

癌関連抗原を標的とする高機能人工抗体の創製に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2018-06-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大崎, 智弘 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24544/ocu.20180712-001

癌関連抗原を標的とする
高機能人工抗体の創製に関する研究

2016 年 3 月

大崎 智弘

癌関連抗原を標的とする
高機能人工抗体の創製に関する研究

2016 年 3 月

おおさき ともひろ
大崎 智弘

略語表

本論文では以下の略語を使用した。

AD	: anchoring domain
ADC	: antibody-drug conjugate
ADCC	: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
BiTE	: bispecific T cell engaging
CDC	: complement-dependent cytotoxicity
DDD	: dimerization and docking domain
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EC ₅₀ , IC ₅₀	: half maximal effective and inhibitory concentrations
ECD	: extracellular domain
EGF	: epidermal growth factor
EGFR	: epidermal growth factor receptor
ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay
EpCAM	: epithelial cell adhesion molecule
FBS	: fetal bovine serum
FcγRIIIa	: Fc-gamma receptor IIIa
FDA	: Food and Drug Administration
Fv	: variable fragment
HAMA	: human anti-mouse antibody
HRP	: horseradish peroxidase
Ig	: immunoglobulin
IPTG	: isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
k_a	: association rate constant
k_d	: dissociation rate constant
K_D	: dissociation constant
MALDI-TOF/MS	: matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
MFI	: mean fluorescence intensity
MTS	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium inner salt
OD ₆₀₀	: optical density at the wavelength 600 nm
Pals1	: protein associated with Lin-7 1
Patj	: Pals-associated tight junction protein
scFv	: single-chain Fv

sdAb	: single-domain antibody
SPR	: surface plasmon resonance
tetBsAb	: tetramerized bispecific antibody
TGF	: transforming growth factor
TNF	: tumor necrosis factor
VEGF	: vascular endothelial growth factor
VH, VL	: variable domains of the heavy and light chains
VHH	: variable domain of heavy-chain antibody

目次

序章	1
1 はじめに	2
2 抗体医薬の特徴	3
3 抗体医薬の作用機序	3
4 抗体医薬の現状と課題	5
5 イムノグロブリンフォールド(Ig フォールド)を基盤とした高機能抗体の構築	7
6 高機能抗体の構築に向けたその他の抗体技術	14
7 研究目的	15
第1章 ヘテロ会合ペプチドの利用による四量体型二重特異性抗体の作製	17
1-1 はじめに	18
1-2 方法	20
1-2-1 細胞と培養条件	20
1-2-2 組換え CD16 細胞外ドメインタンパク質(CD16-ECD)の調製	20
1-2-3 組換え EGFR 細胞外ドメインタンパク質(EGFR-ECD)の調製	21
1-2-4 組換え抗体の発現ベクターの構築	21
1-2-5 組換え抗体の発現と精製	23
1-2-6 ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)およびウェスタンブロッティング による分子間ジスルフィド結合の分析	24
1-2-7 マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF/MS)	24
1-2-8 ゲルろ過クロマトグラフィー	25
1-2-9 フローサイトメトリー解析	25
1-2-10 表面プラズモン共鳴法(SPR 法)	26
1-2-11 <i>in vitro</i> 細胞傷害性試験	26
1-3 結果	27
1-3-1 EGFR および CD16 を標的とする tetBsAb の構築	27
1-3-2 ジスルフィド結合形成の分析および分子形状の評価	29
1-3-3 特異的結合および抗原架橋能の評価	32
1-3-4 SPR 法による結合の速度論的解析	35
1-3-5 NK 細胞を用いた抗体依存性細胞傷害活性の評価	37
1-4 考察	40
第2章 単ドメイン抗体-腫瘍壊死因子 α 融合タンパク質の大腸菌による可溶性発現	45
2-1 はじめに	46
2-2 方法	47
2-2-1 細胞と培養条件	47
2-2-2 Ia1 sdAb の調製	47
2-2-3 組換え TNF α の調製	48
2-2-4 Ia1-TNF α 発現ベクターの構築	48
2-2-5 Ia1-TNF α の発現と精製	48
2-2-6 ゲルろ過クロマトグラフィー	49
2-2-7 フローサイトメトリーによる特異的結合の評価	49
2-2-8 EGF 競合アッセイ	49

2-2-9 L929 細胞を用いた TNF α バイオアッセイ	50
2-3 結果	51
2-3-1 Ia1-TNF α の構築と調製	51
2-3-2 ゲルろ過クロマトグラフィーによる Ia1-TNF α の分子形状評価	53
2-3-3 Ia1-TNF α の A431 細胞への結合	55
2-3-4 TNF α の生物学的活性	57
2-4 考察	58
第 3 章 上皮増殖因子受容体を標的とするラットモノクローナル抗体の作製と特性評価	60
3-1 はじめに	61
3-2 方法	62
3-2-1 細胞と培養条件	62
3-2-2 組換え EGFR タンパク質の調製	62
3-2-3 ハイブリドーマの作製	62
3-2-4 ELISA	63
3-2-5 フローサイトメトリーによる特異的結合の評価	63
3-2-6 競合アッセイ	63
3-2-7 免疫染色	64
3-3 結果	64
3-3-1 ラット抗 EGFR 抗体の作製	64
3-3-2 ラット抗 EGFR 抗体のエピトープ解析	67
3-4 考察	69
総括	71
引用文献	75
論文リスト	86
謝辞	87

序章

1 はじめに

医療の進歩に伴う長寿化により、がんで死亡する人の数は年々増加している。2014 年のがんによる国内の死亡者数は、全死亡者数の約 30%にあたる約 37 万人で、がんは死亡原因の第 1 位となっている。また、がん死亡者の約 50%は 5 年生存率 50%以下の難治性がん患者であることから、がん領域はアンメットメディカルニーズの極めて高い疾患領域であると言える。国内では、これまでに経験したことのないような高齢化の時代を迎えようとしており、今後、がんを対象とした創薬研究に対する期待はますます増加すると予想される。

1975 年にハイブリドーマ技術が確立されて以来、モノクローナル抗体は、がんを含めた様々な疾患に対する治療薬として期待されてきた。1985 年には、マウスモノクローナル抗体オルソクローン OKT3 が最初の抗体医薬として米国食品医薬品局(FDA)に認可された。しかし、マウス抗体の人への投与は、マウス抗体に対するヒト抗体(HAMA)の出現という新たな問題を生み出したため、抗体医薬の実用化はしばらくの間進まなかった。

抗体医薬における最初の技術革新は、1980 年代に開発されたキメラ化およびヒト化技術である。これらの技術は遺伝子組換え技術を用いてマウス抗体の配列をヒトの配列に近づける技術で、これまで抗体医薬の課題とされていた HAMA の出現を大幅に抑制することを可能にし、抗体医薬の普及に大きく貢献した。1999 年にキメラ抗体リツキシマブが FDA に認可されて以来、抗体医薬の承認数は年々増加している。2016 年 1 月 1 日の時点で 46 品目の抗体医薬が FDA から承認を受けている。

一方で、抗体医薬品産業は高い製造コストや生産の難しさ、高い治療コストや標的抗原の枯渇など多くの課題も抱えている。これに対して、製薬企業を中心とする多くの研究機関で課題克服に向けた技術開発が盛んに行われており、二重特異性抗体や抗体薬物複合体(ADC)といった次世代型の抗体医薬が実用化されるなど、徐々にではあるがその成果が見え始めている。本章では、抗体医薬の特徴や課題、関連する抗体技術などの研究背景と本研究の目的について述べる。

2 抗体医薬の特徴

抗体は生体内の免疫システムを担う重要なタンパク質で、外部から病原体などの外敵が体内に侵入した際、生体内に存在する様々な分子の中から外敵だけを見分け攻撃する能力を有している。このような優れた分子標的能こそが抗体医薬の最大の特徴である。従来の抗がん剤の多くは核酸の代謝経路を標的としており、しばしば副作用の発現に苦しめられてきた。一方、抗体医薬はがん細胞で特異的に発現している分子を見分けて結合するため、従来の抗がん剤に比べ副作用が少ないという特徴がある。抗体医薬が登場した当初は、マウス抗体の免疫原性が問題とされることもあったが、キメラ化技術やヒト化技術、さらには完全ヒト型抗体作製技術の登場によって免疫原性の問題は大幅に改善された。

これ以外の抗体医薬の特徴としては、血中半減期が長い(標準的な抗体医薬の血中半減期は 20 日程度)ことや作用メカニズムが多様であること、遺伝子工学的手法による改変、改良が容易であることなどが挙げられる。いずれも従来の抗がん剤にはない特徴で、抗体医薬の成功をもたらした重要な要素である。

3 抗体医薬の作用機序

図 1 に示すように抗体医薬の作用機序としては大きく 3 つある。1 つ目は、エフェクター細胞のリクルートである。NK 細胞やマクロファージなどのエフェクター細胞は細胞表面に抗体の Fc 領域(図 2)に対する受容体を持っている。そのため、標的細胞に抗体が結合すると、抗体の Fc 領域を目印としてエフェクター細胞が呼び集められ、標的細胞を攻撃する。エフェクター細胞によるこれらの作用は抗体依存性細胞傷害(ADCC)と呼ばれる。一方、標的細胞に結合した抗体は Fc 領域を介して補体系の活性化も誘導する。この作用は補体依存性細胞傷害(CDC)と呼ばれ、ADCC とともにがんを標的とする多くの抗体医薬において薬効の発現に関与している(1, 2)。

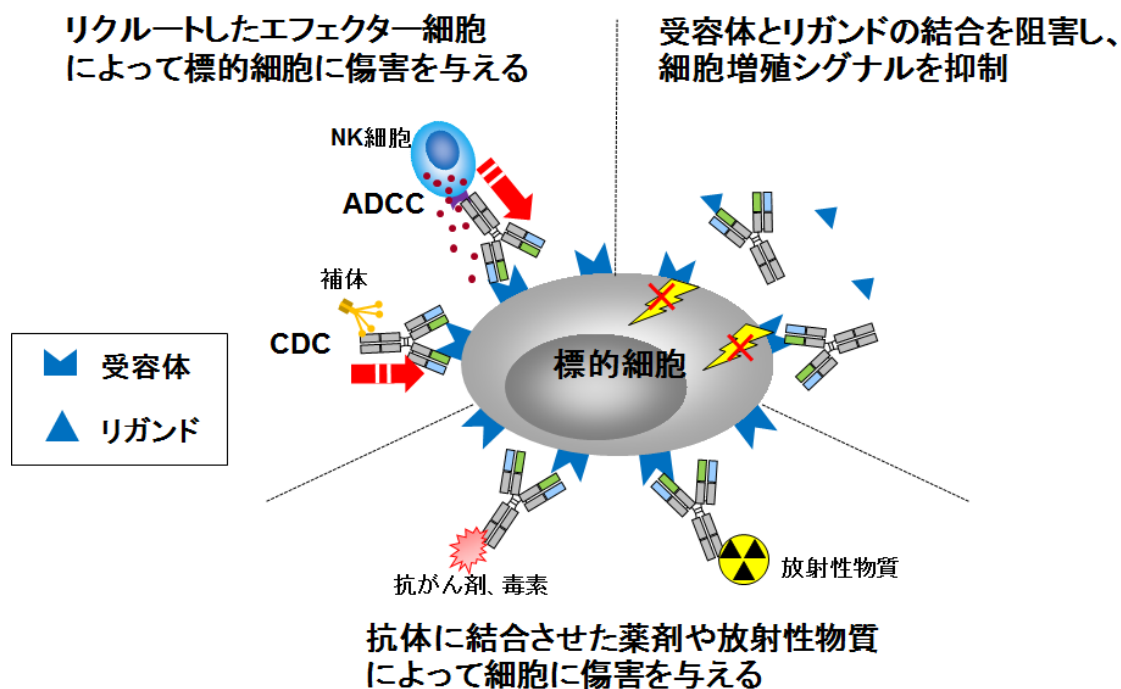


図 1 抗体医薬の主な作用機序 がんを標的とする抗体医薬の多くは図中に示した 3 つのいずれかの作用によって抗腫瘍効果を発揮する。

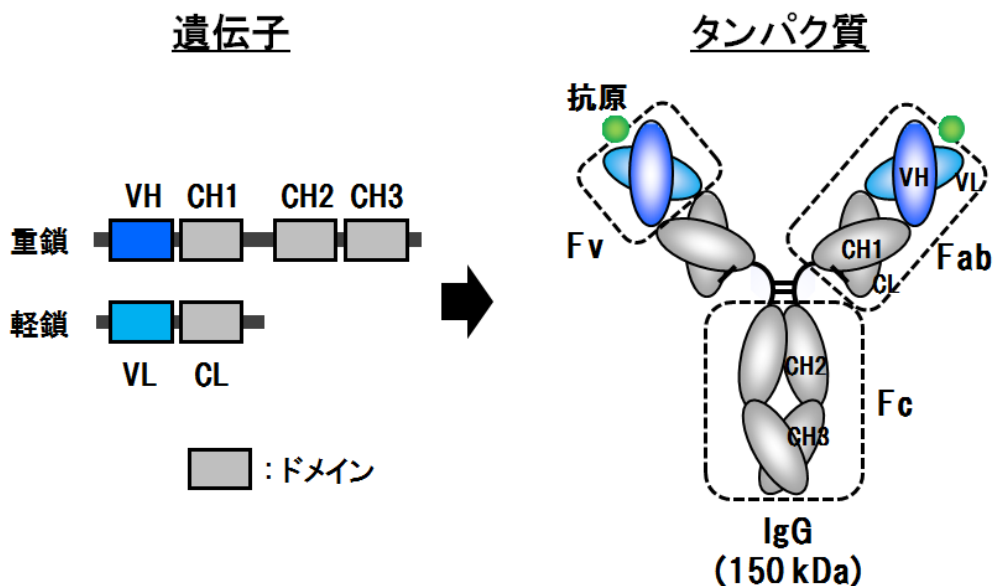


図 2 IgG 抗体の模式図 IgG 抗体は 2 本の重鎖と 2 本の軽鎖から構成されており、それらは分子間ジスルフィド結合を介して会合し、Y 字型の四量体を形成する。抗原結合部位は各鎖の N 末端にあたる 2 本の腕の先端部分に位置する。抗原結合部位を含む各鎖の N 末端ドメインは可変領域断片(Fv; 重鎖:VH、軽鎖:VL)と呼ばれる。また、IgG 抗体の 2 本の腕を支える根元の部分は Fc 領域と呼ばれ、ADCC 活性や CDC 活性に重要な役割を担っている。

2 つ目はシグナル伝達経路の阻害である。がん細胞の増殖には、多くの場合、増殖因子の受容体への結合に伴う細胞内シグナルが重要な役割を果たしている。がん細胞表面の受容体を標的とする抗体は、増殖因子の受容体への結合を阻害することにより、増殖シグナルを阻害し、がんの増殖を抑える(2-4)。また、リガンドを標的とする抗体の場合も同様の作用が期待できる。

3 つ目は抗体による放射性同位元素や抗がん剤の腫瘍組織への送達である(5, 6)。放射性物質や抗がん剤を抗体に結合させることで、これら積み荷分子を標的組織に集積することができる。抗がん剤を結合させた抗体の場合、細胞に結合した抗体の一部が細胞質内に取り込まれることによって薬効を発揮する。この戦略を応用した抗体医薬は、2010 年以前には、薬剤結合抗体 1 種と放射性同位元素結合抗体 2 種しかなかったが、薬剤架橋技術の発展などにより、近年、多くの ADC が臨床段階に入ってきており、実用化が進んできている。

上記以外の作用メカニズムとしてはアゴニスト作用によるアポトーシスの誘導や免疫チェックポイント阻害が挙げられる(7-9)。後者は、がん細胞が獲得した免疫抑制能を解除することを目的としたアプローチで、近年、がん治療の新たな戦略として注目されており、低分子薬も含め開発が進められている。免疫チェックポイント阻害を狙った抗体医薬としては、これまでにピリムマブ(ヤーボイ)、キートルーダ(ペンブロリズマブ)、オブジーボ(ニボルマブ)の 3 品目が承認されており、オブジーボは日本発の抗体医薬として国内でも話題となっている。

4 抗体医薬の現状と課題

世界的にがん治療に対するニーズが高まっている中、抗体医薬の市場は急激に拡大を続けている。表 1 に示すように、2013 年の世界医薬品売上ランキングでは、上位 10 品目の半数を抗体医薬品が占めており、その内の 3 品目(リツキサン、アバスチン、ハーセプチン)は、がんに対する抗体医薬品である。抗体医薬市場の成長はしばらく続くと思われ、今後とも抗体医薬品産業がバイオ医薬品産業の中心的な役割を担うことは間違いないと思われる。

一方で、抗体医薬品産業はいくつかの課題も抱えている。当初からの課題として、高い治療コストが挙げられる。現在承認されている抗体医薬品のほとんどは、高価な動物細胞発現系を用いて生産されており、これが抗体医薬の薬価を引き上げている。また、抗体医薬は1回の投与量が多い。例えば、大腸がんの治療薬であるアービタックス(セツキシマブ)の日本での価格は製品100mgあたり約3万7千円で、1か月あたりの標準的な治療コストは70万程度である。

また、治療効果の面でも課題は残されている。例えば、固形がんに対する抗体ではしばしば組織浸透性の低さが問題とされる。抗体の分子形態は抗体フォーマットと呼ばれるが、組織浸透性の向上に向けては、Fcのない抗体フォーマットへの変換が有効である。しかし、Fc領域を持たない分子量の小さい抗体は血中半減期が短く、医薬への応用は進んでいないのが現状である(10)。また、がん細胞ではしばしば細胞表面抗原の変異や発現レベルの低下が起これることが知られ、こうしたがん細胞の免疫逃避機構は、抗体医薬を含むがん治療薬に対する抵抗性発現の主な原因とされている(11)。

表1 2013年世界医療用医薬品売上ランキング

順位	製品名(一般名)	薬効分類	売上高 (百万ドル)	前年比
1	ヒュミラ(アダリムマブ)	抗リウマチ薬	11,024	15%
2	レミケード(インフリキシマブ)	抗リウマチ/クローン薬	9,727	7%
3	リツキシサン(リツキシマブ)	抗悪性腫瘍薬	8,906	23%
4	エンブレル(エタネルセプト)	抗リウマチ薬	8,791	4%
5	アドエア(サルメテロールキシナホ酸塩)	吸入喘息配合薬	8,756	7%
6	ランタス(インスリングラルギン)	インスリン製剤	7,867	20%
7	アバスチン(ベバシズマブ)	抗悪性腫瘍薬	7,023	6%
8	ハーセプチン(トラスツズマブ)	抗悪性腫瘍薬	6,827	6%
9	クレストール(ロスバスタチンカルシウム)	高脂血症治療剤	6,718	-10%
10	ジャスビア(シタグリプチンリン酸塩水和物)	統合失調症治療薬	6,263	1%

網掛けは抗体医薬品。

出典:セジデム・ストラテジックデータ(株)ユート・ブレーン事業部

その他の課題としては、標的抗原の枯渇が挙げられる。臨床段階にあるがんを対象とした抗体医薬のほとんどは上皮細胞接着分子(EpCAM)や EGFR ファミリーなどの癌関連抗原、血管内皮増殖因子(VEGF)などの血管新生に関わる分子、CD20 などのリンパ球表面抗原を標的としている。この課題の克服には、免疫チェックポイント阻害薬開発のような新規がん治療法の開発や抗体の高機能化により発現レベルの低いがん抗原を標的とできるようにすることが重要であると思われる。

5 イムノグロブリンフォールド(Ig フォールド)を基盤とした高機能抗体の構築

免疫グロブリンは2本の重鎖と2本の軽鎖がジスルフィド結合を介して会合した四量体構造が基本単位となっている。この基本単位を単量体とすると、IgG、IgD、IgE は単量体、IgA は二量体、IgM は五量体となる。IgG の場合、重鎖は4つ、軽鎖は2つのドメインから構成され、それらはすべて図 3 に示したイムノグロブリンフォールドと呼ばれる1対の分子内ジスルフィド結合を持つβバレル型の3次構造をとっている。その中で、抗原への結合は、可変領域断片(Fv)と呼ばれる重鎖と軽鎖の各 N 末端に位置する VH、VL の2つのドメインが担っている。

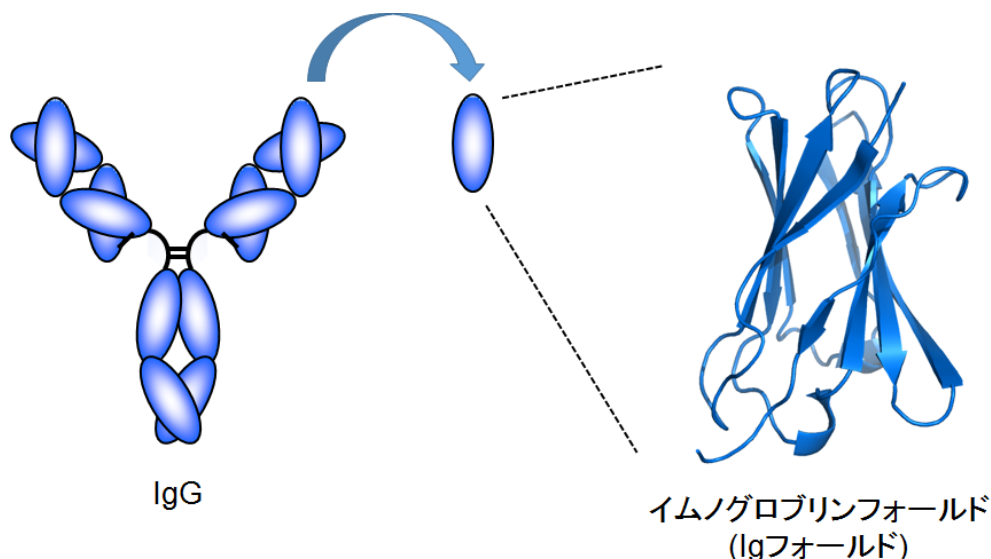


図 3 Ig フォールド IgG 抗体はポリペプチド鎖あたり重鎖 4 つ、軽鎖 2 つの計 12 のドメインから構成されており、各ドメインはいずれも共通して Ig フォールドと呼ばれる 1 対の分子内ジスルフィド結合を有するβバレル構造から成っている。

イムノグロブリンフォールド(Ig フォールド)を基盤とした高機能抗体の構築は上述の課題克服に向けた抗体技術開発の展開の 1 つである。抗体ドメインを機能の最小単位と捉え、それらを組み合わせ、連結することにより、多種多様な人工抗体が作製されてきた。また、多量体形成能を持つタンパク質やサイトカインなど抗体以外の機能ドメインも人工抗体の構成単位として用いられており、機能ドメインの組み合わせは非常に多様である。現在承認されている抗体医薬のほとんどは IgG 型であるが、課題克服に向けては、このような Ig フォールドを基盤とした高機能人工抗体の構築が重要である。以下に抗体断片、多価抗体、二重特異性抗体、融合抗体の 4 つの抗体について解説する。

(1) 抗体断片

図 4 に抗体断片の模式図を示す。Fv は VH と VL の 2 つのドメインから成るヘテロ二量体で、各ドメインは非共有結合で会合しているため解離し易い。一本鎖抗体 scFv は Fv とほとんど同じ分子形態の抗体断片であるが、VH と VL をポリペプチドリンカーで連結しているため、各ドメインは解離し難い。Fab は IgG をパパインで消化することにより得られる抗体断片である。VHH はラクダ科動物由来の重鎖抗体の可変領域断片で、マウスやヒトの抗体と異なり、単一ドメインでも抗原親和性を有する。scFv よりも分子量が小さく、水溶性が高いなど物性にも優れている。以上の抗体断片はすべて安価な微生物発現系を利用して生産することができる。抗体断片は IgG に比べ分子量が小さいため、組織への浸透性にも優れているという特徴がある。一方で、抗体断片は結合価数が 1 価であることがほとんどで、血中半減期も短いため、医薬への応用はあまり進んでいない。組織浸透性と血中半減期の関係はおおよそ図 5 のようになり(13)、組織浸透性と体内動態の両方に優れた人工抗体の開発は難しい。したがって、疾患の種類や抗体の作用メカニズムに応じて適当な抗体フォーマットを選択することが重要である。

