

家族性アミロイドポリニューロパチーの治療を目指した  
新規抗体医薬品の創出

Novel antibody for the treatment of  
Familial Amyloid Polyneuropathy.

一般財団法人 化学及血清療法研究所  
細井 亜樹彦

平成 29 年度

## 目次

略語.....	1
序論.....	3
1 アミロイドーシス.....	3
2 家族性アミロイドポリニューロパチー.....	4
3 トランスサイレチン (TTR).....	6
4 TTR のアミロイド形成.....	8
5 現在の FAP 治療.....	9
6 TTR の線維化と cryptic epitope.....	11
7 本研究の目的.....	12
本論.....	13
第 1 章 TTR115-124 を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体の作製.....	13
第 1 節 序.....	13
第 2 節 TTR115-124 マウスモノクローナル抗体の作製.....	14
第 3 節 T24 のエピトープ解析.....	17
第 4 節 T24 の反応性解析.....	18
第 5 節 考察.....	21
第 2 章 モノクローナル抗体 T24 のヒト化.....	24
第 1 節 序.....	24
第 2 節 T24 の分子モデリング.....	26
第 3 節 ヒト化 T24 のデザインと評価.....	30
第 4 節 考察.....	34
第 3 章 活性評価系の構築.....	35
第 1 節 序.....	35
第 2 節 中性条件下で線維化が進行する変異型 TTR のスクリーニング.....	37
第 3 節 中性条件下で V30M TTR の線維化が進行する条件のスクリーニング.....	39
第 4 節 考察.....	42
第 4 章 臨床応用に向けた評価.....	43
第 1 節 序.....	43
第 2 節 Biacore を用いた反応特異性の評価.....	44
第 3 節 V30M TTR の線維化抑制試験.....	45
第 4 節 FAP 疾患モデル動物を用いた投与試験.....	46
第 5 節 変異型 TTR 線維に対する反応性解析.....	49

第6節 マクロファージ貪食活性評価試験 .....	50
考察 .....	51
材料と実験方法 .....	55
ヒト由来サンプル、動物、ペプチド、タンパク質 .....	55
第1章 TTR115-124 を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体の作製 .....	57
第2章 モノクローナル抗体 T24 のヒト化 .....	62
第3章 活性評価系の構築 .....	64
第4章 臨床応用に向けた評価 .....	66
引用文献 .....	70
謝辞 .....	75
目録 .....	76

## 略語

本文中で使用した略語は、以下の一覧に従う。

SAA: serum amyloid A

SSA: senile systemic amyloidosis

FAP: familial amyloid polyneuropathy

A $\beta$ : amyloid  $\beta$

PrP: prion protein

TTR: transthyretin

ApoAI: apolipoprotein AI

Gel: gelsolin

V30M: Val30Met

PDB: protein data bank

holoRBP: retinol binding protein

T4: thyroxine

siRNA: small interfering RNA

mRNA: messenger RNA

KLH: keyhole limpet hemocyanin

KO: knockout

CFA: Freund's complete adjuvant

IFA: Freund's incomplete adjuvant

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

SDS: sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE: SDS- polyacrylamide gel electrophoresis

CDR: complementarity determining region

FR: framework

Fv: variable fragment

PBS: phosphate-buffered saline

PBST: PBS containing 0.05% Tween20

BSA: bovine serum albumin

LB: Luria-Bertani medium

IPTG: Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside

PB: phosphate buffer

HAT: hypoxanthine-aminopterin-thymidine

cDNA: complementary DNA

CT24: chimera T24 antibody

RT24: humanized T24 antibody

WT: wild type

Native-PAGE: native- polyacrylamide gel electrophoresis

CRE: creatinine

TP: total protein

AMY: amylase

ALB: albumin

hGM-CSF: human granulocyte macrophage colony stimulating factor

M-CSF: macrophage colony stimulating factor

## 序論

### 1 アミロイドーシス

アミロイドーシスは、線維構造を形成したタンパク質が全身の臓器に沈着することによって機能障害を引き起こす一連の疾患群であり<sup>[1][2]</sup>、これまでに線維構造（アミロイド）を形成するタンパク質（前駆体タンパク質）として 30 個程度が同定されている<sup>[3]</sup>。アミロイドーシスは全身諸臓器にアミロイドが沈着する全身性アミロイドーシスと、ある臓器に限局した沈着を示す限局性アミロイドーシスに大別され、更に家族間で遺伝するもの（遺伝性・家族性）と、遺伝しないもの（非遺伝性）に分類される。そして、それぞれのタイプの中で、アミロイドーシスの原因となる前駆体タンパク質に対応する臨床病型に分類される (Table.1)<sup>[2][4]</sup>。

Table.1 アミロイドーシスの分類（抜粋）<sup>[2][4]</sup>

タイプ		臨床病名	前駆体タンパク質
全身性	非遺伝性	AA アミロイドーシス	血清アミロイド A
		AL アミロイドーシス	免疫グロブリン L 鎖
		透析アミロイドーシス	$\beta$ 2-ミクログロブリン
		老人性全身性アミロイドーシス (SSA)	野生型トランスサイレチン
	遺伝性 (家族性)	家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) I 型、II 型	変異型トランスサイレチン
		FAP III 型	アポリポタンパク AI
		FAP IV 型	ゲルゾリン
		家族性腎アミロイドーシス	フィブリノーゲン $\alpha$ 鎖 リゾチーム
		家族性地中海熱	(アポ) 血清アミロイド A
限局性	非遺伝性 脳アミロイドーシス	アルツハイマー型認知症	アミロイド $\beta$ (A $\beta$ )
		クロイツフェルト・ヤコブ病	プリオン (PrP)
	遺伝性 脳アミロイドーシス	家族性アルツハイマー型認知症	アミロイド $\beta$ (A $\beta$ )
		遺伝性プリオン病	プリオン (PrP)

## 2 家族性アミロイドポリニューロパチー

家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) は、トランスサイレチン (TTR) 、アポリポタンパク質 A1 (ApoA1) 、ゲルゾリン (Gel) などの遺伝子の点変異や欠失が原因となって起こる、常染色体優性の遺伝性アミロイドーシスである<sup>[5]</sup>。これまで FAP は臨床的に 4 つの型 (I~IV 型) に分類されてきており、FAP I 型および II 型は異型 TTR が、III 型は異型 ApoA1 が、IV 型は異型 Gel がそれぞれアミロイド原因タンパク質として同定されているが、現在ではこの分類はほとんど用いられていない<sup>[6]</sup>。この中で、TTR の遺伝的な変異によって起こる FAP が最も多い<sup>[5]</sup>。変異型の TTR がアミロイドを形成し、通常中年期以降に末梢神経や心臓、腎臓、消化管、眼といった、ほぼ全身の組織に沈着して機能不全を起こすことが知られている。患者の予後は非常に悪く、発症から 10 年程度で死に至る難病である<sup>[5]</sup>。

現在までに 130 を超える TTR 遺伝子の点変異や欠失が世界中で報告されている<sup>[3]</sup>。そのうちアミロイドを形成しない変異はわずか 15 種類であり、残りの変異はアミロイド原性を持ち、全身性ニューロパチーを含む全身性のアミロイドーシスを引き起こす<sup>[3]</sup>。アミロイド原性を持つ変異型 TTR の中でも、30 番目のバリンがメチオニンに変異した V30M 変異を持つ患者が最も多く<sup>[3][5]</sup>、本変異を持つ患者はポルトガル、スウェーデン、日本で多く報告されている<sup>[5][7]</sup>。

FAP 患者が有する変異型 TTR の種類と頻度は、地域や人種によって大きく異なることが分かっている。例えば V30M 変異においては、ポルトガル北部での発生頻度は 1/538 である一方、アメリカの白人の間での発生頻度は 1/10000 である<sup>[7]</sup>。V122I 変異 (122 番目のバリンがイソロイシンに変異) においては、アフリカ系アメリカ人の発生頻度は 3.0~3.9% なのに対し、スベ

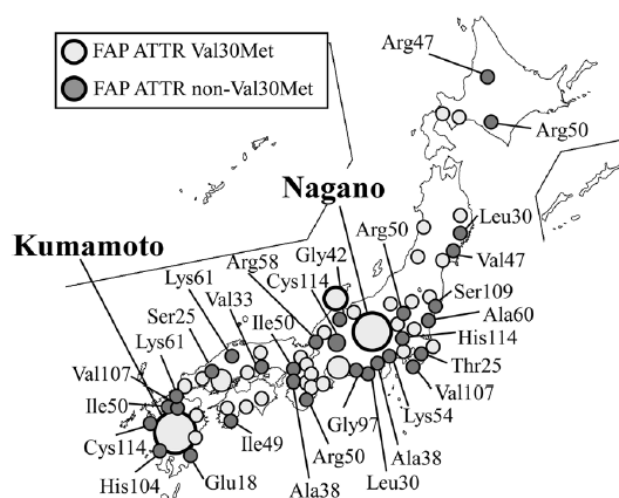


Fig.1 日本で報告された FAP 患者の有する変異型 TTR

※[3]より引用

イン系アメリカ人の発生頻度はほぼ 0%と、相当な違いが観察される<sup>[7]</sup>。日本では、V30M 変異を持つ患者が最も多く報告されているほか、これまで報告されている FAP 患者の有する TTR 遺伝子の点変異は 25 種類以上にのぼる (Fig.1)。

FAP の臨床症状は、TTR の変異アミノ酸や変異部位の違いにより大きく影響されることも明らかになっている。最も数の多い V30M 変異を有する患者は、平均して 35.4 歳で発症し、発症後は末梢神経障害（解離性感覚障害や筋力低下・筋萎縮など）、自律神経障害（排尿障害や下痢、便秘など）、全身症状（貧血や体重減少、不整脈など）が認められる<sup>[5]</sup>。治療を行わなかった場合、臨床症状としては Fig.2 に示すような経過をたどる<sup>[5]</sup>。最初に両下肢のしびれや感覚障害から始まり (Stage1)、筋力低下 (Stage2)、下痢や排尿障害を経て (Stage3)、全身の臓器障害が引き起こされる (Stage4)。進行は比較的緩やかであり、終末期に達するまでの期間は 10 年程度である。Y114C 変異を有する患者は、全ての患者が初期症状として視力低下を示し、平均 38.5 歳で発症していた<sup>[5]</sup>。主な症状として、硝子体の混濁、心不全、自律神経の機能不全が認められている<sup>[5]</sup>。V122I 変異を有する患者は 60 歳以上で発症し、主に心臓への TTR アミロイドの沈着が認められる<sup>[8]</sup>。一方で、L55P 変異を有する患者は 10 代で発症し、非常に重症な全身性アミロイドーシスを引き起こす<sup>[9]</sup>。かたや、D18G 変異を有する患者は比較的軽度であり、脳室脈絡叢で産生された TTR が髄膜や脳に沈着し、中枢神経障害を引き起こすことが報告されている<sup>[10]</sup>。

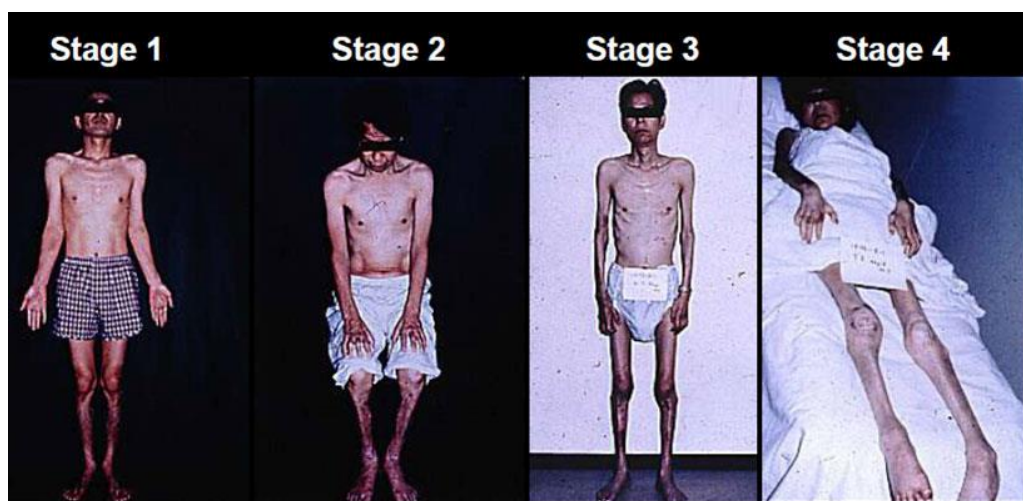


Fig.2 V30M TTR 保有 FAP 患者の臨床症状

※[5]より引用



### 3 トランスサイレチン (TTR)

TTR 遺伝子はヒトの第 18 番染色体に存在し、4 つの exon から構成される<sup>[7]</sup>。TTR 遺伝子の主な合成臓器は肝臓であるが、その他、脳室の脈絡叢や目の網膜色素上皮、膝臓の  $\alpha$  細胞においても発現が認められる<sup>[3][7]</sup>。

TTR は元々プレアルブミンという名称で知られていたタンパク質であり、脳脊髄液や血清を電気泳動で分離した時、アルブミンよりも陽極側に泳動されていたことから名づけられた<sup>[11]</sup>。ビタミン A-レチノール結合タンパク質複合体 (holoRBP) 、および甲状腺ホルモン T4 の輸送に関与する血漿タンパク質であり、血中濃度は 250  $\mu\text{g/mL}$ 、血中半減期は 2 日である<sup>[7][11]</sup>。

TTR は通常、血中で 1 分子が 127 個のアミノ酸からなる分子量 14 kDa の単量体が 4 つ会合した四量体を形成しており、非常に安定な構造をとる<sup>[11]</sup>。単量体は、内部に存在する 8 つの  $\beta$ -ストランドが 2 つの逆平行  $\beta$ -シートを形成した構造を有している。2 つの単量体が 2 つの隣接した  $\beta$ -ストランドの間に逆平行の水素結合を形成して二量体を形成し、2 つの二量体が疎水相互作用、水素結合によって会合し、四量体を形成している (Fig.3)<sup>[11][12]</sup>。

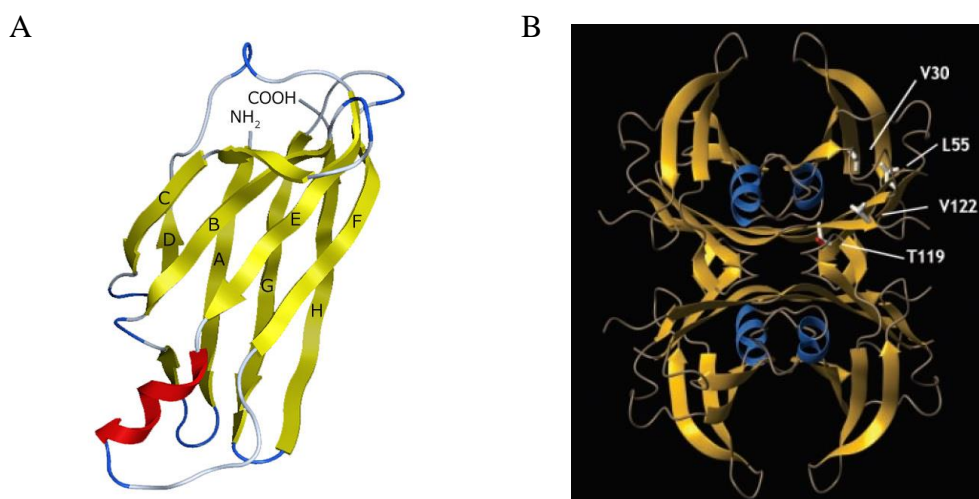


Fig.3 TTR の構造

A. TTR の単量体構造。PDB<sup>[13][14]</sup> ID: 3U2I<sup>[15]</sup>を鋳型として、分子設計ソフト MOE を用いて単量体のみ表示した。図中の A~H は  $\beta$ -ストランドの名称、NH<sub>2</sub> は N 末端、COOH は C 末端をそれぞれ表す。単量体は 1 つの  $\alpha$ -ヘリックスと 8 つの  $\beta$ -ストランド (A~H) から構成され、8 つの  $\beta$ -ストランドは D-A-G-H, および C-B-E-F の組み合わせで並列し、2 つの  $\beta$ -シートを形成している。血中では、単量体の F, H-ストランド同士の水素結合により二量体を形成し、更に、二量体の A, B-ストランド間のループと、もう一方の二量体の H-ストランド間の結合により四量体を形成する。B. TTR の四量体構造。[12]より引用した。

TTR 四量体の中心部には 2 つの相同な T4 結合部位が存在しており、T4 は TTR 四量体の内部に入り込んで結合する<sup>[7]</sup>。血中のおおよそ 10~15% の T4 が TTR と結合しており、結合することで TTR の四量体構造はより安定化される。一方で、holoRBP は TTR 四量体の外側に結合することが分かっており、TTR 四量体 1 分子あたり holoRBP は 2 分子まで結合が可能である<sup>[7]</sup>。T4 と同様に、TTR が holoRBP と結合することで、TTR の四量体構造はより安定化される。

しかし、TTR 遺伝子をノックアウトしたマウスでは、血中のレチノールや甲状腺ホルモン濃度は低下するものの、生存率や繁殖能といった表現型に大きな変化は見られなかったことから<sup>[16]</sup>、TTR が実際の生命活動の維持において必須なものであるかどうかは不明なままである。

#### 4 TTR のアミロイド形成

これまでに、X線回折を用いた TTR アミロイドの分析から、アミロイドを形成しているのは TTR 四量体ではなく単量体であることが明らかにされている<sup>[17]</sup>。また、生化学的な実験から、TTR のアミロイド形成においては、四量体から単量体への解離と、単量体の構造変化（ミスフォールディング）が必要であることが明らかにされている<sup>[18][19]</sup>。一般的に、アミロイドの前駆体タンパク質がアミロイドを形成する際、重合核が形成され、重合核を元にして線維が伸長する過程が必要であると考えられており<sup>[7]</sup>、実際、アルツハイマー型認知症の原因である A $\beta$  アミロイドなどは上述の過程を経てアミロイドが形成される。しかし、TTR のアミロイド形成には重合核の形成を必要とせず、四量体から単量体への解離が反応の律速段階であることが分かっている<sup>[20]</sup>。以上の事実から、TTR は四量体から単量体へ解離した後、単量体 TTR の構造変化を経て、TTR の線維伸長が起こると考えられている (Fig.4)。

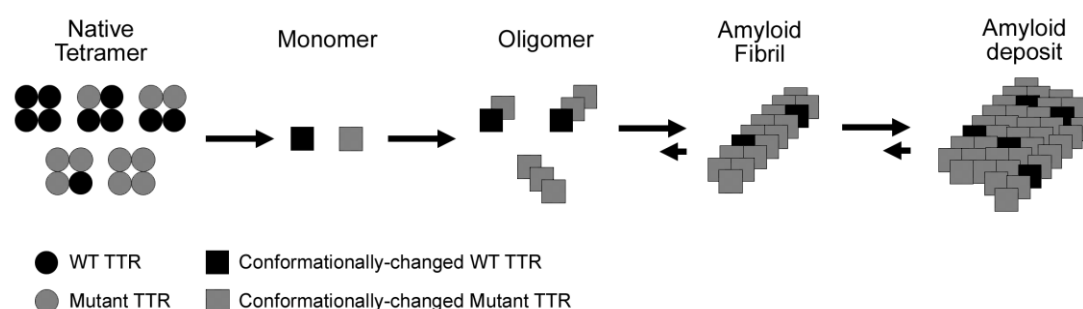


Fig.4 TTR がアミロイド化するまでのステップ

野生型 (WT) の TTR は血中で四量体を形成し、非常に安定な構造をとっているため、単量体への解離は容易には起こらないと考えられているが、アミロイド原性を持つ変異型 TTR においては、WT TTR と比較して構造が不安定になり、単量体への解離がより起こりやすくなると考えられている<sup>[7][12]</sup>。V30M 変異を例にとると、V30 は疎水性コア領域に存在しており、メチオニンへの変異により、その構造が不安定化することが明らかにされている<sup>[12]</sup>。しかし、構造が不安定になるメカニズムについては、その解明が試みられてはいないものの、現時点では明らかになっていない。

## 5 現在の FAP 治療法

これまで、アミロイドーシスの治療薬のターゲットを選定する際、①アミロイド前駆体そのものを薬剤の標的とする、②アミロイド前駆体タンパク質が線維を形成する過程の中で、組織毒性や細胞毒性を発揮する分子種を明らかにし、薬剤の標的とする、③形成された線維を薬剤の標的とする、などが行われてきた。アルツハイマー型認知症の治療を目的とした抗体医薬品を一例として挙げると、①としては、末梢血中の A $\beta$  に対する抗体である Solanezumab<sup>[21]</sup>、②としては、これまで毒性分子種として同定されてきた A $\beta$  のプロトフィブリルに対する抗体である BAN2401<sup>[22]</sup>、③としては、A $\beta$  線維に対する抗体である Bapineuzumab<sup>[21]</sup>等について、それぞれ臨床開発が進められてきた。なお、Solanezumab、および Bapineuzumab は PhaseIII で開発が中止され、BAN2401 は臨床開発が続けられている。同様に、これまで TTR についても毒性分子種の同定が試みられてきたものの、毒性分子種の同定には至っていない。このような状況の中、FAP 治療のターゲット分子種は多岐にわたり、また様々な治療法が試みられている。

