

氏名（本籍）	北澤 剛久		
学位の種類	博 士（理学）		
学位記番号	博 甲 第	10026	号
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査学術院	理工情報生命学術院		
学位論文題目	Creation of a Bispecific Antibody Having Coagulation Factor VIII-Cofactor Function and Analyses of the Action (凝固第VIII因子補因子機能を有するバイスペシフィック抗体の創製及び作用解析)		
主査	筑波大学准教授	理学博士	坂本 和一
副査	筑波大学准教授	博士（理学）	原田 隆平
副査	筑波大学教授	博士（医学）	千葉 智樹
副査	筑波大学教授	理学博士	小林 悟

論 文 の 要 旨

本論文は、FVIII 補因子機能を有する抗体の創製と抗体医薬の作用を解析するために、「凝固第 VIII 因子補因子機能を有するバイスペシフィック抗体の創製及び作用解析」を行い、その成果について述べている。

凝固因子は血液凝固カスケード反応の構成因子で、第 VIII 因子 (Factor VIII [FVIII]) は、凝固開始相で生じる少量のトロンビンにより活性型 FVIII (FVIIIa) に変換されると FIXa が触媒する FX 活性化反応を飛躍的に増進する補因子機能を発揮し、下流の反応を経て安定したフィブリンの形成に繋がる。血友病 A は FVIII の欠乏・欠損に起因する先天性出血性疾患である。近年、重症血友病 A に対して、定期的な FVIII 製剤補充により中等症相当を常時維持する「定期補充療法」が普及している。一方で FVIII 補充療法には限界もある。一つは、定期補充療法に際して週数回の静脈注射を要し、家庭・自己注射療法実施の障壁となること、もう一つは、1/3 の重症患者にて外来 FVIII に対する中和抗体が出現し、FVIII 製剤の効果が激減・消失することである。本論文において著者は、これら血友病 A 治療の課題を解決するために、FVIII 補因子機能を有する抗体の創製を目指し、さらにかかる抗体の作用を解析することを目的としている。

本論文の第一章で著者は、FVIII 補因子機能を有する抗体の創製を目指し、FIXa と FX を架橋するバイスペシフィック抗体 (Bs 抗体) による FVIII 補因子機能の代替を試みている。著者は、一般に抗体は長い血中半減期と高い皮下吸収性をもつことから、成功すれば「FVIII インヒビターの有無に拘らず機能する長期持続型皮下注製剤」という画期的な薬剤の開発が可能になると考えた。著者は、まず抗 FIXa 抗体、抗 FX 抗体を各々約 200 個準備し、遺伝子組換え手法にて約 4 万の抗 FIXa/FX Bs 抗体を作製した。さらに FIXa 触媒 FX 活性化反応を促進する活性 (補因子活性) 等を基に約 4 万から 1 つを選抜した。著者は、選抜した Bs 抗体をヒト化した後アミノ酸置換による分子改良を実施し、補因子活性の大幅な向上に成功した。さらに、動態や物性面の改良も施し、ヒト化 Bs 抗体「hBS23」を創り上げた。著者は、hBS23 は、FVIII インヒビターの有無に拘らず血友病 A 血漿への *in vitro* 添加実験にて補因子活性を発揮し、後天性血友病 A カニクイザル出血惹起モデルでも出血抑制効果を示すことを明らかにした。また著者は、血

中半減期は約 2 週間、皮下からの生物学的利用率は 84%あり、持続性と皮下投与可能性が裏付けられたと述べている。第一章で著者は、FVIII 補充療法の限界を根本的に克服する新たな治療アプローチを切り開くことに成功したと述べている。

本論文の第二章で著者は、hBS23 の改良により得られた医薬品ヒト化 Bs 抗体「エミシズマブ (emi)」の抗原結合特性を明らかにし、それを基に emi の作用を解析している。著者は、表面プラズモン共鳴等を用い、emi が一方の腕で FIX/FIXa の EGF 様領域-1 に、他方の腕で FX/FXa の EGF 様領域-2 に結合すること、それら emi-抗原の結合解離定数 (K_D 値) が 1~2 μM 程度であり抗体医薬としては弱い結合活性であることを明らかにした。さらに著者は、これら K_D 値を用いて循環血漿中の抗原抗体複合体形成量を計算し、血漿では emi、FIX、FX のごく一部のみが FIX-emi-FX 三量体を形成すること、その三量体濃度が emi の補因子活性と連動することを明らかにした。また著者は、 K_D 値を用いたシミュレーションと反応速度論的解析から、emi は、FVIIIa との比較において、酵素 (FIXa) -基質 (FX) 反応の k_{cat} (代謝回転数) 改善程度の相対的低さを、酵素-補因子-基質複合体形成量の相対の高さでカバーしていると考察した。さらに著者は、臨床用量においては血漿中の FIX、FX の大半が単量体で存在すると評価し、凝固カスケード上流下流の反応への干渉があったとしても小さく、安全性の観点で好ましいことも明らかにした。第二章で著者は、抗原との複合体形成の解明を通じて emi の作用を定量的に解明したと述べている。

本論文において著者は、血友病 A における FVIII 補充療法の課題克服に向け抗体医薬の利用に着目し、FIXa と FX を架橋する Bs 抗体による FVIII 補因子機能の代替を試みた。著者は、FVIII 補因子機能を有する抗 FIXa/FX Bs 抗体を同定し、*in vitro/vivo* 活性と薬物動態を解析し、血友病 A 状態における出血を抑制する働きがあることを明らかにした。また著者は、後年医薬品となるヒト化 Bs 抗体 emi の抗原結合特性を解析し、抗体医薬としては抗原結合活性が弱いこと、血漿中 FIX-emi-FX 三量体濃度が emi の補因子活性と連動することを明らかにした。さらに著者は、補因子活性の発揮機序につき、 k_{cat} 改善の程度と酵素-補因子-基質複合体形成量を基に、emi と FVIIIa の違いを明らかにしたと述べている。

審 査 の 要 旨

本論文は、FVIII 機能代替抗 FIXa/FX Bs 抗体アプローチについて新規の血友病 A 治療法としての可能性を検討し、かかる抗体の創製と解析を行った。その結果、(1) 創製した Bs 抗体が同機能を代替でき、血友病 A 状態にて *in vivo* 止血活性を発揮すること、(2) 後年医薬品となる Bs 抗体 emi が抗体医薬としては弱い抗原結合活性を有すること、その補因子活性が FIX-emi-FX 三量体濃度と連動することなどを明らかにした。これらの研究成果は、血友病 A の既存療法の課題を根本的に解決する治療薬の実現に直結したもので、学術的にも大きな意義があるばかりでなく、遺伝子組換え非対称型 IgG Bs 抗体医薬など新しい概念の抗体医薬開発の道を開くもので、その功績は大きい。

令和 3 年 1 月 25 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士 (理学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。