

抗体部位特異的修飾技術による
多様な抗体医薬開発

2019 年 3 月

鹿児島大学理工学研究科
博士後期課程総合理工学専攻

岸本 聡

目次

要旨	1
第 1 章 研究背景	4
1-1 抗体 の 機能	4
1-2 抗体 医 薬 品	10
1-3 抗体 医 薬 品 へ の 分 子 修 飾	11
1-4 フ ェ ー ジ デ ィ ス プ レ イ 技 術 と VHH 抗 体	14
第 2 章 IgG 結 合 ペ プ チ ド を 用 い た 抗 体 修 飾 (CCAP 法)	19
2-1 緒 言	20
2-2 材 料 と 方 法	21
2-3 結 果	25
・ IgG 結 合 ペ プ チ ド の X 線 結 晶 構 造 解 析	25
・ IgG 結 合 ペ プ チ ド の 結 合 親 和 性 解 析	26
・ 抗 体 と ペ プ チ ド 間 で の 部 位 特 異 的 共 有 結 合 の 形 成	28
・ ペ プ チ ド マ ッ ピ ン グ に よ る CCAP 法 の 部 位 特 異 性 を 評 価	30
2-4 ま と め と 考 察	39
第 3 章 CCAP 法 に よ る 抗 体 修 飾 が 抗 体 機 能 へ 与 え る 影 響	40
3-1 緒 言	41
3-2 材 料 と 方 法	42
3-3 結 果	44
・ Fc 受 容 体 に 対 す る 結 合 能 へ の 影 響	44
・ ア ミ ン カ ッ プ リ ン グ 法 と の 抗 体 結 合 活 性 比 較	47
3-4 ま と め と 考 察	51
第 4 章 CCAP 法 に よ る 機 能 性 分 子 の 修 飾 と 機 能 評 価	52
4-1 緒 言	53

4-2 材料と方法.....	56
4-3 結果.....	72
• CCAP 法を用いた ADC の作製.....	72
• ファージディスプレイ技術を用いた抗 Fc α R VHH の単離.....	73
• CCAP 法を用いた二重特異性抗体の作製.....	81
4-4 まとめと考察.....	89
第 5 章 総括と今後の課題.....	91
引用文献.....	94
業績目録.....	104
謝辞.....	110

要旨

近年、抗体薬物複合体（ADC）など抗体へ機能性分子を修飾したものが利用され始めている。しかし、従来のアミンカップリング法などの修飾法は修飾部位を特定できず、抗体の結合能に悪影響を及ぼしており、抗体部位特異的修飾技術の開発が求められていた。これまでに抗体側のアミノ酸改変によるシステインや非天然アミノ酸の導入による部位特異的修飾技術が開発されてきたが、これらの方法では、抗体の遺伝子改変や発現系の構築が煩雑であるといった問題点があった。

そこで、本研究では T7 ランダムペプチドライブラリから単離されたヒト IgG 抗体の Fc 部位特異的なペプチドを介した、IgG-Fc へのアミド結合による部位特異的な修飾法 CCAP（Chemical conjugation by affinity peptide）法を開発した。この修飾反応は、ペプチドの Lys 残基と、抗体とペプチドの複合体中で近接する抗体 Fc 上の特異的 Lys 残基（Lys248）間を DSG リンカーによって架橋することで成立する。ペプチドの親和性を利用するため、部位特異的な修飾を行うことができ、ペプチド側に機能性分子をあらかじめ導入しておくことで、IgG 抗体へ部位特異的にこれらの分子を修飾することが可能となる。本研究では、CCAP 法による修飾反応が IgG 部位特異的であることをペプチドマッピングによって明らかにしただけでなく、CCAP 法による修飾が抗体機能に与える影響を解析した結果、抗原結合能には影響がなく、FcγR との結合も維持され、FcγRIIIa への結合親和性はむしろ向上することがわかった。

CCAP 法を分子修飾抗体医薬品開発へ応用するため、最初に抗体薬物複合体の作製について検討を行った。抗ガン剤である DM1（emtansine）をあらかじめ修飾したペプチドを用いて、乳がん細胞を標的とした抗体医薬品である Trastuzumab へのコンジュゲートを作製した。結果として、Biacore T200 による解析で、CCAP 法によって作製した抗体薬物複合体は Trastuzumab の抗原である Her2 への結合能を維持しており、Her2 発現細胞である SK-BR3 細胞と Her2 非発現細胞である C6 細胞を用いた細胞アッセイでは Trastuzumab に DM1 を従来法でコンジュゲートした医薬品である T-DM1 と同様に SK-BR3 特異的な細胞毒性を発揮した。

次に、CCAP法を用いてVHHをIgG抗体へコンジュゲートすることで新規の二重特異性抗体フォーマットを構築できると考えた。二重特異性抗体を作製することで、本来IgG抗体が有していなかった結合能、機能を新たに付加することができる。そこで、がん標的抗体医薬品へ好中球が有するIgA抗体受容体であるFcαRを標的とするVHHをコンジュゲートし、IgG抗体が本来有するNK細胞を介した細胞傷害活性の他に、好中球を介した細胞傷害活性といった新たな機能を付加し、好中球とNK細胞両方をエフェクター細胞として利用できる高活性、高機能型の二重ADCC抗体を創製することを目的とした二重特異性抗体の作製を行った。結果、作製したIgG-VHHコンジュゲート体はIgG側、VHH側双方の親和性を維持しており、細胞上標的抗原ならびにFcαRへ結合活性を示した。

以上のことから、本研究において開発したCCAP法は優れた分子修飾技術として抗体開発研究を進展させ、抗体薬物複合体、放射性標識抗体、二重特異性抗体など様々なフォーマットの抗体医薬品開発を促進させることが期待される。

第 1 章

研究背景

第1章 研究背景

1-1 抗体機能

抗体は自己防御機構である免疫系における重要なタンパク質であり、体外から侵入した異物（抗原）を認識し、特異的に結合することで異物の排除に関わっている。抗体の構造は、重鎖（H鎖）および軽鎖（L鎖）と呼ばれる2種のポリペプチド鎖によって構成されている。重鎖および軽鎖のN末端側の領域には多様性に富んだアミノ酸配列を有する領域が存在し、特に可変領域（VH、VL）と呼ばれている。VHおよびVLには、特に多様性を持つ領域が存在し、超可変領域または、相補性決定領域（complementarity determining region : CDR）と呼ばれ、VHとVLにそれぞれ3つずつ存在する。CDRは抗体の抗原認識に関わる部位であり、これらの多様性が抗体の様々な抗原に対する多様性を構成している。また、可変領域以外の領域は定常領域またはフレームワーク（FR）領域と呼ばれ、構成するアミノ酸配列の違いからIgA、IgG、IgD、IgE、IgMといったクラスに分類され、それぞれ異なるエフェクター機能を有している。IgG抗体は血液中で最も多く存在する抗体であり、定常領域の違いによりIgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄と4つのサブクラスに分けられる。免疫応答においては、ウイルスなどの病原体に結合し細胞への感染を阻害する中和活性や、マクロファージなどの貪食細胞に標的を認識させるためのオプソニン化、ナチュラルキラー細胞（NK）を動員し、ウイルス感染細胞やがん細胞などを攻撃する抗体依存性細胞障害活性（ADCC : Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity）や、補体分子を介した補体依存性細胞障害活性（CDC : Complement Dependent Cytotoxicity）など様々な働きを担っている。また、IgG₁、IgG₂、IgG₄はFcRnと呼ばれる抗体Fc領域に結合する受容体を介したリサイクリング機能により、約2週間程度の長い血中半減期を有している。特に、IgG₁がNK細胞による高いADCC誘導能力を有していることから、抗体医薬品として様々な疾患へ応用されている。

抗体のFc領域は定常領域とされる部分であり、配列の違いからヒトの場合5種類のクラスに分類される。IgG、IgM、IgA、IgD、IgEの5種類であり、そのうちB細胞表面に存在し、B細胞成熟に関連してはたらくIgD以外のクラスにはそれぞれ対応した受容体であるFcγR、FcμR、FcαR、FcεRが存在し、各種免

疫細胞上に発現している。各クラスの抗体は、その Fc 領域がそれぞれ対応した受容体に結合することで、役割の異なる免疫応答を誘導する。IgM 抗体は血中では 5 量体の状態で存在し、免疫応答の際最初に誘導される抗体であり、感染の初期防御において重要な役割を担っている^{1,2,3}。IgM の受容体である Fc μ R は B 細胞上に発現しており、2009 年に遺伝子が同定された⁴。また、Fc μ R 遺伝子欠損マウスを用いた実験では、野生型のマウスと比べ抗原の侵入に対する B 細胞の応答が阻害され、抗体産生誘導に IgM と Fc μ R の結合が重要な役割を担っていることが示された。また、同時に、自己抗原に対する抗体産生を抑制し、自己免疫疾患の予防という役割を持つ可能性も同時に示唆されている⁵。IgA 抗体は血中で 2 量体の状態で存在し、その受容体は Fc α R と呼ばれている⁶。Fc α R は好中球、単球、マクロファージ上に存在し、IgA 抗体を介した免疫応答に関わっている^{7,8,9}。抗原と結合した IgA 抗体は免疫細胞上の Fc α R と結合し、免疫細胞を活性化、貪食や ADCC 活性と呼ばれる細胞傷害活性を誘導する^{10,11}。Fc α R は免疫細胞による killing 活性を誘導することから、免疫細胞活性化を目的とした医薬品のターゲットとしても注目されている¹²。IgE 抗体はアレルギーへの関与で知られる抗体であり、その受容体 Fc ϵ R はマスト細胞（肥満細胞）や好塩基球、好酸球上に発現している¹³。アレルギー反応は、マスト細胞上の Fc ϵ R に結合した IgE 抗体に抗原であるアレルゲンが結合することで、細胞が活性化され、ヒスタミンなどのアレルギー反応を誘導する物質を放出することによって引き起こされる^{14,15}。IgG 抗体は血中に最も多く存在する抗体クラスであり、液性免疫において感染防御など様々な免疫応答の中核を担う分子である。前述の通り、IgG を用いた抗体医薬品は副作用が少なく効果の高い医薬品として急速に普及している。この IgG 抗体の受容体は Fc γ R と呼ばれており、Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa など様々なタイプが存在する（Table 1-1）¹⁶。Fc γ R は細胞膜タンパク質であるが、細胞内部分に有しているシグナル伝達モチーフの違いによって大きく 2 分することができる。免疫受容体活性化チロシンモチーフ ITAM（immunoreceptor tyrosine-based activation motif）と、免疫受容体抑制性チロシンモチーフ ITIM（immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif）である。ITAM は細胞を活性化するシグナル伝達に関与し、逆に ITIM は細胞を抑制するシグナル伝達に関与している。Fc γ R では唯一 Fc γ RIIb のみが抑制性の ITIM

を有する受容体である。ITAMを有する FcγR に抗体が結合すると、細胞膜上で FcγR が集合し、細胞内 Src ファミリーのチロシンキナーゼが活性化され、ITAM 中のチロシン残基がリン酸化される。これが引き金となり、細胞内にシグナル伝達が起こる¹⁷。マクロファージや樹状細胞、好中球などの細胞で FcγR が活性化された場合、これらの細胞は貪食によって IgG 抗体が認識した抗原を取り込む、取り込まれた抗原は分解され、抗原ペプチドとして細胞へ提示され、T 細胞の活性化に参与する¹⁸。NK 細胞で発現している FcγRIIIa は IgG 抗体によって活性化され、ADCC 活性 (Antibody Dependent Cell Cytotoxicity) と呼ばれる細胞傷害活性を誘導する^{19,20}。これは NK 細胞の細胞質顆粒から放出されたパーフォリン²¹ やグランザイム²² といった酵素によって引き起こされ、パーフォリンは細胞膜に孔を空け、プロテアーゼであるグランザイムが細胞内に侵入し、アポトーシスを誘導する²³。一方、ITIM を有する FcγRIIb は B 細胞上に発現しており、抗体の産生を負に調節する機能を有している。これは免疫反応が過剰に起こることを防ぐためのメカニズムである²⁴。これは、FcγRIIb 欠損マウスにおいて自己免疫疾患が容易に誘導されることにより証明されている^{25,26}。

Table 1-1 各 FcγR の発現分布とシグナル伝達モチーフ

Receptor	Expression	Signal transduction motif	Affinity
FcγRI	MacroPhage Monocyte Neutrophil DC	ITAM	10 ⁷ -10 ⁹ M ⁻¹
FcγRIIa	MacroPhage Neutrophil Platelet DC, LC	ITAM	<10 ⁷ M ⁻¹
FcγRIIb	B cell	ITIM	<10 ⁷ M ⁻¹
FcγRIIIa	MacroPhage Monocyte NK cell	ITAM	10 ⁷ M ⁻¹

抗体医薬品の効果においても Fc 受容体との結合能は大いに関係しており、がんを標的とした抗体医薬品では、多くの場合、FcγRIIIa を介した NK 細胞の ADCC 活性が抗体医薬品の医薬品としての効果に関連している。IgG 抗体医薬品と FcγRIIIa の結合能力が治療効果に影響を与える例として、IgG 抗体 Fc との親和性が高い FcγRIIIa のアロタイプ患者 (FcγRIIIa-158Val) と親和性の低い患者 (FcγRIIIa-158Val) を比較した場合、前者の方が抗体医薬品による高い治療効果が得られるといった知見が報告されている^{27,28}。これらの知見を基に、IgG 抗体の Fc 領域へのアミノ酸変異や、糖鎖を改変することで FcγRIIIa との結合親和性を増強することで治療効果を向上させる試みが行われてきた。アミノ酸改変技術を用いた手法として、ジェネンテック (Genentech) 社は Fc 受容体との結合に関連するアミノ酸配列に変異を導入し、各 Fc 受容体への親和性を増減させるアミノ酸部位を同定している²⁹。この報告では、S298A、E333A、K334A などの部位のアミノ酸置換が FcγRIIIa との結合親和性を向上させ、ADCC 活性をも増強させることを実証している。また、協和発酵キリン社は IgG 抗体が FcγRIIIa と結合形成する際に必須の因子である Asn297 の糖鎖修飾を改変し (Fig.1-1) (文献^{30,31}を参考に改変)、フコースを除くことで FcγRIIIa との結合親和性が向上し、ADCC 活性を増強することが可能であると報告している^{32,33}。ポテリジェント技術と呼ばれるこの手法は既に抗体医薬品開発に応用されているが、製造にはフコース修飾を排除するため、フコースの修飾に関わる酵素をノックアウトした細胞株を用いる必要がある³⁴。

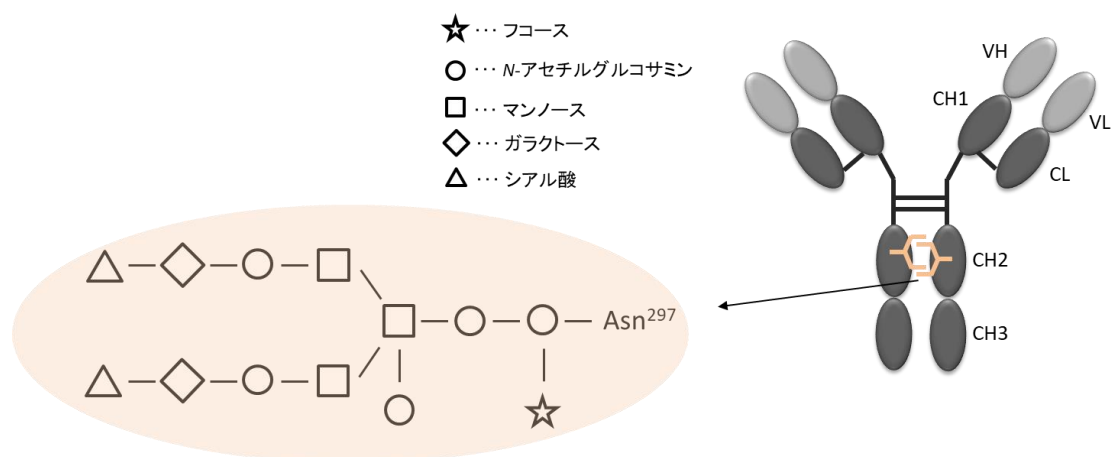


Fig.1-1 IgG 抗体の構造と糖鎖修飾

抗体の Fc 領域に結合し、生理機能を発揮する受容体として、免疫細胞に発現し、免疫応答に関わる Fc 受容体の他に、FcRn が存在する。FcRn は IgG 抗体の分解を抑制し、血中濃度維持に関わっている受容体である。この FcRn へ結合能を持たないバイオ医薬品の血中半減期は 1 日程度であるのに対し、ヒト Fc 領域を有する IgG 抗体医薬品の血中半減期は数日から数週間と非常に長く、医薬品投与頻度を抑えることができるといった特筆すべき利点を有している。FcRn の存在は 1964 年に IgG 抗体の代謝や輸送に関わる受容体として Brambell らによって提唱され³⁵、1989 年にラットから初めてクローニングされた³⁶。その後ノックアウトマウスを用いた実験で IgG 抗体の半減期を延長していることが実証され^{37,38,39}、細胞内酸性条件下では IgG 抗体と結合し、細胞外中性条件下で解離することで、エンドサイトーシスで細胞内へ取り込まれた IgG 抗体が FcRn と結合することでレスキューされ、再度細胞外へ放出されることでリサイクリングされているメカニズムが解明された⁴⁰ (Fig.1-2)。また、FcRn は、IgG だけでなく血清アルブミン (ヒトの場合 HSA) との結合ドメインも有しており、IgG 結合部位とは異なる領域であるため、両者は拮抗せずに FcRn と結合可能である⁴¹。

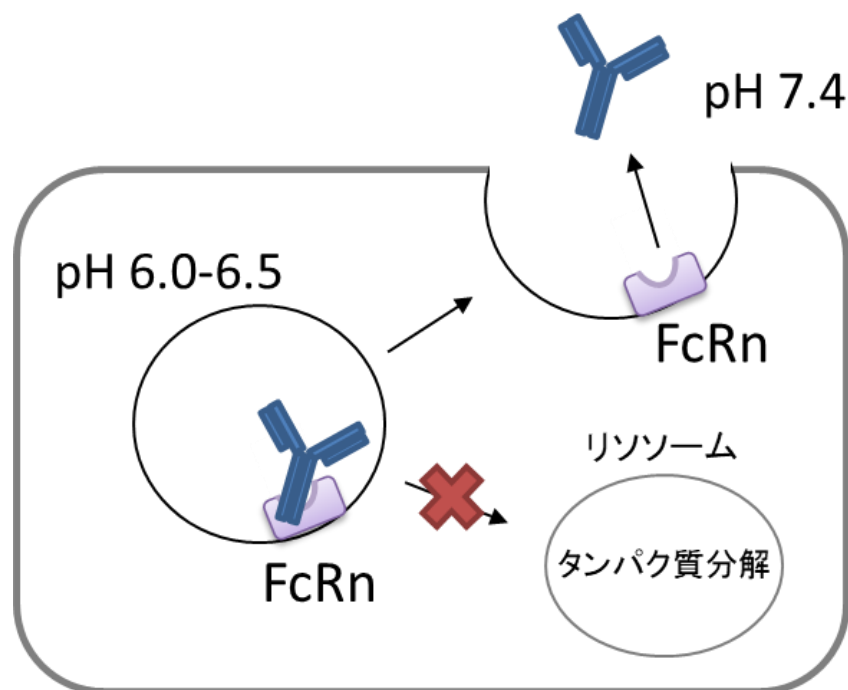


Fig.1-2 FcRn による抗体リサイクリング機構

バイオ医薬品開発において、FcRn との相互作用は血中半減期や IgG 抗体医薬品の代謝と密接に関わるため、欠かせないテーマであり、これまでに様々な試みが行われている。IgG 抗体の Fc 領域を改変し、FcRn との結合親和性を向上させる研究⁴²や、中外製薬社が開発したスウィーピング抗体^{43,44}などが挙げられる。スウィーピング抗体は中性条件下で FcRn と結合可能なように Fc 領域を改変した抗体であり、血中抗原と結合した抗体が FcRn と結合し、細胞内に取り込まれ、抗原のみが酸性条件下で解離し、抗体は再度血中に戻ることで、標的抗原の血中からの排除を効率化するデザインとなっている。

FcRn は HSA とも結合し、その血中半減期延長にも貢献していることから、HSA への結合能を利用したバイオ医薬品の半減期延長の取り組みも行われている。2002 年に Dennis ら (Genentech 社) はランダムペプチド提示 M13 ファージライブラリから HSA に結合可能なペプチドを単離し⁴⁵、抗体の Fab の末端にこのペプチドを融合することで血中半減期を延長可能であることを報告している⁴⁶。同様にこのペプチドをラクダ科動物由来の重鎖抗体の抗原結合ドメインである VHH へ融合し、血中半減期を延長した報告⁴⁷も存在する。また、Ablynx 社は血中サイトカインをブロックすることで炎症を抑える目的で VHH 抗体医薬品を開発しているが、抗原結合ドメインである VHH は FcRn への結合能を有さず、血中半減期が短い。この問題を解決するため、サイトカイン特異的な VHH と HSA に特異的な VHH を融合した複数 (2 または 3) の VHH が繋がった医薬品フォーマットを開発している^{48,49}。

IgG 抗体において各 FcγR は CH2 領域に結合するが、FcRn は CH2、CH3 領域の間の領域に結合する。CCAP 法で使用している IgG 結合ペプチドはこの FcRn のエピトープと重なっていることから、ペプチド修飾による IgG 抗体の FcRn 結合能への影響は確認する必要がある。FcRn への結合能が阻害される場合、血中半減期の低下が予想されるため、医薬品フォーマットとしての使用が制限されるが、二量体である Fc の片側のみにペプチドが修飾された場合、他方の Fc が FcRn と結合し、親和性ならびに血中半減期を維持していることが期待できる。

1-2 抗体医薬品

抗体は生体防御機構である免疫系における主要なタンパク質であり、特定の抗原に対し、高い特異性および親和性で結合する性質を有している。このことから、副作用の少ない医薬品としての利用されている。抗体の利用は、ハイブリドーマ技術の確立により、モノクローナル抗体⁵⁰の生産が可能になったことから発展した。また、遺伝子組み換え技術の発展によって人工的な抗体の生産が可能となり、現在では様々な抗原に対する抗体が作製され、多岐にわたって利用されている。抗体医薬品の主な作用機序を図で示した (Fig.1-3)。細胞上の標的抗原に結合し、前述の ADCC 活性¹⁹や、CDC 活性によって細胞傷害活性を誘導するものは、主にがんに対する抗体医薬品として利用されている。代表例としては、非ホジキンリンパ腫に使用される抗 CD20 抗体である Rituximab や乳がん使用される抗 Her2 抗体である Trastuzumab などが挙げられる。Trastuzumab の標的である Her2 はがん細胞の増殖に関わる受容体であり、Trastuzumab はその機能を阻害することによる増殖抑制効果も有している。また、細胞上の受容体やそのリガンド (炎症性サイトカイン) に結合することで、効果を発揮する抗体医薬品としては、炎症性サイトカイン TNF- α を標的とするインフルキシマブなどが挙げられる。

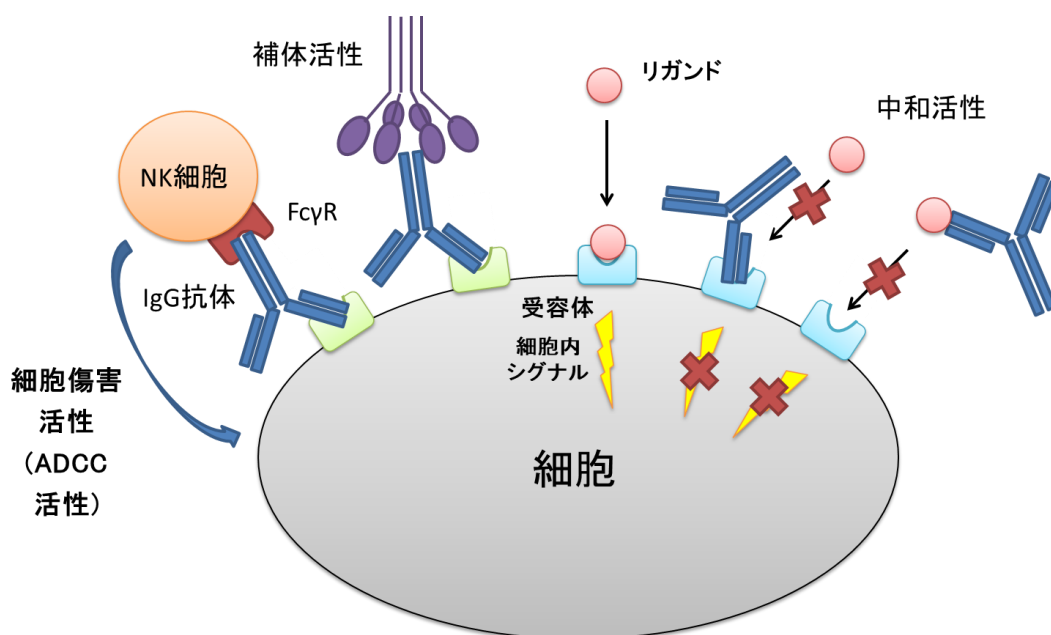


Fig.1-3 抗体医薬品の主な作用機序

1-3 抗体医薬品への分子修飾

従来のがんに対する抗体医薬品の作用機序は、生命が本来有する免疫機構を利用したもの、すなわち免疫細胞の活性化に伴う細胞傷害活性や、補体の活性化に伴う細胞傷害活性または、がん増殖に関わる受容体やリガンドとの結合による増殖阻害が中心であった。その利点は前述の通り、標的特異性に由来する少ない副作用であるが、免疫機構に依存した活性は、免疫力の低下などの要因により減弱する可能性がある。一方、抗がん剤療法では低分子の薬剤が、がん細胞に到達することができればがん細胞のアポトーシスを誘導することができ、免疫細胞に依存せずに効果を発揮することができる。しかし、その最大の欠点のがん細胞以外の細胞にも働き、時に重篤な副作用を伴うことである。そこで、がん細胞特異的なターゲティングが可能な抗体に抗がん剤を結合させた抗体薬物複合体（ADC : Antibody Drug Conjugate）が開発された。ADCの作用機序は、まず抗体が標的であるがん細胞表面受容体へ結合を形成することから始まる。結合した抗体は受容体の細胞内部移行に伴い細胞内へ移行し、リソソームで分解される際に抗がん剤を放出する（Fig.1-4）。理想的なADCの利点は抗体が標的とする細胞内のみで抗体放出が起こることであり、副作用の無い抗がん剤輸送システムとして利用することができる。しかし、前述通り、従来抗体修飾法では抗がん剤結合部位同定できず、結合価数をコントロールすることも困難であるといった問題点も有している。

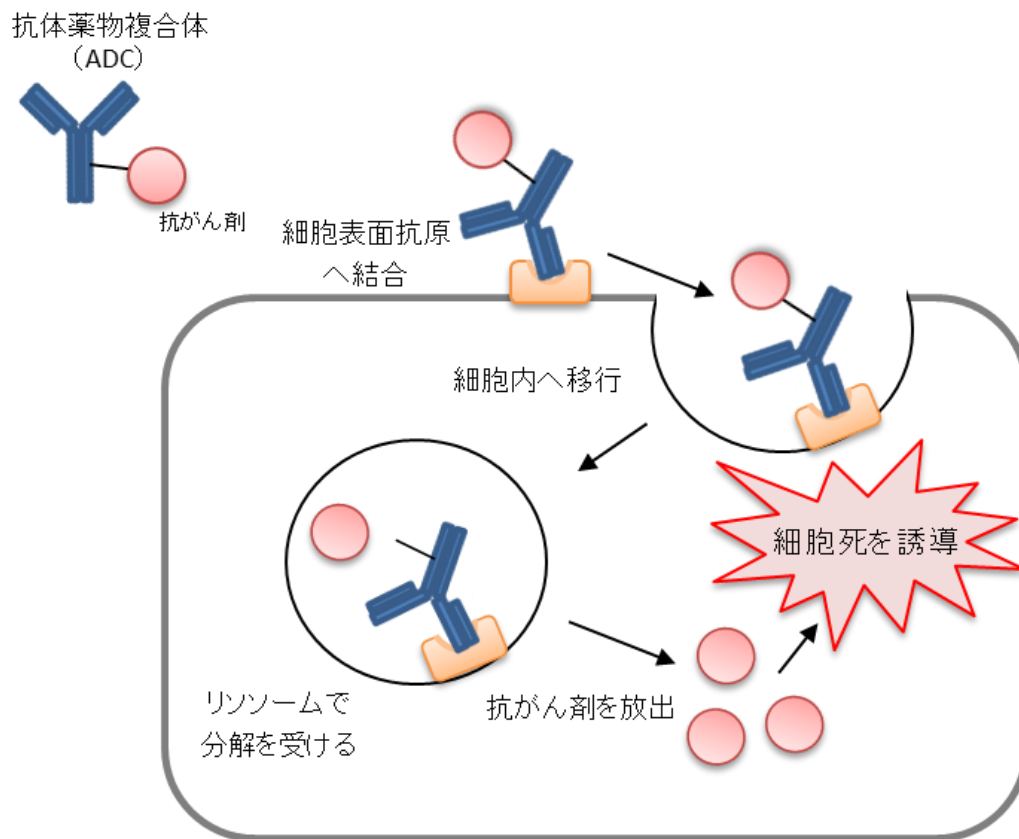
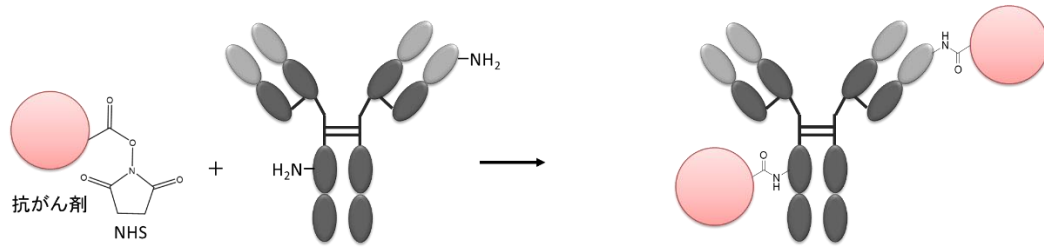


Fig.1-4 抗体薬物複合体（ADC）の作用機序

現在までに、4種類のADCがFDAによって承認されており、臨床開発中のADCも多く存在する。4種類の内容は、2000年のMylotarg® (gemtuzumab ozogamicin)(Pfizer)、2011年のAdcetris®(brentuximab vedotin)(Seattle Genetics and Millennium)、2013年のKadcyla®(ado-trastuzumab emtansine)(Genentech and Roche)、2017年のBesponsa® (inotuzumab ozogamicin)(Pfizer)である。Mylotarg®は急性骨髄性白血病の治療薬として開発されたADCであり、抗CD33抗体に抗がん剤であるオゾガマイシンを修飾し、作製された。修飾方法は抗体内のランダムなLys残基に修飾を行うアミンカップリング法である^{51,52} (Fig.1-5)。史上初のADCであったが、他抗がん剤との併用において憂慮すべき事象が発現したこと（死亡事例）により承認が取り下げられ、製造開発メーカーであるファイザーは2010年に市場から本品を撤退させた。Adcetris®はホジキンリンパ腫(HL)、未分化大細胞型リンパ腫(ALCL)の治療薬として開発されたADCであり、抗CD30抗体に抗がん剤であるMonomethyl Auristatin E (MMAE)を修飾し、作

製された。修飾方法は抗体 CH1、CL、ヒンジ領域に存在する Cys 残基を還元し、マレイミド基を有するリンカーによって抗がん剤修飾を行う方法である⁵³。抗体内に元々存在する Cys 残基を用いた修飾法で、修飾部位が決まっており、抗原結合能や、体内半減期等抗体の機能に影響を与える部位ではなく (Fig1-5)、修飾価数が 2~8 の間でランダムであり、抗体内のジスルフィド結合が失われることから、抗体の構造的な安定性が失われる可能性がある⁵⁴。本剤に使用されている抗がん剤 MMAE はチューブリン重合阻害剤であり、微小管の形成を阻害することにより、強力な抗がん作用を発揮する。FDA では 2011 年に承認され、2014 年には日本でも承認された。Kadcyla®は乳がんの治療薬として開発された ADC であり、抗 Her2 抗体に抗がん剤である emtansine (DM1) を修飾し、作製された⁵⁵。修飾方法は、抗体内のランダムな Lys 残基に修飾を行うアミンカップリング法である。本剤に使用されている抗がん剤 DM1 も MMAE と同様にチューブリン重合阻害剤であり、微小管の形成を阻害することにより、強力な抗がん作用を発揮する。FDA では 2013 年に承認され、日本でも 2013 年に承認された。Besponsa®は難治性の前駆 B 細胞性急性リンパ性白血病 (ALL) の治療薬として開発された ADC であり、抗 CD22 抗体に抗がん剤であるオゾガマイシンを修飾し、作製された^{56,57}。修飾方法は、抗体内のランダムな Lys 残基に修飾を行うアミンカップリング法である。本剤に使用されている抗がん剤オゾガマイシンはバクテリア *Micromonospora echinospora* に由来するエンジン抗生物質の誘導体である。DNA を標的とし、DNA 切断を引き起こすことにより、強力な抗がん作用を発揮する⁵⁸。

