

審査の結果の要旨

氏名 新井 修

近年、抗体医薬を中心としたバイオ医薬が新薬の大部分を占めるようになった。抗体医薬はがんや免疫性疾患の治療に用いられているが、抗体本来が持つ機能である中和反応、抗体依存性細胞障害、補体依存性細胞障害などの作用機序だけでは、固形がんには十分な効果が得られないことが多い。その問題を解決するために、抗体に新しい機能を付加した抗体薬物複合体や薬物送達法の中心となる二重特異性抗体などの改変抗体の研究開発が活発に行われている。

本研究はマルチドメイン膜たんぱく質を標的とした抗体医薬の開発を目的としている。膜たんぱく質は精製が困難で、そのため細胞膜上の標的タンパク質への抗体の親和性の評価が難しい。本研究では、バキュロウイルス提示法(BV display)と結合平衡除外法(KinExA)を組み合わせた新しい親和性測定系を開発した。この手法によりマルチドメイン膜たんぱく質であり、肝がん表面抗原である Robo1 (Roundabout1) に対するモノクローナル抗体の親和性評価がより正確に行えるようになった。また、より効果的な治療を目指して、胃がんで発現頻度の高いカドヘリン17(CDH17)を標的としたイムノトキシンカクテル法を検討した。最後に、Robo1 を標的とした血中安定性の高い二重特異性抗体を構築することで、それを用いた新しい薬剤送達法を考案し実現可能性を示した。

1章では、抗体医薬の歴史について述べ、創薬標的である膜たんぱく質と BV display を用いた抗体作製についてまとめている。次に KinExA を用いる利点と測定原理について述べている。さらに、抗体医薬品の中でも、新しい機能を付加した、抗体薬物複合体(ADC)とイムノトキシンや二重特異性抗体についての知見をまとめている。

2章では、がんの治療用抗体の開発において重要な課題である、膜たんぱく質抗体の親和性評価を細胞膜上の抗原に対して行う方法について論じている。KinExA と BV display を組み合わせた BV-KinExA 法を開発し、Robo1 に対する抗体の親和性評価を行うことで、細胞外領域を可溶化した抗原に対する親和性と細胞膜上 Robo1 に対する親和性が異なる抗体の存在を示している。これにより、細胞膜上の抗原に対する抗体の親和性評価を正しく行うことを可能とし

た。

第3章では CDH17 に対する抗体を作製し、細胞外ドメインの異なるエピトープを認識する3種類の抗体を用いてイムノトキシンカクテル法を検討している。CDH17 発現量が少ない胃癌細胞 (AGS 細胞) に対して、イムノトキシンの殺傷効果が減少することを明らかにし、異なるエピトープに対するイムノトキシンカクテル法により発現量の低い細胞に対して相乗的な細胞殺傷効果が得られ、有効であることを示している。

第4章では、Robo1 を標的とした二重特異性抗体の構築を目的として、FN3 ドメインを認識する B2212A の scFv と Ig5 ドメインを認識する E2107 の scFv を用いて、scFv-Fc-scFv 型二重特異性抗体 22F21 を構築している。バキュロウイルス発現系により精製した 22F21 は、*in vitro* での熱安定性および *in vivo* における血中安定性にすぐれている。

第5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ている。まず、第2章で述べた手法により、22F21 の親和性が細胞膜上にある Robo1 と、IG5 ドメインタンパク質 (IG5fp) とでは1000倍以上異なり、細胞膜上 Robo1 に対する親和性が極めて高いという性質を持つことを明らかにしている。これにより、交換反応を利用した薬物送達法を考案している。まず IG5fp に薬剤 (Drug) と細胞膜透過性ペプチド (CPP) を導入した IG5fp-Drug-CPP を調製し、22F21 と反応させて複合体を形成させる。この複合体を Robo1 発現細胞に反応させることで、22F21 が細胞膜上 Robo1 の FN3 ドメイン (Robo1-FN3) を標的として結合し、続いて親和性の差から IG5fp を離して Robo1-IG5 と結合することにより、IG5fp-Drug-CPP が放出され、CPP の性質により IG5fp-Drug-CPP が細胞内に取り込まれる。本章では、22F21 と IG5fp 複合体の形成を、サイズ排除クロマトグラフィーと ELISA (Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay) により確認し、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ている。また、CPP として TAT を導入した TAT-IG5fp が 22F21 により送達され細胞表面に濃縮されることを確認している。最後にトキシンとして saporin を導入した TAT-IG5fp-saporin を調製し、22F21/TAT-IG5fp-saporin 複合体によるがん細胞殺傷効果を確認し、新規抗がん剤送達法の有用性を見出している。

以上のように本論文では、現在の抗体医薬の固形がん治療における問題点の解決策を提案し、また新規薬剤送達法の開発と実証を行ったもので、これらの成果は抗体工学および医薬開発に大いに寄与するものと評価される。

よって本論文は博士 (学術) の学位請求論文として合格と認められる。