

## 論文の内容の要旨

論文題目：創薬を目指したモノクローナル抗体の作製方法

氏名：岩成宏子

### 第一章 序論

抗体医薬は従来の低分子医薬を大きく上回る治療効果を示し、かつ分子標的薬であるために副作用も少なく「治療満足度」が大変高い。未だ効果的な治療薬が存在しないガン（特に手術不可能な転移ガン）や膠原病などの難治性疾患について、抗体医薬の開発が期待されている。

抗体は、それ自体が医薬品となりうるのみならず、創薬のためのツールとしても重要である。プロテオミクス解析や免疫染色に抗体を用いることにより、病態の解明が可能となり、新たな作用点の治療薬開発に繋がっていく可能性がある。また、抗体は膜蛋白質のX線結晶構造解析のツールとしても重要である。例えばG蛋白共役型受容体（以下GPCR）や膜輸送蛋白質（以下トランスポーター）のような膜蛋白質は重要な生理機能を担っており、その機能異常が数多の疾患の原因となるため、市販薬の半数以上がこれらをターゲットとしている。それ故に、膜蛋白質の構造解析とそれを元にしたドラッグデザインは、世界の関心を集めている。しかし、GPCRやトランスポーターのような複数回膜蛋白質は疎水性に富んでいるために、精製や結晶化が極めて困難である。これらの膜蛋白質に抗体を結合させることにより、蛋白質の「可溶性」を高め、膜蛋白質の立体構造を保持したまま複合体として回収できる。よって抗体は、膜蛋白質を精製するためのツールとして役立つのみならず、複合体を用いて結晶構造解析を行なうことができるという点で大変有用である。さらに抗体は、バイオマーカー探索にも重要な役割を果たす。抗体を用いたプロテオミクス解析により、臨床検体における創薬標的蛋白質の

分布を検証することによって、新たなバイオマーカーを生み出せる可能性は大きい。また、抗体医薬（治療薬）を投与する場合に、治療対象を特定する診断（コンパニオン診断）は治療薬開発と不可分のものであり、この診断法の開発にも抗体が重要である。このような抗体の重要性を鑑み、我々は、従来抗体作製が困難とされていた膜蛋白質などの創薬標的蛋白質に対して、創薬に応用できるような高品質の抗体を作製する手法の研究を行なった。

本研究においては、創薬標的となる細胞表面上の膜蛋白質（特に GPCR やガン特異的に発現している膜蛋白質など）、および細胞内蛋白質（酵素、核内受容体など）に対する抗体を作製する方法を確立することを目的として、標的蛋白質を発現させた発芽型バキュロウイルス（以下 BV）免疫法および末梢性免疫寛容の人為的解除による自己抗原に対する抗体作製方法の検討を行なった。

## 第二章 完全長膜蛋白質発現 BV 免疫による抗体作製方法の開発

膜蛋白質は疎水性が高く、立体構造を保持したまま精製することが一般に困難である。しかも GPCR などの複数回膜貫通蛋白質では蛋白質の発現量が大変少ないため、抗体作製に必要な量の精製蛋白質を調製できない。そこで我々は、膜蛋白質を BV のエンベロップ上に立体構造を保持したまま発現させ、ウイルス粒子を遠心で回収しそのまま免疫に用いることにより、GPCR の抗体を作製する手法の研究を行なった。

具体的には、ムスカリン性アセチルコリン M2 受容体（以下 M2）について、発現 BV を調製した。M2 ノックアウトマウス(KO)と BV のエンベロップ蛋白質 gp64 のトランスジェニックマウス（自家調製：gp64Tg）を交配させて M2KO×gp64 Tg マウスを作出し、そのマウスに M2 発現 BV を免疫した。細胞融合後のスクリーニングで陽性であったウェルのコロニーをパッチピッキング法（新たに考案した方法）で分別した。クローニングを行なって抗 M2 抗体産生ハイブリドーマを樹立した。

樹立した抗 M2 抗体（C1901-C4-152）は、M2 発現 BV ELISA および M2 発現 Sf9 細胞のフローサイトメトリーで特異的に反応し、細胞表面に発現している M2（立体構造を保持）と反応することが確認された。M2 以外にも複数の膜蛋白質について立体構造認識型の抗体作製に成功した。アデノシン A2a 受容体（以下 A2a）についてはインバースアゴニスト抗体を取得することができた。A2a とインバースアゴニスト抗体 C2838 の複合体を単離して X 線構造解析に成功し、GPCR の構造について創薬上重要な情報を提供することができた。

以上により、完全長膜蛋白質発現 BV 免疫法は、創薬を目的とした膜蛋白質に対する抗体作製、すなわち立体構造を認識し、機能を有し、高親和性である抗体を作製する手法として大変有用であり、その手法を確立した。