- a) 肝移植：肝移植は最も一般的な治療法であり、肝臓からの変異型 TTR 供給を断つ治療法である。実際、1990 年までは FAP は不治の病であったが、肝移植の登場で、症状の進行を遅らせることが可能になった<sup>[23]</sup>。しかし、移植を行うことで病態進行の遅延が見られるものの、眼や心臓を含むいくつかの臓器での沈着は継続し、これら臓器の症状が増悪する例が少ない<sup>[24][25]</sup>。この原因として、肝臓からの変異型 TTR 供給は断たれても、その他の TTR 産生臓器からの変異型 TTR の供給は持続すること、また、TTR アミロイドが心臓に沈着する心アミロイドーシスが高齢者で発生し、その原因は変異型 TTR ではなく WT TTR であるためと考えられている。
- b) TTR 四量体安定化剤：近年、四量体を形成した TTR の構造を安定化させる低分子が治療薬として開発された。四量体 TTR の単量体への解離を抑えることで TTR 線維形成を抑えることを期待したものである。この作用機序を持つ低分子として、これまでに Pfizer 社から Tafamidis が開発されており、2011 年に EU で、2013 年に日本で承認されている<sup>[26][27]</sup>。Tafamidis は、四量体 TTR の T4 結合サイトに入り込むように設計された低分子で、結合により四量体構造が安定化する<sup>[27]</sup>。そのほか、同様の機序を持つ低分子として Diflunisal があり、臨床試験が世界中で行われている<sup>[23][27]</sup>。これら TTR 安定化剤は FAP 患者の末梢神経障害を遅らせる効果を示しているものの、症状

の進行を完全に抑えることはできていない。

c) **siRNA** : RNA 干渉のメカニズムを利用した薬剤の開発も行われている。**TTR mRNA** の 3'-非翻訳領域に結合するように合成された **siRNA** の配列を脂質ナノ粒子で包み込んだ薬剤が、Alnylam 社によって開発されている<sup>[28]</sup>。**siRNA** の効果により、**TTR** の産生そのものを抑える効果が期待できる。現在、**FAP** 患者を対象とした **PhaseIII** の臨床試験が行われているが<sup>[23]</sup>、組織に沈着した **TTR** アミロイドに対する影響は不明である。

d) **TTR** 線維除去剤 : **TTR** アミロイドの除去を狙った薬剤の開発も進められている。これまでに、タウリンとタウロウルソデオキシコール酸ナトリウムの混合剤を **FAP** モデルマウスに投与することで、アミロイド形成前の **TTR** を減少させる効果が報告されている<sup>[23]</sup>。本剤についても、臨床試験が進められている状況にある。

以上のように、**TTR** の四量体を安定化させ、単量体への解離を更に抑える治療法のみでは、**FAP** の進行を完全に食い止めることはできていないのが現状である。従って、**FAP** の進行を更に抑えるためには、単量体に解離した後の **TTR** に作用することで **TTR** の線維形成を抑制したり、あるいは既に組織に蓄積してしまった **TTR** アミロイドの除去を行ったりする薬効を持つ薬剤が有効であると考えられる。

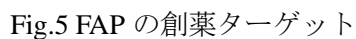
## 6 TTR の線維化と cryptic epitope

TTR アミロイドが形成される過程で、TTR の構造変化に伴って新たなエпитープが分子表面に露出することが知られており、このようなエпитープは cryptic epitope (隠れたエピトープ) と呼ばれる。Goldsteins らは、アミロイドが形成される前の TTR 中間体を調製することを目指して、53~55 番目のアミノ酸を変異させた TTR を調製し、変異型 TTR に対するモノクローナル抗体を作製した。その結果、TTR の 39-44 番目、および 56-61 番目に対する抗体は、四量体 TTR を認識しない一方、四量体 TTR を還元変性処理することで認識することを報告している<sup>[29]</sup>。この結果から、TTR の 39-44 番目、および 56-61 番目の配列は、四量体 TTR の状態では分子内に隠れており、構造変化が起こることで分子表面に露出される、cryptic epitope であると結論付けている。

また、Terazaki らは、四量体 TTR の構造が不安定化し、cryptic epitope が露出する変異体である Y78F 変異型 TTR を用いて FAP 病態モデルマウス<sup>[30]</sup> を免疫することにより、TTR の cryptic epitope を認識する抗体がマウス体内で産生され、TTR アミロイド沈着の軽減に作用しうることを報告している<sup>[31]</sup>。同様に、Gustavsson らは、TTR を 10 アミノ酸ごとに区切った合成ペプチドを抗原として抗血清を作製し、V30M TTR-FAP 患者の組織に対する反応性を解析した。その結果、115-124 番目のペプチドに対する抗血清において、V30M TTR-FAP 患者の心臓に沈着したアミロイドを強く認識する一方、血清中の四量体 TTR や、四量体 TTR が発現している健常人の膵臓組織を認識しないことを報告している<sup>[32]</sup>。この結果から、115-124 番目のペプチドに対する抗血清は、V30M TTR-FAP 患者組織に沈着した TTR アミロイドを特異的に認識していると結論付けた。加えて、TTR の 114 番目付近の領域は、TTR が四量体構造を形成している時は分子間相互作用の界面に位置していることが、立体構造の解析から明らかにされている<sup>[33]</sup>。

以上の知見を元に、我々は TTR の 115-124 番目の領域が、四量体構造を形成している時は隠れており、単量体に解離した後は表面に露出する、まさに cryptic epitope であると考えた。そこで、115-124 番目の合成ペプチドでウサギを免疫し、115-124 番目の領域に対するポリクローナル抗体を調製した<sup>[34]</sup>。このポリクローナル抗体を FAP 病態モデルラット<sup>[35]</sup> に投与したところ、FAP 病態モデルラットの腸管における TTR の沈着量は抗体投与群で有意に減少していた<sup>[36]</sup>。

以上の結果から、TTR の cryptic epitope を特異的に認識する抗体が、構造変化を起こした TTR や TTR アミロイドに特異的に結合し、TTR アミロイドの形成抑制、または形成抑制と除去の両方に係わる可能性が考えられた。一方で、これまで FAP の治療法として利用されているものは、いずれも四量体 TTR をターゲットとしたものであり、構造変化を起こした後の TTR や TTR アミロイドには効果が得られない。よって、TTR の cryptic epitope を特異的に認識する抗体は、FAP の新規治療薬になりうる可能性が示唆された (Fig.5)。



- 12 / 76 -

## 本論

### 第 1 章 TTR115-124 を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体の作製

#### 第 1 節 序

本章では、TTR の 115-124 番目を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体の作製、および作製したマウスモノクローナル抗体の反応性解析を行った結果について報告する。本章は以下の項目によって構成される。

##### 第 1 節 序（本節）

##### 第 2 節 抗 TTR115-124 マウスモノクローナル抗体の作製

##### 第 3 節 T24 のエピトープ解析

##### 第 4 節 T24 の反応性解析

##### 第 5 節 考察



## 第2節 TTR115-124 マウスモノクローナル抗体の作製

Fig.6 のスケジュールに従い、KLH コンジュゲートした TTR115-124 部位のペプチド（以下、「抗原ペプチド」）で TTR ノックアウトマウス<sup>[16]</sup>を免疫した。抗体価の上昇したマウスから脾臓を摘出し、定法<sup>[37]</sup>によりマウスミエローマ細胞と細胞融合を行った。融合後の細胞を 96well プレート十数枚に播種し、HAT 培地で選択を行った。ウェル内で 2 つのコロニーが重ならない程度まで細胞が増殖したことが確認されたタイミングで、細胞の培養上清を用いて ELISA を行い、抗原ペプチドに対する反応性でスクリーニングを行った。陽性ウェルからクローンをピックアップして培養し、同様に抗原ペプチドに対する反応性でスクリーニングを行ったところ、陽性ウェルが 10 得られた。

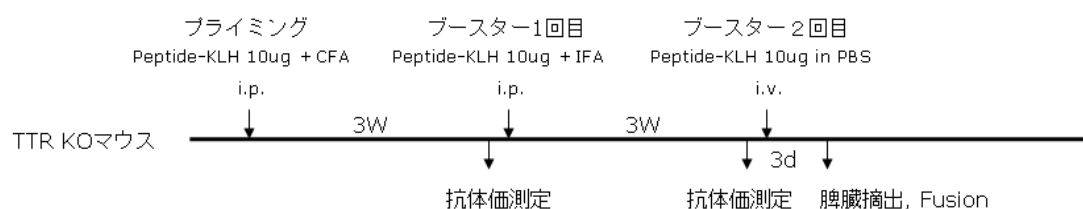


Fig.6 抗原ペプチドの免疫スケジュール

得られた 10 個の陽性ウェル内のハイブリドーマを限界希釈によってクローニングし、ハイブリドーマから各抗体遺伝子を取得した。得られた抗体遺伝子の配列を組み込んだマウス IgG 発現ベクターを作製し、Freestyle293 細胞 (Thermo Fisher Scientific) ヘトランスフェクションを行い遺伝子組換え抗体を発現させた。発現後の培養上清を出発材料として ProteinA クロマトグラフィー精製を行い、組換え抗体の精製品を調製した。

ここで、構造変化を起こした TTR を認識する一方、四量体構造をとる TTR を認識しない抗体を選別するため、2 種類の ELISA によるスクリーニングを行った。1 つ目は直接固相化法による ELISA であり、酸処理によって人為的に線維化させた組換え V30M TTR、または組換え WT TTR 四量体をプレートに直接固相化し、陽性クローンの反応性を解析した (Fig.7A)。その結果、全クローンにおいて V30M TTR 線維に対する反応が認められた一方、WT TTR 四量体に対して反応したクローンも認められた。四量体 TTR を直接プレートに固相化することで TTR の構造が変化し、クローンが反応した可能性が考えられた。

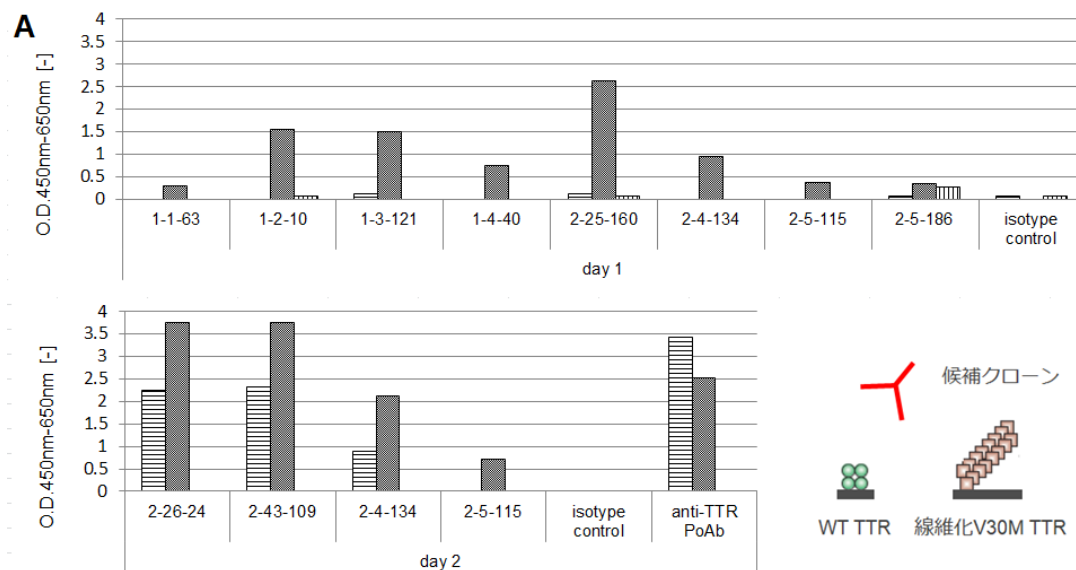


Fig.7A V30M TTR 線維に対する反応性（直接固相化法による ELISA）

酸処理によって人為的に線維化させた組換え V30M TTR、または組換え WT TTR 四量体に対する反応性を ELISA で評価した。横軸は各クローンの名称、縦軸は吸光度を表す。棒グラフ中の は組換え WT TTR 四量体、 は酸処理で人為的に線維化させた組換え V30M TTR をそれぞれ固相化したプレートに対する反応性を表し、 は何も固相化しなかったプレートに対する反応性を表す。横軸中の isotype control は TTR を認識しない抗体、anti-TTR PoAb は抗 TTR ポリクローナル抗体 (Dako) を、day1, 2 は、試験を別日に行ったことを意味する。また、当該試験系の反応様式を右下に図で示した。

そこでもう 2 つ目の手法として、サンドイッチ法による ELISA を用いた。抗 TTR ポリクローナル抗体をプレートに固相化し、組換え WT TTR 四量体をトラップさせたうえで、陽性クローンの反応性を解析した (Fig.7B)。その結果、直接固相化 ELISA の時とは異なる、四量体 TTR に対する反応パターンが認められた。以上の結果から、V30M TTR 線維には強く反応し、サンドイッチ ELISA で WT TTR 四量体に対して反応しないクローンとして、「2-4-134」、「2-5-115」、「2-26-24」、「2-43-109」の 4 クローンを選択した。

最後に、V30M 変異型 TTR 保有の FAP 患者（以下、「V30M FAP 患者」）の腎臓切片を用いた免疫染色を行い、反応するクローンのスクリーニングを行った (Fig.8)。その結果、4 クローン中、2-4-134, 2-26-24, および 2-43-109 の 3 クローンについて、Congo Red 染色や抗 TTR ポリクローナル抗体の染色像と同様に、患者組織に沈着したアミロイドに対する特異的な反応を認めた。この中から、クローン間で V30M TTR 線維に対する反応性が相対的に低かった 2-4-134 は除外し、残りの 2-26-24 と 2-43-109 は、アミノ酸配列の違いが VH 領域の 2 アミノ酸のみであり、V30M TTR 線維に対する反応性にも大きな違いはなかったことから、動物細胞での組換え抗体発現時に、より発現量が高い傾向が認められた 2-26-24

(以下、「T24」) を候補クローンとして選択した。

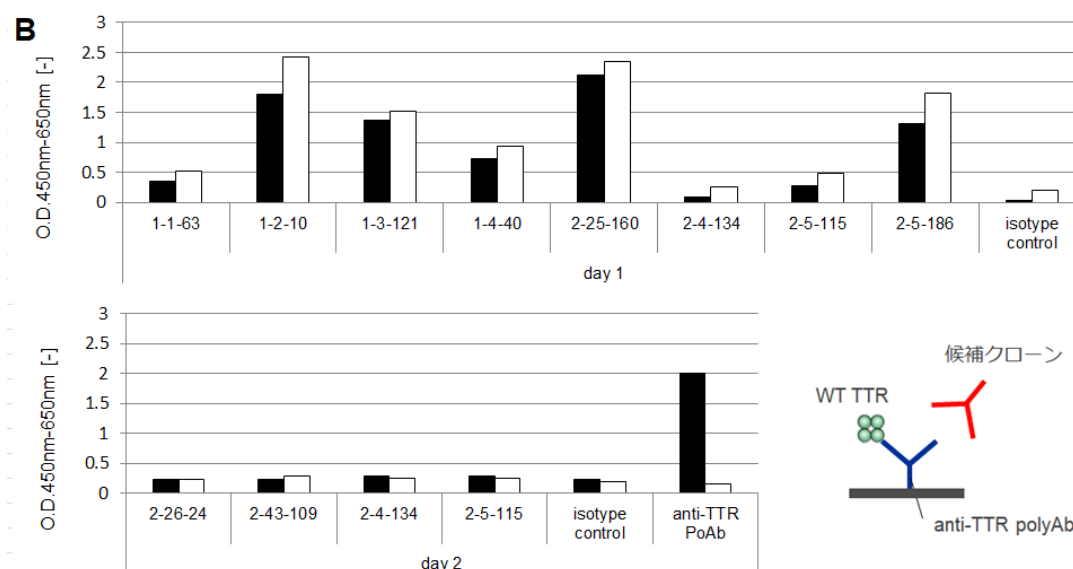


Fig.7B WT TTR 四量体に対する反応性 (サンドイッチ法による ELISA)

組換え WT TTR 四量体に対する反応性をサンドイッチ ELISA で評価した。棒グラフ中の内の■は WT TTR 四量体をトラップさせたプレートに対する反応性を、□は何もトラップしなかったプレートに対する反応性を示した。その他の表記の意味は Fig.7A と同様である。また、当該試験系の反応様式を右下に図で示した。

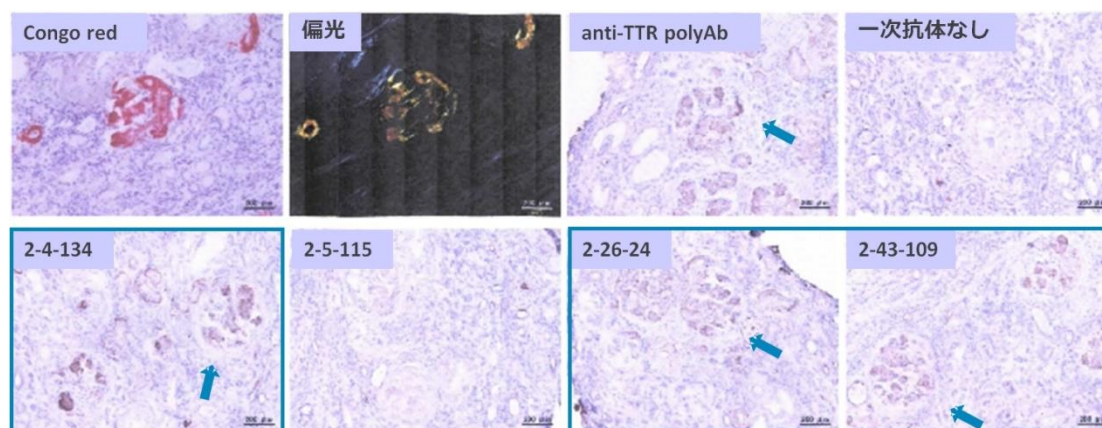


Fig.8 V30M FAP 患者由来の腎臓切片に対する反応性

V30M FAP 患者の腎臓から作製したパラフィン切片に対する反応性を免疫化学染色により評価した。Congo red はコンゴレッド染色、偏光はコンゴレッド染色後の偏光像、anti-TTR polyAb は抗 TTR ポリクローナル抗体 (Dako)、一次抗体なしは一次抗体を反応時に加えなかった時の染色像をそれぞれ表す。免疫染色像において、アミロイド特異的な染色像が認められた部分について、代表して青矢印で表示した。

### 第3節 T24のエピトープ解析

第2節では、V30M TTR 線維を特異的に認識する一方、WT TTR 四量体を認識しないマウスモノクローナル抗体として T24 を得た。そこで、最初に T24 のエピトープ解析を行い、T24 の抗原決定基をより詳細に明らかにすることとした。

抗原とした領域である TTR115-124 部位のアミノ酸配列について、それぞれアラニンに置換した TTR 点変異体の作製を行った。ただし、120 番目は元々アラニンであったため、構造が近く、かつ患者報告のなされている変異であるセリン置換体を作製した。その他、患者報告のなされている変異である Y114C 変異、V122I 変異についても合わせて評価に加えることとした。上記置換体を発現するベクターを大腸菌 M15 に形質転換し、組換えタンパク質を発現させた。BugBuster (Novagen) によりタンパク質を可溶化させ、可溶化画分を SDS-PAGE で泳動し (Fig.9A) 、T24 で Western Blot を行った (Fig.9B) 。その結果、118 番目から 122 番目のアラニン置換体において反応の低下・消失が認められた。よって、T24 のエピトープは TTR115-124 部位の中でも、特に TTR118-122 部位にあると考えられた。

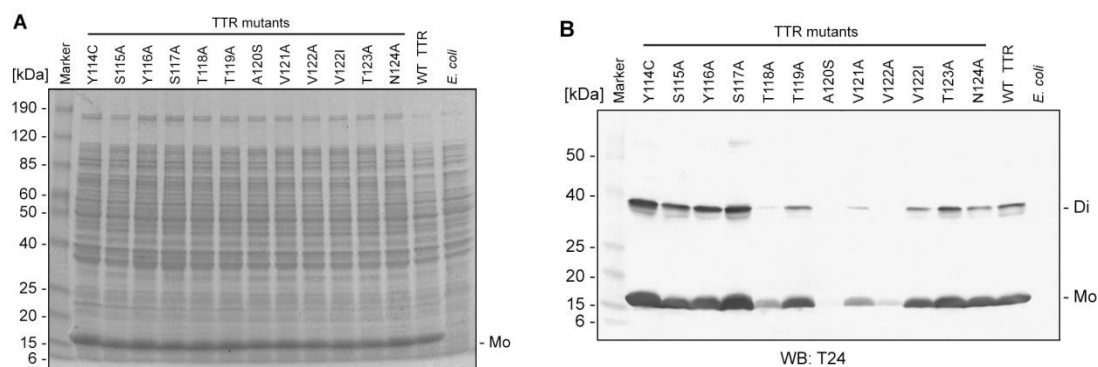


Fig.9 T24 のエピトープ解析

A. 大腸菌で組換え発現させた各 TTR 変異体の可溶性画分を還元、加熱処理して SDS-PAGE で泳動し、CBB 染色によってタンパク質を可視化させた。B. T24 の各 TTR 変異体に対する反応性を Western Blot で解析した。図内の *E. coli* は、TTR 発現ベクターを含まない大腸菌 M15 の可溶性画分を表し、縦軸の Di は TTR 二量体を、Mo は TTR 単量体のバンドを示した。

#### 第 4 節 T24 の反応性解析

次に、ヒト血液中に存在する TTR に対する反応性の解析を行った。健常人の血清、V30M FAP 患者の血清、免疫に使用したペプチド、または酸処理により人為的に線維化させた組換え V30M TTR を固相化し、T24 で ELISA を行った (Fig.10)。その結果、T24 は健常人や V30M FAP 患者の血清に対して反応を認めなかった。