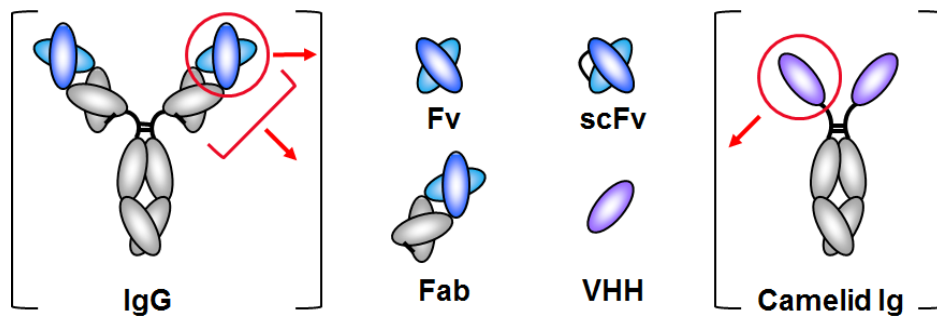


図4 抗体断片の模式図 FvはVHとVLが非共有結合により会合した断片で、人工抗体の構成単位として利用される。VH-VLヘテロ二量体間の相互作用は比較的弱いため、VHとVLの解離を防ぐことを目的として、VH-VL間をポリペプチドリンカーで連結したscFvが開発された。FabはIgGをパパインで消化することによって得られる断片である。これらの断片はすべて、ヒトやマウスのIgGから得られる抗体断片である。一方、VHHはラクダ科動物に存在する重鎖抗体から得られる抗体断片で、単量体で抗原親和性を示す。これらはすべて大腸菌を用いて生産できる。

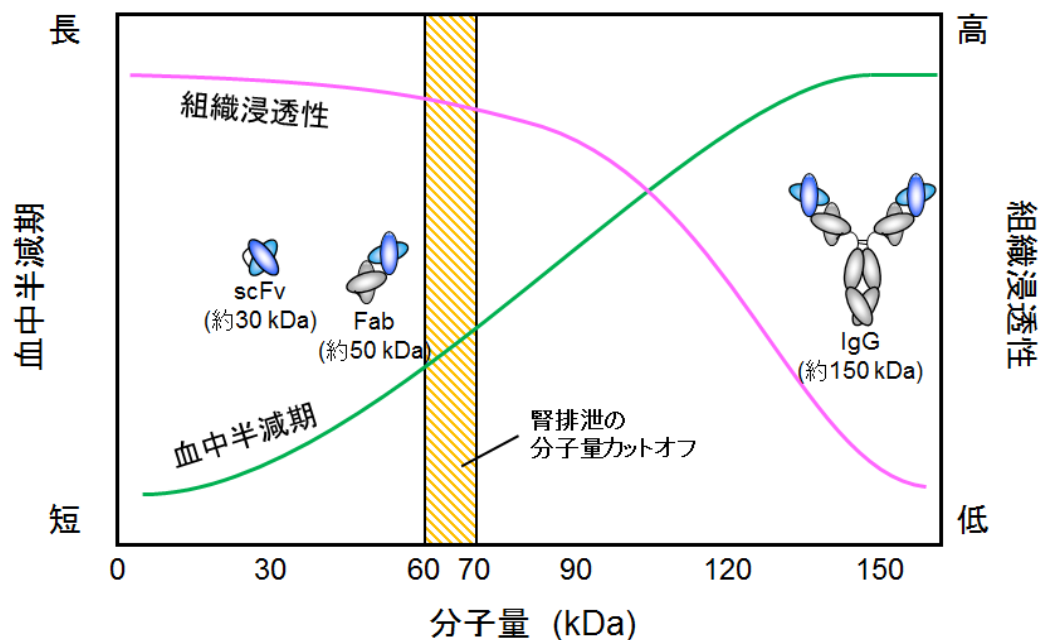


図5 推定される固形癌を標的とする各種組換え抗体の組織浸透性と血中半減期 (13) 分子量の小さい抗体断片は組織浸透性(ピンク)に優れている一方で、血中半減期(緑)が短い。一方、分子量の大きいIgG抗体は血中半減期が長い一方で、組織浸透性に乏しい。

(2) 多価抗体

図6に多価抗体の模式図を示す。多価化の主な目的は結合価数の増やすことにより見かけ上の親和性を向上させることである。また、抗体断片の連結に伴う分子量の増加は血中半減期の延長にもつながる。多価抗体はその構造によって2種類に大別される。1つはIgG様構造の多価抗体で、FcやCH3ドメインを介してscFvを連結したscFv-FcやMinibodyなどが作製されている。もう1つはIgGとは類似していない構造の多価抗体で、scFvのリンカー長の変更によって作製されるscFv誘導体(diabody, triabody、triabody)やp53の四量体形成ドメインを利用した四価抗体scFv-p53などが作製されている。

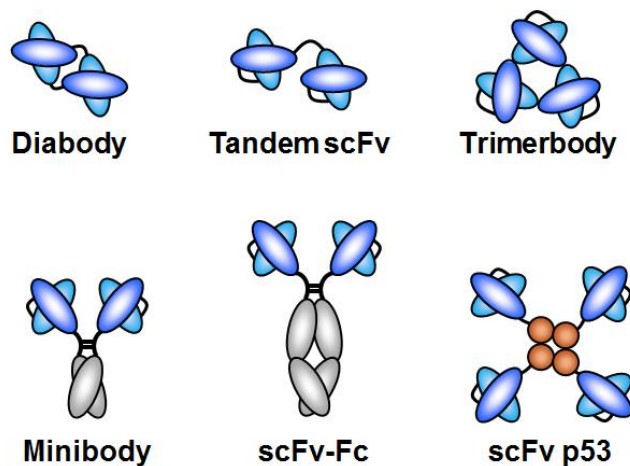


図6 多価抗体の模式図 DiabodyやTrimerbodyはscFvのリンカー長を変更することによって作製される。Tandem scFvはポリペプチドリンカーを介してscFvを連結することによって作製される。MinibodyおよびscFv-Fcは、ヒンジ領域を介してscFvとCH3およびFc領域をそれぞれ連結することによって作製される。scFv p53はscFvにp53の四量体形成ドメインを融合することによって作製される四価の抗体である。

(3) 二重特異性抗体

二重特異性抗体の2つの主な作用機序を図7に示した(14)。1つ目は、同一細胞上に発現する2種類の受容体の架橋である。この狙いは、多くの場合、協同的に働く2種類の受容体の機能を阻害することである。その例としては、ErbB ファミリータンパク質やインシュリン様増殖因子 I 型受容体を標的とする二重特異性抗体が挙げられる。2つ目は免疫細胞と標的細胞の架橋である。この作用機序は Fc を介した免疫細胞のリクルートとよく似ているが、エフェクター細胞に対する親和性や免疫細胞の活性化作用、リクルートできる免疫細胞の種類などに違いがある。がん細胞上の CD19 と T 細胞上の CD3 を標的とする二重特異性抗体ブリナツモマブは、臨床試験において既存の抗体医薬より有効濃度が 5 桁も低いという結果が得られるなど、一般に、二重特異性抗体による標的細胞と免疫細胞の架橋は ADCC よりも高い抗腫瘍効果を誘導されている(15)。

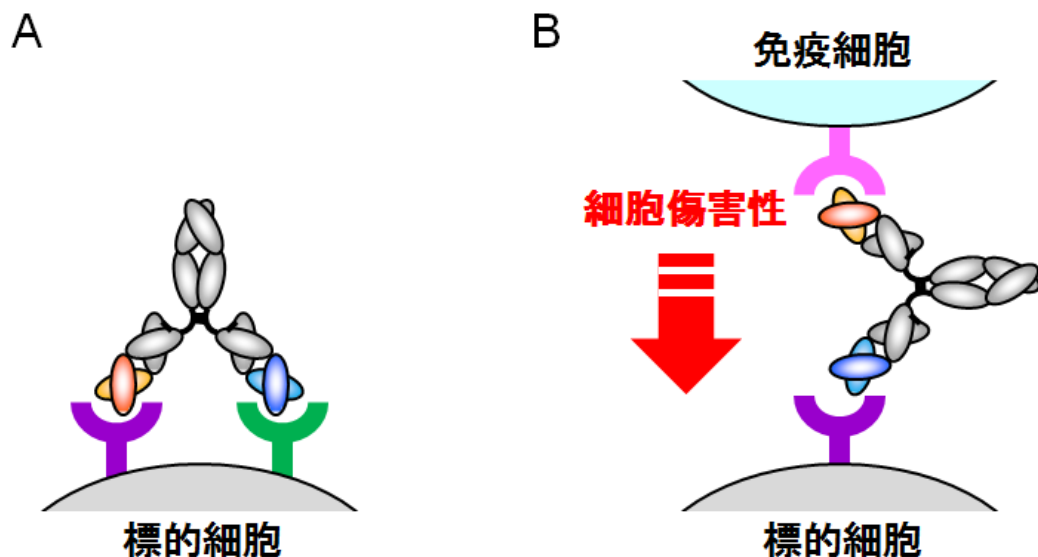


図 7 二重特異性抗体の主な作用機序 (A)二重特異性抗体は同一細胞上の 2 種類の受容体に結合し、それらを架橋することにより効果を発揮する。(B)二重特異性抗体は標的細胞上の受容体と免疫細胞上の受容体に結合し、2 種類の細胞を架橋することにより効果を発揮する。

図 8 に示したように、二重特異性抗体のフォーマットは、Fc 領域の有無によって 2 つに大別される。Fc を持つ IgG 様フォーマットは、ADCC による抗腫瘍効果や胎児性 Fc 受容体を介したリサイクル機構による良好な体内動態が期待できる。中でも、物性などに優れた IgG 型二重特異性抗体は、最も開発に力が注がれている二重特異性抗体フォーマットの 1 つである。長年、IgG 型二重特異性抗体は 2 種類の重鎖と 2 種類の軽鎖の計 4 種類のポリペプチド鎖から構成され、各鎖の組み合わせが異なる副産物の生成が課題とされてきた。一方で、2 種類の重鎖をヘテロに会合させる knobs-into-holes 技術(16)をはじめとして、IgG 型二重特異性抗体の作製に関して多数の技術が開発されており、以前に比べ、生産性は向上してきている。

一方、Fc を持たない二重特異性抗体フォーマットとしては、BiTEs や Diabody のような 2 種類の抗体可変領域をポリペプチドリンカーで連結した抗体フォーマットや多量体形成ドメインを利用して 2 種類の Fab や scFv を連結した抗体フォーマットなどがある。Diabody 型フォーマットのように低分子量の二重特異性抗体は微生物で生産することができる。

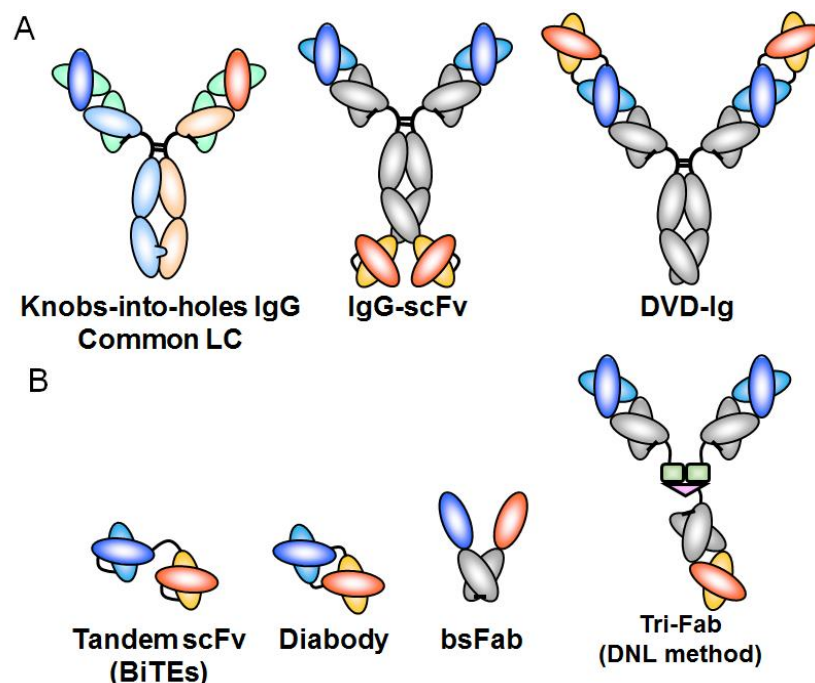


図 8 二重特異性抗体の模式図 (A) IgG 様二重特異性抗体フォーマット。Fc を持つため IgG 同様、ADCC による抗腫瘍効果や良好な体内動態が期待できる。(B) Fc を持たない二重特異性抗体フォーマット。サイズの小さい分子は微生物を用いて生産することができる。

(4) 融合抗体

抗体は、薬剤や放射性物質のような低分子化合物だけでなく機能性タンパク質の運び屋としても利用されている。例として、毒素や RNase、サイトカインなど細胞傷害作用や免疫賦活化作用をもつ機能性タンパク質との融合抗体が挙げられる。毒素、RNase、サイトカインとの融合抗体はそれぞれイムノトキシン、イムノ RNase、イムノサイトカインと呼ばれている。融合抗体のフォーマットは IgG 様分子や Fc 領域を持たない比較的分子量の小さい分子、多量体を形成するサイトカインと融合した多価の分子など多岐に渡る(17)。現在のところ、医薬として承認された融合抗体はないが、開発段階には多数の融合抗体が新薬候補として入っており、今後の動向が注目される。

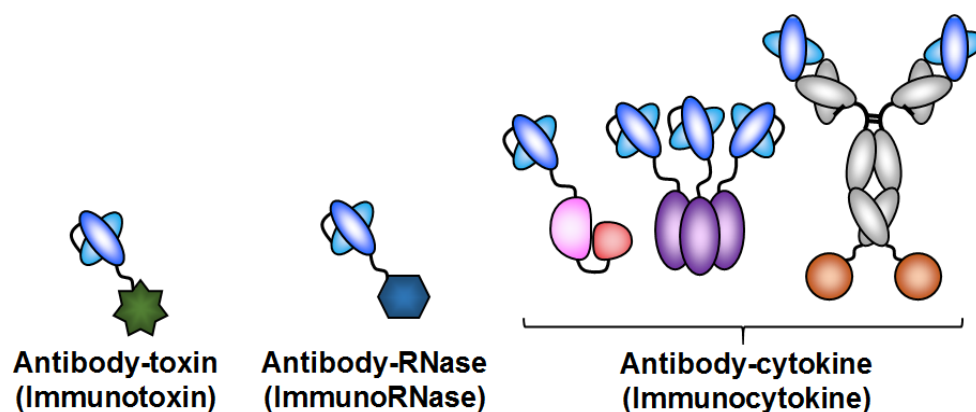


図 9 融合抗体の模式図 毒素、RNase、サイトカインとの融合抗体はそれぞれイムノトキシン、イムノ RNase、イムノサイトカインと呼ばれる。多量体を形成するタンパク質と融合した場合、抗体の結合価数を増加させることもできる。

6 高機能抗体の構築に向けたその他の抗体技術

高機能抗体構築に向けたその他 3 つのアプローチを以下に紹介する。

(1) 親和性の向上

抗体のヒト化はしばしば親和性の低下を引き起こすことが知られ、親和性の回復が必要となる場合が多い。多くの場合、親和性の回復は、抗体可変領域へのランダム変異の導入と生体外での抗親和性クローンの選抜を組み合わせた進化工学的手法によって行われる。この手法は動物への免疫を必要としないため、免疫寛容の問題などで従来抗体の取得が困難だった抗原に対する抗体や完全ヒト型抗体の作製など、親和性の向上以外の目的にも利用されている。上市されている抗体医薬の中には進化工学的手法により親和性を向上させたものもあり、親和性向上のアプローチは一定の成果を上げている。

(2) ADCC 活性の増強

ADCC 活性増強のためにはエフェクター細胞上に発現する FcγRIIIa に対する親和性を向上させることが重要であり、アミノ酸変異の導入(18)や糖鎖改変(19)などによる Fc 領域の改良が行われてきた。後者の手法の中では、フコースと呼ばれる糖鎖の一部を除去することによって FcγRIIIa に対する親和性を向上させる「ポテリジェント技術」が有名で、この技術の適用によって ADCC 活性を 100 倍向上させることに成功したとの報告もある(19)。また、2012 年にはポテリジェント技術を応用した抗体モガムリズマブが成人 T 細胞白血病治療薬として承認されるなど、ADCC 活性の増強技術は徐々に実用化され始めている。

(3) 抗体薬物複合体 (ADC)

ここ数年における抗体医薬の新たな動きとして注目されるのが、抗体薬物複合体(ADC)である。薬剤を抗体に結合させて標的組織まで送達するという発想自体は 1980 年代からあるが

(20)、血中での安定性の低さなどにより、期待された ADC の薬効は発揮されず、2000 年にゲムツマブオゾガマイシンが FDA に認可されて以来、ADC はしばらく実用化から遠ざかっていた。しかし、リンカー技術が発達したことやがん抗原に関する研究が進んだことにより、近年、ADC は次世代抗体医薬として再び注目を集めている。2011 年と 2013 年にそれぞれ 1 品目ずつ FDA に承認されており、現在、30 品目以上の ADC について臨床試験が行われている。

7 研究目的

抗体医薬が登場した当初の最大の課題はマウス抗体の免疫原性であった。しかし、ヒト化技術によってその課題がほぼ完全に克服された現在、抗体医薬品産業は抗原の枯渇や抗体医薬に対する抵抗性の発現、薬価の問題といった多様化・複雑化した課題に直面している。したがって、今後の抗体医薬の発展には、多角的に抗体技術開発を行い、それらの技術を結集させる地道な取り組みが重要になってくるだろう。

本研究では、タンパク質を構成する個々の機能ドメインを人工抗体の構成単位と捉え、それらを遺伝子レベルあるいはタンパク質レベルで連結することによって、癌関連抗原を標的とする高機能人工抗体の創製を試みた。図 10 に示すように、具体的には、①ヘテロ四量体を形成する短鎖ペプチドの性質を利用した新規タンパク質連結手法 (第 1 章)、②単一ドメイン抗体(sdAb)を利用したサイトカイン融合抗体の作製 (第 2 章)、③上皮増殖因子受容体特異的ラットモノクローナル抗体の作製 (第 3 章)の 3 つのアプローチから高機能人工抗体を創製することを研究目的とした。

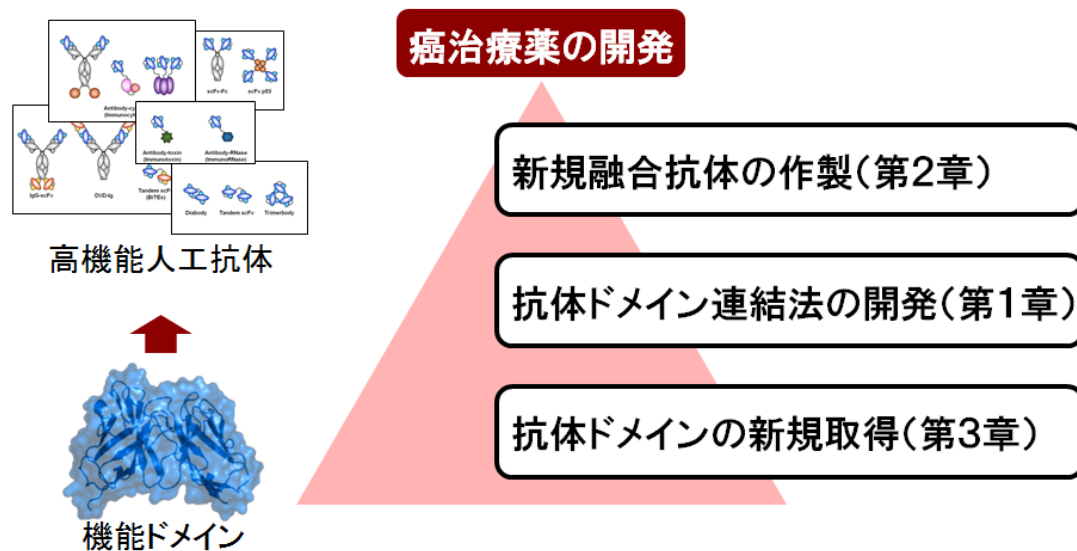


図 10 本研究の概念図 本研究の目的は機能ドメインを組み合わせ、連結することにより、癌を標的とする高機能人工抗体を創製することである。その過程における各章の位置づけとして、第3章は最も基礎的な研究、第2章は機能ドメインと高機能人工抗体を結び付ける橋渡し研究、第1章は最も上流に位置する応用研究と考えている。

第 1 章

ヘテロ会合ペプチドの利用による
四量体型二重特異性抗体の作製

1-1 はじめに

マウス抗体のヒト化に代表される抗体技術の発展は、モノクローナル抗体の医薬としての価値を飛躍的に高めてきた(21-24)。特に、がんや自己免疫疾患などの難治性疾患の領域では、すでに多くのモノクローナル抗体が医薬として承認されており、今やモノクローナル抗体は治療の 1 つとして欠かすことができない存在となっている(23, 24)。さらに、近年、二重特異性抗体や毒素融合抗体など新規人工抗体の開発も盛んに行われており、今後も抗体医薬市場は拡大を続けると予想される(25-27)。

二重特異性抗体は、特異性の異なる 2 つの抗体可変領域を含む分子で、2 種類の抗原に結合することができる。二重特異性抗体の中には、現在、臨床試験に入っているものもある(25)。例えば、CD19 と CD3 に結合し、BiTE (Bispecific T Cell Engaging)抗体と呼ばれる二重特異性抗体ブリナツモマブは、B 細胞性非ホジキンリンパ腫の患者に対して極めて高い治療効果を示している(28)。二重特異性抗体の抗体フォーマットとして、diabody 型、single-chain diabody 型、tandem single-chain Fv 型、IgG 様分子など数多くの抗体フォーマットが報告されている(29)。二重特異性抗体の作製において最も簡単な方法は、遺伝子レベルで 2 種の抗体を連結することである。つまり、2 種の抗体可変領域が含まれるように、遺伝子工学的手法を用いて複数の抗体ドメイン遺伝子を融合し、1 つの分子を構築するのである。しかし、遺伝子融合のみを用いて構築された二重特異性抗体は、一般に分子量が大きく、複雑な構造を有する場合が多いため、微生物発現系を用いた生産が難しいとされている(29)。また、この方法では、二重特異性抗体を構成する抗体ドメインが立体的な障害となって、もう一方の抗体ドメインの抗原に対する結合を阻害してしまう場合もある(30)。

上述と異なる方法として、短鎖ペプチドの自己会合能を利用した二重特異性抗体の構築法が提案されている(31-33)。その中でも DNL (dock-and-lock)システムと呼ばれる方法は、最も成功した方法の 1 つである(33)。DNL システムとは、cAMP 依存タンパクキナーゼ由来二量体化ドッキングドメイン(DDD2、45 アミノ酸)と A キナーゼ由来アンカードメイン(AD2、21 アミノ

酸)の相互作用を利用した方法であり、各単量体ユニットは分子量が小さいため、微生物発現系を用いて生産可能である。さらに、この方法は、遺伝子レベルでの連結では作製できない複雑な構造の分子も作製することができる。このように、自己会合能を持つペプチドは、二重特異性抗体をはじめとする高機能人工抗体を迅速かつ簡便に作製するツールとして有用であると考えられる。

B リンパ腫細胞上の CD19 と T 細胞上の CD3 に結合する二重特異性抗体ブリナツモマブのように、がん細胞と免疫細胞を架橋する二重特異性抗体は、高い抗腫瘍効果を発揮すると期待される。標的抗原として、上皮増殖因子受容体(EGFR)と FcγRIIIa (CD16)を組み合わせた二重特異性抗体もその 1 つである。EGFR は癌治療の標的として期待される抗原の 1 つで、EGFR を標的とするいくつかの抗体はすでに米国食品医薬品局に承認されている(23)。一方、CD16 は、NK 細胞や単球、マクロファージといった免疫細胞の表面に発現する Fc 受容体である。EGFR と CD16 を同時に認識する二重特異性抗体は、EGFR を発現する癌細胞の周囲に CD16 を発現する免疫細胞をリクルートすることによって、高い抗腫瘍効果を発揮すると期待できる(34)。