抗体内 Lys 残基への修飾



抗体内 Cys 残基への修飾

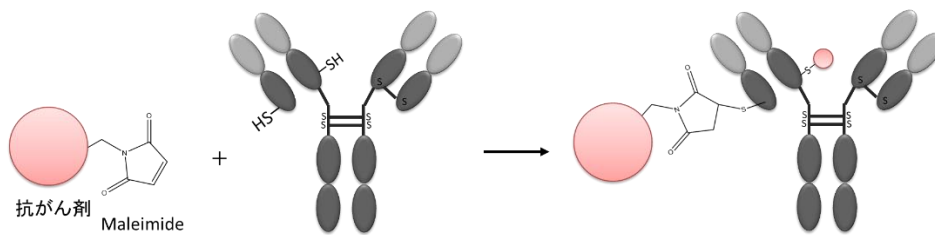


Fig.1-5 従来の ADC 作製方法

1-4 ファージディスプレイ技術と VHH 抗体

我々の研究室では、ファージディスプレイ技術を用いて、抗体やペプチドといった結合性分子の探索を行ってきた。ファージディスプレイ技術は、大腸菌に感染することで増殖・複製を行うウイルスであるファージに外来ポリペプチド鎖をコードする DNA を挿入することで、ファージのコートタンパク質上に外来性のランダムポリペプチドを融合させた形での提示させる技術であり、1985 年に Smith らが繊維状ファージに外来性のランダムポリペプチドを融合させた形での提示が可能であることを報告した^{59,60,61}。最も一般的に用いられている M13 ファージではコートタンパク質である g3p⁶²、g8p⁶³、g6p⁶⁴、g7p⁶⁵、g9p⁶⁶ に外来分子を提示したディスプレイシステムが確立されている。現在では主に大腸菌の F Pilus (F 繊毛) と結合し感染の開始に利用される g3P に 1-5 分子の外来分子を提示するシステムまたは、M13 ファージを形成するコートタンパク質の中で最も数の多い (約 3000 分子) g8p に提示させるシステムが用いられており、有用な生理活性ペプチドや抗体の探索研究など様々な分野で応用されている。ファージディスプレイ技術は、同時に多様な配列を提示したファージを扱うことができるだけでなく、ファージ上に提示されているペプチドまたはタンパク質分子のアミノ酸配列とファージ内部にパッケージングされている

DNA 配列が対応しており、大腸菌へ感染させることで遺伝子情報を維持した状態で容易にクローニングできるといった利点を有している。

ファージディスプレイ技術を用いてファージ上に多様なペプチドや抗体を提示させた状態をファージライブラリと呼んでおり (Fig.1-6)、VHH 抗体などの外来遺伝子をファージゲノム上に組み込んだライブラリを構築した後は通常、バイオパンニングと呼ばれる手法によって目的とする抗原に対し結合可能な分子を提示したファージの濃縮、単離操作を実施する。この操作の流れは免疫系で B 細胞上に提示された抗体が標的と結合することで増殖し、高い親和性を有する抗体発現細胞へと成熟していく過程と類似しており、試験管内において生体内部で行われている免疫システムを模倣しているといえる。通常バイオパンニングは、プラスチックプレートやチューブ内に固相化した抗原に対し、ファージライブラリを反応させ、洗浄操作を行った後に、結合した状態で残っているファージを回収するといった操作を何度か繰り返すことで実施される (Fig.1-7)。幾度かのラウンドを経て回収されたファージ中には標的抗原に対し高い親和性を有する分子を提示したファージが含まれていることが期待されるため、大腸菌へ感染させ、クローニングを実施し、結合能ならびに DNA シークエンスによって標的的特異的分子の配列が単離、同定される。近年、次世代シーケンサーに発達により、同時に多数の DNA シークエンスを行うことが可能になったことから、バイオパンニングの前後のファージライブラリ中に含まれていた遺伝子情報を次世代シーケンサーで解析することで、パンニング後に増幅した標的抗原に結合可能な配列を網羅的に同定することが可能となっている⁶⁷。

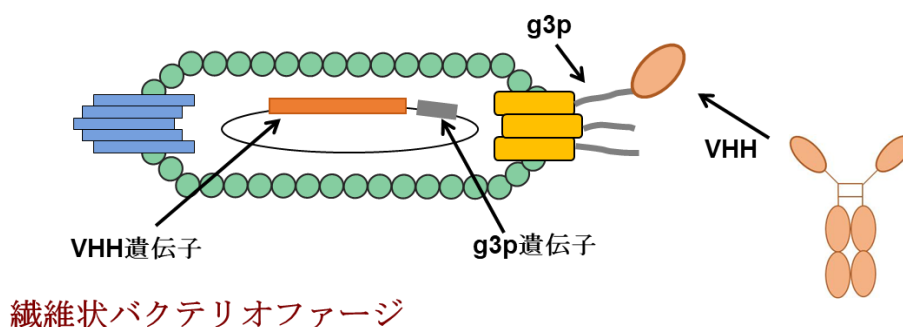


Fig.1-6 VHH 抗体提示ファージの構造

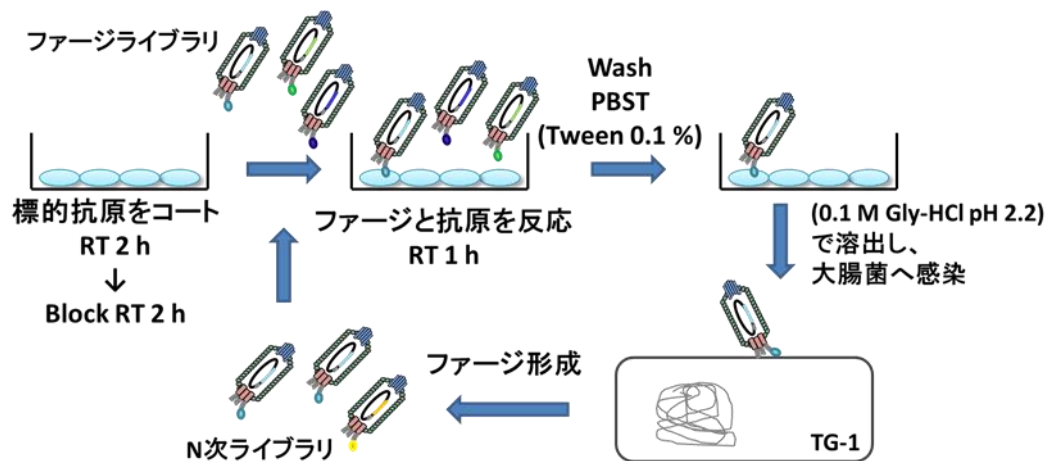


Fig.1-7 バイオパンニングの流れ

繊維状 M13 ファージの他に、溶菌性ファージである T7 を用いた分子提示ライブラリも利用されている。T7 DNA は直鎖二本鎖であり、成熟したファージ粒子は細胞溶解 (溶菌) によって放出される。繊維状ファージでの提示とは異なり、T7 上に提示されるペプチドやタンパク質は細胞膜を通じた分泌過程を経ず、大腸菌細胞質内の還元的条件下で形成された状態で放出されることになる。そのため、ペプチドなどの短い配列では放出後にジスルフィド結合を形成することが可能であるが、タンパク質では変性した状態のまま提示される可能性がある。一方、ファージ粒子の形成が大腸菌内のサイトプラズムで起こるという特徴は、ファージタンパク質-外来性ポリペプチド複合体の提示が、宿主細胞のタンパク質合成系とその分泌系に依存する必要がないことを意味し、これによって繊維状ファージ提示系と比較して、発現されるペプチド配列の偏りが少ないというメリットを有している。T7 ファージライブラリシステムは Novagen Inc. によって報告され、市販化されている。この市販ライブラリは、T7 ファージへの外来ペプチド提示数の異なるいくつかのバリエーションが存在する。T7 ファージの頭部を構成する G10 タンパク質すべてを利用した 415 分子の提示系 (T7Select® 415) から、10 分子 (T7Select®10)、1 分子 (T7Select®1) と三種類の提示が可能である。提示するポリペプチドの分子量や親和性に応じて使い分けが可能となっている。

アルパカを含むラクダ化の動物は通常の抗体に加え、重鎖のみで構成される

重鎖抗体を産生する。これは、1993年にベルギーのブリュッセル自由大学(Vrije Universiteit Brussel)のHamers教授らのグループによって報告された⁶⁸。この重鎖抗体は、通常の抗体がVHおよびVLの組み合わせにより抗原を認識するのに対し、単一可変ドメインであるVHHのみで抗原と結合することができる(Fig.1-8)。VHHは単一ドメインで抗原と結合するのにもかかわらず、通常の抗体と同等の親和性を有する。また、VHHは分子量が小さく構造も単純であることから工学的改変が容易であり、安定性も高いことから、産業応用が期待されている。安定性の高さの具体的な例としては、高温条件下に曝された後のリフォールディング能力の高さが上げられる。1999年にvan der Lindenらによって報告された例⁶⁹によると、通常の抗体を4-90℃に曝した後に室温条件に戻し、結合活性を測定したところ60℃以上の温度に曝されると変性し、リフォールディングすることができなくなるため結合能を失ってしまう。しかし、VHH抗体であれば、90℃まで加熱した後でも室温条件に戻すことでリフォールディングが可能であることが見出された。これはVHH抗体が一旦熱変成した後でも再度リフォールディングすることが可能であるといったことを示している。また、単一のドメインで機能することからタンパク質工学によるエンジニアリングも容易であり、二量体化や三量体化、他のタンパク質への組み込み等も可能である。実際に二量体化や三量体化することで、抗原結合親和性が10倍、100倍に増強されるといった報告⁷⁰も存在する。そのため、医薬品を含む様々な分野への応用が期待されたが、前述のHamers教授らのグループによって、この重鎖抗体の抗原結合ドメインであるVHH(ナノボディ)の医薬利用を含めた、かなり広範囲にわたる世界特許、いわゆるHamers特許(Immunoglobulins devoid of light chains: WO 1994004678)が出され、この特許の医薬への独占実施権を持つAblynxが、長く医薬開発における優位な地位を占めることになる。しかし、2013年8月に基本特許は期限切れとなったことから、近年、世界的にも、このVHHを使った新たな医薬品開発の機運が高まっている。我々が研究に用いているアルパカの重鎖抗体には、VHHと定常領域とつなぐヒンジの長さが異なる2種類が存在しており、それぞれIgG₂(Long hinge)、IgG₃(Short hinge)と呼ばれる。アルパカにおいては、血液中に存在する抗体の約50%が重鎖抗体であることが報告⁷¹されている。

本研究においてもこの重鎖抗体由来 VHH 抗体に着目し、CCAP 法によって VHH 抗体を IgG 抗体へ修飾することで、二重特異性抗体フォーマットを構築した。これは、VHH 抗体が単一ドメインで結合能を発揮する最小の抗体であり、抗体工学における材料として適していると考えたからである。本研究で使用した VHH 抗体は好中球表面受容体である Fc α R を標的とする VHH であるが、アルパカへの Fc α R 免疫を経て、ファージディスプレイライブラリを構築し、スクリーニングによって単離した抗 Fc α R VHH クローンを使用した。

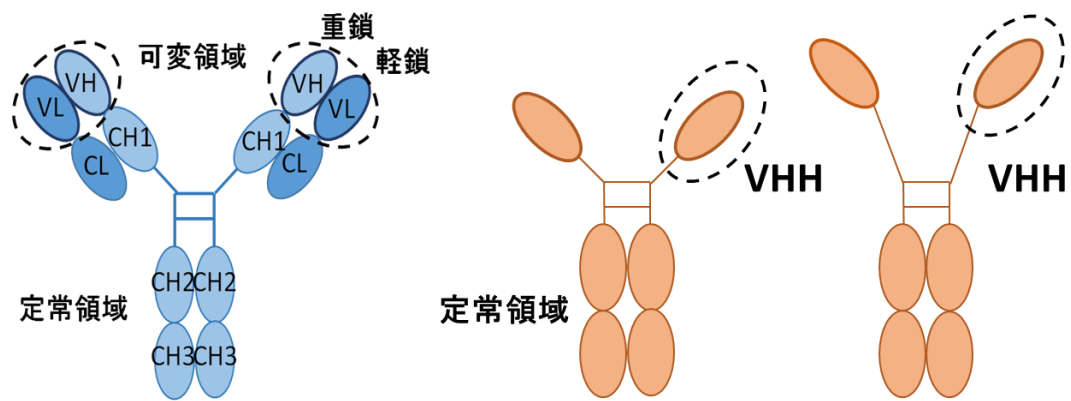


Fig.1-8 アルパカ重鎖抗体

第 2 章

IgG 結合ペプチドを用いた抗体 修飾 (CCAP 法)

第2章 IgG 結合ペプチドを用いた抗体修飾 (CCAP 法)

2-1 緒言

我々の研究室では、前述の T7 フェージライブラリシステムを用いて、IgG 抗体 Fc 部位特異的に結合可能な 17 アミノ酸からなり、内部にジスルフィド結合を 1 つ有するペプチド (GPDCAYHRGELVWCTFH) を単離していた。これは、プロテイン A の代替として IgG 抗体精製時のアフィニティリガンドとして利用するために開発したものである。このペプチドはヒト IgG₁, IgG₂, IgG₄ へ結合可能であり、実際にプロテイン A 同様に IgG を精製可能である。一方、後述の結晶構造解析より、ペプチド 8 番目の Arg 側鎖が IgG-Fc 内の Lys 残基側鎖と相互作用可能な位置関係にあることが明らかとなった。そこで、この 8 番目の Arg 側鎖を Lys に置換しクロスリンカーである DSG (disuccinimidyl glutarate) をあらかじめ修飾した後に IgG と混合することで、IgG-Fc 内の特定の Lys とペプチド Lys 間をアミド結合によって架橋できると考えた。同様に IgG-Fc 部位特異的な分子を用いた架橋法として、プロテイン A の Z ドメインにロジウム金属触媒 (ロジウム (II) アセタート) を修飾し、ジアゾを含む化合物と共に IgG とインキュベートすることで、IgG の 76 番目 Asn 特異的にジアゾ化合物を修飾する手法が報告されている⁷²。この手法では、ロジウム金属触媒を修飾したプロテイン A の Z ドメインは触媒として利用されているため、修飾反応後の IgG へは残らない。しかし、IgG へ化学結合を形成する際の触媒として使用されるロジウムは重金属であり、人体を含む生体にとっては毒物である。そのため、生体に投与される医薬品開発に本手法を用いる場合、ロジウム金属の除去が課題となる。一方、我々が今回考案したペプチドを介した抗体修飾法は IgG にペプチドが残存するものの、17 残基のアミノ酸であり、人体へ悪影響を及ぼす可能性が低いと考えられる。本章では、IgG 結合ペプチドの結晶構造解析の結果から、実際に R8K 置換ペプチドを用いて IgG 抗体 Fc 領域に分子修飾が可能であるか検証すると共に、修飾反応が IgG 248 Lys 特異的であることを確認するたまたまにペプチドマッピングによる修飾部位の同定も実施した。

2-2 材料と方法

IgG とペプチドの X 線結晶構造解析

X 線結晶構造解析は量子科学技術研究開発機構の（故）黒木良太博士、安達基泰博士との共同研究として依頼分析して頂いた。

Cys および HC (ホモシステイン) がそれらの間で独立してジスルフィド架橋を形成している IgG-BP (G (HC) DCAYHRGELVWCT (HC) H-NH) と trastuzumab (Rosh) をパパイン消化により調製したヒト IgG1-Fc を結晶構造解析に用いた。Fc と IgG-BP の非共有結合複合体はシッティングドロップ蒸気拡散法によって結晶化し、結晶化液滴は、16 mg/mL の非共有結合複合体、20 mM の 2-モルホリノエタンスルホン酸 (pH 6.0) および 0.1 M の塩化ナトリウムを含有する 0.3 μ L のタンパク質溶液と、20 % (w/v) ポリエチレングリコール 3350 (Sigma Aldrich) および 0.3 μ L の 0.2 M ヨウ化カリウム (pH 6.9) (和光ケミカルズ) を添加した。同様の方法で、Fc と IgG-BP-ビオチン (2 つの Cys 残基がジスルフィド結合している biotin-PEG4-RGNCA YHKGQLVWCTYH-NH₂) 間の共有結合複合体を、0.1 M CHES (pH 10.0)、20 % (w/v) PEG-8000、および 0.3 M 塩化ナトリウムを含む溶液を用いて、20 °C で 2 週間インキュベーション後に結晶を得た。

X 線回折データは、KEK Photon Factory (筑波) の BL17A beamline および SPring-8 (兵庫) の BL38B1 beamline で得られた。グリセロールを、凍結保護剤として、沈殿剤溶液中の最終濃度 20 % (w/v) で使用した。X 線回折データは、HKL-2000 suite of programs を使用して統合され、スケールされた。Fc ペプチド複合体 (PDB id : 1DN2) の構造を探索モデルとし、PHASER を用いた分子置換法により、Fc 複合体の初期相情報を得た。Fc 複合体構造の結晶学的精密化および手動モデル化は、それぞれ phenix.refine および XtalView ソフトウェアを有する PHENIX ソフトウェアによって実施した。結晶学的データおよび統計データは Table 2-1 にまとめた。

Table 2-1 収集された X 線回折データおよび精密化統計のまとめ

	Non-covalent complex	Covalent complex
Beam line	SPring-8 BL38B1	KEK-PF BL5A
Data collection date	Nov.22.2014	Dec.12.2015
Wavelength (Å)	1.00	0.98
Data statistics		
Resolution range (Å)	44.2–3.00	44.1–3.00
Outer shell (Å)	3.11–3.00	3.11–3.00
Space group	$P2_1$	$P2_1$
Unit cell dimensions, a,b,c (Å)	66.1, 60.5, 69.5	61.1, 67.0, 78.3
α, β, γ	90.0, 101.3, 90.0	90.0, 106.4, 90.0
Total reflections	40,705	37,934
Unique reflections	10,959 (1,071)	12,253 (1,158)
Redundancy	3.7 (3.7)	3.1 (2.6)
I/I(δ)	9.5 (2.0)	8.4 (1.6)
Completeness (%)	99.9 (99.9)	98.4 (92.9)
R-merge (%)	13.8 (56.4)	15.9 (44.7)
Structure refinement		
Software	Phenix1.9	Phenix1.9
Resolution range (Å)	44.22–3.00	44.10–3.00
R-factor (%)	19.7	22.8
Free-R (%)	27.2	28.4
RMSD bonds (Å)	0.017	0.015
RMSD angles (deg.)	1.471	1.642
Mean B Value (Å ²)	41.0	43.4
Protein chain	A, B	A, B
No. of protein residue	379, 379	379, 379
No. of water molecules	52	0

No. of molecules in an asymmetrical unit	1	1
PDB ID	6IQG	6IQH

ペプチドの合成

合成ペプチドは Fmoc 固相合成法により合成された。すべてのペプチドは C 末端側をアミド化している。保護基を除去した後、穏やかな酸化条件下で分子内 S-S 結合を形成させ、逆相 HPLC を用いて分子内 S-S 結合ペプチドを精製した。また、N 末端のビオチン化は、NHS-PEG4-Biotin を用いて合成した。

表面プラズモン共鳴による IgG-peptide の IgG への親和性解析

表面プラズモン共鳴 (SPR) による親和性解析は Biacore T200(GE Healthcare) を用いて、25°C の条件下で実施した。IgG (Trastuzumab) は CM5 センサーチップ (GE Healthcare) にアミンカップリング法を用いた装置プログラムを用いて、それぞれ RU = 10000 で固定化した。HBS-EP buffer (pH 7.4) (0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005 % tween) 中に調製した 2000 nM から 15.6 nM の範囲内で希釈した IgG 結合ペプチドをセンサーチップに 3 分間、流速 50 μ L/min で流し、結合を測定、10 分間 HBS-EP buffer (pH 7.4) を流し、解離を測定した。得られたセンサーグラムは、BIA evaluation software の 1:1 binding model を用いて解析し、親和性解析を行った。

IgG 結合ペプチドへの DSG コンジュゲートと精製

20 μ L の 20 mM ペプチドは 2 %ピリジンを含む DMSO 中に調製され、アセトニトリル中に調製された 500 mM DSG 80 μ L と混合した後に 50 °C で 3 時間インキュベートし、DSG を付加した。反応物は 250 倍量の 0.1 % TFA (trifluoroacetic acid) で希釈され、LC-forte(YMC)に接続された InertSustain C18 カラム(5 μ m 7.6 \times 250 mm column, GL Sciences)を用いた逆走クロマトグラフィーで分取した。分取時の流速は 4.0 mL/min で、グラジエント条件はアセトニトリル 13.5 % ~ 72 % (30 min) である。分取した生成物は遠心エバポレーターで 50 分間アセトニトリル除去操作を行った後に、凍結乾燥した。乾燥後のパウダーは DMSO に溶解

し、-20℃で保存した。

ビオチン標識ペプチドによって修飾された IgG の SDS-PAGE とウェスタンブロット

1.9 μ M の hIgG₁, hIgA₁, HSA を 5 倍量の DSG 修飾したビオチン化 IgG 結合ペプチド(NHS-IgG-BP-biotin)と PBS 中で反応させ、15 分反応させ、1 M Tris-HCl (pH 7.0)を加えた。各サンプルを 2-メルカプトエタノールで還元し、5-20 % Supersep グラジエントゲル (Waco)を用いて、SDS-PAGE した。泳動後、タンパク質はニトロセルロースメンブレンに転写し、0.5 % BSA にて blocking 後、SA-HRP、基質に Chemi-Lumi One(ナカライテスク)を用いて検出した。検出ならばに撮影は ChemiDOc XRS Plus(Bio-Rad)を用いて行った。

ESI-MS を用いた修飾個数分析とペプチドマッピング

ESI-MS 分析は ACQUITY UPLC I-Class FTN system (Waters) に接続された Xevo G2-XS QToF spectrometer (Waters) と Mass PREP Micro Desalting Column (2.1 \times 5 mm, Waters) を用いて Waters 株式会社への依頼分析によって実施された。ESI-MS 分析時のグラジエント条件は 0.1 %のギ酸を含むアセトニトリル 5 %~90 %で行った。Trastuzumab または trastuzumab-IgG-BP (50 μ g in 25 μ L of water)へ 25 μ L の 0.2% Rapigest SF (Waters)を混合し、2.6 μ L の 100 mM dithiothreitol (DTT, 終濃度 5 mM)を添加し、60 °Cで 30 分インキュベートした。インキュベート後、5.8 μ L の 150 mM iodoacetamide (終濃度 15 mM)を添加し、室温で 30 分間暗所においてインキュベートした。

ペプチドマッピングに使用するサンプルは、12.5 μ L の 0.2 μ g/ μ L トリプシンを加え、37 °Cで 3.5 時間インキュベート後、7.85 μ L の 5% TFA (終濃度 0.5%)を加え反応停止した。遠心後、サンプルは ACQUITY UPLC Peptide BEH130 C18 column (1.7 μ m, 2.1 \times 150 mm, Waters)を用いて質量分析された。分析時のグラジエント条件は 0.1 %のギ酸を含むアセトニトリル 0.1 %~90 %で行った (カラムオーブンは 60 °C)。

2-3 結果

IgG 結合ペプチドの X 線結晶構造解析

IgG 結合ペプチドの IgG 結合様式を明らかにするため、X 線結晶構造解析を行った。その結果、このペプチドは IgG Fc 領域の CH2, CH3 境界領域に結合していることが判明した (Fig.2-1)。また、このペプチドは 1 分子の Fc あたり 2 カ所結合サイトを有している。興味深いことに、このペプチドの結合サイト近傍には Lys 残基が存在し、これはペプチド側の 8 番目のアルギニンと 6.13 Å, の距離に位置しており、相互作用可能な位置関係にあった (Fig.2-2)。また、ペプチドの N 末端、C 末端領域はそれぞれ Fc 領域の外側を向いており、ペプチドの末端部位に様々な分子を修飾可能であることが示唆された。実際に、X 線結晶構造解析のデータを基に分子構造モデル解析を行ったところ、8 番目のアルギニンをリジンに置換した IgG 結合ペプチド (R8K) は DSG 架橋剤を介して抗体 Fc248 番目のリジンを介して共有結合を形成可能であることが判明した (Fig.2-3)。このことは、IgG 結合ペプチド (R8K) を抗体部位特異的な修飾が可能であることを示唆しており、ペプチド末端部位に機能性分子を修飾した状態で抗体へ結合することが可能であれば、抗体への部位特異的分子修飾架橋剤として利用することが可能となる。

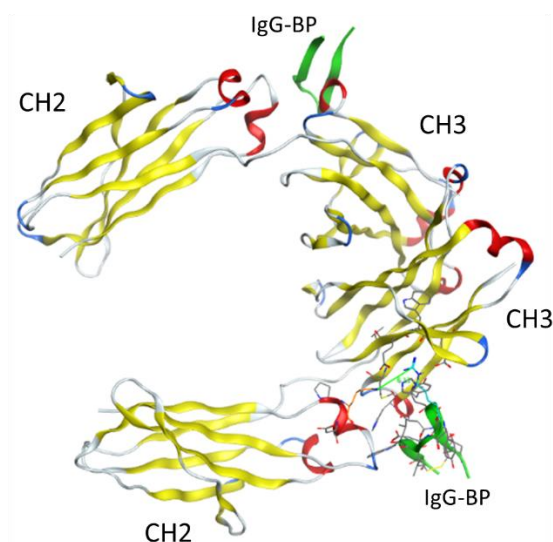


Fig.2-1 IgG 結合ペプチドと IgG-Fc 複合体の X 線結晶構造解析

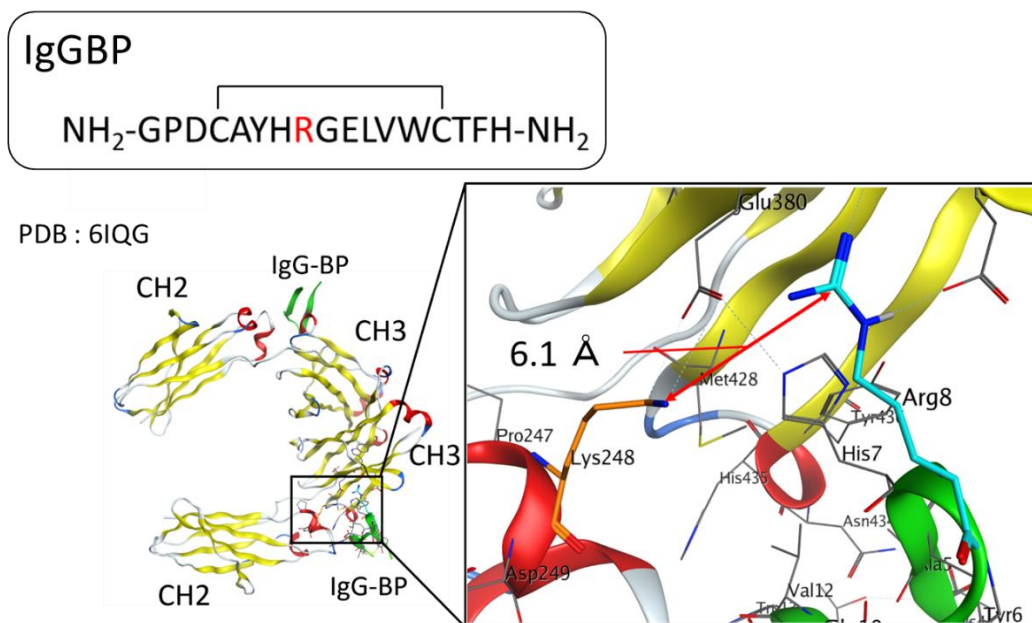


Fig.2-2. IgG 結合ペプチド内 Arg 残基と Fc 内の Lys 残基間の距離

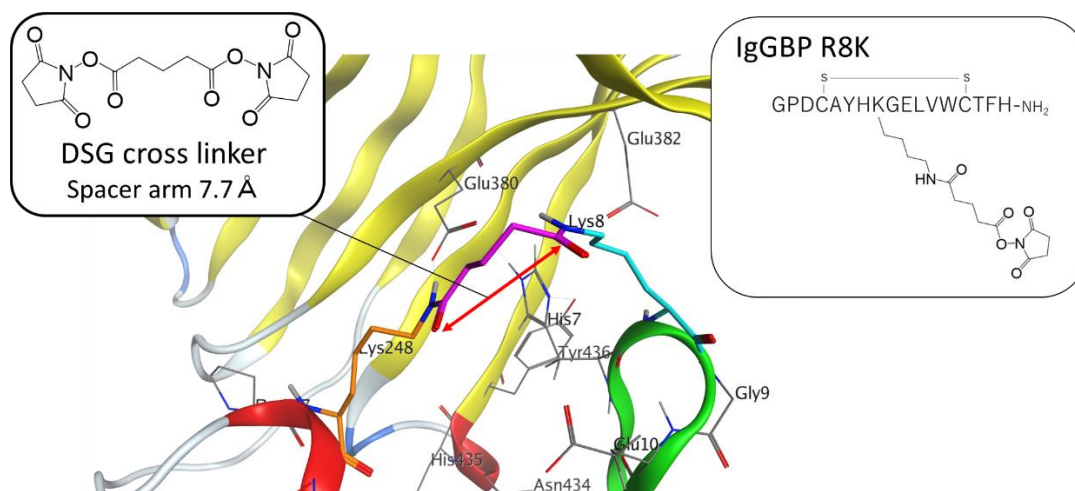


Fig.2-3 IgG 結合ペプチド(R8K)と Fc-248Lys 間の DSG 架橋モデル

IgG 結合ペプチドの結合親和性解析

IgG 結合ペプチドを介して IgG 抗体へ分子を修飾するためには 8 番目の Arg を Lys へ置換すること (R8K)、ペプチド末端に分子を修飾しておくことが必要となる。この 2カ所の改変が、ペプチドの親和性に与える影響を確認する必要がある。また、この IgG 結合ペプチドは分子内にジスルフィド結合を有していることから、末端にチオール基を導入することが制限されていた。これは分

子内でジスルフィド結合のシャッフリングが起こる可能性によるものである。しかし、チオール基はマレイミドを介した分子修飾の標的官能基として非常に簡便に利用できることから、チオール基を導入可能なペプチドデザインとして分子内ジスルフィド結合をジクロロアセトンで不可逆的に架橋したデザインを考案した。筆者は最初に IgG 結合ペプチドならびに分子修飾 IgG 結合ペプチド、ジクロロアセトン架橋ペプチドの IgG への親和性を解析した。Biacore T200 を用いて、CM5 センサーチップへ IgG 抗体医薬品である Trastuzumab を固相化し、アナライトとして IgG 結合ペプチド (NH₂-PEG₄-GPDCAYHRGELVWCTFH-NH₂) または、ジクロロアセトン架橋ペプチド (NH₂-PEG₄-GPDCAYHRGELVWCTFH-NH₂) (Cys 残基間はジクロロアセトン架橋) を用いた。結果として、IgG 結合ペプチド (8R) は 15 nM (Fig.2-4 A)、ジクロロアセトン架橋 IgG 結合ペプチド (8R) は 6800 nM (Fig.2-4 B) の親和性でそれぞれ IgG 抗体と結合可能であることを確認した (Fig.2-4) (Table 2-2)。

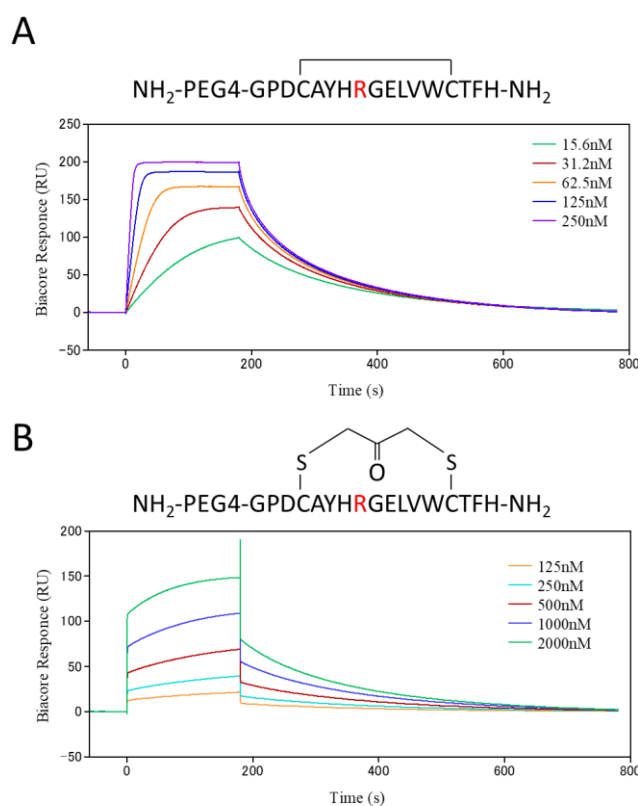


Fig.2-4 IgG 結合ペプチドの結合親和性解析

Table 2-2 各 IgG 結合ペプチドの IgG への結合親和性

peptide	Ka (/Ms)	Kd (/s)	KD (nM)
IgG binding peptide	5.5×10^5	0.14	15
IgG binding peptide (Aceton)	7.5×10^2	0.005	6800

抗体とペプチド間での部位特異的共有結合の形成

我々は、IgG 結合ペプチドのアミノ酸置換体 (R8K) に種々の機能性分子を修飾した上で、IgG-Fc 248 と共有結合させることで、抗体への部位特異的な修飾法へと応用することができると考えた (Fig.2-5)。この手法の利点として、これまでは抗体側の構造変化や、非天然アミノ酸の導入などの手法に限られていた抗体部位特異的修飾を抗体側の改変を伴うことなく達成可能となること。ペプチド末端のデザインが自由に行えることから、様々な官能基を介した多様な分子修飾に対応可能であることが挙げられる。我々は最初に抗体へ修飾される分子として代表的な機能性分子であるビオチンをこの IgG 結合ペプチド (R8K) の N 末端領域に修飾した状態 (Fig.2-6A) で IgG-Fc 領域との間で DSG を介した共有結合が形成されるかどうか評価を行った。hIgG, hIgA, HSA 各 5 μ g とビオチン修飾 IgG 結合ペプチド (R8K) 250 ng を 5 分間反応させ、Tris-HCl (pH7.0) で反応停止した後に、各サンプルを 2-メルカプトエタノールで還元し SDS-PAGE とウェスタンブロッティングを行い、ストレプトアビジン-HRP によって抗体に共有結合でコンジュゲートされたペプチドを検出した (Fig.2-6B)。結果として、このビオチン修飾 IgG 結合ペプチドは IgG 抗体と共有結合した状態で検出された。また、この反応は IgA ならびに HAS に対しては起こっておらず、反応の特異性も確認された。さらに、この反応は IgG 結合ペプチドの結合様式から推測されるように 1 分子の IgG に対し 1 価または 2 価のコンジュゲート産物を生成する。生成物反応物を陽イオン交換クロマトグラフィーで分析した結果 (Fig.2-7)、得られたパターンから 1 価、2 価の生成物を容易に分取精製することが可能であること、3 価以上の反応物が生じていないことも判明した。我々

