

称号及び氏名 博士(理学) 内藤 正一

学位授与の日付 平成 30 年 6 月 30 日

論 文 名 抗原ペプチドの分子設計による高機能モノクローナル抗体の創出
とその創薬応用

論文審査委員 主査 藤井 郁雄
副査 佐藤 孝哉
副査 児玉 靖司

論文要旨

抗原ペプチドの分子設計による高機能モノクローナル抗体の創出とその創薬応用

塩野義製薬株式会社 内藤 正一

第1章 序論

1975年にモノクローナル抗体の技術が確立され、現在では、免疫組織染色やイムノアッセイによる生体分子の機能解析や病気の診断などに、抗体は広く活用されている。しかし、創薬研究開発プロセス (Fig. 1) において、抗体を効果的に活用するためには、結合親和性や特異性が優れた抗体や生体分子の機能を阻害する抗体など、高度な機能を持つ抗体が求められる。さらに、非臨床研究では、動物モデルの抗原に交差する抗体も求められる。

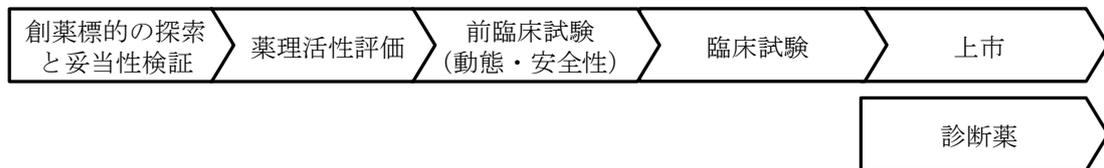


Fig. 1 創薬研究開発プロセス

高機能抗体の取得には、標的タンパク質に結合する抗体の中から適切なスクリーニング方法を用いて、目的の機能を有する抗体を選抜する方法が取られる。免疫原として、タンパク質や部分ペプチドが一般的に用いられるが、それぞれに利点と課題がある。タンパク質の場合、**native**なタンパク質と反応する抗体を獲得可能であるが、特定のエピトープに対する抗体や目的とする特異性を持つ抗体を獲得できるとは限らない。また、抗体作製に一般的に用いられる齧歯類に免疫した場合、非臨床研究で必要な齧歯類の抗原に結合する抗体を獲得できない場合が多い。一方、部分ペプチドの場合は、**native**なタンパク質に結合しない抗体となる可能性はあるが、エピトープを限定できるため、特異性や機能をデザインした抗体を効率良く作製可能である。また、齧歯類の抗原と交差する抗体の獲得も可能である。

そこで、創薬研究開発プロセスにおいて必要とされる抗体の機能に応じて、抗原ペプチドを適切にデザインし、高機能抗体の効率的な作製を試みた。本研究では、変形性関節症 (OA) の関節におけるコラーゲン分解の主体である **Matrix metalloproteinase-13 (MMP-13)**、組み換えタンパク質の迅速な定量に用いる新規ペプチドタグ、代謝性疾患で重要な役割を担うマウスインスリン、癌関連抗原として知られる **Mucin1 (MUC1)** の4つの分子に対して、分子設計した抗原ペプチドを用いて、高機能なモノクローナル抗体の創出と創薬研究への応用を試みた。

第2章 活性型 MMP-13 に特異的な中和抗体の創出【創薬標的の妥当性検証への応用】(論文1)

MMP-13 は、関節軟骨に多く含まれる 2 型コラーゲンを切断し、OA における関節軟骨の減少に大きく寄与する酵素の 1 つであり、OA 治療薬の創薬ターゲットとして期待されている。そ

ここで、MMP-13 の OA 病態への寄与を明らかにし、MMP-13 を阻害した場合の治療効果が見込まれるかを評価するために、MMP-13 に対して特異的な中和抗体の作製を試みた。

