

学位論文の要旨

氏名

吉永 圭介

学位論文題目

ケモカイン、MCP-1 特異的なヒト抗体エンジニアリング

本論文は、MCP-1 を標的とした抗体分子の開発およびその機能解析を行い、それについてまとめたものである。本論文は以下の6章から成り立っている。

第1章では、MCP-1 と炎症性免疫疾患との関連性を示し、MCP-1 をターゲットとした治療法開発の戦略について述べた。MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1) は、単球などの免疫系の細胞の遊走を誘導するケモカインである。近年、その過剰発現が様々な炎症性免疫疾患に関与していることが報告され、これらの疾患を治療するための非常に有効な標的分子となる。

第2章では、ヒトscFv 抗体ファージライブラリーについて述べた。1980年にKollerとMilsteinによって動物免疫を基盤としたハイブリドーマ技術を用いたモノクローナル抗体作製法が確立されてから4半世紀を経て、抗体医薬は、癌、アレルギー、感染症などの疾患領域における新たな医薬品として今日注目を集めている。その背景には、実用化における最大の障害、マウス由来モノクローナル抗体のヒトにおける免疫原性の解決に向けた近年の目覚ましい技術革新がある。その技術として、ヒト抗体遺伝子群をマウスに移入したトランスクロモマウスおよびヒト抗体ファージディスプレイライブラリーが報告されている。本研究では、20名の健常人由来の末梢血単核球をもとに構築されたヒトscFv 抗体ファージライブラリーを用いている。

第3章では、ヒトscFv 抗体ファージライブラリーから、MCP-1 に依存した炎症疾患の治療に応用できるヒト抗体の単離を試みた。そのため、ヒトMCP-1 に特異的に結合するヒト抗体のスクリーニングを行

った。ヒトMCP-1 タンパクをターゲットとして抗体ファージライブラリーから選別を行い、7種類のヒトMCP-1 特異的ヒト抗体分子を単離した。さらに、これらの抗体の性状について解析した。7つの抗体についてそのアミノ酸配列を解読したところ、VH1 領域のgermline が7つのクローンのすべてで一致していた。このことから、これらの抗体のMCP-1 への結合にはおもにこの領域が関与していると考えられた。

さらに、これらの抗体がMCP-1 による細胞の遊走を阻害するかどうかを検討した。MC8 とMC32 の2つの抗体において、細胞株THP-1 の遊走を濃度依存的に阻害することがわかった。

第4章では、MC8 およびMC32 抗体がMCP-1 による細胞遊走を阻害できることがわかったので、両者のIgG 型抗体を作製しその活性を調べた。本研究が作製したMC8 およびMC32 IgG 抗体は完全なヒト抗体分子であるので、早期に臨床への応用が可能であり、MCP-1 依存性の炎症疾患の治療薬として利用されることが期待される。

第5章では、MC32 抗体の親和性向上を試み、その戦略について記載した。この抗体のMCP-1 への結合にはおもにVH が寄与していると考えられたため、VL をさまざまなレパートリーに置き換えたMC32 VL shuffling ライブラリーを構築した。

MC32 VL shuffling ライブラリーから、MC32 変異体を単離しその活性を比較した。いくつかの変異体において親和性の向上がみられた。また、親和性の向上にともなって細胞の遊走阻害活性も強くなっていた。