は、この IgG ペプチドを用いた新規抗体部位特異的修飾法を CCAP 法 (Chemical Conjugation by Affinity Peptide) と命名した。

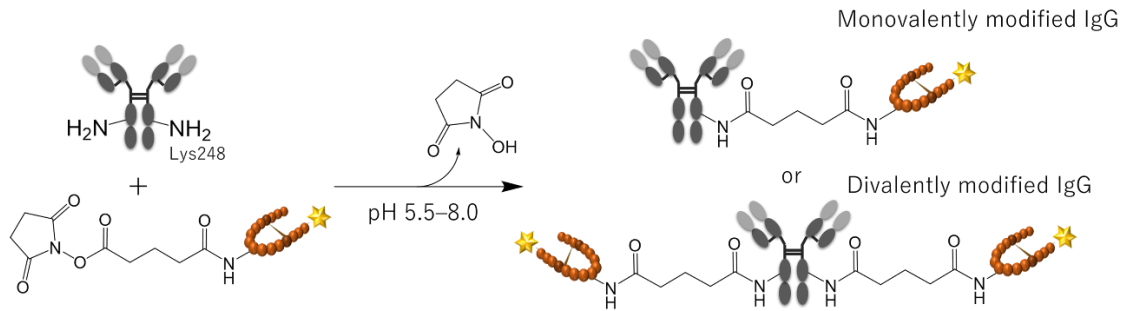


Fig.2-5 IgG 結合ペプチドを介した IgG-Fc 部位特異的な分子修飾

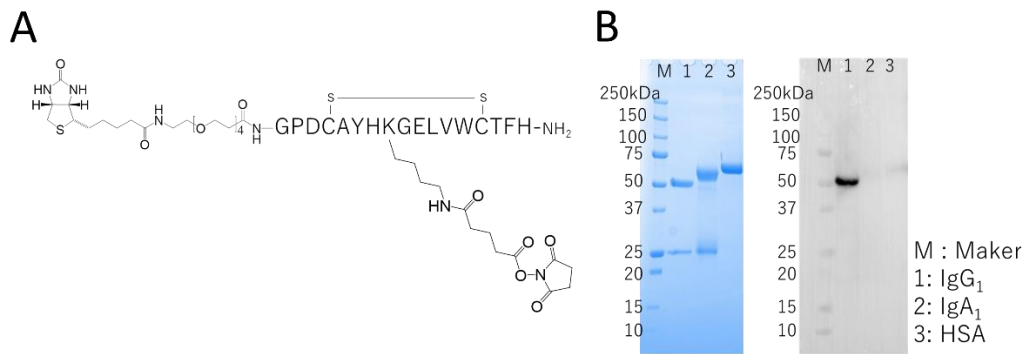


Fig.2-6 IgG-Fc 特異的なビオチン修飾を SDS-PAGE と
ウェスタンブロッティングによって評価

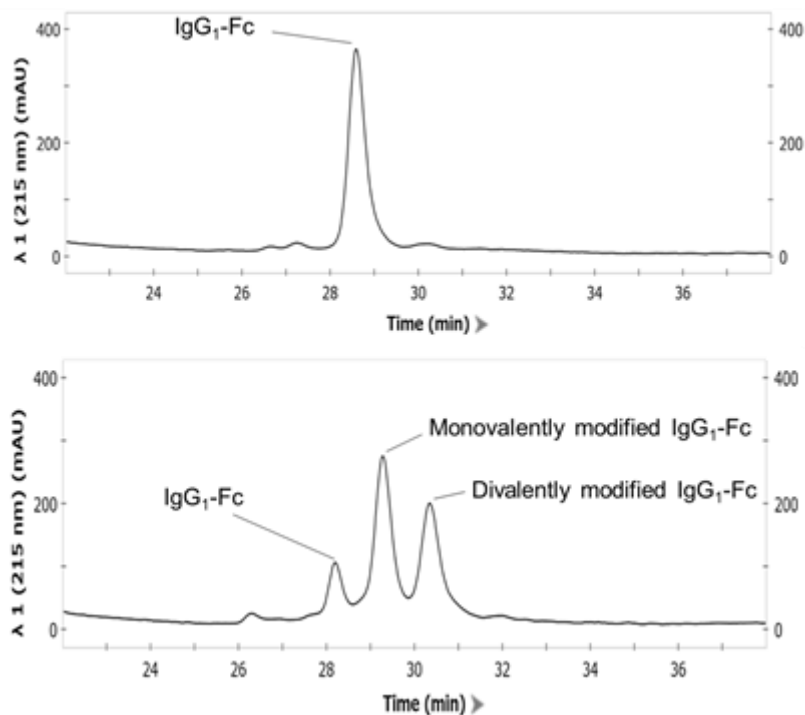


Fig.2-7 陽イオン交換クロマトグラフィーによる
IgG-peptide コンジュゲートの形成確認

ペプチドマッピングによる CCAP 法の部位特異性を評価

CCAP 法によるペプチド修飾の特異性を評価するために実施した ESI-MS 分析に際し、Trastuzumab へ修飾した IgG-BP の構造を示す (Fig.2-8)。このペプチドを Trastuzumab へ 2 価で修飾したものを ESI-MS で分析を行った (Fig.2-9)。予想された分子量の増加はペプチド 2 分子 - 水 2 分子 ($2116.36 \times 2 - 18.00 \times 2$) であり、増加後の分子量は 152255.89 と予想された。結果は、152255.75 であり、予測通り、IgG-BP が IgG に対し 2 価で修飾されていることが明らかとなった。引き続き、CCAP 法による修飾が重鎖特異的であることを確認するため、IgG-BP 修飾後の Trastuzumab を還元処理し、分析を行った。還元処理を行っているため、修飾された IgG-BP は還元された状態となっている (Fig.2-10)。予想された分子量の増加は重鎖において、ペプチド 1 分子 - 水 1 分子 ($2118.36 - 18.00$) であり、増加後の分子量は 52693.89 と予想された。結果は、52693.76 であり (Fig.2-11)、予測通り、IgG-BP が重鎖 1 分子に対し、1 価で修飾されていることが明らかとなった。また、軽鎖の分子量に変化はなく、修飾が重鎖

特異的であることを確認できた。

ペプチドマッピング分析に際し、トリプシン消化によって生じる Trastuzumab のペプチド断片を下記表に示した (Table 2-3)。また、Lys248 を含む IgG-BP 修飾前の配列をと IgG-BP が修飾されたことによって生じるペプチド断片の構造 (Fig.2-12) と予想分子量を示した (Fig.2-13)。IgG-BP が修飾されたアミノ酸残基が Lys248 であることを特定するために、還元後、ヨードアセトアミドで Cys 残基を修飾し、トリプシン消化したサンプルを用いて ESI-MS で分析とペプチドマッピングによる解析を行った (Fig.2-14)。結果として Trastuzumab 分析時に特有のピーク X と Trastuzumab-IgG-BP 分析時特有のピーク Y を確認する事ができた。また、ピーク X (2844.46) の分子量が T20 (2845.38)、ピーク Y (5873.83) の分子量が T20-21-IgG-BP (5876.81) と同様であることを確認することができた (Table 2-4)。この結果より、結晶構造解析から予測されていたように CCAP 法によるペプチド修飾が Lys248 特異的であることが示された。また、実際に IgG-BP を修飾したサンプルを用いた結晶構造解析によっても修飾位置が Lys248 であることが確認されている (Fig.2-15)。

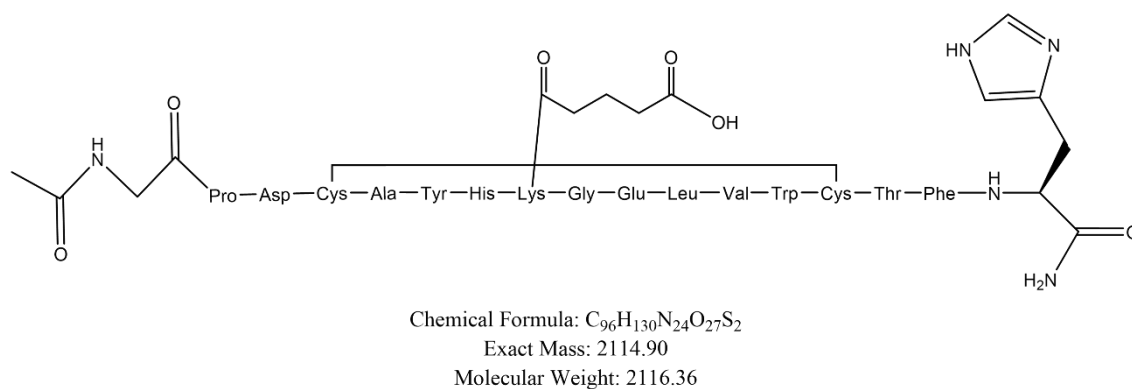


Fig.2-8 修飾に用いた IgG-BP (分子内 S-S 結合は酸化状態)

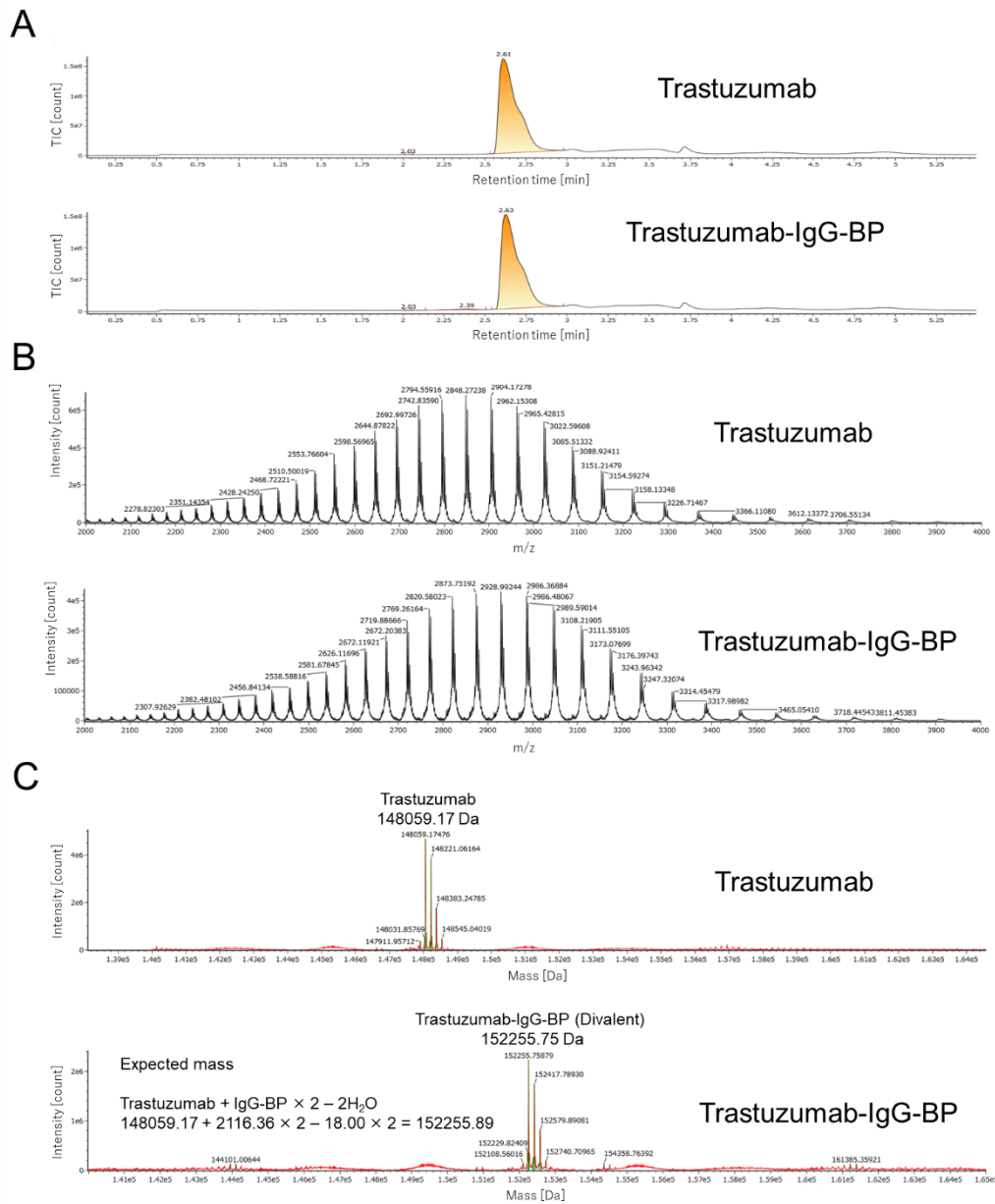
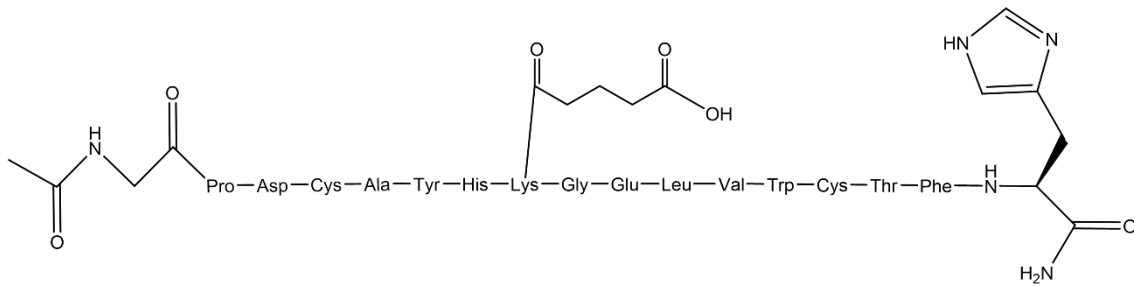
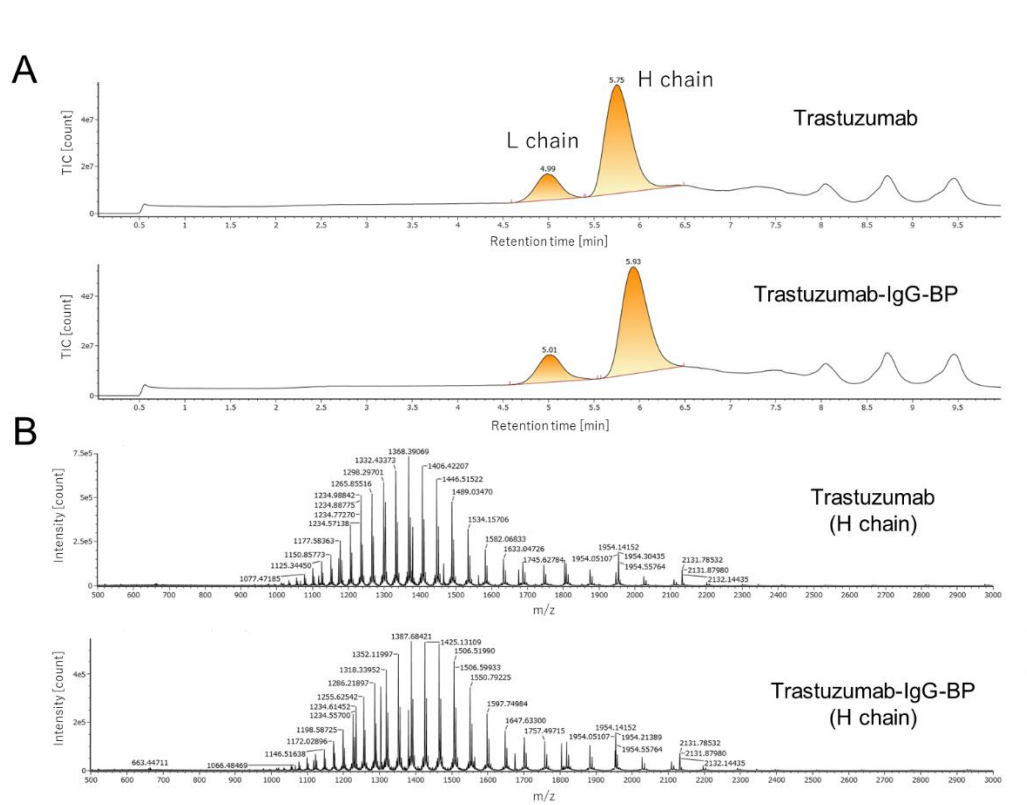


Fig.2-9 A) Trastuzumab ならびに IgG-BP で修飾された Trastuzumab の MassPREP micro desalting column (2.1 × 5 mm, Waters)分離時の TIC(Total ion chromatograms) B) MS spectra C) デコンボリューション後の MS スペクトル



Chemical Formula: $C_{96}H_{132}N_{24}O_{27}S_2$
 Exact Mass: 2116.91
 Molecular Weight: 2118.37

Fig.2-10 修飾に用いた IgG-BP (分子内 S-S 結合は還元状態)



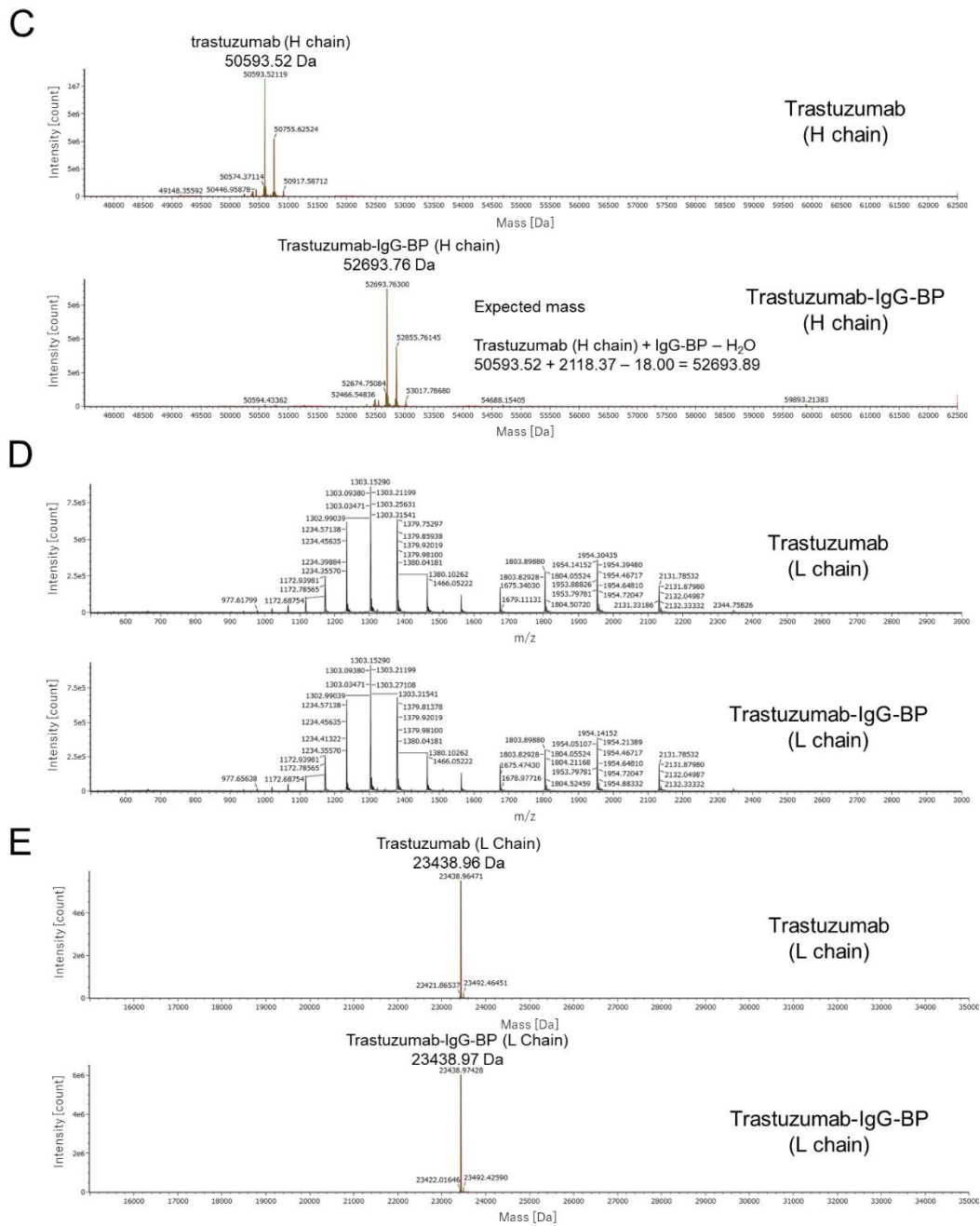
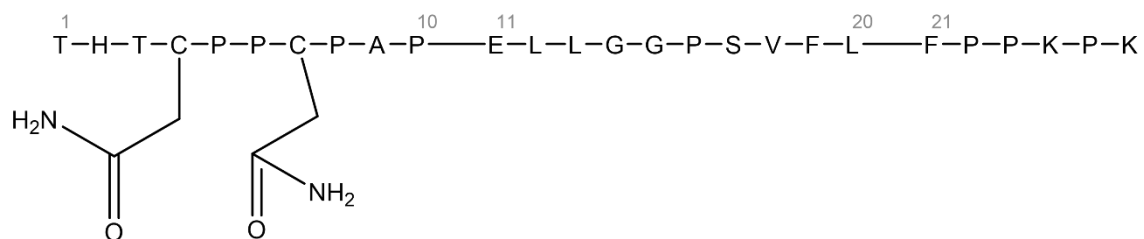


Fig.2-11 A) 還元された Trastuzumab ならびに IgG-BP で修飾された Trastuzumab の MassPREP micro desalting column (2.1 × 5 mm, Waters)分離時の TIC(Total ion chromatograms) B) 重鎖の MS spectra C) デコンボリューション後の重鎖 MS スペクトル D) 軽鎖の MS spectra E) デコンボリューション後の軽鎖 MS スペクトル

Table 2-3 トリプシン消化によって生じる Trastuzumab の消化断片

	Position	Modification	Sequence		Position	Modification	Sequence
T1	1-19		EVQLVESGGGL VQPGGSLR	T22	259-277	Cys_CAM: 264	TPEVTCVVVDVS HEDPEVK
T2	20-30	Cys_CAM: 22	LSCAASGFNIK	T23	278-291		FNWYVDGVEVH NAK
T3	31-38		DTYIHWVR	T24	292-295		TKPR
T4	39-43		QAPGK	T25	296-304		EEQYNSTYR
T5	44-50		GLEWVAR	T26	305-320		VVSVLTVLHQD WLNK
T6	51-59		IYPTNGYTR	T27	321-323		EYK
T7	60-65		YADSVK	T28	324-325	Cys_CAM: 324	CK
T8	66-67		GR	T29	326-329		VSNK
T9	68-76		FTISADTSK	T30	330-337		ALPAPIEK
T10	77-87		NTAYLQMNSL R	T31	338-341		TISK
T11	88-98	Cys_CAM: 96	AEDTAVYYCSR	T32	342-343		AK
T12	99-124		WGGDGFYAMD YWGQGLTVT SSASTK	T33	344-347		GQPR
T13	125-136		GPSVFPLAPSS K	T34	348-358		EPQVYTLPPSR
T14	137-150	Cys_CAM: 147	STSGGTAALGC LVK	T35	359-363		EEMTK
T15	151-213	Cys_CAM: 203	DYFPEPVTVSW NSGALTSGVHT FPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSS SLGTQTYICNV	T36	364-373	Cys_CAM: 370	NQVSLTCLVK

			NHKPSNTK				
T16	214-216		VDK	T37	374-395		GFYPSDIAVEWE SNGQPENNYK
T17	217-217		K	T38	396-412		TTPPVLDSDGSFF LYSK
T18	218-221		VEPK	T39	413-417		LTVDK
T19	222-225	Cys_CAM: 223	SCDK	T40	418-419		SR
T20	226-251	Cys_CAM: 229,232	THTCPPCAPE LLGGPSVFLFP PKPK	T41	420-442	Cys_CAM: 428	WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ K
T21	252-258		DTLMISR	T42	443-449		SLSLSPG



Chemical Formula: $C_{132}H_{202}N_{32}O_{34}S_2$

Exact Mass: 2843.45

Molecular Weight: 2845.38

Fig.2-12 トリプシン消化によって生じる T20 ペプチドの構造と Mass

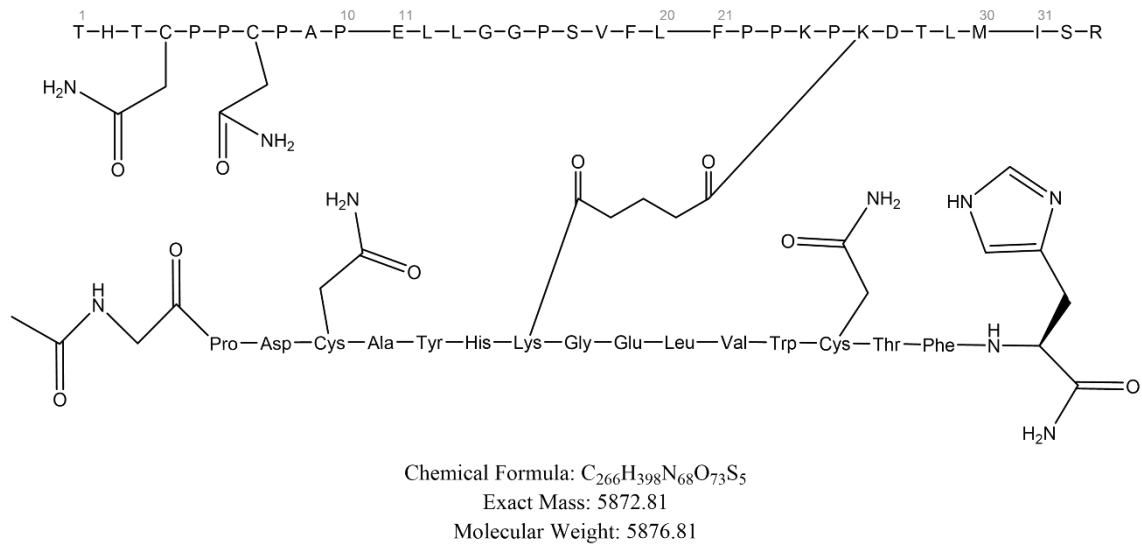


Fig.2-13 トリプシン消化によって生じる T20-21-IgG-BP ペプチドの構造と Mass

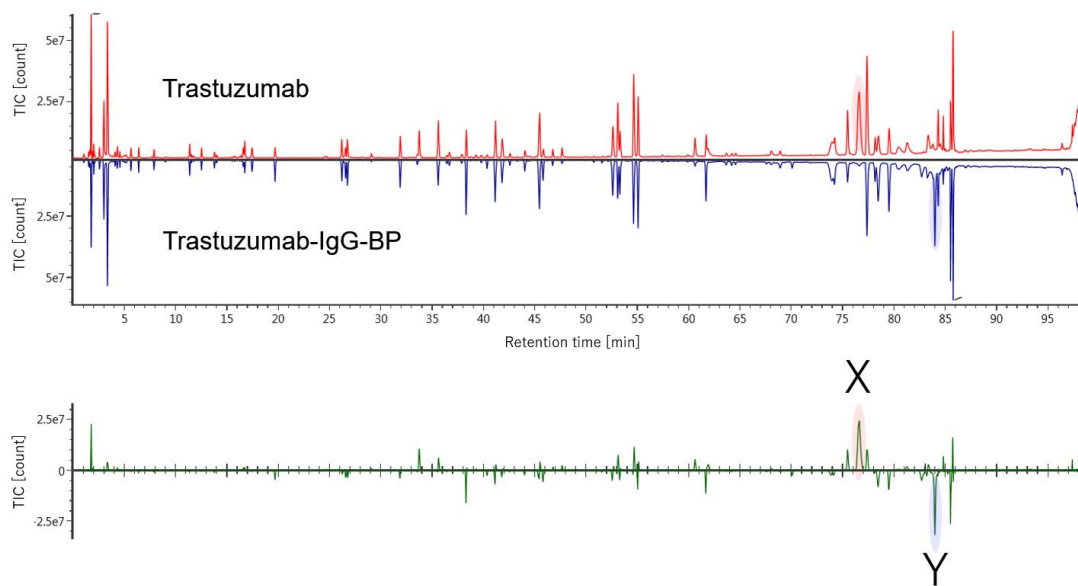


Fig.2-14 トリプシン消化産物の TIC(Total ion chromatograms)と Trastuzumab 分析時と Trastuzumab-IgG-BP 分析時の差分クロマトグラム

Table 2-4 トリプシン消化後、ピーク X、Y において検出された mass

Peak	Actual mass (Da)	RT (min)	Assignment	Expected mass (Da)
X	2844.46	76.61	T20 (Fig. 2-10)	2845.38
Y	5873.83	84.00	T20-T21-IgG-BP (Fig. 2-11)	5876.81

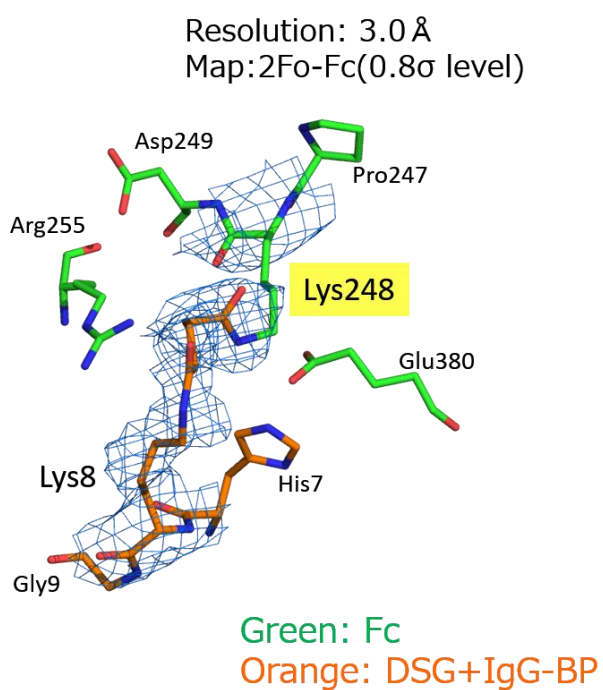


Fig.2-15 IgG-IgG-BP コンジュゲートの X 線結晶構造解析

2-4 まとめと考察

結晶構造解析の結果から予想されたように、IgG-Fc 結合ペプチド (GPDCAYHRGELVWCTFH) の 8 番目の Arg を Lys に置換したペプチド (GPDCAYHKGELVWCTFH) を用いて、IgG-Fc 部位特異的にペプチドをアミド結合により修飾することができた。この修飾反応は IgG 特異的であり、IgG、IgA、HSA と DSG 修飾したペプチドを混合した際に IgG のみに修飾反応が起こり、IgA や HSA とは結合が形成されないことを実証することができた (Fig.2-6)。また、ペプチドマッピングの結果より、CCAP 法による修飾が IgG 248 Lys 特異的に形成されることを実証することができた。

CCAP 法によって作製したコンジュゲートの評価や精製を容易にするため、ペプチド N 末端領域に Arg を 2 つ付加することで、ペプチドの正電荷を増強することができ、ペプチド修飾 IgG (1 価または 2 価) を陽イオン交換クロマトグラフィーで容易にピークを分離することができた (Fig.2-7)。N 末端側に追加のアミノ酸として Arg や Glu を導入することで、電荷を持たせることも可能である。

第 3 章

CCAP 法による抗体修飾が 抗体機能へ与える影響

第3章 CCAP 法による抗体修飾が抗体機能へ与える影響

3-1 緒言

CCAP 法による分子修飾は IgG 抗体 Fc 部位特異的であることが前章の結果より判明した。Fc 部位への修飾は抗体の抗原結合能に影響を与えないと考えられ、抗原結合部位へも修飾が起こりうるアミンカップリング法と比較して有利であると考えた。この仮説を実証するため、CCAP 法による分子修飾とアミンカップリング法による分子修飾が IgG 抗体の抗原結合能にどのような影響を及ぼすか確認することを目的として SPR 解析による検証を行った。

また、CCAP 法に使用される IgG 結合ペプチド (GPDCA₂YHK₂GELVWCTFH) の結合エピトープは IgG 抗体の体内半減期延長に関わる受容体である FcRn の結合部位と重なっている。そのため、FcRn ならびに免疫細胞の活性化に関わる受容体で FcRn 同様 IgG 抗体 Fc 部位と結合する FcγRI、FcγRIIIa 結合能への影響も SPR 解析によって確認を行った。

CCAP 法による修飾では、ペプチドを介して抗がん剤や放射性核種導入用のキレート剤の修飾を行う。そのため、ペプチドだけを修飾した状態ではなく、実際に抗がん剤やキレート剤を CCAP 法によって修飾した最終的に医薬品として利用を想定した状態で抗体の抗原結合が維持されているか確認を行った。また、IgG 結合ペプチドは内部にジスルフィド結合を有しているが、このジスルフィド結合をジクロロアセトンで架橋したペプチドも利用可能である。ジクロロアセトン架橋ペプチドは N 末端領域に Cys 残基を追加し、Maleimide を介して分子修飾を可能とするために設計した。ジスルフィド結合を有するペプチドを用いてキレート剤である Deferoxamine 修飾を行った Trastuzumab と、ジクロロアセトン架橋ペプチドを用いて Deferoxamine 修飾を行った Trastuzumab を用いてペプチド形態が抗原結合能に与える影響を確認することを目的とした SPR 解析も実施した。