本章では、L27 ドメインと呼ばれる会合ユニットを利用した二重特異性抗体の新規作製法について述べる。会合ペプチドを利用した機能ドメイン連結法としては、すでに、ホモ四量体(35)やヘテロ三量体(33)を形成する会合ペプチドを利用した技術は開発されている。一方、ヘテロ四量体を形成する会合ペプチドを利用した機能ドメイン連結技術は報告されていない。そこで、今回、機能ドメイン連結のための新規会合ペプチドとしてヘテロ四量体を形成する L27 ドメインに着目した。L27 ドメインは複数のドメインから構成される足場タンパク質において、タンパク質-タンパク質間相互作用モジュールとして機能し、L27 ドメイン同士の会合は細胞極性の制御において重要な役割を担っている(36-39)。L27 ドメインは、配列相同性によって A 型と B 型の 2 種類に分類されており、2 分子の A 型 L27 ドメインと 2 分子の B 型 L27 ドメインが会合し、ヘテロ四量体を形成する(40)。いくつかの L27 ドメインヘテロ四量体については、すでに立体

構造が解かれており、L27ドメインが3つの α -ヘリックスから構成されることや、ヘテロ四量体の中心では4ヘリックスバンドル構造が形成されていることなどが明らかになっている(40, 41)。本研究では、A型L27ドメインであるヒト Pals-associated tight junction protein (Patj)由来のL27ドメイン(アミノ酸残基番号:5-65、L27Aと命名)とB型L27ドメインであるヒト protein associated with Lin-7 1 (Pals1)由来のL27Nドメイン(アミノ酸残基番号:120-177、L27Bと命名)を癌細胞表面上のEGFRを標的とする単一ドメイン抗体(sdAb) Ia1 (42)とNK細胞表面上のCD16を標的とする sdAb C28 (43)にそれぞれ融合することにより、四量体型二重特異性抗体(tetramerized Bispecific Antibody; tetBsAb)を作製し、その機能評価を行った。

1-2 方法

1-2-1 細胞と培養条件

A431細胞およびNIH3T3細胞は、10% (v/v)ウシ胎児血清(FBS)を添加したRPMI-1640培地で培養した。NK-92/CD16a細胞およびNK-92/mock細胞(44)は組換えヒトインターロイキン-2 (Shionogi) 100 U mL^{-1} を添加したMyeloCult H5100培地(StemCell Technologies)で培養した。細胞はすべて5% CO_2 、37°Cの条件下で培養した。

1-2-2 組換えCD16細胞外ドメインタンパク質(CD16-ECD)の調製

人工合成したヒトCD16 (Fc γ RIIIa-158F アロタイプ; Swiss-Prot accession no. P08637)遺伝子はフナコシから購入した。これを鋳型として、PCRによりCD16細胞外ドメイン遺伝子にC末端His₆タグを付加して増幅した後、pCAGGSベクター(45)に組み込み、HEK293T細胞を用いて発現させた。培養液を回収し、金属キレートアフィニティークロマトグラフィー(Ni Sepharose 6 Fast Flow, GE Healthcare)により精製した。

1-2-3 組換え EGFR 細胞外ドメインタンパク質 (EGFR-ECD) の調製

A431 細胞から全 RNA を抽出し、逆転写 PCR によってヒト EGFR (Swiss-Prot accession no. P00533) の cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として PCR を行い、N 末端から EGFR 細胞外ドメイン、ヒトライノウイルス 3C プロテアーゼ認識配列(LEVLFQGP) (46)、ヒト IgG1 の Fc 領域(Swiss-Prot accession no. P01857)の順に並んだ融合遺伝子を増幅した。得られた増幅 DNA 断片を pCAGGS ベクターに組み込み、HEK293T 細胞を用いて発現させた。Protein A カラム(rProtein A Sepharose Fast Flow; GE Healthcare)を用いて、培養上清から EGFR-ECD/Fc 融合タンパク質(EGFR-ECD-Fc)を精製した。また、EGFR-ECD-Fc をヒトライノウイルス 3C プロテアーゼ(BioVision)で消化した後、Protein A カラムと Ni Sepharose カラムを用いて、プロテアーゼや Fc 断片、未消化タンパク質を除去し、EGFR-ECD を調製した。

1-2-4 組換え抗体の発現ベクターの構築

L27A および L27B の cDNA 断片をオーバーラップ伸長 PCR 法により合成した。このときに用いたオリゴヌクレオチドプライマーを表 2-1 に示した。ジスルフィド結合予測プログラム MODIP(47)を利用して、Patj-Pals1 L27 ヘテロ四量体の立体構造モデル(Protein Data Bank ID 1Y76) (41)を基に、L27A-L27B ヘテロ二量体間でジスルフィド結合形成が可能なアミノ酸残基を決定した。改変型 L27ドメイン(すなわち L27A の K61C 変異体および L27B の M173C 変異体)をコードする DNA 断片は、野生型 L27ドメインに対して PCR により部位特異的変異導入を行うことによって合成した。このとき L27A の 61 番目のリジン残基に対する変異導入用プライマーとして、5'-CATTAAACAGCTGTGCGGTCAGCTGAAT-3' および 5'-ATTCTAGCTGACCGCACAGCTGTTTAATG-3'、L27B の 173 番目のメチオニン残基に対する変異導入用プライマーとして、5'-CAATTACCGTTCACTGCAAATAAAGCAAGC-3' および 5'-GCTTGCTTTATTGCAGTGAACGGTAATTG-3'をそれぞれ用いた(下線は変異導入箇所を示す)。大腸菌コドンに最適化した C28 sdAb (GenBank accession no. EF561292) (43)の人工

合成 cDNA 断片はユーロフィンジェノミクスから購入した。Ia1 sdAb (42)の cDNA 断片については、以前の研究で合成したものを用いた(48)。Ia1 sdAb および C28 sdAb の cDNA 断片を、ラマ IgG2 upper hinge (49)を介して改変型 L27A および改変型 L27B の cDNA 断片の両N末端にそれぞれ連結し、pET-20b (Novagen)を改変したバイストロニック発現ベクターに両ポリペプチドの cDNA 断片を挿入した。

表 1-1 L27A および L27B の cDNA 合成のために用いたプライマーの配列

プライマー名	配列
第 1 ラウンド L27A 用 PCR プライマー	1 5'-GAACCGAAAATTCCGCAGCCGCAGCCGAAACCGCA ACCGCAACCGCAGCCG-3' 2 5'-CGGTTCCGGTTTCGGCTGCGGTTTCGGCTGCGGTTG CGGCTGCGGTTGCGGTTG-3' 3 5'-CAGCCGAAACCGGAACCGCCGGCAACCGATAAACT GCAGGTTCTGCAGGTTCTGGATCGTCTGAAAATG-3' 4 5'-GCTCAGTTTTTCATTCTGGCTGGTATCACCTTTTTCT GCAGTTTCATTTTCAGACGATCCAGAACCTGC-3' 5 5'-CCAGCCAGAATGAAAAACTGAGCATGTTTTATGAAA CCCTGAAAAGCCCGCTGTTCAATCAGATTCTGAC-3' 6 5'-GTGATGATTTCAGCTGACCTTTCAGCTGTTAATGCTC TGCTGCAGGGTCAGAATCTGATTGAACGCGGG-3' 7 5'-GGATCCTTAATGGTGATGGTGGTGATGATTCAGCTG ACCTTTCAG-3'
第 1 ラウンド L27B 用 PCR プライマー	1 5'-GAACCGAAAATTCCGCAGCCGCAGCCGAAACCGCA ACCGCAACCGCAGCCG-3' 2 5'-CGGTTCCGGTTTCGGCTGCGGTTTCGGCTGCGGTTGC GGCTGCGGTTGCGGTTG-3' 3 5'-CAGCCGAAACCGGAACCGAAAATTCTGGAAATTGAA GATCTGTTTAGCAGCCTGAAACATATTCAGC-3' 4 5'-GCAGCAGCAGGCTAATATCTTCCTGGCTCTGGCTATC AACCAGGGTATGCTGAATATGTTTCAGGCTGC-3' 5 5'-GATATTAGCCTGCTGCTGCAGCTGGTTCAGAATAAA GATTTCAGAATGCATTCAAGATTCATAATGC-3' 6 5'-GGCTTGCTTTATTCATGTGAACGGTAATTGCATTATG AATCTTGAATGCATTCTGGAAATC-3' 7 5'-GGATCCTTAATGGTGATGGTGGTGATGGCTTGCTTT ATTCATGTGAACGG-3'
第 2 ラウンド PCR プライマー	1 5'-CCCCCGCGGAACCGAAAATTCCGCAGCC-3' 2 5'-CCCGGATCCTTAATGGTGATGGTGGTG-3'

1-2-5 組換え抗体の発現と精製

作製した tetBsAb 用発現ベクターを用いて大腸菌 BL21(DE3)pLysS 株を形質転換した。形質転換体をアンピシリン $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ およびクロラムフェニコール $34 \mu\text{g mL}^{-1}$ を含む 2×YT 培

地に植菌し、28°C で培養した。培養液の 600 nm における光学密度(OD_{600})が 0.8 に達した時点で、イソプロピル- β -D-1-チオガラクトピラノシド(IPTG)を終濃度 1 mM となるように添加し、さらに 28°C で 16 時間培養した。培養上清を回収し、80%飽和となるように硫酸アンモニウムを添加した。沈殿物を PBS で溶解した後、Ni Sepharose (GE Healthcare)と StrepTactin Superflow Plus (Qiagen)を用いた 2 段階のアフィニティークロマトグラフィーを行い、精製した。

Ia1 sdAb および C28 sdAb については、宿主大腸菌株として BL21(DE3)株を用いたこと以外は tetBsAb と同様の方法で発現させた。発現させた目的タンパク質を金属キレートアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。各精製タンパク質を PBS に対して透析し、次節以降の分析に使用するまで 4°C で保存した。

1-2-6 ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) およびウェスタンブロッティングによる分子間ジスルフィド結合の分析

15%ポリアクリルアミドゲルを用いて、還元および非還元条件下で tetBsAb を泳動した。泳動後のゲルをニトロセルロース膜に転写し、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合抗 His₆ タグ抗体(Wako)または HRP 結合 StrepTactin (Qiagen)を用いて検出した。

1-2-7 マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF/MS)

窒素レーザー(337 nm)を備え付けた AXIMA-CFR Plus MALDI-TOF 質量分析計 (Shimadzu/Kratos Analytical)を使用して質量分析を行った。マトリックスとして用いたシナピン酸を終濃度 10 mg mL⁻¹となるように水/アセトニトリル(2:1, v/v)混合溶液(0.1%トリクロロ酢酸を含む)に溶解した。調製したシナピン酸溶液 0.5 μ L を MALDI ターゲットプレートに塗布し乾燥させた。さらに PBS に溶解した tetBsAb 0.5 μ L をターゲットプレートに塗布し結晶化させた後、

再度、シナピン酸溶液 0.5 μL を塗布した。加速電圧 20 kV の正イオンリニアモードで 200 回のスキャンを行い、それらを平均してスペクトルを得た。

1-2-8 ゲルろ過クロマトグラフィー

ÅKTA Prime Plus システム(GE Healthcare)を用いて、ゲルろ過クロマトグラフィーを行った。PBS で平衡化した Superdex 200 10/300 カラム(GE Healthcare)に試料を注入し、PBS を用いて流速 0.5 mL min^{-1} で溶出した。分子量マーカータンパク質として、ブルーデキストラン(2000 kDa)、カタラーゼ(230 kDa)、BSA (67 kDa)、カルボニックアンヒドラーゼ(29 kDa)、リボヌクレアーゼ A (14 kDa)を用いた。

1-2-9 フローサイトメトリー解析

EGFR に対する特異的結合の評価には、EGFR 陽性の A431 細胞および EGFR 陰性の NIH3T3 細胞をそれぞれ用いた。2 $\times 10^5$ 細胞の A431 細胞または NIH3T3 細胞と 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ または 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ の tetBsAb 溶液を混合し、氷中で 30 分間反応させた。FACS buffer (0.1% NaN_3 を含む PBS)で細胞を洗浄した後、マウス抗 FLAG タグ抗体(1E6, Wako)と FITC 標識ヤギ抗マウス IgG(H+L)抗体(Kirkegaard & Perry Laboratories)を順に反応させ、細胞に結合した tetBsAb を検出した。CD16 に対する特異的結合の評価には、NK-92/CD16a 細胞(CD16 陽性)および NK-92/mock 細胞(CD16 陰性)をそれぞれ用いた。また、biotinamidohexanoic acid *N*-hydroxysuccinimide ester (Sigma)を用いて、tetBsAb をビオチン化した。3 $\times 10^5$ 細胞の NK-92/CD16a 細胞および NK-92/mock 細胞と 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ または 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ のビオチン化 tetBsAb 溶液を混合し、氷中で 30 分間反応させた。細胞を洗浄後、細胞に結合したビオチン化 tetBsAb を Alexa Fluor 488 標識ストレプトアビジン(Jackson Immuno-Research)で検出した。2 種の抗原に対する架橋能の評価には、FITC Antibody Labeling Kit (Thermo scientific)を用いて FITC 標識した CD16-ECD を用いた。EGFR に対する特異的結合の評価と同様に、A431

細胞と $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ の tetBsAb 溶液を混合し、氷中で 30 分間反応させた。細胞を洗浄後、 $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ の FITC 標識 CD16-ECD 溶液を加え、さらに氷中で 30 分間反応させた。フローサイトメーターFACSCalibur (Becton Dickinson)を用いて、染色した各細胞を解析した。

1-2-10 表面プラズモン共鳴法 (SPR 法)

Biacore3000 (GE Healthcare)を用いて、SPR 解析を行った。すべての測定は、ランニング緩衝液として 0.005% Tween-20 を含む PBS を用い、 25°C の条件下で行った。SPR サンドイッチアッセイでは、アミンカップリングキット(GE Healthcare)を用いて、CD16-ECD をセンサーチップ CM5 上に 1400 RU の密度で固定化した。そのセンサーチップ上に tetBsAb (200 nM)および EGFR-ECD (500 nM)を流速 $10 \mu\text{L mL}^{-1}$ で添加した。

速度論的解析では、EGFR-ECD-Fc または CD16-ECD を標的抗原としてそれぞれ用いた。Human Antibody Capture Kit (GE Healthcare)を用いて、センサーチップ CM5 上に 1000 RU の密度で EGFR-ECD-Fc を捕捉した。一方、アミンカップリングキット(GE Healthcare)を用いて、センサーチップ CM5 上に 1000 RU の密度で CD16-ECD を固定化した。流速 $20 \mu\text{L min}^{-1}$ でセンサーチップ上にアナライトを添加した。BIAevaluation 3.0 software (GE Healthcare)を用いて、測定データを解析した。すべての測定データは、アナライトセルのセンサーグラムからリファレンスセルのセンサーグラムを差し引いた。また、測定データに対して、1:1 Langmuir binding model を用いてグローバルフィッティングを行うことにより速度論的パラメータを算出した。

1-2-11 *in vitro*細胞傷害性試験

乳酸デヒドロゲナーゼアッセイによって、組換え抗体による NK 細胞を介した細胞傷害性の評価を行った。本実験では、組換え抗体として、tetBsAb に加え、Ia1 sdAb と C28 sdAb を混ぜた試料および市販の抗体医薬セツキシマブ(Merck)も用意した。予め NK-92/CD16a 細胞また

は NK-92/mock 細胞に対して、 100 U mL^{-1} のインターロイキン-2 を添加し、18 時間活性化した。A431 細胞または NIH3T3 細胞を 1 ウェルあたり 5×10^3 個の細胞の密度で 96 穴平底プレート (IWAKI) に播種し、10% FBS を含む RPMI-1640 培地 ($100 \mu\text{L well}^{-1}$) 中で 16 時間培養した。各ウェルに、まず段階的に希釈した組換え抗体溶液を加えた。さらにインターロイキン-2 で活性化した NK-92/CD16a 細胞または NK-92/mock 細胞を、エフェクター細胞とターゲット細胞の細胞数比が 10:1 となるように加えた。1% FBS を含む RPMI-1640 培地中、 37°C で 4 時間培養した後、培養上清 $50 \mu\text{L}$ を回収し、Cytotox 96 Non-radioactive Cytotoxicity Assay Kit (Promega) を用いて、培養上清中の乳酸デヒドロゲナーゼを定量した。iMark Microplate Reader (BioRad) を用いて、 490 nm における吸光度を測定した。細胞傷害活性(%) は以下の式から算出した。

$$\text{細胞傷害活性(\%)} = [(A_{490} \text{ of experiment} - A_{490} \text{ of effector spontaneous} - A_{490} \text{ of target spontaneous}) / (A_{490} \text{ of target maximum} - A_{490} \text{ of target spontaneous})] \times 100\%.$$

MASTERPLEX ソフトウェア (Hitachi Solutions America) を用いてシグモイド型近似曲線を描き、半数効果濃度 (EC_{50}) を算出した。

1-3 結果

1-3-1 EGFR および CD16 を標的とする tetBsAb の構築

図 1-1A に示したように、本研究では大腸菌での生産性を考慮し、分子サイズが小さく、熱安定性や水溶性も高いと言われるラマ抗体由来の単ドメイン抗体 (sdAbs) を用いて tetBsAb を構成した (50)。また、今回、tetBsAb の構築には L27A-L27B ヘテロ二量体同士がホモ会合する際の相互作用界面に変異を導入した改変型 L27 ドメインを用いた。これは、以前の研究において、L27A-L27B ヘテロ二量体によるホモ二量体形成反応の解離定数は $6.88 \mu\text{M}$ と報

告されており(41)、L27A-L27B ヘテロ二量体間には解離し易いと予想したためである。具体的には、L27A-L27B 複合体の、L27A-L27B ヘテロ二量体同士がホモ会合する際の相互作用界面に分子間ジスルフィド結合を導入することにした。ジスルフィド結合導入箇所の選定には、ジスルフィド架橋モデリングプログラム MODIP (47)を用いた。Patj-Pals1 L27 ヘテロ四量体の結晶構造を基に、MODIP を用いて解析した結果、Patj の Lys61 と Pals1 の Met173 の空間的配置が、ジスルフィド結合の形成が可能な配置であると予測された。部位特異的変異導入により、L27A の Lys61 および L27B の Met173 をそれぞれシステイン残基に置換した。L27A-L27B ヘテロ四量体の立体構造における変異導入箇所を図 1-1B に示した。ポリペプチドリンカーを介して、改変型 L27A および改変型 L27B を、EGFR 特異的 sdAb (Ia1)および CD16 特異的 sdAb (C28)の C 末端にそれぞれ融合し、大腸菌共発現用のベクターに組み込んだ。その発現ベクターの模式図を図 1-1C に示した。大腸菌を用いて目的タンパク質を分泌発現させ、培養上清から二段階のアフィニティークロマトグラフィー(金属キレートアフィニティークロマトグラフィーおよび Strep-Tactin アフィニティークロマトグラフィー)により精製した。精製後の目的タンパク質の収量は、培養液 1 L あたりおよそ 100-300 μ g であった。

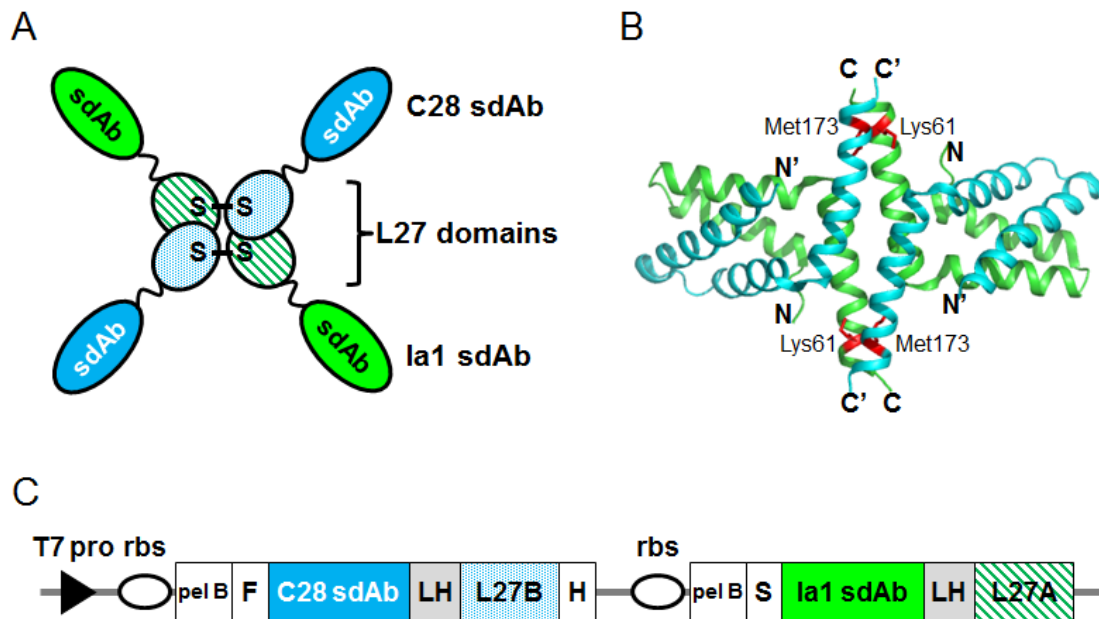


図 1-1 EGFR/CD16 特異的四量体型二重特異性抗体 tetBsAb の構築 (A) EGFR/CD16 特異的 tetBsAb の模式図。L27ドメインを介して Ia1 sdAb および C28 sdAb を会合させることを考案した。(B) L27A (緑斜線)-L27B (シアン)ヘテロ四量体の構造。複合体の安定化のために、L27A の Lys61 および L27B の Met137 をそれぞれシステイン残基に置換することによって、L27A-L27B 間にジスルフィド結合を導入した。変異導入箇所は赤色で示した。(C) tetBsAb の大腸菌共発現ベクターの模式図。F は FLAG タグ(DYKDDDDK)、H は His₆タグ、LH はラマ IgG2 upper hinge、pel B は pel B シグナル配列、rbs はリボソーム結合サイト、S は Strep-tag II (WSHPNFEK)、T7 は T7 プロモーターをそれぞれ表している。

1-3-2 ジスルフィド結合形成の分析および分子形状の評価

作製した tetBsAb において、L27A-L27B 間に分子間ジスルフィド結合が導入されているか否かを確認するために、還元および非還元条件下での SDS-PAGE と抗 His₆ タグ抗体および Strep-Tactin を用いたウェスタンブロッティングを行った。それらの結果を図 1-2A、B に示した。還元条件下での SDS-PAGE において、Ia1-L27A (26 kDa)および C28-L27B (25 kDa)共に、単一バンドが検出できた。また、ウェスタンブロッティングの結果より、Ia1-L27A の分子量は C28-L27B のそれより大きいにも関わらず、Ia1-L27A の泳動距離が C28-L27B に比べて大きく

なることがわかった。そこで、Ia1 sdAb と C28 sdAb を SDS-PAGE により分析した。その結果、図 1-2C に示したように、Ia1 sdAb (18 kDa)の泳動距離は C28 sdAb (16 kDa)に比べて大きかった。この結果は、Ia1-L27A と C28-L27B において、分子量と泳動距離が相関しない原因が sdAb の性質にあることを示唆した。一方、非還元条件下で tetBsAb を泳動した結果、ホモ二量体およびヘテロ二量体の分子量に対応する位置にいくつかのバンドが検出された。これらの結果は、tetBsAb の L27ドメインに導入したほぼすべてのシステイン残基が分子間ジスルフィド結合を形成していることを示唆した。

tetBsAb の L27ドメインに形成されたジスルフィド結合の様式を調べるために、tetBsAb について MALDI-TOF 質量分析法による分析を行った。その結果、図 1-2D に示したように、質量電荷数比(m/z) 52,166、51,039、49,875 の位置にそれぞれピークを観測した。これら3つのピークは、アミノ酸配列から計算した Ia1-L27A/Ia1-L27A (52,150)、Ia1-L27A/C28-L27B (51,018)、C28-L27B/C28-L27B (49,886)の分子量にそれぞれほぼ一致した。これらの結果から、精製試料における分子間ジスルフィド結合の組み合わせが、C28-L27B/C28-L27B だけでなく、Ia1-L27A/Ia1-L27A と Ia1-L27A/C28-L27B を含めた計 3 通りあることがわかった。