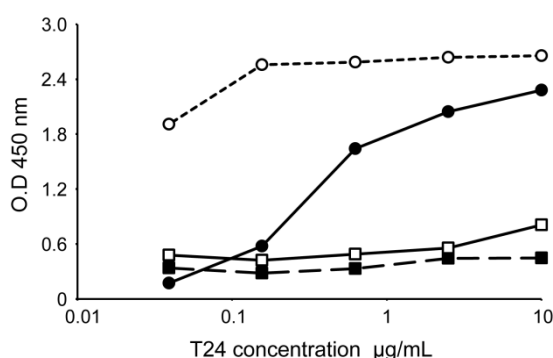


Fig.10 T24 のヒト血清に対する反応性

T24 のヒト血清に対する反応性を ELISA により評価した。横軸は T24 の抗体濃度、縦軸は吸光度を表す。○は抗原ペプチド、●は酸処理によって人為的に線維化させた組換え V30M TTR、■は健常人の血清、□は V30M FAP 患者の血清に対する反応性をそれぞれ示した。

次に、ヒト血清、および V30M FAP 患者組織から抽出したアミロイドに対する反応性の解析を行った。健常人の血清、V30M FAP 患者の血清、または V30M FAP 患者の心臓および腎臓から抽出したアミロイドを非加熱の状態で SDS-PAGE で泳動し、抗 TTR ポリクローナル抗体 (Dako)、または T24 で Western Blot を行った (Fig.11)。その結果、T24 は健常人、および V30M FAP 患者の血清に対する反応を認めず、V30M FAP 患者の腎臓から抽出したアミロイドに対する特異的な反応を認めた。一方で、FAP 患者の心臓から抽出したアミロイドに対する反応を認めなかった。

最後に、V30M FAP 患者の腎臓、および心臓組織のパラフィン切片を用いて免疫組織化学的染色を行い、T24 の反応特異性を更に解析した。その結果、T24 は congo red 染色像や抗 TTR ポリクローナル抗体の染色像と同様に、V30M FAP 患者の糸球体、および心臓に沈着したアミロイドに対する特異的な反応を認めた (Fig.12A, M)。この結果は凍結切片を用いた際も同様の傾向を示した (Fig.12G, S)。以上の結果から、T24 はヒト血液中の TTR は

認識せず、V30M FAP 患者由来の TTR アミロイドを認識する特性を有すると考えられた。

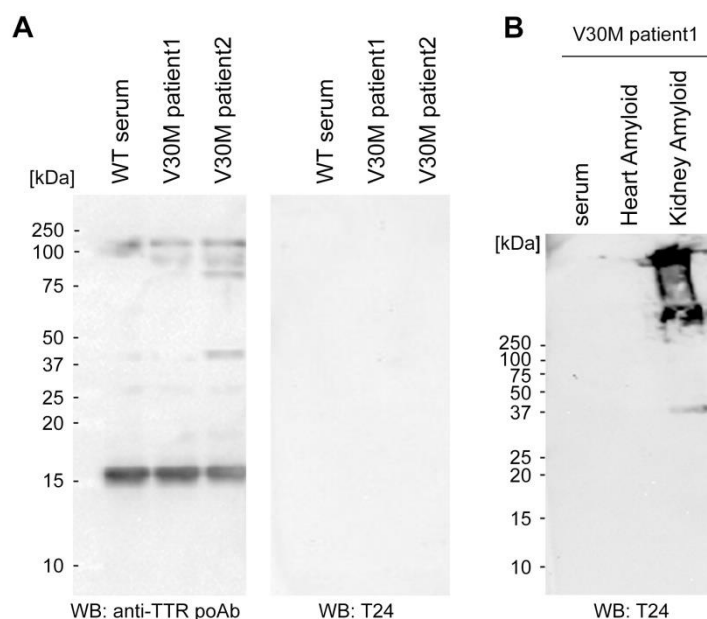


Fig.11 T24 の血清、および FAP 患者由来アミロイドに対する反応性

A. T24 のヒト血清に対する反応性。健常人の血清、または V30M FAP 患者の血清を非還元、非加熱の状態 SDS-PAGE で泳動し、抗 TTR ポリクローナル抗体 (Dako) (左図)、または T24 (右図) で Western Blot を行った。メインで観察されるバンドが TTR 単量体、37kDa から 50kDa の間に観察されるバンドが TTR 三量体、75kDa 以上のサイズに観察されるバンドが TTR 以外の非特異的反応であると考えられる。B. T24 の V30M FAP 患者由来のアミロイドに対する反応性。V30M FAP 患者の血清、V30M FAP 患者の心臓または腎臓から抽出したアミロイドを非還元、非加熱の状態 SDS-PAGE で泳動し、T24 で Western Blot を行った。250kDa 以上のサイズに観察されるバンドが抽出した TTR アミロイドであると考えられる。



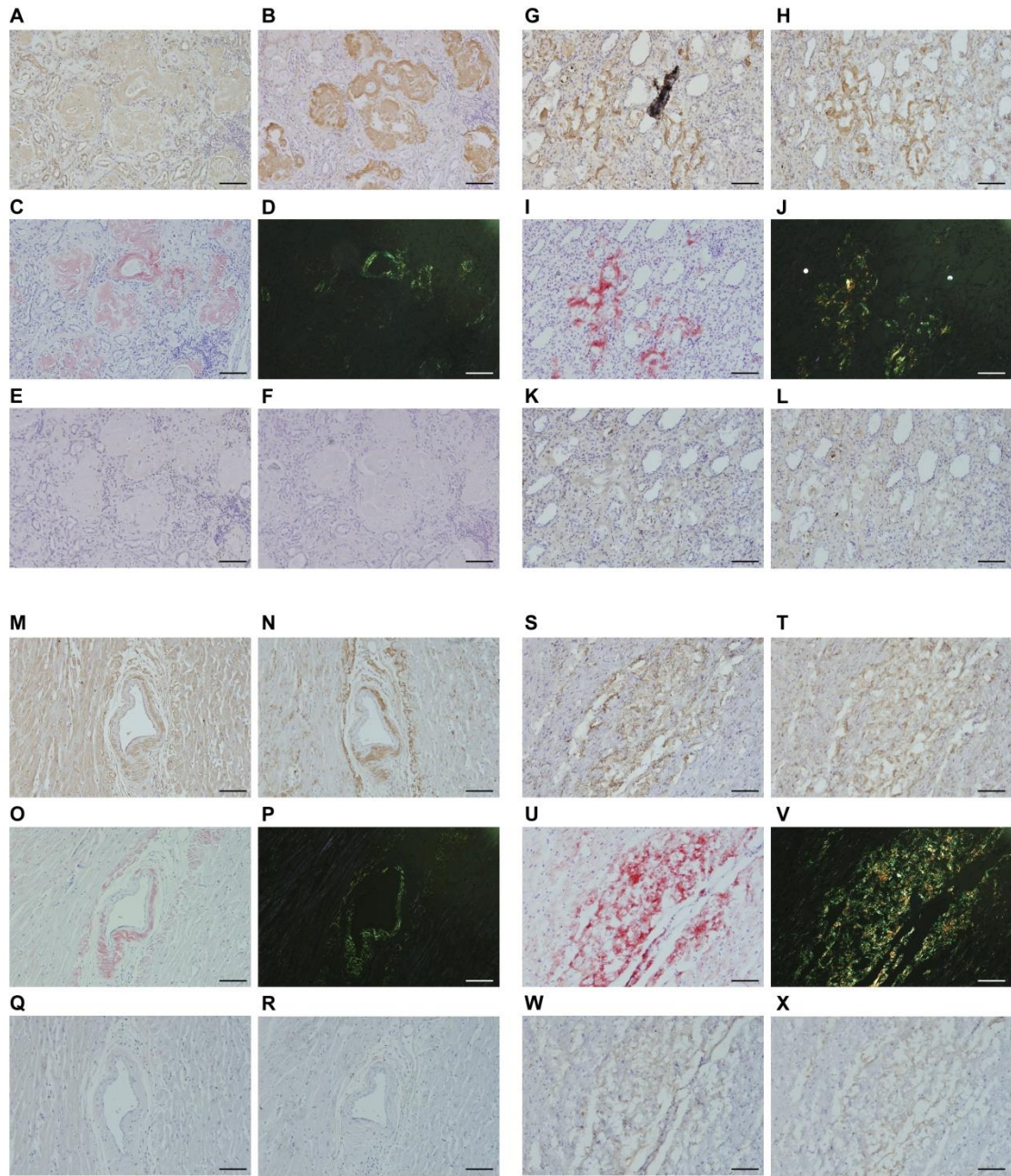


Fig.12 T24 の V30M FAP 患者組織に対する反応性

V30M FAP 患者の腎臓、または心臓から作製したパラフィン、および凍結切片に対する T24 の反応性を免疫組織化学的染色により評価した。A~L は腎臓、M~X は心臓由来の切片を使用しており、A~F、M~R はパラフィン切片、G~L、S~X は凍結切片を使用した。A、G、M、S は T24、C、I、O、U は Congo Red 染色、D、J、P、V は Confo Red 染色後の偏光像、B、H、N、T は抗 TTR ポリクローナル抗体 (Dako)、E、K、Q、W は TTR を認識しないアイソタイプコントロール抗体、F、L、R、X は一次抗体を反応時に加えなかった時の染色像をそれぞれ表した。

## 第5節 考察

### 1. 得られたクローンの特性について

本章では、血中で機能する四量体の TTR を認識せずに、構造変化を起こした TTR を特異的に認識する抗体の創出を目指し、TTR115-124 部位に対するマウスモノクローナル抗体の創出を試みた。その結果、四量体構造の TTR を認識せずに、V30M FAP 患者組織に沈着した TTR アミロイドを特異的に認識するマウスモノクローナル抗体を 3 クローン得た。これらの抗体は、患者組織由来の TTR アミロイドを特異的に認識することから、FAP の診断や FAP の病態解析への応用も利用可能であると考えられる。

更に、得られた 3 クローンの中から候補クローンとして T24 を選び、結合特性の解析を行った。その結果、T24 は TTR115-124 部位のうち、特に 118-122 部位をエпитープとして有すること、健常人や V30M FAP 患者の血清中に含まれる TTR を認識しないこと、V30M FAP 患者の腎臓組織から抽出したアミロイドを特異的に認識すること、V30M FAP 患者の腎臓、および心臓に沈着した TTR アミロイドを特異的に認識することを明らかにした。これらの結合特性は、いずれも FAP を治療するための抗体医薬品として求められる特性であると考えられた。

T24 のエпитープである TTR118-122 部位は、四量体を形成した TTR において、二量体—二量体の界面に位置している。四量体構造を形成している際は、二量体—二量体の界面はタンパク質の内部に隠れている領域であることから、TTR118-112 部位は、TTR が単量体に解離することで初めてタンパク質表面に露出する、まさに cryptic epitope であると考えられた。実際、T24 は血中で働く（四量体構造をとる）TTR を認識しない一方、酸処理で人為的に線維化させた TTR や FAP 患者から抽出したアミロイドを特異的に認識していることを ELISA (Fig.10) や Western Blot (Fig.11) により明らかにしており、この結果は上記仮説と矛盾しない。

一方で、T24 は V30M FAP 患者の腎臓から抽出したアミロイドを特異的に認識したものの、心臓から抽出したアミロイドを認識しなかった (Fig.11B)。しかし、V30M FAP 患者の腎臓、および心臓組織切片を用いた免疫組織化学的染色の結果では、T24 は V30M FAP 患者の腎臓、および心臓に沈着した TTR アミロイドを特異的に認識していた (Fig.12)。よって、本来であれば T24 は V30M FAP 患者の心臓から抽出した TTR アミロイドも認識



しうと考えられる。Western Blot で心臓由来のアミロイドに対する反応が認められなかった原因として、V30M FAP 患者組織からアミロイドを抽出する際に、心臓からのアミロイド抽出の効率が悪く、泳動サンプル内にアミロイドが十分に含まれなかった可能性や、SDS-PAGE での泳動を行う際、抽出したアミロイドのサイズが大きく、ゲル内に十分流れなかった可能性が考えられる。

## 2. スクリーニングに利用した ELISA 系について

得られたマウスモノクローナル抗体の中から、四量体構造の TTR を認識せずに、構造変化を起こした TTR を特異的に認識するクローンをスクリーニングするため、当初は直接固相化法による ELISA を用いた (Fig.7A)。その結果、組換え WT TTR 四量体を固相化したプレートにおいて強い反応が認められるクローンが得られた (Fig.7A 2-26-24, 2-43-109)。しかし、四量体 TTR をプレートに直接固相化することで、TTR の四量体構造が物理的に変化し、本来の四量体構造では表面に露出しない領域が露出した可能性が否定できなかったため、追加でサンドイッチ ELISA の系を構築し、評価を行った (Fig.7B)。その結果、四量体 TTR に対する反応性は直接固相化 ELISA と大きく異なる傾向を示し、直接固相化 ELISA で四量体 TTR を強く認識した上記 2 クローンは、サンドイッチ ELISA で四量体 TTR を認識しなかった。陽性コントロールとして測定した抗 TTR ポリクローナル抗体 (Dako) においては、WT TTR 四量体をトラップさせることで TTR 特異的な反応が認められたことから、WT TTR 四量体のトラップ、およびトラップさせた WT TTR 四量体の検出は問題なく行えていると考えられる。よって、上記 2 クローンは、組換え WT TTR 四量体を認識しないと判断した。一方で、1-2-10, 1-3-121, 2-25-160 は、直接固相化 ELISA では WT TTR 四量体を認識しない結果が得られていたものの、サンドイッチ ELISA において、TTR の有無にかかわらず強い発色が認められた。この発色は非特異的な反応であると考えられるため、候補クローンとしては望ましくないと判断した。

## 3. T24 のヒト血清に対する反応性について

ELISA、および Western Blot による解析により、T24 は健常人、および V30M FAP 患者の血清を認識しないことが分かった (Fig.10, 11)。その際、ヒト由来の血清はプレートに

直接固相化させたうえで ELISA を行っており、スクリーニングの際に利用した直接固相化 ELISA の結果と一見矛盾しているように思われる。しかし、この差は、ELISA に用いた抗原として、ヒト血清由来か、組換えタンパク質であるかによって生じた可能性が考えられる。TTR は、ヒトの血中で T4 や holoRBP と結合しており、これらの因子と結合することで四量体構造は更に安定化されることが知られている<sup>[7]</sup>。一方で、組換えの四量体 TTR は、上記因子の結合が無い状態であるため、四量体 TTR としての安定性に差が生まれ、プレートへ直接固相化した際に構造に差が生じた可能性が考えられた。

抗 TTR ポリクローナル抗体を用いた Western blot (Fig.11A) の結果、メインのバンドは 15kDa 付近に認められた。このバンドは TTR の単量体由来と考えられ、サンプルの SDS 処理（非還元、非加熱）、および SDS-PAGE によって生じたものと思われる。一方で、T24 を用いた Western Blot (Fig.11B) の結果では、TTR 単量体に対する反応は認められなかった。T24 は TTR が四量体から単量体に解離する際に分子表面に露出する領域をエピトープとして持つため、本来であれば単量体 TTR に反応しても不思議ではない。実際、組換え WT TTR を還元、加熱処理した後に SDS-PAGE で泳動し、T24 で Western Blot を行った結果、TTR 単量体に対する反応が認められている (Fig.9) 。しかし今回、T24 で TTR 単量体に反応しなかった要因として、①サンプルの処理方法の違い（ヒト血清に対して、SDS は添加しているが、還元処理や加熱処理は行っていない。）②ヒト血清中の TTR と組換え TTR の環境の違い（TTR に結合している分子種の違いなど）が考えられ、要因の解明は今後の課題である。更に、Fig.11A において、メインバンド以外にも、サイズから三量体を形成していると推定される位置においても一部バンドが認められた。また、そのバンドの濃さは健常人の血清と V30M FAP 患者とで大きく異なっており、V30M FAP 患者の血清で多い傾向が認められた。サンプル処理中に三量体を形成したものと想定されるが、原因は不明である。WT TTR 四量体と V30M TTR 四量体とでは立体構造は完全には一致しないことから、変性を行った時に得られた分子体の割合もわずかに異なるのかもしれない。

## 第2章 モノクローナル抗体 T24 のヒト化

### 第1節 序

第1章で、FAP 治療用抗体医薬品の候補となるマウスモノクローナル抗体 T24 を得た。そこで、ヒトへの投与を可能にするために、マウス抗体のヒト化を行うこととした。マウス抗体はヒトにとって種が異なるため、免疫原性が高く、マウス抗体をそのまま投与することは、アナフィラキシーショックの発現や、投与したマウス抗体に対する抗体の出現によって抗体の効き目が失われる等、副作用が発生する危険が高い。

抗体医薬品は、元のマウス抗体由来の配列の割合により、主に3種に分類される (Fig.13)。抗体 (免疫グロブリン G) は定常領域と可変領域からなり、可変領域は、抗原を認識する相補鎖決定領域 (CDR) と、フレームワーク領域 (FR) から構成される。キメラ抗体は、鑄型となるヒト抗体に、元のマウス抗体の可変領域をそのまま置換した抗体である。一方で、ヒト化抗体は鑄型ヒト抗体に、元のマウス抗体の CDR を置換すること等により作られる (CDR grafting 法)<sup>[38][39]</sup>。マウス抗体のヒト化によりヒト由来の配列は9割に近づくため、ヒトへの投与を考えた際、ヒト化抗体はマウス抗体やキメラ抗体と比較してより安全であると考えられる。

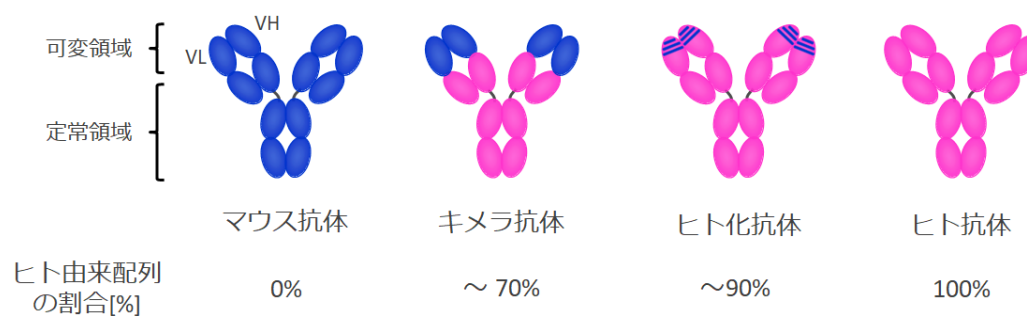


Fig.13 抗体医薬品の分類

本章では、ヒトへの投与を目的とした抗体を創出するため、第 1 章で得た T24 のヒト化を行った結果について報告する。本章は以下の項目によって構成される。

第 1 節 序（本節）

第 2 節 T24 の分子モデリング

第 3 節 ヒト化 T24 のデザインと評価

第 4 節 考察

## 第2節 T24 の分子モデリング

ヒト化抗体を作製する際は、元のマウス抗体が有する抗原結合能・生物活性を維持しつつ、極力ヒト抗体の配列に近づけることが必要である。今回、CDR grafting 法をベースとして T24 のヒト化を行うこととした。

CDR grafting 法によるヒト化抗体の作製において、元のマウス抗体の CDR のみを鋳型ヒト抗体に置換しただけでは、ほとんどの場合、元のマウス抗体と同等の活性は再現できない。これは FR の中に直接的あるいは間接的に CDR の立体構造保持に影響を与えている残基が存在するためである。従って、そのような FR 由来の残基の中でも特に重要なものについては、CDR と併せて鋳型ヒト抗体に置換する必要がある。このような重要残基の基本的な位置は論文に報告されているものや、特許出願されているものもあるが、厳密には重要な FR 残基は抗体毎に異なる。そこで、それを推定するための有効な方法として、元のマウス抗体の分子モデルを作製し、CDR との相互作用残基を推察することとした。

分子モデリングソフト MOE2010 (Chemical Computing Group) を使用し、T24 Fv の分子モデルを作製した。その際、① 最も一般的な手法である Homology Modeling を使用し、手動でモデルを作製する方法で 1 種、② MOE2010 から搭載された Antibody Modeler 機能を用いて 2 種、の合計 3 種類のモデルを作製した。

### ① 手動でモデルを作製する方法

モデリングの流れを Fig.14 に示した。始めに VH モデルの作製を行った。T24 の VH 領域のアミノ酸配列を元に Protein Data Bank<sup>[13][14]</sup>に登録された配列と比較し、相同性の高いファミリーを抽出した。その結果、PDB ID: 1ZWI ファミリーには十分な数のエントリーが含まれていたため採用した。ファミリーの中でも PDB ID: 1ZWI の A 鎖は CDR3 の長さも含め、全体のホモロジーが T24VH と最も高かった（一致度 80.5%）ことから鋳型として採用した。次に、PDB ID: 1ZWI の A 鎖と対を成す鋳型である B 鎖の座標を MOE-PDB からロードし、PDB ID: 1ZWI の A 鎖を鋳型、B 鎖を environment、力場を AMBER99 に設定してホモロジーモデリングを実行し、T24VH+1ZWI.B の複合体構造モデルを作製した。

続いて、Fv モデルの作製を行った。T24 の VL 領域のアミノ酸配列を元に、VH モデル構築時と同様に配列を比較し、ホモロジーが最も高いもの（一致度 74.8%）として PDB

