

氏名(本籍)	舟橋真一(東京都)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	乙第28号
学位授与年月日	2019年9月12日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	新規モノクローナル抗体の作製にあたってのエピトープの選択と抗体の機能に関する研究
論文審査委員	(主査) 島田章則 (副査) 栗林尚志 荻原喜久美

## 論文内容の要旨

モノクローナル抗体は、その特異性から分子生物学的ならびに病理組織学的な分子の検出・解析に威力を発揮するとともに、抗体の持つ機能との組み合わせにより分子標的治療にも広く活用されている。本研究では二つのモノクローナル抗体の取得について報告する。一つは幹細胞の分子生物学的・病理組織学的研究への展開を目指したモノクローナル抗体の取得に関する研究であり、もう一つはそこから得られたナレッジを活用した抗体創薬に向けたモノクローナル抗体の取得に関する研究である。

### 1. LGR6(Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor)に対する

#### モノクローナル抗体の作製

LGR6はGタンパク質共役受容体(GPCR)の一つで、ロイシン・リッチ・リピートを含むGPCR(LGR)ファミリーのメンバーである。LGR6は、LGR4,5とともにLGRのサブファミリーを形成し、これらの分子で最も研究が進んでいるのはLGR5である。LGR5は小腸、胃、皮膚の幹細胞、および大腸癌幹細胞のマーカーとして知られており、我々は先の研究でLGR5の発現が大腸癌幹細胞の増殖と静止状態を区別する分子病理学的マーカーであることを報告した。今回研究を進めたLGR6も、genetic lineage tracingの解析から原始の皮膚の幹細胞マーカーとして報告されている。しかし、LGR6の組織学的な発現情報やLGR6陽性細胞の機能・役割については、特異的な抗体が得られていないためにいまだ詳細に解明されていない。我々が抗LGR5抗体を取得する際に経験した困難さからLGR6特異的な抗体が得られていないのは、このサブファミリーに特徴的なタンパクの構造に起因するものと考えられた。すなわち、LGRサブファミリーはN末端に馬蹄形をした500アミノ酸からなるロイシン・リッチ・リピート領域を有し、この複雑な立体構造を維持した免疫抗原を調製することが難

しいこと、また、ロイシン・リッチ・リピート領域を含めサブファミリー分子間の相同性が高く、ファミリー分子に交差しない特異的抗体の取得が難しいことが考えられた。

そこで我々はこれらの課題を克服するために、DNA 免疫法による LGR6 特異的抗体の作製を試みた。DNA 免疫法では、金粒子にコーティングした発現プラスミドを GeneGun によって高圧でマウスの腹部に接種し、発現プラスミドが導入された細胞ではタンパク質が産生され、これらのタンパク質は立体構造を維持した状態で細胞膜上に提示され、免疫抗原としてマウスでの抗体産生を誘導することができる。LGR6 発現プラスミドを DNA 免疫法で Balb/c マウスに導入した結果、LGR6 に対する液性免疫が誘導され、LGR6 に対する抗体が産生された。

LGR6 に対する抗体価が上昇したマウスに対し、さらに LGR6 に対する免疫を亢進させるためにブースト免疫として LGR6 タンパク質を高発現した細胞株の細胞免疫を実施した。LGR ファミリーを含む GPCR は一般に高発現株を取得することが難しいとされているが、我々は先の抗 LGR5 抗体取得の際に LGR5 を高発現させる方法としてマウス ProB 細胞株である Ba/F3 株を使用することが有効であることを経験していた。Ba/F3 株は目的の遺伝子を発現する細胞株の樹立にあまり広く利用されていない親株であるが、浮遊細胞のためフローサイトメトリー解析において細胞の調整が容易であり、また細胞の増殖が速いことから細胞株の樹立を早期に実現できるメリットがある。また、Ba/F3 株は Balb/c マウスに由来する細胞株であり、Balb/c マウスへ免疫する際には Ba/F3 株で発現される抗原のみが外来抗原と認識される。そこで、LGR6 高発現 Ba/F3 株を樹立し、細胞免疫を施すことで特異的な免疫増強による抗体価上昇を誘導し、抗 LGR6 モノクローナル抗体を取得することができた。