次に、tetBsAb の溶液中での会合状態を調べるため、ゲルろ過クロマトグラフィーを行った。今回、比較のため、tetBsAb に加え、Ia1 sdAb も同時に分析した。その結果を図 1-3 に示した。図 1-3A に示したように、Ia1 sdAb は単量体として溶出され、多量体のピークは観測されなかった。一方、図 1-3B に示したように、tetBsAb では二量体と考えられる溶出体積にわずかなピークと四量体と考える位置に主なピークが観測された。以上の結果から、L27 ドメインを介した会合によりヘテロ四量体型抗体を作製できたと考えた。

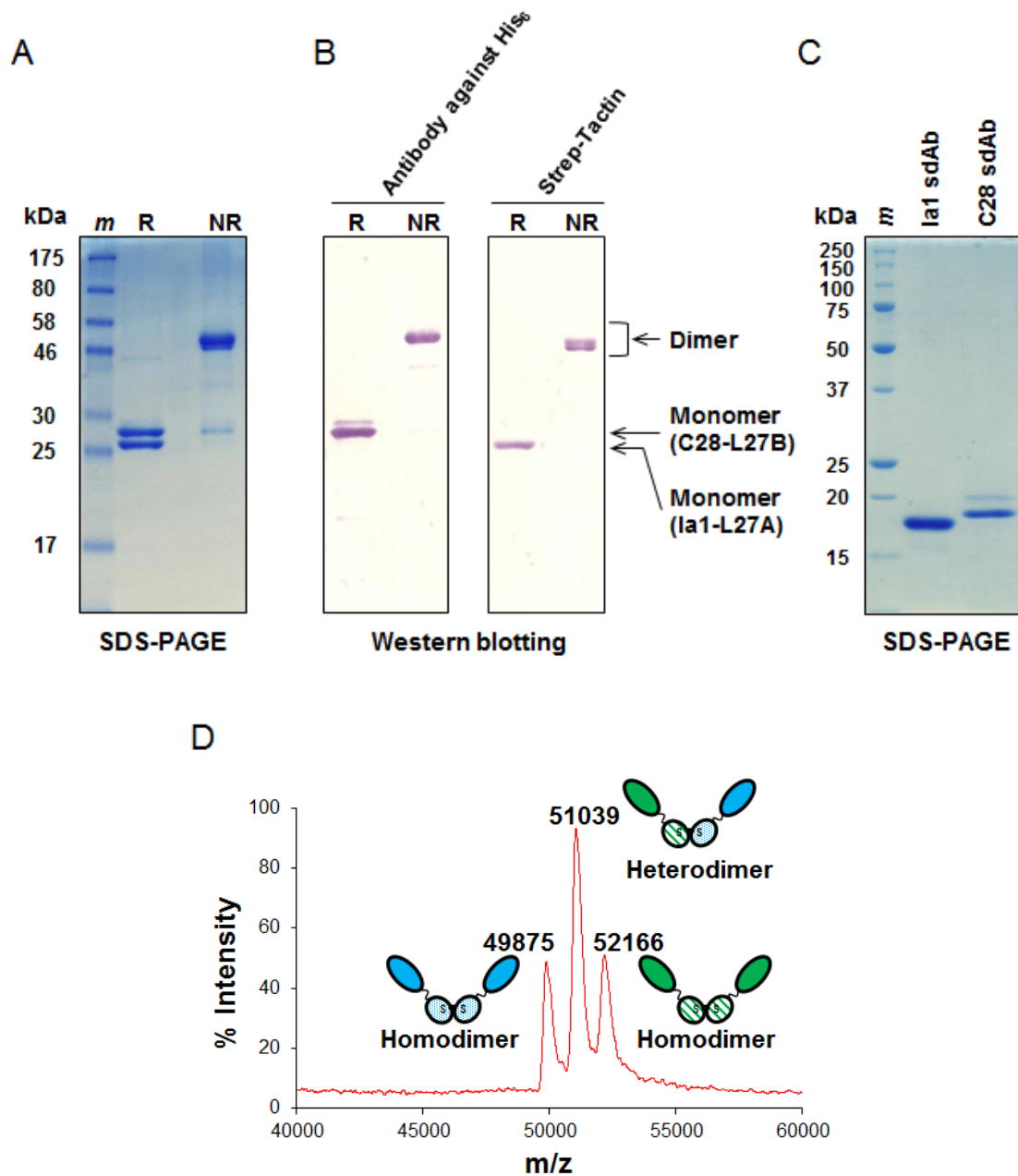


図 1-2 L27A-L27B ヘテロ二量体の相互作用界面に導入した分子間ジスルフィド結合の分析 (A)精製後の tetBsAb について、還元(R)および非還元(NR)条件下で SDS-PAGE 分析を行った。*m* は分子量マーカー。(B)精製後の tetBsAb について抗 His₆ タグ抗体および Strep-Tactin を用いたウェスタンブロッティングにより分析した。(C)精製後の Ia1 sdAb および C28 sdAb について、還元条件下で SDS-PAGE 分析を行った。(D) tetBsAb の MALDI-TOF マススペクトル。緑は Ia1-L27A、青は C28-L27B を表している。

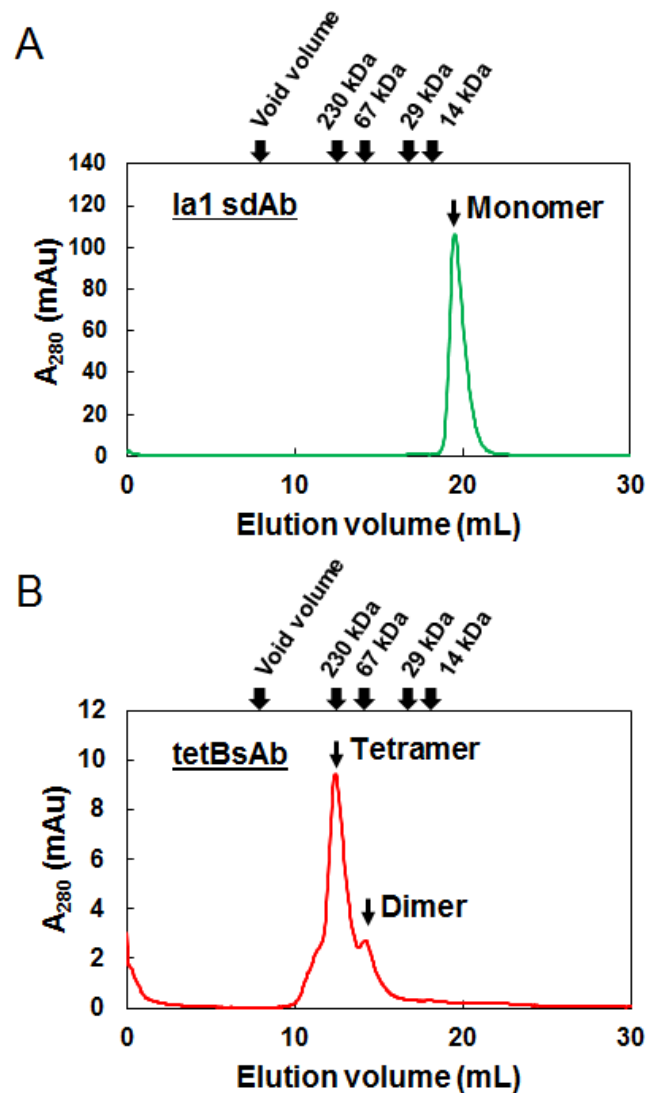


図 1-3 ゲルろ過クロマトグラフィーによる組換え抗体の分析 精製後の Ia1 sdAb (A)および tetBsAb (B)をゲルろ過カラム Superdex 200 に添加し、PBS で溶出した。分子量マーカータンパク質として、ブルーデキストラン(2,000 kDa)、カタラーゼ(230 kDa)、BSA (67 kDa)、カルボニックアンヒドラーゼ(29 kDa)、リボヌクレアーゼ A (14 kDa)を用いた。矢印は分子量マーカータンパク質の溶出位置を示す。

1-3-3 特異的結合および抗原架橋能の評価

細胞表面上の抗原に対する tetBsAb の特異的結合を評価するために、フローサイトメリー解析を行った。今回、EGFR および CD16 に対する結合の評価には、EGFR を発現する A431

細胞(ヒト扁平上皮癌細胞株)および CD16 を発現する NK-92/CD16a 細胞(36) (外因性の CD16 遺伝子を導入したヒト NK 細胞株)をそれぞれ用いた。また、非特異的な結合を評価するために、各抗原陽性細胞のコントロールとして、EGFR 陰性の NIH3T3 細胞(マウス繊維芽細胞株)および CD16 陰性の NK-92/mock 細胞(36) (CD16 遺伝子を含まないベクターを導入したヒト NK 細胞株)を用いた。図 1-4 にその結果を示した。NIH3T3 細胞や NK-92/mock 細胞といった抗原陰性の細胞に対する tetBsAb の結合は見られなかったが、A431 細胞や NK-92/CD16a 細胞といった抗原陽性の細胞に対する結合は観測された。以上より、tetBsAb 中の Ia1 sdAb 部分および C28 sdAb 部分は、L27ドメインを融合した場合でも抗原結合能を保持していることがわかった。

さらに tetBsAb の抗原架橋能について評価した。まず、フローサイトメリー解析によって、tetBsAb が A431 細胞上の EGFR と可溶性 CD16 タンパク質を架橋できるか否かを調べた。A431 細胞と tetBsAb を反応させ、FITC 標識した CD16-ECD を用いて細胞を染色した後、フローサイトメーターで解析した。図 1-5A にその結果を示した。A431 細胞を PBS とインキュベートした場合にはピークシフトは見られなかったが、A431 細胞を tetBsAb とインキュベートした場合ではピークシフトが観測された。これらの結果は、tetBsAb を介して A431 細胞表面上の EGFR と可溶性 CD16 タンパク質が架橋されたことを示唆した。次に、サンドイッチ SPR 測定によって、tetBsAb を介した可溶性 EGFR タンパク質と可溶性 CD16 タンパク質間の架橋について調べた。その結果、図 1-5B に示したように、CD16 を固定化したセンサーチップ上への tetBsAb の添加と、それに引き続く可溶性 EGFR の添加の両方でレスポンスが得られた。この 2 段階のレスポンスは、tetBsAb がセンサーチップ上に固定化した CD16 と可溶性 EGFR を架橋したことを示した。以上のフローサイトメリー解析およびサンドイッチ SPR 測定による評価結果は、tetBsAb が CD16 陽性リンパ球と EGFR 陽性癌細胞の架橋を促進し得ることを示唆した。

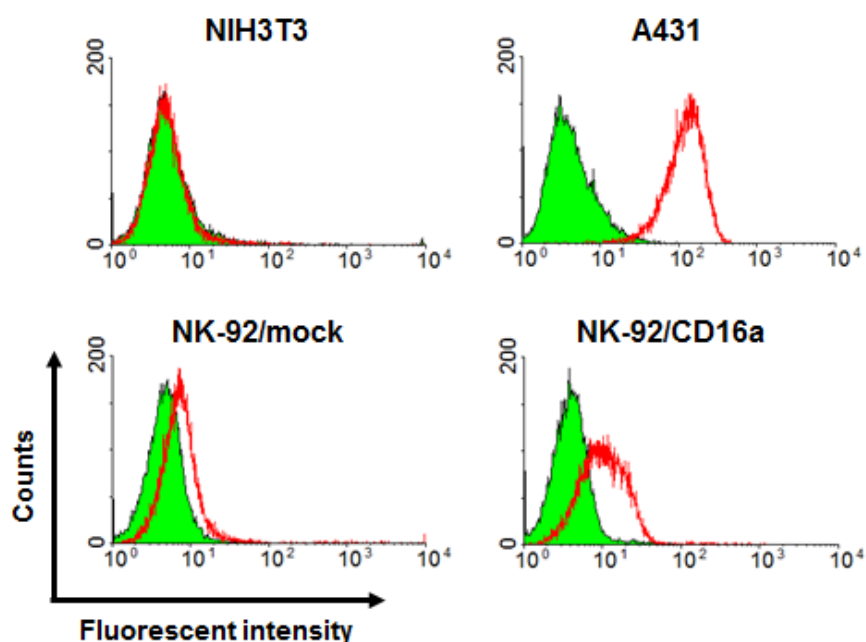


図 1-4 tetBsAb の結合特異性の評価 A431 細胞(EGFR 陽性)および NK-92/CD16a 細胞(CD16 陽性)に対する特異的結合を調べた。非特異的結合の有無を評価するために、NIH3T3 細胞(EGFR 陰性)および NK-92/mock 細胞(CD16 陰性)に対する結合も調べた。これらの抗原陰性細胞に対する結合の評価では、抗原陽性細胞に対する結合評価の場合に比べて高濃度の tetBsAb を反応させた。赤枠内の領域と緑色の領域はそれぞれ tetBsAb と反応させた細胞および PBS と反応させた細胞を示す。

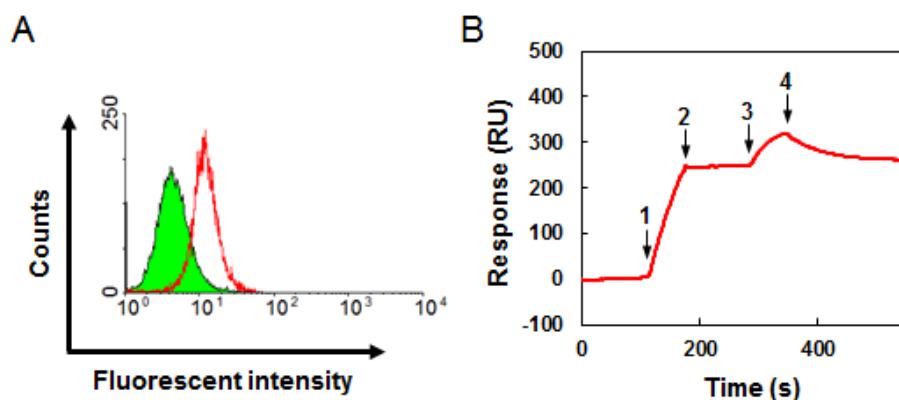


図 1-5 tetBsAb の抗原架橋能の評価 (A)フローサイトメトリーによる抗原架橋能の評価。A431 細胞を PBS (緑色の領域)または tetBsAb (赤枠内の領域)と反応させ、FITC 標識した CD16-ECD で検出した。(B)サンドイッチ SPR 測定。CD16-ECD を固定化したセンサーチップ上に tetBsAb (200 nM)および EGFR-ECD (500 nM)を順に添加した。矢印 1: tetBsAb の添加開始点。矢印 2: tetBsAb の添加終了点。矢印 3: 可溶性 EGFR の添加開始点。矢印 4: 可溶性 EGFR の添加終了点。

1-3-4 SPR 法による結合の速度論的解析

L27ドメインを介したsdAbの多量体化が抗原に対する見かけ上の親和性に与える影響を評価するため、sdAbとtetBsAbについてSPR法による結合の速度論的解析を行い、比較した。このとき、tetBsAbに含まれるsdAbドメインのN末端に付加したポリペプチドタグが結合に与える影響を考慮し、比較対象として用いるIa1 sdAbおよびC28 sdAbには、tetBsAbの場合と同様にStrep-tag IIおよびFLAGタグをそれぞれ融合した。また、tetBsAbが多価で結合できるように、可溶性抗原を固定化したセンサーチップを用いて測定を行った。その結果、図1-6に示したように、どちらの抗原に対してもtetBsAbでは、Ia1 sdAbまたはC28 sdAbに比べて解離速度が遅かった。さらに、得られたセンサーグラムを1:1 Langmuir binding modelにフィットさせ、見かけ上の結合速度定数(k_a)、見かけ上の解離速度定数(k_d)、見かけ上の解離定数(K_D)をそれぞれ求めた。見かけ上の速度論的パラメータは、固定化した抗原密度などの実験条件によって変化するため、算出した値は本論文中で比較する場合にのみ用いた(51)。Ia1 sdAb、C28 sdAb、tetBsAbのセンサーグラムから算出した k_a 、 k_d 、 K_D の値を表2-1に示す。EGFRに対するsdAbおよびtetBsAbの k_a 値はそれぞれ $6.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ および $4.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であった。また、CD16に対するsdAbおよびtetBsAbの k_a 値はそれぞれ $1.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ および $2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であった。このように、EGFRおよびCD16の両抗原に対するtetBsAbと各sdAbの k_a 値はほとんど変わらなかった。一方、 k_d 値を見ると、EGFRに対するsdAbおよびtetBsAbの k_d 値はそれぞれ $8.8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ および $1.4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、CD16に対する k_d 値はそれぞれ $4.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ および $1.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ と、EGFRおよびCD16のどちらの抗原に対してもtetBsAbの k_d 値は各sdAbの k_d 値の1/10以下であった。その結果、EGFRに対するsdAbおよびtetBsAbの K_D 値はそれぞれ $1.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ および $2.8 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、CD16に対するsdAbおよびtetBsAbの K_D 値はそれぞれ $3.5 \times 10^{-7} \text{ M}$ および $6.2 \times 10^{-9} \text{ M}$ と、EGFRおよびCD16のどちらの抗原に対してもtetBsAbの K_D 値は各sdAbの K_D 値の1/50以下であった。以上のように、tetBsAbのEGFRまたはCD16に対する見かけ上の親和性は各sdAbの見かけ上の親和性よりも高かった。

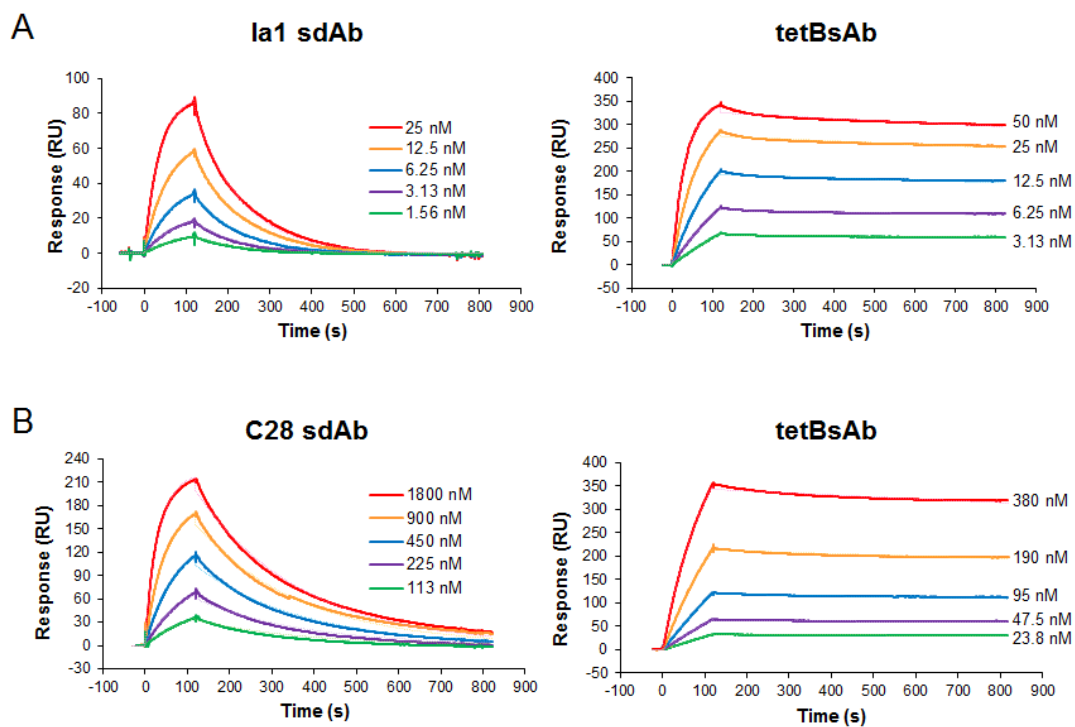


図 1-6 SPR 法による抗体断片-抗原相互作用の速度論的解析 EGFR (A)および CD16 (B) に対する組換え抗体の結合センサーグラム。(A)の実験では、抗ヒト IgG 抗体を用いて、EGFR-ECD-Fcをセンサーチップ上に捕捉し、Ia1 sdAb または tetBsAb を添加した。(B)の実験では、CD16-ECDを直接センサーチップ上に固定化し、C28 sdAb または tetBsAb を添加した。実線は測定データを、破線は測定データから 1 : 1 Langmuir binding model を用いて算出したフィッティングカーブをそれぞれ表している。フィッティングの近接性を示す χ^2 の値は以下の通りであった。(A) Ia1 sdAb: 0.49、(A) tetBsAb: 5.18、(B) C28 sdAb: 10.9、(B) tetBsAb: 3.85。

表 1-1 抗体-標的抗原間相互作用の速度論的パラメータ

抗原	抗体	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)
EGFR	Ia1 sdAb	$6.0 \pm 1.1 \times 10^5$	$8.8 \pm 0.69 \times 10^{-3}$	$1.5 \pm 0.16 \times 10^{-8}$
EGFR	tetBsAb ^a	$4.9 \pm 0.77 \times 10^5$	$1.4 \pm 0.02 \times 10^{-4}$	$2.8 \pm 0.48 \times 10^{-10}$
CD16	C28 sdAb	$1.3 \pm 0.13 \times 10^4$	$4.4 \pm 0.36 \times 10^{-3}$	$3.5 \pm 0.59 \times 10^{-7}$
CD16	tetBsAb ^a	$2.1 \pm 0.39 \times 10^4$	$1.3 \pm 0.09 \times 10^{-4}$	$6.2 \pm 1.7 \times 10^{-9}$

すべての値は 25 °C での測定結果から 1:1 Langmuir binding model を用いて解析することにより求めた。各パラメータは 3 回の測定結果から求めた値の平均値 $\pm$ 標準偏差で表している。

^atetBsAb は各標的抗原に対して多価で結合し得るため、tetBsAb の k_a 、 k_d 、 K_D はすべて見かけ上の値である。これらの値は、tetBsAb と adAb を比較する場合にのみ使用した。

1-3-5 NK 細胞を用いた抗体依存性細胞傷害活性の評価

tetBsAb の抗原架橋能によって、リンパ球による癌細胞への傷害効果を促進し得るか否かを調べるために、乳酸デヒドロゲナーゼアッセイを用いた *in vitro* における細胞傷害性評価を行った。細胞傷害性を比較するために、tetBsAb に加えて、Fc 領域を介した抗体依存性細胞傷害が期待できる抗体医薬品セツキシマブ(マウス-ヒトキメラ型抗 EGFR 抗体)も同時に評価した。まず、標的細胞として EGFR を発現する癌細胞 A431 を、エフェクター細胞として CD16 を発現する NK-92/CD16a 細胞をそれぞれ用いて実験を行った。図 1-7A にその結果を示した。Ia1 sdAb と C28 sdAb を組み合わせて添加した場合には、 10^{-3} から 10^4 pM の濃度範囲内で標的細胞の溶解は見られなかった。一方、tetBsAb の場合には、濃度依存的に標的細胞の溶解が生じた。さらに、tetBsAb を添加した場合の細胞傷害性は、最大で約 80% 程度であり、セツキシマブと同程度であった。また、tetBsAb とセツキシマブの EC_{50} の値はそれぞれ 190 pM と 470 pM であり、tetBsAb はセツキシマブよりわずかに低い濃度で作用することがわかった。これらの結果は tetBsAb がセツキシマブとほぼ同等の細胞傷害活性を有することを示唆した。

次に tetBsAb を添加した場合に見られた細胞傷害性が、抗原依存的なものであることを明らかにするために、抗原陰性細胞を標的細胞またはエフェクターとして用いた細胞傷害性試験を行った。図 1-7B に示したように、CD16 陰性の NK-92/mock 細胞をエフェクター細胞として用いた場合、tetBsAb に依存的な A431 細胞の溶解は見られなかった。これは tetBsAb により誘導される標的細胞の溶解がエフェクター細胞上の CD16 の存在に依存することを示している。同様に標的細胞として EGFR 陰性の NIH3T3 細胞を用いた場合、エフェクター細胞として CD16 を発現する NK-92/CD16a 細胞を用いても、図 1-7C に示したように tetBsAb に依存的な細胞傷害性は見られなかった。これは tetBsAb が NK 細胞による細胞傷害性を誘導する上で、tetBsAb の EGFR に対する結合が必要不可欠であることを示している。