3-2 材料と方法

表面プラズモン共鳴による IgG-peptide コンジュゲートの FcR への親和性解析

表面プラズモン共鳴 (SPR) による親和性解析は Biacore T200(GE Healthcare) を用いて、25°Cの条件下で実施した。Fc 受容体 (FcRn, FcγRI, FcγRIIIa) (R&D Systems) は CM5 センサーチップ (GE Healthcare) にアミンカップリング法を用いた装置プログラムを用いて、それぞれ RU = 500 で固定化した。HBS-EP buffer (pH 6.0) 中に調製した 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12.5 nM, 6.25 nM の IgG またはペプチド修飾 IgG をセンサーチップに 3 分間、流速 50 μL/min で流し、結合を測定、10 分間 HBS-EP buffer (pH 6.0) を流し、解離を測定した。得られたセンサーグラムは、BIA evaluation software の 1:1 binding model を用いて解析し、親和性解析を行った。

FcγRIIIa を介した ADCC シグナル伝達アッセイ

各濃度に希釈した Trastuzumab, Trastuzumab-1pep, Trastuzumab-2pep の SK-BR3(HER2⁺)細胞と C6(HER2⁻)細胞によって誘導される FcγRIIIa 下流シグナルを、ADCC Reporter Bioassay, Core Kit(Promega) を使用し、製品の説明書通りに測定を行った。シグナル伝達によって誘導されたルシフェラーゼの検出は、75 μL の Bio-Glo™ Luciferase Assay Reagent を加えた 30 分後に EnSight™ プレートリーダー(PerkinElmer)を用いて検出した。

DBCO 修飾 Trastuzumab の調製

実験に用いたペプチドの配列は (Ac-CRR-PEG4-GPDCAYHKGELVWCTFH-NH2) となっており、N 末端の cys 残基がフリーの状態かつ、残りの Cys ペアがジクロロアセトンで架橋された状態で合成された。ペプチドは 100 mM で DMSO 中に調製され、DMSO 中に調製された 100 mM の DBCO-maleimide とモル比 1:3 で反応された (final peptide:25mM, DBCO-maleimide:75mM)。反応溶液に peptide:DSG = 1:30 となるようにアセトニトリル中に調製された 500 mM DSG を添加し、50°Cで 3 時間インキュベートした。反応物は LC-forte(YMC)と InertSustain C18 (5 μm 7.6 × 250 mm column, GL Sciences)を用いた逆走クロマトグラフィーで分取した。分取した生成物は遠心エバポレーターで 50 分間アセ

トニトリル除去操作を行った後に、凍結乾燥した。乾燥後のパウダーは DMSO に溶解した。ペプチド濃度は LC-MS(Shimadzu, LCMS8030)と ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μ m 2.1 \times 100 mm column (Waters)を用いた分析によって、吸光度により濃度を同定済みの DBCO 未修飾ペプチドとの面積比の比較で同定した。

Trastuzumab は 10 mM HEPES buffer (pH7.0)中に 16 μ M/150 μ L で調製され、4.46 mM の DBCO 修飾 IgG 結合ペプチド 4.3 μ L と室温で 2 時間反応させ (モル比 IgG:peptide = 1:8)、2 価のコンジュゲート体を作製した。ビバスピнкаラム (GE Healthcare MWCO:10,000) を用いた脱塩操作によって未反応のペプチドを除去し、10mM HEPES buffer (pH 7.0)中に 4.7 μ M で調製した。

従来のアミンカップリング法によって IgG 抗体へ DBCO を修飾するため、16 μ M の Trastuzumab 100 μ L に DMSO 中に調製した DBCO-PEG4-NHS(Click Chemistry Tools #A134)10 mM を 0.8 μ L(抗体:試薬モル比 = 1:5)または 1.6 μ L(抗体:試薬モル比 = 1:10)で室温 1 時間反応させ、余った試薬を除くため、ビバスピнкаラム (GE Healthcare MWCO:10,000) を用いた脱塩操作を行い、10 mM HEPES buffer (pH 7.0)にそれぞれ、3.4 μ M (モル比 1:5)、3.38 μ M (モル比 1:10)で調製した。

表面プラズモン共鳴による分子修飾 Trastuzumab の Her2-Fc への親和性解析

表面プラズモン共鳴 (SPR) による親和性解析は Biacore T200 (GE Healthcare) を用いて、25 $^{\circ}$ C の条件下で実施した。Her2-Fc (Sino Bio) は CM5 センサーチップ (GE Healthcare) にアミンカップリング法を用いた装置プログラムを用いて、それぞれ RU = 100 で固定化した。HBS-EP buffer (pH 7.4) (0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005 % tween) 中に調製した 10 nM から 0.31 nM の範囲内で希釈した Trastuzumab またはコンジュゲート体をセンサーチップに 3 分間、流速 50 μ L/min で流し、結合を測定、10 分間 HBS-EP buffer (pH 7.4) を流し、解離を測定し、Glycin-HCl (pH 2.0) で 5 秒、2 回の再生処理を行った。得られたセンサーグラムは、BIA evaluation software の 1:1 binding model を用いて解析し、親和性解析を行った。

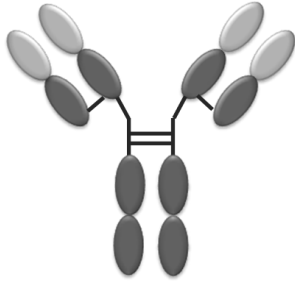
3-3 結果

Fc 受容体に対する結合能への影響

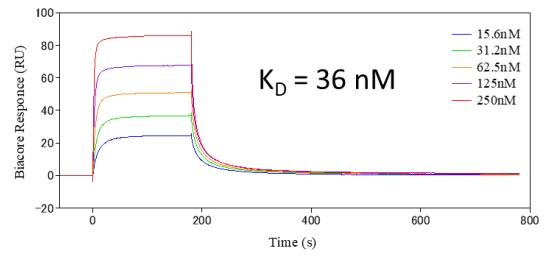
CCAP 法では抗体の Fc 領域に修飾を行うため、抗体の Fc 領域が有する生物学的機能へ影響を与える可能性が憂慮された。特に、この IgG 結合ペプチドのエピトープは抗体の体内リサイクリング機構に関わる FcRn の結合サイトと重なっているため、2 価の抗体ペプチドコンジュゲート体は FcRn への結合能を失っていると予想された。そこで、我々は各種 Fc 受容体に対する IgG と IgG-peptide コンジュゲートの結合親和性を比較した (Fig.3-1A-C)。表面プラズモン共鳴による親和性解析の結果、予想通り 2 価のペプチドコンジュゲート抗体は FcRn に対する結合能が失われていた (Fig.3-1C)。このことから、2 価の抗体ペプチドコンジュゲート体は FcRn への結合能の欠損から減少した体内半減期という性質を示すであろうと推測される。一方で、FcγRI や FcγRIIIa への結合親和性はいずれのコンジュゲート体においても損なわれていなかった (Fig.3-1)。興味深いことに、FcγRIIIa への結合親和性はコンジュゲートの価数が多くなるにつれ、強くなっていた (Table 3-1)。この結果から、抗体ペプチドコンジュゲート体は免疫細胞の活性化ならびに ADCC 活性の誘導といった抗体医薬品として重要な性質を保持していることが推測され、抗体ペプチドコンジュゲート体では FcγRIIIa への結合親和性が未修飾の抗体よりも向上されていたことから、ADCC 活性が増強されている可能性が示唆された。そこで、細胞表面に FcγRIIIa を発現させ、受容体シグナル伝達をルシフェラーゼ遺伝子の発現で検出可能な Jurkat/NFAT-*luc* + FcγRIIIa 細胞、標的細胞として、SKBR3(Her2⁺)、抗体は抗 Her2 抗体である Trastuzumab を用いて各コンジュゲート体による ADCC シグナル伝達を観察した (Fig.3-2)。結果、ペプチドの価数が増えるにつれ EC50 値は減少した (Table 3-2)。この結果は表面プラズモン共鳴による FcγRIIIa への親和性解析の結果とも相関しており、ペプチドコンジュゲートによって ADCC 活性が増強されることが示された。

A

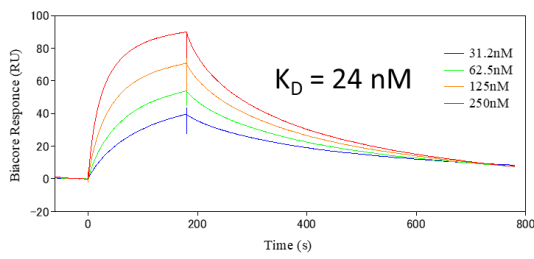
Trastuzumab



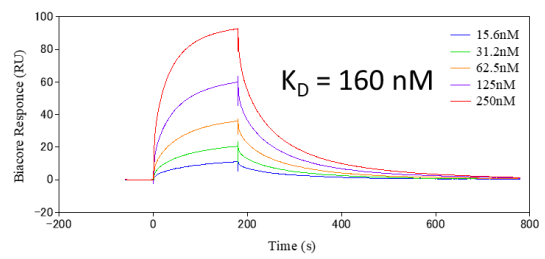
FcRn



FcγRI

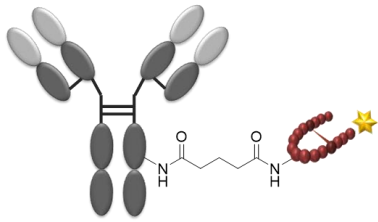


FcγRIIIa

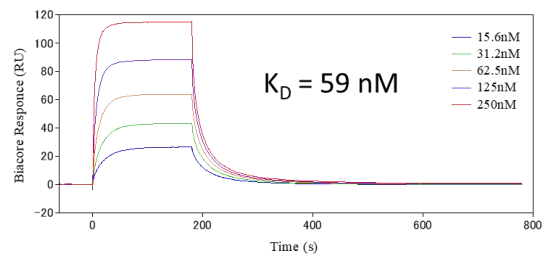


B

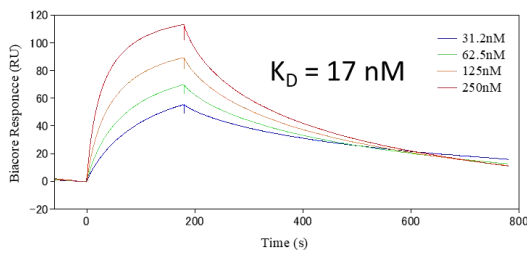
Trastuzumab + 1peptide



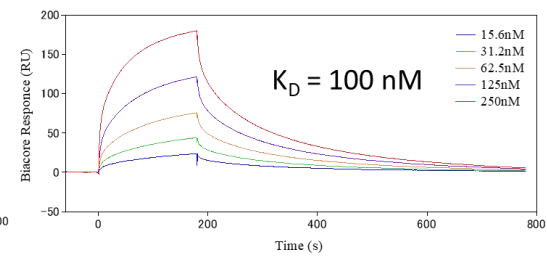
FcRn



FcγRI



FcγRIIIa



C

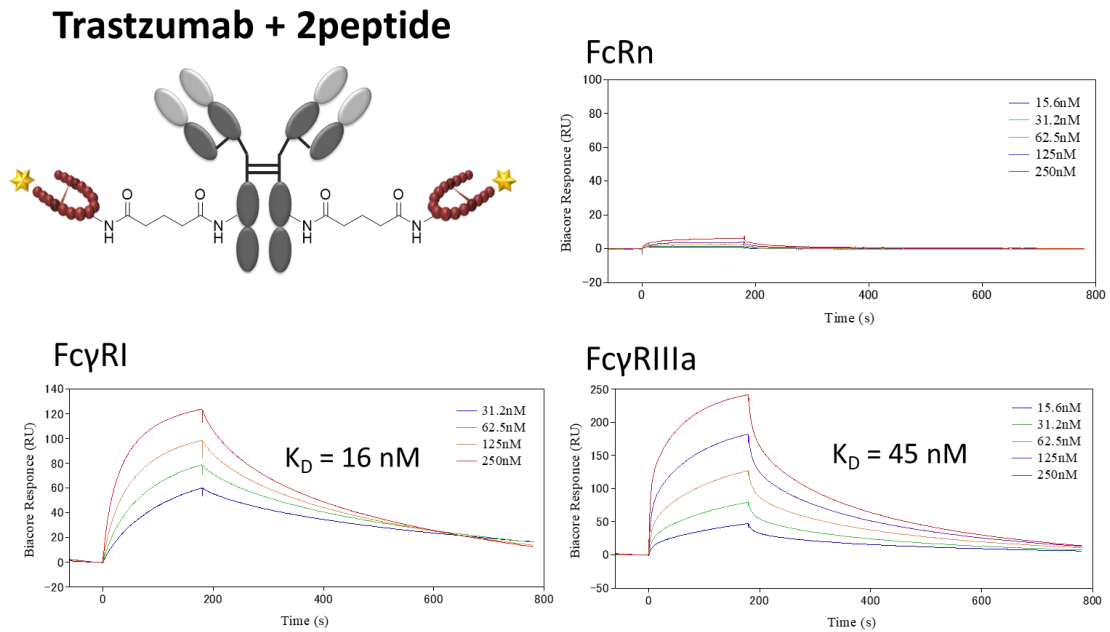


Fig.3-1 CCAP 法による peptide 修飾が FcR への親和性に与える影響

Table 3-1 CCAP 法によって peptide 修飾した Trastuzumab の各 FcR への親和性比較

	Trastuzumab	Trastuzumab + 1peptide	Trastuzumab + 2peptide
FcRn	$K_D = 36 \text{ nM}$	$K_D = 59 \text{ nM}$	-
FcγR I	$K_D = 24 \text{ nM}$	$K_D = 17 \text{ nM}$	$K_D = 16 \text{ nM}$
FcγR IIIa	$K_D = 160 \text{ nM}$	$K_D = 100 \text{ nM}$	$K_D = 45 \text{ nM}$

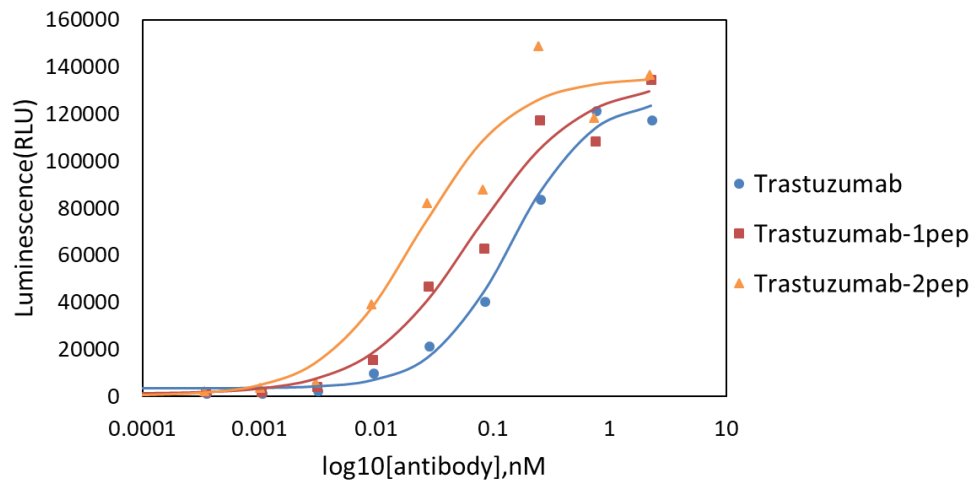


Fig.3-2 CCAP 法によって peptide 修飾した Trastuzumab の ADCC 活性シグナル伝達試験

Table 3-2 CCAP 法による peptide 修飾は ADCC 活性シグナルを増強する

Antibody	EC ₅₀ (nM)
Trastuzumab	0.118
Trastuzumab-1pep	0.064
Trastuzumab-2pep	0.022

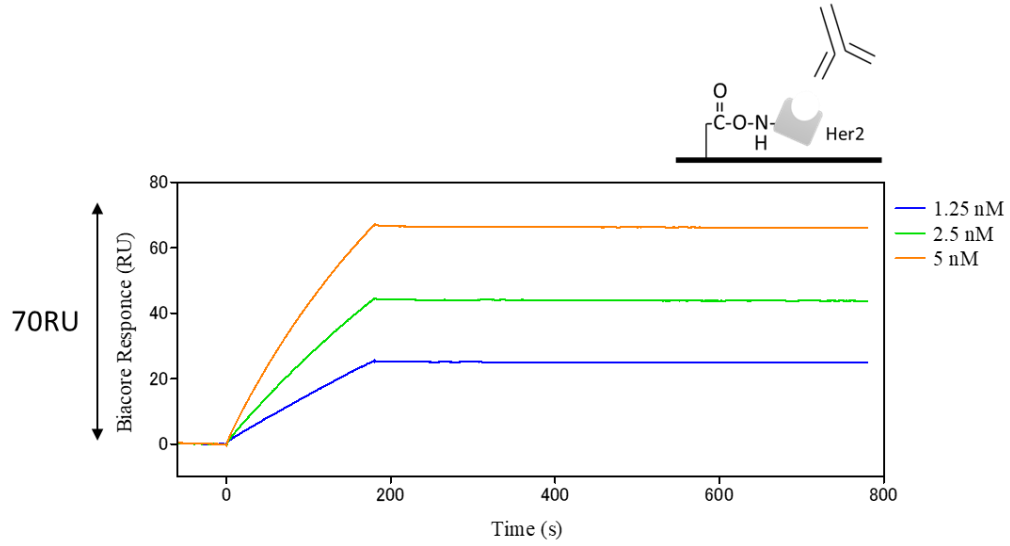
アミンカップリング法との抗体結合活性比較

CCAP 法による抗体への分子修飾は、抗体の Fc 領域で形成されるため、抗体結合部位と干渉せず、抗原結合能へ影響を与えない。一方、従来のアミンカップリング法による抗体修飾は抗体表面上のランダムな Lys 残基に形成されるため、抗原結合能に影響を及ぼす可能性があった。

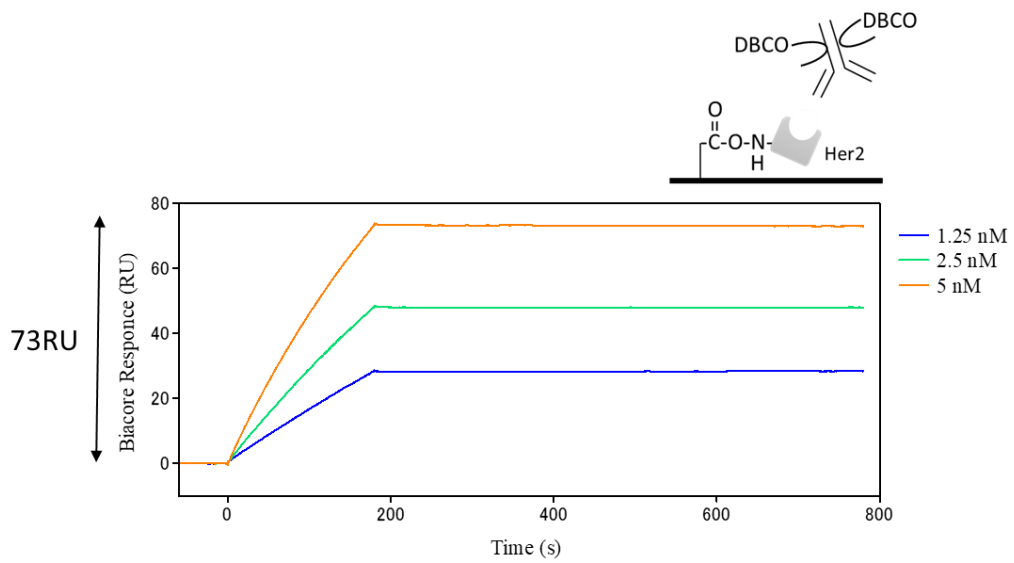
実際にこの予想を検証するため、センサーチップ上へ抗原を固相化し、アナライトとして DBCO 修飾抗体を反応させることで、DBCO 修飾による抗体親和性への影響を確認する事ができる。実際に、CM5 センサーチップにアミンカップリング法で Her2-Fc を固相化し、アナライトとして DBCO 修飾 Trastuzumab を反応させた (Fig.3-3)。得られたセンサーグラムを比較したところ、CCAP 法

によって DBCO 修飾した Trastuzumab を 5 nM でリガンドとしてアプライした結果、73 RU のレスポンスが得られた。また、未修飾の Trastuzumab では 70 RU、アミンカップリング法で DBCO-PEG4-NHS を修飾した Trastuzumab の場合、IgG : DBCO-PEG4-NHS = 1 : 5 で調製したサンプルでは 55 RU、IgG : DBCO-PEG4-NHS = 1 : 10 で調製したサンプルでは 45 RU のレスポンスがそれぞれ得られた。この結果から、アミンカップリング法による修飾では修飾価数に応じて親和性の低下が起こっていることを確認した。一方、CCAP 法によって DBCO 修飾した Trastuzumab ではレスポンスの低下が確認されず、むしろ 3 RU レスポンスが増加した。このレスポンスの上昇は抗体 (150kDa) にペプチド (3 kDa × 2) が結合し、分子量が約 4 % 増加したことに起因している。70 RU のレスポンスが 4 % 増加すると、72.8 RU となる。この結果より、CCAP 法によって調製したコンジュゲートでは抗原との結合能が阻害されないことを実証することができた。

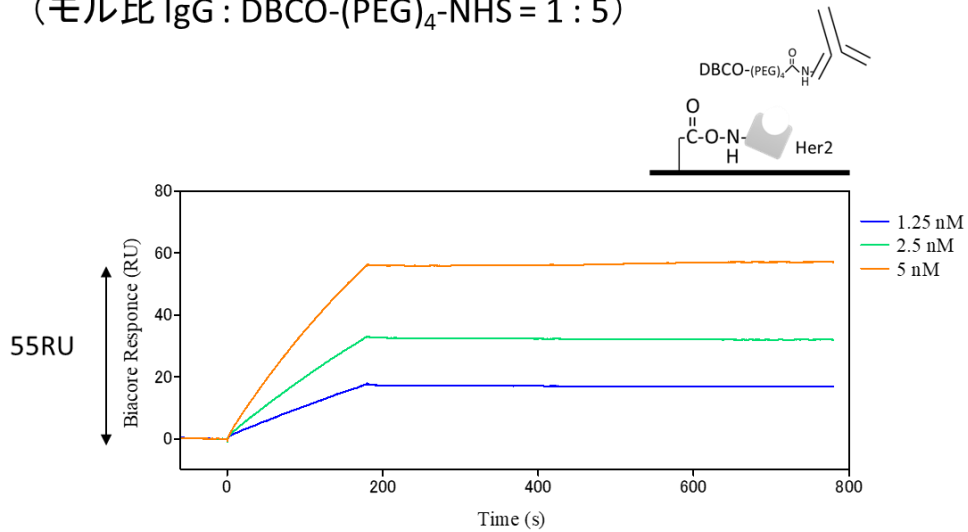
A Trastuzumab



B CCAP法によってDBCO修飾したTrastuzumab



C アミンカップリング法で DBCO 修飾した Trastuzumab
(モル比 IgG : DBCO-(PEG)₄-NHS = 1 : 5)



D アミンカップリング法で DBCO 修飾した Trastuzumab
(モル比 IgG : DBCO-(PEG)₄-NHS = 1 : 10)

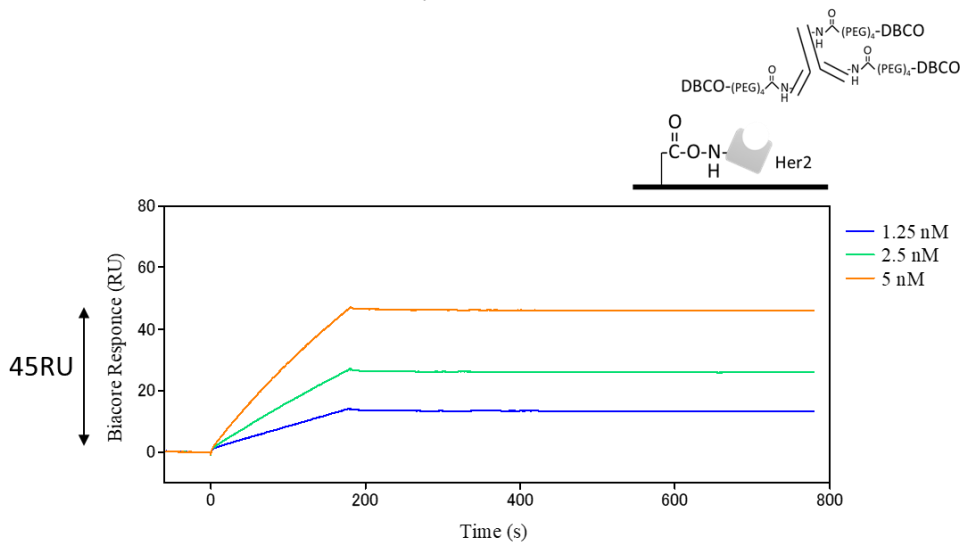


Fig.3-3 CM5 センサーチップに固相化した Her2-Fc に対する
DBCO 修飾 Trastuzumab の結合レスポンスを比較

3-4 まとめと考察

CCAP 法によるペプチドを介した分子修飾は IgG-Fc に形成される。そのため、CCAP 法によるコンジュゲートが IgG の Fc 受容体に対する結合能にどのように影響するか確認を行った。結果、IgG の体内半減期延長に関わる受容体である FcRn に対する結合がペプチド 2 価のコンジュゲートで失われることが判明した (Table 3-1)。これは FcRn の結合エピトープと IgG 結合ペプチドの結合エピトープが重なっていることに起因している。しかし、ペプチド 1 価のコンジュゲート体では FcRn に対する結合親和性が維持されていた (Table 3-1)。これらの結果は、2 価のコンジュゲートでは体内半減期延長効果が失われるが、1 価のコンジュゲートであれば体内半減期延長効果が維持されることを示唆している。また、免疫細胞の活性化に関わる FcγR への結合能はペプチドエピトープと FcγR のエピトープが異なることから維持されていた。興味深いことに、FcγRIIIa に対する結合親和性は 1 価のコンジュゲートで 1.6 倍 ($K_D = 160$ nM から 100 nM)、2 価のコンジュゲートでは約 4 倍程度 ($K_D = 160$ nM から 45 nM) 増強されていた (Table 3-1)。FcγRIIIa に対する結合親和性が増強されると、NK 細胞を介した ADCC 活性が増強されることが報告^{27,28}されている。CCAP 法によって作製したコンジュゲートでも FcγRIIIa に対する結合親和性が向上したことで、FcγRIIIa 下流シグナルを増強することを確認する事ができた (Fig.3-2)。この結果は、CCAP 法による修飾が増強された ADCC 活性を誘導可能であることを示唆している。ペプチドを修飾することにより FcγRIIIa への結合親和性が向上する要因は不明であるが、Fc 構造がペプチドによって安定化された結果、親和性が向上している可能性が考えられる。

CCAP 法による修飾は Fc 部位特異的であるため、IgG の抗原結合を阻害しないと考えていた。これを実証するため、SPR 解析によってペプチド修飾によって CCAP 法で分子を修飾した Trastuzumab とアミンカップリング法による分子修飾を行った Trastuzumab の結合活性比較を行った。結果として、アミンカップリング法による分子修飾では抗原結合能が低下し、CCAP 法による修飾では抗原結合能が低下しなかった (Fig.3-3)。アミンカップリング法での結合能低下は抗原結合部位への修飾に起因していると考えられる。

第 4 章

CCAP 法による機能性分子の 修飾と機能評価

第4章 CCAP 法による機能性分子の修飾と機能評価

4-1 緒言

医療応用を目的とした抗体への分子修飾の代表例は抗体薬物複合体 (ADC) である。2018 年の時点で 4 種類の ADC が市販化されている。代表例は抗 Her2 抗体 Trastuzumab にチューブリン重合阻害剤である DM1 をアミンカップリング法によって修飾した T-DM1 (商品名 Kadcyla) である⁷³。T-DM1 はアミンカップリング法によって DM1 を平均 3.5 分子修飾した抗体医薬品であるが、アミンカップリング法による分子修飾は抗原結合能へ悪影響を及ぼすことを前章において明らかにした。一方、CCAP 法による分子修飾では抗原結合能に影響を及ぼさない。そのため、CCAP 法はより副作用の少ない ADC 作製手法として応用できる可能性がある。そこで、DM1 を CCAP 法によって Trastuzumab に修飾した ADC を作製し、T-DM1 同様の細胞増殖抑制効果を発揮可能か確認する事を目的として、ADC の作製と、細胞増殖抑制試験を行った。

また、抗体医薬品の改良技術として、ADC の他に二重特異性抗体が挙げられる。二重特異性抗体は抗体を改変し、2 種類の抗原に結合可能なフォーマットとした抗体のことである。代表例は、2 本の重鎖、軽鎖がそれぞれ別の抗原に対応するよう改変した構造である⁷⁴ (Fig.4-1)。二重特異性抗体の応用例としては、アルツハイマー病の治療を目的とし、病原である A β に対する抗体と、結合したタンパク質を脳内に輸送することが可能な TfR (鉄輸送タンパク質 Transferrin の受容体) に対する抗体を用いた二重特異性抗体が挙げられる⁷⁵。これは、抗体が本来有していなかった脳内移行能を付加することを目的とした二重特異性抗体である。また、がん細胞抗原に対する抗体と T 細胞受容体の構成因子である CD3 に対する抗体から作製された二重特異性抗体も報告されている⁷⁶。これは、がん細胞に T 細胞をリクルートすることを目的とした抗体であり、IgG 抗体が本来有していない T 細胞由来の細胞傷害活性といった新たな機能を付加した例である。

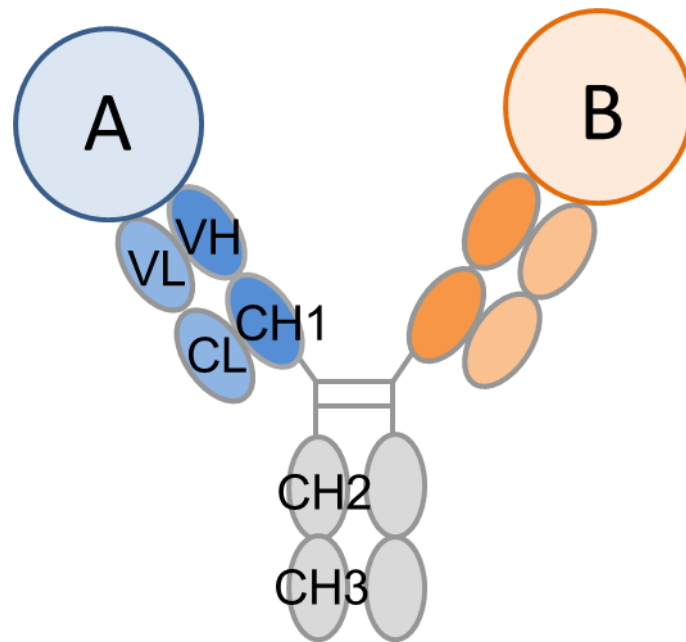


Fig.4-1 二重特異性抗体の構造

我々の研究室では、アルパカ重鎖抗体由来のシングルドメイン抗体 VHH の単離技術を有していた。VHH 抗体は単一ドメインで機能する最小の抗体であり、他のタンパク質などへの組み込みが容易といった利点を有している。そこで、CCAP 法によって IgG 抗体にペプチドを介して VHH を修飾した二重特異性抗体を構築することを考えた。二重特異性抗体化することで、抗体に新たに付加する機能として好中球結合能を選択した。通常 IgG 抗体は NK 細胞を介して標的であるがん細胞に対する ADCC 活性を誘導するが、NK 細胞は血中白血球の数%しか存在せず、高齢の患者や抗がん剤治療を行っている患者では免疫力の低下によりさらに NK 細胞数が減少している。一方、好中球は白血球の約 7 割を占める血球であり、免疫が落ちてしまった患者でも一定数の好中球の存在が期待できる。好中球は表面に $Fc\alpha R$ を有しており、これは本来 IgA 抗体の受容体として機能している。好中球はこの $Fc\alpha R$ を介して ADCC 活性を発揮できることが報告^{77,78}されており、前述の T 細胞をリクルート可能な二重特異性抗体同様に $Fc\alpha R$ へ結合可能な二重特異性抗体を作製することで、好中球を利用可能な IgG 抗体を作製できると考えた。また、CCAP 法による修飾であれば、 $Fc\gamma RIIIa$ に対する結合親和性が維持されるため、NK 細胞と好中球両方の細胞傷害活性を利用可能な抗体医薬品フォーマット (Fig.4-2) となることが

期待できる。本研究では、CCAP 法によって抗 FcαR VHH を IgG 抗体へ連結したコンジュゲートを作製することで、好中球と NK 細胞をエフェクター細胞として利用できる高活性、高機能型の二重 ADCC 抗体の創製を目的として、FcαR 特異的 VHH の単離から CCAP 法による IgG への修飾ならびに好中球を用いた細胞傷害活性試験を実施した。