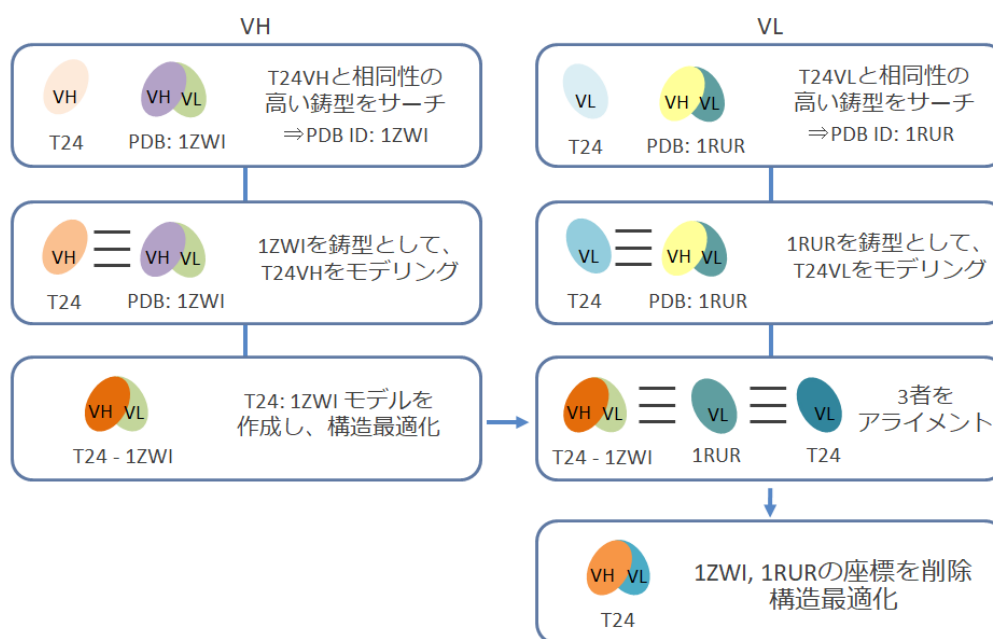


Fig.14 ホモロジーモデリングの流れ

図上に示した 1ZWI, 1RUR の表記は、それぞれ PDB ID を表す。

ID: 1RUR の L 鎖を鋳型として採用した。次に、先に作製した T24VH+1ZWI.B 複合体の座標をロードし、PDB ID: 1ZWI の B 鎖と PDB ID: 1RUR の L 鎖の、主鎖が重なるように superpose を行った。そして、1RUR の L 鎖を鋳型、T24VH+1ZWI.B 複合体を environment、力場を AMBER99 に設定してホモロジーモデリングを実行し、T24 複合体構造モデルを構築した (Fig.15)。

得られた Fv モデルについてジオメトリ解析を行ったところ、VH-CDR3 のループ先端付近に 1 箇所の  $\phi\psi$  の outlier が検出された (VH;103Thr)。定法に従って AMBER99 力場のもとでエネルギー最小化計算を行ったが、上記 outlier は解消されなかった。上記の outlier がモデルの解釈に大きな影響を与える可能性は低いと考え、そのままのモデルを採用した。

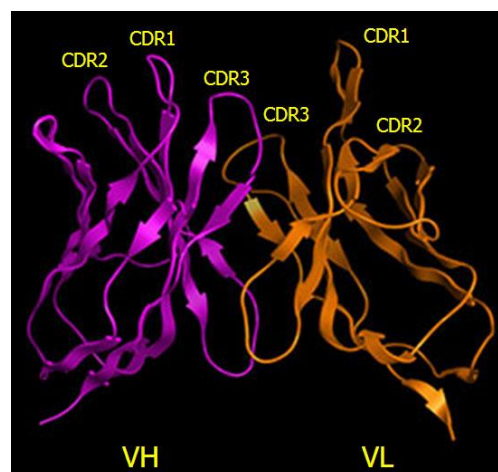


Fig.15 T24 のホモロジーモデル (Model1)

## ② Antibody Modeler 機能を用いてモデルを作製する方法

MOE 内の Antibody Modeler (AM) 機能を利用し、AM 上で T24VH, VL と相溶性の高

い鑄型を検索した。その結果、Table.2 に示す座標をそれぞれ鑄型として使用した。なお、Model2 では VH、VL 各々で相同性の高い FR を使用し、CDR3 は上から 2 番目に高いものを使用した。Model3 は VH+VL 全体で相同性の高かった FR を採用し、CDR3 のみ Model1 の CDR を使用した。上記鑄型を利用し、Intermediate を medium, Final Model を Fine、力場を AMBER99 に設定して Antibody Builder を実行し、T24Fv モデルを作製した (Fig.16, 17) 。得られた Fv モデルについてジオメトリ解析を行ったところ、outlier は検出されなかったため、これら 2 種類のモデルを採用した。

Table.2 Antibody Modeler で使用した鑄型

項目		FR	CDR1	CDR2	CDR3
Model2	VL	2AK1.L 鎖	2C1P.A 鎖	2AK1.L 鎖	2AJX.L 鎖
	VH	1MJJ.H 鎖	1MJJ.H 鎖	1EMT.H 鎖	1R3L.H 鎖
Model3	VL	1MJJ.L 鎖	2C1P.A 鎖	2AK1.L 鎖	2AJX.L 鎖
	VH	1MJJ.H 鎖	1MJJ.H 鎖	1EMT.H 鎖	1ZWI.H 鎖

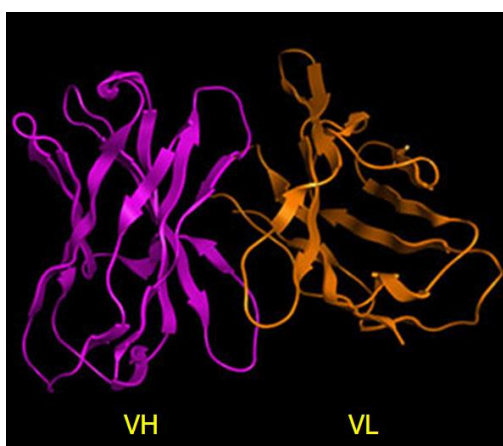


Fig.16 T24 のホモロジーモデル (Model2)

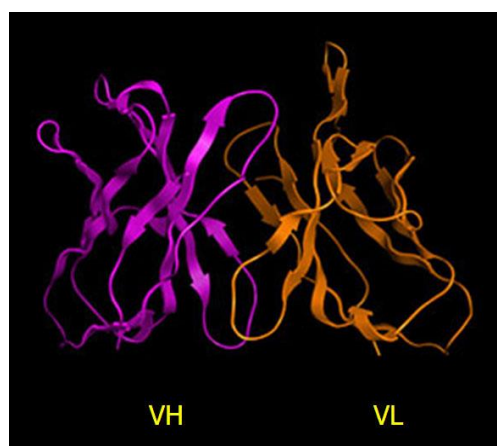


Fig.17 T24 のホモロジーモデル (Model3)

作製した 3 種類のモデルを元に、MOE の Protein Contact 機能を利用して Fv の分子内および分子間相互作用解析を行った。得られたデータを元に、T24 の CDR 領域と相互作用 (水素結合、疎水相互作用、イオン結合) するアミノ酸について、作製したモデル間で高頻度に登場するものを抜粋した (Table.3, 4) 。これらの情報から、CDR と相互作用している FR アミノ酸を、T24 の活性維持に重要であると推測される FR 領域のアミノ酸とした。

Table.3 CDR 残基が関与する VH-VL 間相互作用データ

結合	分子鎖 1	残基 1	分子鎖 2	残基 2
水素結合	VL	Phe36	VH	Phe100a
水素結合	VL	Phe98	VH	Phe100a

Table.4 CDR 残基が関与する分子内相互作用データ

結合	分子鎖 1	残基 1	分子鎖 2	残基 2
疎水結合	VL	Arg24	VL	Asp70
疎水結合	VH	Trp47	VH	Asn58
疎水結合	VH	Tyr59	VH	Leu69
水素結合	VL	Ile2	VL	Val92
水素結合	VL	Leu27b	VL	Phe71
水素結合	VL	Leu33	VL	Phe71
水素結合	VH	Trp47	VH	Phe100a
水素結合	VH	Ile51	VH	Leu69
水素結合	VH	Ile51	VH	Val71
イオン結合	VL	Arg24	VL	Asp70



### 第3節 ヒト化 T24 のデザインと評価

第2節で得た活性維持に必要な FR アミノ酸の情報、これまで当研究室で行ってきた抗体のヒト化で得た知見を参考にし、T24 由来の配列に置換するアミノ酸の決定を行った。これらの情報から、ヒト化 T24 抗体のデザインを複数行った。

デザインしたアミノ酸配列を元に人工遺伝子合成を行い（タカラバイオ）、ヒト化 T24 の VH、および VL を含む塩基配列をヒト C $\gamma$ 、およびヒト C $\kappa$  の塩基配列を持つ pUC19 ベクターに導入した。このベクターを制限酵素 SalI で消化して動物細胞発現ベクターにそれぞれ導入し、ヒト化 T24 発現ベクターを構築した。あわせて、T24 の V 領域配列を含む塩基配列をヒト C $\gamma$ 、およびヒト C $\kappa$  の塩基配列を持つ pUC19 ベクターに導入し、同様にキメラ T24 発現ベクターを構築した（以下、「CT24」）。

Neofectin（アステック）を用いてヒト化 T24 発現ベクターを Freestyle293 細胞にトランスフェクションして振とう培養を行い、5 日目に培養上清を回収した。培養上清を 0.22  $\mu$ m フィルターメンブレンでろ過後、HiTrap rProteinA FF (GE Healthcare) カラムを使用し、各種抗体の精製を行った。溶出画分をフラクションコレクターで回収し、トップピークのみを回収して PBS (Wako) に対して透析した。透析後のサンプルを 0.22  $\mu$ m フィルターメンブレンでろ過し、ヒト化 T24 精製品とした。精製品は SDS-PAGE やサイズ排除クロマトグラフィーを用いて分析を行い、抗体モノマー純度が 95%以上であることを確認した。CT24 についても同様に発現および精製品の調製を行ったものの、得られた精製品は抗体モノマー純度が低かったことから、ゲルろ過精製を追加で行い、CT24 精製品とした。

得られたヒト化 T24 精製品のうち 4 種類（以下、RT24v1~RT24v4 とする）、および CT24 精製品について、ビオチン化した TTR115-124 ペプチドを Immobilizer Streptavidin Plates (Nunc) に固相化したプレートを用いて ELISA を行い、各抗体の抗原ペプチドへの反応性を検証した (Fig.18)。その結果、CT24 と同等の結合活性、および用量反応性を有する抗体として RT24v1（以降、「RT24」）が得られた。RT24 の配列を Fig.19 に、RT24 構築の際、最終的に鋳型配列に対して追加で置換した T24 FR 由来のアミノ酸を Fig.20 に示した。一方で、RT24v1 以外に作製した RT24v2~RT24v4 の結合活性、および用量反応性は、CT24 と大きく異なっていた (Fig.18)。RT24v2~RT24v4 の、RT24 との配列の違いを Table.5 に示した。

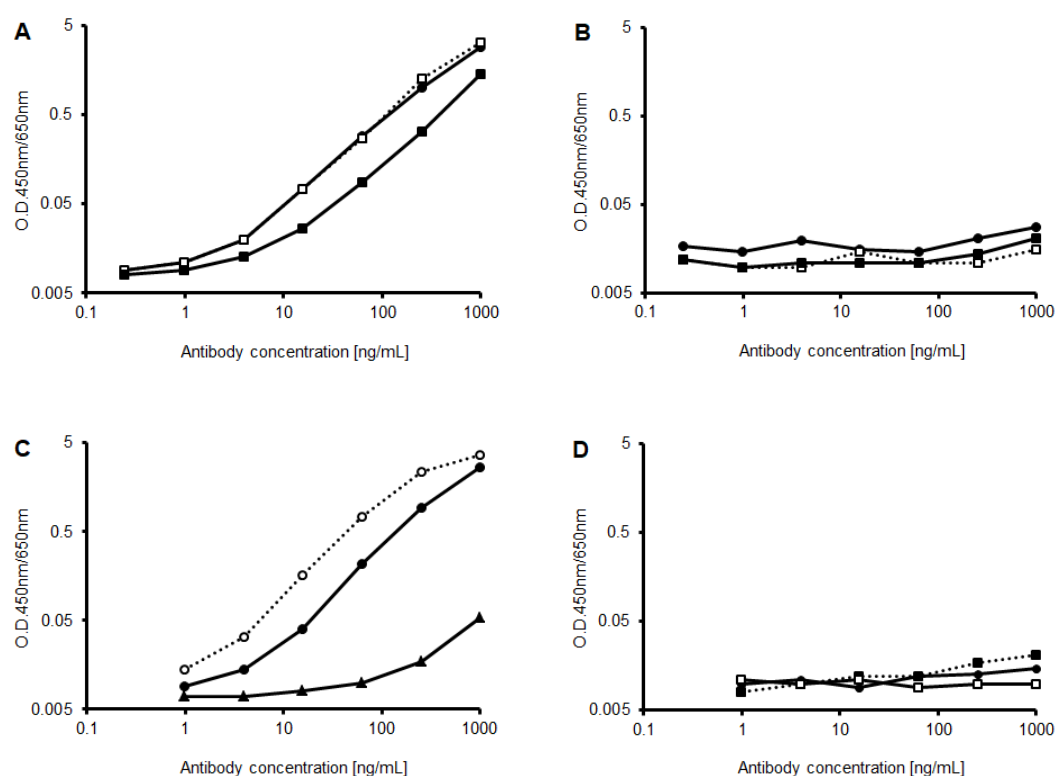


Fig.18 ヒト化 T24 の抗原ペプチドに対する反応性

A,C. RT24、または CT24 の抗原ペプチドに対する反応性を ELISA により評価した。横軸は抗体濃度、縦軸は吸光度を表す。●は CT24、□は RT24v1、■は RT24v2、○は RT24v3、▲は RT24v4 の反応性をそれぞれ示した。B, D. 陰性対照として、何も固相化しないプレートを用いて A, C と同様に ELISA を行った。凡例は A, C と同様である。

Table.5 RT24v2~RT24v4 の、RT24 とのアミノ酸の相違について

ver	VH	VL
RT24 (RT24v1)	—	—
RT24v2	A16S, R40A, T73K, A75T ⇒参考にした鋳型の変更に伴う	RT24v1 と同一
RT24v3	RT24v1 と同一	V2I, S7T, L15P, Q17E, Q37L, R39K ⇒参考にした鋳型の変更に伴う
RT24v4	R40A ⇒置換したアミノ酸を戻した	RT24v3 に加え、F36Y ⇒置換したアミノ酸を戻した

10	20	30	40	50	60
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTC					
Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V					
70	80	90	100	110	120
TCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACT	AGGTACTGGATAACCTGGGTGCGCCAGCGC				
S C K A S G Y T F T	R Y W I T W V R Q R				
	CDR-H1				
130	140	150	160	170	180
CCCGGACAAGGACTTGAGTGGATGGGA	GATATTTATCCTGGTAGTGGTAGAACTAATTAC				
P G Q G L E W M G	D I Y P G S G R T N Y				
	CDR-H2				
190	200	210	220	230	240
AATGAGAAGTTCAAGAACAGAGTCACCATTACCGTGGACACATCCGCGAGCACAGCCTAC					
N E K F K N R V T I T V D T S A S T A Y					
250	260	270	280	290	300
ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAATTACTAC					
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A N Y Y					
310	320	330	340	350	
GGTAGTACCTACTTCTATGTC	TGGGGGCAAGGGACACGGTCACCGTCTCCTCA				
G S T Y F Y V W G Q G T T V T V S S					
CDR-H3					

Fig.19-1 RT24 の VH 配列

10	20	30	40	50	60
GATGTTGTGATGACCCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCTTGGACAGCCGGCCTCC					
D V V M T Q S P L S L P V T L G Q P A S					
70	80	90	100	110	120
ATCTCCTGC	AGGTCTAGTAAGAGTCTCCTGTATAAGGACGGGAAGACATACTTGAATTGG				
I S C	R S S K S L L Y K D G K T Y L N W				
	CDR-L1				
130	140	150	160	170	180
TTTCAGCAGAGGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATT	TGTGATGTCACCCAGAGCA				
F Q Q R P G Q S P Q L L I Y L M S T R A					
	CDR-L2				
190	200	210	220	230	240
TCAAGGAGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTACGGCACTGATTCACACTGAAAATC					
S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I					
250	260	270	280	290	300
AGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAGTTTATTACTGC	CAGCAACTTGTGGAGTATCCT				
S R V E A E D V G V Y Y C	Q Q L V E Y P				
	CDR-L3				
310	320	330			
CGGACCTTCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAATCAAACGT					
R T F G G G T K V E I K R					

Fig.19-2 RT24 の VL 配列

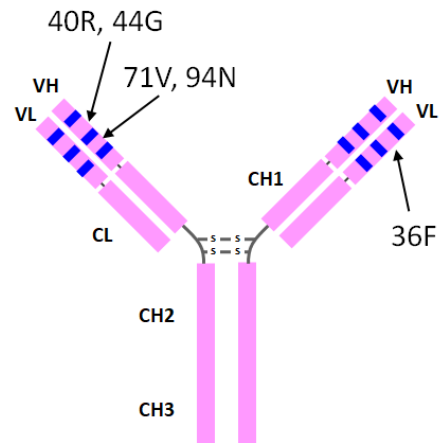


Fig.20 RT24 における、鋳型に対して最終的に置換した **FR** 由来のアミノ酸

図中の数字は Kabat Numbering<sup>[40]</sup>に従ったアミノ酸配列の順番を表し、その後のアルファベットは、移植した後のアミノ酸を表す。

## 第4節 考察

第2節では、T24のヒト化を行う上で、元のマウス抗体の分子モデルを作製し、CDRの立体構造を維持するために必要なアミノ酸の推察を行った。得られた情報を元に第3節でT24のヒト化を行った。その結果、T24と同等の結合活性を有するヒト化抗体RT24の創出に成功した。

今回評価を行った中で、元のマウス抗体由来の配列を置換したことによる影響が最も大きかったのは、VLの36Yである。この結果はRT24v1とRT24v3, RT24v4の結果を比較することで導かれる。RT24v3とRT24v4の違いはVHのR40A、およびVLのF36Yの2アミノ酸であり、いずれもRT24v4においてマウス抗体由来の配列から鑄型由来の配列に戻したことになる。2アミノ酸の違いにより、RT24v4の結合活性はRT24v3と比較して400倍程度低かった。このうち、VHの40Rについては、モデリングの結果からVH-VL間の相互作用に重要と推察され、当該変異については、別途R40A変異体での比較を行った。その結果、マウス抗体由来の配列から鑄型由来の配列に戻すことで、活性の低下が生じるものの、その程度はわずかであることを確認している。従って、RT24v4における劇的な活性低下は、VLのF36Y変異によるものであると考えられた。VLの36番目のアミノ酸部位は、第2節の結果から、VHとVL間の相互作用に重要なアミノ酸として抽出されている。一方で、フェニルアラニンとチロシンの違いは先端のヒドロキシル基のみであることから、フェニルアラニンがチロシンに置き換わることで、チロシンのヒドロキシル基がVHとVLの境界面に干渉し、その結果抗体の構造が変化し、抗原の結合能に大きく影響を与えたものと考えられた。以上の結果から、マウス抗体のヒト化を行う際に、CDR以外の残基を適切に置換することは非常に重要であり、また置換アミノ酸の推定を行うために、元のマウス抗体の立体構造モデルを作製することは有用であると考えられた。

また今回、ヒト化を行う際に、鑄型の選定も重要であると考えられた。RT24v1とRT24v2とではVHの鑄型が、RT24v1とRT24v3とではVLの鑄型がそれぞれ異なっている。いずれの鑄型も、第2節で得られた相互作用の情報を加味し、可能な限り相互作用が保たれる鑄型を選別したものの、RT24v2ではCT24よりも数倍活性は低く、逆にRT24v3ではCT24よりも数倍活性は高い結果となった。この結果は、ヒト化を行う際に、鑄型の選定が非常に重要であることを示唆している。

### 第3章 活性評価系の構築

#### 第1節 序

FAPを治療するための抗体医薬品として求められる特性として、抗体がTTRの線維化を抑える活性を有していることが必要である。そのため、第2章で得られたRT24が変異型TTRの線維化を抑制する活性を有しているかの評価を行うこととした。しかし、評価系を構築する上で大きな問題があった。線維化の抑制能を評価するためには、通常ヒト体内で何年もかけて進行するTTRの線維化を短時間で進める必要がある。しかし、短時間でTTRの線維化を進行させるためには、酸性条件下でTTRを静置する方法が一般的であったためである。一例として、組換えV30M TTRを酸性条件下（pH3.0またはpH4.4）で静置した時の、TTR線維の形成状況を示す（Fig.21）。

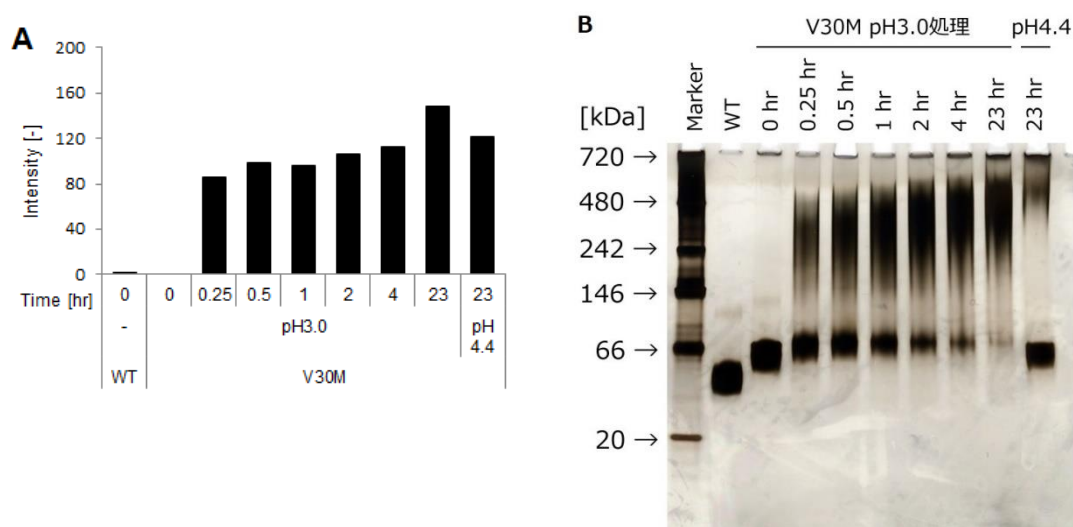


Fig.21 V30M TTR の経時的な線維化

組換え V30M TTR を 3 mg/mL になるように 10 mM リン酸バッファー (pH7.5) で希釈した後、0.2 M 酢酸バッファー (pH3.0 または pH4.4) -0.1 M NaCl と 1:1 で混合し、37°C で 0.25 から 23 時間インキュベートした。その際、全ての検体が同一時間に線維化が終了するよう、線維化開始の時間をずらした。線維化を行った検体を元に ThioflavinT assay、および Native-PAGE、銀染色を行い、V30M TTR の経時的な線維形成の程度を評価した。対照として、線維化を行っていない組換え WT TTR、および V30M TTR を同時に評価した。A. ThioflavinT assay。横軸は使用した TTR の種類、および線維化させた時間を表し、縦軸は ThioflavinT assay を行った時の蛍光強度を表す。B. 銀染色。線維化させた各サンプルを Native-PAGE で泳動し、銀染色によってタンパク質を可視化させた。縦軸は分子サイズを表す。