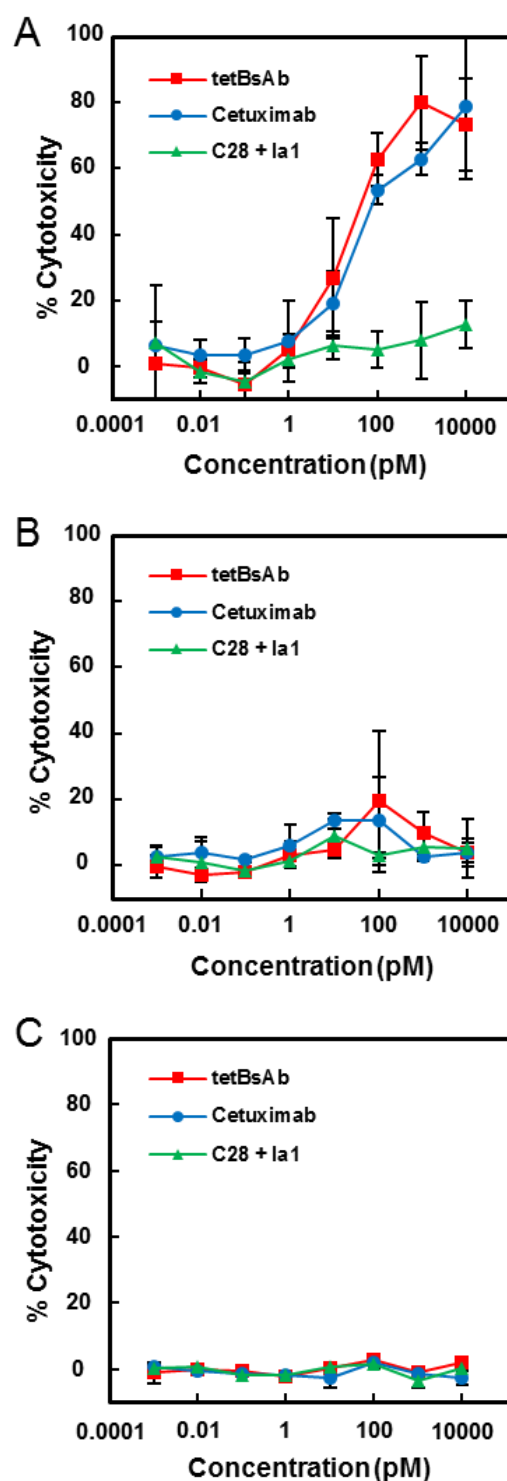


図 1-7 NK 細胞を用いた細胞傷害性試験 標的細胞[A431 (A, B)または NIH3T3 (C)]を播種したプレートにエフェクター細胞[NK-92/CD16a (A, C)または NK-92/mock (B)]をエフェクター細胞/標的細胞比 10:1 となるように加え、組換え抗体存在下で 4 時間培養した。細胞傷害性は乳酸デヒドロゲナーゼアッセイにより算出した。各シンボルとバーは、3 ウェルの測定結果の平均値 ± 標準偏差を表している。

1-4 考察

生体分子(タンパク質、ペプチド、核酸)間の会合を利用したタンパク質分子の架橋は、標的の異なる抗体を組み合わせた多重特異性抗体や、抗体にサイトカインや毒素などを組み合わせた多機能性抗体を構築する上で非常に有効な手法である(35, 52, 53)。その理由は2つある。1 つ目は優れた特異性である。生体分子間の特異的な会合は、個々のタンパク質を特異的に架橋する上で役立ち、均一な複合体の生産を可能にする。2 つ目は立体的な自由度の高さである。遺伝子融合の場合、各機能ドメインを N 末端から C 末端へと 1 列に並べることはできないため、構築できる抗体分子の構造は大きく制限される。一方、生体分子の会合を利用することによって、多様な抗体分子の構築が可能であり、抗原結合部位の空間的配置を制御した分子設計も容易になると期待される。

本章では、高機能人工抗体の構築を目的とした新たな会合ユニットとして L27 ドメインに着目した。L27 ドメインは A 型と B 型の 2 種類に大別され、それらは自発的に会合し、ヘテロ四量体を形成することが知られている。したがって、A 型および B 型の L27 ドメインに対して、2 種の抗体断片をそれぞれ融合することによって、4 つの抗原結合部位を持つ四価二重特異性抗体を作製することが可能である。また、本研究で用いた 2 つの L27 ドメイン、すなわち L27A および L27B は、それぞれ分子量 7.0 kDa (61 アミノ酸残基)および 6.6 kDa (58 アミノ酸残基)のポリペプチドであることから、バルナーゼ (12 kDa)/バルスター (10 kDa) (52)、IgG CH1 (10 kDa)/CL (12 kDa) (54)、IgM CH2 (12 kDa) (55)といった、これまで高機能人工抗体の作製に用いられてきた既存の会合ユニットに比べて低分子量であり、大腸菌発現系を用いた高機能人工抗体の生産に適していると考えた。さらに、L27A および L27B はどちらもヒト由来のタンパク質であるため、免疫原性の低減という利点もあるかもしれない。本研究では、抗体高機能化における L27 ドメインの有用性を示すために、EGFR と CD16 を標的とする四量体型二重特異性抗体 tetBsAb の作製を試みた。

今回、tetBsAb を構成する抗体ドメインとして、単一ドメイン抗体 sdAb を用いた。sdAb は分子量 12-15 kDa の比較的小さいタンパク質であり、大腸菌発現系における生産性が高いことから、大腸菌発現系を用いた L27 ドメイン融合抗体の生産に適していると考えた。実際に tetBsAb は、大腸菌発現系を用いて可溶性タンパク質として得られ、リフォールディングなどの煩雑な操作を必要としなかった。また、sdAb を用いた結果、tetBsAb の分子サイズを癌組織へのターゲティングに適していると言われる“tumor target zone” (およそ 70-120 kDa) の範囲に収めることができた(tetBsAb の分子量は 102 kDa である) (13)。このように L27 ドメインと sdAb の組み合わせは、生産性だけでなく薬物動態に優れた人工抗体を開発する上でも適していると考えている。

上述のように、すでにいくつかの研究グループが生体分子の自己会合性を利用した高機能抗体作製法を報告している。その中で、多くの研究成果を得ている手法の 1 つは、dock-and-lock システムと呼ばれる、ドッキングドメインとアンカードメインの 2 つの会合ユニットを利用した方法である(33)。この方法と L27 ドメインを用いた本手法の最大の違いは会合ユニットの化学量論比である。dock-and-lock システムで作製される分子は、2 : 1 の化学量論比で会合させたヘテロ三量体であり、この方法で 2 種類の抗体断片から二重特異性抗体を作製する場合、少なくとも一方の標的抗原に対する結合価は 1 価となる。一方、L27 ドメインを用いて作製される分子は、2 : 2 の化学量論比で会合したヘテロ四量体であり、この方法で 2 種類の抗体断片から二重特異性抗体を作製する場合、2 種類の標的抗原に対する結合価はともに 2 価となる。したがって、2 種類の細胞表面抗原を標的とする二重特異性抗体を作製する上では、dock-and-lock システムで作製した分子と本手法で作製した分子で、標的細胞に対する親和性に大きく違いが出るのが予想される。このように、これら 2 つの手法は、会合ユニットの化学量論比という点で差別化できる。

L27 ドメインについて、これまでにヘテロ四量体を形成することが知られているだけでなく、立体構造も明らかにされている(41)。その立体構造モデルを基に考えると、L27A および L27B

に導入したジスルフィド結合は、L27A-L27B 間に形成されると予想される。しかし、マスマススペクトル解析の結果は、L27A-L27B 間だけでなく L27A-L27A 間や L27B-L27B 間でジスルフィド結合を形成していることを示していた。このことは tetBsAb には、図 1-8 に示した 2 つの会合様式が存在することを示唆している。以前の研究において、二重特異性抗体の分子フォーマットは、がん細胞に対する傷害性に大きな影響を与え得ると報告されている(56)。したがって、相互作用界面への変異導入などによって、L27 ドメインの会合様式を制御できれば、tetBsAb の機能を飛躍的に高めることができるかもしれない。

抗体の高機能化を図る上で、抗原結合価数の増強は重要な戦略の 1 つである。抗原結合価数の増強によって期待できることとして、体内動態(57)や抗体依存性細胞傷害活性(58)の向上などが挙げられる。上述のように tetBsAb は EGFR および CD16 の両標的抗原に対する結合部位をそれぞれ 2 つ持つ四価の二重特異性抗体である。SPR 解析では、tetBsAb は Ia1 sdAb および C28 sdAb に比べ標的抗原からの解離が遅いという結果が得られており、tetBsAb が癌細胞や NK 細胞に対して多価で結合する可能性は高いと考えている。

NK 細胞が発現する CD16a には、158 番目のアミノ酸残基が異なる 2 つのアイソタイプが存在する。片方はバリン型であり、もう片方はフェニルアラニン型である。これらの IgG に対する親和性は異なり、バリン型の方がフェニルアラニン型よりも IgG に強く結合することが知られている(59)。また、この違いは臨床における抗体医薬品の有効性に大きく影響することも示されている(60-62)。この課題に対する解決策の 1 つとして、これら 2 種の CD16 アロタイプに対して同等の親和性で結合する抗 CD16 抗体からなる二重特異性抗体の利用が検討されている(63)。本研究では、IgG に対する親和性が高い CD16a 158V アロタイプを発現する NK 細胞を用いて細胞傷害性の評価を行った。しかし、tetBsAb を構成する C28 sdAb はセツキシマブと異なり、2 種の CD16a 158 アロタイプに対して同程度の親和性で結合することがわかっている。そのため、IgG に対する親和性が低い CD16a 158F アロタイプを発現する NK 細胞を用いて細胞傷

害性の評価を行い、CD16 158 V アロタイプの NK 細胞を用いた場合と比較すると興味深い結果が得られるかもしれない。

本章では、二重特異性抗体を作製するための方法として、L27 ドメインの自発的会合の利用を提案した。本手法の有用性を示すために、大腸菌発現系を用いて L27 ドメインの会合を利用した四量体型二重特異性抗体 **tetBsAb** を作製し、その性質を調べた。*in vitro* での癌細胞傷害性評価において、**tetBsAb** は抗体医薬セツキシマブと同等の活性を示した。以上の結果から、本手法が二重特異性抗体をはじめとする高機能人工抗体の安価で迅速な生産に有用であると考えた。

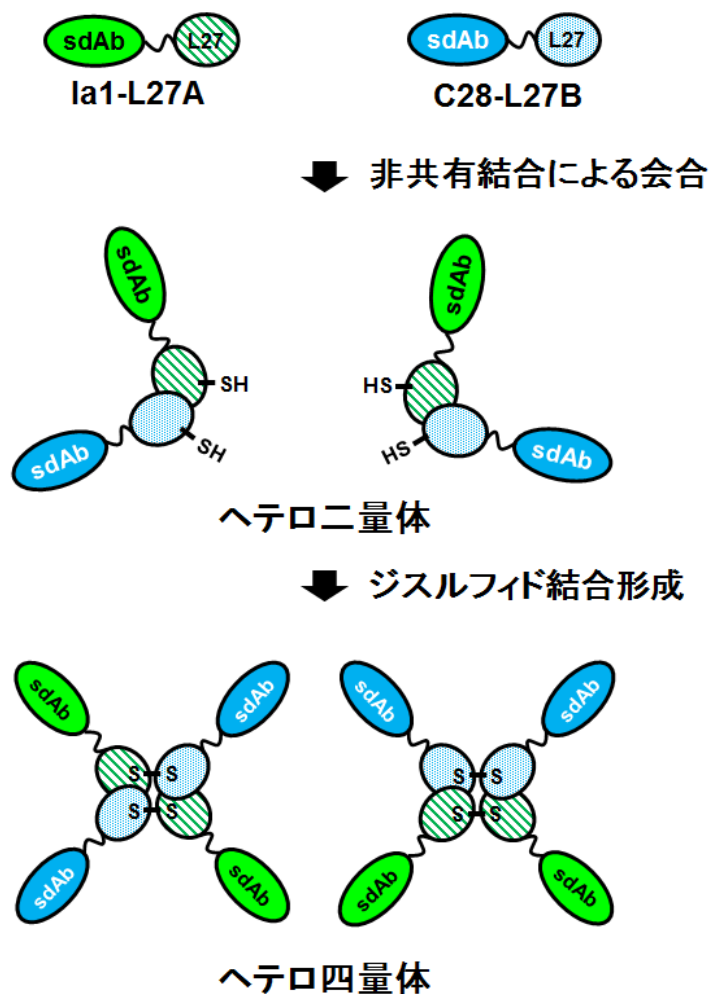


図 1-8 SDS-PAGE、MALDI-TOF 質量分析、ゲルろ過クロマトグラフィーの結果から推定した sdAb-L27 融合タンパク質の会合状態 tetBsAb は Ia1-L27A に付加した Strep-tag II と C28-L27B に付加した His₆ タグを利用した 2 段階のアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。そのため、精製後の tetBsAb には、ホモ二量体およびホモ四量体は含まれないと考えた。また、ゲルろ過クロマトグラフィーの結果から、tetBsAb は主に溶液中で四量体として存在することがわかった。さらに、質量分析の結果から、分子間ジスルフィド結合の組み合わせは、L27A-L27A、L27A-L27B、L27B-L27B の 3 通りであることがわかった。以上の結果より、精製後の tetBsAb には、分子間ジスルフィド結合の組み合わせが異なる 2 種のヘテロ四量体が含まれると考えた。

第 2 章

単一ドメイン抗体－腫瘍壊死因子 α 融合タンパク質の 大腸菌による可溶性発現

2-1 はじめに

サイトカインは、分泌性のシグナルタンパク質であり、免疫応答において重要な役割を担っている。また、サイトカインの中には腫瘍壊死因子(TNF)スーパーファミリーリガンドのように、リガンドの受容体を発現する標的細胞に対して、アポトーシス性の細胞死を誘導するものもある(64)。そこで、この性質を利用し、いくつかのサイトカインについて、医薬への応用が模索されてきた。サイトカイン医薬品として、遺伝子組換えインターフェロン γ が初めて承認されて以降、様々なサイトカインについて臨床試験が行われており、いくつかはすでに医薬品として承認を受けている(65)。しかし、サイトカインの中には重篤な副作用を示すものや、十分な薬物動態特性が得られないものも多く、医薬品としての応用は必ずしも期待通りに進んでいない。

組換え DNA 技術の進歩に伴って、抗体とサイトカインの融合タンパク質が作製されるようになった。この融合タンパク質はイムノサイトカインと呼ばれ、治療薬としての応用が期待されている。サイトカインに抗体を融合する目的は、抗体の抗原特異性を利用して、サイトカインを病巣に送達することである(66)。サイトカインを病巣特異的に集積させることができれば、副作用を大幅に低減できることが期待される。これまでに多くのイムノサイトカインが作製されてきたが、そのいくつかについては臨床試験が実施されている(17)。一方で、イムノサイトカインは、他のバイオ医薬品と同様に、微生物や動物細胞などを利用して生産する必要があるため、生産管理の難しさや製造コストの高さが依然課題として残されている。

種々の抗体断片の中でも単ドメイン抗体(sdAb)は、分子量が小さく、熱安定性や水溶性が高いことから、融合抗体を構築する際の構成単位としてしばしば利用されている(57)。例えば、第 1 章で述べたように、2 種の sdAb を利用することによって、大腸菌発現系により簡便かつ迅速に生産できる四量体型二重特異性抗体を創製することができた(67)。sdAb のイムノサイトカインへの応用については、Garcin らによってマウスレプチン 1 特異的 sdAb と I 型インターフェロンからなる融合タンパク質が報告されている(68)。しかし、彼らは動物細胞発現系を用いて融合タンパク質を生産しており、sdAb を利用したイムノサイトカインを微生物発現系により

生産した報告例はない。

そこで本章では、EGFR 特異的 sdAb Ia1 と炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 α (TNF α)を融合した新規イムノサイトカイン Ia1-TNF α を作製した。第 1 章で述べた通り、EGFR は多くのがんで過剰発現している受容体であり、がん治療の標的の1つとされている。一方、TNF α は TNF スーパーファミリーに属するサイトカインで、抗腫瘍活性を持つことから、抗がん剤としてすでに臨床応用されている。しかし、TNF α は毒性が高く、しばしば重篤な副作用を引き起こしたため、現在では分離式肢灌流のような局所的な治療にのみ用いられている(69)。本章では、機能性と生産性に優れた新規イムノサイトカインの開発を目的として、大腸菌発現系を用いた Ia1-TNF α の生産を試み、作製した分子の機能評価を行った。

2-2 方法

2-2-1 細胞と培養条件

ヒト扁平上皮癌細胞株 A431 細胞は、10% FBS を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)中で、マウス繊維芽細胞株 NIH3T3 細胞および L929 細胞は、10% FBS を含む RPMI1640 中でそれぞれ培養した。細胞はすべて 5% CO₂、37°Cの条件下で培養した。

2-2-2 Ia1 sdAb の調製

以前に構築した C 末端 His₆ タグ付き Ia1 sdAb の大腸菌分泌発現ベクター(48)を用いて、大腸菌 BL21(DE3)株を形質転換した。得られた形質転換体を植菌し、28°Cで OD₆₀₀ が 0.8 に達するまで培養した後、終濃度 1 mM の IPTG を添加し、さらに一晩培養した。培養上清を回収し、80%飽和に相当する硫酸アンモニウムを添加することによってタンパク質を濃縮した。得られた沈殿を PBS に溶解し、遠心操作とフィルターろ過により沈殿物を除いた後、TALON レジン(Clontech)を用いた金属キレートアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

2-2-3 組換え TNF α の調製

全合成したヒト TNF α の cDNA (ユーロフィンジェノミクスから購入)を制限酵素 *Nde* I および *Xho* I を用いて消化し、予め同じ酵素で消化した pET-20b (Novagen)に挿入した。この TNF α 発現プラスミドを用いて、大腸菌 BL21(DE3)株を形質転換した。得られた形質転換体を植菌し、28°Cで OD₆₀₀ が 0.8 に達するまで培養した後、IPTG を終濃度 1 mM となるように添加し、さらに一晩培養した。菌体を回収し、200 mM KCl、50 mM MgCl₂、5 % グリセロールを含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.2)緩衝液に懸濁した後、超音波により菌体を破碎した。遠心操作とフィルターろ過により不溶物を除いた後、陰イオン交換クロマトグラフィー(HiTrap Q XL, GE Healthcare)、ゲルろ過クロマトグラフィー(HiLoad 16/600 Superdex 75 pg, GE Healthcare)、陽イオン交換クロマトグラフィー(RESOURCE S, GE Healthcare)の 3 種のカラムクロマトグラフィーを組み合わせて精製した。

2-2-4 Ia1-TNF α 発現ベクターの構築

ヒト TNF α 遺伝子をコードする DNA 断片を、2 本のプライマー SacII_G1_TNFA (5'-CCCCCGCGGGTGGCGGCGGTAGCGTCCGCAGTTCGAGTCGTAC-3') および XhoI_FLAG_TNFA (5'-CCCCTCGAGTTTGTTCATCATCGTCTTTGTAGTCCAGCGCAATAATGCCGAG-3')を用いて、PCR により増幅した。PCR 産物を制限酵素 *Sac* II および *Xho* I で消化し、予め同じ酵素で消化した Ia1 sdAb をコードする DNA を含む pET20b ベクターに挿入した。作製した Ia1-TNF α 発現ベクターを pET-Ia1-TNF α と名付けた。

2-2-5 Ia1-TNF α の発現と精製

pET-Ia1-TNF α を用いて、大腸菌 BL21(DE3)pLysS を形質転換し、得られた形質転換体をアンピシリン(100 μ g mL⁻¹)およびクロラムフェニコール(34 μ g mL⁻¹)を含む 2 × YT 培地中、28°Cで培養した。OD₆₀₀ が 0.8 に達した時点で IPTG を加え、さらに 28°Cで 16 時間培養した。

培養上清を回収し、80%飽和に相当する硫酸アンモニウムを添加することによってタンパク質を濃縮した。得られた沈殿を PBS に溶解し、遠心操作とフィルターろ過により沈殿物を除いた後、TALON レジン(Clontech)を用いた金属キレートアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。目的タンパク質の発現および精製後の試料の純度は、SDS-PAGE および HRP 標識抗 His₆ タグ抗体(Wako)を用いたウェスタンブロッティングによって確認した。

2-2-6 ゲルろ過クロマトグラフィー

ÄKTA Prime plus システム (GE Healthcare)を用いて、ゲルろ過クロマトグラフィーによる分析を行った。PBS で平衡化した Superdex 200 10/300 カラム(GE Healthcare)に試料を添加し、同じ緩衝液を用いて流速 0.5 mL min⁻¹ で溶出した。検量線の作成には、カタラーゼ(232 kDa)、TNF α (52.5 kDa)、キモトリプシノーゲン(25.0 kDa)、リボヌクレアーゼ A (13.7 kDa)の 4 種の分子量マーカータンパク質を用いた。

2-2-7 フローサイトメトリーによる特異的結合の評価

A431 細胞または NIH3T3 細胞(ともに 5×10^5 細胞)と Ia1-TNF α 溶液(2 $\mu\text{g mL}^{-1}$)を混合し、Ia1 sdAb (40 $\mu\text{g mL}^{-1}$)存在下または非存在下で氷中、30 分間反応させた。FACS buffer (0.1% NaN₃を含む PBS)で細胞を洗浄した後、マウス抗 FLAG タグ抗体(1E6, wako)と FITC 標識ヤギ抗マウス IgG(H+L)抗体(Kirkegaard & Perry Laboratories)を順に反応させ、細胞に結合した Ia1-TNF α を検出した。フローサイトメーター(FACSCalibur, Becton Dickinson)を用いて、染色細胞を解析した。

2-2-8 EGF 競合アッセイ

5×10^5 細胞の A431 細胞と 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ のビオチン化 EGF 溶液 (Life Technologies)を混合し、各濃度の Ia1 sdAb または Ia1-TNF α の存在下あるいは非存在下で氷中、30 分間反応させ

た。FACS buffer で細胞を洗浄した後、細胞に結合したビオチン化 EGF を Alexa Fluor 488 標識ストレプトアビジン (Jackson Immuno-Research) で検出した。フローサイトメーター (FACSCalibur, Becton Dickinson) を用いて、染色細胞を解析した。以下の式を用いて、% 平均蛍光強度 (% MFI) を算出した。

$$\% \text{ MFI} = \frac{(\text{MFI of experiment} - \text{MFI of PBS control})}{(\text{MFI of no competitor} - \text{MFI of PBS control})} \times 100\%.$$

MASTERPLEX ソフトウェア (Hitachi Solutions America) を用いてシグモイド型近似曲線を描き、半数阻害濃度 (IC₅₀) を算出した。

2-2-9 L929 細胞を用いた TNF α バイオアッセイ

L929 細胞を 2×10^4 cells well⁻¹ の密度で 96 穴平底プレートに播種し、37°C、10 % FBS RPMI 1640 培地中で 24 時間培養した。ウェルから培地を除いた後、各濃度の TNF α 溶液を加え、アクチノマイシン D ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) を含む 10% FBS RPMI 1640 中、37°C で培養した。24 時間後、CellTiter96 Aqueous One Solution Reagent (Promega) を用いた 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium inner salt (MTS) assay に よって生細胞を比色定量した。以下の式を用いて、細胞生存率を算出した。

$$\% \text{ Cell viability} = \frac{(A_{490} \text{ of experiments} - A_{490} \text{ of background})}{(A_{490} \text{ of control} - A_{490} \text{ of background})} \times 100\%.$$

MASTERPLEX ソフトウェアを用いてシグモイド型近似曲線を描き、IC₅₀ を算出した。L929 細胞を 50% 溶解するために必要なタンパク質量を 1 unit と定義した。

