

## 学位論文の要旨

氏名

前田 政敏

学位論文題目

免疫応答制御のためのファージライブラリによる補助刺激分子特異的ヒト抗体の開発

本論文は、免疫応答の抗体フラグメントによる制御を目的に、補助刺激分子CD86及びB7RP-1を標的とした抗体分子の開発及び細胞表面レセプターに対する抗体分子の機能解析を行い、それについてまとめたものである。本論文は、以下の6章から成り立っている。

第1章では、補助刺激分子(CD86, B7RP-1)と免疫疾患との関連性を示し、CD86, B7RP-1をターゲットとした治療法の開発戦略について述べた。CD86 (別名: B7-1)は細胞表面分子CD28及びCTLA-4と結合し、またB7RP-1 (B7 related protein-1, 別名: B7-H2) は、細胞表面分子ICOS (Inducible costimulator) と結合し、免疫応答を調整する補助刺激分子である。近年、この分子の免疫調整異常が様々な免疫疾患に関わっていることが報告され、これらの疾患を治療するための非常に有効な標的分子となる。

第2章では、本研究の要となるヒト一本鎖抗体 (scFv) ファージライブラリについて述べた。Milsteinらによってハイブリドーマ技術を用いたモノクローナル抗体作成法が確立されて以降、抗体医薬は、ガン、感染症、アレルギーなどの疾患領域における新たな医薬品として注目を集めている。その背景には、実用化における最大の障害、マウス由来のモノクローナル抗体のヒトにおける免疫原性の解決に向けた近年の目覚ましい技術革新がある。その技術として、ヒト抗体遺伝子群をマウスに移入したトランスクロモマウス及びヒト抗体ファージライブラリが報告されている。

第3章では、ヒト一本鎖抗体ファージライブラリからCD86に依存した免疫疾患の治療に応用できるヒト抗体の単離を試みた。そのため、CD86に特異的に結合するヒト抗体のスクリーニングを行った。ヒトCD86タンパク質をターゲットとして抗体ファージライブラリから選別を行い、4種類のヒトCD86特異的ヒト抗体分子を単離した。これらの抗体は、CD86を介したT細胞増殖を濃度依存的に抑制した。また抗体の発現量及び安定性の向上のため、maltose binding protein (MBP)との融合発現を行った。MBP融合発現抗CD86抗体の1つは、CD86を介したT細胞増殖を濃度依存的に抑制した。

第4章では、ヒト一本鎖抗体ファージライブラリからB7RP-1に依存した免疫疾患の治療に応用できるヒト抗体の単離を試みた。そのため、B7RP-1に特異的に結合するヒト抗体のスクリーニングを行った。ヒトB7RP-1タンパク質をターゲットとして抗体ファージライブラリから選別を行い、4種類のヒトB7RP-1特異的ヒト抗体分子を単離した。さらに、これらの抗体の性状について解析した。単離した4種類の抗体の内3種類は、B7RP-1/ICOS間の結合を濃度依存的に阻害し、B7RP-1を介した抗原特異的なT細胞免疫応答を抑制した。さらに、これらの抗体は、移植免疫モデルである混合リンパ球応答試験において、同種異系に対するT細胞免疫応答を抑制した。

第5章では、これらの抗体がB7RP-1を介した免疫応答を抑制したため、scFv抗体の臨床への応用を考え、ポリエチレングリコール (PEG) またはヒト型糖鎖を抗体に修飾することによる安定性向上を試み、その機能を解析した。本研究で作製したPEG化及び糖鎖修飾scFv抗体は、抗原に対する結合活性を保持したまま安定性が向上した。そのため、FabやIgG抗体への改変なしに臨床への早期利用が可能になるかもしれない。

第6章では、以上の結果を総括し、B7RP-1依存的免疫疾患の制御法開発における展望及び残された課題について述べた。

## 論文審査の要旨

報告番号	理工論 第 57 号	氏名	前田 政敏
審査委員	主査	伊東 祐二	
	副査	杉村 和久	大木 章

学位論文題目 免疫応答制御のためのファージライブラリによる補助刺激分子特異的ヒト抗体の開発 (Human antibody fragments specific to costimulatory molecules developed by phage library to control the immune response)

## 審査要旨

提出された学位論文及び論文目録等を基に学位論文審査を実施した。本論文は、免疫システムにおいて重要な補助刺激分子CD86及びB7RP-1を標的とした抗体分子の単離と、得られた抗体分子の細胞表面レセプターに対する作用解析を行いまとめたものである。本論文は、以下の6章から成り立っている。

第1章では、補助刺激分子(CD86, B7RP-1)と免疫疾患との関連性を示し、これらの分子を標的とした抗体治療法の有効性について述べた。CD86及びB7RP-1は、細胞表面のレセプター分子と結合し、免疫応答を調整する補助刺激分子である。近年、この分子の免疫調節異常が様々な免疫疾患に関わっていることが報告され、これらの疾患を治療するための非常に有効な標的分子となる。

第2章では、ヒト一本鎖抗体ファージライブラリについて述べた。抗体医薬は、ガンやアレルギーなどの疾患領域における新たな医薬品として注目を集めている。本研究では、抗体の単離にファージディスプレイライブラリ法を用いており、その原理、ライブラリ構築法、そのメリットについて述べた。

