



CD47抗原と特異的に結合し白血病細胞にアポトーシスを誘導する抗体に関する研究

菊地, 康文

(Degree)

博士 (工学)

(Date of Degree)

2005-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3464

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003464>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 284 】

氏 名・(本 籍)	菊地 康文	(埼玉県)
博士の専攻分野の名称	博士(工学)	
学 位 記 番 号	博い第382号	
学位授与の 要 件	学位規則第5条第1項該当	
学位授与の 日 付	平成17年9月25日	

【 学位論文題目 】

CD47抗原と特異的に結合し白血病細胞にアポトーシスを誘導する抗体に関する研究

審 査 委 員

主 査	教 授	加藤 滋雄
	教 授	大野 清春
	教 授	近藤 昭彦

本論文は、骨髄中の血液腫瘍細胞をアポトーシスに陥れる抗ヒトCD47抗体 (MABL 抗体) の生物活性を利用して、化学療法や全身放射線照射後も骨髄中に残存する腫瘍細胞を除去する治療薬の開発を目指して研究を行ったものである。

第1章は緒論で、組換え型抗体とがん領域の抗体医薬品開発研究の現状について簡単に述べた後、著者がこれまでの研究ですでに樹立している抗CD47抗体 (MABL 抗体) について説明し、この抗体を応用・利用した医薬品の開発という本研究の目的と内容について論述した。

第2章では、本研究で作製した種々の形態の抗CD47抗体による血液腫瘍細胞のアポトーシス誘導効果について検討を行った。

MABL whole 抗体と F(ab)₂ 抗体は、*in vitro* でヒト CD47 を発現させたマウス白血病細胞株に対しアポトーシス誘導活性を示した。また、ヒト急性リンパ性白血病細胞・ヒト慢性リンパ性白血病・ヒト多発性骨髄腫細胞を移植したマウスに投与したところ、MABL whole 抗体および F(ab)₂ 抗体は、いずれも抗腫瘍効果を示した。しかしながら、CD47 抗原は赤血球細胞膜上にも発現しているため、MABL whole 抗体や F(ab)₂ 抗体では、ヒトに投与した場合に赤血球の凝集を引き起こすことが問題であった。

そのため、MABL whole 抗体から低分子化改変技術により、MABL 一本鎖抗体 (scFv) を構築し、生物活性は有するが赤血球凝集を引き起こさない抗体分子の作製を検討した。MABL 抗体の V_H と V_L の間を (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser) × 3 の 15 mer のリンカーでつないだ一本鎖抗体 (MABL scFv-15) を構築した。MABL scFv-15 は、おもに monomer として存在するほか、一部は dimer を形成していた。これらの monomer と dimer それぞれについて特性解析を行ったところ、以下のようになっていることが明らかになった。

- (1) monomer, dimer 共にヒト CD47 抗原に対する結合能を有しているが、解離速度の違いから dimer はヒト CD47 に対し二価で結合する二価一本鎖抗体、いわゆる diabody であることが確認された。
- (2) アポトーシス誘導活性を示したのは MABL scFv-15 diabody であり、MABL scFv-15 monomer にはアポトーシス誘導活性がなかった。しかし、monomer についても、タグとして用いた FLAG-peptide に対する抗体を添加して二量体を形成させると、強力にアポトーシスを誘導したことから、二価抗体による CD47 抗原の ligation が、アポトーシス誘導のシグナルに必要であることが示唆された。
- (3) MABL scFv-15 diabody は、二価抗体でありながら赤血球凝集を引き起こさなかった。
- (4) ヒト多発性骨髄腫細胞を移植したマウスに投与したところ、MABL scFv-15 diabody は抗腫瘍効果を示した。一方 monomer には抗腫瘍効果は、ほとんど認められなかった。

以上、MABL scFv-15 diabody は、二価抗体でありながら赤血球凝集能はなく、白血病等の血液腫瘍治療抗体としての利用にかなった分子であることを示した。