2-3 結果

2-3-1 Ia1-TNF α の発現系構築と調製

EGFR を標的とする単ドメイン抗体 Ia1 sdAb の C 末端に、柔軟性の高いポリペプチドリンカーを介して、ヒト TNF α を連結した融合タンパク質 Ia1-TNF α を設計した。本研究室における以前の研究では、組換え TNF α は、大腸菌の細胞質内で高効率に生産できたが、sdAb は分子内に1対のジスルフィド結合を含むため、一般に、酸化的環境下にあるペリプラズム内で生産される。そこで、Ia1-TNF α の N 末端側に pel B シグナルペプチドを融合し、大腸菌分泌発現ベクターを作製した。作製した Ia1-TNF α の発現ベクターの模式図を図 2-1A に示した。また、TNF α は溶液中で三量体を形成することが知られているため、Ia1-TNF α も図 2-1B の模式図で示したように、TNF α ドメインを介して三量体を形成すると考えた。作製したベクターで形質転換した大腸菌を培養し、SDS-PAGE およびウェスタンブロットティングにより目的タンパク質の発現を調べた。その結果、図 2-2 に示したように、培養上清、菌体内不溶性画分、菌体内不溶性画分のそれぞれにおいて目的タンパク質のバンドが検出された。菌体内不溶性画分にも目的タンパク質のバンドが検出されたことから、Ia1-TNF α の一部は発現段階で不溶化したことがわかった。しかし、培養上清画分にも目的タンパク質のバンドが検出されたことから、目的タンパク質は可溶性タンパク質として、培養上清に存在することがわかった。そこで、培養上清から金属キレートアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。精製後の Ia1-TNF α の SDS-PAGE の結果を図 2-3 に示した。目的タンパク質の分子量の位置に単一のバンドが検出されたことから、目的タンパク質を高純度に精製できたことがわかった。培養液 1 L あたりの収量は約 2 mg であった。

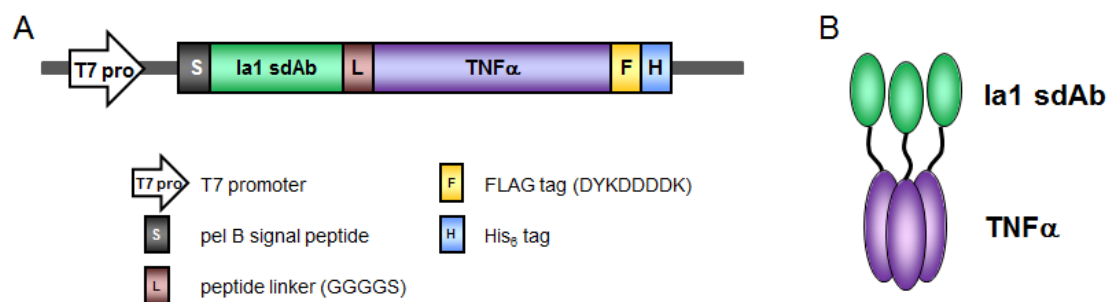


図2-1 Ia1-TNF α の構築 (A) Ia1-TNF α の大腸菌発現ベクターの模式図。(B) Ia1-TNF α 三量体の模式図。TNF α は三量体を形成するため、Ia1-TNF α は TNF α ドメインを介して三量体を形成すると考えられる。

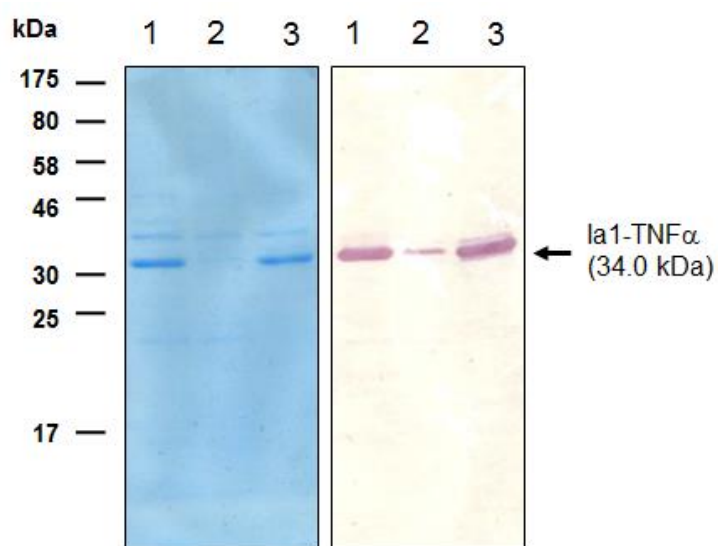


図 2-2 Ia1-TNF α の発現 大腸菌 BL21(DE3)pLysS 株を用いて Ia1-TNF α を発現させ、SDS-PAGE (左)および抗 His₆タグ抗体を用いたウェスタンブロッティング(右)によって目的タンパク質の発現を調べた。レーン1、培養上清画分; レーン2、菌体内可溶性画分; レーン3、菌体内不溶性画分。

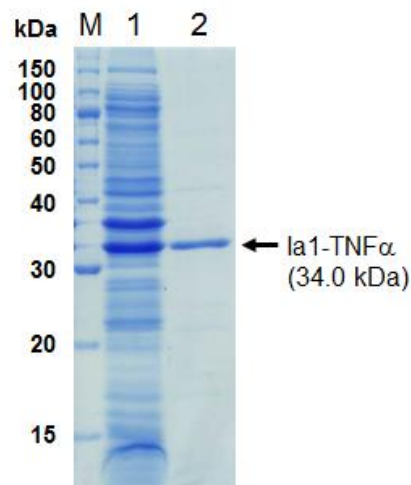


図 2-3 SDS-PAGE による Ia1-TNF α の分析 レーン 1、培養上清(精製前); レーン 2、アフィニティークロマトグラフィーの溶出画分(精製後); M、分子量マーカー。

2-3-2 ゲルろ過クロマトグラフィーによる Ia1-TNF α の分子形状評価

溶液中における Ia1-TNF α の会合状態を調べるために、ゲルろ過クロマトグラフィーによる分析を行った。その結果、分子量 232 kDa および 52.5 kDa に相当する溶出位置の間に、ほぼ単一のピークが検出され、可溶性凝集体や単量体と考えられるピークは見られなかった(図 2-4A)。また、検量線から見積った Ia1-TNF α の分子量は102 kDa であり、アミノ酸配列から算出したIa1-TNF α 三量体の分子量(102 kDa)と一致した(図 2-4B)。第 1 章で述べたように、Ia1sdAb は単量体として存在していたことから(1-3-2, p. 30)、溶液中で Ia1-TNF α は TNF α ドメインを介して三量体を形成していると考えた。

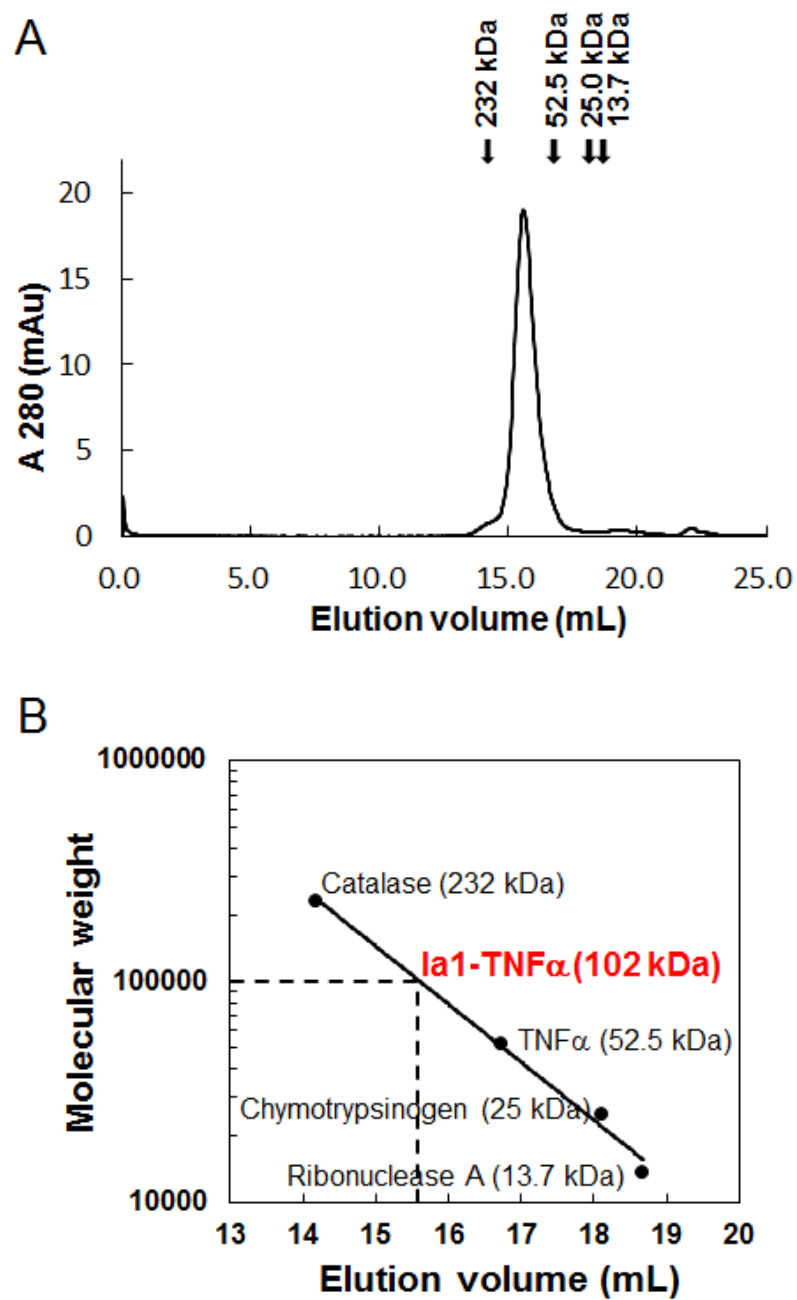


図 2-4 ゲルろ過クロマトグラフィーによる Ia1-TNFαの分析 ゲルろ過カラム Superdex 200 を用いて Ia1-TNFαの分子形状を調べた。(A) Ia1-TNFαのクロマトグラム。矢印は分子量マーカータンパク質の溶出位置を示す。(B)分子量マーカータンパク質を用いて作成した検量線。この検量線を用いて Ia1-TNFαの分子量を求めた。

2-3-3 Ia1-TNF α の A431 細胞への結合

Ia1-TNF α の結合特異性を調べるために、フローサイトメトリー解析を行った。標的細胞として EGFR を発現するヒト扁平上皮癌細胞 A431 を用いて実験を行ったところ、図 2-5A のようなヒストグラムが得られた。A431 細胞に Ia1-TNF α を添加した場合、細胞に PBS を添加した場合に比べ、ピークが右にシフトしたことから、Ia1-TNF α がA431細胞に結合したと考えた。また、Ia1-TNF α の A431 細胞への結合が、TNF α ドメインを介した TNF 受容体への結合であるか否かを明らかにするために、過剰量の Ia1 sdAb 存在下で A431 細胞に対して Ia1-TNF α を反応させた。その結果、Ia1-TNF α の A431 細胞に対する結合は見られなかった。さらに、A431 細胞への Ia1-TNF α の結合が非特異的な結合ではないことを示すために、EGFR 陰性である NIH3T3 細胞を用いて同様の実験を行ったところ、図 2-5B のようなヒストグラムが得られた。NIH3T3 細胞に Ia1-TNF α を添加してもピークシフトは見られなかったことから、Ia1-TNF α は NIH3T3細胞に結合しなかったと考えた。以上の結果から、Ia1-TNF α は A431 細胞表面上の EGFR に対して特異的に結合したと考えた。

次に、TNF α ドメインを介した Ia1 sdAb の三量体形成が、細胞表面上の EGFR に対する結合に与える影響を調べるために、フローサイトメトリー用いた EGF 競合アッセイにより、単量体である Ia1 sdAb と三量体である Ia1-TNF α について、A431 細胞に対する結合の強さを比較した。その結果を図 2-6 に示した。以前の研究から、EGFR への結合において、Ia1 sdAb と EGF は競合することが知られている(42)が、今回行った実験でも同様に、Ia1 sdAb および Ia1-TNF α は、EGF の A431 細胞への結合を濃度依存的に阻害した。それぞれの抗体について、IC₅₀ 値を求めたところ、Ia1-TNF α と Ia1 sdAb の IC₅₀ 値はそれぞれ 5.9 nM および 23 nM であった。このように Ia1-TNF α は Ia1 sdAb より低濃度で EGF の A431 細胞への結合を阻害したことから、Ia1-TNF α は Ia1 sdAb に比べて、A431 細胞に対して強く結合すると考えた。この結合力の違いは、三量体を形成する Ia1-TNF α が、細胞表面上の標的抗原に対して多価で結合したためであると考えた。

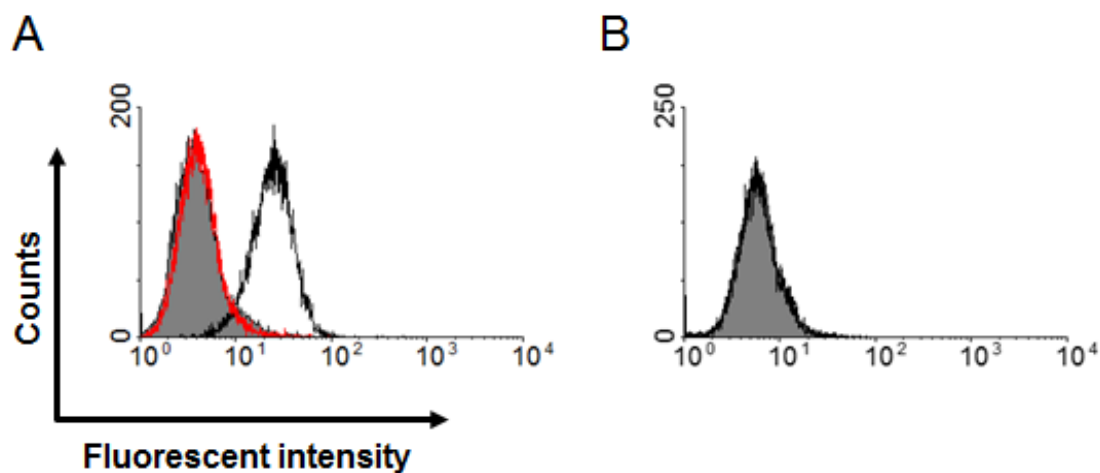


図 2-5 フローサイトメトリーによる Ia1-TNF α の結合特異性評価 (A) A431 細胞に対する Ia1-TNF α の結合。A431 細胞(5×10^5 細胞)と Ia1-TNF α 溶液($2 \mu\text{g mL}^{-1}$)を混合し、Ia1 sdAb ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$)存在下(赤線)または非存在下(黒線)で氷中、30 分間反応させた。(B) NIH3T3 細胞に対する Ia1-TNF α の結合。NIH3T3 細胞(5×10^5 細胞)と Ia1-TNF α 溶液($2 \mu\text{g mL}^{-1}$)を混合し、氷中、30 分間反応させた(黒線)。灰色で示した領域はコントロールを示す。

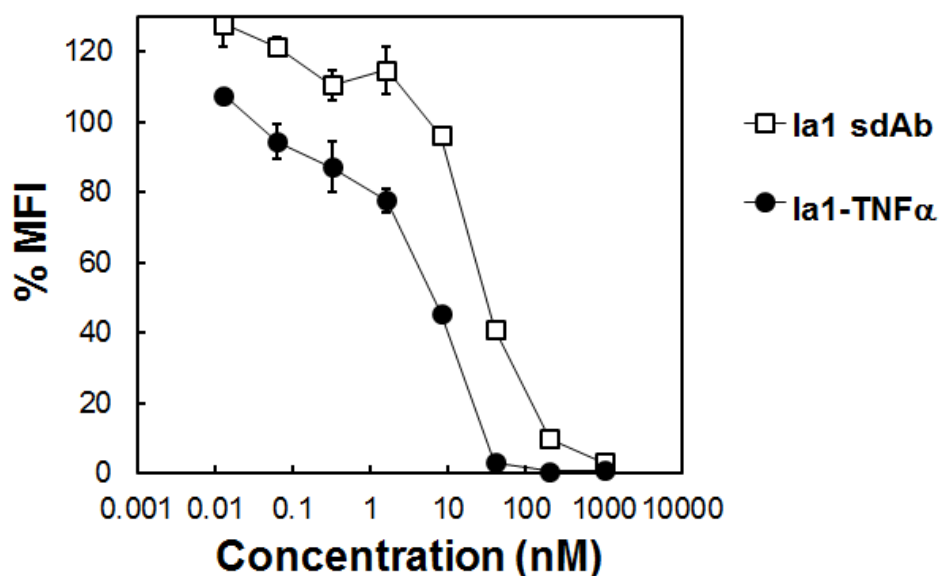


図 2-6 フローサイトメトリーを用いた EGF 競合アッセイ A431 細胞をビオチン化 EGF ($0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$)と混合し、各濃度の Ia1 sdAb ($\square$)または Ia1-TNF α ($\bullet$)存在下でインキュベートした。細胞を洗浄後、Alexa Fluor 488 標識streptavidinを添加し、細胞に結合した EGF を検出した。

2-3-4 TNF α の生物学的活性

EGFR 陰性かつ TNF α 感受性の L929 細胞を用いて、Ia1-TNF α の TNF α 活性を調べた。L929 細胞に対して TNF α または Ia1-TNF α を添加し、アクチノマイシン D 存在下で培養後、MTS アッセイにより細胞生存率を決定した。その結果を図 2-7 に示す。Ia1-TNF α は TNF α と同様に、L929 細胞に対して濃度依存的に細胞傷害性を示した。各試料について、シグモイド型近似曲線から IC₅₀ 値を求めたところ、Ia1-TNF α の IC₅₀ 値は 1.1 pM であり、TNF α の IC₅₀ 値は 0.15 pM であった。この約 7 倍の違いは、TNF α に融合した Ia1 sdAb の立体障害が原因となつて、TNF α ドメインの TNF 受容体への結合が妨げられたことから生じたと考えた。抗体の融合に伴う TNF α 活性の低下は、他の研究グループからも報告されており(70)、この場合も抗体ドメインの立体障害が活性低下の原因であると考えられている。以上のように Ia1-TNF α において、TNF α 活性の低下は見られたものの、TNF α と同様に L929 細胞に対する傷害性を確認することができた。

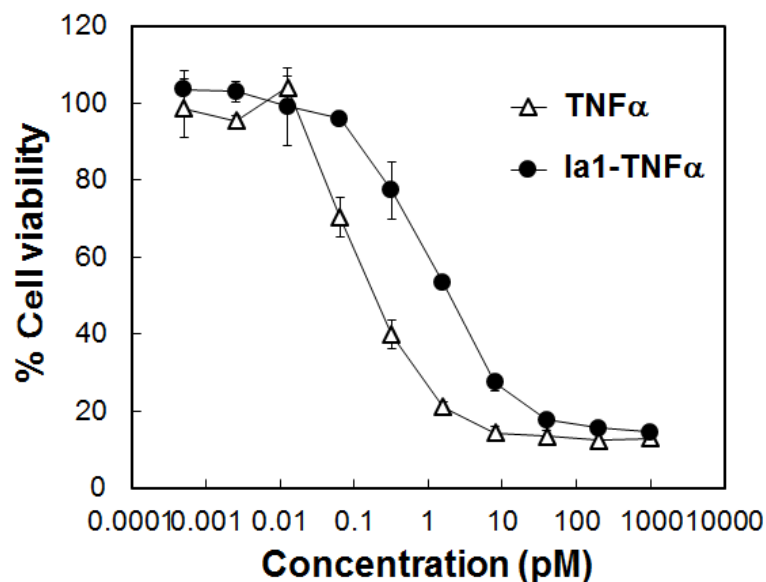


図 2-7 L929 細胞を用いた TNF α バイオアッセイ L929 細胞に TNF α (Δ)または Ia1-TNF α ($\bullet$)を加え、アクチノマイシン D ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$)存在下で 18 時間培養した。細胞生存率は MTS アッセイによって決定した。各シンボルとバーは、3 ウェルの測定結果の平均値 $\pm$ 標準偏差を表す。

2-4 考察

現在承認を受けているほとんどの抗体医薬は動物細胞を用いて生産されているが、微生物発現系を利用して組換え抗体を生産できれば、製造コストの低減や研究開発期間の短縮につながる事が期待できる。これまでに開発されてきた TNF α 融合抗体のほとんどは、scFv 抗体とTNF α 単量体(70-72)、もしくはscFv 抗体と一本鎖のTNF α 三量体(55)からなる。このうち発現系として大腸菌が用いられているのは、scFv 抗体とTNF α 単量体の融合タンパク質だけである。しかし、scFv 抗体とTNF α 単量体の融合タンパク質は、3つのドメイン(VH、VL、TNF α)から構成されており、単量体としての分子量は 4~5 万程度となるため、大腸菌を用いて可溶性タンパク質として効率良く生産することは必ずしも容易ではない。

本研究では、TNF α 融合抗体を構成する抗体部分として、scFv より分子サイズの小さいsdAbを用いて融合抗体 Ia1-TNF α を作製した。Ia1-TNF α はsdAbとTNF α の2つのドメインから構成されており、単量体あたりの分子量は 34 kDa であり、scFv を用いた融合抗体より分子量はやや小さい。今回、大腸菌を用いて Ia1-TNF α を可溶性タンパク質として発現させることができたのは、このような分子量の差が影響していると考えている。一方で、用いる抗体ドメインの違いが TNF α 融合抗体の生産に及ぼす影響について詳細に議論するためには、同一の発現系を用いて、scFv から構成した融合抗体とsdAbから構成した融合抗体を直接、比較する必要がある、これは今後の検討課題である。

Ia1-TNF α の機能性については、改良の余地が残されていると考えている。特に、Ia1 sdAbとの融合により、TNF α ドメインの活性が約 1/7 に低下したことから、その活性向上が強く望まれる。具体的には、Ia1-TNF α をつなぐポリペプチドリンカーの最適化によって解決できている。2-3-4 でも述べた通り、TNF α ドメインの活性が低下した原因として、Ia1 sdAbドメインの立体障害によりTNF α ドメインのTNF 受容体へ結合が阻害された可能性が高い。すなわち Ia1 sdAbドメインの立体障害を緩和するには、Ia1 sdAbドメインをTNF α ドメインから空間的に離れた配置にすることが重要であると考えられる。今回、Ia1-TNF α の作製には、G₄S リンカー

(GGGGS)を用いた(70, 72)。このリンカーは、TNF α 融合抗体で用いられている数種のポリペプチドリンカー(70-72)の中でも比較的短いリンカーに分類される。短いリンカーを利用することの利点としては、ポリペプチドリンカーに起因する免疫応答の誘導やプロテアーゼによる分解のリスクを軽減することである(73)。一方で、フィブロネクチンエキストラドメイン B を標的とする TNF α 融合抗体 L19-TNF (Fibromun) (74)や EGFR を標的とする TNF α 融合抗体 scFv(14E1)-TNF α (71)では、それぞれ 15 アミノ酸からなる(S₄G)₃リンカーや 60 アミノ酸からなる CD8- α 鎖ヒンジ領域が用いられており、より長いペプチドリンカーの適用は、Ia1-TNF α の機能性を向上させる上で有効かもしれない。

以上、本章では Ia1-TNF α の作製を通して、がん治療用 TNF α 融合抗体の開発における sdAb-TNF α フォーマットの有用性について述べてきた。その中でも大腸菌を用いて、可溶性タンパク質として Ia1-TNF α を調製できたことは、生産性に優れた融合抗体の開発に貢献できる成果であると考えている。今後の課題としては、Ia1-TNF α の抗腫瘍効果についての検討が残されている。Ia1-TNF α に期待される作用としては、TNF α が癌細胞表面上の TNF 受容体に結合することによってアポトーシスを誘導する直接的な作用と、TNF α が癌組織周囲の免疫細胞表面上の TNF 受容体に結合することによって免疫細胞を活性化する間接的な作用が挙げられる。この内、直接的な作用に関しては、Ia1-TNF α が標的とする EGFR を含む ErbB ファミリータンパク質の発現が TNF α 感受性を低下させるとの報告もあることから(71)、効果は限定的かもしれない。一方で、Ia1-TNF α の間接的な作用に関しては、*in vitro* の実験において、細胞表面上の EGFR に結合する TNF α 融合抗体が T 細胞を活性化すると報告もあり(71)、期待は高い。したがって、今後、*in vivo* における腫瘍抑制効果の評価を通して、Ia1-TNF α の癌治療薬としての可能性について議論を深めるべきだと考えている。

