 (ADC) や放射線免疫療法 (RIT) など、抗体を病変部位への送達プローブとして用いることによる新しい作用機序を持った抗体医薬品の開発が進んでいる。病変部位を特異的に認識するプローブとしての抗体を正しく評価し、医薬品へと導くための基礎技術を開発することはより一層、重要性を増している。本研究は新規抗体薬物療法の開発を目的として行った。

第2章 KinExAとBV displayを組み合わせた膜たんぱく質抗体親和性測定法の開発

がんの治療用抗体の開発において、膜たんぱく質に対するモノクローナル抗体 (mAb) のがん細胞表面抗原に対する親和性を正確に評価することは重要な課題である。本章では、膜たんぱく質に対するmAbの簡便かつ高感度な評価方法を開発した。この評価方法は結合平衡除外法 (KinExA) と発芽バキュロウイルス (Budded baculovirus: BV) エンベロープ上に膜たんぱく質を提示する方法 (BV display) を組み合わせた親和性測定系 (BV-KinExA) である。まず、肝がんで発現が亢進しているRobo1を提示したBVを磁性ビーズに吸着させることでBVビーズを調製した。これをBV-KinExAに適応することで抗

Robo1 mAbs の親和性評価を行った。対照として、Robo1の細胞外領域を可溶化した抗原 (sRobo1) とRobo1発現細胞を用いた測定も行った。その結果、BV表面Robo1に対する平衡解離定数(K_d)はRobo1発現細胞を用いたKinExAから得られた値と相関が高かったが、sRobo1を用いて得られた値とは相関が低かった。これらの結果はBV-KinExA法が膜たんぱく質抗体の親和性評価方法として適していることを示している。

第3章 カドヘリン-17ドメイン特異的モノクローナル抗体を用いたイムノトキシンカクテル法の開発

胃がんは予後が不良であり、世界におけるがん関連死の第3位となっている。カドヘリン-17 (CDH17)は、日本人の胃がんにおいて発現頻度が高いことから、胃がんの治療標的として期待できる。我々はバキュロウイルスディスプレイ法 (BV display)による抗CDH17モノクローナル抗体 (mAb) 作製を行った。取得した5種類のmAbsはそれぞれ、CDH17の細胞外ドメインの異なるエピトープを認識する。これらの抗体を用いてイムノトキシンを調製し細胞殺傷効果を解析したところ、CDH17発現量がイムノトキシンの細胞殺傷効果に影響を与えていることが判明した。そこで、CDH17 発現量の低い細胞に対しても十分な細胞殺傷効果を得るため、イムノトキシンカクテル法を検討した。その結果、イムノトキシンをカクテルすることでCDH17発現量が低い細胞でも殺傷効果を高めることができた。この結果は、抗原発現量にばらつきがある腫瘍への有効な手法を与えるとともに、複数の作用機序の異なる抗がん剤を送達する新規治療法への応用も示唆される。

第4章 安定性の高い二重特異性抗体の構築

二重特異性抗体は同時に異なる2つのエピトープを認識するよう人工的に設計した抗体であり、特異性の向上や細胞障害性免疫細胞との連携など新しい機能を持った抗体を設計することができ、注目を浴びている。本章は、Robo1を標的とした、安定性の高い二重特異性抗体の構築を目的とした。まず複数クローンの抗Robo1抗体からscFvを作製し、その中から安定性の高いB2212A(22) とE2107(21)を選別した。それを基にscFv-Fc-scFv型二重特異性抗体22F21を構築した。昆虫細胞発現系により精製した22F21は、in vitroでの熱安定性にすぐれており、in vivoにおいても、マウス投与後0.5時間の血中濃度を100%としたとき、血中半減期は8時間であり、その後24-72時間は20%を維持しており、IgGと同等の血中安定性を示した。

第5章 二重特異性抗体を用いた新規薬物送達法の開発

抗体-薬物複合体(ADC)は、がんの治療薬として期待されている。ADCが標的に結合し細胞内に取り込まれることで細胞傷害性を発揮する。ADCの固形がんにおける効果をより高めることが現在の課題である。そこで本章では、4章で構築した二重特異性抗体

22F21を用いた新しい薬物送達法について述べる。抗Robo1抗体E2107はIG5ドメインをエピトープとするが、第2章で述べた手法により、細胞膜上にあるRobo1のIG5ドメイン (Robo1-IG5) とIG5断片たんぱく質 (IG5fp) とを比較すると、Robo1-IG5に対する親和性が極めて高いという性質を持つことが明らかとなった。そこで、この性質を利用した薬物送達法を考案した。まず、IG5fpに薬剤 (Drug) と細胞膜透過性ペプチド (CPP) を導入しIG5fp-Drug-CPPを調製する。これを22F21のIG5を認識するE2107scFv部位と反応させ複合体を形成させる (図 1)。この複合体をRobo1発現細胞に反応させれば、22が細胞膜上Robo1のFN3ドメイン (Robo1-FN3) を標的として結合し (Targeting, T)、続いてIG5fpとRobo1-IG5との交換反応によりIG5fp-Drug-CPPが放出され (Releasing, R)、CPPの性質によりIG5fp-Drug-CPPが細胞内に取り込まれ (Penetrating, P)、薬剤の効果が発揮される (図 2)。



図 1 二重特異性抗体を用いた抗体-薬物複合体の概略図

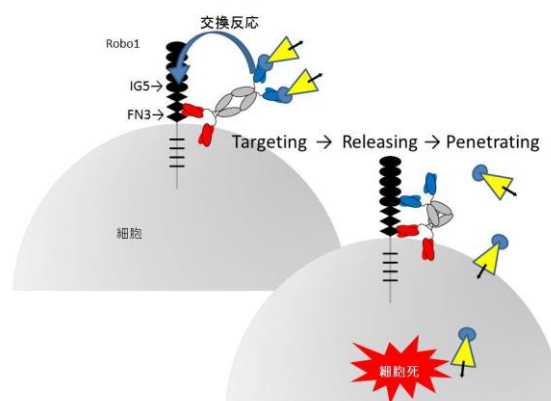


図 2 二重特異性抗体を用いた薬物送達法の概念図

本章では、新規薬物送達法T-R-Pの概念を実証するための評価方法を検討した。22F21/IG5fp複合体の形成を、サイズ排除クロマトグラフィーとELISAにより確認した。次に、22F21/IG5fp複合体が細胞上Robo1へ結合した後IG5fpが放出されることをフローサイトメトリーと蛍光顕微鏡を用いることで確認した。また、CPPとしてTATペプチドを導入したIG5fpが22F21により送達され細胞に集積することを確認した。最後に、細胞傷害性薬剤としてサポリン (Saporin) を結合させたTAT-IG5fp-Saporinを用いて、肝がん細胞株であるHepG2に対する細胞障害活性を確認し、薬剤が細胞内に取り込まれていることを実証した。以上より、考案した薬物送達法の実現可能性を示した。

第6章 結語

本研究の成果は、マルチドメインを有する、様々な膜たんぱく質を標的とした抗体薬物療法への応用が可能である。本研究は、新しいがんの薬物療法の可能性を提案するとともに、これまで発現量が障害となり選択されなかったがん抗原も治療標的と成り得るため、抗体医薬の適応範囲拡大に貢献できると考えられる。