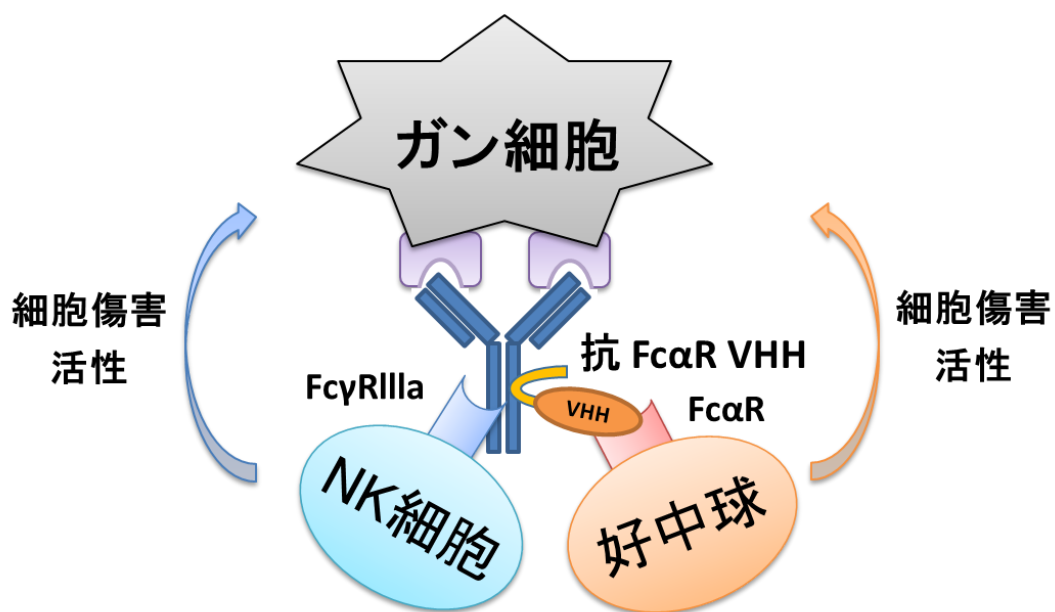


Fig.4-2 NK 細胞と好中球両方の ADCC 活性を利用できるフォーマット

4-2 材料と方法

IgG 結合ペプチドへの DM1 の修飾

IgG 結合ペプチドは N 末にマレイミドを有する状態で合成し (Mal-CH₂-NH-PEG4-RRGPDCAYHKGELVWCTFH-NH₂)、2 mg を 66.6 μL の 5 %ピリジンを含む DMSO 中で 1.6 倍量の DM1 と 50°C で 3 時間反応させた (final peptide: 11.4 mM, DM1: 18.2 mM)。ペプチド側のマレイミド基と DM1 のチオール基がこの反応で結合を形成するため (Fig.4-3)、反応後のこの溶液にアセトニトリル中に調製した 500 mM の DSG を 80 μL 添加し 50°C で 3 時間反応させ、8 番目 Lys への DSG 修飾を行った (Fig.4-4)。反応溶液を 0.1 % TFA を含む 10 %アセトニトリル 5 mL で希釈し、LC-forte(YMC)と InertSustain C18 (5 μm 7.6 × 250 mm column, GL Sciences)を用いた逆走クロマトグラフィーで分取した。流速は 4 mL/min で、分取時に使用したグラジエント条件はアセトニトリル 22 %~74 % (30 min) である。分取した生成物は遠心エバポレーターで 50 分間アセトニトリル除去操作を行った後に、凍結乾燥した。乾燥後のパウダーは DMSO に溶解し、e-spect (BM Equipment)を用いて濃度決定した。

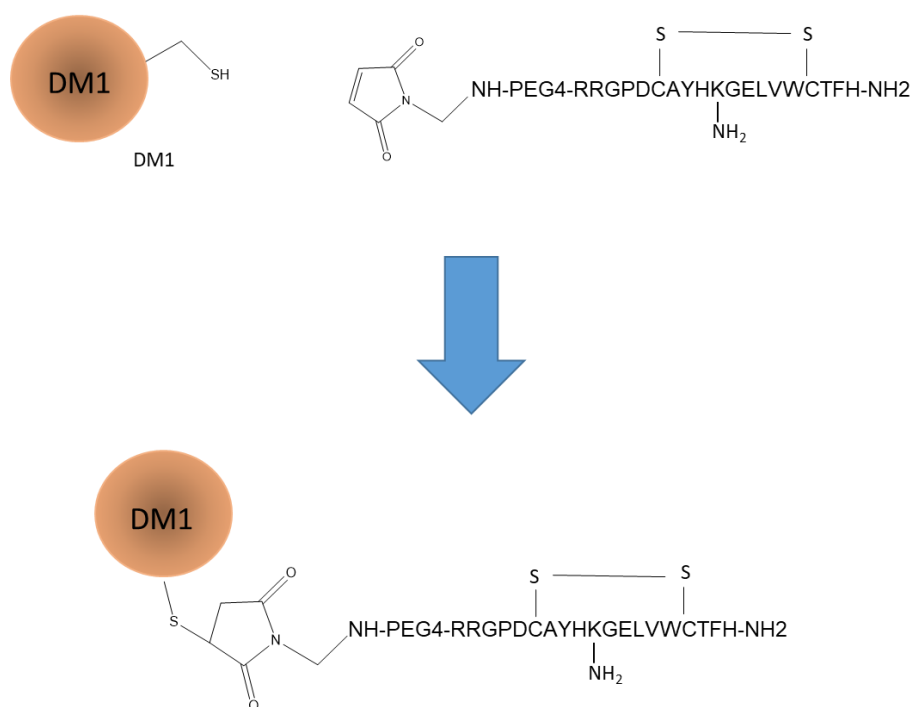


Fig.4-3 DM1 修飾 IgG 結合ペプチドの調製

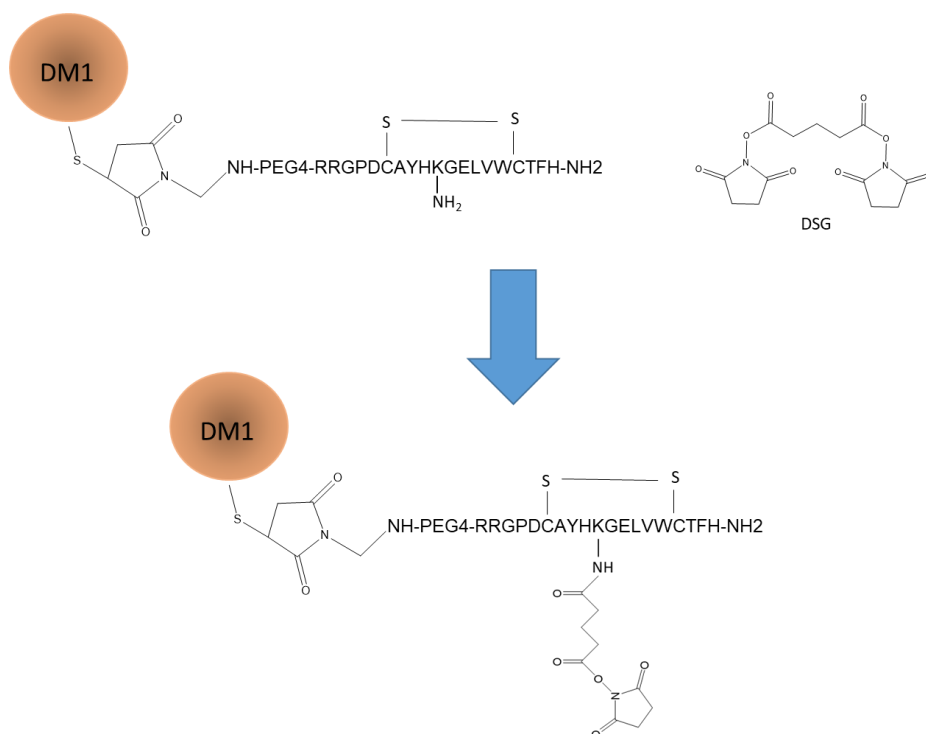


Fig.4-4 DM1 修飾 IgG 結合ペプチドへの DSG の付加

Trastuzumab への DM1 修飾ペプチドのコンジュゲート

Trastuzumab への DM1 未修飾 Trastuzumab の反応は、10 mM 酢酸 buffer (pH 5.5) 500 μ L 中に 6.8 μ M に調製した Trastuzumab に DMSO 中に 12 mM で調製した DM1-peptide を 0.28 μ L 添加し、室温で 30 分反応させた(抗体:peptide = 1:1)。反応物は Shodex SP825 カラム (昭和電工)と Shimadzu Chromatography system (島津製作所)を用いて流速 0.8 mL/min 10 mM 酢酸 buffer (pH 5.5) NaCl グラジエント 0~1 M (30 min) の条件で 0 価~2 価のコンジュゲート体を分取精製した。分取精製したコンジュゲート体は 10,000 MWCO の Vivaspin カラム (GE Healthcare) で濃縮し、e-spect (BM Equipment)を用いて濃度決定した。

Trastuzumab-peptide-DM1 を用いた細胞増殖抑制試験

96 well マルチタイタープレート上に Her2⁺ 細胞である SKBR3 または Her2⁻ 細胞である C6 細胞を 1.0×10^4 cell/100 μ L/well で播種し、37°C 5% CO₂ 条件下で一晩培養し、プレートへ接着させた。CCAP 法によって DM1 を 1 価または 2 価修飾した Trastuzumab または DM1 をアミンカップリング法で平均 3.5 分子

修飾した抗体薬物複合体である T-DM1 (Kadcyla) または DM1 未修飾 Trastuzumab を 10 nM~0.0032nM (5 倍ずつ希釈 6 点) の濃度で well に添加し、3 日間培養した。生細胞測定試薬である Cell Counting Kit-8(Dojin)を添加し、2 時間 37℃でインキュベートした。吸光度は EnSight™ プレートリーダー (PerkinElmer)を用いて検出し、450 nm の吸光度からブランクとして、630 nm の吸光度とブランク well (培地のみを添加) の吸光度の値を差し引いた値をデータとして用いた。

アルパカへの FcαR 免疫

アルパカの飼育および FcαR の免疫は、以下のスケジュール (Table 4-1) でアーク・リソース株式会社の協力のもと行われた。採血 3 ならびに採血 4 のタイミングで採血した血液からアルパカ IgG₁ (通常抗体)、IgG₂ (Long hinge 重鎖抗体)、IgG₃ (Short hinge 重鎖抗体) をそれぞれ精製し、抗体価確認のための ELISA に使用した。下記スケジュールの免疫 0 日目は 2015 年 3 月 19 日である。

Table 4-1 免疫スケジュール

免疫期間(day)	操作
0	採血1
	抗原免疫
14	抗原免疫
21	採血2
28	採血3
	抗原免疫
35	採血4
	抗原免疫

精製 IgG を用いた ELISA

採血 3 ならびに採血 4 由来の血液から精製されたアルパカ IgG₁(通常抗体)、IgG₂ (Long hinge 重鎖抗体)、IgG₃ (Short hinge 重鎖抗体) を用いて抗体価確認のための ELISA を実施した。96 穴マイクロタイタープレート (Nunc Thermo Fisher Scientific) に Fc α R (Sino Biological) を 50 ng/50 μ L(PBS)/well で室温 1 時間固相化した。溶液を廃棄、0.5 % BSA(PBS)100 μ L で well を洗浄し、400 μ L の 0.5 % BSA(PBS)を各 well に加え、室温 2 時間ブロッキングを行った。PBST(0.1 % tween) で 3 回洗浄し、精製 IgG は各 25 μ g/mL (0.5 % BSA in PBS) から 5 倍ずつ段階希釈し、7 段階分調製した。これに 0.5 % BSA (PBS) を抗体 0 μ g/mL として加えた 8 段階の濃度の抗体溶液を 50 μ L/well で室温 1 時間インキュベートした。PBST (0.1 % tween) で 5 回洗浄し、0.5 % BSA(PBS)で 2500 倍希釈した Rabbit anti Alpaca 抗体 (1 mg/mL) (アーク・リソース社製) を 50 μ L/well で室温 1 時間インキュベートした。PBST(0.1 % tween)で 5 回洗浄し、0.5 % BSA(PBS)で 4000 倍希釈した Goat anti Rabbit 抗体-HRP (1mg/mL) (Southern Biotech) を 50 μ L/well で室温 1 時間インキュベートした。ペルオキシダーゼ発光基質を含む TMB solution (CALBIOCHEM) を加え、呈色反応により、ウェル上の抗原タンパク質に結合しているアルパカ IgG を検出した (反応の停止は 1 M HCl で行った)。検出は ELISA プレートリーダーMODEL 680XR (BIO-RAD) を用いて 450 nm の吸光度を測定することによって行った。

VHH 特異的プライマー

VHH 遺伝子を増幅するプライマーは、文献⁷¹を参考に設計し、株式会社グライナー・ジャパンに合成を依頼した。プライマーの名称・配列は以下に記載したものを使用した。(赤字は制限酵素サイト)

KSB-573 5'- CAGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGG -3'

KSB-299 5'- GGGTCTTCGCTGTGGTGCG -3'

KSB-300 5'- TTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG -3'

KSB-610 5'- TGCTCCTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCTCAGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGG -3'

SfiI

KSB-344 5'- ATGATGATGTGCACTAGTTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG -3'

SpeI

KSB-425 5'- ATGATGATGTGCACTAGTGGGGTCTTCGCTGTGGTGCG -3'

SpeI

FcαR 免疫 VHH フェージライブラリの構築

抗原タンパク質 (FcαR) の免疫により、血中抗体価の上昇したアルパカから血液を採取し、リンパ球比重液を加え、分離された PBMC を RNAiso Plus (TAKARA BIO) でホモジナイズした溶液 (1.0×10^7 cell/mL) をアーク・リソース株式会社より受領した。total RNA を回収するため、1 mL × 2 本 (2.0×10^7 cell) のホモジネート溶液に各 200 μL のクロロホルムを添加し、5 分静置後に 12000g 15 分遠心し、各上層 400 μL を回収した。これに 320 μL のイソプロパノールを加え、攪拌後 10 分静置し、12000g 10 分間遠心した。上清を除き、沈殿した total RNA に 75 %エタノールを 900 μL 添加し、リンスした。7500g 5 分遠心し、上清を除き、風乾した後に、各 20 μL の DEPC 処理水に溶解し、e-spect (BM Equipment) を用いて濃度測定した。この total RNA を鋳型に、SuperScriptTMIII (Invitrogen) および Oligo(dt) 20 を用いて cDNA を逆転写反応により合成した。

逆転写した cDNA をテンプレートに VHH 特異的なプライマーである KSB-573 (VHH N 末端共通フォワードプライマー) と KSB-299 (short hinge リバープライマー)、KSB-300 (long hinge リバープライマー) を用い、VHH 遺伝子の増幅を行った。増幅した遺伝子を KSB-610 (SfiI 制限酵素サイト付加)、KSB-344 (long hinge)、KSB-425 (short hinge) (SpeI 制限酵素サイト付加) で PCR することによって制限酵素サイトを付加した (Fig.4-5)。PCR 反応での DNA ポリメラーゼは、Gene Taq (WAKO ニッポンジーン) を用いた。

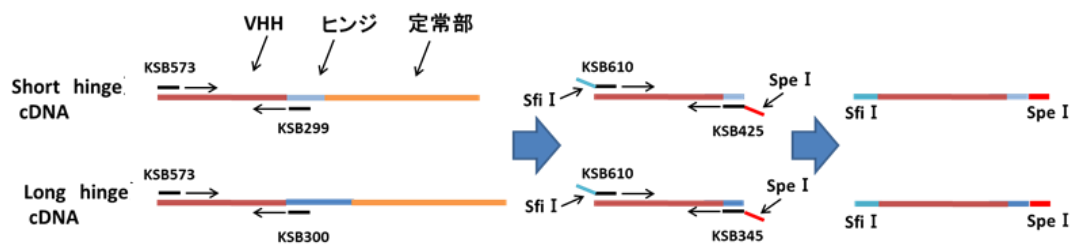


Fig.4-5 PCR での VHH 遺伝子増幅と制限酵素サイト付加

制限酵素サイトを付加した VHH 遺伝子断片（インサート）と pTV118N（TAKARA BIO）一部改変したファージミドベクター pKSTV03 を制限酵素 SfiI（NEB）と SpeI（NEB）でそれぞれの至適条件で処理した後、ゲル抽出して精製した。ベクターとインサートを 1 : 5 で混合し、T4 DNA ligase（Wako）を用いてライゲーション反応を 16 °C で 10 時間行った。ライゲーション産物をフェノール・クロロホルム抽出法で精製した。精製したライゲーション産物を、ファージの感染が可能な宿主 *E. coli* TG-1 Phage Display Electrocompetent cells（Lucigen）に MicroPulser エレクトロポレーター（Bio-Rad）を用いてエレクトロポレーション法によって導入した。形質転換産物の一部はタイターチェックに使用し、残りはプレート培養（2TYAG、30 °C）した。プレート培養後の大腸菌 TG-1 を液体 2TY 培地 6 mL で回収し、500 μ L を 2TYAG（2TY medium、100 μ g/mL ampicillin、2 % glucose）500 mL に植菌・培養（37 °C、1.5 時間 200 rpm）後、ヘルパーファージ（M13KO7（Invitrogen）、m.o.i = 10）を重感染させた（37 °C 30 min stand、37 °C 30 min shake 200 rpm）。感染後、菌体を遠心分離し、感染していない過剰量のヘルパーファージが残る上清を捨て、ヘルパーファージが感染した大腸菌ペレットを、2TYAK（2TY medium、100 μ g/mL ampicillin、25 μ g/mL kanamycin）500 mL で懸濁し、37 °C、200 rpm 16 時間培養した。培養液を遠心分離し、上清に浮遊したファージ溶液を回収後、0.2 容量の PEG/NaCl を加え、4 °C で O/N の沈降反応を行った。ファージ溶液を遠心し、沈降したファージペレットを PBS で懸濁し、バイオパンニングに用いた。

バイオパンニング（プレート固相化法）

96 穴マイクロタイタープレート（Nunc Thermo Fisher Scientific）の 1well

に、500 ng / 200 μ L で PBS 中に調製した抗原タンパク質を、室温 2 時間で固定化した。ブロック剤 (0.5 % BSA or 5 % skim milk / PBS) を加え、室温で 2 時間ブロッキングを行った。0.1 % PBST で 3 回洗浄した後、構築したファージライブラリを加え、室温で 1 時間反応させた。非特異的に結合しているファージを除去するため、0.1 % PBST で洗浄を (5~50 回) 行った。0.1M glycine-HCl (pH 2.2) を加え、抗原特異的なファージを溶出し、1M Tris-HCl (pH 9.0) で中和した後、大腸菌 TG-1 に感染させ、2TYAG プレートで 30°C 16 h 培養した。培養した TG-1 は液体 2TY 6 mL で回収し、50 mL 2TYAG に 150 μ L 加え、37 °C 1 h で大腸菌を増殖させた後に M13KO7 ヘルパーファージ (Invitrogen) を重感染させ 37°C 30 min stand、37°C 30 min shake 200 rpm)、菌体を遠心分離し、感染していない過剰量のヘルパーファージが残る上清を捨て、ヘルパーファージが感染した大腸菌ペレットを、2TYAK 50 mL で懸濁し、37 °C、200 rpm 16 時間培養し、パンニングによって回収された抗原特異的な VHH を提示したファージを増幅した。

バイオパンニング (可溶性ビオチン化抗原法)

抗原のビオチン化は Lightning-Lin™ Biotin Conjugation Kit (TypeB) (Innova Biosciences) を用いて行った。1 mg/mL Fc α R 20 μ L に LL-Modifier buffer 2 μ L 加え、ビオチン化試薬入り容器へ加えた。室温で O/N インキュベートし、LL-quencher buffer 2 μ L 加え、4°C で保存した。96 穴マイクロタイタープレート (Nunc Thermo Fisher Scientific) の 2 well に、500 ng/200 μ L で PBS 中に調製した streptavidin (WAKO) を、室温 2h で固定化した。ブロック剤 (0.5 % BSA/PBS) を加え、室温で 2h ブロッキングを行った。2 well のうち 1 well を 0.1 % PBST で 3 回洗浄した後に、構築したファージライブラリを 200 μ L 加え、室温で 1h 反応させた (streptavidin に結合するファージの吸収操作)。反応後、ファージライブラリを回収した。ビオチン標識した標的抗原は、回収したファージライブラリと溶液中 (500 ng / 200 μ L) で、室温で 1h 反応させた。ファージ・ビオチン化抗原混合溶液は 0.1 % PBST で 3 回洗浄したもう 1 well の streptavidin 固定化 well へ加えた。室温で 1 時間反応させ、ビオチン化抗原ならびに抗原に結合したファージを streptavidin でトラップさせ、非特異的に結合しているファージ

ジを除去するため、0.1 % PBST で洗浄を (5~50 回) 行った。0.1 M glycine-HCl (pH 2.2) を加え、抗原特異的なファージを溶出し、1 M Tris-HCl (pH 9.0) で中和した後、大腸菌 TG-1 に感染させ、2TYAG プレート 30°C で 16 時間培養した。培養した TG-1 は液体 2TY 6 mL で回収し、50 mL 2TYAG に 150 μ L 加え、37°C で 1 h で大腸菌を増殖させた後に M13KO7 ヘルパーファージを重感染させ (37°C 30 min stand、37°C 30 min shake 200 rpm)、菌体を遠心分離し、感染していない過剰量のヘルパーファージが残る上清を捨て、ヘルパーファージが感染した大腸菌ペレットを、2TYAK 50 mL で懸濁し、37°C、200 rpm 16 時間培養し、パンニングによって回収された抗原特異的な VHH を提示したファージを増幅した (Fig.4-6)。

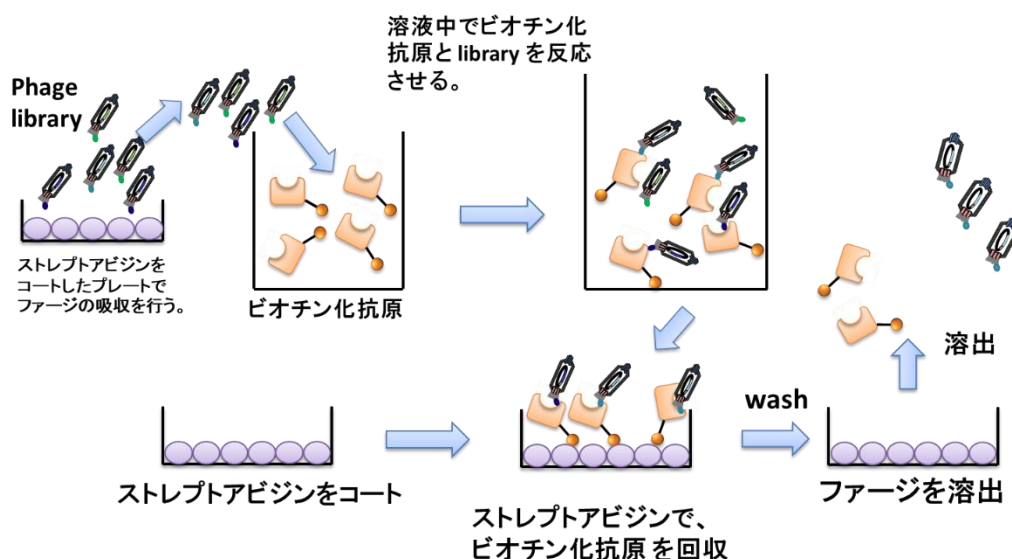


Fig.4-6 バイオパンニングの概要 (可溶性ビオチン化抗原法)

ファージ ELISA

96 穴マイクロタイタープレート (Nunc Thermo Fisher Scientific) に PBS で希釈した抗原 (50 ng/50 μ L) を室温で 2h 固定化し、ブロック剤 (0.5 % BSA) を用いて室温で 2h ブロッキングを行った。0.1 % PBST で 3 回洗浄した後、VHH を提示したファージ溶液 (1.0×10^9 / 50 μ L) を加え、室温で 1h 反応させた。0.1 % PBST で 5 回洗浄した後、あらかじめ SA-HRP (VECTOR LABORATORIES) とプレインキュベートした二次抗体 (1/4000 ビオチン化 Mouse anti-M13 抗体

(Abcam)) を室温で 1h 反応させた。0.1 % PBST で 5 回洗浄した後、ペルオキシダーゼ発光基質を含む TMB solution (CALBIOCHEM) を加え、呈色反応により、ウェル上の抗原タンパク質に結合している VHH 抗体ファージを検出した (反応の停止は 1 M HCl で行った)。検出はプレートリーダー MODEL 680XR (BIO-RAD) を用いて 450 nm の吸光度を測定することによって行った。

VHH の発現

発現用大腸菌 HB2151 に目的 VHH を提示したファージを感染させ (37 °C 30 min stand)、目的 VHH 遺伝子が組み込まれているファージミドベクター pKSTV03 を導入した後、SOBAG-N プレート (SOB medium、100 µg/ml ampicillin、2 % glucose、100 µg/mL nalidixic acid) に塗布した。30 °C で over night 培養し、形成されたコロニーを各 3 クローンずつ 2TYAG 3 mL で 37 °C over night で培養した。培養液 800 µL はグリセロールストックし、残りの培養液 500 µL を 2TYA 20 mL に加え、37 °C で OD 600 = 0.6 ~ 0.8 になるまで培養後、IPTG (final 1 mM) を加え、培養 (37 °C 10 h) した。培養液を遠心分離にて上清と菌体に分離し、上清を回収した (supernatant)。菌体を TES buffer (0.2 M Tris-base、0.5 mM EDTA、0.5 M sucrose) 400 µL で懸濁し、2 h 氷上で静置後、5 倍希釈した TES buffer を 660 µL 加え、氷上で 1 h 静置した後に遠心分離して上清を回収した (periplasm)。沈殿した菌体を PBS 1060 µL で懸濁後、10 min boil した後、遠心分離して上清を回収した (cytoplasm)。回収した各画分をメタノールで親水化した PVDF メンブレン上に Dot blot し、5 % skim milk を用いて室温で 2 時間ブロッキングした。その後、あらかじめ SA-HRP をプレインキュベートした二次抗体 (ビオチン化 Mouse anti-His tag 抗体) を室温で 1h 反応させ、0.1 % PBST で 3 回洗浄後、Chemi Lumi One (ナカライテクス) を加え、発色反応を観察した。

ドットブロットの結果、発現を確認できたクローンのグリセロールストックを白金針で 2TYAG プレートに塗布し、30 °C で over night 培養した。形成されたコロニーを 2TYA 10 mL 37 °C で over night 培養し、培養液 10 mL を 2TYA 500 mL に加え 37 °C で 1h 培養した後、1M IPTG を 500 µL 加え 37 °C で 16 h 培養した。培養液を遠心分離にて上清と菌体に分離し、菌体を TES buffer (0.2

M Tris-base、0.5 mM EDTA、0.5 M sucrose) 10 mL で懸濁後、氷上で 2 時間静置。1/4 TES buffer を 20 mL 加え再懸濁し氷上で 1h 静置。遠心分離し、上清を回収した (periplasm)。沈殿した菌体を PBS 50 mL で懸濁後、1h boil した後、遠心分離して上清を回収した (cytoplasm)。上清をアフィニティーカラム (His trap excel、GE Healthcare) と Profinia の精製システムを用いて VHH を精製した。流速は結合・溶出 2 mL/min、洗浄 2 mL/min Buffer は平衡化 Buffer : 0.5 M NaCl、20 mM リン酸 Na、洗浄 Buffer: 0.5 M NaCl、20 mM リン酸 Na、溶出 Buffer : 500 mM イミダゾール、0.5 M NaCl、20 mM リン酸 Na を用いた。

VHH の親和性解析

Biacore T200 (GE Healthcare) を用いて行った。測定にはセンサーチップ CM5 を使用し、センサーチップへの抗原タンパク質の固定化は、アミンカップリングキットを用いて、Rmax = 100 (FcαR : RU = 200) になるように固定化を行った。HBS-EP buffer (pH 7.4) 中に 10 μM, 1 μM, 20 nM ~ 2 倍ずつ段階希釈で 6~8 点調製した VHH 溶液を Flow rate : 50 μl/min、Injection time 3 min、Dissociation time 10 min の条件で測定を行った。抗 FcαR VHH の測定においては Glycin-HCl (pH 2.0) で 5 秒、2 回の再生処理を行った。測定結果の解析ならびに親和性の計算は Biacore T200 Evaluation software Ver. 1.0 (GE Hethcare) 用いて行った。

VHH への Cys 残基導入

PCR の手法を用いて、VHH C 末ヒンジ領域のアミノ酸の 1 つを Cys 残基に置換することで Cys 残基導入 VHH 抗体の作製を行った (Fig.4-7, 4-8)。

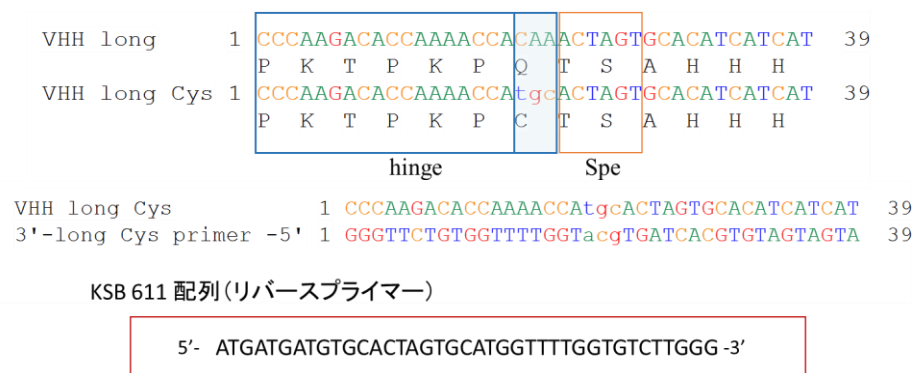


Fig.4-7 IgG₂ (Long hinge) VHH への Cys 残基導入プライマーのデザイン

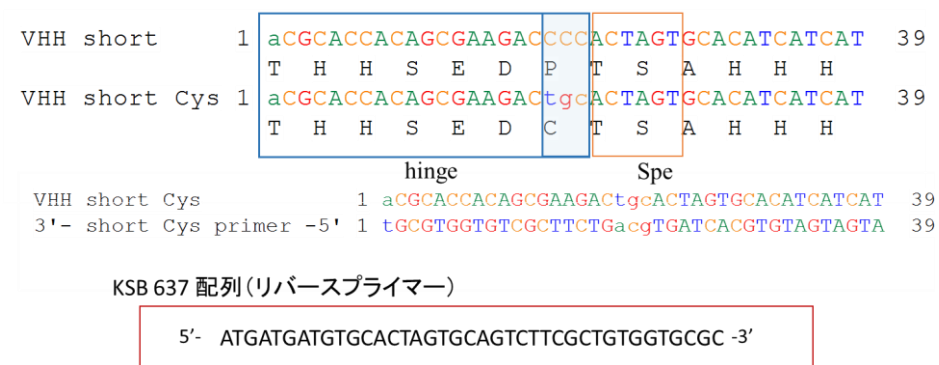


Fig.4-8 IgG₃ (Short hinge) VHH への Cys 残基導入プライマーのデザイン

N 末にアジド基を有する IgG 結合ペプチドへの DSG 付加

IgG 結合ペプチドは N 末にアジド基を有する状態で合成し (Azide-PEG4-GPDCAYHKGELVWCTFH-NH₂)、1 mg を 20 μL の DMSO 中に調製し、この溶液にアセトニトリル中に調製した 500 mM の DSG を 20 μL 添加し 50°C で 6 時間反応させ、8 番目 Lys への DSG 修飾を行った。反応溶液を 0.1 % TFA を含む 10 %アセトニトリル 10 mL で希釈し、LC-forte(YMC)と InertSustain C18 (5 μm 7.6 × 250 mm column, GL Sciences)を用いた逆走クロマトグラフィーで分取した。流速は 4 mL/min で、分取時に使用したグラジエント条件はアセトニトリル 17% ~55.5% (30 min) である。分取した生成物は遠心エバポレーターで 50 分間アセトニトリル除去操作を行った後に、凍結乾燥した。乾燥後のパウダーは DMSO に溶解し、e-spect (BM Equipment)を用いて濃度決定した。

Trastuzumab へのアジド基を有する IgG 結合ペプチドの修飾

Trastuzumab は 25 mM 酢酸 buffer (pH 5.0) 800 μL 中に 16.6 μM で調製し、アジド基を有する DSG 修飾済みのペプチド (Azide-PEG4-GPDCAYHKGELVWCTFH-NH₂) 10 mM 2.0 μL と混合し、室温で 5 時間反応させた (抗体:peptide = 1:1.5)。反応物は CIM multus SO3-1 カラム (昭和電工)と NGC Chromatography system (Bio-Rad)を用いて流速 5 mL/min 25 mM 酢酸 buffer (pH 5.0) NaCl グラジエント 0 ~1 M (50 min) の条件で 1 価~2 価のコンジュゲート

体を分取精製した。分取精製したコンジュゲート体は 10,000 MWCO の Vivaspin カラム(GE Healthcare) で濃縮し、e-spect (BM Equipment)を用いて濃度決定した。

Trastuzumab と VHH コンジュゲートの作製

前述の Cys 残基を C 末端領域に導入し、発現した VHH (2b1-L9) を 43 μ M で PBS 中に調製し、0.1 mM DTT で室温 1 時間還元処理を行った。これは導入した Cys 残基に結合しているグルタチオンを除くための操作である。VHH は Shodex SP825 カラム (昭和電工)と Shimadzu Chromatography system (島津製作所)を用いて流速 0.8 mL/min 10 mM 酢酸 buffer (pH 4.5) NaCl グラジエント 0~1 M (30 min) の条件で分取精製した。分取精製した VHH は 10,000 MWCO の Amicon Ultra (Merck KGaA) で濃縮し、e-spect (BM Equipment)を用いて濃度決定した。還元処理を行った VHH を 10 mM 酢酸 buffer (pH 4.5) で 41.2 μ M に調製し、200 μ L を 870 μ M の DBCO-maleimide (Dibenzocyclooctyne-maleimide) (Click Chemistry Tools #A108-100) 42 μ L と VHH:DBCO-maleimide = 1:2 で室温 1 時間反応させた。DBCO 修飾 VHH を 10,000 MWCO の Amicon Ultra (Merck KGaA) を用いて未反応の DBCO-maleimide の除去と濃縮操作によって精製した。