取得された抗体については、以下の流れで特性と機能の解析を行った。

1. LGR6 特異的抗体は、フローサイトメトリーを用いて細胞外領域への結合の有無でエピトープ分類を行い、N 末端の細胞外領域 (N-ECD) を認識する抗体と 7 回膜貫通領域 (7TM) の細胞外ループを認識する抗体のエピトープを確認した。その結果、N-ECD を認識する抗体 2 クローンと 7TM を認識する抗体 1 クローンを取得した。
2. LGR6 特異的抗体による LGR6 とリガンド RSPO-1 との結合阻害活性を解析した。RSPO-1 の LGR6 への結合を検出するため、タグ付きの組換えタンパク質の RSPO-1 を準備し、タグに対する抗体で検出するアッセイ系を構築した。反応系に加えた抗 LGR6 抗体の濃度依存的な結合阻害を評価した。その結果、43A6, 43D10 の二つのクローンは LGR6 とリガンド RSPO-1 との結合を阻害することが明らかとなった。

DNA 免疫と細胞免疫の二つの方法を組み合わせることによって、LGR6 に特異的であるとともに、リガンドとレセプターの結合を阻害する中和活性のある抗体の取得にも成功した。これらの成果は、LGR6 の立体構造を維持したタンパク質を免疫抗原として用いたことと、立体構造の維持によりリガンドの結合部位が保存されたという、免疫手法の選択・工夫がもたらしたものと考えられる。今回取得した抗体は、LGR6 陽性細胞の役割・機能の解明など新たな幹細胞生物学の進展に貢献できるものと考えられる。

## II. デスモグレイン 3 (Desmoglein 3 (DSG3)) に対するモノクローナル抗体の作製

近年、癌を標的としたモノクローナル抗体が分子標的治療薬として利用されてきている。抗体をベースとした創薬の特徴は、抗体の特異性と、中和活性、抗体依存的な細胞傷害活性 (ADCC)、補体依存的な細胞傷害活性 (CDC) といった抗体の機能の組み合わせにより癌細胞を死滅させることである。

癌に対する抗体創薬の新規標的分子は、遺伝子発現の多寡から候補遺伝子を絞り込む遺伝子発現解析と、その遺伝子から発現されるタンパク質の組織分布や細胞膜に位置しているかといった細胞内分布を解析する病理解析の両面から評価される。これらの解析から、我々は DSG3 を重層扁平上皮癌に対する有望な標的分子として見出した。DSG3 は一回膜貫通タンパク質で他のカドヘリン分子である DSG1 とともにデスモソームを形成し、重層扁平上皮組織での細胞間結合に寄与している。

抗 DSG3 自己抗体は皮膚粘膜の水疱を特徴とする自己免疫疾患の一つである天疱瘡の原因となることが知られている。DSG3 を標的とする創薬を進めるためには、天疱瘡様病変の誘発を回避し、かつ、重層扁平上皮癌に対して薬理作用を発揮しなければならない。これまでの研究より天疱瘡を引き起こす病原性の自己抗体は、Ca<sup>2+</sup>依存的な構造をとる DSG3 を認識すること、自己抗体が認識する領域が N 末端の接着界面に存在することが報告されている。これらの知見より、Ca<sup>2+</sup>非依存的 DSG3 結合抗体の取得により副作用を回避した治療用抗体を取得できるものと仮説を立てた。

そこで、各種スクリーニング系を駆使し、目的とする特徴を有する抗体の取得を試みた。スクリーニング系では、DSG3 が生体内で本来形成している構造に近いタンパク質を準備し、エピトープの分類による抗体の選別を行った。抗マウス DSG3 抗体のスクリーニング過程を以下に示す。

