The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	EphA10/CD3を標的とするBispecific抗体の創製と抗腫瘍活性の増強に向けた分子設計に関する研究
Author(s)	瀧, 慎太郎
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/52248
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　瀧　慎太郎　）	
論文題名	EphA10/CD3を標的とするBispecific抗体の創製と 抗腫瘍活性の増強に向けた分子設計に関する研究

論文内容の要旨

現在、モノクローナル抗体（mAb）をもとにした抗体医薬の開発が加速しており、特にがん治療の領域においては、多くの抗体医薬が実用化されている。しかし、標的抗原の発現レベルや患者の免疫力等の個体差によって、十分な作用を発揮できないケースも多く認められており、このような既存薬抵抗性の難治性がん患者にも有効な、高機能抗体医薬の開発が待望されている。本観点から近年、2種の異なる抗原を同時に標的可能な改変抗体であるBispecific抗体（BsAb）が開発され、次世代の抗体医薬として大きな期待が寄せられている。例えば、がん関連抗原とT細胞抗原CD3を標的とするBsAbは、がん組織周辺に活性化T細胞をリクルートすること、および両抗原を架橋することで免疫機能を効率よく賦活化するimmuno-modulatorとして働き、強力な抗腫瘍作用を誘導できる。しかし、生体内における有効性と安全性を担保できるBsAbの設計・最適化に関する理論は未成熟であり、その詳細な作用メカニズムの解明を含め、BsAb創製のための各種技術の確立や基盤情報の集積が求められている。

これまでに著者らのグループでは、新規乳がん関連膜タンパク質としてEph Receptor A10（EphA10）を同定し、HER2やホルモン受容体がいずれも陰性で難治性のTriple Negative 乳がんの創薬ターゲットとして有望であることを明らかにしてきた。さらに、EphA10を標的とするmAbを取得し、抗体医薬のシーズとしての可能性も示してきた。そこで本研究では、EphA10を標的とする次世代型抗体医薬の創製を念頭に、EphA10とCD3を標的とするBsAbの創製と最適化を行うこと、さらに、それらを通じて、次世代型抗体医薬として有望なBsAbの分子設計に資する基盤情報を集積することを目的として検討を実施した。

本研究では、現在、がん治療用のBsAbとして主に開発が進められている2種の低分子フォーマット（tandem scFv; taFv, single-chain Diabody; scDb）に着目し、抗腫瘍活性を増強し得るフォーマットの探索を試みた。まず、クローニングにより取得したヒトEphA10およびヒトCD3に対する抗体遺伝子をもとに、taFv, scDbの発現ベクターを構築し、哺乳類発現系によりBsAbを調製した。物性解析の結果、いずれのフォーマットにおいても、monomerに加え、dimerを形成することが判明した。このような多量体化分子も医薬品の候補であり、有益な知見になり得ることから、monomerのみならずdimerにも着目し、*in vitro, in vivo*における活性評価を実施した。*In vitro*での検討の結果、調製したBsAbは、いずれもEphA10高発現がん細胞株に対してヒト末梢血単核球（PBMC）共存下で特異的な傷害活性を誘導すること、そして、scDbはmonomer, dimerともに、taFvよりも強力な傷害活性を発揮することが判明した。さらに、ヒト腫瘍ゼノグラフトマウスを用いた*in vivo*治療実験においても、BsAbの優れた抗腫瘍効果が示され、*in vitro*において示された細胞傷害活性との相関が認められた。特に、scDbのmonomerは、dimerよりも*in vivo*で優れた抗腫瘍効果を発揮し、さらに従来のIgG型フォーマットのmAbを上回る治療効果を発揮した。一般に、多量体化分子では、体内半減期の延長や標的分子に対する親和性の向上が見込まれるため、BsAbの高機能化に繋がる場合が多いが、本研究で創製したscDbでは、monomerの方が高活性であることが判明し、フォーマット固有の特性が抗腫瘍活性の増強に寄与する新たな要因になることが示唆された。