Thioflavin T assay は、分子間  $\beta$  シート構造に入り込むと蛍光を発する色素 ThioflavinT を用いたアッセイ法<sup>[41]</sup>で、励起光が 450 nm 付近、蛍光は 465~565 nm（最大は 482 nm）で、存在するアミロイド線維の量に応じた蛍光が観察される。TTR を酸性条件下で処理することで、V30M TTR の経時的な線維化が Native-PAGE で視認でき、また、ThioflavinT assay においても蛍光強度の増強が認められる (Fig.21) 。実際、ThioflavinT assay は FAP を治療するための低分子薬剤の活性評価に用いられている<sup>[42]</sup>。しかし、この系を抗体の活性評価に応用しようとした際、酸性環境下では抗体は変性するため、活性評価を行うことができなかった。我々は、これまでの検討により pH が 5.0 までは V30M TTR の線維化が緩やかに進行することを見出しているが、pH5.0 の環境においても長時間の反応で抗体は変性し、線維化抑制活性の評価を行うことはできていなかった。そのため、得られた抗体の TTR 線維化抑制能を評価できるようにするためには、中性条件下において短時間で線維化が進行する変異型 TTR、および線維化進行する条件を見出す必要があった。

本章では、第 2 章で得た RT24 の TTR 線維化抑制能を評価するためのアッセイ系を構築した結果について報告する。本章は以下の項目によって構成される。

#### 第 1 節 序（本節）

#### 第 2 節 中性条件下で線維化が進行する変異型 TTR のスクリーニング

#### 第 3 節 中性条件下で V30M TTR の線維化が進行する条件のスクリーニング

#### 第 4 節 考察

## 第 2 節 中性条件下で線維化が進行する変異型 TTR のスクリーニング

初めに、中性条件下においても短時間で線維化が進行する変異型 TTR の探索を試みた。スクリーニングを行う変異型を選定するにあたり、実際に患者報告がなされている変異体の中から以下の 5 種類を選択した。

Asp18Gly (D18G) 変異 : 軽症型で、髄膜・脳に沈着し、中枢神経障害を起こす。

Ala25Thr (A25T) 変異 : 軽症型で、髄膜・脳に沈着し、中枢神経障害を起こす。

Glu54Lys (E54K) 変異 : 劇症型で、野生型と比較して T4 結合部が小さくなる。

Leu55Pro (L55P) 変異 : 劇症型で、ハイブリッド四量体の形成を促進。

Tyr116Ser (Y116S) 変異 : 野生型よりも四量体構造は不安定になる。

WT TTR 発現ベクターを元にアッセンブリーPCRによって変異を導入し、5 種の変異型 TTR 発現ベクターを構築した。変異型 TTR 発現ベクターを大腸菌 M15 に導入して組換え TTR を発現させたのち、可溶性画分をニッケルカラム精製し、更にゲルろ過精製を行って組換え変異型 TTR 精製品を調製した。上記 5 種の変異型 TTR 精製品を PBS または PBST で希釈し、37°C で静置した。0, 2.5, 4, 7, 24 時間後に Thioflavin T assay により TTR 線維形成の程度を評価したところ、D18G 変異、A25T 変異は中性条件下で線維化が進行することが分かった (Fig.22A)。中でも、D18G 変異を PBST 環境下で静置することで、最もバランスよく Thioflavin T の蛍光強度が上昇することが分かった (Fig.22B)。一方で、A25T 変異は、4°C の静置保存によっても短時間で線維化が進行する現象が認められたため、試験系の構築は行えないと判断し、評価を中断した。

そこで、PBST 環境下で D18G 変異体を静置させたときの TTR 線維の形成を ThioflavinT assay および Native-PAGE によって評価した (Fig.23)。その結果、ThioflavinT assay では経時的な蛍光強度の上昇が認められた一方、Native-PAGE では 8 時間静置以後の TTR 線維形成量の増加は認められず、ThioflavinT assay と Native-PAGE の結果は相関しなかった (Fig.23B)。原因がつかめなかったことから、D18G 変異体を用いた評価系の構築は断念した。



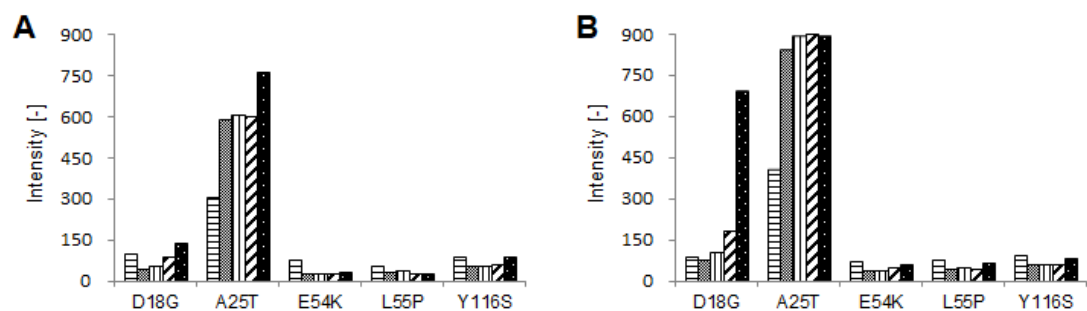


Fig.22 変異型 TTR の線維化検討

各変異型 TTR を 37°C で静置した時の線維形成の程度を ThioflavinT assay で評価した。横軸は各変異型 TTR の名称、縦軸は蛍光強度を表す。棒グラフ中の内の は静置直後 (0 hr)、 は 2.5 時間経過後、 は 4 時間経過後、 は 7 時間経過後、 は 24 時間経過後の蛍光強度を表す。A. PBS 環境下、B. PBST 環境下での結果。

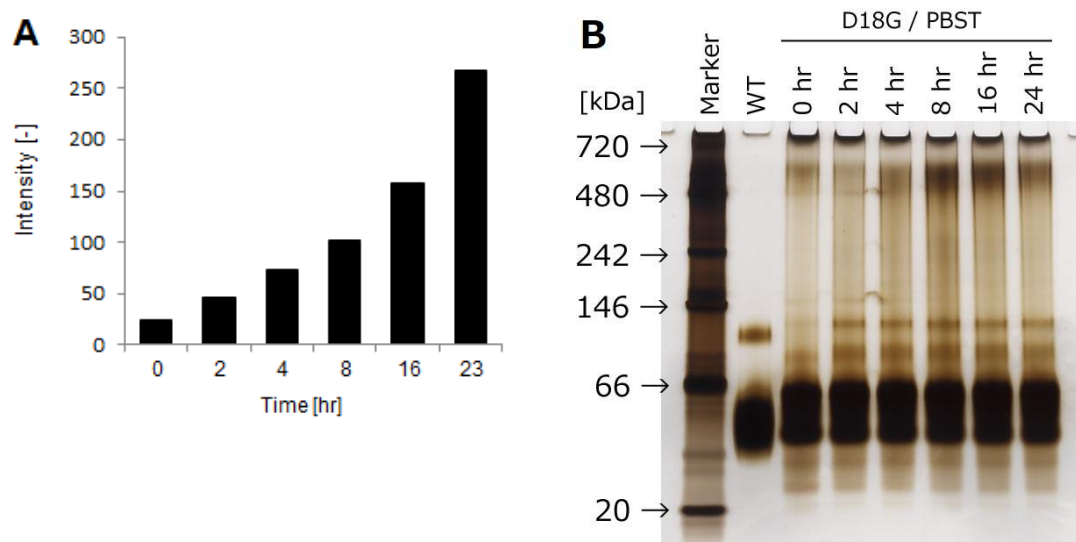


Fig.23 D18G 変異型 TTR の線維化検討

D18G 変異型 TTR を 37°C で静置した時の経時的な線維形成の程度を ThioflavinT assay、および Native-PAGE で評価した。対照として、線維化を行っていない組換え WT TTR 四量体を用いた。A. ThioflavinT assay。横軸は線維化を開始してから経過した時間を表し、縦軸は ThioflavinT assay を行った時の蛍光強度を表す。B. 銀染色。線維化させた各サンプルを Native-PAGE で泳動し、銀染色によってタンパク質を可視化させた。縦軸は分子サイズを表す。

### 第3節 中性条件下で V30M TTR の線維化が進行する条件のスクリーニング

次に、ターゲットを V30M TTR に絞り、中性条件下で V30M TTR の線維化が短時間で進行する条件の探索を試みた。タンパク質の構造変化と界面活性剤との間には密接な関連があることは良く知られており、例えばタンパク質の立体構造を破壊させるために、界面活性剤である SDS が一般的に用いられている。四量体を形成している TTR の構造を緩ませ、単量体に解離させやすくすることができれば、中性条件下での短時間の線維化が期待できると考えた。そこで、性質の異なる複数の界面活性剤が V30M TTR の線維化に及ぼす影響を検討した。

カチオン系、アニオン系、両性、非イオン系の界面活性剤を含む PBS と V30M TTR とをを混合し、37℃で 4 日間静置した後、線維形成の程度を ThioflavinT assay で評価した (Fig.24) 。その際、カチオン系の界面活性剤として塩化ベンザルコニウムを、アニオン系の界面活性剤としてデオキシコール酸ナトリウムを、両性界面活性剤として Zwittergent3-16 を、非イオン系の界面活性剤として NP-40 をそれぞれ用いた。

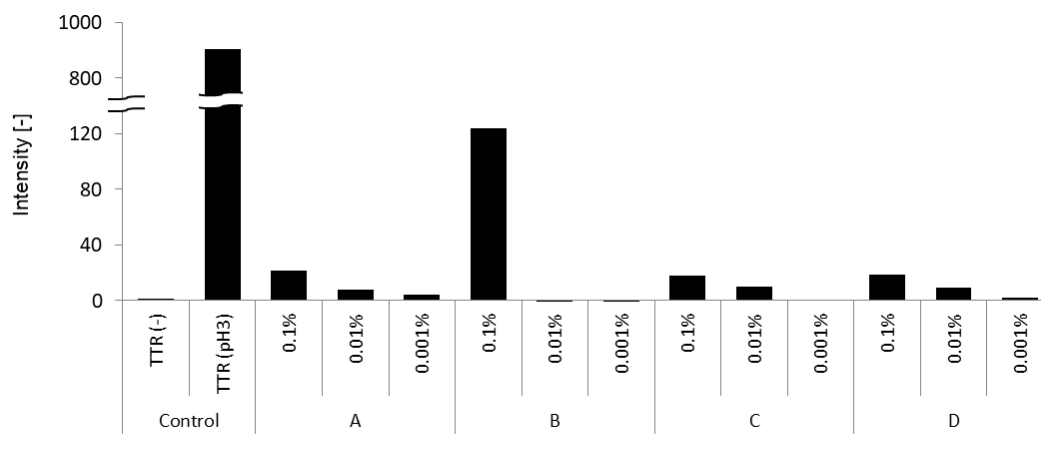


Fig.24 界面活性剤を使用した時の V30M TTR の線維形成

組換え V30M TTR と界面活性剤を PBS 下で混合し、37℃で 4 日間静置した時の線維形成の程度を ThioflavinT assay で評価した。横軸は使用した界面活性剤の濃度、および使用した TTR の名称、縦軸は蛍光強度を表す。control として設定した TTR (-) は V30M TTR を添加せずに反応させた検体、TTR (pH3.0) は V30M TTR を酸性条件下で反応させた検体、A は塩化ベンザルコニウム、B はデオキシコール酸ナトリウム、C は Zwittergent3-16、D は NP-40 をそれぞれ用いた時の結果を示した。

その結果、デオキシコール酸ナトリウムを添加した群において、ThioflavinT の蛍光強度

の上昇が認められ、V30M TTR の線維化が進行していると考えられた。そこで、デオキシコール酸ナトリウムの至適濃度、および至適条件の検討を行った。

V30M TTR とデオキシコール酸ナトリウムを、デオキシコール酸ナトリウムの終濃度が 0.05%～1% になるように PBS で希釈混合して 37℃で 1 週間静置し、1 日目、4 日目、7 日目に ThioflavinT assay を行い、V30M TTR 線維形成の程度を評価した (Fig.25)。また、7 日目の反応液を Native-PAGE で泳動し、銀染色、および抗 TTR ポリクローナル抗体 (Dako) で Western Blot を行った (Fig.26)。

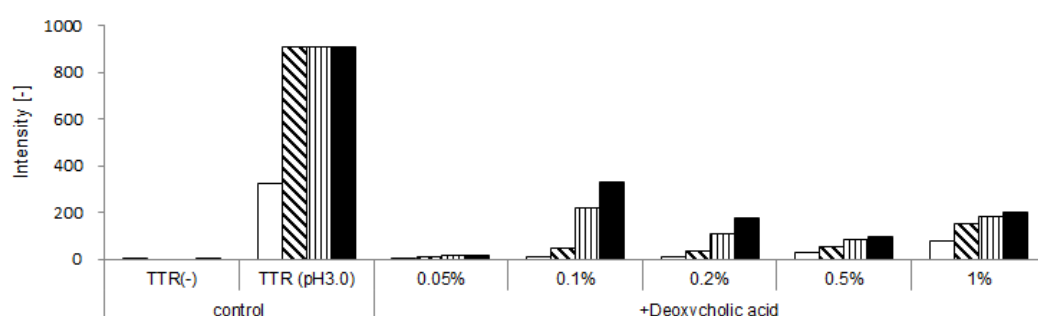


Fig.25 デオキシコール酸ナトリウムの至適濃度の検討

組換え V30M TTR とデオキシコール酸ナトリウム/PBS を混合し、37℃で静置した時の線維形成の程度を ThioflavinT assay で評価した。横軸は使用した界面活性剤の濃度、および使用した TTR の名称、縦軸は蛍光強度を表す。control として設定した TTR(-) は V30M TTR を添加せずに反応させた検体、TTR (pH3.0) は V30M TTR を酸性条件下で反応させた検体を表す。棒グラフ中の内の□は静置直後 (0 hr)、▨は 1 日経過後、▤は 4 日経過後、■は 7 日間経過後の蛍光強度を示した。

その結果、デオキシコール酸ナトリウムの終濃度が 0.1% の時に ThioflavinT の蛍光強度が最も強くなり、また静置時間を長くすることで蛍光強度が上昇することが分かった。一方で、銀染色、および Western Blot の結果、デオキシコール酸ナトリウムの終濃度が 0.1% を超えた時に V30M TTR 線維の形成が認められ、線維形成の量は終濃度が 0.2% の時が最も多く、終濃度が 0.2% を上回ると線維形成が視認できないことが分かった。以上の結果から、中性条件下で V30M TTR の線維形成を短時間で行える条件を見出すことに成功したと考えられた。

なお、V30M TTR の線維化抑制試験を構築する際の評価は Thioflavin T assay で行うこと、デオキシコール酸ナトリウムの終濃度が 0.1% であっても V30M TTR 線維の形成は認められることから、実際に線維化抑制試験を行う際の条件として、デオキシコール酸ナトリウムを終濃度で 0.1% 含む PBS 環境下で、V30M TTR を 37℃で静置させることとした。

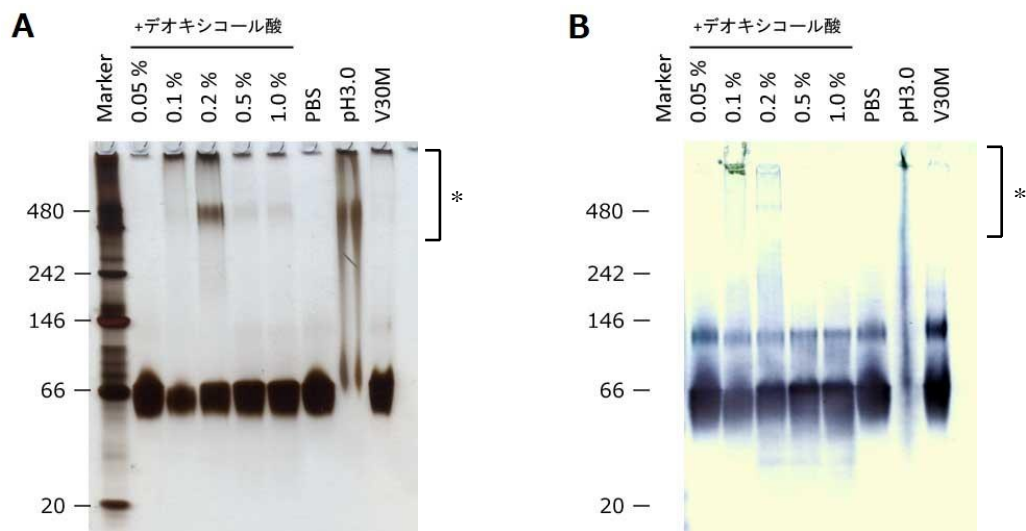


Fig.26 デオキシコール酸ナトリウムの至適濃度の検討

組換え V30M TTR とデオキシコール酸ナトリウム/PBS を混合し、37°Cで7日間静置した時の線維形成の程度を Native-PAGE、および Western Blot で評価した。横軸は使用した界面活性剤の濃度、および使用した TTR の名称、縦軸は分子量を表す。横軸の PBS は V30M TTR を PBS 下で反応させた検体、pH3.0 は V30M TTR を酸性条件下で反応させた検体、V30M は V30M TTR の反応前の検体をそれぞれ表す。また、線維形成の判断に用いた高分子領域を図中の\*に示した。A. 銀染色。線維化させた各サンプルを Native-PAGE で泳動し、銀染色によってタンパク質を可視化させた。B. Western Blot。Native-PAGE で泳動した後に、抗 TTR ポリクローナル抗体 (Dako) で Western Blot を行った。

## 第4節 考察

今回、中性条件下で **V30M TTR** の線維化を進行させるため、性質の異なる界面活性剤を用いたスクリーニングを実施し、デオキシコール酸ナトリウムが有効であることを初めて見出した。タンパク質の変性に界面活性剤が作用する際、イオン系の界面活性剤によってタンパク質分子内の水素結合が切断される作用が知られている。一方で、デオキシコール酸ナトリウムはイオン系界面活性剤の中でもマイルドであり、非変性的な界面活性剤として一般的に用いられている。以上の事実から、デオキシコール酸ナトリウムが **V30M TTR** の線維化に有効であった理由として、マイルドなイオン系界面活性剤であるデオキシコール酸ナトリウムが **V30M TTR** に対して緩やかに作用し、四量体から単量体への解離が進んだためと考察した。

**TTR** が四量体を形成する際、単量体同士が主に水素結合により会合しており、形成された二量体同士は主に水素結合と疎水相互作用により会合していることが明らかにされている<sup>[11]</sup>。イオン系界面活性剤であるデオキシコール酸ナトリウムが、野生型よりも四量体構造が不安定化している **V30M TTR** の分子間水素結合に作用し、その結果、四量体の一部が単量体に解離し、**TTR** の線維形成が進行したと考えられる。

また今回、デオキシコール酸ナトリウムの至適濃度は 0.1%～0.2%であったものの、この間の濃度において **Thioflavin T assay** による蛍光強度と、**Native-PAGE**、および抗 **TTR** ポリクローナル抗体を用いた **Western Blot** の挙動が一致しなかった。その理由として、デオキシコール酸ナトリウムの濃度が高くなることで、形成された **TTR** 線維に **ThioflavinT** が入り込むのを阻害し、見かけ上蛍光強度が低く算出されてしまった可能性が考えられた。更に、デオキシコール酸ナトリウムの臨界ミセル濃度は 0.2%前後であるため、終濃度が 0.2%を超えることで、一部単量体に解離した **TTR** の状態で安定化され、線維形成が伸長しなかった可能性が考えられた。

今回、**FAP** 患者として最も多い **V30M** 変異に焦点を当てて、中性条件下で線維化の進行する条件の探索を行ったが、今回見出した線維化の条件が **WT TTR** や他の変異型 **TTR** に対しても有効かどうかの評価は行えていない。デオキシコール酸ナトリウムの作用により、**TTR** の四量体構造の解離が期待できることから、条件の最適化により、他の変異型 **TTR** が中性環境下で線維化する条件や、**WT TTR** では線維化しないが、**V30M TTR** は線維化が進行するような条件の探索が可能かもしれない。今後の課題である。

## 第4章 臨床応用に向けた評価

### 第1節 序

これまで、第1章では、ヒト TTR の 115-124 番目のアミノ酸を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体 T24 を創出し、T24 は健常人や V30M FAP 患者由来の血清を認識しない一方、V30M FAP 患者の心臓や腎臓に沈着したアミロイドを特異的に認識する特性を有することを明らかにしてきた。そして、第2章では、T24 抗体のヒトへの投与を目指してマウス抗体のヒト化を行い、T24 抗体と同等の結合活性を有するヒト化抗体 RT24 の創出に成功した。そして第3章で、V30M TTR の線維化抑制試験系の構築を行った。そこで最後に、我々が創出した RT24 が FAP の治療用抗体医薬品として必要な特性を有しているか、臨床応用に向けた評価を行った。