### 第三章 gp64 融合部分長蛋白質発現 BV 免疫による抗体作製方法の開発

創薬の標的蛋白質となっている核内受容体や細胞内酵素などで、共通の配列を持つファミリー蛋白質については、構造特異性の高い領域のみを BV のエンベロープの主要蛋白質である gp64 の融合蛋白質として発現させ、創薬のツールとなり得るような高品質の抗体を作製する手法を確立する研究を行なった。

gp64 融合部分長蛋白質発現 BV の調製においては、25~50 アミノ酸長で発現させると抗体取得効率が低いことを見いだした。アスパラギン合成酵素（以下 ASNS）については、N 末端 50 残基を gp64 の融合蛋白質として BV 上に発現させ、gp64Tg マウスに免疫して抗体作製を行なった。抗体産生陽性のウェルをまず発現 BV の ELISA およびイムノブロットで選別し、さらに完全長 ASNS 発現細胞のイムノブロットおよびフローサイトメトリーを行い、完全長蛋白質と反応するウェルを選別した。

樹立した抗 ASNS 抗体 Z5801 および Z5808 について、ヒト白血病細胞株 K562（ASNS 蛋白質が高発現）および MOLT-4（ASNS 蛋白質が極めて低発現）を用いてイムノブロットおよびフローサイトメトリーを行ない、K562 と特異的に反応すること、すなわち内在性 ASNS 蛋白質と特異的に反応することを確認した。フローサイトメトリーにより、細胞 1 個当たりの ASNS 蛋白質発現量が K562 では  $5755 \pm 291$  分子、MOLT-4 では  $44 \pm 39$  分子と見積もられ、K562 の方で有意に発現が高いことが確認できた ( $p < 0.001$ )。また 2 種類の抗体を組み合わせ、ASNS 測定サンドイッチ ELISA 法を構築し、K562 の細胞抽出液の希釈系列を反応させたところ、容量依存的な反応曲線が得られた。

以上により、gp64 融合部分長蛋白質発現 BV 免疫法においては、構造特異性の高い部分長の蛋白質を免疫することにより、内在性の蛋白質と特異的に反応する抗体を得られることが示された。また取得した抗 ASNS 抗体を用いて、フローサイトメトリーおよび ELISA で内在性 ASNS が定量できることが示された。これにより、急性リンパ性白血病においてアスパラギナーゼ療法を適用する患者群（ASNS 発現量の低い患者群）の識別診断方法開発への可能性を示した。

同免疫法でおよそ 350 種類の抗原について抗体作製を行なったが、およそ 7 割について内在性蛋白質のイムノブロット、免疫染色、免疫沈降、クロマチン免疫沈降、フローサイトメトリーなどに用いることができる高品質の抗体を取得することができた。以上により、gp64 融合部分長蛋白質発現 BV 免疫法は、創薬を目的とした高品質の抗体を作製する手法として大変有用であり、その手法について確立した。

#### 第四章 末梢性免疫寛容の人為的解除による自己抗原に対するモノクローナル抗体作製方法の開発

自己抗原および自己と相同性の高い抗原に対しては、異なる生物種由来の抗原であっても自己抗原と認識されて免疫寛容の機構が働くため、抗体が産生されにくい。創薬の標的になるような蛋白質は生理的に重要な機能を有しているため、動物種間で構造保存性が高い場合が多い。そこで我々は、末梢性免疫寛容を人為的に解除したマウスを作製して免疫に用いることにより、自己抗原および自己と相同性の高い抗原に対して抗体を作製する手法を確立するための研究を行なった。

正常 BALB/c マウスの脾臓細胞から CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 細胞を除去した細胞（以下 CD25<sup>-</sup>細胞）を同系のヌードマウスに移入することによって、末梢性免疫寛容を人為的に解除したマウスを作製した（以下 CD25<sup>-</sup>細胞移入マウス）。そのマウスに自己抗原であるマウスサイログロブリン（以下 mTg、精製抗原）を免疫し、免疫の至適条件の検討を行なった。抗血清価は ELISA で評価した。その結果、CD25<sup>-</sup>細胞移入マウスに外来性に mTg を免疫した群では、免疫を行なわなかった群、あるいは CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 細胞除去処理を行なわない脾臓細胞を移入したマウスに免疫した群と比べて、血中抗 mTg 抗体価が有意に上昇した ( $p < 0.05$ )。また、初回、2 回目免疫を 10 日以内に行なうことが、抗体価上昇のために重要であることが判った。別のマウス自己抗原であるマウス Gα12 蛋白質（精製抗原）についても至適条件で免疫を行い、抗血清価をイムノブロットで評価したところ、抗体価の上昇が確認された。また、mTg を免疫したマウスを用いてモノクローナル抗体を樹立した（C9502-03、C9504-11、C9507-02）。樹立された抗体は、ELISA、イムノブロットでいずれも mTg と良好に反応し、ビアコアにより解離定数 ( $K_D$ ) は  $10^{-8}$  M オーダーと見積もられ、高親和性の抗体が得られたことが確認された。

以上により、CD25<sup>-</sup>細胞移入マウスに外来性に免疫を行なう方法は、免疫寛容を回避し自己抗原に対する抗体を作製する手法として有用であると考えられる。自己抗原に対する抗体作製方法としては他にノックアウトマウスを用いる方法があるが、本法はそれを補うより汎用性の高い有用な方法になり得ると考えられ、創薬を目指した抗体作製の手法として確立することができた。

#### 第五章 結語

本研究の成果は、今後の創薬を目指した新規モノクローナル抗体の作製、開発に貢献できるものであると考えられる。

以上