第3章では、抗CD47二価一本鎖抗体を二価状態で安定に存在させるための分子構築を行い、その二価一本鎖抗体の多発性骨髄腫細胞に対する抗腫瘍効果を検討した。

MABL scFv-15 分子は二価の diabody 構造をとる分子の割合はごくわずかであったので、安定に二価一本鎖抗体の構造をとる分子の構築を検討した。そこで、

- (1) V_H と V_L の間を Gly-Gly-Gly-Gly-Ser の 5 mer のリンカーでつないだ MABL scFv-5 diabody
 - (2) 2 組の V_H と V_L を N 末端側から V_H - V_L - V_H - V_L の順に、すべて (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser) × 3 の 15 mer リンカーでつないだ MABL sc(Fv)₂
- を構築し、これらが安定した二価一本鎖抗体としてのみ存在することを確認した。

MABL scFv-5 diabody および MABL sc(Fv)₂ とも、*in vitro* でヒト CD47 を発現させたマウス白血病細胞株に対するアポトーシス誘導作用を有しており、ヒト多発性骨髄腫細胞を移植したマウスに投与したところ、投与量に応じてマウス血中のヒト IgG 濃度が減少しマウスの延命効果も認められ、両者とも *in vivo* でも強い抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。さらに、いずれの分子ともに、二価抗体でありながら赤血球凝集が起きないという性質は保持されていた。以上の結果から、MABL 抗体を血液腫瘍治療抗体として用いる場合には、scFv-5 diabody あるいは sc(Fv)₂ という二価一本鎖抗体の分子形態が適当であることを示した。

第4章では、Biacore による一本鎖抗体の抗原との結合活性測定法と定量法を開発した。

本研究で使用した一本鎖抗体には、C 末端に FLAG タグが付加されているが、抗原性の理由から将来、医薬品として使用するためには、FLAG などのタグを付加しない分子を作製しなければならない。また、一本鎖抗体は whole 抗体と異なり、Fc 領域を持たないため、Protein A や Protein G により分子を捕捉することもできないので、一本鎖抗体の結合活性の測定や定量などを ELISA により行うことは困難である。その代替方法として Surface Plasmon Resonance を利用した Biacore system (Biacore AB) を抗原-抗体間の結合特性の解析に使用するための検討を行った。

MABL 二価一本鎖抗体の抗原との結合活性を評価する場合、一価と二価では結合・解離速度が大きく異なるため、抗原と抗体の結合活性を正しく評価するためには、一価の結合性を測定する必要があった。このため、抗原蛋白質 (ヒト CD47) を結合させたセンサーチップを作製し、二価抗体をアナライトとして Biacore で結合特性を測定した。一価と二価の両方の結合が混在している状態に、二価結合に対する反応モデルを適用することで、二価抗体であっても抗原に対する一価での結合活性を正確に測定できることを示した。

MABL 抗体濃度測定のためには、ヒト CD47 を高密度で固定化したセンサーチップを作製する必要があるが、ヒト CD47 抗原は、pI 値が低いので通常の固定化方法では、高密度で固定化することが困難であった。アルデヒドカップリング法でセンサーチップへ固定化する方法を採用してこの問題を解決し、MABL 抗体の濃度を正確かつ簡便に測定することを可能とした。本法は 10% 血漿 (血清) が含まれていても測定可能であるので、抗体高発現細胞株の選抜や精製中の各画分のアッセイなどにも応用できる。

(氏名：菊地康文 NO.3)

次に、MABL抗体を投与したマウスの血中抗体濃度を、この定量法を利用して測定した。抗体の血中からの消失速度については、Biacore法とRIでラベルした抗体を投与し測定した方法で得られた結果はよく一致し、Biacore法は生体に投与した一本鎖抗体の簡便な血中動態測定法として利用できることを明らかにした。この方法は血中の動態測定を行うには測定感度が低く、改良の余地があるものの、抗原と結合力を有している抗体濃度を測定できる点で利用価値が高いと考えられる。

以上、本研究は医薬品として適用可能なアポトーシス誘導抗体を作製するための手法を開発し、作製抗体の特性を明らかにしたものであり、免疫工学、生物化学工学において価値ある成果が得られた。

