

	あさの りゅうたろう
氏 名	浅野 竜太郎
授 与 学 位	博士 (工学)
学位授与年月日	平成18年12月13日
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第2項
最 終 学 歴	平成12年3月 東北大学大学院工学研究科生物工学専攻博士課程前期課程退学
学位論文題目	がん関連抗原を標的とした二重特異性抗体の開発研究
論文審査委員	主査 東北大学教授 熊谷 泉 東北大学教授 中山 亨 東北大学教授 末永 智一 東北大学名誉教授 工藤 俊雄

論 文 内 容 要 旨

第1章 序論

近年、脚光を浴びている抗体は診断、検査薬としては開発、製品化が進んだものの、医薬品となると米国で18品目、国内独自開発は1件のみである。その臨床効果と経済効果は十分に認知されているものの、標的抗原の探索、ヒト型化等の抗体作製に係る技術基盤整備の不足、及びその知財の複雑さが開発研究へ足踏みをする要因となっている。そして、何より抗体医薬の製造法に起因する絶対的なコスト高が非常に大きな問題となっており、医療費負担から必ずしも手軽な選択肢とはなっていないのが現状である。本研究は、このような背景を受け、リンパ球とがん細胞間の架橋形成により特異的な抗腫瘍効果を誘導する二重特異性抗体に着目し、がん治療を目指す新規抗体医薬の開発に向けて、大きく二つのアプローチから研究を進めた。従来の完全抗体型の抗体医薬では、その分子量の大きさ等から大腸菌を用いた調製は不可能であったが、極力低分子の組換え抗体を構築することで、その安価な抗体医薬製造の可能性を探った。一方、抗体を構成するドメインの組み合わせの自由度の高さを利用し、抗体工学を駆使した極めて高活性の組換え抗体の構築も目指した。がん治療に向けて、これまでに非常に多くの標的抗原が見つかったが、本研究では、抗体医薬開発の現状、入手可能なモノクローナル抗体等を考慮し、がん関連抗原、リンパ球表面抗原、それぞれ3種ずつ、計6種の抗原に着目し研究を進めた。

第2章 抗体可変領域のクローニングと機能評価

新規組換え抗体の構築を目指す上では、抗体可変領域(Fv)遺伝子の取得が必要不可欠である。そこで、選択した6つの抗原、即ち、がん関連抗原としてMUC1(ムチン糖タンパク質)、CEA(がん胎児性抗原)、EGFR(上皮成長因子受容体)、リンパ球表面抗原としてCD3、CD16、CD28に対する特異的なマウスモノクローナル抗体、それぞれMUSE11、T84.66、528、OKT3、3G8、15E8の可変領域断片を調製し、機能評価を行った。Fvあるいは一本鎖抗体(scFv)の形態で、大腸菌を用いた様々な方法で調製を行った結果、scFvでは、活性を示さない抗体が存在するなど、興味深い知見を得ることが出来た。一方、15E8、528に関しては、本研究で新たにその可変領域のクローニングに成功するなど、着目した全ての抗体に関して、いずれかの形態で、その組換え型の結合活性を確認することが出来た。このため

次章以降の網羅的な新規二重特異性抗体の構築に用いた。

第3章 二重特異性抗体 (diabody) の構築と機能評価

前章でクローニングを行った抗体可変領域に基づいて、二重特異性抗体の最小形態の一つである diabody(図 1(上))の構築を目指した。従来は主にペリプラズム画分から調製されてきた diabody に対し、Mx3 と名付けた MUC1 と CD3 を標的とした diabody を段階透析法による巻き戻しにより調製を行った。結果、両標的細胞への結合、即ち二重特異性が示され、また活性化リンパ球(T-LAK)細胞存在下で、濃度に依存したがん細胞の殺傷効果が見られた。これらの結果は、巻き戻しにより機能的な diabody を調製可能であることを示すもので、世界で初めての例である。更に、抗 CEA 抗体と抗 CD3 抗体を用いた Cx3 を構築、diabody の汎用性の拡大を示すと共に、抗 EGFR 抗体 528 と抗 CD3 抗体を用いることで強力な活性を有する Ex3 の構築に成功した(図 1(下))。この高機能性が 528 に起因すると考え、528 に基づく新たな diabody を複数構築したが、同様に抗原に依存した特異的な強い傷害性が誘導出来たものもあれば、全く効果を示さない diabody もみられ、用いる抗体の組み合わせの重要性が示唆された。今後、高機能性 diabody の網羅的な構築に向けては、これらの要因を探ることは重要であると思われる。Ex3 は担がん SCID マウスを用いた治療実験でも 6 匹中 3 匹に完全な治癒が見られるなど非常に有望な効果を示し、大腸菌を用いた安価な抗体医薬の調製に向けた展望を示せたといえる。