そこで次に、フォーマットの違いが抗腫瘍活性の増強に及ぼす影響を、誘導されるTh1/Th2サイトカインのプロファイル、およびBsAbの物性　（両抗原への結合特性および抗体自身の熱安定性）の観点から検討した。その結果、ターゲット細胞の存在下において特異的に、Th1サイトカインであるIFN-γ・IL-2・TNF-αの産生誘導が認められ、また、フォーマットの違いがサイトカインプロファイルに影響することが示された。特に、scDbのmonomerは、他のフォーマットと比較し、IL-2の顕著な産生増強を誘導することが判明し、$CD8^+$ T細胞などのエフェクターT細胞の活性化をより効率的に誘導する可能性が示された。また、BsAbの物性評価の結果、フォーマットの違いは、両抗原に対する結合活性には殆ど影響しない一方、taFvよりもscDbの方が熱安定性に優れており、この熱安定性が、抗腫瘍活性の増強に寄与していることが示された。

以上の研究結果から、難治性乳がんに対する次世代の抗体医薬として、EphA10/CD3を標的とする新規BsAbの創製と、それによる治療コンセプトの有用性を明らかにすることができた。加えて、①ターゲット細胞依存的に細胞傷害活性を誘導するサイトカインプロファイルを調整すること、および②両抗原に対する結合特性を保持した上で高い熱安定性を保持することの2つの要因が、scDbフォーマットが発揮する優れた抗腫瘍活性に寄与していることを明らかにした。従来のmAbでは、抗原に対して高い親和性を持つ抗体の取得が重要視されてきたが、BsAbのような新規機能を持つ抗体医薬の分子設計においては、親和性のみならず、上述のフォーマット固有の特性（サイトカイン産生の誘導プロファイル、熱安定性など）を加味することが重要であることが明らかとなった。今回得られた情報については、今後より多種類の抗体を用いて一般化することが重要であり、本研究では未検討の要因（*in vivo*の特性や構造生物学的特性など）を含め、詳細な解析が必要である。本研究で明らかにした知見を一つの足掛かりとして、今後BsAbの特性と機能との連関に関するさらなる機能解析を進める中で、次世代の抗体医薬としての実用化に向けた基盤技術が確立されることを期待したい。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　瀧　慎太郎　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教 授	角田　慎一
	副 査　教 授	中川　晋作
	副 査　教 授	辻川　和丈

論文審査の結果の要旨

本博士論文では、難治性乳がんの新規創薬ターゲットとして期待される膜タンパク質、Eph Receptor A10 (EphA10)に対する新規抗体医薬の開発を目的に、次世代型抗体医薬のフォーマットとして有望なBispecific抗体 (BsAb)に着目し、EphA10およびT細胞抗原CD3を標的とする新規BsAbの創製と最適化が試みられた。さらに、創製したBsAbについて、in vitro, in vivoにおける詳細な機能評価および特性評価を行うことを通して、BsAbの分子設計に有用な基盤情報の集積が図られた。これら一連の研究により、以下の結論が得られている。

1. EphA10およびCD3を認識するtandem scFv; taFvフォーマット・single-chain Diabody; scDbフォーマットのBsAbを設計・作製することに成功した。また、両BsAbは、in vitroならびにin vivoにおいて、EphA10特異的な抗腫瘍活性を誘導できることが明らかとなり、EphA10を標的とする次世代の抗体医薬としての可能性が示された。

2. 上記2種類のBsAbは、いずれも同一のエピトープを認識する分子であるにもかかわらず、scDbフォーマットはtaFvフォーマットよりも強力な抗腫瘍活性を発揮することを見出した。

3. 同じエピトープを認識する上記2種類のBsAbにおいて、分子フォーマットの違いが抗腫瘍活性に影響を与えた要因を解析した結果、taFvフォーマットと比較して、scDbフォーマットでは熱安定性が向上し、抗原に対する結合安定性が高まったことでin vitroの細胞傷害活性の向上につながっていることが示唆された。

現在、モノクローナル抗体を基にした抗体医薬の開発が加速しており、特にがん治療の領域においては、多くの抗体医薬が実用化されつつある。しかし、標的抗原の発現レベルや患者の免疫力等の個体差によって、十分な作用を発揮できないケースが多く認められており、既存薬に抵抗性の難治性がんに有効な次世代型の抗体医薬の開発が待望されている。

本研究では、難治性乳がんに対する創薬ターゲットとして有望なEphA10を標的とした新規BsAb (EphA10/CD3)を創製し、次世代の抗体医薬候補としての可能性を明らかにした。また、BsAb (EphA10/CD3)に関する各種特性評価の検討を通して、BsAbの分子設計・最適化のための基盤情報となりうる知見が得られた。以上、本研究は、創薬研究をはじめ、薬学、生命科学等において有意義で興味深いものであり、博士(薬科学)の学位を授与するにふさわしいものと考えられる。