CCAP 法によってアジド基を 2 価で修飾した Trastuzumab 16 μ M (104 μ L in 25 mM 酢酸 buffer pH 5.0) と、アジド基を 1 価で修飾した Trastuzumab 24 μ M (12.5 μ L in 25 mM 酢酸 buffer pH 5.0) と DBCO 修飾した VHH (2b1-L9) 33.4 μ M (150 μ L in 10 mM 酢酸 buffer pH 4.5) を混合し、4°C で 80 時間反応させた。反応産物は Shodex SP825 カラム (昭和電工)と Shimadzu Chromatography system (島津製作所)を用いて流速 0.8 mL/min 10 mM 酢酸 buffer (pH 4.5) NaCl グラジエント 0~1 M (30 min) の条件で分取精製した。

Rituximab と VHH コンジュゲートの作製

Fc 受容体との親和性解析に使用するための、ペプチド 1 価かつ VHH 1 価の Rituximab-VHH コンジュゲートを作製するため、Rituximab は 33 mM 酢酸 buffer (pH 4.5) 600 μ L 中に 33 μ M で調製し、アジド基を有する DSG 修飾済みのペプチド (Azide-PEG4-GPDCAYHKGELVWCTFH-NH₂) 7.3 mM 3.6 μ L と混合し、室温で 5 時間反応させた (抗体:peptide = 1:2)。反応物は CIM multus SO3-1 カ

ラム (昭和電工)と NGC Chromatography system (Bio-Rad)を用いて流速 5 mL/min 25 mM 酢酸 buffer (pH 5.0) NaCl グラジエント 0 ~1 M (50 min) の条件で 1 価 ~2 価のコンジュゲート体を分取精製した。分取精製したコンジュゲート体は 10,000 MWCO の Vivaspin カラム (GE Healthcare) で濃縮し、e-spect (BM Equipment)を用いて濃度決定した。

前述と同様の条件で還元精製した VHH (2b1-L24) を 10 mM 酢酸 buffer (pH 4.5) で 76.8 μ M に調製し、4000 μ L を 8.75 mM の DBCO-maleimide (Dibenzocyclooctyne-maleimide) (Click Chemistry Tools #A108-100) 52.5 μ L と VHH:DBCO-maleimide = 1:1.5 で室温 1 時間反応させた。DBCO 修飾 VHH を PBS に透析することで精製し、e-spect (BM Equipment)を用いて濃度決定した。

CCAP 法によってアジド基を 1 価で修飾した Rituximab 12.3 μ M (400 μ L in 10 mM 酢酸 buffer pH 5.0) と、DBCO 修飾した VHH (2b1-L24) 76.8 μ M (192 μ L in PBS pH 7.4) を混合し、4°C で O/N 反応させた。反応産物は Shodex SP825 カラム (昭和電工)と Shimadzu Chromatography system (島津製作所)を用いて流速 0.8 mL/min 10 mM 酢酸 buffer (pH 4.5) NaCl グラジエント 0~1 M (30 min) の条件で分取精製した。

Rituximab と VHH コンジュゲートの作製

細胞との結合評価に使用するため、ペプチド 2 価かつ VHH 1 価または 2 価の混合状態の Rituximab-VHH コンジュゲートを作製するため、Rituximab は 10 mM HEPES buffer (pH 7.0) 500 μ L 中に 24.2 μ M で調製し、アジド基を有する DSG 修飾済みのペプチド (Azide-PEG4-EEGPDCAYHKGELVWCTFH-NH₂) 6.9 mM 8.75 μ L と混合し、室温で 2 時間反応させた (抗体:peptide = 1:5)。反応物は 10,000 MWCO の Amicon Ultra (Merck KGaA)で濃縮し、e-spect (BM Equipment)を用いて濃度決定した。

前述と同様の条件で還元精製した VHH (2b1-L24) を 10 mM 酢酸 buffer (pH 5.5) で 23.6 μ M に調製し、2000 μ L を 5 mM の DBCO-maleimide (Dibenzocyclooctyne-maleimide) (Click Chemistry Tools #A108-100) 52.5 μ L と VHH:DBCO-maleimide = 1:1.2 で室温 1 時間反応させた。DBCO 修飾 VHH を 10,000 MWCO の Amicon Ultra (Merck KGaA)で濃縮し、e-spect (BM Equipment)

を用いて濃度決定した。

CCAP 法によってアジド基を 2 価で修飾した Rituximab 23.1 μM (400 μL in 10 mM HEPES buffer pH 7.0) と、DBCO 修飾した VHH (2b1-L24) 150 μM (184.8 μL in 10mM 酢酸 buffer pH 5.5) を混合し、4°C で 48 時間反応させた。反応産物は未反応の VHH を除くため、30,000 MWCO のビバスピナラム (GE Healthcare) で 10mM HEPES buffer (pH 7.0) に Buffer 置換し、精製した。

IgG-VHH の親和性解析

表面プラズモン共鳴 (SPR) による親和性解析は Biacore T200 (GE Healthcare) を用いて、25°C の条件下で実施した。Her2-Fc (Sino Bio)、Fc α R-His (Sino Bio) は CM5 センサーチップ (GE Healthcare) にアミンカップリング法を用いた装置プログラムを用いて、それぞれ RU = 140、RU = 92 で固定化した。HBS-EP buffer (pH 7.4) (0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005 % tween) 中に調製した 20 nM から 0.31 nM の範囲内で希釈した Trastuzumab をセンサーチップに 3 分間、流速 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ で流し、結合を測定、10 分間 HBS-EP buffer (pH 7.4) を流し、解離を測定し、Glycin-HCl (pH 2.0) で 5 秒、2 回の再生処理を行った。得られたセンサーグラムは、BIA evaluation software の 1:1 binding model を用いて解析し、親和性解析を行った。

Fc 受容体との親和性解析

表面プラズモン共鳴 (SPR) による親和性解析は Biacore T200 (GE Healthcare) を用いて、25°C の条件下で実施した。Fc 受容体 (Fc γ RI, Fc γ RIIIa) (R & D Systems) は CM5 センサーチップ (GE Healthcare) にアミンカップリング法を用いた装置プログラムを用いて、それぞれ RU = 500 で固定化した。HBS-EP buffer (pH 6.0) 中に調製した 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12.5 nM, 6.25 nM の Rituximab または VHH 修飾 Rituximab をセンサーチップに 3 分間、流速 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ で流し、結合を測定、10 分間 HBS-EP buffer (pH 6.0) を流し、解離を測定した。得られたセンサーグラムは、BIA evaluation software の 1:1 binding model を用いて解析し、親和性解析を行った。

FcαR 発現 Jurkat 細胞の調製

ヒト前骨髄球性白血病細胞 (HL60 細胞) ($6.0 \times 10^6/10 \text{ mL}$) に終濃度 1.3% DMSO を添加し、7 日間培養し、好中球様に分化させた分化 HL60 細胞を調製した。分化 HL60 細胞から、RNA isoplus (TaKaRa) と、SuperScriptTMIII (Invitrogen) および Oligo(dt)₂₀ を用いて cDNA を逆転写反応により合成した (前述のアルパカ由来 cDNA 調製と同様の操作を実施した)。調製した cDNA をテンプレートに、FcαR 遺伝子のデータベース (National Center for Biotechnology Information) を基に設計したプライマー (Forward Primer: 5'- ATGGACCCCAAACAGACCACC CT -3') (Reverse Primer 5'- TTACTTGCAGACACTTGGTGTTCGTGC -3')、Gene Taq (Wako Nippon Gene) を用いて PCR を行い FcαR 遺伝子の増幅を行った。pVITRO1-neo-mcs (Invitrogen) の MCS1 に制限酵素 (BamHI, AvrII) を用いて FcαR 遺伝子を組み込むために設計した Forward Primer: 5'- GTATACGGATCCCGTACGATGGACCCCAAACAGA -3' (BamHI) と Reverse Primer 5'- CCTGCTCCTAGGACGCTGTTACTTGCAGACACTT -3' (AvrII) を用いて PCR によって FcαR 遺伝子に BamHI と AvrII 制限酵素サイトを付加した。その後、BamHI と AvrII (NEB) で制限酵素処理した FcαR 遺伝子と pVITRO1-neo-mcs ベクター (Invitrogen) を T4 DNA ligase (Wako) を用いてベクター : インサート比 = 1 : 5 でライゲーションを行った。ライゲーション産物を、ヒートショックによって大腸菌 JM109 株に導入し、2TYKG プレートに播種し、生じたコロニーを培養した後に Maxi Plus (VIOGENE) によるプラスミド抽出を実施した。

Jurkat 細胞に FcαR 遺伝子を導入するためのリポフェクションを行った。Opti-MEM 100 μL に Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) を 6.0 μL 混合した溶液 A と、Opti-MEM 100 μL と FcαR 遺伝子を組み込んだ pVITRO1-neo-mcs ベクター 2.0 μg と混合した溶液 B を調製した。A、B 溶液を混合し 15 分静置した後に、 $1.0 \times 10^5 \text{ cell/well}$ の Jurkat 細胞 500 μL (RPMI1640) に 50 μL ずつ添加した (4well 分)。最終量は Jurkat 細胞 $1.0 \times 10^5 \text{ cell}$ 、Lipofectamine 2000 1.5 μL、pVITRO1-neo-mcs ベクター 0.5 μg/550 μL (RPMI1640) である。37 °C、5 % CO₂ で 1 日インキュベートし、RPMI1640 (10 % FBS, 1 % pc/sm, 500 μg/mL G418) 培地で継代を続け、安定発現株を獲得した。形質転換を実施していない Jurkat ならびに HL60 細胞の培養には RPMI1640 (10 % FBS, 1 % pc/sm) を使用した。

Flow Cytometry での結合確認

RAJI 細胞 (CD20 発現細胞) ならびに Fc α R 形質転換 Jurkat 細胞は、3 % BSA/PBS 中に 2.0×10^5 cell/200 μ L で調製し、一次抗体である Rituximab または Rituximab-VHH (2b1-L24) を 200 nM で加え、4°C で 30 分インキュベートした。110 G で 3 分間遠心し、上清を除き、1 mL 3 % BSA/PBS を加え懸濁、110 G で 3 分間遠心し、上清を除き、200 μ L 3 % BSA/PBS を加え懸濁した。この一連の流れを細胞洗浄操作とした (以下、細胞洗浄と記載)。二次抗体としてビオチン標識抗 His tag 抗体 (MBL #D291-6) またはビオチン標識抗ヒト IgG 抗体 (Affymetrix #13-4998) をそれぞれ最終濃度 66 nM、33 nM で添加した。4°C で 30 分インキュベートし、細胞洗浄を実施した。Flow Cytometry で検出するため、ストレプトアビジン標識 PE (SA-PE) (VECTOR #SA-5207) を 10 μ g/mL で添加し、4°C で 30 分インキュベートし、細胞洗浄を実施、800 μ L の PBS に調製した。Flow Cytometry は S3e Cell Sorter (BIO-RAD) を使用し、解析には FlowJo Software (BD Bioscience) を使用した。

4-3 結果

CCAP 法を用いた ADC の作製

我々は CCAP-HIG 法の技術を医薬品開発へ応用するため、抗体薬物複合体の作製を行った。前述の通り、従来の ADC 作製に用いられるアミンカップリングの手法や、抗体内部ジスルフィド結合を用いる手法では、薬剤の個数、修飾部位、抗体の結合能や安定性への影響といった問題点が存在した。我々の CCAP 法では抗体部位特異的な修飾が可能であり、個数の制御も容易といった利点が存在する。CCAP 法を用いた ADC を作製するため、IgG 結合ペプチドにチューブン重合阻害剤である抗がん剤 DM1 をコンジュゲートした (Fig.4-9)。これは IgG 結合ペプチドの N 末端領域に PEG4 リンカーを介して付加したマレイミドと DM1 のチオール基の反応により形成された。抗がん剤付加ペプチドは精製され、DSG を付加した後に乳がんに対する抗体医薬品である Trastuzumab へコンジュゲーションされた。作製した ADC は陽イオン交換クロマトグラフィーで精製され、細胞増殖抑制試験に用いた。使用した細胞は、Trastuzumab の標的抗原 Her2 過剰発現株である SKBR3 ならびに Her2 を発現していない細胞株である C6 である。試験の結果、CCAP 法で作製した ADC は Trastuzumab にアミンカップリングの手法で DM1 をコンジュゲートし、すでに医薬品として販売されている Trastuzumab-DM1 (T-DM1) と同様に Her2⁺細胞である SKBR3 細胞に対し増殖抑制活性を示し、Her2⁻細胞である C6 細胞へは増殖抑制活性を示さなかった (Fig.4-10)。このことは、従来の ADC と同等の効果を有し、かつ抗体部位特異的な修飾が可能な ADC 作製方法として、CCAP 法が有用であることを示唆している。

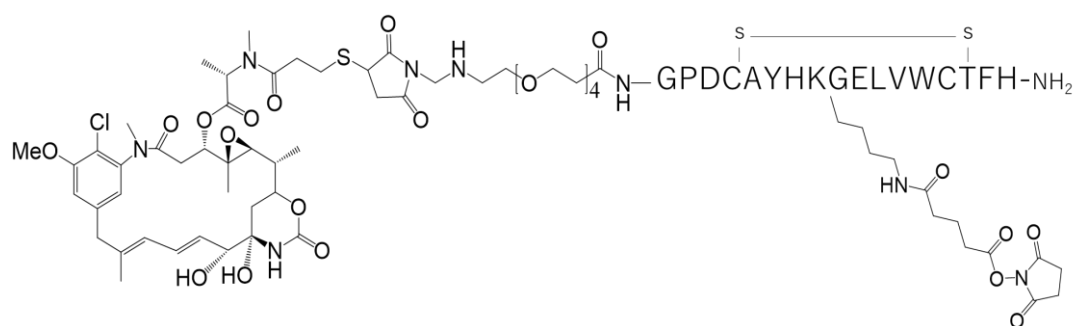


Fig.4-9 DM1 修飾 IgG 結合ペプチドのデザイン

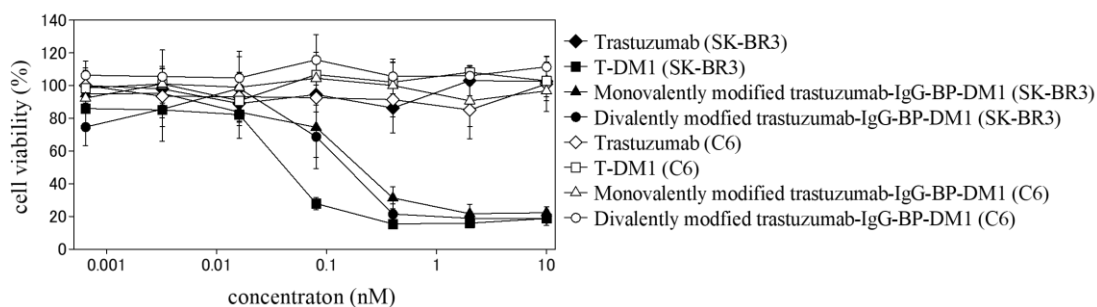
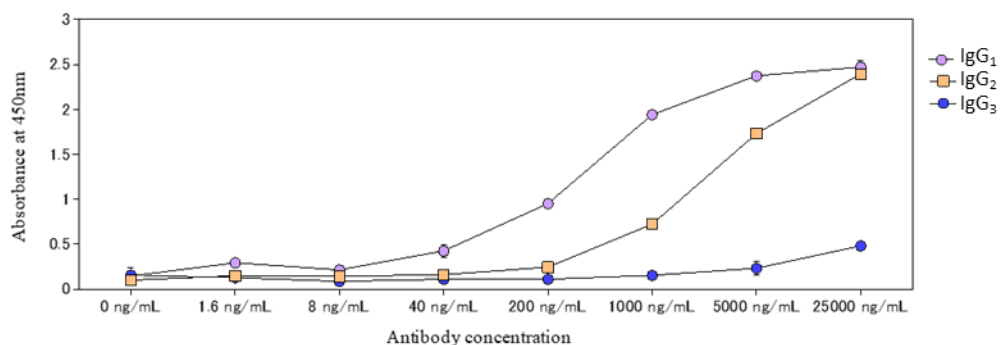


Fig.4-10 CCAP 法によって DM1 修飾した Trastuzumab の細胞増殖抑制試

ファージディスプレイ技術を用いた抗 *FcαR* VHH の単離

前述のスケジュール通りに免疫を実施し、採血 3 ならびに採血 4 由来の血液から精製された IgG を用いて免疫によって *FcαR* に対する抗体価が上昇していることを確認するための ELISA を実施した (Fig.4-11)。結果、通常抗体である IgG₁、Long hinge の重鎖抗体である IgG₂ において高い抗体価を確認する事ができた。また、採血 3 と採血 4 をそれぞれ比較したところ、採血 3 の方が平衡に達する濃度が低く、抗体価が高いことが確認できた。この結果より、採血 3 由来の total RNA を用いて VHH ファージライブラリの作製を行った。

採血3



採血4

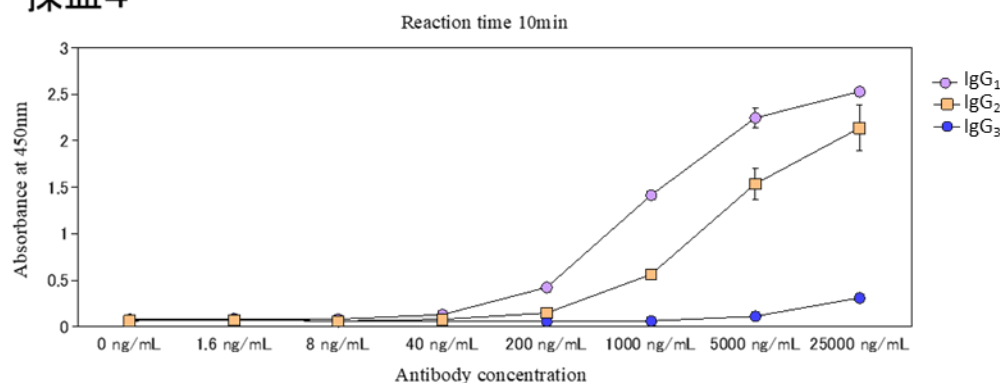
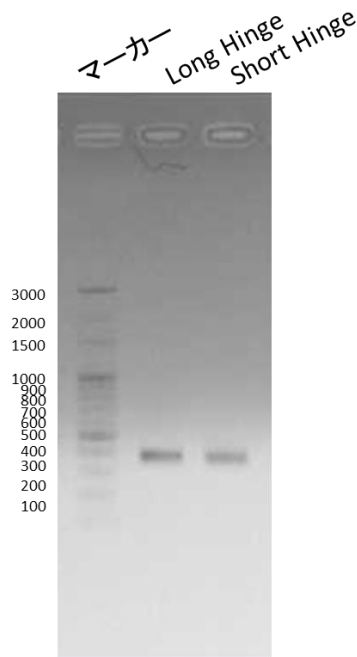


Fig.4-11 精製 IgG 抗体を用いた抗 Fc α R 抗体価確認 ELISA

採血 3 の末梢血リンパ球 (2×10^7 cell) から total RNA を回収した。回収した total RNA から逆転写酵素を用いて cDNA を合成し、cDNA をテンプレートに VHH 特異的なプライマーである KSB-573 (フォワードプライマー) と KSB-299 (IgG₃ リバースプライマー)、KSB-300 (IgG₂ リバースプライマー) を用い、VHH 遺伝子の増幅を行った (1st PCR)。増幅した遺伝子を KSB-610 (SfiI制限酵素サイト付加)、KSB-344 (IgG₂)、KSB-425 (IgG₃) (SpeI制限酵素サイト付加) で PCR することによって制限酵素サイトを付加した (2nd PCR)。各 PCR の結果は電気泳動で確認を行った (Fig.4-12)。

A 1st PCR



B 2nd PCR

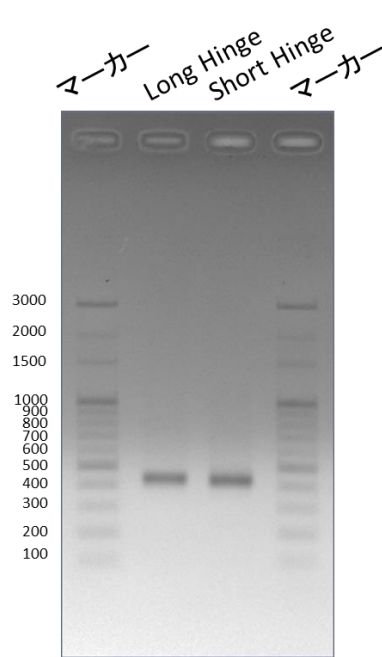


Fig.4-12 PCR による VHH 領域の増幅と制限酵素サイトの付加

制限酵素サイトを付加した DNA 断片とファージミドベクター pKSTV03 を制限酵素 SfiI と SpeI で至適条件にて処理し、T4 DNA リガーゼを用いて DNA 断片とファージミドベクターをライゲーションした。ライゲーションにより VHH 遺伝子を組み込んだプラスミドを大腸菌 (TG-1) にエレクトロポレーション法により形質転換を行った。形質転換後の大腸菌をカウントし、求めたライブラリサイズは IgG₃ (Short hinge) 由来 VHH ライブラリでは 2.6×10^7 であり、IgG₂ (Long hinge) 由来 VHH ライブラリでは 3.2×10^7 であった。採血した際のリンパ球の数は 2×10^7 個であったことから、今回構築したライブラリは最低限の抗体多様性を確保できていることを確認した。形質転換した大腸菌 (TG-1) にヘルパーファージ (M13KO7) を重感染させ、VHH ファージライブラリを構築した (Fig.4-13)。

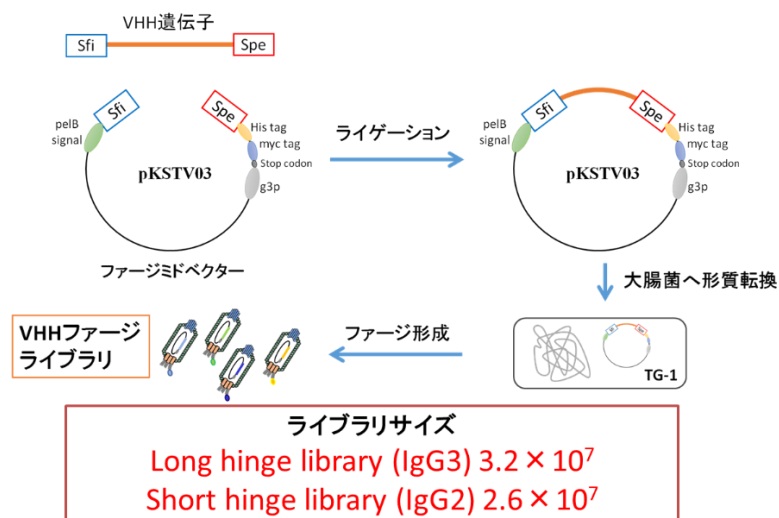


Fig.4-13 VHH ファージライブラリの構築の概要

作製したアルパカ免疫 VHH ファージライブラリを用いて、ヒト FcαR に対するバイオパンニングを行った。バイオパンニングでは、従来通りの手法であるイムノプレート上に抗原タンパク質を固相化し、ファージを反応させるパターンだけでなく、ビオチン化した抗原をもちいた可溶性抗原に対するパンニングも実施した。プレート上に抗原タンパク質を固相化すると、本来の抗原構造が崩れ、崩れた構造を認識する VHH がパンニングで得られるといったケースが存在する。そこで、自然な抗原構造に近い条件でパンニングを実施するため、抗原タンパク質とファージを溶液中で反応させる系を考案した。抗原をあらかじめビオチン化しておき、溶液中でファージライブラリと反応させた後にストレプトアビジンを固相化したプレートで回収するといった系である (Fig.4-6)。

Long hinge library, Short hinge library 共に 2R のパンニングを行い、各ラウンドのファージライブラリを用いてファージ ELISA を行った。Long hinge library では、通常の固相化パンニングで 1R を実施した後に、固相化法で行った 2R-1、ビオチン化法で行った 2Rb-1 のライブラリにおいて FcαR に対し特異的な VHH を提示したファージの濃縮を確認することができた (Fig.4-14)。Short hinge library では、通常の固相化法で行った 2R-1 のライブラリにおいて FcαR に対し特異的な VHH を提示したファージの濃縮を確認することができた (Fig.4-15)。

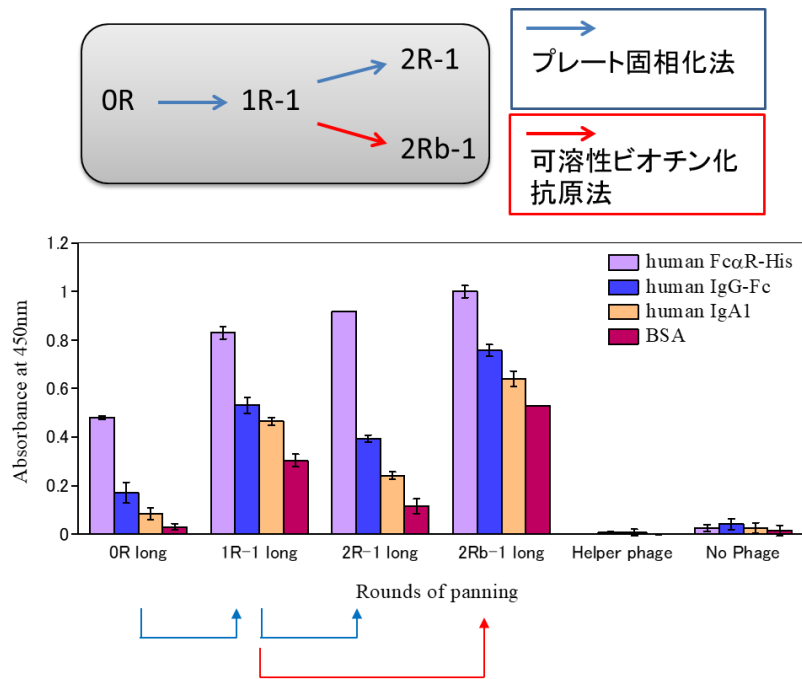


Fig.4-14 Long hinge library (IgG₂) ライブラリを用いた 2R のパンニング後の
ファージを用いて Fc α R 特異的な結合を ELISA で評価

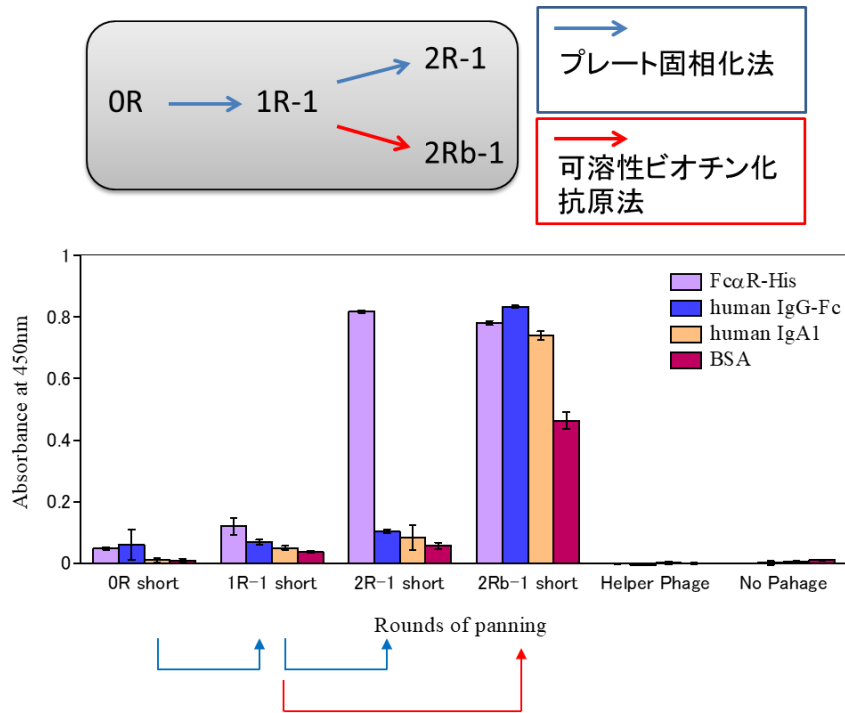


Fig.4-15 Short hinge library (IgG₃) ライブラリを用いた 2R のパンニング後の
ファージを用いて Fc α R 特異的な結合を ELISA で評価

Long hinge library では通常パンニングおよびビオチン化パンニングでのファージ濃縮が見られたが、Short hinge library ではビオチン化パンニングでのファージ濃縮が見られなかった。IgARc 特異的 VHH を提示したファージの濃縮が確認できたため、Long 2R-1, 2Rb-1 Short 2R-1 のライブラリからそれぞれクローンをランダムに 30 クローンピックアップし、ファージ形成後 IgARc、human IgG Fc、BSA を抗原としてファージ ELISA を行った。この ELISA の結果、IgARc にのみ結合を示していると思われるクローンを Long 2R-1(プレート固相化法) から 21 クローン、Long 2Rb-1 (可溶性ビオチン化抗原法) から 17 クローン、Short 2R-1 (プレート固相化法) から 11 クローン確認することができた (Fig.4-16 A-C)。(赤枠は特異的結合を示したクローン)

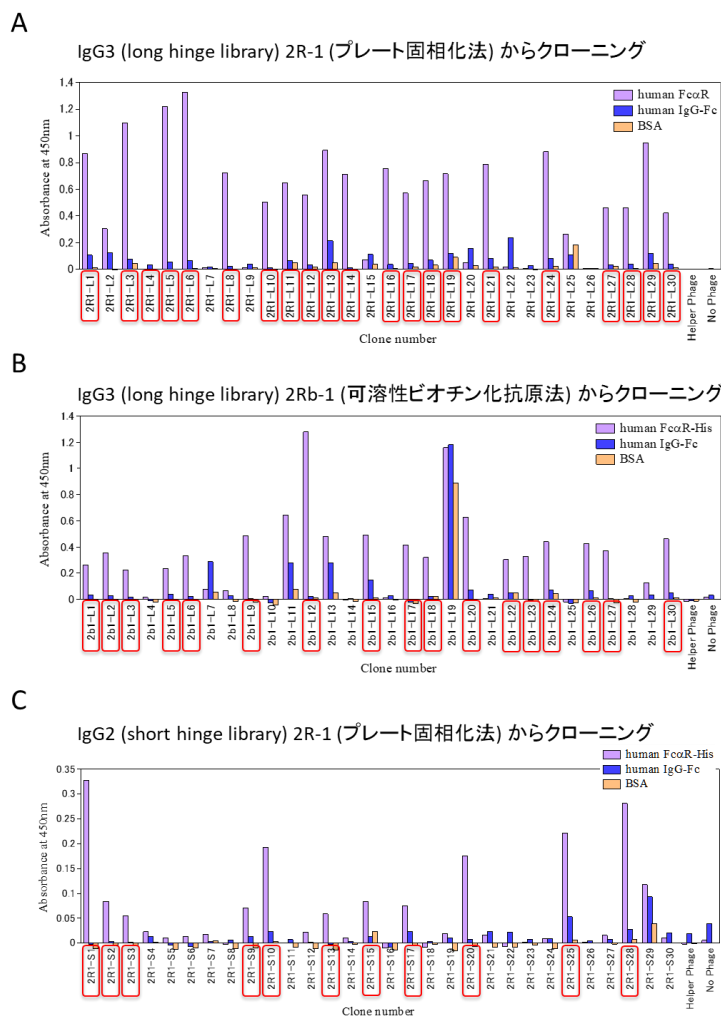
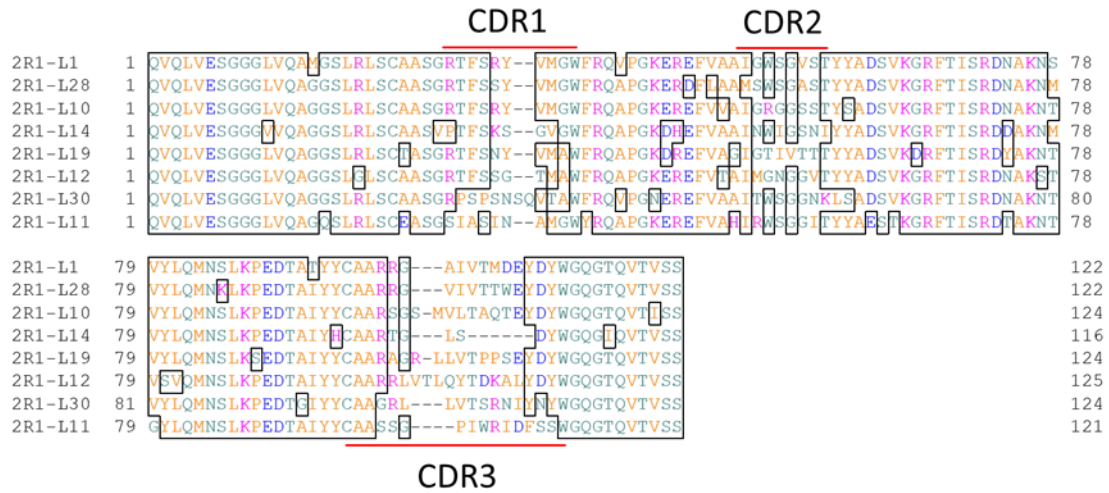


Fig.4-16 各ラウンドからのクローニングと FcαR 結合能評価

クローンはランダムにピックアップした際のクローンナンバーならびにパンニングラウンド名を関連付けて命名した。今回スクリーニングを行ったクローンのうち、FcαR に結合を示したクローンの配列解析を行った結果、Long hinge library から 15 種類、Short hinge library から 4 種類のクローンをそれぞれ獲得した。プレート固相化法でパンニングを実施した Long hinge ライブラリの 2R-1 と可溶性ビオチン化抗原法でパンニングを実施した 2Rb-1 では 1 クローン (2R1-L11, 2b1-L18) のみが重複し、パンニング手法によって異なるクローンが得られることが示唆された。3 つのパンニングラウンドから重複が 1 つであったため、合計 19 種類の VHH 配列を同定した (Fig.4-17 A-C)。