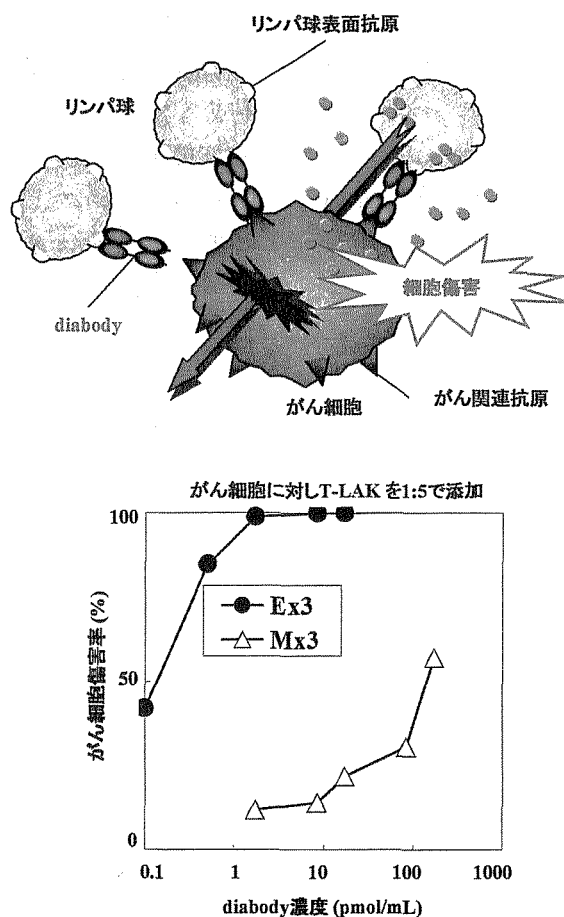


図1 diabodyが介するがん細胞殺傷の模式図(上)とがん細胞に対する傷害試験(下)

第4章 diabody のヒト型化と臨床試験に向けた展望

より抗原性の低下を目的に Ex3 のヒト型化を行うと共に、その作用機序解析、および臨床試験に向けての製造工程の開発も行い、トランスレーショナル・リサーチと呼ばれる臨床研究への展開を目指した。相補性決定領域(CDR)移植法、および大腸菌至適コドンを用いて全合成したヒト型化 Ex3(hEx3)は、十分な抗原特異性と細胞傷害性の保持が確認された。またどちらか一方の親抗体の添加のみで阻害が見られたため、細胞傷害性には hEx3 の二重特異性もたらす二細胞間の架橋形成が重要であることが示された。担がんヌードマウスを用いた生存試験でも、Ex3 と同等の生存延長効果が見られ、よりいっそう臨床への期待が高まった(図 2)。4°Cで長期保存後も機能的な hEx3、即ち二量体構造が安定に存在していることが分かり、生理的条件下での安定性も示された。hEx3 を構成する両鎖の重要性も示されたため、詳細な作用機序解析を進めた結果、分子治療薬の特徴であるチロシンキナーゼのリン酸化の

阻害能ではなく、直接的な細胞間の架橋によるアポトーシスの誘導であることが示唆された。一方、他の EGFR 抗体を用いて、新たに diabody を構築したが、hEx3 と比較して著しい活性の低下が見られた。機能的な diabody の構造を取り得る抗体の組み合わせの重要性が示唆されたが、両抗原に対して結合能を示したことから微妙なエピトープ領域の違いにより、立体障害が生じている可能性も考えられる。今後の結晶構造解析で機能的な diabody 構築に関する知見を得ることに期待がもたれる。