1. マウス DSG3 に結合する抗体をフローサイトメトリーによりスクリーニングした。34 個のマウス DSG3 結合抗体を取得した。
2. 癌細胞の死滅誘導方法として ADCC を薬理作用に持つ抗体 12 クローンを選抜した。マウスの ADCC 活性を測定する安定したアッセイ系がないため、ヒト NK92 細胞を遺伝子工学的に改変した細胞株を用いたスクリーニング系を考案し、マウスとヒトの FcR $\gamma$  IIIa 融合タンパク質を発現させることによって NK 細胞によるマウス抗体の ADCC 活性を測定できる系が構築できた。
3. 抗体によって DSG3 の Ca<sup>2+</sup>依存的構造が認識されるかどうかを Ca<sup>2+</sup>のキレート剤である EDTA 存在下でフローサイトメトリーを用いて評価した。3 クローンが Ca<sup>2+</sup>非依存的に DSG3 に結合する抗体であった。そのうち最も結合アフィニティーの高いクローン 18-1 を選定した。
4. 天疱瘡様病変を誘発する抗体は、細胞間の接着を分離する活性を有していることからマウス由来の皮膚細胞シートを用いたスクリーニング方法により抗体が細胞の接着機能を阻害する能力があるかどうかを判断した。クローン 18-1 は細胞間接着の分離活性は有していなかった。

上記スクリーニング系でマウス DSG3 に対する副作用の回避が可能と考えられる抗体 18-1 を取得できた。次に、*in vivo* モデルでの解析として、DSG3 を発現するマウス肺癌細胞株 LC12 を移植したマウスによる抗腫瘍効果を評価した。その結果、抗マウス DSG3 抗体 18-1 の投与による天疱瘡様病変はみられず、LC12 癌組織の退縮が観察された。副作用を誘導するエピトープを避け、ADCC を誘導す

るエピトープを選択することにより DSG3 に対する創薬抗体の作製が可能であることがマウスモデル系で示された。

次に、同様のスクリーニングフローを用い、ヒト DSG3 に対し天疱瘡様病変の誘発作用がなく、高い ADCC 作用を持つ抗体 DF366 を取得した。種々のヒト重層扁平上皮癌担癌モデルでの抗ヒト DSG3 抗体 DF366 の抗腫瘍効果を確認し、抗体医薬としての可能性を示した。

### Ⅲ. 総括

二つの解析から目的のエピトープを持つ抗体を作製するための要点は次あげる二点となる。一つは、免疫やスクリーニングに用いるタンパク質は機能的に天然の構造を持ったものを利用することであり、もう一つは、エピトープを分類することで適切な抗体の機能を付加できるような抗体の分類をすることである。これらのステップは目的の機能を持った抗体を同定・取得する有用なアプローチを提供するものである。

現在、抗体創薬標的分子は枯渇している。今回、医薬品とするためには不都合な作用のある抗原であってもエピトープの選択次第で新しい創薬への展開が可能となることを示唆した。この研究は、分子標的薬としての抗体創薬の標的分子の選択可能性を広げるものであり、今後の抗体医薬品の研究開発に貢献するものと考えている。

## 論文審査の結果の要旨

モノクローナル抗体は、その特異性から、細胞・組織での分子の検出・解析に威力を発揮するとともに、抗体の持つ機能との組み合わせにより分子標的治療にも広く活用されている。本論文は、近年注目を浴びている幹細胞の生体における機能や役割についての研究の展開に有用なモノクローナル抗体の取得方法の解析、および、抗体取得に関する知見を活用して得られたモノクローナル抗体の抗体創薬としての機能の解析を行ったものである。

LGR6 (Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 6) は G タンパク質共役受容体 (GPCR) の一つであり、ロイシン・リッチ・リピートを含む GPCR ファミリーのメンバーである。LGR4, 5, 6 はサブファミリーで互いにホモロジーがあり、それゆえにこれらの LGR に対する抗体は交差性を示す傾向がある。LGR5 は小腸、胃、皮膚の幹細胞、および大腸癌幹細胞のマーカーとして知られているが、LGR6 の組織学的な発現情報や LGR6 陽性細胞の機能・役割については特異的な抗体がないためにまだ解明されていない。LGR ファミリーは、免疫抗原を調製することが難しいこと、また、サブファミリーの分子間の相同性のために得られた抗体が他のファミリー分子と交差すること、これらが特異的な抗体の取得を困難にしている。