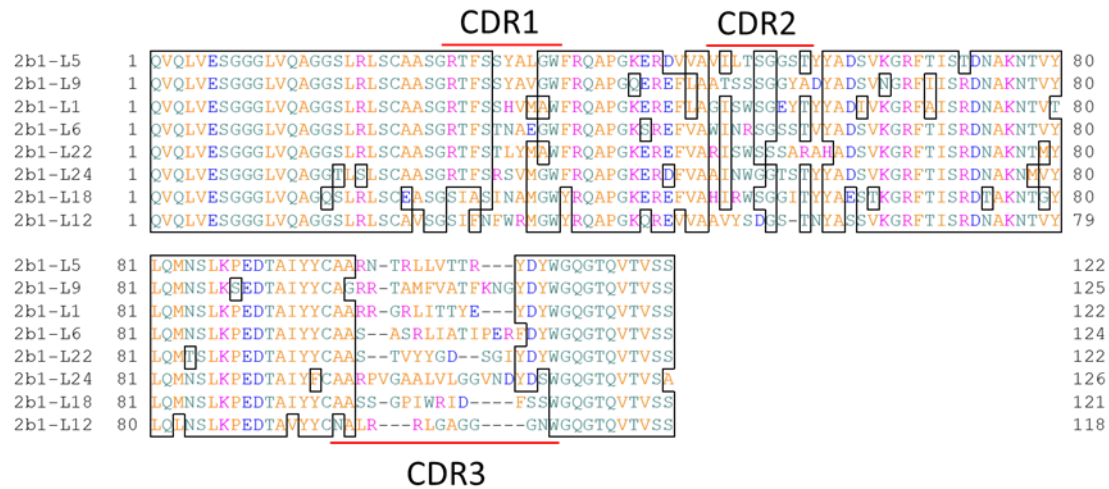
A

IgG₂(long hinge library) 2R-1 (プレート固相化法)からクローニング



B

IgG₃(long hinge library) 2Rb-1 (可溶性ビオチン化抗原法)からクローニング



C

IgG₃(short hinge library) 2R-1 (プレート固相化法)からクローニング

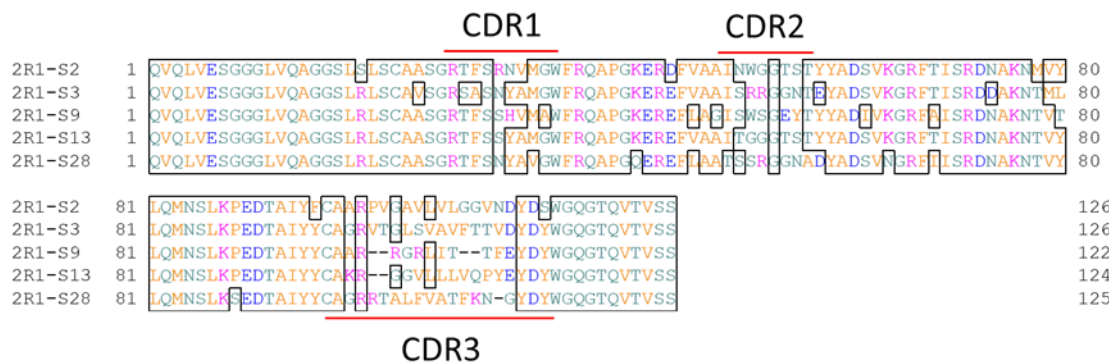


Fig.4-17 各ラウンドから単離された抗 FcαR VHH のアミノ酸配列

CCAP 法を用いた二重特異性抗体の作製

IgG 抗体への VHH 抗体の修飾は、最初に N 末端に Azide 基を有するペプチドを CCAP 法によって IgG 抗体へ修飾した Azide 修飾 IgG を調製し、これと、C 末端領域に Cys 残基を導入した VHH に DBCO-maleimide(Dibenzocyclooctyne-maleimide) を修飾したものを混合し、クリック反応によって Azide 基と DBCO 間で共有結合を形成することによって作製した (Fig.4-18)。使用する VHH は前述のプライマーを用いて C 末端領域に Cys 残基を導入し、大腸菌 HB2151 株を用いて発現した。

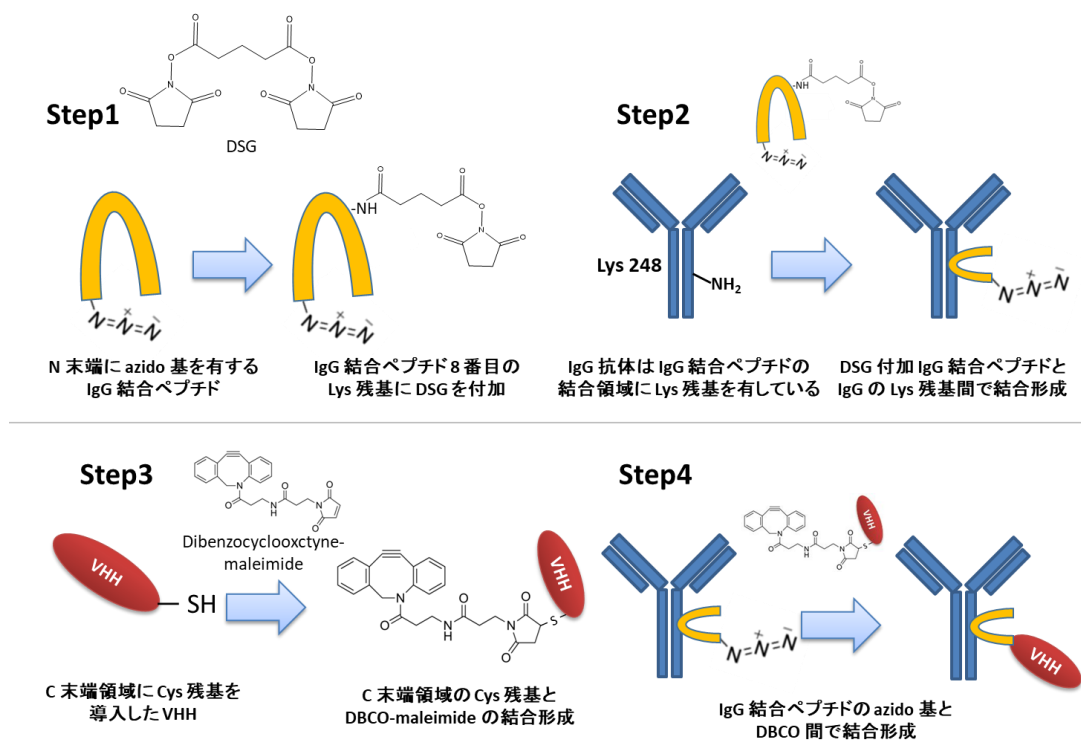


Fig.4-18 CCAP 法による Azide 基を介した VHH の修飾

まず、CCAP 法によって IgG 抗体に VHH 抗体を修飾可能であること、IgG 側、VHH 側双方の抗原結合能への影響を検証するため、Trastuzumab に VHH の修飾を行った。Trastuzumab に VHH が 2 分子結合した Trastuzumab-VHH 2 価のものだけでなく、VHH が 1 つ結合した Trastuzumab-VHH 1 価のコンジュゲート両方を得るために Azide 基を有するペプチドを 2 価で修飾した Trastuzumab と 1 価で修飾した Trastuzumab 両方を混合した状態で DBCO 修飾した VHH とのクリ

ック反応を実施した。クリック反応後に反応物を陽イオン交換クロマトグラフィーで分取した (Fig.4-19)。この陽イオン交換クロマトグラフィーの3つのピークをそれぞれ還元条件下で SDS-PAGE 分析したところ、No.1 のピークは Trastuzumab の重鎖と軽鎖のバンドのみが確認され、Trastuzumab に Azide 基を有するペプチドが結合した未反応 Trastuzumab であることを確認できた。No.2 のピークでは重鎖と軽鎖のバンドに加えて重鎖に VHH が結合したバンドを確認することができ、Trastuzumab に VHH が1価で結合したコンジュゲートであることを確認した。No.3 のピークでは重鎖のバンドが消失し、軽鎖のバンドと重鎖に VHH が結合したバンドを確認することができ、Trastuzumab に VHH が2価で結合したコンジュゲートであることを確認した (Fig.4-20)。

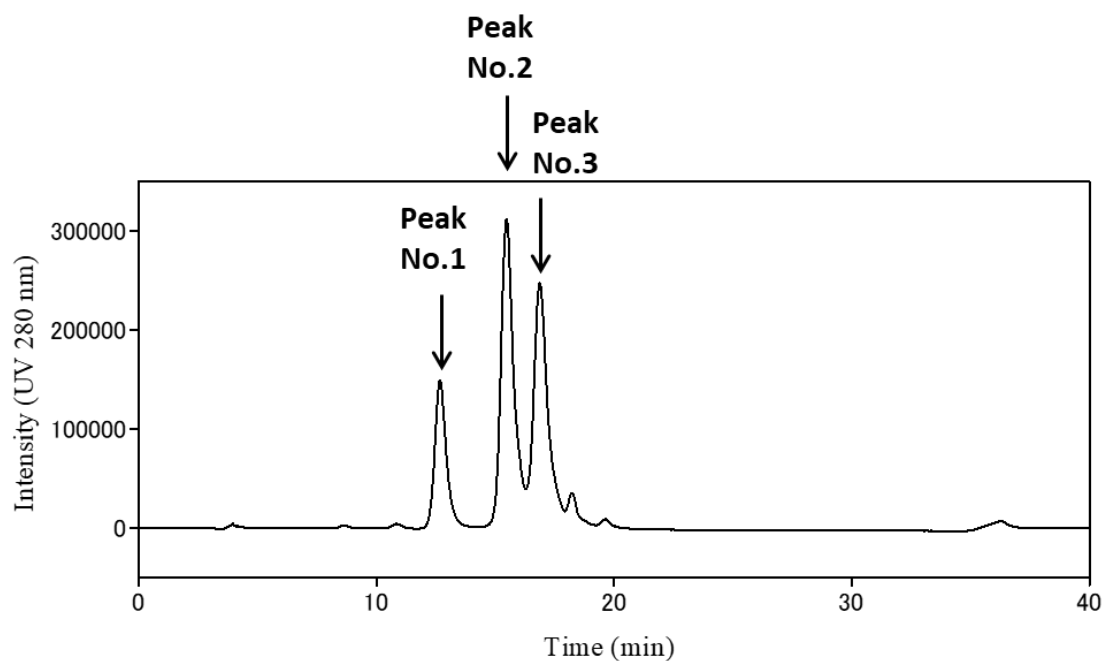


Fig.4-19 陽イオン交換クロマトグラフィーでの Trastuzumab-VHH の分取

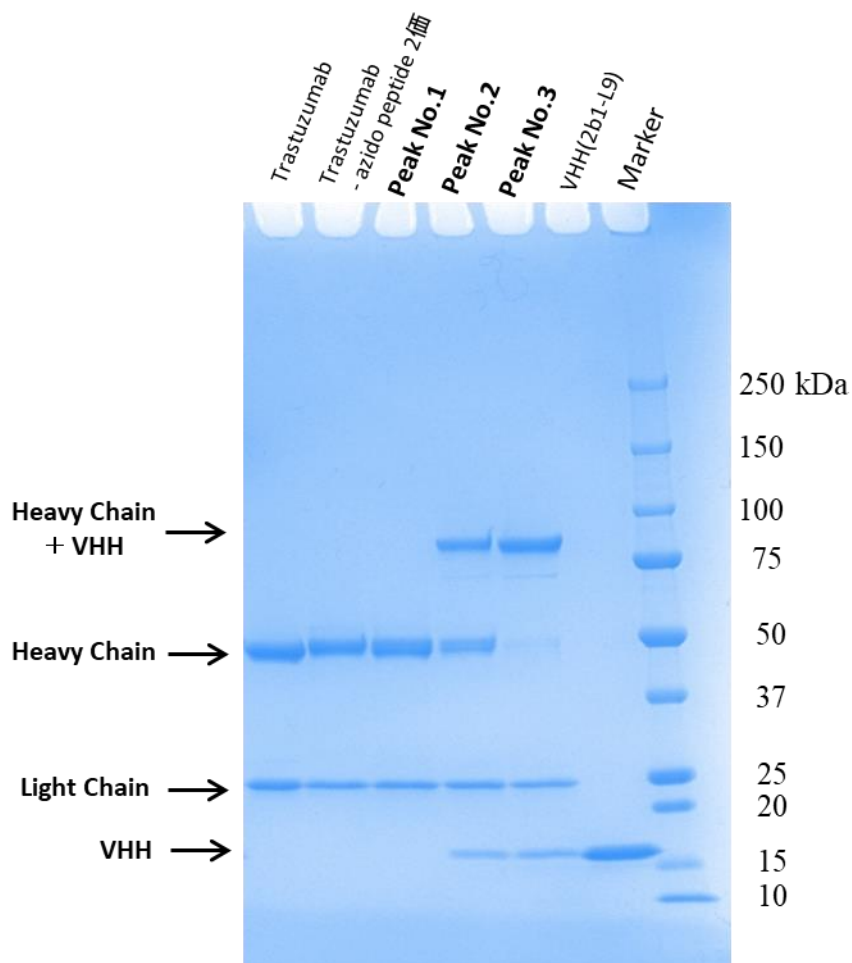
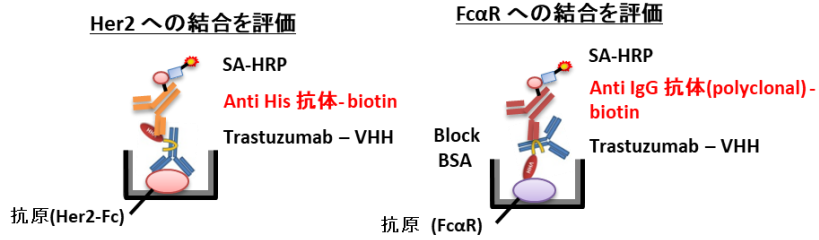


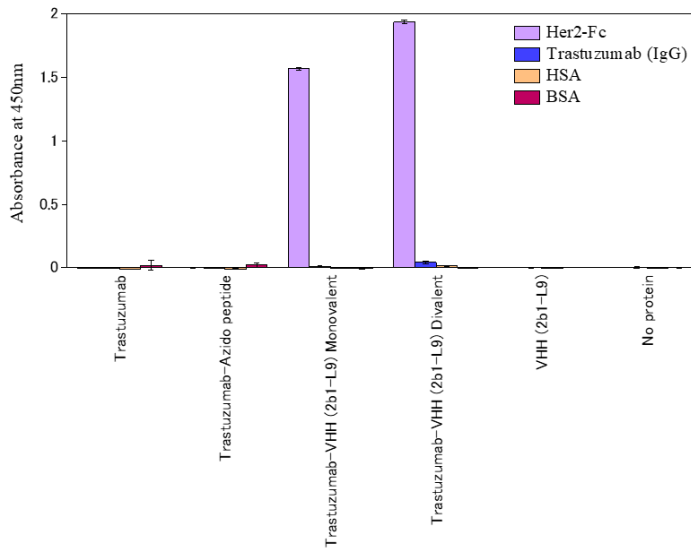
Fig.4-20 分取した Trastuzumab-VHH コンジュゲートの SDS-PAGE

作製した Trastuzumab-VHH コンジュゲートが IgG、VHH それぞれの特異的結合能ならびに親和性を維持していることを確認するために、ELISA での抗原結合能評価と SPR 解析による親和性評価を行った。修飾に使用した VHH 抗体は His tag 精製のため His tag を有している。そのため、ELISA では Trastuzumab-VHH の Her2 に対する結合を評価するために 2 次抗体として anti-His 抗体を使用し、コンジュゲートの VHH を検出した (Fig.4-21 A)。また、Trastuzumab-VHH の Fc α R への結合を評価するために 2 次抗体として anti-IgG 抗体を使用した (Fig.4-21 A)。このような ELISA を行うことで、Trastuzumab-VHH コンジュゲート体が各抗原に結合していることを確認することができた (Fig.4-21 B,C)。

A



B



C

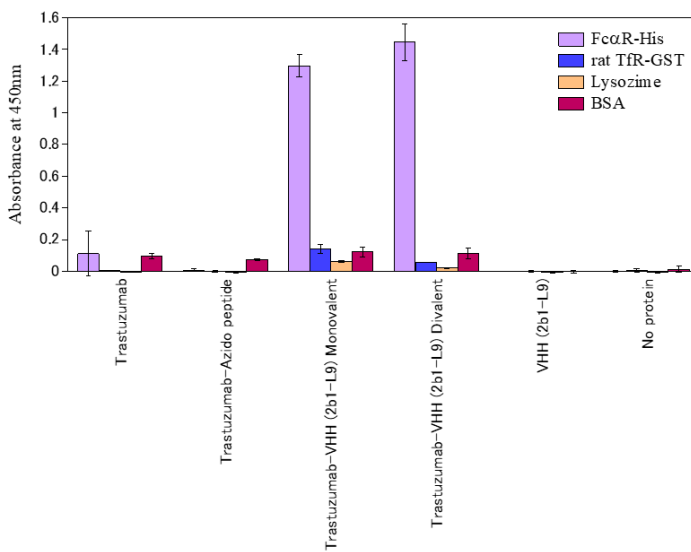


Fig.4-21 Trastuzumab-VHH コンジュゲートの抗原結合能を ELISA で評価

SPR 解析による親和性評価でも Trastuzumab-VHH は抗原である Her2 ならびに FcαR へ結合可能であることが示された (Table 4-2)。FcαR への結合親和性は元の VHH (2b1-L9) が $K_D = 940$ pM で、VHH 1 価の Trastuzumab-VHH では $K_D = 540$ pM、2 価では $K_D = 97$ pM と 1 価では親和性に大きな差は無いが 2 価にすることでアビディティ効果によって親和性が約 10 倍向上していた。VHH 2 価のコンジュゲート体では FcαR に対する結合速度 (k_a) ならびに解離速度 (k_d) 双方が向上していた。Her2 に対する結合親和性は、元の Trastuzumab が $K_D = 7.6$ pM、VHH 1 価の Trastuzumab-VHH では $K_D = 0.43$ pM、2 価では $K_D = 0.5$ pM とコンジュゲート体にする事で約 10 倍程度親和性が増強しているといった結果になった。親和性向上の要因は不明であるが、ペプチドや VHH が修飾されたことによって抗体全体の安定性が向上し、その結果として親和性が向上した可能性は考えられる。少なくとも、Her2 に対する結合親和性は低下していないことが示された。

Table 4-2 Trastuzumab-VHH の FcαR ならびに Her2 への結合親和性




	FcαR	Her2
Trastuzumab (IgG)	No binding	$K_a = 1.0 \times 10^6$ (/Ms) $K_d = 8.0 \times 10^{-6}$ (/s) $K_D = 7.6$ pM
VHH (2b1-L9)	$K_a = 7.7 \times 10^5$ (/Ms) $K_d = 7.3 \times 10^{-4}$ (/s) $K_D = 940$ pM	No binding
Trastuzumab-VHH(2b1-L9) Monovalent	$K_a = 8.3 \times 10^5$ (/Ms) $K_d = 4.5 \times 10^{-4}$ (/s) $K_D = 540$ pM	$K_a = 8.3 \times 10^5$ (/Ms) $K_d = 3.6 \times 10^{-7}$ (/s) $K_D = 0.43$ pM
Trastuzumab-VHH(2b1-L9) Divalent	$K_a = 1.9 \times 10^6$ (/Ms) $K_d = 1.8 \times 10^{-4}$ (/s) $K_D = 97$ pM	$K_a = 7.5 \times 10^5$ (/Ms) $K_d = 3.7 \times 10^{-7}$ (/s) $K_D = 0.5$ pM

Trastuzumab を用いた実験において、IgG と VHH を CCAP 法によって連結し、二重特異性抗体として利用できることを確認できた。次に、二重特異性抗

体化することでNK細胞と好中球両方エフェクター細胞として利用可能であることの確認を行った。好中球と Flow Cytometry を使用した実験系を考案したが、その際 SKBR3 のような接着細胞では、Trypsin 処理による細胞回収操作が必要となり、実験操作が煩雑になるため、今後の実験では浮遊細胞である RAJI 細胞（CD20 発現細胞）と抗 CD20 抗体である Rituximab を使用して実験を行った。

最初に、VHH を修飾した状態での NK 細胞の活性化に関わる FcγRIIIa を含む Fc 受容体への結合能の確認を行った。Rituximab にアジド基を有するペプチド 1 個かつ VHH も 1 個で修飾したコンジュゲート体を作製し、Biacore T200 を用いた SPR 解析を実施した (Table 4-3)。結果として、免疫細胞の活性化に関わる Fc 受容体への結合親和性は、FcγRI に対する結合親和性は元の Rituximab が 32 nM、Azide 基を有するペプチドを 1 個で修飾した Rituximab では 17 nM、ペプチド 1 個かつ VHH も 1 個で修飾した Rituximab では 20 nM と大差は見られなかった、一方 FcγRIIIa への結合親和性はそれぞれ 160 nM、100 nM、77 nM であり、前述のペプチドを修飾した場合と同様、ペプチドが結合した効果によって親和性が向上していることが確認できた。この結果は、CCAP 法によって作製した IgG-VHH コンジュゲート体が NK 細胞を利用可能なだけでなく、より強力な NK 細胞由来 ADCC 活性を誘導できる可能性を示唆している。

Table 4-3 Rituximab-VHH の FcγRI ならびに FcγRIIIa への結合親和性

			
FcγRI	$K_a = 1.6 \times 10^5$ (/Ms) $K_d = 5.2 \times 10^{-3}$ (/s) $K_D = 32$ nM	$K_a = 3.1 \times 10^5$ (/Ms) $K_d = 5.4 \times 10^{-3}$ (/s) $K_D = 17$ nM	$K_a = 2.6 \times 10^5$ (/Ms) $K_d = 5.0 \times 10^{-3}$ (/s) $K_D = 20$ nM
FcγRIIIa	$K_a = 8.4 \times 10^4$ (/Ms) $K_d = 1.4 \times 10^{-2}$ (/s) $K_D = 160$nM	$K_a = 8.2 \times 10^4$ (/Ms) $K_d = 8.4 \times 10^{-3}$ (/s) $K_D = 100$nM	$K_a = 8.4 \times 10^5$ (/Ms) $K_d = 6.5 \times 10^{-3}$ (/s) $K_D = 77$nM

引き続き、Rituximab-VHH コンジュゲート体が Rituximab の標的抗原である CD20 ならびに好中球表面受容体である Fc α R 発現細胞に結合可能であるか確認を行った。Fc α R を発現する細胞株として、ヒト前骨髄球性白血病細胞 HL60 細胞が知られているが、DMSO で好中球様に分化させる必要があった⁷⁹。そこで、安定的に Fc α R を発現する細胞株を作製するため、分化した HL60 細胞から total RNA を抽出し、Fc α R 遺伝子を増幅、pVITRO1-neo-mcs ベクター (Invitrogen) に組み込み、Jurkat 細胞へリポフェクションによって形質転換した。形質転換した Jurkat 細胞は G418 によってセレクションし、Flow Cytometry による分析によって Fc α R (CD89) の発現を確認した (Fig.4-22)。また、ヒトバーキットリンパ腫・B リンパ球様細胞である RAJI 細胞 (CD20 発現細胞) と、この Fc α R 発現 Jurkat 細胞を用いて、Rituximab-VHH コンジュゲート体が細胞表面の CD20 (Fig.4-23) ならびに Fc α R へ結合可能であることを確認した (Fig.4-24)。結果として、Fc α R 遺伝子を形質転換した Jurkat 細胞は Fc α R を発現しており (Fig.4-22)、Rituximab-VHH コンジュゲート体が RAJI 細胞 (Fig.4-23 C,D) ならびに Fc α R 発現 Jurkat 細胞 (Fig.4-24 C,D) に結合可能であることが確認できた。二次抗体として、anti-His tag 抗体を用いた実験では Rituximab-VHH の VHH 側 His tag を検出している。また、二次抗体 anti-His tag 抗体が若干細胞と相互作用しているが、Rituximab-VHH の結合と比較して相互作用は微弱であり、実験結果には影響しないと考えられる。

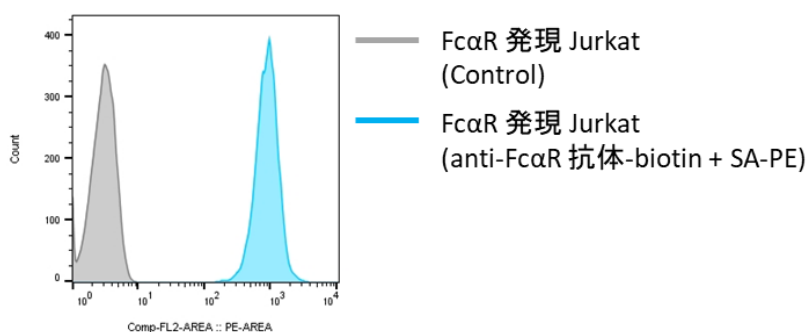


Fig.4-22 作製した Fc α R 形質転換 Jurkat 細胞の Fc α R 発現確認

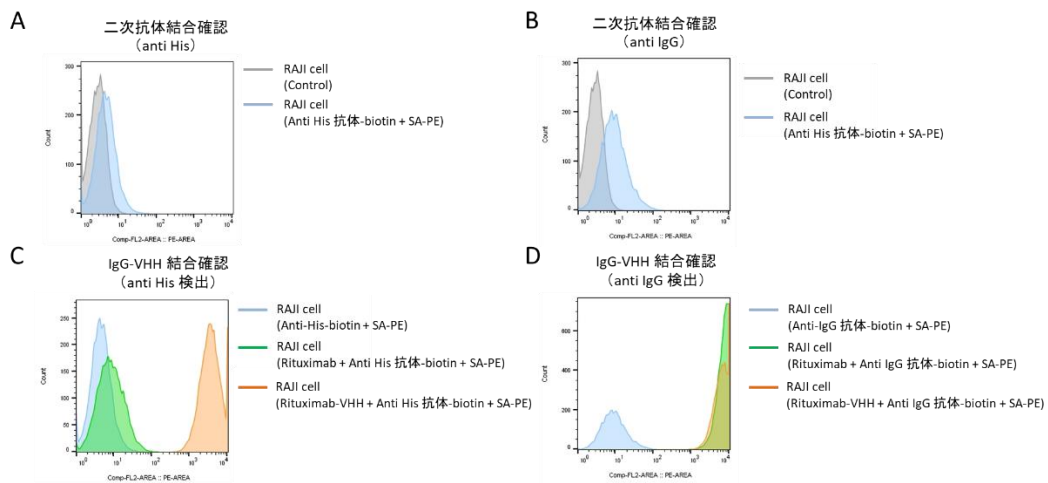


Fig.4-23 Rituximab-VHH の RAJI 細胞への結合確認

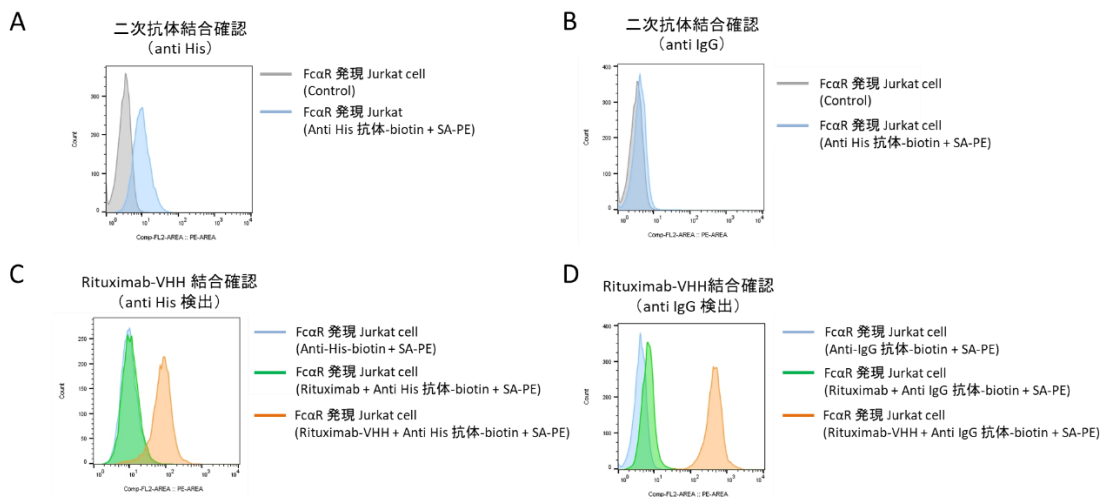


Fig.4-24 Rituximab-VHH の FcαR 発現 Jurkat 細胞への結合確認

4-4 まとめと考察

CCAP 法の応用法として、抗体薬物複合体 (ADC) と VHH 抗体を用いた二重特異性抗体を作製することができた。ADC は乳がんの治療に使用される抗 Her2 抗体 Trastuzumab を用いて、チューブリン重合阻害剤である DM1 を修飾し、作製した。CCAP 法によって作製した ADC は Trastuzumab にアミンカップリング法によって DM1 を修飾した T-DM1 と同様に Her2 発現細胞特異的な細胞増殖抑制効果を発揮し (Fig.4-10)、CCAP 法が ADC の作製法として応用可能であることを確認する事ができた。実際に CCAP 法によって ADC を作製する場合、ペプチドを 2 価にすると体内半減期が短くなるため、1 価のコンジュゲートとして使用する必要がある。また、今回の実験ではペプチド 1 分子に DM1 を 1 分子で修飾したため、平均 3.5 分子の DM1 が修飾されている T-DM1 より効果が弱いことが実験により判明した (Fig.4-10)。これを改善するため、ペプチドの末端デザインを変更し、1 分子のペプチドに複数の DM1 を修飾可能とする必要があると考えている。

アルパカに Fc α R を免疫し、免疫後の末梢血リンパ球から構築した VHH ファージライブラリから Fc α R 特異的クローンを 19 種類獲得することができた (Fig.4-17)。また、Azide 基を有するペプチドを用いて CCAP 法により、IgG へ VHH を修飾することができた (Fig.4-19, 4-20)。作製した IgG-VHH は IgG 側、VHH 側双方の結合親和性を維持していることを確認した (Table 4-2)。これまでに報告されている二重特異性抗体は遺伝子工学的手法によって 2 種類の重鎖と軽鎖を発現するよう改変した発現細胞を用いるか、重鎖または軽鎖の末端に融合タンパク質の状態を抗体ドメインを導入するよう改変する必要があった。前者では重鎖と軽鎖が正しい組み合わせで形成される必要があり、後者では導入した抗体ドメインが IgG 側のいずれかの N 末端領域が塞がれることになる。抗体の結合は N 末端領域が重要であり、N 末端へのタンパク質融合は抗原結合親和性に不利にはたらく。一方、本研究で作製した CCAP 法による二重特異性抗体は従来通りの手法で作製された IgG 抗体にペプチドと VHH を混ぜるだけで結合を形成することが可能である。また、VHH の修飾は C 末端側に導入した Cys 残基を介して行うため、IgG、VHH 双方の N 末端がフリーの状態に二重特異性抗体を作製することができる。そのため、前述の通り親和性への影響のな

い二重特異性抗体を構築することができた。また、VHHを修飾した状態であってもFcγRへの結合能が維持されていた (table 4-3)。これらの結果は、CCAP法が強力な二重特異性抗体作製手法としての可能性を有していることと、作製した二重特異性抗体がコンセプト通りNK細胞と好中球両方をエフェクター細胞として利用可能であることを示唆している。

第5章

総括と今後の展望

第5章 総括と今後の展望

IgG への分子修飾手法は抗体の産業応用において重要な役割を果たしてきた。医薬品としては、抗がん剤を修飾した抗体薬物複合体 (ADC) や放射性核種修飾抗体が開発され^{80,81}、標的特異的な抗がん剤や放射性核種の輸送を可能にし、研究ツールとしてはビオチン標識抗体や蛍光標識抗体は必須のものとなっている。しかし一方で、抗体の部位特異的修飾は長らく課題として残っていた。近年、様々なグループが部位特異的修飾法を報告している。例としては、抗体への遺伝子改変によって、新たに Cys 残基を導入し、その Cys 部位特異的にコンジュゲートを行う手法⁸²や、抗体にアルデヒド基を有する非天然アミノ酸 (パラアセチルフェニルアラニン) を導入し、アルコキシアミンを有する分子をオキシム結合によって修飾する手法⁸³や、酵素 (グリコトランスフェラーゼ) を用いて、抗体の Asn 297 糖鎖特異的にケトン基を有する糖鎖を修飾した後にアルコキシアミンを有する分子をオキシム結合によって修飾する手法^{84,85}などが報告されている。抗体改変により Cys 残基や非天然アミノ酸を導入する手法は抗体に遺伝子工学的改変を加える必要がある。また、酵素を用いて糖鎖に修飾を行う手法は、抗体の糖鎖が有している FcγRIIIa との結合能などの機能への悪影響といった問題点がある。我々が開発した CCAP 法は、抗体側を改変することなく、DSG 修飾したペプチドと抗体を混合するだけで部位特異的分子修飾を行うことができる。また、ペプチド修飾によって抗原結合能に悪影響がなく、FcγR との結合も維持され、FcγRIIIa への結合親和性はむしろ向上することが本研究によって見出された。一方、FcRn との結合に関しては 2 価のコンジュゲートでは失われる。FcRn との結合能が失われると体内半減期が短くなるため、CCAP 法によるコンジュゲートを医薬品として利用する場合、1 価のフォーマットを利用する必要がある。そのため、課題として 1 価のコンジュゲートのみを選択的に作製する手法の確立が必要となるが、これは今後の課題であろう。さらにまた、本 CCAP 法で使用している IgG 結合ペプチドはヒト IgG1、2、4 とウサギ IgG に結合可能であるが、マウスやラットの抗体とは結合できないため、試薬として応用する場合にはマウスや、ラットにも交差性のあるペプチドをデザインする必要がある。