トランスレーショナル・リサーチに向けては、発現系の整備を目指し、動物細胞発現系を新たに確立し比較検討を行ったが、分子自身の特性としてはほとんど違いが見られず、巻き戻しによっても十分に機能的な diabody を調製出来ることが改めて示された。また、分子の同一性、マスターセルの作製、製造コストの面からも大腸菌発現系は実用的であることが分かり、情報収集の結果に基づき、実際に臨床試験に向けた製造工程開発を行った。

第5章 高機能性組換え抗体の構築と機能評価

抗体工学を駆使し、より高い治療効果が見込まれる新規組換え抗体を設計、動物細胞発現系を用いた調製を行った。それぞれ hEx3-Fc、hEx3-scDb-Fc、hEx3-scFv-Fc と名付けた新たに構築した3種の IgG 様二重特異性抗体は、いずれも二価性、ヒト IgG1 の Fc 領域を有し、調製される分子種は1つであるという特徴を有する(図3(上))。いずれも hEx3 に比べて、多価化によるものと思われる強い結合、さらには PBMC の増殖効果が見られたことからヒト Fc の融合による新たなエフェクター機能を獲得したことが示された。また、T-LAK 細胞、PBMC いずれを用いても強力な細胞傷害性を示し、特に hEx3-scFv-Fc に関しては、異なる分子形態に依存した親和性の違い、あるいは分子全体の抗原に対する配向性の違い等に起因すると思われる強い効果が見られた(図3(下))。PBMC に少量の T-LAK 細胞を添加することで強力な傷害活性の誘導も確認され、単独投与、あるいは IL-2 の共投与だけで、同等の効果を得ることに期待がもたれる。マウス実験での結果が待たれるが、少なくとも *in vitro* の効果は、diabody 型を遙かに凌駕する高機能性組換え抗体を構築できたといえる。

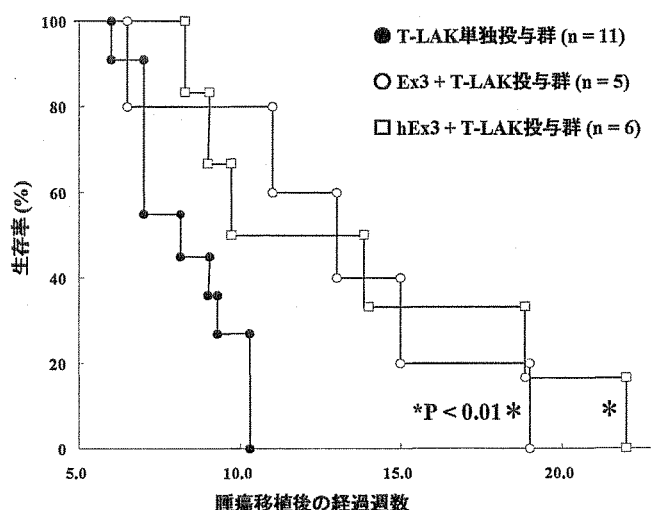


図2 ノードマウスを用いた生存試験

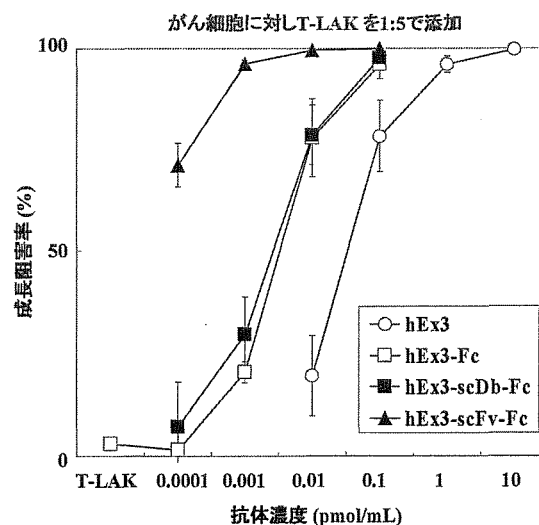
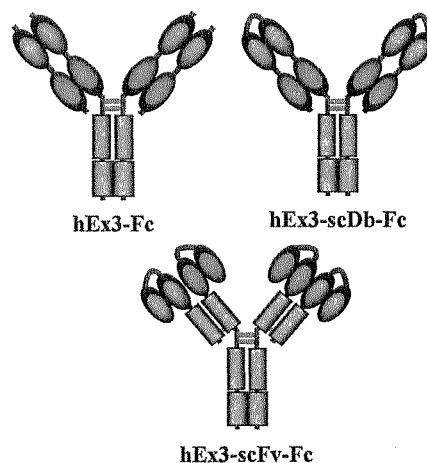