DNA 免疫法は発現プラスミドを金粒子にコーティングし、GeneGun を用いて高圧でマウスの腹部に発現プラスミドを導入する方法で、皮下の細胞などに導入された発現プラスミドから産生されたタンパク質がその細胞上に提示されてマウスにそのタンパク質に対する免疫を惹起する方法である。本研究では、LGR6 発現プラスミドを DNA 免疫法でマウスに導入し、液性免疫を誘導した。さらに、LGR6 タンパク質を高発現した細胞株を用いてマウスに追加の細胞免疫を施すことで、LGR6 に特異的な免疫が増強され、抗 LGR6 モノクローナル抗体が取得できた。

以上のように、DNA 免疫と細胞免疫の二つの方法を組み合わせることによって、生体内での LGR6 の立体構造への特異抗体が取得できた。得られた抗 LGR6 抗体は、組織内での発現分布解析や組織からの LGR6 陽性細胞分離などにより、幹細胞の機能・役割についての研究の進展に貢献することが期待される。

次に、モノクローナル抗体の癌細胞を標的とした分子標的薬としての開発・応用を目的として、抗 DSG3 (Desmoglein 3 : 接着斑デスモソームの細胞接着分子) モノクローナル抗体の治療的活用についての研究を実施した。癌細胞を標的としたモノクローナル抗体が癌の創薬に利用されてきている。抗体をベースとした創薬の利点は、中和活性、抗体依存的な細胞傷害活性 (ADCC)、補体依存的な細胞傷害活性 (CDC) などの抗体の機能性により、選択的に癌細胞を死滅させることである。

癌に対する抗体創薬の新規標的分子探索は、癌における遺伝子発現の多寡から候補遺伝子を絞り出す遺伝子発現解析とその遺伝子から発現されるタンパク質の組織分布や細胞膜に位置しているかといった細胞内の分布を解析する病理解析の両面から評価される。これらの過程から、今回、DSG3 が扁平上皮癌における有望な標的分子として見出された。

DSG3 は一回膜貫通タンパク質で他のカドヘリン分子である DSG1 とともにデスモソームを形成する。扁平上皮組織での細胞と細胞の結合にはこれらのカドヘリンが必要である。一方、抗 DSG3 自己抗体は皮膚粘膜の水疱を特徴とする自己免疫疾患の一つである天疱瘡の原因となることが知られている。DSG3 を標的とする創薬を進めるためには、天疱瘡様病変の誘発を回避し、かつ、扁平上皮癌に対して薬理作用を発揮しなければならない。

そこで、目的の抗体を得るために、LGR6 抗体取得過程で得た知見・技術を利用した。すなわち、目的のエピトープを持つ抗体を作製するため、免疫やスクリーニングに用いるタンパク質として天然の構造を持ったものを選択し、また、エピトープを分類することで適切な機能を付加できるような抗体の分類・同定が可能となった。スクリーニング系では、DSG3 が生体内で本来形成している構造に近いタンパク質を準備し、エピトープの分類による抗体の選別を行った。

得られた抗体の抗腫瘍効果を、マウス肺癌細胞株 LC12 を移植したマウスモデルによって評価した。その結果、天疱瘡様変化の発現はマウスには見られず、抗マウス DSG3 抗体を投与することで癌組織の退縮が観察された。副作用を誘導するエピトープを避け、ADCC を誘導するエピトープを選択することにより、DSG3 に対する創薬抗体の作製が可能であることが示された。

現在、抗体創薬標的分子は枯渇している。本研究で、創薬に不都合な作用のある抗原であっても、エ

ピトープの選択次第で新しい創薬への開発が可能となることが示唆された。本研究で明らかになった知見は、分子標的薬としての抗体創薬の標的分子の選択可能性を広げ、今後の抗体医薬品の研究開発に貢献するものであり、それ故に博士（学術）を授与するにふさわしい業績であると審査委員一同判断した。