MMP ファミリーには 20 種以上の酵素が存在し、活性中心の構造が良く似ている。また、細胞から分泌された MMP-13 は、前駆体型から活性型に変換されるため、活性型 MMP-13 に特異的な中和抗体が必要である。以上のことから、MMP ファミリーの酵素活性中心付近のアミノ酸配列のアライメントや MMP-13 の触媒ドメインの立体構造から、最適な抗原ペプチドをデザインし、マウスに免疫することで、親和性 ($K_D = 0.33 \text{ nM}$)・特異性 (MMP-13 と相同性が最も高い MMP-8 に対する交差反応性: 1.2%) とともに優れた活性型 MMP-13 特異的な中和抗体 (14D10) を創出した。14D10 を用いてサンドイッチ ELISA を構築し、ヒト関節軟骨細胞を IL-1 β で刺激した際に分泌される活性型 MMP-13 を定量し、活性型 MMP-13 は、総 MMP-13 の約 15% であることを明らかにした。さらに、活性型 MMP-13 による 2 型コラーゲンの分解が 14D10 により阻害されることを示した。

以上のように、分子設計した抗原ペプチドを用いて活性型 MMP-13 特異的な中和抗体を創出した。このような中和抗体を用いて、MMP-13 の OA 病態への寄与を細胞レベルで明らかにし、創薬標的の妥当性検証に応用した。

第 3 章 2 種の抗ペプチドタグ抗体による組み換えタンパク質のホモジニアス免疫測定法の開発【創薬標的の妥当性検証への応用】(論文 2)

組み換えタンパク質作製の手法は、タンパク質の機能解析に有用な技術である。組み換えタンパク質の調製法は、タンパク質によって異なるため、条件設定が必要であり、その最適化には時間を要する。その要因の 1 つとして、条件検討の過程で組み換えタンパク質の検出や定量に汎用されるペプチドタグ (FLAG など) とペプチドタグ抗体を用いた Western blotting (WB) や ELISA の操作に時間がかかることが挙げられる。そこで、組み換えタンパク質を迅速に定量するために、新規ダブルエピトープタグをデザインし、タグに結合する 2 種の新規モノクローナル抗体 (TAG-6G4 と TAG-2E6) を用いる迅速なホモジニアス免疫測定法を構築した。

スベルミジン合成酵素 (SPDS) にダブルエピトープタグを付加した組み換えタンパク質を、FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) 法によるホモジニアス免疫測定法で測定した。その結果、本法は種々の培地 (動物細胞・昆虫細胞・酵母・大腸菌の破碎液および培養上清) の影響をほとんど受けなかったため、様々な宿主で発現させた組み換えタンパク質の検出に利用できることが判明した。さらに、その検出感度は、5 分の反応時間で、WB の定量下限と同等であった。次に、TAG-2E6 を用いるアフィニティクロマトグラフィにより SPDS を精製し、精製過程の画分を本法で測定したところ、SPDS が含まれる画分でシグナルの増加が検出され、組み換えタンパク質の精製過程のモニタリングへの有用性を明らかにした。

第 4 章 親和性を向上させた抗体によるマウスインスリンの高感度な免疫測定法の開発【薬理活性評価への応用】(論文 3)

インスリン抵抗性は、高脂血症や糖尿病のような代謝性疾患の発症リスクであると考えられており、代謝性疾患の創薬研究では、薬理活性の評価に用いる齧歯類のインスリン抵抗性の正確な評価は非常に重要である。インスリン抵抗性の指標の1つである HOMA-R の算出には、空腹時インスリン値の測定が必須であるが、齧歯類の空腹時インスリン値は極めて低濃度であり、既存のマウスインスリン測定キットでは感度が不足し、測定できなかった。そこで、マウスインスリンの高感度な測定が可能なサンドイッチ ELISA を構築するために、高親和性モノクローナル抗体の獲得を試みた。

多くの動物種でインスリン遺伝子は 1 コピーであるが、マウスやラットには 2 コピーの遺伝子が存在し、2 つのインスリンを産生する（インスリン I、II）。したがって、マウスとラットのインスリン I、II の間で良く保存されている領域を抗原ペプチドとして選択し、サンドイッチ可能な 2 種類の抗体（13G4 と 26B2）を作製した。これらの抗体は、マウスインスリンおよびラットインスリンに対して同等の反応性を示したが、目標よりも弱い結合親和性であった。そこで、部位特異的変異導入法、または、ファージディスプレイ法により親和性を向上させ、オリジナルの抗体よりも約 10 倍強い結合親和性の抗体（13G4m1 と 26B2m1、 K_D はそれぞれ 6.2 nM と 1.3 nM）を作製した。13G4m1 と 26B2m1 を用いて、マウスインスリンおよびラットインスリンを同程度の感度で測定可能なサンドイッチ ELISA を構築し、マウスの空腹時血中インスリン濃度の定量が可能となった。