図3 新たに設計した3種のIgG様二重特異性抗体の模式図(左)と細胞傷害試験(右)

第6章 総括

本研究により、大腸菌による安価な調製が可能な diabody 型の二重特異性抗体 hEx3、および高活性の組換え抗体として、IgG 様の二重特異性抗体 hEx3-scFv-Fc という有望な分子の構築にそれぞれ成功したといえる。以上の結果は、抗体のドメインの組み合わせに基づく自在な設計からの新規タンパク質の創製を実証するものであり、いずれも世界でも未だ抗体医薬としての完成を見ない非天然型組換え抗体であることから、本研究が次世代型の抗体医薬開発に大いに貢献することが期待される。

論文審査結果の要旨

抗体は診断、検査薬としては開発、製品化が進んだものの、医薬品としての開発例は必ずしも多くはない。その臨床効果と経済効果は十分に認知されているが、製造におけるコスト高が、開発研究へ足踏みをする大きな要因の1つとなっている。本論文は、がん治療を目指す新規組換え抗体の形態として二重特異性抗体に着目し、大腸菌での安価な調製が可能なその低分子化と、新たな分子設計による高機能化の観点から開発研究を進めたものである。

論文は全6章で構成されている。

第1章は序論で、本研究の背景と目的、及び6種のモノクローナル抗体を選択した経緯を述べている。

第2章では、組換え抗体の構築の上で必須である抗体可変領域の取得について述べている。抗EGFR抗体528など、新たに2種の抗体のクローニングに成功すると共に、着目した全ての抗体に関して、その可変領域の機能評価を行った。

第3章では、diabody型の低分子二重特異性抗体の新規構築について述べている。大腸菌不溶性画分から巻き戻しによるdiabodyの調製に世界で初めて成功し、また、抗EGFR抗体528と抗CD3抗体の可変領域から構成されるdiabody Ex3が*in vivo*実験でも極めて顕著な効果を示すことを見出している。

第4章では、低免疫原性化を目指したEx3のヒト型化と臨床に向けた展開を述べている。相補性決定領域(CDR)移植法により構築したヒト型化Ex3(hEx3)は、Ex3と比べて十分な機能の保持が確認され、さらに担がんマウスの生存延長効果も示すなど、臨床応用が期待される成果をあげている。作用機序として、二細胞間の架橋形成がもたらすアポトーシスを支持する結果を得ている。発現系の整備も進め、改めて大腸菌発現・巻き戻しによる調製法の実用性を示すと共に、実際に試験薬の製造工程開発検討を行っている。

第5章では、抗体工学を駆使した、新規高機能性組換え抗体の開発について述べている。hEx3を基盤とし、ヒトIgG1のFc領域と融合した3種のIgG様二重特異性抗体を新たに設計、調製を行った。何れも二価性による親和性の向上、Fcの付加によるエフェクター機能に起因すると考えられるdiabody型を凌駕する効果が得られている。

第6章は総括であり、各章の成果をまとめている。

以上要するに本論文は、新たにクローニング、ヒト型化を施した抗EGFR抗体528可変領域に基づき設計、構築したdiabody型、およびIgG様の二重特異性抗体が、マウス治療モデルでも顕著な抗腫瘍効果を示すなど治療薬として有望であることを明らかにしたものであり、次世代型の抗体医薬開発に大いに貢献し、バイオ工学の発展に寄与することが少なくない。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。