CCAP 法による VHH 抗体を用いた二重特異性抗体の作製では、IgG 側、VHH 側双方の N 末端をフリーにすることが可能であり、抗原との結合親和性を維持した状態の二重特異性抗体を構築することができた。Fc α R 免疫を行ったアルパカ末梢血由来のリンパ球から作製した VHH フェージライブラリからは 20 種類の抗 Fc α R VHH を獲得することができたが、それらとガン細胞特異的 IgG 抗体の組み合わせ、IgG-VHH 間のリンカー長の違いによる好中球活性化効率の変化を検討して、より高い ADCC 活性を持つ二重特異性抗体の構築を検討する必要がある。

引用文献

- (1) Fellah, J. S.; Wiles, M. V.; Charlemagne, J.; Schwager, J. Evolution of Vertebrate IgM: Complete Amino Acid Sequence of the Constant Region of *Ambystoma Mexicanum* μ Chain Deduced from cDNA Sequence. *Eur. J. Immunol.* **1992**, *22* (10), 2595–2601.
- (2) Ehrenstein, M. R.; Notley, C. A. The Importance of Natural IgM: Scavenger, Protector and Regulator. *Nature Reviews Immunology.* **2010**, *10* (11), 778–786.
- (3) Heyman, B.; Pilström, L.; Shulman, M. J. Complement Activation Is Required for IgM-Mediated Enhancement of the Antibody Response. *J. Exp. Med.* **1988**, *167* (6), 1999–2004.
- (4) Kubagawa, H.; Oka, S.; Kubagawa, Y.; Torii, I.; Takayama, E.; Kang, D.-W.; Gartland, G. L.; Bertoli, L. F.; Mori, H.; Takatsu, H.; et al. Identity of the Elusive IgM Fc Receptor (FcmuR) in Humans. *J. Exp. Med.* **2009**, *203* (12), 2779–2793.
- (5) Ouchida, R.; Mori, H.; Hase, K.; Takatsu, H.; Kurosaki, T.; Tokuhisa, T.; Ohno, H.; Wang, J.-Y. Critical Role of the IgM Fc Receptor in IgM Homeostasis, B-Cell Survival, and Humoral Immune Responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (40), 2699–2706.
- (6) Monteiro, R. C.; Van De Winkel, J. G. J. IgA Fc Receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **2003**, *21*, 177–204.
- (7) Monteiro, R. C.; Kubagawa, H.; Cooper, M. D. Cellular Distribution, Regulation, and Biochemical Nature of an Fc Alpha Receptor in Humans. *J. Exp. Med.* **1990**, *171* (3), 597–613.
- (8) Monteiro, R. C.; Cooper, M. D.; Kubagawa, H. Molecular Heterogeneity of Fc Alpha Receptors Detected by Receptor-Specific Monoclonal Antibodies. *J. Immunol.* **1992**, *148* (6), 1764–1770.
- (9) Monteiro, R. C.; Hostoffer, R. W.; Cooper, M. D.; Bonner, J. R.; Gartland, G. L.; Kubagawa, H. Definition of Immunoglobulin A Receptors on Eosinophils and Their Enhanced Expression in Allergic Individuals. *J. Clin. Invest.* **1993**, *92* (4),

- 1681–1685.
- (10) Otten, M. a; Rudolph, E.; Dechant, M.; Tuk, C. W.; Reijmers, R. M.; van De Winkel, J. G. J.; Beelen, R. H. J.; van Egmond, M. Immature Neutrophils Mediate Tumor Cell Killing via IgA but Not IgG Fc Receptors. *J. Immunol.* **2005**, *174* (9), 5472–5480.
- (11) Van Egmond, M.; Damen, C. A.; Van Spriël, A. B.; Vidarsson, G.; Van Garderen, E.; Van De Winkel, J. G. J. IgA and the IgA Fc Receptor. *Trends Immunol.* **2001**, *22* (4), 205–211.
- (12) Bakema, J. E.; Van Egmond, M. The Human Immunoglobulin A Fc Receptor Fc α RI: A Multifaceted Regulator of Mucosal Immunity. *Mucosal Immunol.* **2011**, *4* (6), 612–624.
- (13) Kinet, J. P. The High-Affinity IgE Receptor (Fc Epsilon RI): From Physiology to Pathology. *Annu.Rev.Immunol* **1999**, *17*, 931–972.
- (14) Sutton, B. J.; Gould, H. J. The Human IgE Network. *Nature* **1993**, *366*, 421–428.
- (15) Daëron, M.; Malbec, O.; Latour, S.; Arock, M.; Fridman, W. H. Regulation of High-Affinity IgE Receptor-Mediated Mast Cell Activation by Murine Low-Affinity IgG Receptors. *J. Clin. Invest.* **1995**, *95* (2), 577–585.
- (16) Bruhns, P. Properties of Mouse and Human IgG Receptors and Their Contribution to Disease Models. *Blood* **2015**, *119* (24), 5640–5649.
- (17) Daëron, M. Fc Receptor Biology. *Annu. Rev. Immunol.* **1997**, *15*, 203–234.
- (18) Guilliams, M.; Bruhns, P.; Saeys, Y.; Hammad, H.; Lambrecht, B. N. The Function of Fc γ Receptors in Dendritic Cells and Macrophages. *Nat. Publ. Gr.* **2014**, *14* (2), 94–108.
- (19) Cooley, S.; Burns, L. J.; Repka, T.; Miller, J. S. Natural Killer Cell Cytotoxicity of Breast Cancer Targets Is Enhanced by Two Distinct Mechanisms of Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity against LFA-3 and HER2/Neu. *Exp. Hematol.* **1999**, *27* (10), 1533–1541.
- (20) Wang, W.; Erbe, A. K.; Hank, J. A.; Morris, Z. S.; Sondel, P. M. NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 368.

- (21) van den Broek, M. F.; Kägi, D.; Zinkernagel, R. M.; Hengartner, H. Perforin Dependence of Natural Killer Cell-mediated Tumor Control in Vivo. *Eur. J. Immunol.* **1995**, *25* (12), 3514–3516.
- (22) Jenne, D. E.; Tschopp, J. Granzymes, a Family of Serine Proteases Released from Granules of Cytolytic T Lymphocytes upon T Cell Receptor Stimulation. *Immunol. Rev.* **1988**, *103*, 53–71.
- (23) Chávez-Galán, L.; Arenas-Del Angel, M. C.; Zenteno, E.; Chávez, R.; Lascurain, R. Cell Death Mechanisms Induced by Cytotoxic Lymphocytes. *Cell. Mol. Immunol.* **2009**, *6* (1), 15–25.
- (24) Takai, T. Roles of Fc Receptors in Autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2* (8), 580–592.
- (25) Yuasa, T.; Kubo, S.; Yoshino, T.; Ujike, A.; Matsumura, K.; Ono, M.; Ravetch, J. V.; Takai, T. Deletion of Fcγ₂ Receptor IIB Renders H-2(b) Mice Susceptible to Collagen-Induced Arthritis. *J. Exp. Med.* **1999**, *189* (1), 187–194.
- (26) Nakamura, A.; Nukiwa, T.; Takai, T. Dereglulation of Peripheral B-Cell Development in Enhanced Severity of Collagen-Induced Arthritis in FcγRIIB-Deficient Mice. *J. Autoimmun.* **2003**, *20* (3), 227–236.
- (27) Cartron, G.; Dacheux, L.; Salles, G.; Solal-Celigny, P.; Bardos, P.; Colombat, P.; Watier, H. Therapeutic Activity of Humanized Anti-CD20 Monoclonal Antibody and Polymorphism in IgG Fc Receptor FcγRIIIa Gene. *Blood* **2002**, *99* (3), 754–758.
- (28) Anolik, J. H.; Campbell, D.; Felgar, R. E.; Young, F.; Sanz, I.; Rosenblatt, J.; Looney, R. J. The Relationship of FcγRIIIa Genotype to Degree of B Cell Depletion by Rituximab in the Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* **2003**, *48* (2), 455–459.
- (29) Shields, R. L.; Namenuk, A. K.; Hong, K.; Meng, Y. G.; Rae, J.; Briggs, J.; Xie, D.; Lai, J.; Stadlen, A.; Li, B.; et al. High Resolution Mapping of the Binding Site on Human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII, and FcRn and Design of IgG1 Variants with Improved Binding to the FcγR. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (9), 6591–6604.

- (30) Satoh, M.; Iida, S.; Shitara, K. Non-Fucosylated Therapeutic Antibodies as next-Generation Therapeutic Antibodies. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2006**, *6* (11), 1161–1171.
- (31) Wuhrer, M.; Selman, M. H. J.; McDonnell, L. A.; Kumpfel, T.; Derfuss, T.; Khademi, M.; Olsson, T.; Hohlfeld, R.; Meinl, E.; Krumbholz, M. Pro-Inflammatory Pattern of IgG1 Fc Glycosylation in Multiple Sclerosis Cerebrospinal Fluid. *J. Neuroinflammation* **2015**, *12*, 235.
- (32) Niwa, R.; Sakurada, M.; Kobayashi, Y.; Uehara, A.; Matsushima, K.; Ueda, R.; Nakamura, K.; Shitara, K. 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.* **2005**, *11* (6), 2327–2336.
- (33) Masuda, K.; Kubota, T.; Kaneko, E.; Iida, S.; Wakitani, M.; Kobayashi-Natsume, Y.; Kubota, A.; Shitara, K.; Nakamura, K. Enhanced Binding Affinity for FcγRIIIa of Fucose-Negative Antibody Is Sufficient to Induce Maximal Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *Mol. Immunol.* **2007**, *44* (12), 3122–3131.
- (34) Yamane-Ohnuki, N.; Kinoshita, S.; Inoue-Urakubo, M.; Kusunoki, M.; Iida, S.; Nakano, R.; Wakitani, M.; Niwa, R.; Sakurada, M.; Uchida, K.; et al. Establishment of FUT8 Knockout Chinese Hamster Ovary Cells: An Ideal Host Cell Line for Producing Completely Defucosylated Antibodies with Enhanced Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *87* (5), 614–622.
- (35) Brambell, F. W. R.; Hemmings, W. A.; Morris, I. G. A Theoretical Model of γ -Globulin Catabolism. *Nature* **1964**, *203*, 1352–1354.
- (36) Simister, N. E.; Mostov, K. E. An Fc Receptor Structurally Related to MHC Class I Antigens. *Nature* **1989**, *337* (6203), 184–187.
- (37) Ghetie, V.; Hubbard, J. G.; Kim, J. K.; Tsen, M. F.; Lee, Y.; Ward, E. S. Abnormally Short Serum Half-Lives of IgG in B2-Microglobulin-Deficient Mice. *Eur. J. Immunol.* **1996**, *26* (3), 690–696.

- (38) Israel, E. J.; Wilsker, D. F.; Hayes, K. C.; Schoenfeld, D.; Simister, N. E. Increased Clearance of IgG in Mice That Lack B2-Microglobulin: Possible Protective Role of FcRn. *Immunology* **1996**, *89* (4), 573–578.
- (39) Junghans, R. P.; Anderson, C. L. The Protection Receptor for IgG Catabolism Is the Beta2-Microglobulin-Containing Neonatal Intestinal Transport Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93* (11), 5512–5516.
- (40) Ward, E. S.; Ober, R. J. Chapter 4 Multitasking by Exploitation of Intracellular Transport Functions. The Many Faces of FcRn. *Adv Immunol.* **2009**, *103*, 77–115.
- (41) Anderson, C. L.; Chaudhury, C.; Kim, J.; Bronson, C. L.; Wani, M. A.; Mohanty, S. Perspective - FcRn Transports Albumin: Relevance to Immunology and Medicine. *Trends Immunol.* **2006**, *27* (7), 343–348.
- (42) Zalevsky, J.; Chamberlain, A. K.; Horton, H. M.; Karki, S.; Leung, I. W. L.; Sproule, T. J.; Lazar, G. A.; Roopenian, D. C.; Desjarlais, J. R. Enhanced Antibody Half-Life Improves in Vivo Activity. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28* (2), 157–159.
- (43) Igawa, T.; Maeda, A.; Haraya, K.; Tachibana, T.; Iwayanagi, Y.; Mimoto, F.; Higuchi, Y.; Ishii, S.; Tamba, S.; Hironiwa, N.; et al. Engineered Monoclonal Antibody with Novel Antigen-Sweeping Activity In Vivo. *PLoS One* **2013**, *8* (5), e63236.
- (44) Igawa, T.; Haraya, K.; Hattori, K. Sweeping Antibody as a Novel Therapeutic Antibody Modality Capable of Eliminating Soluble Antigens from Circulation. *Immunol. Rev.* **2016**, *270* (1), 132–151.
- (45) Dennis, M. S.; Zhang, M.; Gloria Meng, Y.; Kadkhodayan, M.; Kirchhofer, D.; Combs, D.; Damico, L. A. Albumin Binding as a General Strategy for Improving the Pharmacokinetics of Proteins. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (38), 35035–35043.
- (46) Nguyen, A.; Reyes, A. E.; Zhang, M.; McDonald, P.; Wong, W. L. T.; Damico, L. A.; Dennis, M. S. The Pharmacokinetics of an Albumin-Binding Fab (AB.Fab) Can Be Modulated as a Function of Affinity for Albumin. *Protein Eng. Des. Sel.* **2006**, *19* (7), 291–297.
- (47) Moayeri, M.; Leysath, C. E.; Tremblay, J. M.; Vrentas, C.; Crown, D.; Leppla, S.

- H.; Shoemaker, C. B. A Heterodimer of a VHH (Variable Domains of Camelid Heavy Chain-Only) Antibody That Inhibits Anthrax Toxin Cell Binding Linked to a VHH Antibody That Blocks Oligomer Formation Is Highly Protective in an Anthrax Spore Challenge Model. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290* (10), 6584–6595.
- (48) Vincke, C.; Loris, R.; Saerens, D.; Martinez-Rodriguez, S.; Muyldermans, S.; Conrath, K. General Strategy to Humanize a Camelid Single-Domain Antibody and Identification of a Universal Humanized Nanobody Scaffold. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (5), 3273–3284.
- (49) Van Roy, M.; Ververken, C.; Beirnaert, E.; Hoefman, S.; Kolkman, J.; Vierboom, M.; Breedveld, E.; t Hart, B.; Poelmans, S.; Bontinck, L.; et al. The Preclinical Pharmacology of the High Affinity Anti-IL-6R Nanobody(R) ALX-0061 Supports Its Clinical Development in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **2015**, *17*, 135.
- (50) Köhler, G.; Milstein, C. Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature* **1975**, *256* (5517), 495–497.
- (51) Bernstein, I. D. Monoclonal Antibodies to the Myeloid Stem Cells: Therapeutic Implications of CMA-676, a Humanized Anti-CD33 Antibody Calicheamicin Conjugate. *Leukemia* **2000**, *14* (3), 474–475.
- (52) Sievers, E. L.; Appelbaum, F. R.; Spielberger, R. T.; Forman, S. J.; Flowers, D.; Smith, F. O.; Shannon-Dorcy, K.; Berger, M. S.; Bernstein, I. D. Selective Ablation of Acute Myeloid Leukemia Using Antibody-Targeted Chemotherapy: A Phase I Study of an Anti-CD33 Calicheamicin Immunoconjugate. *Blood* **1999**, *93* (11), 3678–3684.
- (53) Francisco, J. A.; Cerveny, C. G.; Meyer, D. L.; Mixan, B. J.; Klussman, K.; Chace, D. F.; Rejniak, S. X.; Gordon, K. A.; DeBlanc, R.; Toki, B. E.; et al. CAC10-VcMMAE, an Anti-CD30-Monomethyl Auristatin E Conjugate with Potent and Selective Antitumor Activity. *Blood* **2003**, *102* (4), 1458–1465.
- (54) Panowski, S.; Bhakta, S.; Raab, H.; Polakis, P.; Junutula, J. R. Site-Specific Antibody Drug Conjugates for Cancer Therapy. *MAbs* **2014**, *6* (1), 34–45.
- (55) Lewis Phillips, G. D.; Li, G.; Dugger, D. L.; Crocker, L. M.; Parsons, K. L.; Mai,

- E.; Blättler, W. A.; Lambert, J. M.; Chari, R. V. J.; Lutz, R. J.; et al. Targeting HER2-Positive Breast Cancer with Trastuzumab-DM1, an Antibody-Cytotoxic Drug Conjugate. *Cancer Res.* **2008**, *68* (22), 9280–9290.
- (56) Advani, A.; Coiffier, B.; Czuczman, M. S.; Dreyling, M.; Foran, J.; Gine, E.; Gisselbrecht, C.; Ketterer, N.; Nasta, S.; Rohatiner, A.; et al. Safety, Pharmacokinetics, and Preliminary Clinical Activity of Inotuzumab Ozogamicin, a Novel Immunoconjugate for the Treatment of B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma: Results of a Phase I Study. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28* (12), 2085–2093.
- (57) Kantarjian, H. M.; DeAngelo, D. J.; Stelljes, M.; Martinelli, G.; Liedtke, M.; Stock, W.; Gökbuget, N.; O'Brien, S.; Wang, K.; Wang, T.; et al. Inotuzumab Ozogamicin versus Standard Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375* (8), 740–753.
- (58) Elmroth, K.; Nygren, J.; Mårtensson, S.; Ismail, I. H.; Hammarsten, O. Cleavage of Cellular DNA by Calicheamicin gamma1. *DNA Repair (Amst).* **2003**, *2* (4), 363–374.
- (59) Smith, G. P. Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface. *Science* **1985**, *228* (4705), 1315–1317.
- (60) Smith, G. P.; Scott, J. K. Libraries of Peptides and Proteins Displayed on Filamentous Phage. *Methods Enzymol.* **1993**, *217*, 228–257.
- (61) Smith, G. P.; Schultz, D. A.; Ladbury, J. E. A Ribonuclease S-Peptide Antagonist Discovered with a Bacteriophage Display Library. *Gene* **1993**, *128* (1), 37–42.
- (62) Barbas, C. F.; Kang, A. S.; Lerner, R. A.; Benkovic, S. J. Assembly of Combinatorial Antibody Libraries on Phage Surfaces: The Gene III Site. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, *88* (18), 7978–7982.
- (63) Kang, A. S.; Barbas, C. F.; Janda, K. D.; Benkovic, S. J.; Lerner, R. A. Linkage of Recognition and Replication Functions by Assembling Combinatorial Antibody Fab Libraries along Phage Surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, *88* (10), 4363–4366.
- (64) Jespers, L. S.; Messens, J. H.; De Keyser, A.; Eeckhout, D.; Van Den Brande, I.;

- Ganseman, Y. G.; Lauwereys, M. J.; Viasuk, G. P.; Stanssens, P. E. Surface Expression and Ligand-Based Selection of cDNAs Fused to Filamentous Phage Gene VI. *Bio/Technology* **1995**, *13* (4), 378–382.
- (65) Markland, W.; Roberts, B. L.; Saxena, M. J.; Guterman, S. K.; Ladner, R. C. Design, Construction and Function of a Multicopy Display Vector Using Fusions to the Major Coat Protein of Bacteriophage M13. *Gene* **1991**, *109* (1), 13–19.
- (66) Gao, C.; Mao, S.; Lo, C.-H. L.; Wirsching, P.; Lerner, R. A.; Janda, K. D. Making Artificial Antibodies: A Format for Phage Display of Combinatorial Heterodimeric Arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96* (11), 6025–6030.
- (67) Miyazaki, N.; Kiyose, N.; Akazawa, Y.; Takashima, M.; Hagihara, Y.; Inoue, N.; Matsuda, T.; Ogawa, R.; Inoue, S.; Ito, Y. Isolation and Characterization of Antigen-Specific Alpaca (Lama Pacos) VHH Antibodies by Biopanning Followed by High-Throughput Sequencing. *J. Biochem.* **2015**, *158* (3), 205–215.
- (68) Hamers-Casterman, C.; Atarhouch, T.; Muyldermans, S.; Robinson, G.; Hammers, C.; Songa, E. B.; Bendahman, N.; Hammers, R. Naturally Occurring Antibodies Devoid of Light Chains. *Nature* **1993**, *363* (6428), 446–448.
- (69) van Der Linden, R. H.; Frenken, L. G.; de Geus, B.; Harmsen, M. M.; Ruuls, R. C.; Stok, W.; de Ron, L.; Wilson, S.; Davis, P.; Verrips, C. T. Comparison of Physical Chemical Properties of Llama VHH Antibody Fragments and Mouse Monoclonal Antibodies. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1431* (1), 37–46.
- (70) Kolkman, J. A.; Law, D. A. Nanobodies - From Llamas to Therapeutic Proteins. *Drug Discov. Today: Technologies.* **2010**, *7* (2), 139–146.
- (71) Maass, D. R.; Sepulveda, J.; Pernthaner, A.; Shoemaker, C. B. Alpaca (Lama Pacos) as a Convenient Source of Recombinant Camelid Heavy Chain Antibodies (VHHs). *J. Immunol. Methods* **2007**, *324* (1-2), 13–25.
- (72) Ohata, J.; Ball, Z. T. A Hexa-Rhodium Metallopeptide Catalyst for Site-Specific Functionalization of Natural Antibodies. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (36), 12617–12622.
- (73) Lewis Phillips, G. D.; Li, G.; Dugger, D. L.; Crocker, L. M.; Parsons, K. L.; Mai, E.; Blättler, W. A.; Lambert, J. M.; Chari, R. V. J.; Lutz, R. J.; et al. Targeting

- HER2-Positive Breast Cancer with Trastuzumab-DM1, an Antibody-Cytotoxic Drug Conjugate. *Cancer Res.* **2008**, *68* (22), 9280–9290.
- (74) Liu, H.; Saxena, A.; Sidhu, S. S.; Wu, D. Fc Engineering for Developing Therapeutic Bispecific Antibodies and Novel Scaffolds. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 38.
- (75) Niewoehner, J.; Bohrmann, B.; Collin, L.; Urich, E.; Sade, H.; Maier, P.; Rueger, P.; Stracke, J. O.; Lau, W.; Tissot, A. C.; et al. Increased Brain Penetration and Potency of a Therapeutic Antibody Using a Monovalent Molecular Shuttle. *Neuron* **2014**, *81* (1), 49–60.
- (76) Bacac, M.; Fauti, T.; Sam, J.; Colombetti, S.; Weinzierl, T.; Ouaret, D.; Bodmer, W.; Lehmann, S.; Hofer, T.; Hosse, R. J.; et al. A Novel Carcinoembryonic Antigen T-Cell Bispecific Antibody (CEA TCB) for the Treatment of Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22* (13), 3286–3297.
- (77) Valerius, T.; Stockmeyer, B.; van Spriël, a B.; Graziano, R. F.; van den Herik-Oudijk, I. E.; Repp, R.; Deo, Y. M.; Lund, J.; Kalden, J. R.; Gramatzki, M.; et al. FcαRI (CD89) as a Novel Trigger Molecule for Bispecific Antibody Therapy. *Blood* **1997**, *90* (11), 4485–4492.
- (78) Dechant, M.; Beyer, T.; Schneider-Merck, T.; Weisner, W.; Peipp, M.; van de Winkel, J. G. J.; Valerius, T. Effector Mechanisms of Recombinant IgA Antibodies against Epidermal Growth Factor Receptor. *J. Immunol.* **2007**, *179* (5), 2936–2943.
- (79) Jacob, C.; Leport, M.; Szilagyi, C.; Allen, J. M.; Bertrand, C.; Lagente, V. DMSO-Treated HL60 Cells: A Model of Neutrophil-like Cells Mainly Expressing PDE4B Subtype. *Int. Immunopharmacol.* **2002**, *2* (12), 1647–1656.
- (80) Steiner, M.; Neri, D. Antibody-Radionuclide Conjugates for Cancer Therapy: Historical Considerations and New Trends. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17* (20), 6406–6416.
- (81) Weber, J.; Haberkorn, U.; Mier, W. Cancer Stratification by Molecular Imaging. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16* (3), 4918–4946.
- (82) Junutula, J. R.; Flagella, K. M.; Graham, R. A.; Parsons, K. L.; Ha, E.; Raab, H.;

- Bhakta, S.; Nguyen, T.; Dugger, D. L.; Li, G.; et al. Engineered Thio-Trastuzumab-DM1 Conjugate with an Improved Therapeutic Index to Target Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16* (19), 4769–4778.
- (83) Axup, J. Y.; Bajjuri, K. M.; Ritland, M.; Hutchins, B. M.; Kim, C. H.; Kazane, S. A.; Halder, R.; Forsyth, J. S.; Santidrian, A. F.; Stafin, K.; et al. Synthesis of Site-Specific Antibody-Drug Conjugates Using Unnatural Amino Acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (40), 16101–16106.
- (84) Boeggeman, E.; Ramakrishnan, B.; Pasek, M.; Manzoni, M.; Puri, A.; Loomis, K. H.; Waybright, T. J.; Qasba, P. K. Site Specific Conjugation of Fluoroprobes to the Remodeled Fc N-Glycans of Monoclonal Antibodies Using Mutant Glycosyltransferases: Application for Cell Surface Antigen Detection. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20* (6), 1228–1236.
- (85) Qasba, P. K. Glycans of Antibodies as a Specific Site for Drug Conjugation Using Glycosyltransferases. *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26* (11), 2170–2175.

業績目録

本学位論文に関する発表論文

1. Satoshi, Kishimoto; Yuichi, Nakashimada; Riri, Yokota; Takaaki, Hatanakai; Motoyasu, Adachi; Yuji, Ito
「Site-specific chemical conjugation of antibodies by using affinity peptide for the development of therapeutic antibody format」
Bioconjugate Chemistry (2019年1月4日採択、掲載待ち)

その他の参考論文

1. Ryosuke, Nakano; Sayaka, Takagi Maeda; Yuji, Ito; Satoshi, Kishimoto; Tomoko, Osato; Kaori, Noguchi; Kana, Kurihara Suda; Nobuaki, Takahashi
「A new technology for increasing therapeutic protein levels in the brain over extended periods」
PLOS ONE (投稿中, 2018年11月1日 受付)

著書・刊行物

1. 「ペプチド医薬品のスクリーニング・安定化・製剤化技術」株式会社技術情報協会,第1賞,第3節「ファージディスプレイ法と次世代シーケンサーを利用したペプチドの網羅的配列探索・解析」, p18-26, 2017.12
加藤由貴子、岸本聡、牧野智宏、伊東祐二

総説

1. 「続・生物学基礎講座 バイオよもやま話 分子標的素子デザインにおけるファージライブラリー法」生物工学会誌, 93(5), 289-292, 2015.5
橋口周平、宮原隆二、岸本聡、伊東祐二
2. 「ラクダ科動物重鎖抗体由来の抗原結合ドメイン VHH の医療技術への応用」MEDCHEM NEWS, Vol.27, No.1, p35-41, 2017
岸本聡、伊東祐二

国際学会発表

1. Satoshi Kishimoto, Abdur Rafique, Kanade Fujisaki, Nobuyuki Nagamizo, Dai-ichiro Kato, Yuji Ito
「Construction and evaluation of bispecific antibody by Fc α R specific VHH conjugate to IgG antibody using IgG-binding peptide」 2017年6月
Antibody Society Korea (ASK) Summer Workshop (Gyeongju)
2. Satoshi Kishimoto, MD Abdur Rafique, Nobuyuki Nagamizo, Yu Orikono, Haruka Morimitsu, Dai-ichiro Kato, Yuji Ito
「Development of CCAP method enabling IgG-Fc site specific modification and design of bispecific antibody using VHH antibody」 2018年12月
10th International Peptide Symposium (Kyoto)

国内学会発表

1. 岸本聡、Abdur Rafique、佐竹貴莉子、宮本結花、加藤太一郎、伊東祐二
「アルパカ免疫・非免疫抗体ライブラリから得られた VHH 抗体特性とグラム陽性菌 *Brevibacillus brevis* での発現」2015 年 5 月 平成 27 年度日本生化学会九州支部例会（福岡）
2. 岸本聡、Abdur Rafique、佐竹貴莉子、宮本結花、加藤太一郎、伊東祐二
「アルパカナイーブ VHH 抗体ライブラリから得られた VHH 抗体特性解析ならびに *Brevibacillus brevis* 発現系を用いた発現」2015 年 9 月 第 39 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム（別府）
3. 岸本聡、Abdur Rafique、佐竹貴莉子、宮本結花、加藤太一郎、伊東祐二
「アルパカ由来ナイーブ VHH 抗体ライブラリからの抗原特異的抗体の獲得と特性解析ならびに *Brevibacillus brevis* 発現系を用いた発現効率向上の検討」2015 年 10 月 第 67 回日本生物工学会大会（鹿児島）
4. 岸本聡、Abdur Rafique、佐竹貴莉子、宮本結花、加藤太一郎、伊東祐二
「アルパカナイーブ VHH 抗体ライブラリ由来 VHH 抗体の特性解析と *Brevibacillus brevis* 発現系を用いた発現ならびに親和性、発現効率改善に向けた検討」2015 年 12 月 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（神戸）
5. 岸本聡、Abdur Rafique、佐竹貴莉子、宮本結花、藤崎奏、加藤太一郎、伊東祐二
「CCAP 法によるヒト IgG 抗体への部位特異的な Fc α R 特異的 VHH の導入とそのコンジュゲートの機能評価」2016 年 5 月 平成 28 年度日本生化学会九州支部例会（鹿児島）

6. 岸本聡、Abdur Rafique、佐竹貴莉子、宮本結花、藤崎奏、加藤太一郎、伊東祐二
「Identification and characterization of antigen-specific antibodies by NGS sequence analysis from the antigen immunized alpaca VHH antibody phage library」
2016年6月 第16回日本蛋白質科学会年会（福岡）
7. 岸本聡、Abdur Rafique、佐竹貴莉子、宮本結花、藤崎奏、加藤太一郎、伊東祐二
「IgG 結合ペプチドを用いた Fc α R 特異的 VHH の IgG 抗体への部位特異的修飾と機能評価」2016年8月 第48回若手ペプチド夏の勉強会（八王子）
8. 岸本聡、Abdur Rafique、佐竹貴莉子、宮本結花、藤崎奏、加藤太一郎、伊東祐二
「Fc α R 特異的 VHH 抗体の IgG 抗体 Fc 領域への 部位特異的コンジュゲート作製と機能評価」2016年8月 第40回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム（鹿児島）
9. 岸本聡、Abdur Rafique、佐竹貴莉子、宮本結花、藤崎奏、加藤太一郎、伊東祐二
「ヒト IgG 抗体への Fc 部位特異的な抗 Fc α R VHH のコンジュゲート構築と機能評価」2016年9月 第89回日本生化学会大会（仙台）
10. 岸本聡、Abdur Rafique、佐竹貴莉子、宮本結花、藤崎奏、加藤太一郎、伊東祐二
「IgG 抗体への新規機能付加を目的とした Fc 部位特異的な VHH コンジュゲートの作製と機能評価」2016年12月 第23回日本生物工学会九州支部 飯塚大会（飯塚）

11. 岸本聡、Abdur Rafique、藤崎奏、永溝修幸、加藤太一郎、伊東祐二
「Construction of bispecific antibody by site-specific chemical conjugation with IgG-binding peptide」2017年11月 第54回ペプチド討論会（大阪）

12. 岸本聡、MD Abdur Rafique、永溝修幸、折小野優、盛満晴佳、加藤太一郎、伊東祐二
「CCAP法を用いたIgG-Fc部位特異的VHH修飾による好中球活性化能を有する二重特異性抗体の構築」2018年8月 第42回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム（佐賀）

13. 岸本聡、MD Abdur Rafique、永溝修幸、折小野優、盛満晴佳、加藤太一郎、伊東祐二
「IgG-Fc部位特異的修飾を可能とするCCAP法の開発とVHH抗体を用いた二重特異性抗体の構築」2018年9月 第91回日本生化学会大会（京都）

14. 岸本聡、MD Abdur Rafique、永溝修幸、折小野優、盛満晴佳、加藤太一郎、伊東祐二
「新規二重特異性抗体の開発を目指したアフィニティーペプチドによるIgG抗体特異的修飾法の開発」
2018年12月 第25回 日本生物工学会九州支部 鹿児島大会（鹿児島）

受賞

1. 第 48 回若手ペプチド夏の勉強会 優秀講演賞
(2016 年 8 月 2 日)
2. 第 91 回日本生化学会大会 若手優秀発表賞
(2018 年 9 月 26 日)
3. 第 25 回日本生物工学会九州支部 鹿児島大会 学生賞
(2018 年 12 月 1 日)
4. 10th International Peptide Symposium JPS Excellent Poster Presentation Award
(2018 年 12 月 7 日)

謝辞

本研究は、鹿児島大学大学院、理工学研究科総合理工学専攻、有機化学講座（伊東研究室）において行われ、その一部は、AMED（日本医療研究開発機構）革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業（課題番号：JP18am0301006）のサポートの下、実施されました。

学部学生として配属されて以来6年間にわたり、主指導教官の伊東祐二教授からは公私にわたり多大な助言を賜りました。厚く感謝申し上げます。また副査として、大変お忙しい中ご指導頂きました新留康郎教授、濱田季之准教授へ心より感謝申し上げます。

また、結晶構造解析は量子科学技術研究開発機構、（故）黒木良太博士、安達基泰博士との共同研究により実施されました。アルパカへの抗原免疫はアーケ・リソース株式会社の井上聖也社長、宮崎誠生様、清瀬紀彦様との共同研究により実施されました。心より感謝申し上げます。

最後に、研究室にてお世話になった有馬一成准教授、加藤太一郎助教、実験を手伝って頂いた伊東研究室の皆様にも、この場を借りて感謝申し上げます。