氏名	菊地 康文		
論文 題目	CD47 抗原と特異的に結合し白血病細胞にアポトーシスを誘導する抗体に関する研究		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	加 藤 滋 雄
	副 査	教授	*大 野 清 春
	副 査	教授	近 藤 昭 彦
	副 査		
			印
要 旨			
<p>本論文は骨髄中の血液腫瘍細胞をアポトーシスに陥れる抗ヒトCD47抗体 (MABL 抗体) の生物活性を利用して、化学療法や全身放射線照射後も骨髄中に残存する腫瘍細胞を除去する治療薬の開発を目指して研究を行っている。</p> <p>第1章は緒論で、まず組換え型抗体とがん領域の抗体医薬品開発研究の現状について簡単に述べた後、著者がこれまでの研究ですでに樹立している抗CD47モノクローナル抗体 (MABL 抗体) について説明し、この抗体のアポトーシス誘導特性を応用・利用した医薬品の開発という本研究の目的と内容について論述している。</p> <p>第2章では本研究で作製した種々の形態の抗CD47抗体による血液腫瘍細胞のアポトーシス誘導効果について検討を行っている。</p> <p>MABL whole抗体とF(ab')₂抗体は、<i>in vitro</i>でヒトCD47抗原を発現させたマウス白血病細胞株に対しアポトーシス誘導活性を示した。また、ヒト急性リンパ性白血病細胞・ヒト慢性リンパ性白血病細胞・ヒト多発性骨髄腫細胞を移植したマウスに投与したところ、MABL whole抗体および F(ab')₂抗体は、いずれも抗腫瘍効果を示した。しかしながら、CD47抗原は赤血球細胞膜上にも発現しているため、MABL whole抗体やF(ab')₂抗体は、ヒトに投与した場合に赤血球の凝集を引き起こすことが問題であった。</p> <p>そのため、MABL whole抗体から低分子化改変技術により、MABL一本鎖抗体 (scFv) を構築し、生物活性は有するが赤血球凝集を引き起こさない抗体分子の作製を検討している。MABL抗体のV_HとV_Lの間を(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)×3の15 merのリンカーでつないだ一本鎖抗体(MABL scFv-15)を構築した。MABL scFv-15は、おもにmonomerとして存在するほか、一部は非共有結合 dimerを形成していた。これらのmonomerとdimerそれぞれについて特性解析を行い、以下のようなことを明らかにした。</p> <p>(1) monomer、dimer 共にヒト CD47 抗原に対する結合能を有しているが、解離速度の違いから dimer はヒト CD47 抗原に対し二価で結合する二価一本鎖抗体、いわゆる diabody であることが確認された。</p> <p>(2) アポトーシス誘導活性を示したのは MABL scFv-15 diabody であり、MABL scFv-15 monomer にはアポトーシス誘導活性がなかった。しかし、monomer についても、タグとして用いた FLAG-peptide に対する抗体を添加して二量体を形成させると強力にアポトーシスを誘導したことから、二価抗体による CD47 抗原の ligation が、アポトーシス誘導のシグナルに必要であることが示唆された。</p> <p>(3) MABL scFv-15 diabody は二価抗体でありながら赤血球凝集を引き起こさなかった。</p> <p>(4) ヒト多発性骨髄腫細胞を移植したマウスに投与したところ、MABL scFv-15 diabody は抗腫瘍効果を示した。一方 monomer には抗腫瘍効果は、ほとんど認められなかった。</p> <p>以上、MABL scFv-15 diabody は二価抗体でありながら赤血球凝集能はなく、白血病等の血液腫瘍治療抗体としての利用にかなった分子であることを示した。</p>			