以上のように、分子設計した抗原ペプチドを用いた抗体作製と抗体工学技術を応用することで、高感度免疫測定法に必要な高親和性抗体を創出し、さらに、これまで測定できなかったマウスの空腹時血中インスリン濃度の測定に応用した。

第 5 章 抗原糖ペプチドの分子設計による MUC1 抗体の創出【診断薬への応用】（論文 4）

膵臓がんマーカーの CA19-9 や肝線維化マーカーの M2BPGi のように、いくつかの糖鎖マーカーは診断薬として活用されている。糖鎖マーカーの基礎研究や診断薬への応用に、抗体は有用であり、複雑な糖鎖構造を厳密に認識する高い特異性の抗体が求められるが、O 型タンパク質糖鎖のコア領域では、特異性が厳密にデザインされた抗体はこれまでに報告例がほとんどない。そこで、合成糖ペプチドライブラリーを用いて、糖鎖特異性をデザインした抗体の作製に取り組んだ。

MUC1 は、20 アミノ酸のユニットの繰り返し構造を持ち、O 型糖鎖が密に付加された膜タンパク質である。癌や間質性肺炎などの病態に伴う MUC1 の糖鎖構造の変化は診断薬となり得るため、これまでに MUC1 に対する抗体が数多く報告されているが、糖鎖特異性の高い抗体は極めて少ない。そこで、糖鎖特異性の高い抗体を効率的に作製するために、MUC1 合成糖ペプチドを免疫原とし、抗体スクリーニングには 18 種の合成糖ペプチドから成る糖ペプチドライブラリーと Native MUC1 を用いる新しい抗体作製方法を試みた。特に MUC1 の O 型糖鎖コア領域の GalNAc の 6 位分岐に着目し、あらかじめ糖鎖特異性をデザインした 2 種の MUC1 抗体（1B2 と 12D10）を獲得した。どちらの抗体も MUC1 の PDTR モチーフの Thr 残基に糖鎖が結合し

た構造を認識し、1B2 は、GalNAc の 6 位が糖鎖で置換されていない構造を、12D10 は、同じ位置がシアル酸で置換された構造を認識する、またどちらもの抗体も GalNAc の 6 位が GlcNAc に置換された構造 (Core 2) に結合せず、monovalent なエピトープや Native MUC1 に対して強い結合親和性を示した。

以上のことから、今回作製した MUC1 抗体は、MUC1 の O 型糖鎖構造の解析に有用なツールとなり、病態変化に伴う糖鎖構造の変化を検出する診断薬への応用が期待される。さらに、本方法は、これまで獲得が難しかった O 型糖鎖のコア領域を認識する抗体作製への応用が可能である。

第 6 章 総括

本研究では、創薬プロセスに必要な抗体の機能に応じて抗原ペプチドを適切にデザインすることで、高機能抗体を効率的に作製できることを明らかにした。さらに、本研究で獲得したモノクローナル抗体は、既存の抗体よりも優れた性質 (高い結合親和性、優れた特異性、酵素の中和活性) を示し、創薬研究開発 (創薬標的の妥当性検証、薬理活性評価、診断薬) への応用の可能性を示した。

抗原ペプチドの分子設計による抗体作製法は、様々な抗原に対して応用できる可能性があり、本研究の成果が今後の医薬品の研究開発に貢献できるものと期待される。

学位に関する学術論文

- (1) Development of a neutralizing antibody specific for the active form of matrix metalloproteinase-13. Naito, S.; Takahashi, T.; Onoda, J.; Yamauchi, A.; Kawai, T.; Kishino, J.; Yamane, S.; Fujii, I.; Fukui, N.; Numata, Y. *Biochemistry*. **51**, 8877-8884. (2012)
- (2) A double epitope tag for quantification of recombinant protein using fluorescence resonance energy transfer. Enomoto, K.; Uwabe, K.; Naito, S.; Onoda, J.; Yamauchi, A.; Numata, Y.; Takemoto, H. *Anal. Biochem.* **380**, 249-256. (2008)
- (3) Development of an ultrasensitive immunoassay using affinity matured antibodies for the measurement of rodent insulin. Imai, S^a; Naito, S.^a; Takahashi, T.; Yamauchi, A.; Nakamura, E.; Sato, M.; Mitsuda, Y.; Takagi, H.; Numata, Y.; Fujii, I.; Yamane, S. *Anal. Biochem.* **473**, 72-79. (2015)
a; These authors contributed equally to the work.
- (4) Generation of Novel Anti-MUC1 Monoclonal Antibodies with Designed Carbohydrate Specificities Using MUC1 Glycopeptide Library. Naito, S.; Takahashi, T.; Onoda, J.; Uemura, S.; Ohyabu, N.; Takemoto, H.; Yamane, S.; Fujii, I.; Nishimura, S.-I.; Numata, Y. *ACS Omega*. **2**, 7493-7505. (2017)

