

## 学位論文題名

## 抗体工学的手法を用いたヒト悪性脳腫瘍治療薬に関する研究

## 学位論文内容の要旨

ヒト腫瘍細胞に特異的に結合するマウスモノクローナル抗体を腫瘍特異的な抗腫瘍薬として応用する場合、いくつかの問題点が存在する。マウスモノクローナル抗体はヒトにおいて強い抗原性を示し、ヒトへの連続投与が制限される。さらに、ヒトにおいて抗体依存性細胞傷害活性を誘導することができず、抗腫瘍活性を誘導するためには植物・細菌由来の毒素ならびに放射同位元素を融合させる必要が生じるが、その場合分子量の大きさにより腫瘍組織内部への浸透性の低さが問題となる。そこで本研究ではヒト髄芽腫ならびにグリオーマ細胞に特異的に結合するマウスモノクローナル抗体 ONS-M21 のヒト髄芽腫ならびにグリオーマ治療薬への応用を目的に、抗体工学的手法を用いて抗体の改変を行い、*in vitro* 実験により臨床応用の可能性を検討した。

マウスモノクローナル抗体のヒトにおける抗原性を減弱させるためにマウス ONS-M21 抗体を抗原認識部位 (CDR) をヒト抗体上に移植する CDR-グラフティング法を用いてヒト型化を行った。抗体のヒト型化において、ヒト型化の際の鋳型として用いるヒト抗体の選択ならびに抗原結合部位の再構築に必要な不可欠なフレームワーク (FR) のアミノ酸残基の同定が最も重要である。鋳型となるヒト抗体は相同性の高さや CDR のサイズに加え、CDR ループの保持に重要なカノニカル残基、重鎖可変領域 ( $V_H$ ) と軽鎖可変領域 ( $V_L$ ) の分子介合に重要なアミノ酸残基がより保存されているものを選択することが可能である。また、機能的な抗原結合部位の再構築の際に必要な不可欠なマウス FR 中のアミノ酸残基については抗体により異なっており、その同定がヒト型化の成功の可否を担っている。ONS-M21 抗体  $V_H$  領域のヒト型化においては、FR1、2 及び 3 についてはヒト抗体 EU のものを、FR4 についてはヒト抗体 ND の FR を鋳型として使い、H 鎖 CDR1 ループのカノニカル残基である 27、28、29、30 及び 94 位のアミノ酸を保持することで、マウス抗体と同等の抗原結合活性を示した。一方、 $V_L$  領域についてはその相同性の高さよりヒト抗体 REI を鋳型として使い、ヒト型化を行った。初めに、抗原結合部位の形成に影響ある可能性のある残基として、20、21、71、73 ならびに 87 位のアミノ酸残基に注目したものの、それらの置換では機能的な抗原結合部位を再構築できなかった。そこで、どのマウス FR に抗原結合部位の形成に必要な不可欠なアミノ酸残基が含まれているのかを明らかにするために、マウス抗体とヒト型化抗体からなる 2 種のハイブリッド可変領域を構築した。ハイブリッド可変領域を用いた検討の結果より、マウス FR1 と FR2 のいずれか一方または両方に重要なアミノ酸残基が含まれていることが明らかになり、さらに数種のバージョンを設計した。抗原結合能を検討した

結果、FR2 の 46 位の Pro の一アミノ酸残基が機能的な抗原結合部位の形成に必須なアミノ酸残基であることが明らかとなり、最終的にはマウス ONS-M21 抗体と同等の抗原結合活性を示すヒト型化 ONS-M21 抗体の構築に成功した。以上の結果より、ハイブリッド可変領域を用いた手法は、ヒト型化が困難な抗体において機能的な抗原結合部位の再構築に必要な不可欠なアミノ酸残基の同定に有用であると考えられた。

続いてキャリアー分子としての可能性を明らかにするために、ヒト型化 ONS-M21 抗体を基に、一本鎖抗体 (schM21) を構築し、さらにリシン A 毒素と結合させたイムノトキシンを用い、腫瘍細胞内へ取り込まれるか検討した。SchM21 は大腸菌を用いて分泌発現させ、一段階のアフィニティー精製により容易に調製できた。精製した schM21 はヒト髄芽腫細胞株 ONS-76 細胞に結合し、その結合活性はヒト型化 ONS-M21 抗体 Fab 断片と同等であったことより、元の抗体と同等のアフィニティーを持つ一本鎖抗体の構築に成功した。さらに、リシン A 毒素を結合させたイムノトキシンは抗原を発現している ONS-76 細胞の増殖のみを阻害したのに対し、抗原を発現していない HuH-7 細胞に対しては全く影響を与えなかったことより、schM21 は細胞表面の抗原に結合した後、細胞内へ取り込まれることが示された。従って、schM21 は脳腫瘍の診断薬、あるいは治療薬のキャリアー分子としての利用が期待される。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 前 出 吉 光  
副 査 教 授 小 沼 操  
副 査 教 授 渡 邊 智 正  
副 査 助 教 授 杉 本 千 尋

### 学 位 論 文 題 名

## 抗体工学的手法を用いたヒト悪性脳腫瘍治療薬に関する研究

本論文はヒト髄芽腫ならびにグリオーマ細胞に特異的に結合するマウスモノクローナル抗体のヒト悪性脳腫瘍治療薬への応用を目的に、抗体工学的手法を用いて抗体の改変を行い、臨床応用の可能性を検討したものである。

最初に、マウスモノクローナル抗体のヒトにおける抗原性を減弱させるためにマウス抗体の抗原認識部位（CDR）をヒト抗体上に移植するCDRグラフトイング法を用いてヒト型化を行った。H鎖のヒト型化においては、ヒト抗体を鋳型として用い、H鎖CDR1ループのカノニカル残基である27、28、29、30及び94位のアミノ酸残基を保持することで、マウス抗体と同等の抗原結合活性を示した。また、L鎖のヒト型化においては、ヒト抗体を鋳型として用い、46位の1アミノ酸残基のみを保持することでマウス抗体と同等の抗原結合活性を示すヒト型化抗体の構築に成功した。構築したヒト型化抗体はマウス抗体と同一のエピトープ領域を認識し、かつ同等の抗原結合活性を示した。次いで、同抗体の抗腫瘍剤等のキャリアー分子としての可能性を明らかにするために、ヒト型化抗体を基に一本鎖抗体を構築した。一本鎖抗体はH鎖可変領域とL鎖可変領域をそれぞれ15アミノ酸残基からなるペプチドリンカーで連結させることで構築した。作成した一本鎖抗体は抗原結合部位が一価になったことによる抗原結合活性の低下が認められたものの、ヒト型化抗体と同等のアフィニティーを示した。この一本鎖抗体とリシンA鎖を結合させた一本鎖抗体イムノトキシンは抗原を発現するヒト髄芽腫細胞にのみ特異的に細胞傷害活性を示し、抗原を発現しないヒトヘパトーマ細胞では全く細胞傷害活性が認められなかった。

以上の研究成果は、マウスモノクローナル抗体のヒト型化抗体及びヒト型化一本鎖抗体はヒトへの頻回投与が可能であり、ヒト悪性脳腫瘍に対する体内診断薬、ならびに新規な治療薬となる可能性が高いことを示しており、学術的価値が大きい。よって審査委

員一同、大友俊彦氏は、博士（獣医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。