氏名	菊地 康文
<p>第3章では抗CD47一本鎖抗体を二価状態で安定に存在させるための分子構築とその多発性骨髄腫細胞に対する抗腫瘍効果を検討している。</p> <p>MABL scFv-15分子は二価のdiabody構造をとる分子の割合はごくわずかであったので、安定に二価一本鎖抗体の構造をとる分子の構築を検討した。そこで、</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) V_HとV_Lの間をGly-Gly-Gly-Gly-Serの5 merのリンカーでつないだMABL scFv-5 diabody (2) 2組のV_HとV_LをN末端側からV_H-V_L-V_H-V_Lの順に、すべて(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)×3の15 merリンカーでつないだMABL sc(Fv)₂を構築し、これらが安定した二価一本鎖抗体としてのみ存在することを確認した。 <p>MABL scFv-5 diabodyおよびMABL sc(Fv)₂とも、<i>in vitro</i>でヒトCD47抗原を発現させたマウス白血病細胞株に対するアポトーシス誘導作用を有しており、ヒト多発性骨髄腫細胞を移植したマウスに投与したところ、投与量に応じてマウス血中のヒトIgG濃度が減少しマウスの延命効果も認められ、両者とも<i>in vivo</i>でも強い抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。さらに、いずれの分子ともに、二価抗体でありながら赤血球凝集が起きないという性質は保持されていた。以上の結果から、MABL抗体を血液腫瘍治療抗体として用いる場合には、scFv-5 diabodyあるいはsc(Fv)₂という二価一本鎖抗体の分子形態が適当であることを示した。</p> <p>第4章ではBiacoreによる一本鎖抗体の抗原との結合活性測定法と定量法を開発している。本研究で使用した一本鎖抗体には、C末端にFLAGタグが付加されているが、抗原性の理由から将来医薬品として使用するためには、FLAGなどのタグを付加しない分子を作製しなければならない。また、一本鎖抗体はwhole抗体と異なり、Fc領域を持たないため、Protein AやProtein Gにより分子を捕捉することもできないので、一本鎖抗体の結合活性の測定や定量などをELISAにより行うことは困難である。そこで、その代替方法としてSurface Plasmon Resonanceを利用したBiacore system (Biacore AB) を抗体-抗原間の結合特性の解析に使用するための検討を行っている。</p> <p>MABL二価一本鎖抗体の抗原との結合活性を評価する場合、一価と二価では結合・解離速度が大きく異なるため、抗原と抗体の結合活性を正しく評価するためには、一価の結合性を測定する必要があった。このため、抗原タンパク質(ヒトCD47)を結合させたセンサーチップを作製し、二価抗体をアナライトとしてBiacore systemで結合特性を測定した。一価と二価の両方の結合が混在している状態に二価結合に対する反応モデルを適用することで、二価抗体であっても抗原に対する一価での結合活性を正確に測定できることを示した。</p> <p>MABL抗体濃度測定のためには、ヒトCD47を高密度で固定化したセンサーチップを作製する必要があるが、ヒトCD47抗原は、pI値が低いので通常の固定化方法では、高密度で固定化することが困難であった。アルデヒドカップリング法でセンサーチップへ固定化する方法を採用してこの問題を解決し、MABL抗体の濃度を正確かつ簡便に測定することを可能とした。本法は10%血漿(血清)が含まれていても測定可能であるので、抗体高発現細胞株の選抜や精製中の各画分のアッセイなどにも応用できる。</p> <p>次に、MABL抗体を投与したマウスの血中抗体濃度を、この定量法を利用して測定した。抗体の血中からの消失速度については、Biacore法とRIでラベルした抗体を投与し測定した方法で得られた結果はよく一致し、Biacore法は生体に投与した一本鎖抗体の簡便な血中動態測定法として利用できることを明らかにした。この方法は測定感度に改良の余地があるものの、抗原と結合活性を有している抗体濃度を測定できる点で利用価値が高いと考えられる。</p> <p>以上本研究は医薬品として適用可能なアポトーシス誘導抗体を作製するための手法を開発し、作製抗体の特性を明らかにしたものであり、生物化学工学ならびに免疫工学における価値ある重要な知見を得ている。よって、学位申請者の菊地 康文は博士(工学)の学位を得る資格があると認める。</p>	