FAP 治療用の抗体医薬品として望まれる特性として序論で挙げた各項目に対して、それぞれ以下の評価を実施した (Fig.27)。本章は、以下の項目により構成される。なお、考察については後の章に改めて記載することとする。

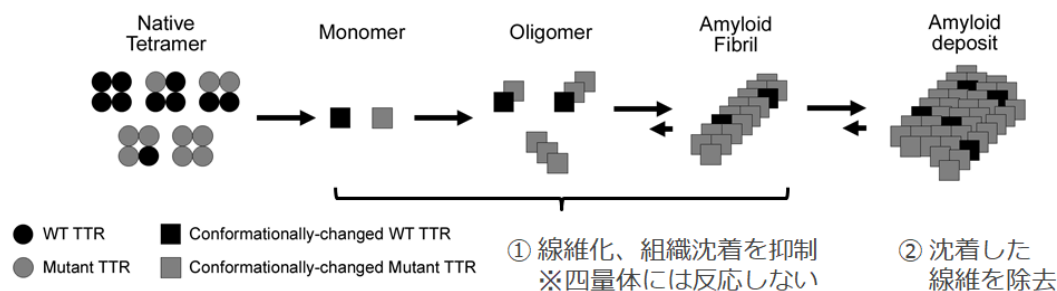


Fig.27 FAP 治療用の抗体医薬品として望まれる特性

- |                       |     |                      |
|-----------------------|-----|----------------------|
| ① 四量体の TTR に反応しないこと：  | 第2節 | Biacore を用いた反応特異性の評価 |
| V30M TTR の線維化を抑制すること： | 第3節 | V30M TTR の線維化抑制試験    |
| TTR の組織沈着を抑制すること：     | 第4節 | FAP 疾患モデル動物を用いた評価    |
| ② TTR 線維に結合すること：      | 第5節 | 変異型 TTR 線維に対する反応性解析  |
| 沈着した TTR 線維を除去すること：   | 第6節 | マクロファージ貪食能活性評価試験     |

## 第2節 Biacore を用いた反応特異性の評価

血中で RT24 が有効に機能するためには、血中で四量体 TTR を認識せずに、構造が変化した TTR や線維化が進行した TTR を認識する特性を有していることが望ましい。そこで、より血中に近い環境を再現するため、Biacore2000 (GE Healthcare) を用いた反応特異性の評価を行った。組換え TTR 四量体 (WT または V30M 変異体)、および酸処理によって人為的に線維化させた組換え TTR (WT または V30M 変異体) を、四量体が解離しないよう、pH6.0 の環境下で CM5 sensorchip に固相化し、RT24 またはアイソタイプコントロール抗体を 2 分間泳動し、シグナルの挙動を観察した (Fig.28)。その結果、RT24 は、WT、V30M 変異型の TTR 四量体に対するシグナルは認められず、線維化した TTR に対する特異的なシグナルが認められた。アイソタイプコントロール抗体については、いずれも TTR に対するシグナルは認められなかった。

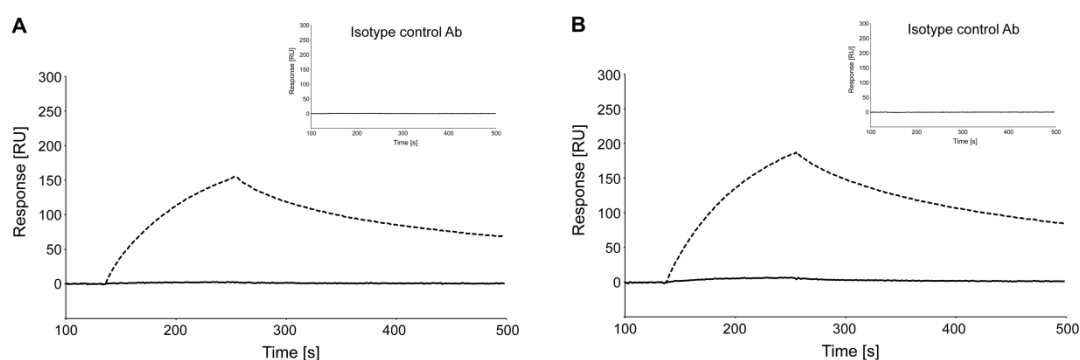


Fig.28 Biacore による反応特異性の解析

RT24 の WT TTR 四量体、V30M TTR 四量体、WT TTR 線維、および V30M TTR 線維に対する反応性を Biacore で解析した。横軸はセンサーグラムに泳動を開始してから時間、縦軸はレスポンスの強度を表す。図上の直線は TTR 四量体、破線は酸処理 (pH3.0) により人為的に線維化させた TTR を固相したセンサーチップに RT24 を泳動した時のシグナルを表す。右上は、対照としてアイソタイプコントロール抗体を泳動した時の結果を表す。A. 組換え WT TTR 四量体または線維、B.V30M TTR 四量体または線維に対する反応性を示した。

### 第3節 V30M TTR の線維化抑制試験

次に、血中で線維化が伸長する過程の TTR に対して RT24 が有効に機能するためには、TTR の線維化を抑制する活性を有していることが望ましい。そこで、第3章で構築した中性条件下における V30M TTR の線維形成条件を用いた線維化抑制試験を行った。

終濃度で 0.1% のデオキシコール酸ナトリウムを含む PBS 環境下において、組換え V30M TTR と RT24 またはアイソタイプコントロール抗体を 10  $\mu$ M: 0.01  $\mu$ M~10  $\mu$ M: 2  $\mu$ M の濃度で混合し、37°C で 3 日間静置した。静置後の反応液を用いて ThioflavinT assay を行ったところ、RT24 の濃度上昇に伴って ThioflavinT の蛍光強度は低下し、V30M TTR 線維形成が抑制されていた (Fig.29)。アイソタイプコントロール抗体は、V30M TTR 線維形成に影響を与えなかった。以上の結果から、RT24 は濃度依存的に V30M TTR の線維形成を抑制する活性を有していると考えられた。

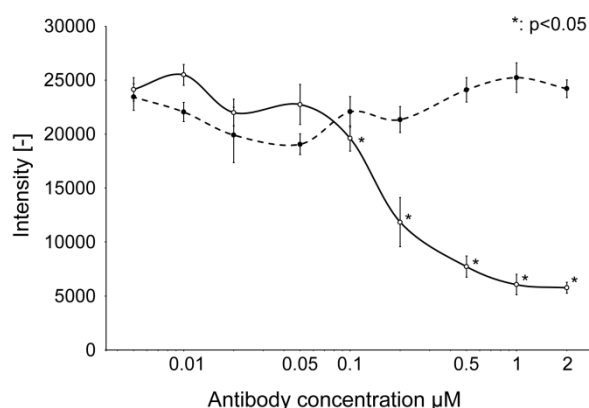


Fig.29 V30M TTR の線維化抑制試験

RT24 の V30MTTR 線維化抑制活性を ThioflavinT assay により評価した。横軸は抗体濃度、縦軸は ThioflavinT の蛍光強度を表す。直線は RT24, 点線はアイソタイプコントロール抗体の結果を表す。各々の抗体濃度について n=3 で測定後、平均値を測定結果として表示し、標準偏差をエラーバーで表示した。



## 第4節 FAP 疾患モデル動物を用いた投与試験

続いて、血中で線維化した TTR の組織への沈着を RT24 が抑制する活性を有しているか明らかにするため、FAP 疾患モデル動物への投与試験を行った。今回、疾患モデルとして V30M TTR トランスジェニックラット<sup>[35]</sup>を用いた。ヒト V30M TTR 遺伝子上流にラットのアルブミンプロモーター/エンハンサー配列を接続した配列が DA/Slc ラットに導入されたモデルで、10~24 箇月齢の大腸筋層部に TTR の沈着が認められる。そこで今回、TTR が沈着する前である 3 箇月齢のトランスジェニックラットに対して、6 箇月間にわたって抗体を投与し、TTR の組織への沈着抑制能を評価することとした。なお、投与期間が 6 箇月間と長期にわたるため、ラットに対する免疫原性を考慮し、投与の際は RT24 ではなく、よりラット抗体の配列に近い T24 を使用することとした（なお、ラット IgG1κ の定常領域における相同性は、マウス IgG1κ で 80%程度、ヒト IgG1κ で 64%程度である）。

### 1. T24 のラット薬物動態試験

トランスジェニックラットへの適切な投与間隔を設定するため、DA/Slc ラットに T24 を投与した時の薬物動態試験を行い、血中半減期を算出することとした。3 匹の DA/Slc ラットに T24 を 10mg/kg で単回投与（静脈注射）し、経時的に採血して血中濃度の推移をモニタリングした。得られた血中濃度を元に、automated pharmacokinetic analysis system（以下、「APAS<sup>[43]</sup>」）を用いて消失速度定数を算出し、β相（消失相）の半減期を算出した（Fig.30）。その結果、T24 の血中半減期は 7.9~9.2 日と、1 週間程度であることが分かった。よって、ラットへの投与間隔は 1 週間毎で問題はないと判断した。

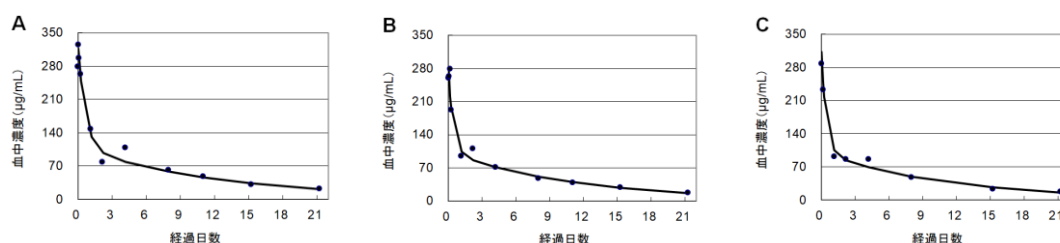


Fig.30 T24 の薬物動態試験

FAP 疾患モデルと同一の野生ラットに T24 を投与し、ラット血中の T24 濃度を ELISA により定量した。A, B, C は各個体への投与結果を表し、横軸は投与後の経過日数、縦軸は T24 の血中濃度を表す。黒点は血中濃度の実測値を、黒線は APAS で解析後の補正濃度を表す。

## 2. 投与試験

続いて、3 箇月齢の V30M トランスジェニックラットに週 1 回、26 週間（6 箇月）にわたって T24 あるいは PBS を投与し、ラットから大腸組織を摘出した。組織切片を作製して抗 TTR ポリクローナル抗体 (Dako) で免疫染色を行い、大腸筋層内の TTR 沈着量を数値化した。その結果、T24 投与群の免疫染色像において、PBS 投与群の免疫染色像と比較して、大腸筋層における TTR 沈着量は少ない傾向が認められた (Fig.31A, B)。両投与群における TTR 沈着量を比較した結果、統計的有意差は認められなかったものの、PBS 投与群と比較して、T24 投与群では TTR 沈着量が抑制される傾向が認められた (Fig.31C)。以上の結果から、T24 は TTR 線維の組織への沈着を抑制する可能性が示唆された。

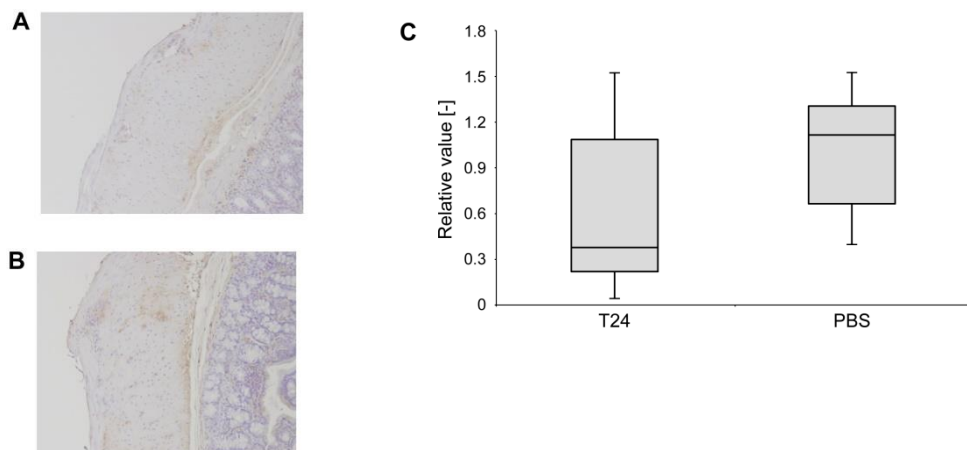


Table.6-1 T24 投与群における生化学的データ

		Pre	8 weeks	16 weeks	26 weeks
CRE (mg/mL)	Mean	0.271	0.295	0.307	0.308
	SD	0.0303	0.0263	0.0164	0.0198
TP (g/dL)	Mean	6.05	6.16	6.30	5.77
	SD	0.239	0.181	0.152	0.326
AMY (IU/L)	Mean	2100	2334	2268	2043
	SD	292	251	305	208
TTR (mg/dL)	Mean	18.4	12.4	17.3	15.8
	SD	3.30	5.17	1.74	2.05
ALB (g/dL)	Mean	0.985	0.980	1.02	0.920
	SD	0.0532	0.0784	0.0403	0.0568
SAA (ng/mL)	Mean	0.194	0.0400	0.219	0.106
	SD	0.113	0.113	0.138	0.104

Table.6-2 PBS 投与群における生化学的データ

		Pre	8wks	16wks	26wks
CRE (mg/mL)	Mean	0.273	0.286	0.295	0.263
	SD	0.0321	0.0280	0.0156	0.0243
TP (g/dL)	Mean	6.01	6.20	6.23	5.78
	SD	0.265	0.101	0.206	0.229
AMY (IU/L)	Mean	2135	2328	2094	1915
	SD	274	142	134	128
TTR (mg/dL)	Mean	17.3	13.6	16.3	14.3
	SD	2.81	4.10	1.40	1.08
ALB (g/dL)	Mean	1	1	0.991	0.901
	SD	0.0490	0.0500	0.0470	0.0300
SAA (ng/mL)	Mean	0.126	0.0788	0.181	0.236
	SD	0.108	0.144	0.191	0.147

FAP 疾患モデルラットへの投与前、投与期間中、投与後に採取した血清を検体として、クレアチニン濃度 (CRE)、総タンパク質濃度 (TP)、アミラーゼ濃度 (AMY)、TTR 濃度 (TTR)、アルブミン濃度 (ALB)、血清アミロイド A 濃度 (SAA) の測定を行った。測定結果について、投与群内の平均値 (Mean)、および標準偏差 (SD) を示した。横軸の Pre は投与前、8wks、16wks はそれぞれ投与開始から 8 週間、16 週間経過後、26wks は投与終了後の測定値をそれぞれ表す。

## 第 5 節 変異型 TTR 線維に対する反応性解析

これまで、第 1 章、および第 4 章第 2 節において、T24、または RT24 が TTR 線維を特異的に認識することを示してきたが、これらは WT、または V30M TTR を使用している。V30M 変異以外の点変異を有する FAP 患者に対して RT24 が効果を示すことができれば、RT24 は更に有用な薬剤になることが期待できる。そこで、これまでに患者報告がなされている変異型 TTR 由来の TTR 線維に対する反応性を検証した。患者報告がなされている変異型 TTR のうち、D18G 変異、V30M 変異、E54K 変異、L55P 変異、Y114C 変異、Y116S 変異、V122I 変異を選択し、組換え TTR 精製品を調製した。組換え TTR 精製品を酸処理 (pH3.0) によって人為的に線維化したものを検体として Native-PAGE を行った。コントロールとして、WT TTR (四量体、および人為的に線維化させたもの) を合わせて泳動した。RT24 で Western Blot を行ったところ、今回評価した全ての TTR 線維に対する反応が認められ、一方で WT TTR 四量体に対する反応は認められなかった (Fig.32)。また、線維を構成する TTR 変異体によって、その反応性に違いが認められた。

以上の結果から、RT24 は、患者報告がなされている複数の変異型 TTR 線維を認識することが明らかになった。

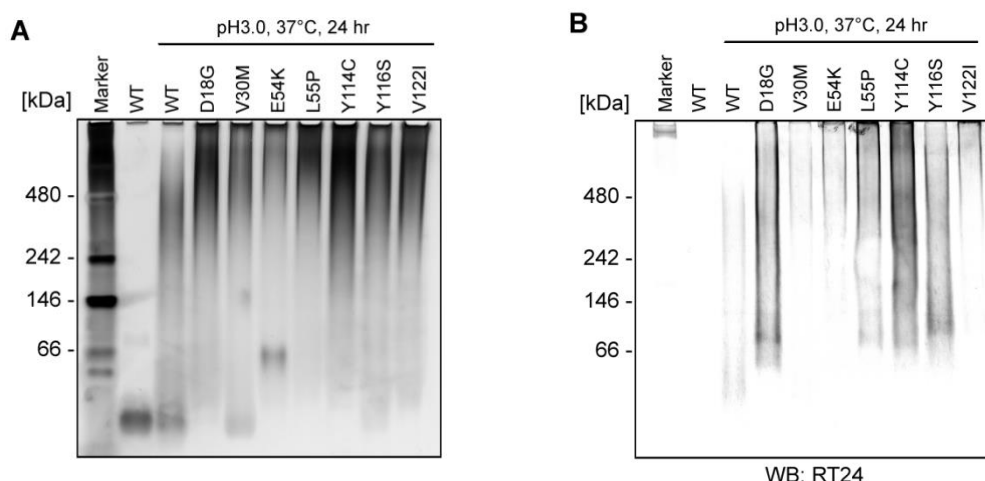


Fig.32 患者報告のなされている変異型 TTR 線維に対する反応性解析

RT24 の、酸性条件下で線維化させた様々な変異型 TTR に対する反応性を Western Blot で検証した。横軸は評価した変異型 TTR の名称、縦軸は分子量を表す。control として、WT TTR 四量体を用いた。A. 銀染色。線維化させた各サンプルを Native-PAGE で泳動し、銀染色によってタンパク質を可視化させた。B. Western Blot。Native-PAGE で泳動した後に、RT24 で Western Blot を行った。

## 第 6 節 マクロファージ貪食活性評価試験

組織に沈着した TTR アミロイドを除去する特性を RT24 が有しているかを評価するため、マクロファージ貪食活性評価試験を行った。この手法は、TTR が沈着した臓器に RT24 が結合することで、オプソニン化により、マクロファージによる TTR 貪食能が亢進されるかどうかを *in vitro* で模倣するために構築した試験法である。

iPS 細胞から誘導したマクロファージに RT24、および組換え TTR（人為的に線維化させた V30M TTR 線維、または WT TTR 四量体）を添加して 37°C で 3 日間静置した後、液中の TTR の残量を ELISA で定量化し、抗体非添加群に対する相対量で表した (Fig.33)。その結果、RT24 の添加群において、非添加群と比較して統計的に有意な V30M TTR 線維量の減少が認められた (Fig.33A)。一方で、WT TTR 四量体の量に有意な変化は認められなかった (Fig.33B)。

以上の結果から、RT24 は、V30M TTR 線維特異的にマクロファージの貪食能を促進する活性を有していると考えられた。

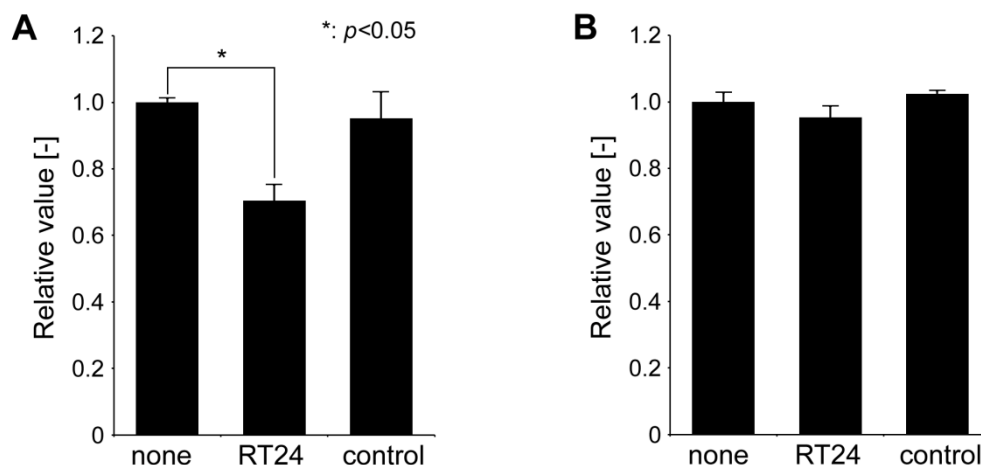


Fig.33 マクロファージ貪食活性評価試験

RT24 と TTR、マクロファージを混合し、37°C で静置した時の残存 TTR 線維量を ELISA で評価した。横軸は添加した抗体の名称、縦軸は抗体非添加群の TTR 残量を 1 としたときの相対値を表す。各群において  $n=3$  で測定後、平均値を測定値として表示し、標準偏差をエラーバーで表記した。A. 人為的に線維化させた V30M TTR を添加した群、B. WT TTR 四量体を添加した群の結果をそれぞれ示した。

## 考察

我々は、TTR の cryptic epitope を特異的に認識する抗体が FAP の新規治療薬になりうるというコンセプトのもと、TTR115-124 部位を認識するモノクローナル抗体の作製を行った。その結果、四量体構造の TTR を認識せず、四量体構造から解離した後の TTR を特異的に認識するヒト化抗体 RT24 の創出に至った。

創出した抗体の大きな特性として、1 点目に抗体濃度依存的に V30M TTR の線維化を抑制する活性を有していたことが挙げられる (Fig.29)。この活性は TTR の組織への沈着を防ぐ上で非常に重要である。2 点目に、RT24 はマクロファージによる TTR 線維貪食能を促進する活性を有していた (Fig.33)。この活性は、組織に沈着した TTR アミロイドの除去に有効であると考えられる。3 点目に、T24 は V30M FAP 患者の血清を認識せずに、V30M FAP 患者から抽出した TTR アミロイドを特異的に認識していた (Fig.11)。この特性により、血管内へ投与した際に、より効果的に機能し、更に副作用の軽減も期待される。最後に、T24 は FAP 疾患モデルラットにおいて、組織への TTR 沈着を抑制する傾向を示した (Fig.31)。また、投与開始時点から投与終了時点まで血中の生化学的マーカーに異常は認められなかった (Table.6) ことから、T24 は長期投与を行っても安全であると推定された。これらの事実はいずれも、FAP 治療薬として考えたときに非常に望ましい特性であると考えられる。