第6章は、以上の結果を総括し、MCP-1 依存型炎症疾患の制御法開発における展望および残された課題について述べた。

論文審査の要旨

報告番号	理工研 第271号	氏名	吉永 圭介
審査委員	主査	杉村 和久	
	副査	青柳 隆夫	伊東 祐二
<p>学位論文題目</p> <p style="text-align: center;">ケモカイン、MCP-1 特異的なヒト抗体エンジニアリング (Antibody Engineering for Human Antibody specific to MCP-1)</p> <p>審査要旨</p> <p>提出された学位論文および論文目録等をもとに学位論文審査を実施した。</p> <p>本論文は、MCP-1 を標的とした抗体分子の開発およびその機能解析を行い、それについてまとめたものである。本論文は以下の6章から成り立っている。</p> <p>第1章では、MCP-1 と炎症性免疫疾患との関連性を示し、MCP-1 をターゲットとした治療法開発の戦略について述べた。MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1) は、単球などの免疫系の細胞の遊走を誘導するケモカインである。近年、その過剰発現が様々な炎症性免疫疾患に関与していることが報告され、これらの疾患を治療するための非常に有効な標的分子となる。</p> <p>第2章では、ヒトscFv 抗体ファージライブラリーについて述べた。1980年にKollerとMilsteinによって動物免疫を基盤としたハイブリドーマ技術を用いたモノクローナル抗体作製法が確立されてから4半世紀を経て、抗体医薬は、癌、アレルギー、感染症などの疾患領域における新たな医薬品として今日注目を集めている。その背景には、実用化における最大の障害、マウス由来モノクローナル抗体のヒトにおける免疫原性の解決に向けた近年の目覚ましい技術革新がある。その技術として、ヒト抗体遺伝子群をマウスに移入したトランスクロモマウスおよびヒト抗体ファージディスプレイライブラリーが報告されている。本研究では、20名の健康人由来の末梢血単核球をもとに構築されたヒトscFv 抗体ファージライブラリーを用いている。</p> <p>第3章では、ヒトscFv 抗体ファージライブラリーから、MCP-1 に依存した炎症疾患の治療に応用できるヒト抗体の単離を試みた。そのため、ヒトMCP-1 に特異的に結合するヒト抗体のスクリーニングを行った。ヒトMCP-1 タンパクをターゲットとして抗体ファージライブラリーから選別を行い、7種類のヒトMCP-1 特異的ヒト抗体分子を単離した。さらに、これらの抗体の性状について解析した。7つの抗体についてそのアミノ酸配列を解読したところ、VH1 領域のgermline が7つのクローンのすべてで一貫していた。このことから、これらの抗体のMCP-1 への結合にはおもにこの領域が関与していると考えられた。</p> <p>さらに、これらの抗体がMCP-1 による細胞の遊走を阻害するかどうかを検討した。MC8 とMC32 の2つの抗体において、細胞株THP-1 の遊走を濃度依存的に阻害することがわかった。</p> <p>第4章では、MC8 およびMC32 抗体がMCP-1 による細胞遊走を阻害できることがわかったので、両者のIgG 型抗体を作製しその活性を調べた。本研究が作製したMC8 およびMC32 IgG 抗体は完全なヒト抗体分子であるので、早期に臨床への応用が可能であり、MCP-1 依存性の炎症疾患の治療薬として利用されることが期待される。</p> <p>第5章では、MC32 抗体の親和性向上を試み、その戦略について記載した。この抗体のMCP-1 への結合にはおもにVH が寄与していると考えられたため、VL をさまざまなレパートリーに置き換えたMC32 VL shuffling ライブラリーを構築した。</p> <p>MC32 VL shuffling ライブラリーから、MC32 変異体を単離しその活性を比較した。いくつかの変異体において親和性の向上がみられた。また、親和性の向上にともなって細胞の遊走阻害活性も強くなっていた。</p> <p>第6章は、以上の結果を総括し、MCP-1 依存型炎症疾患の制御法開発における展望および残された課題について述べている。</p> <p>以上本論文は、MCP-1 を標的とした抗体分子の開発を目的とし、ファージディスプレイ法、抗体エンジニアリングの手法を用い、MCP-1 による細胞遊走を阻害するヒト抗体分子の創出とその親和性における改良を行っている。この研究成果は、MCP-1 依存性の炎症疾患の治療薬開発において有用であるばかりでなく、IgG への変換およびL鎖交差法による親和性向上などの抗体エンジニアリングの方法論は今後の抗体医薬開発において重要な意味を持つと考えられる。その内容は高く評価でき、博士の学位を授与するに十分に値するものと判断された。よって、審査委員会は博士(工学)の学位論文として合格と判定する。</p>			

最終試験結果の要旨

報告番号	理工研 第271号	氏名	吉永 圭介
審査委員	主査	杉村 和久	
	副査	青柳 隆夫	伊東 祐二

最終試験の結果は、研究発表内容の質、発表状況、質疑応答の内容を総合的に審査した。

博士論文の発表と質疑応答：平成 20 年 2 月 8 日の 13 時 30 分より、鹿児島大学ベンチャービジネスラボラトリ（VBL）のディスカッションルームにて学位論文の聴講会がおこなわれた。約 40 分ほどの博士論文発表のあと、研究内容について 20 分間程度の質疑応答が行われた。

1) 様々な低分子の医薬品があるなか抗体医薬の利点は何なのか、
回答：抗体はもともと生体内にあるタンパクなので免疫原性の問題がほとんどない。かつ免疫系が異物を排除するためのタンパクであるので、単に結合による阻害だけでなく、免疫系を動員した排除の効果も望める。また、分子量が大きく標的分子との接触面積が大きいことから高い結合親和性を容易に得ることができる。最後に、抗体分子は血中半減期が長く安定性にすぐれている。

2) 抗体医薬の投与方法について、
回答：静脈注射や点滴、筋肉注射による投与方法がある。抗体医薬を全身的に用いるか、局部的に用いるかの目的によって投与方法は違うと考えられる。

3) scFv 抗体から IgG 抗体へのエンジニアリングを行ったが IgG 抗体の利点とは何なのか、
回答：IgG は結合部位が 2 カ所あるので、みかけの結合親和性が高い。また、免疫系へのエフェクター機能を示す Fc 領域があるので、結合するだけでなく免疫系へ作用できる。前に述べた血中半減期の増加が望める。

4) 親和性向上において CDRL3 のアミノ酸置換が影響していると考えられたがそのことを直接証明する実験はどうやればいいのか、
回答：アミノ酸配列の比較から CDRL3 が親和性向上に関与していると考えられるが、直接確かめるためには遺伝子工学的に CDR L3 にのみアミノ酸置換を導入した抗体分子を作製し比較検討する必要がある。

5) 他に MCP-1 を標的とした抗体医薬が開発されているのかについて。
回答：研究当初は、MCP-1 を標的分子としたヒト抗体は報告されていなかったが、現在、HuCAL というヒト抗体ライブラリーよりヒト MCP-1 に対するヒト抗体の単離が報告されている。同様の抗体医薬が他のグループによっても開発されているということからも、抗 MCP-1 ヒト抗体のニーズが大きいものと考えられる。

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