

氏名(本籍)	なか の きよ たか 中野清孝(愛知県)			
学位の種類	博士(学術)			
学位記番号	博甲第6493号			
学位授与年月日	平成25年3月25日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
審査研究科	生命環境科学研究科			
学位論文題目	Generation and Modification of Anti-Glypican 3 Antibodies with Anti-tumor Effects against Hepatocellular Carcinoma (肝細胞癌に対し抗腫瘍効果を示す抗 Glypican3 抗体の作製と改変)			
主査	筑波大学教授	理学博士	漆原秀子	
副査	筑波大学教授	博士(医学)	千葉智樹	
副査	筑波大学准教授	理学博士	坂本和一	
副査	筑波大学教授	理学博士	中村幸治	

論文の内容の要旨

がんは日本人の死因の約3割を占める重篤な疾患であり、がんを撲滅するような治療薬の開発は非常に重要である。近年、特定の分子に選択的に作用する分子標的薬が有効性・安全性の高い医薬品として期待されているが、中でも高い結合選択性と抗腫瘍効果を有する抗体医薬は注目されている。しかし、実際に抗腫瘍効果のある抗体を取得することは必ずしも容易ではない。本研究では、最も頻度の高い致死的な悪性腫瘍の一つであるにもかかわらず安全性が高く有効な治療薬がまだに開発されていない肝細胞癌に対して抗腫瘍効果を示す特異抗体を作製するとともに、強力な抗腫瘍効果を示す抗体を効果的に取得するための新しい技術開発を行った。

まず、ハイブリドーマ法により肝細胞癌で特異的に高発現する Glypican3 (GPC3) に対する抗体作製を行った。GPC3 はヒトとマウスで高度に保存されているために免疫原性が低いが、自己免疫疾患様症状を示す MRL/lpr マウスを使用することにより、多数の抗 GPC3 抗体を取得することに成功した。取得した全ての抗体の結合活性、エピトープ、抗腫瘍効果を多面的に解析した結果、取得した抗体のエピトープは4種類の異なるグループに分類された。また、抗体による抗腫瘍効果として、NK細胞をエフェクターとした Antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) 活性、補体による Complement dependent cytotoxicity (CDC) 活性を評価することにより、細胞膜近傍に結合する抗体が最も強い抗腫瘍活性を示すことが判明した。この知見をもとに GPC3 分子の細胞膜近傍の部分ペプチドで MRL/lpr マウスを新たに免疫し、極めて強い抗腫瘍活性を示す抗体を取得することができた。そのうちのひとつ GC33 は強力な ADCC 活性および CDC 活性を示し、肝癌細胞株を移植したマウスモデルにおいても強力な抗腫瘍効果を示した。

抗 GPC3 抗体 GC33 が新しい肝癌治療薬として利用される可能性を拓げるために、ヒト型化技術による改変を行った。抗体の定常領域をヒト配列に改変した後、さらに、抗体の可変領域の中で直接抗原に結合する相補性決定領域 (CDR) のみを残し、その立体構造を支えるフレームワーク配列をヒト由来配列に置き換える CDR-grafting 法により GC33 のヒト型化を行った。しかし、この操作によって抗体結合活性の低下が認められた。そこで、配列の検証を行って再度抗体を改変するという過程を繰り返し、最終的に免疫原性を生じ

ない形でもとの抗体と同等の活性を示すヒト型化 GC33 を作製することができた。最後に、抗体分子の不安定性に関わるリスク部位を検索し更に改変する事で、安定性の改良を行った。抗体H鎖のフレームワーク配列中に不安定化要因と文献情報から予測された部位が見いだされたため、改変を行って熱加速試験において安定性を改善する結果を得た。また、L鎖 CDR1 内に脱アミド化による代謝を受けるリスク配列が含まれていたが、脱アミド化を模倣した改変体では抗体の結合活性が消失することが確認されたので、脱アミド化を受けにくい配列に改変した。こうして作製した最終的なヒト型化 GC33 は元のマウス抗体と同等の GC33 結合活性を示し、*in vivo* の肝細胞癌移植モデルに対して強力な抗腫瘍効果を示した。

本研究で、ヒトに対して免疫原性がなく、かつ高い抗腫瘍活性をもつ抗 GPC3 抗体を作製したことは、肝細胞癌の治療に道を開く重要な成果である。また、抗体の結合活性が同等であっても抗腫瘍効果はエピトープによって異なるという知見、ヒト型化に関して検討すべき因子や安定性を高める技術に関する情報は抗体医薬の開発に極めて有用であり、将来の個別医療化にも貢献していくことが期待される。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、がんの新規治療薬として有望視されている抗体医薬の開発に関する一連の研究をまとめたものである。筆者はまず肝細胞癌に対して特異的に抗腫瘍活性を発揮する単クローン抗体を作製した。標的とした GPC3 はヒトとマウスで保存性の高いプロテオグリカンであるため当初抗体の取得は困難であったが、免疫不全マウスを利用することでこの問題を克服し、多くの抗体を作製することに成功した点は高く評価できる。また、抗体は通常抗原への結合活性のみで評価されるのに対し、エピトープとの関係を解析し、その結果を利用してより活性の高い抗体が得た手法には独自性が見出される。さらに、医療への応用として不可欠である抗体のヒト型化に関してもさまざまな角度から検討を行い、技術改良を行っている。抗体分子の安定性を高めるための基本操作も含め、本論文で示された知見は抗体医薬の開発に資する重要な情報であり、学術的価値が高いと判断できる。

平成 25 年 2 月 6 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（学術）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。