一方で、FAP 疾患モデルラットを用いた投与試験において、T24 投与群と PBS 投与群との間でラット大腸筋層中の TTR 沈着量に差は見られたものの、統計的に有意な差ではなかった (Fig.31C)。この原因としては 2 つ考えられる。1 点目として、疾患モデルラットにおける TTR 沈着量の個体間差が考えられる。生後 3~9 ヶ月齢にかけて、TTR 沈着量は増大するものの、その増え方には個体差がかなり大きい (共同研究先による未発表データ)。そのため、T24 による TTR 沈着抑制効果が、TTR 沈着量の個体間差によってマスクされている可能性が考えられた。2 点目として、疾患モデルラットには、遺伝子導入したヒト V30M TTR のほか、ラット由来の野生型 TTR の沈着が起きており、T24 投与群においてラット由来の TTR に邪魔されて薬効を発揮できにくかった可能性が考えられる。その根拠として、野生型の DA/Slc ラットの組織を抗 TTR ポリクローナル抗体で免疫染色した結果、特異的な染色が確認されている (共同研究先による未発表データ)。その際に用いた抗 TTR ポリクローナル抗体は、ヒト TTR への反応性に比べてラット TTR への反応性はかなり弱いも

のを使用している。このような反応性の違いがありながら、ラット組織において特異的な染色が確認されるということは、疾患モデルの組織にかなりの量のラット由来 TTR が沈着している可能性が考えられた。T24 の薬効を適切に評価するためには、今後は FAP 疾患モデルマウス等、異なる疾患モデルを用いた評価が必要と考える。

我々と同様なコンセプトに基づく抗 TTR 抗体の研究は、Goldsteins ら<sup>[29]</sup>や、Phay ら<sup>[44]</sup>、Higaki<sup>[45]</sup>らのグループによっても報告されている。Goldsteins らは、構造変化を起こした TTR に特異的なマウスモノクローナル抗体 mAb 39-44 および mAb 56-61 を作製したこと、これらが生体由来の V30M 変異体のアミロイドを認識したことを報告している。しかし、これらはアミロイド形成に対して阻害作用を示さなかったことが明記されており、FAP の診断に利用できる可能性について言及されているのみである。一方で、Phay らは Y78F TTR 変異体を抗原としたマウスモノクローナル抗体 2T5C9 を作製し、FAP 患者由来の TTR アミロイドを特異的に認識することを ELISA や免疫組織化学的染色により報告している（なお、エピトープは明らかにされていない）。しかし、当抗体の生物活性に関する報告は無く、やはり FAP の診断への可能性について言及されているのみである。Higaki らは、我々と同様のコンセプトで構造変化を起こした TTR に対するモノクローナル抗体を創出し、構造変化を起こした TTR にのみ反応すること、マクロファージの貪食能亢進活性を有していること、V122I 変異型 TTR の線維化を *in vitro* で抑制することを報告している。しかし、V122I 変異型 TTR の線維化阻害試験系が pH4.5~4.8 の酸性条件下で組まれていることから、候補抗体への影響（変性など）の面で懸念が残る。また、V30M TTR に対する線維化抑制能の有無や、疾患モデル動物を用いた評価については報告がなされておらず、その薬効は不明である。

このように、*in vitro*、および *in vivo* の両方で生物活性を示し、かつ様々な異型 TTR 由来アミロイドを認識し、更にヒトへの投与に適した抗体の報告はこれまでなされていない。一方、RT24 は *in vivo* 試験において TTR の沈着を押さえ、また *in vitro* 試験において沈着した TTR に対してマクロファージを介して除去する効果を有することが示唆されている。異型 TTR の蓄積抑制のみならず、沈着したアミロイドの除去作用も期待されることから、新規の FAP 治療薬になると期待される。

現在、アミロイドーシスに対する抗体医薬品の開発は活発になされている。その中で、アルツハイマー型認知症を例にとると、脳内に沈着した A $\beta$  アミロイドを除去しても病態の改善にはつながらないことが報告されており、毒性の本体は A $\beta$  アミロイドではなく A $\beta$

オリゴマーではないかと考えられている<sup>[46]</sup>。しかし、TTR アミロイドーシスの場合、肝移植によって変異型 TTR を除去しても病態は進行し、症状が増悪する例が少なくない<sup>[24][25]</sup>。つまり、同じアミロイドーシスであっても、アルツハイマー型認知症と FAP とでは沈着したアミロイドが臓器に及ぼす影響は異なる可能性が考えられる。よって、上述した活性は FAP 治療薬として望ましい特性であると考えられる。

また RT24 は、D18G 変異、E54K 変異、L55P 変異、Y114C 変異、Y116S 変異、V122I 変異型といった、これまでに患者報告がなされている様々な変異型 TTR 由来の線維を特異的に認識していた (Fig.32)。この結果は、RT24 が V30M 変異型以外の TTR 変異が由来する FAP 患者に対しても薬効を持ちうることを示唆している。更に、RT24 は構造変化を起こした WT TTR を認識していることから (Fig.32B)、WT TTR が加齢に伴って心臓などの組織に沈着することによって発症する老人性全身性アミロイドーシスに対しても有効であるかもしれない。心臓への TTR の沈着に関しては、T24 は V30M FAP 患者の心臓から抽出したアミロイドを認識していなかったが (Fig.11B)、第 1 章 5 節で述べた理由により、T24、および RT24 は FAP 患者の心臓に沈着した TTR アミロイドを認識しうると考えられる。以上の理由から、RT24 は様々な TTR 変異を有する患者に対して有効であると考えられ、また老人性全身性アミロイドーシスの治療法に関する新たなアプローチになることが期待される。

その他の興味深い知見として、線維化抑制試験系の新たな構築が挙げられる。線維化抑制試験はアミロイドーシスの治療を目的とした抗体医薬品のスクリーニング段階で一般的に行われてきている。しかし、V30M TTR を用いた TTR 線維化抑制試験に関しては、低分子で行われた例はあるものの<sup>[42]</sup>、抗体では行われていなかった。V30M TTR を短時間で線維化させるためには酸性条件下で反応させる必要があり、酸性条件下において抗体は変性してしまうためであると推測している。我々は、デオキシコール酸ナトリウムを実験系に添加することで、抗体の変性や線維化を起こすことなく、中性条件下で V30M TTR の線維化が進行することを新たに見出し、TTR 線維化抑制試験で抗体の評価を行うことを可能にした (Fig.25)。今回構築したアッセイ法を用いることにより、今後は抗 TTR 抗体のスクリーニングをより確実に行うことが可能になると考えられる。

現在 FAP の治療法は、上述したような様々なアプローチによって研究開発が行われており、近い将来、種々の治療薬が上市されるものと考えられる。中でも抗体療法は、ユニークな作用メカニズムと高い特異性を有することから、有効性と安全性に優れた新規治療法



として医療ニーズに応える事ができるものと思われる。我々が創出した RT24 がその一翼を担えることを期待したい。

## 材料と実験方法

### ヒト由来サンプル、動物、ペプチド、タンパク質

#### 倫理関連

ヒト試料を用いた全ての試験は、現行のヘルシンキ宣言に従って実施し、共同研究先である熊本大学の倫理委員会によって承認された上で、承認された施設において行った。試験に用いた動物は、化学及血清療法研究所の非臨床試験部動物管理課、および熊本大学動物資源研究・支援センターにおいて、病原体のない特定の環境下で飼育され、化学及血清療法研究所の動物実験規定、および熊本大学の動物介護方針に従って取り扱った。

#### ヒト TTR115-124 ペプチド

ヒト TTR115-124 ペプチド（配列：SYSTTAVVTN）に対して N 末端あるいは C 末端にシステインを付加したペプチドを化学合成によって作製した（SIGMA-ALDRICH 社へ外注）。Immunogen EDC Kit with mcKLH and BSA (Thermo Fisher Scientific) を用いて、KLH あるいは BSA を合成したペプチドの N 末端または C 末端のシステインへコンジュゲートさせた。

メーカーの操作手順書に従い、Biotin-PE-maleimide（同仁化学）を用いて、N 末端にシステインを付加した TTR115-124 ペプチドをビオチン化した。ビオチン化後の TTR115-124 ペプチドを、Superdex peptide (GE Healthcare) を用いて PBS (SIGMA) 下でゲルろ過精製を行い、ビオチン化 TTR115-124 ペプチドとした。

#### ヒト WT TTR 遺伝子のクローニング、および組換え WT TTR 発現ベクター

Human liver Marathon-Ready cDNA (Clontech) を鋳型に、成熟型 TTR の 5'末端または 3'末端に設定したプライマー（TTR-F2、TTR-R：配列は以下に記載）、および Ex-Taq (Takara) を用いて PCR を行った。PCR 産物を pCR2.1-TOPO (Thermo Fisher Scientific) に TA クローニングした後、シーケンス解析によってヒト TTR 遺伝子の塩基配列を確認した。配列が正しいことを確認した後、TTR 遺伝子が挿入された pCR2.1-TOPO を制限酵素 BamHI および制限酵素 HindIII 処理して、TTR 遺伝子をコードする配列が含まれた領域を切り出した。切り出した配列を BamHI および HindIII 処理した pQE-30 (QIAGEN)

に導入し、N 末端に His-tag が融合されたヒト WT TTR を発現するベクターの構築を行った。

TTR-F2: cgcgatccggccctacgggcaccggt

TTR-R: cccaagctttatcattccttgggattggtgacgac

#### 組換え変異型 TTR 発現ベクター

ヒト D18G, V30M, E54K, L55P, Y114C, S115A, Y116A, S117A, Y118A, T119A, A120S, V121A, V122A, V122I, T123A, N124A 変異型 TTR をコードする配列は、先に構築した組換え WT TTR 発現ベクターを鋳型としてアッセンブリーPCR 法を用いて変異を導入した。導入後の配列について、組換え WT TTR 発現ベクターの構築と同様に、pQE-30 (QIAGEN) に導入し、N 末端に His-tag が融合された組換え変異型 TTR を発現するベクターの構築を行った。

#### 組換え TTR の発現と精製

N 末端に His-tag が融合された組換え TTR の発現、および精製品の調製は Matsubara らの方法<sup>[47]</sup>を参考に行った。WT、および変異型 TTR 発現ベクターを大腸菌 M15 株に形質転換し、20mL の LB / Ampicilin (50 µg/mL) / Kanamycin (25 µg/mL) 培地で、37°C 振とう培養した。O.D.600nm = 0.5 になった時点で IPTG を終濃度 10 mM になるように添加し、一晚培養した。培養後、遠心分離により培養物から細胞を回収し、BufferA (50 mM PB, 0.3 M NaCl, 10 mM imidazole, 20 mM 2-mercaptoethanol) に再懸濁した。懸濁液を 15 分間超音波処理し、次いで遠心分離して上清を回収した。上清を nickel-nitrilotriacetic acid-agarose (QIAGEN) で His-tag 精製し、組換え TTR を含む溶出画分を 20mM NaHCO<sub>3</sub> に対して透析した。透析後の組換え TTR を、10mM PB, pH7.5 環境下で Superdex 75 (GE Healthcare) を用いてゲルろ過精製し、四量体 TTR が含まれる画分を組換え TTR 精製品とした。

## 第1章 TTR115-124 を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体の作製

### モノクローナル抗体の作製

100 µg/mL の KLH コンジュゲートした TTR115-124 ペプチドと Freund's Complete Adjuvant (DIFCO) を 1:1 で混合し、TTR ノックアウトマウスに 200 µL 接種し、マウスを免疫した。1 回目の免疫から 2 週間以上間隔を空け、KLH コンジュゲートした TTR115-124 ペプチドと Freund's InComplete Adjuvant (DIFCO) を 1:1 で混合し、更にマウスを免疫した。免疫後、1~2 週間おきに採血を実施し、抗体価が十分に上昇するまで上述と同じ条件でマウスを免疫した。抗体価は ELISA によって確認した。

抗体価が十分に上昇したのを確認した後、マウスから脾細胞を摘出し、マウスミエローマ細胞 P3U1 と細胞融合<sup>[37]</sup>を行った。融合後の細胞を HAT 培地に懸濁し、96well Plate に播種した。HAT 培地下で培養を継続することによりハイブリドーマのみを選択した。播種後 7 日~11 日目に、以下に示した ELISA により、培養上清中に含まれる抗体の、抗原ペプチドへの結合活性を評価した。

BSA コンジュゲートした TTR115-124 ペプチドを PBS (SIGMA) で 2 µg/mL に希釈し、Maxisorp Plate (Nunc) に各ウェルあたり 100 µL 入れ、室温で 1 時間静置して TTR ペプチドを固相化した。溶液を廃棄後、1%BSA-PBS を添加し、室温で 1 時間静置してプレートのブロッキングを行った。溶液を廃棄後、取得したハイブリドーマの培養上清をプレートの各ウェルに 100 µL ずつ加え、37°C で 1 時間反応させた。PBST で洗浄し、標識抗体として HRP 標識 Rabbit anti-mouse IgG(Gamma) (Zymed) を 5000 倍希釈になるように 1%BSA-PBS で希釈して添加し、37°C で 1 時間反応させた。PBST で洗浄後、TMB (SIGMA) を添加して発色させた。30 分後に 1N 硫酸を加えて反応を停止させ、マイクロプレートリーダー (Molecular Devices) で 450 nm-650 nm の吸光度を測定した。

### 抗体遺伝子の取得

TTR ペプチドへの特異的な結合活性を有する抗体を発現するハイブリドーマについて、限界希釈法によってハイブリドーマのクローニングを行った。クローニング後のハイブリドーマ  $1 \times 10^7$  個を出発材料とし、TRIzol (Thermo Fisher Scientific) を用いて total RNA を抽出した。total RNA を鋳型として、random primer (Thermo Fisher Scientific) 、Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (GE Healthcare) を用いて、First-strand cDNA を

調製した。次に、この cDNA を鋳型として用い、Kabat らによる V 領域および J 領域の配列の分類<sup>[40]</sup>を参照してデザインしたリーダー領域に対するプライマーと J 領域に対するプライマーを用い、Ex-Taq (Takara) で VH および VL 遺伝子断片を増幅した。増幅した VH 領域や VL 領域の DNA は pCR2.1-TOPO (Thermo Fisher Scientific) に TA クローニングを行い、抗 TTR 抗体の遺伝子配列を取得した。取得した遺伝子配列については、Big Dye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Thermo Fisher Scientific) および Genetic analyzer ABI Prism 3100 (Thermo Fisher Scientific) を用いて DNA 塩基配列を決定した。

#### マウス抗体発現ベクターの構築

得られた各マウス抗体遺伝子の VH 領域をマウス C $\gamma$ 1 鎖の配列に連結させ、pCAGGS/mdhfr プラスミド<sup>[48]</sup>の SalI 部位にライゲーションし、マウス抗体の VH 発現ベクターを構築した。同様に、得られた各マウス抗体遺伝子の VL 領域をマウス C $\kappa$  鎖の配列に連結させ、pCAGGS プラスミド<sup>[48]</sup>の SalI 部位にライゲーションし、マウス抗体の VL 発現ベクターを構築した。

#### 組換えマウス抗体の発現と精製

先に構築した、各 VH および VL 発現ベクターについて、Neofection (ASTEC) を用いて Freestyle293 細胞 (Thermo Fisher Scientific) にトランスフェクションし、37°C 8%CO<sub>2</sub> 環境下 125 rpm で振とう培養を行い、5 日目に培養上清を回収した。培養上清を 0.22  $\mu$ m フィルターメンブレンでろ過後、PBS(-) (SIGMA) で平衡化した HiTrap rProteinA FF (GE Healthcare) カラムにアプライした。PBS(-) (SIGMA) でカラムを洗浄後、0.1M Glycine-HCl, pH3.0 を用いてカラムに結合した抗体を溶出させた。溶出画分をフラクションコレクターで回収し、トップピークのみを回収して PBS(-) (Wako) に対して透析したものをマウス抗体精製品とした。

#### 直接固相化 ELISA によるスクリーニング

組換え V30M TTR 精製品を 3 mg/mL になるように 10mM PB, pH7.5 で希釈し、等量の 200 mM 酢酸バッファー + 100 mM NaCl, pH3.0 と混合して 1.5 mg/mL の濃度になるように調製し、37°C 恒温槽で 16 時間反応させて組換え V30M TTR 線維を調製した。線維が形成されていることの確認は、ThioflavinT assay<sup>[41]</sup> (励起波長 450/442 nm, 蛍光波長

482/489 nm) により行った。測定には FP-6500 (Jasco) を用いた。

組換え V30M TTR 線維、または WT TTR 四量体を PBS (SIGMA) で 10 µg/mL に希釈し、Maxisorp Plate (Nunc) に各ウェルあたり 50 µL 入れ、室温で 1 時間静置して固相化した。溶液を廃棄後、1%BSA-PBS を添加し、室温で 1 時間静置してプレートのブロッキングを行った。溶液を廃棄後、1%BSA-PBS で 1 µg/mL に希釈したマウス抗体精製品、または Polyclonal Anti-Human Prealbumin (Dako) をプレートの各ウェルに 100 µL ずつ加え、37°C で 1 時間反応させた。PBST で洗浄し、標識抗体として HRP 標識 Rabbit anti-mouse IgG(Gamma) (Zymed) を 5000 倍希釈になるように、または HRP 標識 Goat Anti-Rabbit IgG(H+L) (Bio-Rad) を 50000 倍希釈になるように 1%BSA-PBS で希釈して添加し、37°C で 1 時間反応させた。PBST で洗浄後、TMB (SIGMA) を添加して発色させた。30 分後に 1N 硫酸を加えて反応を停止させ、マイクロプレートリーダー (Molecular Devices) で 450 nm-650 nm の吸光度を測定した。

#### サンドイッチ ELISA によるスクリーニング

Anti-TTR, Goat Polyclonal (LifeSpan BioSciences) を PBS(-) (SIGMA) で 5 µg/mL に希釈し、Maxisorp Plate (Nunc) に各ウェルあたり 50 µL 入れ、室温で 1 時間静置して固相化した。溶液を廃棄後、1%BSA-PBS を添加し、室温で 1 時間静置してプレートのブロッキングを行った。溶液を廃棄後、PBS (-) で 10 µg/mL に希釈した組換え WT TTR 精製品を各ウェルあたり 50 µL 入れ、室温で 1 時間静置した。溶液を廃棄後、PBST で洗浄し、1%BSA-PBS で 10 µg/mL に希釈したマウス抗体精製品、または Polyclonal Anti-Human Prealbumin (Dako) をプレートの各ウェルに 100 µL ずつ加え、37°C で 1 時間反応させた。PBST で洗浄し、標識抗体として HRP 標識 Rabbit anti-mouse IgG(Gamma)/HRP (Zymed) を 10000 倍希釈になるように、または HRP 標識 Goat Anti-Rabbit IgG(H+L) (Bio-Rad) を 50000 倍希釈になるように 1%BSA-PBS で希釈して添加し、37°C で 1 時間反応させた。PBST で洗浄後、TMB (SIGMA) を添加して発色させた。30 分後に 1N 硫酸を加えて反応を停止させ、マイクロプレートリーダー (Molecular Devices) で 450 nm-650 nm の吸光度を測定した。

#### 精製マウス抗体のビオチン化

Biotin-AC<sub>5</sub> Sulfo-OSu (同仁化学) を PBS(-) (SIGMA) で溶解後、マウス抗体精製品と

Biotin-AC<sub>5</sub> Sulfo-OSu とが 1 : 5 のモル比になるように混合し、25℃で 2 時間静置した。反応後の溶液について、PBS(-) (Wako) に対して透析したものをビオチン化マウス抗体精製品とした。

#### 免疫組織化学染色

V30M FAP 患者の腎臓糸球体、および心筋を採取し、ホルマリン固定を行った。固定した腎臓組織をパラフィンブロックに包埋し、組織切片を作製した。組織切片を 4 μm の厚さにスライスしてスライドグラスに接着させた後、脱パラフィン処理を行った。PBS で洗浄後、0.1% 過ヨウ素酸に 10 分間浸透し、更に PBS で洗浄した。0.5% BSA-PBS で 5% になるように希釈した Rabbit serum (Dako) に室温で 1 時間浸漬し、ブロッキング処理を行った。PBS で洗浄した後、一次抗体として候補抗体、またはアイソタイプコントロール抗体をそれぞれ 0.5% BSA-PBS で希釈し、4℃で一晩浸漬した。二次抗体として HRP 標識 Rabbit anti-mouse IgG (Dako) を 0.5% BSA-PBS で 100 倍希釈し、室温で 1 時間浸漬した。PBS で洗浄し、DAB Liquid System (Dako) を用いて発色させた。ヘマトキシリン染色もあわせて行った。陽性対照として、一次抗体に Polyclonal Rabbit Anti-Human Prealbumin (Dako) を、二次抗体に HRP 標識 Polyclonal Goat anti-Rabbit Ig (Dako) を用いて同様な処理を行った。また、V30M FAP 患者の腎臓糸球体、および心筋の凍結組織切片についても、10 μm の厚さにスライスした凍結切片を作製し、同様に免疫染色を行った。