学位論文草稿提出者氏名：内藤 正一

学位論文草稿題目：抗原ペプチドの分子設計による高機能モノクローナル抗体の創出とその創薬応用

1975年にモノクローナル抗体の技術が確立され、現在では、免疫組織染色やイムノアッセイによる生体分子の機能解析、病気の診断などに、抗体は広く活用されている。しかし、創薬研究開発プロセスにおいて、抗体を効果的に活用するためには、抗原に結合するだけでは不十分で、結合親和性や特異性が優れた抗体や生体分子の機能を阻害する抗体など、高度な機能を持つ抗体が求められる。さらに、非臨床研究では、動物モデルの抗原に交差する抗体も求められる。そこで、本学位論文では、4つの標的タンパク質に対する抗体を実例として、創薬研究開発プロセスにおいて必要とされる抗体の機能に応じて抗原ペプチドをデザインし、高機能抗体を効率的に創出し、創薬研究へ応用した。

第2章では、創薬標的分子としての妥当性を検証するため、高機能抗体を作製した。変形性関節症（osteoarthritis: OA）の軟骨減少に寄与する酵素 MMP-13（関節軟骨に含まれる II 型コラーゲンを分解する）に対して親和性・特異性ともに高い中和抗体（14D10）を創出した。活性型 MMP-13 に特異的に反応する 14D10 を用いてサンドイッチ酵素免疫測定法 (ELISA) を構築し、MMP-13 の OA 病態への寄与を細胞レベルで明らかにした。第3章では、新規ペプチドタグとタグに結合する2種の抗体の創出し、これらの抗体を利用したホモジニアス免疫測定法を開発した。ホモジニアス免疫測定法により、新規タグを付加した組み換えタンパク質を迅速・簡便に検出できることを示し、組み換えタンパク質調製の手間や時間の軽減に繋がった。第4章では、適切な抗原ペプチドの設計と抗体工学技術を組み合わせることで、イムノアッセイに適した高親和性抗体を創出した。最適化した抗体を用いて、高感度サンドイッチ ELISA を開発し、既存のキットでは測定できなかった極めて低レベルの空腹時マウス血中インスリンを測定し、代謝性疾患研究における薬理活性評価に貢献した。第5章では、癌関連抗原 MUC1 の O 型糖鎖コア領域に対して親和性・特異性ともに高い抗体を創出した。Monovalent な合成糖ペプチドを抗原とし、スクリーニングに合成糖ペプチドライブラリーを用いる抗体作製方法は、病態変化に伴い変化する糖鎖構造を厳密に認識する高性能抗体の効率的な取得を可能にし、糖鎖構造の研究や診断薬開発に対して有用性であった。

以上のように、申請者は、分子設計した抗原ペプチドを用いて高性能モノクローナル抗体を効率的に創出する方法を開発した。本研究で獲得した抗体は既存の抗体よりも優れた特徴（高い結合親和性、優れた特異性、酵素の中和活性、広範な動物種の抗原に対する反応性）を示し、基礎研究や創薬研究開発（創薬標的分子の妥当性検証、薬理活性評価、診断マーカーの開発）に応用が可能であった。本抗体作製方法を、疾患に関連するさまざまな抗原に応用すれば、高機能抗体を効率的に創出することが可能となり、今後の医薬品の研究開発に大きく貢献することが期待できる。本学位論文には顕著な新規性と独創性があり、また本人自信が、抗原ペプチドの設計、抗体の作製および特性解析を手がけており、申請者を博士（理学）の学位に値する能力を持つものと判断する。