第 3 章

上皮増殖因子受容体を標的とする ラットモノクローナル抗体の作製と 特性評価

3-1 はじめに

上皮増殖因子受容体(EGFR)は ErbB ファミリーに属する受容体チロシンキナーゼで、細胞の増殖や遊走、分化などの様々な細胞プロセスにおいて重要な役割を担っている。これらの細胞プロセスの引き金となっているのは、上皮増殖因子(EGF)またはトランスフォーミング増殖因子(TGF α)の EGFR への結合である。これらのリガンドの結合は EGFR を活性化することで様々な細胞プロセスに関するシグナルを細胞内へと伝えている。通常、これらのシグナルは厳密に制御されているため、細胞が無秩序に増殖することはない(75)。しかし多くのがんでは、EGFR の過剰発現や EGFR の変異、EGFR リガンドの過剰産生により EGFR シグナルが調節不全の状態となり、その結果、がん細胞は無秩序に増殖する(76, 77)。このように EGFR は、がん細胞の増殖と深く関連しており、がん治療の有望な標的とされている。

これまでに抗体医薬や低分子薬を含め、EGFR を標的としたいくつかの分子標的薬が開発、承認されている。EGFR を標的とする抗体医薬セツキシマブは 2004 年に大腸がんの治療薬として FDA に承認されたヒト-マウスキメラ型抗 EGFR 抗体である。また、セツキシマブは 2008 年に国内でも承認されており、頭頸部扁平上皮がんや大腸がんの治療薬として用いられている。セツキシマブは、EGFR に対しアンタゴニストとして作用し、異常な EGFR シグナル抑制することでがんの増殖を抑えらる(78)。しかし、EGFR の変異や ErbB ファミリー内の他の受容体によるシグナルの増加により、セツキシマブによる抗腫瘍効果が低減することも報告されている(79)。実際、切除不能な大腸がん患者を対象にした臨床試験では、セツキシマブの奏効率が 11%とあまり高くなかったことが報告されている(80)。

抗体医薬に対する抵抗性に打ち勝つための他の戦略は EGFR を標的とする新規抗体の取得である。そこで今回、新規抗 EGFR モノクローナル抗体の取得に向け、腸骨リンパ節法(81)によるラットモノクローナル抗体の作製を試みた。本章では、モノクローナル抗体の作製と取得した抗体の性質についてその詳細を述べる。

3-2 方法

3-2-1 細胞と培養条件

ヒト扁平上皮がん細胞株 A431 およびマウス繊維芽細胞株 NIH3T3 細胞は 10% FBS を添加した DMEM 中で培養した。細胞はすべて 5% CO₂、37℃の条件下で培養した。

3-2-2 組換え EGFR タンパク質の調製

ラットへの免疫に用いた組換え Fc 融合 EGFR タンパク質(EGFR-ECD-Fc)および、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)によるスクリーニングに用いた組換え EGFR タンパク質は 1-2-3 と同様の方法で調製した。

3-2-3 ハイブリドーマの作製

免疫には 8 週齢 Wister-Kyoto ラットを 1 匹用いた。EGFR-ECD-Fc 170 µg と Freund's complete adjuvant を混合したエマルジョン溶液 200 µL をラットの後ろ足の肉球に注射した。免疫から 19 日後、免疫したラットの腸骨リンパ節からリンパ球を単離し、マウスミエローマ SP2 細胞と 1:1 の比率で混合した後、50%ポリエチレングリコール溶液(PEG1500, Roche)を用いて細胞融合を行った。得られた融合細胞(ハイブリドーマ)を HAT 選択培地(Hybridoma-SFM [Life Technologies], 10% FBS, 1 ng mL⁻¹ 組換えマウスインターロイキン-6, 100 mM ヒポキサンチン [Sigma], 0.4 mM アミノプテリン[Sigma], 16 mM チミジン[Wako])で 96 穴プレートに播種した。細胞融合の 7 日後にハイブリドーマの培養液を回収し、EGFR-ECD を用いた ELISA および、A431 細胞を用いた免疫染色によるスクリーニングを行った。陽性ウェルの細胞を限界希釈した後、96 穴プレートに再び細胞を播種し、単クローン化した。単クローン化したハイブリドーマの培養上清を回収し、フローサイトメトリーによりさらなる絞り込みを行った。樹立したハイブリドーマは無血清培地中で培養し、培養上清から Protein G カラムアフィニティークロマトグラフィー (Protein G Sepharose, GE Healthcare)によって目的抗体を精製した。抗体のクラスおよ

びサブクラスを Rat Monoclonal Antibody Isotyping Test Kit (Serotec)を用いて決定した。

3-2-4 ELISA

10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)を用いて $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ に調製した EGFR-ECD を 96 穴プレートに添加し、 4°C で一晩静置し結合させた。抗体の非特異的な反応を防ぐため、PBS で希釈した 1% BSA をプレートに加えブロッキングを行った。プレートを PBS で洗浄後、ハイブリドーマの培養上清をウェルに添加し、室温で 1 時間反応させた。プレートを PBS で再度洗浄した後、ペルオキシダーゼ結合抗ラット IgG 抗体(Sigma)を加え、室温で 30 分反応させた。プレートを TBS-T (10 mM Tris-HCl [pH 7.4], 100 mM NaCl, 0.1% Tween-20)で 1 度、さらに PBS で 2 度洗浄した後、3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine solution (Wako)を加え発色させた。

3-2-5 フローサイトメトリーによる特異的結合の評価

A431 細胞または NIH3T3 細胞(5×10^5 細胞)に $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ の 2C2D3 または 4H7F4 と名付けた 2 つのクローン由来の精製抗体を加え、氷中 30 分間反応させた。次に、細胞を FACS buffer で洗浄後、Alexa 488 結合抗ラット IgG 抗体(Life Technologies)を加え、氷中 30 分間反応させた。染色した細胞をフローサイトメーター(FACSCalibur, Becton Dickinson)を用いて解析した。

3-2-6 競合アッセイ

一次抗体として、10 nM ビオチン化 EGF (Life Technologies)、 $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ラットモノクローナル抗体(2C2D3 または 4H7F4)、 $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ セツキシマブを用い、各一次抗体の検出には、二次抗体として、Alexa 488 結合streptavidin(Jackson ImmunoResearch Laboratories)、Alexa 488 結合抗ラット IgG 抗体(Life Technologies)、FITC 結合抗ヒト IgG 抗体(Sigma)をそれぞれ用いた。また、一次抗体の阻害には、100 nM (一次抗体としてビオチン化 EGF を用いた場合)ま

たは $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (一次抗体としてラット抗 EGFR 抗体またはセツキシマブを用いた場合)に調製したセツキシマブまたはラット抗 EGFR 抗体(2C2D3 または 4H7F4)を用いた。A431 細胞(5×10^5 細胞)に一次抗体を添加し、セツキシマブまたはラット抗 EGFR 抗体、存在下または非存在下で氷中 30 分間反応させた。細胞を FACS buffer で洗浄後、二次抗体を添加し、氷中 30 分間反応させた。染色した細胞をフローサイトメーター(FACSCalibur, Becton Dickinson)を用いて解析した。

3-2-7 免疫染色

A431 細胞を $5 \times 10^3 \text{ cells well}^{-1}$ の密度になるように multi-test slide (MP Biomedicals Europ) に播種した後、 37°C で 24 時間培養し、細胞をプレートに接着させた。培養上清を除いた後、細胞にハイブリドーマの培養上清または 20 nM に調製した精製済ラット抗 EGFR 抗体(2C2D3 または 4H7F4)を加え、室温で 1 時間反応させた。PBS で調製した 3.7%ホルムアルデヒド溶液を細胞に加え、室温 15 分間静置することによって細胞を固定化した後、Alexa488 結合抗ラット抗体を加え、細胞に結合したラット抗 EGFR 抗体を検出した。染色した細胞は IX-71 蛍光顕微鏡(Olympus)を用いて観察した。

3-3 結果

3-3-1 ラット抗 EGFR 抗体の作製

免疫には EGFR の細胞外ドメインとヒト IgG1 の Fc 領域を融合した組換えタンパク質 EGFR-ECD-Fc を用いた。Wister-Kyoto ラットに対し EGFR-ECD-Fc を免疫し、19 日後に腸骨リンパ球を回収した。さらに、回収したリンパ球をマウスミエローマ細胞と融合した後、HAT 選択培地で融合細胞のセレクションを行った。組換えタンパク質抗原だけでなく細胞表面上の抗原も認識する抗体を取得するため、組換え EGFR タンパク質を用いた ELISA と、EGFR を発現する A431 細胞を用いた免疫染色を組み合わせ抗体のスクリーニングを行った。その結果、

プレート 6 枚分にあたる全 576 ウェル中、1A11、2C2、2F8、3C8、4G9、4H7、5H4 の 8 つのウェルに由来する培養上清が ELISA および免疫染色の両アッセイにおいて陽性反応を示した。そこで、限界希釈によってこれらのウェル中の細胞を単一クローン化し、フローサイトメトリーによるさらなるスクリーニングを行った。EGFR 陽性の A431 細胞に対する結合を調べたところ、2C2D3 (IgG1/κ) および 4H7F4 (IgG2a/κ) の 2 つのクローンで他のクローンよりも大きなピークシフトを観測した(図 3-1A)。EGFR 陰性細胞である NIH3T3 に対する結合も調べたところ、2C2D3 および 4H7F4 の NIH3T3 細胞に対する非特異的な結合は認められなかった(図 3-1B)。また、2C2D3 と 4H7F4 について、免疫染色でも A431 細胞に対する結合を調べたところ、両クローンの A431 細胞に対する結合が認められた(図 3-2)。以上の結果から、ラットモノクローナル抗体 2C2D3 および 4H7F4 は、細胞表面上の EGFR を特異的に認識する抗体であると考えた。

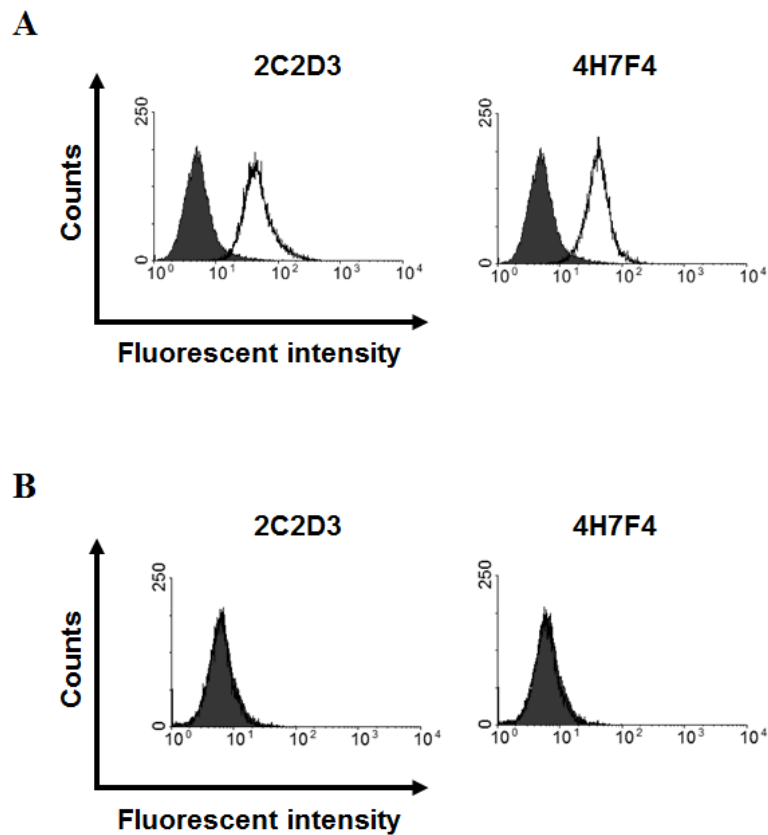


図 3-1 フローサイトメトリーによるラットモノクローナル抗体 2C2D3 および 4H7F4 の解析 A431 細胞(A)または NIH3T3 細胞(B)に、ラットコントロール抗体(黒塗り)またはラットモノクローナル抗体(2C2D3 または 4H7F4) (黒線)を加えインキュベートした後、細胞に結合したラット抗体を Alexa 488 標識抗ラット IgG 抗体で検出した。

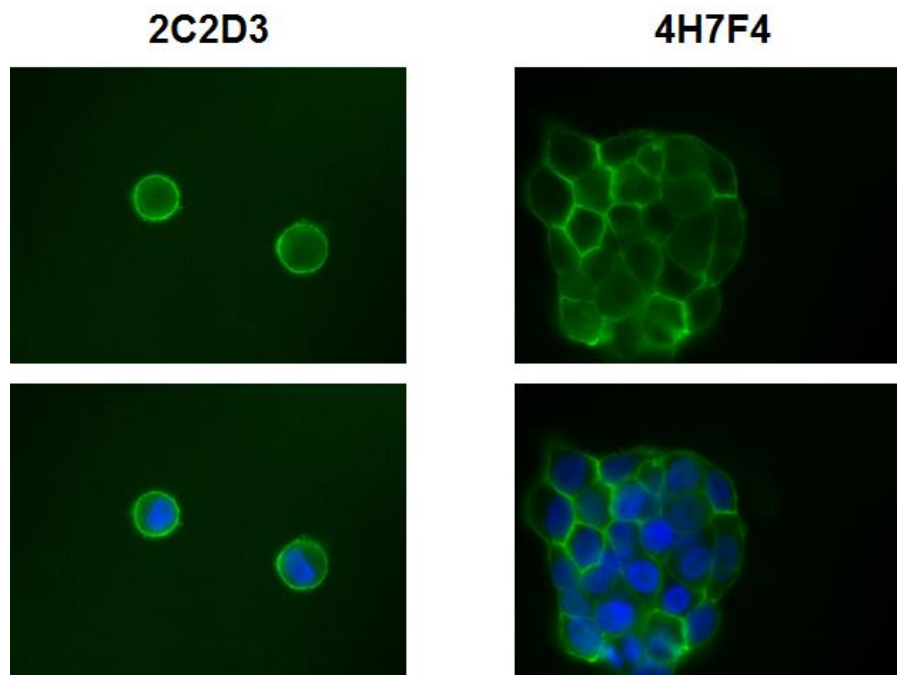


図 3-2 免疫染色によるラットモノクローナル抗体の解析 A431 細胞を接着させたプレートにラットモノクローナル抗体(2C2D3 または 4H7F4)を加えインキュベートした後、細胞に結合したラット抗体を Alexa 488 標識抗ラット IgG 抗体(緑)で検出した。核はヘキスト(青)で対比染色した。上は抗体による染色を、下は抗体による染色とヘキストによる染色の重ね合わせをそれぞれ示している。

3-3-2 ラット抗 EGFR 抗体のエピトープ解析

作製した 2 つの EGFR 特異的ラットモノクローナル抗体 2C2D3 および 4H7F4 の性質についてさらに詳細に調べるため、フローサイトメトリーによるエピトープ解析を行った。まず、EGFR のリガンドの 1 つである EGF との競合を調べた(図 3-3)。A431 細胞にビオチン化 EGF を加え、作製したラットモノクローナル抗体 2C2D3 または 4H7F4 の存在下および非存在下でインキュベートした後、Alexa 488 標識streプトアビジンを用いて検出した。ポジティブコントロールとして EGFR を標的とし、アンタゴニスト活性を持つことが知られる(72)抗体医薬セツキシマブを加えた場合、EGF の A431 細胞への結合はほぼ完全に阻害された。一方、2C2D3 および 4H7F4 を加えた場合、EGF の A431 細胞への結合は阻害されなかった。

次に、2C2D3 と 4H7F4 について、セツキシマブとの競合を調べた。まず、セツキシマブ存在下または非存在下で 2C2D3 または 4H7F4 の A431 細胞への結合を測定した。その結果、図 3-4A に示したように、セツキシマブを添加した場合でも、ラットモノクローナル抗体の MFI 値に大きな変化は見られなかった。次に 2C2D3 または 4H7F4 の存在下または非存在下でセツキシマブの A431 細胞への結合を測定した。その結果、図 3-4B に示したように、ラットモノクローナル抗体を添加してもセツキシマブの MFI 値はほとんど変化しなかった。これらの結果から、2C2D3 および 4H7F4 のエピトープはともにセツキシマブのエピトープと重複していないと考えた。

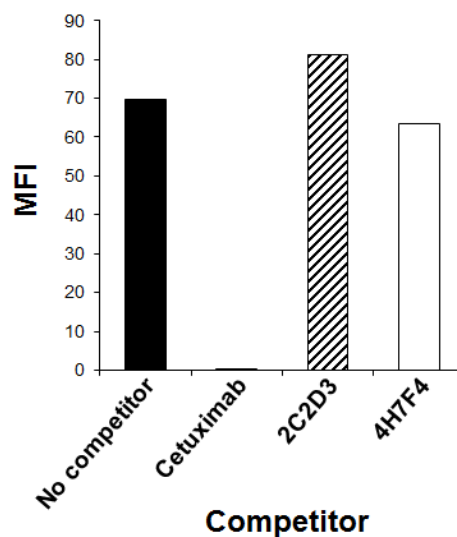


図 3-3 フローサイトメトリーによる EGF 競合アッセイ A431 細胞にビオチン化 EGF を加え、セツキシマブまたはラットモノクローナル抗体の存在または非存在下でインキュベートした。細胞を洗浄した後、結合したビオチン化 EGF を Alexa 488 標識ストレプトアビジンで検出した。グラフの縦軸は各試料の平均蛍光強度(MFI)からバックグラウンド(ビオチン化 EGF 未添加の細胞の MFI)を引いた値を示している。

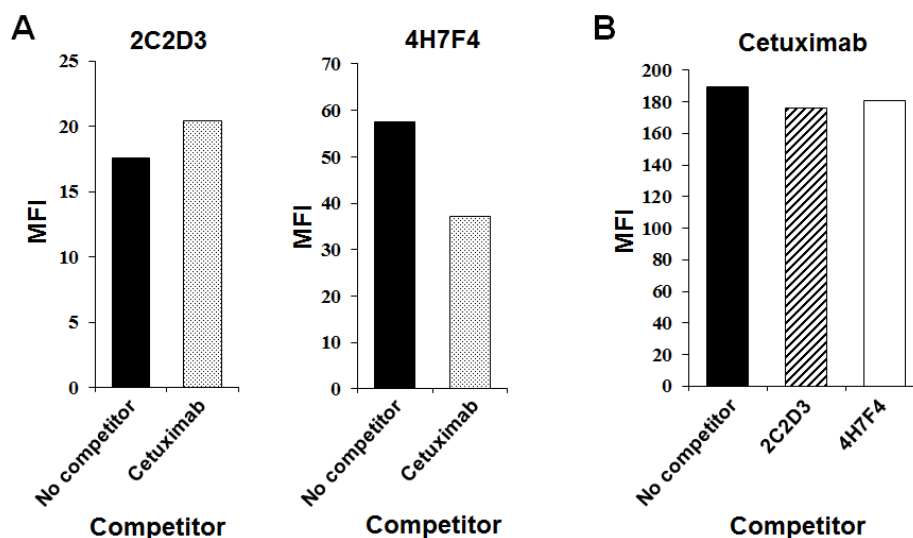


図 3-4 フローサイトメトリーによるセツキシマブとの競合アッセイ (A) A431 細胞に 2C2D3 または 4H7F4 ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$)を加え、セツキシマブ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$)の存在下または非存在下でインキュベートした。細胞を洗浄した後、細胞に結合したラットモノクローナル抗体を Alexa 488 標識抗ラット IgG 抗体で検出した。(B) A431 細胞にセツキシマブ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$)を加え、2C2D3 または 4H7F4 ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$)の存在下または非存在下でインキュベートした。細胞を洗浄した後、細胞に結合したセツキシマブを FITC 標識抗ヒト IgG 抗体で検出した。各縦軸は各試料の平均蛍光強度(MFI)からバックグラウンド(一次抗体未添加の細胞の MFI)を引いた値を示している。

3-4 考察

本章では、EGFR 特異的ラットモノクローナル抗体の作製と、樹立した 2 つの EGFR 特異的抗体 2C2D3 および 4H7F4 のエピトープについて述べた。ラットに対し組換え EGFR タンパク質を免疫し、腸骨リンパ節法を用いてハイブリドーマを樹立した。組換えタンパク質によるスクリーニングと細胞を用いたスクリーニングを組み合わせることによって、がん細胞表面上の EGFR に対し特異的に結合する 2 種のモノクローナル抗体を得た。これらの抗体を医薬応用するには次のステップとして抗体のキメラ化(82)またはヒト化(83)をしなければならない。

エピトープ解析では、2C2D3 および 4H7F4 のエピトープが、EGFR を標的とする抗体医薬セツキシマブのエピトープと重ならないことが示唆された。最近の報告では、互いに競合しない 2

種の抗 EGFR 抗体からなる「バイパトープ抗体」を EGFR 陽性細胞に添加したところ、EGFR の発現が抑えられたことが示されている(84)。また、その報告では、この現象はバイパトープ抗体によって複数の EGFR 分子が架橋され、EGFR のリソソームへの移行を促進することにより引き起こされると述べられている。さらに、バイパトープ抗体は *in vitro* だけでなく *in vivo* での抗腫瘍効果も報告されている(85, 86)。ここで注目すべきは、Boersma らが作製したバイパトープ抗体には、アンタゴニスト活性を持たない抗体が含まれていることである(86)。つまり、バイパトープ抗体の抗腫瘍効果の発現には必ずしもアンタゴニスト作用が必要ではないと言える。これらの知見は、2C2D3 および 4H7F4 のそれぞれが単独での医薬品候補であるだけでなく、バイパトープ抗体のような次世代抗体医薬を構成する機能単位としても利用価値があることを支持している。

総括

これまでに承認されてきた抗体医薬のほとんどは分子量約 15 万の IgG 型分子である。数多くの分子形態の人工抗体が開発される中、IgG 型分子が抗体医薬のほとんどを占める最大の理由は、Fc の機能にあるだろう。序章でも述べたように、抗体の Fc 領域は ADCC 活性や抗体のリサイクル機構に深く関わっており、Fc 領域の有無は抗体医薬品開発に向けた高機能人工抗体の創製において非常に重要である(序章, 第 5 項, p. 12)。一方で、近年、Tandem scFv 型の低分子量の抗体医薬ブリナツモマブが登場するなど、抗体医薬の分子形態にも変化の兆しが見え始めている。この理由としては、抗体技術やがん研究、免疫学の発展により、抗体医薬の作用機序や治療法が変化していることが挙げられる。例えば、二重特異性抗体や免疫チェックポイント阻害剤は、従来とは異なる作用機序で薬効を発揮する、次世代型抗体医薬として注目されている。したがって、今後は、作用メカニズムや治療法に合った最適な抗体フォーマットを開発していくことが重要になってくると考えられる。そこで本論文では、Ig フォールドを基盤にしたボトムアップ的手法により、がん領域での医療ニーズを充足する新規高機能抗体を創出することを目指し、関連する 3 つの研究を行い、第 1 章から第 3 章にそれぞれまとめた。

第 1 章では、2 種の抗体断片を連結して四量体型二重特異性抗体を構築するための新規会合ペプチドの開発について述べた。本研究で、新規会合ペプチドとして着目したのは、ヘテロ四量体を形成する L27A および L27B と名付けた 2 種のペプチドである。これらのペプチドはともに約 60 アミノ酸残基からなり、抗体ドメインの連結に用いられてきた既存の会合ペプチドの中でも特に短く、人工抗体の大腸菌での生産に適している。本研究では、これら 2 種類の L27 ペプチドを用いて、癌関連抗原 EGFR および NK 細胞表面抗原 CD16 に特異的な二重特異性抗体を作製した。以前に 2 種の L27 ペプチドを抗体と酵素にそれぞれ融合し、抗体酵素複合体の作製を試みた際には、目的としたヘテロ四量体ではなくほとんどがヘテロ二量体として得られた。しかし、今回、複合体の相互作用界面にジスルフィド結合を導入することで、2 種の L27 ペプチド融合抗体から成るヘテロ四量体を作製することに成功した。さらに、作製した四量体型二重特異性抗体は、

in vitro での細胞傷害性試験において、癌細胞と NK 細胞を架橋することにより抗腫瘍効果を発揮した。以上より、本手法は高機能人工抗体の微生物による安価かつ効率的な生産方法として有用であると考えた。

