

氏名	大島 勉		
学位の種類	博 士 (生物科学)		
学位記番号	博 甲 第 9 4 5 2 号		
学位授与年月日	令和2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	Studies on Novel Antibody for Antibody Therapeutics against Cancer Specific Target, Nectin-2 (がん特異的ターゲットNectin-2に対する新規抗体医薬に関する研究)		
主査	筑波大学教授	博士 (理学)	中野 賢太郎
副査	筑波大学教授	学術博士	橋本 哲男
副査	筑波大学教授	博士 (理学)	稲垣 祐司
副査	筑波大学准教授	博士 (理学)	澤村 京一

論 文 の 要 旨

現在の日本における死因のトップは癌によるものである。既存の抗癌剤は低分子化合物が主流である。しかし、それらは増殖が頻繁に起こっている正常組織に影響するため、副作用が懸念されている。そこで最近、抗体医薬を用いた治療が注目されている。本論文の著者は、新規の抗体医薬の開発を目的とした研究を行った。

本論文の第一部で著者は、癌組織と正常組織の mRNA を網羅的に発現解析し、Nectin-2 が乳癌や卵巣癌で過剰に発現しているのを発見した。Nectin-2 はカルシウム非依存的細胞間接着を担う分子であるが、癌細胞における機能は知られていなかった。著者は、完全ヒト抗体導入マウスを用いて、Nectin-2 に対する 256 種のモノクローナル抗体を作製した。そして著者は、これらのエピトープについて調べ、その違いから 7 つのグループに分類した。そのうち、グループ 5 と 6 に属する抗体は、細胞膜上における Nectin-2 と Nectin-3 のトランス結合を阻害することを示した。さらに著者は、グループ 7 に属する抗体が最も強い抗体依存性細胞毒性 (ADCC) 活性を有することを示した。このように著者は、種々の活性を有する抗体を作製することに成功した。次に著者は、担癌マウスモデルを用いて、機能の異なる抗体の抗癌活性を調べた。その結果、Nectin-2 のトランス結合阻害や *in vitro* における癌細胞増殖阻害を有さない抗体であっても、マウスで強い抗癌活性を示す場合があることを、著者は見出した。これらの抗体はすべてヒト IgG₁ 型であり、強弱はあるものの ADCC 活性を有していた。そこで著者は、Nectin-2 に対する抗体の抗癌作用は、ADCC 活性によりもたらされるのではないかと推察した。これまでの知見では、ヒト IgG₂ 型と IgG₄ 型の抗体は、ADCC 活性を示さない。そこで著者は自らが立てた仮説を検証するため、抗癌作用を示した代表的な抗体である Y-443 について、その IgG₄ 型の抗体を作製した。そして、IgG₁ 型の抗体との抗癌活性の比較を担癌マウスモデルを用いて行った。その結果、IgG₄ 型にした抗体は抗癌活性を全く示さなかった。そのため著者は、抗 Nectin-2 抗体による抗癌活性の主作用は ADCC 活性によりもたらされると結論した。

医薬品の開発において毒性予測は必須である。そこで著者は本論文の第二部において、サルを用いた毒性試験を行った。使用した抗体は、第一部で作製・同定した中で ADCC 活性が最も高く、担癌マウスモデルにおいて高い抗癌活性を示した Y-443 である。著者は、サルでの毒性試験において、Y-443 の投与が、止血時間の延長、臓器での出血、脾臓肥大、強い血小板減少を引き起こすことを発見した。これ

らの現象は、ヒトにおける血小板減少症と酷似していた。血小板減少症とは、血小板に対する自己抗体が体内で産生されてしまうことで、血小板に結合したその抗体を介して、マクロファージが血小板を貪食してしまうことで引き起こされる疾患である。この貪食作用においては、自己抗体の Fc 領域が、マクロファージの細胞表面の Fc γ RI と結合することで引き起こされる。そこで著者は、抗体の Fc γ RI への結合を低下することで血小板減少症様の副作用を低減できるのではないかと考えた。この仮説を検証するために著者は、Fc 領域に変異を導入した改変型 Y-443 を用意した。そして、それらの Fc γ RI への結合活性、Fc γ RI 以外の Fc レセプター結合活性、及び Nectin-2 結合活性について調べた。その結果、235 番目のロイシンを他のアミノ酸残基に置換することで、Fc γ RI に対する抗体の結合性を抑制できることを見出した。しかし、この変異は ADCC 活性に重要な Fc γ RIIIa への結合低下を同時にもたらした。そこで著者は、Fc γ RI への結合低下を保持したまま、Fc γ RIIIa への結合性を増強する工夫を試みた。抗体の糖鎖からフコースを取り除いたところ、Fc γ RIIIa への結合活性が増加し、さらに ADCC 活性が増強することを発見した。この新規に開発した抗体 Y-634 は、235 番目のロイシンをアスパラギン酸に置換し、フコースを取り除いたものである。この Y-634 は、Fc γ RI への結合は Y-443 よりも約 2,000 倍低く、Fc γ RIIIa への結合は Y-443 よりも 3 倍高かった。さらに担癌マウスモデルを用いて Y-634 の抗癌活性を調べた結果、Y-443 とほぼ同等の高い効果が保持されているのが分かった。この Y-634 のサルにおける毒性試験では、懸念されていた血小板減少は従来の 90%から約 50%まで低減されていた。さらに、抗体の頻回投与においてもさらなる血小板減少は誘発は認められなかった。このようにして著者は、抗体の Fc 領域におけるアミノ酸残基の置換とフコースの除去により、抗癌活性を保持したまま血小板減少症様の副作用を低減させることに成功した。

審 査 の 要 旨

本研究で著者は、癌組織で特異的に発現量が増加する膜貫通タンパク質 Nectin-2 を見出した。さらに、Nectin-2 を標的としたモノクローナル抗体を多数作製し、それらに抗がん活性があることを示した。これらは、出口を見据えた生物科学研究として高く評価できる。また抗体医薬への応用を目指し、最も有望な抗体 Y-443 について毒性試験を行った。その過程で発見した血小板減少症様の副作用を回避するため、抗体科学の知見を活用し、Y-443 のアミノ酸残基の改変や糖鎖の除去等の工夫を試みた。その結果、副作用の低減に成功した点は高く評価できる。さらに著者が本研究で発見した抗体の改変手法は、応用的に価値があるだけでなく、ADCC 活性の増強に重要な抗体の部位を同定した点で、学術的価値が高い。

令和 2 年 1 月 29 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（生物科学）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。