第3章では、ヒト一本鎖抗体ファージライブラリからCD86に対するヒト抗体の単離を試みた。バイオパニングという手法により候補の抗体ファージを単離し、CD86への結合特異性によるスクリーニングによって、4種のヒトCD86特異的ヒト抗体分子を単離した。これらの抗体は、CD86とそのレセプターであるCTLA-4との結合を濃度依存的に抑制した。またマルトース結合タンパク質(MBP)との融合発現を行ったMBP融合抗CD86抗体の1つは、T細胞増殖を濃度依存的に抑制した。

第4章では、ヒト一本鎖抗体ファージライブラリからB7RP-1に特異的なヒト抗体の単離を試みた。抗体のスクリーニングから最終的に4種のヒトB7RP-1特異的ヒト抗体分子を単離し、性状解析を行った。単離した4種類の抗体のうち3種類は、B7RP-1/ICOS間の結合を濃度依存的に阻害し、かつ抗原特異的なT細胞免疫応答を抑制した。さらに、混合リンパ球応答試験において、同種異系に対するT細胞免疫応答を抑制した。

第5章では、単鎖Fv抗体の臨床応用を目的に、ポリエチレングリコール(PEG)またはヒト型糖鎖を抗体による修飾での安定性向上を試みた。PEG化及び糖鎖修飾scFv抗体では、抗原に対する結合活性を保持したまま安定性が向上しており、血中での安定化が期待できるため、FabやIgG抗体への改変なしに臨床への応用が示唆された。

第6章では、以上の結果を総括し、B7RP-1依存的免疫疾患治療や免疫応答の制御法開発における本研究で得られた抗体の展望及び課題について述べた。

以上のように、本論文は、ヒト抗体ファージライブラリを用いて、CD86やB7RP-1に対する特異的単鎖Fv抗体の単離に成功し、ヒト混合リンパ球応答試験における抑制効果を明らかにした。この研究成果は、補助刺激分子を標的にした自己免疫疾患や臓器移植時の拒絶反応を抑制する低分子化抗体医薬品の可能性を示した。よって、審査委員会は博士(工学)の学位論文として合格と判定した。

## 学力確認結果の要旨

報告番号	理工論 第57号	氏名	前田 政敏
審査委員	主査	伊東 祐二	
	副査	杉村 和久	大木 章

最終試験は、以下の要領で博士論文の発表会を行い、研究発表内容の質、発表状況、質疑応答の内容を総合的に審査することにより行われた。

博士論文の発表会は、平成22年2月15日の 16時30分より鹿児島大学産学官連携推進機構(VBL)1階ディスカッションルームにて行われ、約30分の博士論文内容の発表後、約30分間の諮問を含む質疑応答が行われた。具体的な質疑応答の内容の一部を以下に示す。

質問1) 単離した抗B7RP-1 scFv抗体の認識部位についての検討は行ったのか

回答: 単離した抗体のエピトープ解析は行っていない。ELISA法を用いたICOS/B7RP-1間の相互作用の抑制効果及びICOS/B7RP-1を介したT細胞増殖応答の抑制効果が見られたことから、単離した抗体のエピトープは、ICOSとB7RP-1との結合表面あるいは近傍であると考えられる。

質問2) 単鎖Fv抗体に修飾する糖鎖の構造をヒト二分岐N型糖鎖にした理由について

回答: 糖鎖には、N型糖鎖及びO型糖鎖の2種類が存在し、N型糖鎖は分岐型、O型糖鎖は直鎖状の糖鎖である。過去の研究報告から、分岐型糖鎖の方が安定性を高める効率が高いことが知られていたため、N型糖鎖を選択した。また、タンパク質は、血中に投与されると腎臓でろ過されるが、シアル酸を持つ糖鎖は、腎臓での排出を抑制する効果を期待し、二分岐ヒトN型(11糖)の糖鎖構造を選択した。

質問3) 糖鎖を修飾する残基としてLys残基ではなくCys残基を選んだ理由について

回答: タンパク質にPEG等を化学修飾する際に、Lys残基を介して修飾する手法は多く見られるが、Lys残基は、タンパク質(抗体)中に複数個存在し、修飾部位の制御ができない。このため、抗原認識に重要な部位付近に修飾されることで抗体の機能を低下させる懸念がある。一方、タンパク質中のCys残基の存在割合は低く、今回使用した9種類の抗体にはジスルフィド結合を形成するCys残基以外は存在せず、部位特異的な修飾が可能となり、抗体の結合活性にも影響を与える可能性が低いことから、Cys残基への修飾を選択した。

質問4) 抗CD86 scFv抗体が組換えタンパク質に結合し細胞表面のCD86分子に結合しない理由について

回答: 組換えタンパク質はマウス細胞由来であり、使用した細胞はヒト細胞である。細胞により、糖鎖の修飾の割合が異なったり、糖鎖構造自身が異なることが知られている。組み換え型のCD86と細胞上のCD86の間で修飾糖鎖の影響によりCD86分子の構造が異なり、抗体の反応性に影響を与えた可能性が考えられる。

以上の内容から、3人の審査員は、審査対象者が大学院博士課程修了者としての学力ならびに見識を有するものと認め、博士(工学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。