第 2 章では、新規サイトカイン融合抗体として、癌関連抗原 EGFR を標的とする単ドメイン抗体と TNF α からなる融合抗体を考案した。これまでサイトカイン融合抗体を構成する抗体断片の多くは、scFv や diabody といった Fv を基盤にした抗体断片であった。一方、本研究では、scFv に比べ分子量が小さく、大腸菌で発現しやすいという特徴を持つ単ドメイン抗体を用い、TNF α 融合タンパク質を構成した。具体的には、癌関連抗原 EGFR 特異的単ドメイン抗体と抗腫瘍活性を持つサイトカイン TNF α の融合タンパク質を設計し、大腸菌を用いた生産を試みた。その結果、融合抗体は大腸菌で可溶性タンパク質として発現し、大腸菌の培養上清から目的タンパク質を調製することができた。また、作製した融合抗体が標的癌細胞特異的な結合活性および TNF α の生物学的活性をともに有していた。以上のように、第 2 章では、本融合抗体に関する分子設計の有用性と癌治療薬としての可能性を示すことができた。

第 3 章では、癌を標的とした高機能人工抗体の基盤となる抗体の取得に向け、上皮増殖因子受容体(EGFR)特異的ラットモノクローナル抗体の作製を試みた。ラットに対し組換え EGFR タンパク質を免疫し、単離したリンパ球からハイブリドーマを作製した。スクリーニングの結果、がん細胞上の EGFR に特異的に結合する 2 種のクローンを取得することができた。また、エピトープ解析によって、各抗体のエピトープが既存の抗体医薬セツキシマブのエピトープとは重ならないことを明らかにした。以上の結果より、取得した 2 種の抗 EGFR 抗体はそれぞれ単独で抗体医薬に応用できる可能性を有しているだけでなく、高機能人工抗体の創製において、その機能単位として用いることができると考えた。

以上、本論文では、タンパク質ドメインを人工抗体構築のための機能単位と捉え、それらを組み合わせ、連結することにより、高機能人工抗体を創製した研究成果について述べてきた。こうしたタンパク質工学を駆使した高機能人工抗体構築の手法は、二重特異性抗体創出の大

きな原動力となり、次世代型抗体医薬の創製に大きく貢献してきた。現在、創薬研究において、がん領域は最も力が注がれている領域の 1 つで、がん治療の標的分子は徐々に拡大しつつあり、今後、がん治療における標的分子はさらに拡大すると予想される。したがって、高機能人工抗体の構築における機能ドメインの組み合わせはさらに広がりを見せられると思われ、第 1 章で述べたような機能ドメイン連結法の重要性は増すだろう。本研究では、第 1 章から第 3 章までの 3 つの研究を通して、癌を標的とする高機能人工抗体の創製に関して重要な知見を得ることができた。したがって、本研究成果はタンパク質工学の発展のみならず、抗体医薬品開発に大きく貢献していると考えている。

引用文献

1. Bello, C. and Sotomayor, E. M. (2007) Monoclonal antibodies for B-cell lymphomas: rituximab and beyond. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2007**, 233–242.
2. Hudis, C. A. (2007) Trastuzumab—mechanism of action and use in clinical practice. *N. Engl. J. Med.* **357**, 39–51.
3. Cheson, B. D. and Leonard, J. P. (2008) Monoclonal antibody therapy for B-cell non-Hodgkin's Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **359**, 613–626.
4. Strome S. E., Sausville E. A., and Mann, D. (2007) A mechanistic perspective of monoclonal antibodies in cancer therapy beyond target-related effects. *Oncologist* **12**, 1084–1095.
5. Multani, P. (2002) Development of radioimmunotherapy for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Int. J. Hematol.* **76**, 401–410.
6. Foyil, K. V. and Bartlett, N. L. (2010) Anti-CD30 Antibodies for Hodgkin lymphoma. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* **5**, 140–147.
7. Orita, T., Tsunoda, H., Yabuta, N., Nakano, K., Yoshino, T., Hirata, Y., Ohtomo, T., Nezu, J., Sakumoto, H., Ono, K., Saito, M., Kumagai, E., Nanami, M., Kaneko, A., Yoshikubo, T., and Tsuchiya, M. (2005) A novel therapeutic approach for thrombocytopenia by minibody agonist of the thrombopoietin receptor. *Blood* **105**, 562–566.
8. Falschlehner, C., Ganten, T. M., Koschny, R., Schaefer, U., and Walczak, H. (2009) TRAIL and other TRAIL receptor agonists as novel cancer therapeutics. *Adv. Exp. Med. Biol.* **647**, 195–206.
9. Callahan, M. K., Flaherty, C. R., and Postow, M., A. (2016) Checkpoint Blockade for the Treatment of Advanced Melanoma. *Cancer Treat. Res.* **167**, 231–250.

10. Hudson, P. J. (1999) Recombinant antibody constructs in cancer therapy. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 548–557.
11. Igney, F. H. and Krammer, P. H. (2002) Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J. Leukoc. Biol.* **71**, 907–920.
12. Raedler, L. A. (2015) Opdivo (Nivolumab): Second PD-1 Inhibitor Receives FDA Approval for Unresectable or Metastatic Melanoma. *Am. Health Drug Benefits* **8(Spec Feature)**, 180–183.
13. Cuesta, A. M., Sainz-Pastor, N., Bonet, J., Oliva, B., and Alvarez-Vallina, L. (2010) Multivalent antibodies: when design surpasses evolution. *Trends Biotechnol.* **28**, 355–362.
14. May, C., Sapra, P., and Gerber, H. P. (2012) Advances in bispecific biotherapeutics for the treatment of cancer. *Biochem. Pharmacol.* **84**, 1105–1112.
15. Bargou, R., Leo, E., Zugmaier, G., Klinger, M., Goebeler, M., Knop, S., Noppeney, R., Viardot, A., Hess, G., Schuler, M., Einsele, H., Brandl, C., Wolf, A., Kirchinger, P., Klappers, P., Schmidt, M., Riethmüller, G., Reinhardt, C., Baeuerle, P. A., and Kufer, P. (2008) Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science* **321**, 974–977.
16. Ridgway, J. B., Presta, L. G., and Carter, P. (1996) 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng.* **9**, 617–621.
17. Kontermann, R. E. (2012) Antibody-cytokine fusion proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **526**, 194–205.
18. Shields, R. L., Namenuk, A. K., Hong, K., Meng, Y. G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., Fox, J. A., and Presta, L. G. (2001) High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J. Biol. Chem.* **276**,

6591–6604.

19. Niwa, R., Sakurada, M., Kobayashi, Y., Uehara, A., Matsushima, K., Ueda, R., Nakamura, K., and Shitara, K. (2005) Enhanced natural killer cell binding and activation by low-fucose IgG1 antibody results in potent antibody-dependent cellular cytotoxicity induction at lower antigen density. *Clin. Cancer Res.* **11**, 2327–2336.
20. Garnett, M. C., Embleton, M. J., Jacobs, E., and Baldwin, R. W. (1983) Preparation and properties of a drug-carrier-antibody conjugate showing selective antibody-directed cytotoxicity *in vitro*. *Int. J. Cancer* **31**, 661–670.
21. Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S., and Winter, G. (1986) Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* **321**, 522–555.
22. Campbell, J., Lowe, D., and Sleeman, M. A. (2011) Developing the next generation of monoclonal antibodies for the treatment of rheumatoid arthritis. *Br. J. Pharmacol.* **162**, 1470–1484.
23. Tassev, D. V. and Cheung, N. K. (2009) Monoclonal antibody therapies for solid tumors. *Expert Opin. Biol. Ther.* **9**, 341–353.
24. Boder, E. T. and Jiang, W. (2011) Engineering antibodies for cancer therapy. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2**, 53–75.
25. Chames, P. and Baty, D. (2009) Bispecific antibodies for cancer therapy: the light at the end of the tunnel? *MAbs* **1**, 539–547.
26. Choudhary, S., Mathew, M., and Verma, R. S. (2011) Therapeutic potential of anticancer immunotoxins. *Drug. Discov. Today* **16**, 495–503.
27. List, T. and Neri, D. (2013) Immunocytokines: a review of molecules in clinical development for cancer therapy. *Clin. Pharmacol.* **5**, 29–45.

28. Zimmerman, Z., Maniar, T., and Nagorsen, D. (2015) Unleashing the clinical power of T cells: CD19/CD3 bi-specific T cell engager (BiTE®) antibody construct blinatumomab as a potential therapy. *Int. Immunol.* **27**, 31–37.
29. Lameris, R., de Bruin, R. C., Schneiders, F. L., van Bergen En Henegouwen, P. M., Verheul, H. M., de Gruijl, T. D., and van der Vliet, H. J. (2014) Bispecific antibody platforms for cancer immunotherapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **92**, 153–165.
30. Jakob, C. G., Edalji, R., Judge, R. A., DiGiammarino, E., Li, Y., Gu, J., and Ghayur, T. (2013) Structure reveals function of the dual variable domain immunoglobulin (DVD-Ig™) molecule. *MAbs* **5**, 358–363.
31. Kostelny, S. A., Cole, M. S., and Tso, J. Y. (1992) Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. *J. Immunol.* **148**, 1547–1553.
32. Zhu, X., Wang, L., Liu, R., Flutter, B., Li, S., Ding, J., Tao, H., Liu, C., Sun, M., and Gao, B. (2010) COMBODY: one-domain antibody multimer with improved avidity. *Immunol. Cell Biol.* **88**, 667–675.
33. Rossi, E. A., Goldenberg, D. M., and Chang, C. H. (2012) The dock-and-lock method combines recombinant engineering with site-specific covalent conjugation to generate multifunctional structures. *Bioconjug. Chem.* **23**, 309–323.
34. Asano, R., Nakayama, M., Kawaguchi, H., Kubota, T., Nakanishi, T., Umetsu, M., Hayashi, H., Katayose, Y., Unno, M., Kudo, T., and Kumagai, I. (2012) Construction and humanization of a functional bispecific EGFR × CD16 diabody using a refolding system. *FEBS J.* **279**, 223–233.
35. Kubetzko, S., Balic, E., Waibel, R., Zangemeister-Wittke, U., and Plückthun, A. (2006) PEGylation and multimerization of the anti-p185^{HER-2} single chain Fv fragment 4D5: effects on tumor targeting. *J. Biol. Chem.* **281**, 35186–35201.

36. Lee, S., Fan, S., Makarova, O., Straight, S., and Margolis, B. (2002) A novel and conserved protein-protein interaction domain of mammalian Lin-2/CASK binds and recruits SAP97 to the lateral surface of epithelia. *Mol. Cell Biol.* **22**, 1778–1791.
37. Roh, M. H., Makarova, O., Liu, C. J., Shin, K., Lee, S., Laurinec, S., Goyal, M., Wiggins, R., and Margolis, B. (2002) The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost. *J. Cell Biol.* **157**, 161–172.
38. Li, Y., Karnak, D., Demeler, B., Margolis, B., and Lavie, A. (2004) Structural basis for L27 domain-mediated assembly of signaling and cell polarity complexes. *EMBO J.* **23**, 2723–2733.
39. Doerks, T., Bork, P., Kamberov, E., Makarova, O., Muecke, S., and Margolis, B. (2000) L27, a novel heterodimerization domain in receptor targeting proteins Lin-2 and Lin-7. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 317–318.
40. Feng, W., Long, J. F., Fan, J. S., Suetake, T., and Zhang, M. (2004) The tetrameric L27 domain complex as an organization platform for supramolecular assemblies. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 475–80.
41. Feng, W., Long, J. F., and Zhang, M. (2005) A unified assembly mode revealed by the structures of tetrameric L27 domain complexes formed by mLin-2/mLin-7 and Patj/Pals1 scaffold proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 6861–6866.
42. Roovers, R. C., Laeremans, T., Huang, L., De Taeye, S., Verkleij, A. J., Revets, H., de Haard, H. J., and van Bergen en Henegouwen, P. M. (2007) Efficient inhibition of EGFR signaling and of tumour growth by antagonistic anti-EFGR Nanobodies. *Cancer Immunol. Immunother.* **56**, 303–317.
43. Behar, G., Sibénil, S., Groulet, A., Chames, P., Pugnière, M., Boix, C., Sautès-Fridman, C., Teillaud, J. L., and Baty, D. (2008) Isolation and characterization of anti-FcγRIII

- (CD16) llama single-domain antibodies that activate natural killer cells. *Protein Eng. Des. Sel.* **21**, 1–10.
44. Nakadate, Y., Kodera, Y., Kitamura, Y., Shirasawa, S., Tachibana, T., Tamura, T., and Koizumi, F. (2014) KRAS mutation confers resistance to antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against human colorectal cancer cells. *Int. J. Cancer* **134**, 2146–2155.
 45. Miyazaki, J., Takaki, S., Araki, K., Tashiro, F., Tominaga, A., Takatsu, K., and Yamamura, K. (1989) Expression vector system based on the chicken beta-actin promoter directs efficient production of interleukin-5. *Gene* **79**, 269–277.
 46. Asano, R., Ikoma, K., Kawaguchi, H., Ishiyama, Y., Nakanishi, T., Umetsu, M., Hayashi, H., Katayose, Y., Unno, M., Kudo, T., and Kumagai, I. (2010) Application of the Fc fusion format to generate tag-free bi-specific diabodies. *FEBS J.* **277**, 477–487.
 47. Sowdhamini, R., Srinivasan, N., Shoichet, B., Santi, D. V., Ramakrishnan, C., and Balaram, P. (1989) Stereochemical modeling of disulfide bridges. Criteria for introduction into proteins by site-directed mutagenesis. *Protein Eng.* **3**, 95–103.
 48. Shishido, T., Azumi, Y., Nakanishi, T., Umetsu, M., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., and Kondo, A. (2009) Biotinylated bionanocapsules for displaying diverse ligands toward cell-specific delivery. *J. Biochem.* **146**, 867–874.
 49. Els Conrath, K., Lauwereys, M., Wyns, L., and Muyldermans, S. (2001) Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs. *J. Biol. Chem.* **276**, 7346–7350.
 50. Arbabi-Ghahroudi, M., Desmyter, A., Wyns, L., Hamers, R., and Muyldermans, S. (1997) Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett.* **414**, 521–526.

51. Bell, A., Wang, Z. J., Arbabi-Ghahroudi, M., Chang, T. A., Durocher, Y., Trojahn, U., Baardsnes, J., Jaramillo, M. L., Li, S., Baral, T. N., O'Connor-McCourt, M., Mackenzie, R., and Zhang, J. (2010) Differential tumor-targeting abilities of three single-domain antibody formats. *Cancer Lett.* **289**, 81–90.
52. Deyev, S. M., Waibel, R., Lebedenko, E. N., Schubiger, A. P., and Plückthun, A. (2003) Design of multivalent complexes using the barnase·barstar module. *Nat. Biotechnol.* **21**, 1486–1492.
53. Kazane, S. A., Axup, J. Y., Kim, C. H., Ciobanu, M., Wold, E. D., Barluenga, S., Hutchins, B. A., Schultz, P. G., Winssinger, N., and Smider, V. V. (2013) Self-assembled antibody multimers through peptide nucleic acid conjugation. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 340–346.
54. Müller, K. M., Arndt, K. M., Strittmatter, W., and Plückthun, A. (1998) The first constant domain (C_H1 and C_L) of an antibody used as heterodimerization domain for bispecific miniantibodies. *FEBS Lett.* **422**, 259–264.
55. Seifert, O., Plappert, A., Heidel, N., Fellermeier, S., Messerschmidt, S. K., Richter, F., and Kontermann, R. E. (2012) The IgM C_H2 domain as covalently linked homodimerization module for the generation of fusion proteins with dual specificity. *Protein Eng. Des. Sel.* **25**, 603–612.
56. Asano, R., Kumagai, T., Nagai, K., Taki, S., Shimomura, I., Arai, K., Ogata, H., Okada, M., Hayasaka, F., Sanada, H., Nakanishi, T., Karvonen, T., Hayashi, H., Katayose, Y., Unno, M., Kudo, T., Umetsu, M., and Kumagai, I. (2013) Domain order of a bispecific diabody dramatically enhances its antitumor activity beyond structural format conversion: the case of the hEx3 diabody. *Protein Eng. Des. Sel.* **26**, 359–367.
57. Holliger, P. and Hudson, P. J. (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1126–1136.

58. Reusch, U., Burkhardt, C., Fucek, I., Le Gall, F., Le Gall, M., Hoffmann, K., Knackmuss, S. H., Kiprijanov, S., Little, M., and Zhukovsky, E. A. (2014) A novel tetravalent bispecific TandAb (CD30/CD16A) efficiently recruits NK cells for the lysis of CD30⁺ tumor cells. *MAbs* **6**, 728–739.
59. Koene, H. R., Kleijer, M., Algra, J., Roos, D., von dem Borne, A. E., and de Haas, M. (1997) Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood* **90**, 1109–1114.
60. Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., and Watier, H. (2002) Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene. *Blood* **99**, 754–758.
61. Weng, W. K. and Levy, R. (2003) Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **21**, 3940–3947.
62. Musolino, A., Naldi, N., Bortesi, B., Pezzuolo, D., Capelletti, M., Missale, G., Laccabue, D., Zerbini, A., Camisa, R., Bisagni, G., Neri, T. M., and Ardizzoni, A. (2008) Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**, 1789–1796.
63. Turini, M., Chames, P., Bruhns, P., Baty, D., and Kerfelec, B. (2014) A FcγRIII-engaging bispecific antibody expands the range of HER2-expressing breast tumors eligible to antibody therapy. *Oncotarget* **5**, 5304–5319.
64. Bremer, E. (2013) Targeting of the tumor necrosis factor receptor superfamily for cancer immunotherapy. *ISRN Oncol.* **2013**, 371854.

65. Dranoff, G. (2004) About the author Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 11–22.
66. List, T. and Neri, D. (2013) Immunocytokines: a review of molecules in clinical development for cancer therapy. *Clin. Pharmacol.* **20**, 29–45.
67. Osaki, T., Fujisawa, S., Kitaguchi, M., Kitamura, M., and Nakanishi, T. (2015) Development of a bispecific antibody tetramerized through hetero-associating peptides. *FEBS J.* **282**, 4389–4401.
68. Garcin, G., Paul, F., Staufenbiel, M., Bordat, Y., Van der Heyden, J., Wilmes, S., Cartron, G., Apparailly, F., De Koker, S., Piehler, J., Tavernier, J., and Uzé, G. (2014) High efficiency cell-specific targeting of cytokine activity. *Nat. Commun.* **5**, 3016.
69. Lienard, D., Ewalenko, P., Delmotte, J. J., Renard, N., and Lejeune, F. J. (1992) High-dose recombinant tumor necrosis factor alpha in combination with interferon gamma and melphalan in isolation perfusion of the limbs for melanoma and sarcoma. *J. Clin. Oncol.* **10**, 52–60.
70. Rosenblum, M. G., Horn, S. A., and Cheung, L. H. (2000) A novel recombinant fusion toxin targeting HER-2/NEU-over-expressing cells and containing human tumor necrosis factor. *Int. J. Cancer* **88**, 267–273.
71. Hoffmann, M., Schmidt, M., and Wels, W. (1998) Activation of EGF receptor family members suppresses the cytotoxic effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cancer Immunol. Immunother.* **47**, 167–175.
72. Liu, Y., Cheung, L. H., Marks, J. W., and Rosenblum, M. G. (2004) Recombinant single-chain antibody fusion construct targeting human melanoma cells and containing tumor necrosis factor. *Int. J. Cancer* **108**, 549–557.
73. Fischer, N. and Léger, O. (2007) Bispecific antibodies: molecules that enable novel

therapeutic strategies, *Pathobiology* **74**, 3–14.

74. Borsi, L., Balza, E., Carnemolla, B., Sassi, F., Castellani, P., Berndt, A., Kosmehl, H., Biro, A., Siri, A., Orecchia, P., Grassi, J., Neri, D., and Zardi, L. (2003) Selective targeted delivery of TNF α to tumor blood vessels. *Blood* **102**, 4384–4392.
75. Ferguson, K. M., Berger, M. B., Mendrola, J. M., Cho, H. S., Leahy, D. J., and Lemmon, M. A. (2003) EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol. Cell* **11**, 507–517.
76. Yarden, Y. and Sliwkowski, M. X. (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 127–137.
77. Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M. R., Carotenuto, A., De Feo, G., Caponigro, F., and Salomon, D. S. (2006) Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* **366**, 2–16.
78. Ferris, R. L., Jaffee, E. M., and Ferrone, S. (2010) Tumor antigen-targeted, monoclonal antibody-based immunotherapy: clinical response, cellular immunity, and immuneescape. *J. Clin. Oncol.* **28**, 4390–4399.
79. Vlacich, G. and Coffey, R. J. (2011) Resistance to EGFR-targeted therapy: a family affair. *Cancer Cell* **20**, 423–425.
80. Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, C., Chau, I., and Van Cutsem, E. (2004) Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **22**, 337–345.
81. Kishiro, Y., Kagawa, M., Naito, I., and Sado, Y. (1995) A novel method of preparing rat-monoclonal antibody producing hybridomas by using rat medial iliac lymph node cells. *Cell Struct. Funct.* **20**, 151–156.

82. Boulianne, G. L., Hozumi, N., and Shulman, M. J. (1984) Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature* **312**, 643–646.
83. Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S., and Winter, G. (1986) Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* **321**, 522–555.
84. Hackel, B. J., Neil, J. R., White, F. M., and Wittrup, K. D. (2012) Epidermal growth factor receptor downregulation by small heterodimeric binding proteins. *Protein Eng. Des. Sel.* **25**, 47–57.
85. Roovers, R. C., Vosjan, M. J., Laeremans, T., el Khoulati, R., de Bruin, R. C., Ferguson, K. M., Verkleij, A. J., van Dongen, G. A., and van Bergen en Henegouwen, P. M. (2011) A biparatopic anti-EGFR nanobody efficiently inhibits solid tumour growth. *Int. J. Cancer* **129**, 2013–2024.
86. Boersma, Y. L., Chao, G., Steiner, D., Wittrup, K. D., and Plückthun, A. (2011) Bispecific designed ankyrin repeat proteins (DARPs) targeting epidermal growth factor receptor inhibit A431 cell proliferation and receptor recycling. *J. Biol. Chem.* **286**, 41273–41285.

論文リスト

1. 第1章

Tomohiro Osaki, Shingo Fujisawa, Masahiro Kitaguchi, Masaya Kitamura, and Takeshi Nakanishi. Development of a bispecific antibody tetramerized through hetero-associating peptides. *The FEBS Journal*, **282** (22), 4389–4401, November 2015.

2. 第2章

大水 貴裕, 大崎 智弘, 青木 基, 北村 昌也, 中西 猛. 大腸菌発現系による TNF α 融合抗体の作製. BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会) オンラインプログラム要旨集, 3P0865, December 2015.

3. 第3章

Tomohiro Osaki, Cai-Xia Wang, Taro Tachibana, Masayuki Azuma, Masaya Kitamura, and Takeshi Nakanishi. Generation and characterization of rat monoclonal antibodies against epidermal growth factor receptor. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*, **34** (6), 418–422, December 2015.

謝辞

本論文の執筆にあたっては、大変多くの方々にお世話になりました。大阪市立大学大学院工学研究科教授・北村昌也博士には、今日に至るまで長きに渡ってご指導、ご鞭撻いただきました。大阪市立大学大学院工学研究科教授・田辺利住博士および同教授・長崎健博士には、本論文の執筆にあたり、大変有意義なご助言をいただきました。大阪市立大学大学院工学研究科講師・中西猛博士には、本研究を進めるにあたり、直接、ご指導いただき、本論文の執筆に関しても全面的にお世話になりました。大阪市立大学大学院工学研究科准教授・立花太郎博士には、研究を進めるにあたって大変有意義なご助言をいただきました。大阪市立大学技術職員の下中智美さんには質量分析を行っていただきました。北村研 OB の藤澤真吾さん、北口将大君、青木基君には共同研究者として本研究の基礎となる多くの成果を出していただきました。大阪市立大学大学院工学研究科修士 2 年の西浦大祐君と大水貴裕君、同修士 1 年の王彩霞さんの 3 人には非常に多くの実験を手伝っていただきました。また、キシダ化学株式会社研究開発部リーダー・小山幸一氏をはじめとする同社研究開発部の皆様には、この 1 年間、多大なるご支援ご協力を賜りました。以上の方々に心より感謝申し上げます。

最後に、家族や友人を含め、これまで私の研究生活を支えてくださった全ての方に心より感謝し、本論文を終わらせていただきます。

2016 年 3 月

大崎 智弘