#### T24 のエピトープ解析

Y114C, S115A, Y116A, S117A, Y118A, T119A, A120S, V121A, V122A, V122I, T123A, N124A 変異型 TTR 発現ベクターを大腸菌 M15 に形質転換し、20mL の LB / Ampicilin (50 μg/mL) / Kanamycin (25 μg/mL) 培地で、37℃振とう培養した。O.D.600nm = 0.5 になった時点で IPTG を終濃度 10 mM になるように添加し、一晩培養した。培養液を遠心し、沈殿画分を Bugbuster (Novagen) によって、可溶化した。可溶化した菌体液を加熱・還元処理し、8-16% SDS-PAGE ゲル (TEFCO) に泳動した。泳動後のゲルを SimplyBlue SafeStain (Thermo Fisher Scientific) で染色し、タンパク質を可視化した。併せて、泳動後のゲルを Immobilon-P (Merck) に転写し、2% Skimmilk-PBST で 30 分間ブロッキングした。その後、T24 を 1 μg/mL の濃度になるように 2% Skimmilk-PBST で希釈して添加し、室温で 1 時間

反応させた。PBST で洗浄し、標識抗体として HRP 標識 anti-mouse IgG(H+L) (AMERICAN QUALEX INTERNATIONAL) を 5000 倍希釈になるように 2%Skimmilk-PBST で希釈して添加し、室温で 30 分間反応させた。PBST、および PBS で洗浄後、EzWest Blue (ATTO) を用いてバンドを可視化した。

#### 患者血清への反応性解析

BSA コンジュゲートした TTR115-124 ペプチド、健常人の血清、および V30M FAP 患者由来の血清を 2  $\mu\text{g/mL}$  に、pH3.0 環境下で反応させた血清由来 WT TTR の線維を 4  $\mu\text{g/mL}$  にそれぞれ希釈し、Maxisorp Plate (Nunc) に添加し、室温で固相化した。溶液を廃棄後、1%BSA-PBS を添加し、プレートのブロッキングを行った。溶液を廃棄後、1%BSA-PBS で段階希釈した T24 を加え、37°C で 1 時間反応させた。PBST で洗浄し、標識抗体として anti-mouse IgG(H+L)/HRP (Zymed) を 1%BSA-PBS で希釈して添加し、37°C で 1 時間反応させた。PBST で洗浄後、SureBlue<sup>TM</sup> TMB microwell peroxidase substrate (KPL) を添加して発色させた。30 分後に 1N 硫酸を加えて反応を停止させ、マイクロプレートリーダー(Molecular Devices)で 450 nm の吸光度を測定した。

100 倍希釈した健常人の血清、および V30M FAP 患者の血清、または V30M FAP 患者の心臓および腎臓から抽出したアミロイドを、非還元、非加熱の状態で SDS-PAGE を行った。泳動後のゲルを PVDF 膜に転写し、2.5%Skimmilk-PBST で 1 時間ブロッキングした。その後、ビオチン標識 Polyclonal Rabbit anti-human prealbumin、またはビオチン化 T24 を 1  $\mu\text{g/mL}$  の濃度になるように 2.5%Skimmilk-PBST で希釈して添加し、4°C で一晩反応させた。PBST で洗浄し、標識抗体として Streptavidin/HRP (Dako) を 2000 倍希釈になるように 2.5%Skimmilk-PBST で希釈して添加し、室温で 1 時間反応させた。PBST、および PBS で洗浄後、発色基質を用いてバンドを可視化した。



## 第2章 モノクローナル抗体 T24 のヒト化

### T24 の分子モデリング

分子設計ソフト MOE 2010.10 (Chemical Computing Group) を用いて、T24 の VH および VL に相同性の高い PDB エントリーを鋳型としてホモロジーモデリングを行い、T24 の Fv モデルを作製した。作製したモデルから、CDR 領域と相互作用して CDR の構造保持に寄与していると考えられるアミノ酸残基や、VH-VL 相互作用に寄与する FR 領域アミノ酸残基の位置を推定した。FR および CDR 領域のナンバリングについては、Kabat Numbering<sup>[40]</sup>に従った。

### T24 抗体のヒト化

T24 の分子モデリングによって得られたアミノ酸の情報、および定法<sup>[38][39]</sup>に従い、ヒト化抗体の配列をデザインした。

### キメラ T24 発現ベクターの構築

第1章で得た T24 抗体遺伝子の VH 領域をヒト C $\gamma$ 1 鎖領域の配列に連結させ、pCAGGS/mdhfr プラスミド<sup>[48]</sup>の SalI 部位にライゲーションし、キメラ抗体の VH 発現ベクターを構築した。同様に、得られた T24 抗体遺伝子の VL 領域をヒト C $\kappa$  鎖領域の配列に連結させ、pCAGGS プラスミド<sup>[48]</sup>の SalI 部位にライゲーションし、キメラ抗体の VL 発現ベクターを構築した。

### ヒト化抗体発現ベクターの構築

デザインしたヒト化抗体の配列について、タカラバイオ社に人工遺伝子合成を依頼した。得られたヒト化抗体遺伝子の VH 領域をヒト C $\gamma$ 1 鎖領域の配列に連結させ、pCAGGS/mdhfr プラスミド<sup>[48]</sup>の SalI 部位にライゲーションし、ヒト化抗体の VH 発現ベクターを構築した。同様に、ヒト化抗体遺伝子の VL 領域を C $\kappa$  鎖領域の配列に連結させ、pCAGGS プラスミド<sup>[48]</sup>の SalI 部位にライゲーションし、ヒト化抗体の VL 発現ベクターを構築した。他のデザインしたヒト化抗体を発現するベクターについては、上記で構築したベクターを鋳型として、アッセンブリーPCR により点変異を導入した。

### ヒト化抗体、キメラ抗体の発現と精製

ヒト化抗体発現ベクターについて、Neofection (ASTECH) を用いて Freestyle293 細胞 (Thermo Fisher Scientific) にトランスフェクションし、37°C 8%CO<sub>2</sub> 環境下 125 rpm で振とう培養を行い、5 日目に培養上清を回収した。培養上清を 0.22 µm フィルターメンブレンでろ過後、PBS(-) (SIGMA) で平衡化した HiTrap rProteinA FF (GE Healthcare) カラムにアプライした。PBS(-) (SIGMA) でカラムを洗浄後、0.1M Glycine-HCl, pH3.0 を用いてカラムに結合した抗体を溶出させた。溶出画分をフラクションコレクターで回収し、トップピークのみを回収して PBS(-) (Wako) に対して透析したものをヒト化抗体精製品とした。

キメラ抗体発現ベクターについても同様に、組換え抗体の発現、および精製を行った。その後、得られたキメラ抗体について、TSKgel G3000SWXL (TOSOH) を用いてゲルろ過精製を行い、キメラ抗体精製品とした。

### 抗体の結合活性確認

NUNC IMMOBILIZER STREPTAVIDIN (Nunc) を PBST で 3 回洗浄した後、ビオチン化 TTR115-124 ペプチドを PBS (-) で 100 nM に希釈し、プレートに 100 µL/well 入れ、2 時間室温で軽く振とうして TTR ペプチドを固相化した。PBST で洗浄後に 1%BSA-PBS で希釈したヒト化抗体、またはキメラ抗体を加え、37°C で 1 時間反応させた。PBST で洗浄し、標識抗体として anti-human Fc/HRP (Rockland) を 10000 倍希釈になるように 1%BSA-PBS で希釈して添加し、37°C で 1 時間反応させた。PBST で洗浄後、TMB (SIGMA) を添加して発色させた。30 分後に 1N 硫酸を加えて反応を停止させ、マイクロプレートリーダー (Molecular Devices) で 450 nm-650 nm の吸光度を測定した。

### 第3章 活性評価系の構築

#### 変異型TTR の線維化確認

組換え WT TTR 精製品、および組換え D18G、A25T、E54K、L55P、Y116S TTR 精製品をそれぞれ 1.5 mg/mL になるように PBS または PBST で希釈し、37°C恒温槽で反応させた。反応直後、反応から指定時間経過後のサンプルを用いて ThioflavinT assay (励起波長 450/442 nm, 蛍光波長 482/489 nm) を行い、蛍光強度を測定した。測定には FP-6500 (Jasco) を用いた。

同様に、37°C恒温槽で反応させた D18G TTR 精製品を 1.5 µg ずつ 4-20% Non-SDS-PAGE-mini (TEFCO) にアプライし、Native-PAGE を行った。緩衝液はゲルメーカー推奨の組成を用いた。泳動後、Silver Stain KantoIII (関東化学) を用いて銀染色を行った。

#### 線維化に使用する界面活性剤のスクリーニング

組換え V30M TTR 精製品を 375 µg/mL になるように PBS(-) で希釈し、4 種類の界面活性剤を終濃度が 0.1%、0.01%、0.001%になるように PBS(-)で希釈混合した。使用する界面活性剤として、塩化ベンザルコニウム (山善)、デオキシコール酸ナトリウム (ナカライ)、Zwittergent3-16 (Carbiochem)、NP-40 (Wako) を用いた。37°C恒温槽で4日間静置した後、ThioflavinT assay を行い、蛍光強度を測定した。

#### 最適なデオキシコール酸ナトリウム濃度の探索

組換え V30M TTR 精製品を 375 µg/mL になるように PBS(-) で希釈したものと、デオキシコール酸ナトリウムを終濃度が 0.05%、0.1%、0.2%、0.5%、1%含むように PBS で希釈したものを混合した。37°C恒温槽で静置し、1日、4日、および7日経過後に ThioflavinT assay を行い、蛍光強度を測定した。

同様に、デオキシコール酸ナトリウム存在下で、37°C恒温槽で7日間静置させた組換え V30M TTR を 2 µg ずつ 4-20% Non-SDS-PAGE-mini (TEFCO) にアプライし、Native-PAGE を行った。緩衝液はゲルメーカー推奨の組成を用いた。泳動後、Silver Stain KantoIII (関東化学) を用いて銀染色を行った。同時に、Native-PAGE 後のゲルを Immobilon-P (Merck) に転写し、2%Skimmilk-PBST で30分間ブロッキングした。その後、

Polyclonal Rabbit Anti-Human Prealbumin (Dako) を 1000 倍希釈になるように 2%Skimmilk-PBST で希釈して添加し、室温で 1 時間反応させ、PBST で洗浄した。その後、標識抗体として Polyclonal Goat anti-Rabbit Ig HRP (Dako) を 2000 倍希釈になるように 2%Skimmilk-PBST で希釈して添加し、室温で 30 分間反応させた。PBST、および PBS で洗浄後、EzWest Blue (ATTO) を用いてバンドを可視化した。

## 第4章 臨床応用に向けた評価

### *Biacore* を用いた反応特異性の評価

組換え WT TTR 精製品、または組換え V30M TTR 精製品を 3 mg/mL になるように 10mM PB, pH7.5 で希釈し、等量の 200 mM 酢酸バッファー + 100 mM NaCl, pH3.0 と混合して 1.5 mg/mL の濃度になるように調製し、37°C 恒温槽で 16 時間反応させて WT TTR 線維、または V30M TTR 線維を調製した。TTR 線維が形成されているかの確認は ThioflavinT assay により行った。

Biacore2000 (GE Healthcare) を用い、Sensorchip CM5 (GE Healthcare) に WT TTR 精製品、V30M TTR 精製品、WT TTR 線維、V30M TTR 線維をそれぞれ 1000RU 程度固相化した。リガンドの固相化は 10mM 酢酸バッファー, pH6.0 で行った。HBS-EP Buffer で 10 µg/mL に希釈した RT24、またはアイソタイプコントロール抗体を、20 µL/min で 2 分間インジェクションした。インジェクション後に解離を 60 分間行い、10 mM Gly-NaOH, pH9.0 で 30 秒間再生を行った。

### *V30M TTR* の線維化抑制試験

組換え V30M TTR 精製品と RT24、またはアイソタイプコントロール抗体のモル比が 10 µM:0.01~2 µM になるように両者を混合し (TTR: 550 µg/mL、抗体: 1.5~300 µg/mL)、0.1% デオキシコール酸ナトリウムを含む PBS 下で 37°C 3 日間静置した。静置後のサンプル 10 µL を用いて ThioflavinT assay (励起波長 440 nm, 蛍光波長 480 nm) を行い、蛍光強度を測定した。測定には PHERAStar (BMG Labtech) を用いた。

### *T24* 抗体のラット薬物動態試験

約 4 ヶ月齢の DA/Slc ラット 3 匹に T24 を 10mg/kg で単回投与 (尾静脈注射) し、20 分、1 時間、3 時間、6 時間、1 日、2 日、4 日、8 日、11 日、14 日、21 日経過後に採血し、血清成分を分離させた。その後、採取した血清内の T24 濃度を以下の ELISA で定量した。

Anti-Mouse IgG(H+L) (Rockland) を PBS(-) で 2 µg/mL に希釈し、Maxisorp Plate (Nunc) に各ウェルあたり 100 µL 入れ、室温で 1 時間静置して固相化した。溶液を廃棄後、1% BSA-PBS を添加し、室温で 1 時間静置してプレートのブロッキングを行った。その

後、採取したラット血清を 1000~125000 倍希釈になるように 1%BSA-PBS で希釈して添加し、37°C で 1 時間反応させた。PBST で洗浄し、標識抗体として Goat anti-mouse IgG(H+L)-HRP (American Qualex) を 10000 倍希釈になるように 1%BSA-PBS で希釈して添加し、37°C で 1 時間反応させた。PBST で洗浄後、TMB (SIGMA) を添加して発色させた。30 分後に 1N 硫酸を加えて反応を停止させ、マイクロプレートリーダー (Molecular Devices) で 450 nm-650 nm の吸光度を測定した。

#### *FAP 疾患モデルを用いた投与試験*

ヒト V30M TTR 遺伝子を有するトランスジェニックラットを、Ueda らの方法<sup>[35]</sup>により作製した。3 箇月齢のトランスジェニックラットに、10 mg/kg の T24、あるいは PBS を各群 8 匹ずつ、9 箇月齢までの 6 箇月間にわたり週 1 回ずつ 26 回投与した。投与期間中は毎週採血を行った。6 箇月間の投与後に剖検を行って結腸を採取し、ホルマリン固定を行った。固定した結腸組織をパラフィンブロックに包埋し、厚さ 4  $\mu$ m の組織切片を作製した。組織切片について、第 1 章 4 節で実施した免疫組織化学染色と同一の方法で免疫染色を行った。染色後の切片を光学顕微鏡下で観察し、DP71 カメラ (Olympus) および DP-BSW-V3.1 ソフトウェアを用いて 100 倍に拡大したラット結腸の全視野をデジタル化した。撮影した個々の画像をキャプチャし、結合して結腸全体の画像を合成した。合成した画像に対して、Ueda らの方法<sup>[49]</sup>に従い、ImageJ ソフトウェア (NIH Research Services Branch; imagej.nih.gov) を用いて結腸筋層部全体、および結腸筋層部における TTR 陽性領域のエリア面積を定量した。(TTR 陽性領域のエリア面積)  $\div$  (結腸筋層部全体のエリア面積) を TTR 沈着面積比率とし、TTR 沈着面積比率を個体毎に算出した。T24 投与群の各個体における TTR 沈着面積比率を、PBS 投与群の TTR 沈着面積比率の平均値を 1 としたときの相対値で表した。T24 投与群と PBS 投与群との数値を標本として Student t 検定を行い、p value < 0.05 の時、統計的に有意差が認められると判断した。

血液中のクレアチニン濃度、総タンパク質濃度、アミラーゼ濃度、TTR 濃度、アルブミン濃度、および血清アミロイド A 濃度の分析は、熊本大学医学部の中央検査部に測定を依頼した。

#### *変異型 TTR 線維に対する反応性解析*

組換え WT TTR 精製品、および組換え D18G、V30M、E54K、L55P、Y114C、Y116S、

V122I TTR 精製品をそれぞれ 3 mg/mL になるように 10mM PB, pH7.5 で希釈し、等量の 200 mM 酢酸バッファー + 100 mM NaCl, pH3.0 と混合して 1.5mg/mL の濃度になるように調製し、37°C恒温槽で 16 時間反応させて各種変異型 TTR 線維を調製した。組換え WT TTR 精製品、および各種変異型 TTR 線維を 1.5  $\mu$ g ずつ 4-12% Non-SDS-PAGE-mini (TEFCO) にアプライし、Native-PAGE を行った。緩衝液はゲルメーカー推奨の組成を用いた。泳動後、Silver Stain KantoIII (関東化学) を用いて銀染色を行った。同時に、Native-PAGE 後のゲルを Immobilon-P (Merck) に転写し、2%Skimmilk-PBST で 30 分間ブロッキングした。その後、RT24 を 1  $\mu$ g/mL になるように 2%Skimmilk-PBST で希釈して添加し、室温で 1 時間反応させ、PBST で洗浄した。その後、標識抗体として anti-humanFc-HRP (Rockland) を 5000 倍希釈になるように 2%Skimmilk-PBST で希釈して添加し、室温で 30 分間反応させた。PBST、および PBS で洗浄後、EzWest Blue (ATTO) を用いてバンドを可視化した。

#### マクロファージ食食活性評価試験

健常人から採取した皮膚組織から、Senju らの方法<sup>[50]</sup> に従い、ヒト iPS 細胞の作製、およびマクロファージ (iPS-MP) への分化を行った。組換え V30M TTR 精製品を 200 mM 酢酸バッファー + 100 mM NaCl, pH4.0 環境下において 37°Cで 1 日間静置し、V30M TTR 線維を調製した。1~2 $\times$ 10<sup>6</sup> 個の iPS-MP を 10cm dish にて、50 ng/mL hGM-CSF および 25 pg/mL M-CSF 存在下で 24 時間前培養した。iPS-MP を PBS 洗浄後、20  $\mu$ g/mL マイトマイシン C を含む培地にて 37°Cで 10 分間静置し、96well プレートに 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 個/100 $\mu$ L/well になるように加えた。未処理の WT TTR、あるいは 24 時間の酸処理を行なった V30M TTR を 3.2  $\mu$ g/mL になるように培地で希釈後、50  $\mu$ L ずつ添加した。さらに、RT24 をそれぞれ 40  $\mu$ g/mL になるように希釈し、50  $\mu$ L ずつ添加した (RT24 は終濃度で 10  $\mu$ g/mL)。37°C、5%CO<sub>2</sub> 下で 3 日間培養した後、培養上清を回収した。

培養上清を 5  $\mu$ L ずつ 96well プレートに加え、さらに 25mM の Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Buffer を 100  $\mu$ L 加えた後、4°Cで一晩静置することでプレートに TTR を固相化させた。PBST で洗浄後、0.5%ゼラチン- 25 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> を加え、室温で 1 時間ブロッキングした。PBST で洗浄後、0.05%ゼラチン-PBST で希釈した Polyclonal Rabbit Anti-Human Prealbumin (Dako) を添加して室温で 1 時間静置した。PBST で洗浄後、0.05%ゼラチン-PBST で希釈した HRP 標識 Goat anti-Rabbit Ig (Dako) を添加して室温 1 時間反応させた。PBST で洗浄後、

SureBlue™ TMB microwell peroxidase substrate (KPL) を加えて発色させ、プレートリーダーで 450nm の吸光度を測定した。



## 引用文献

- [1] Glenner, G. G. (1980) Amyloid deposits and amyloidosis: the beta-fibrilloses (second of two parts). *N Engl J Med.* **302**, 1333-43.
- [2] 厚生労働科学研究補助金 難治性疾患克服研究事業 アミロイドーシスに関する調査研究班 (2010) アミロイドーシス診療ガイドライン 2010.
- [3] Ueda, M., and Ando, Y. (2014) Recent advances in transthyretin amyloidosis therapy. *Transl Neurodegener.* **3**, 19.
- [4] Merlini, G., Seldin, D.C., and Gertz, M.A. (2011) Amyloidosis: pathogenesis and new therapeutic options. *J Clin Oncol.* **29**, 1924-33.
- [5] Araki, S., and Ando, Y. (2010) Transthyretin-related familial amyloidotic polyneuropathy -Progress in Kumamoto, Japan (1967-2010)-. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* **86**, 694-706.
- [6] 安東由喜雄, (2011) 家族性アミロイドポリニューロパチーの診療ガイドライン.
- [7] Sekijima, Y. (2014) Recent progress in the understanding and treatment of transthyretin amyloidosis. *J Clin Pharm Ther.* **39**, 225-33.
- [8] Jacobson, D.R., Pastore, R.D., Yaghoubian, R., Kane, I., Gallo, G., Buck, F.S., and Buxbaum, J.N. (1997) Variant-sequence transthyretin (isoleucine 122) in late-onset cardiac amyloidosis in black Americans. *N Engl J Med.* **336**, 466-73.
- [9] Yamamoto, K., Hsu, S.P., Yoshida, K., Ikeda, S., Nakazato, M., Shiomi, K., Cheng, S.Y., Furihata, K., Ueno, I., and Yanagisawa, N. (1994) Familial amyloid polyneuropathy in Taiwan: identification of transthyretin variant (Leu55-->Pro). *Muscle Nerve.* **17**, 637-41.
- [10] Hammarström, P., Sekijima, Y., White, J.T., Wiseman, R.L., Lim, A., Costello, C.E., Altland, K., Garzuly, F., Budka, H., and Kelly, J.W. (2003) D18G transthyretin is monomeric, aggregation prone, and not detectable in plasma and cerebrospinal fluid: a prescription for central nervous system amyloidosis? *Biochemistry.* **42**, 6656-63.
- [11] Hou, X., Aguilar, M. I., and Small, D. H. (2007) Transthyretin and familial amyloidotic polyneuropathy. Recent progress in understanding the molecular mechanism of neurodegeneration. *FEBS J.* **274**, 1637-50.
- [12] Hammarström, P., Jiang, X., Hurshman, A.R., Powers, E.T., and Kelly, J.W. (2000) Sequence-dependent denaturation energetics: A major determinant in amyloid disease diversity.

*Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**, Suppl 4:16427-32.

- [13] Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., and Bourne, P.E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235-42.
- [14] Rose, P.W., Prlić, A., Altunkaya, A., Bi, C., Bradley, A.R., Christie, C.H., Costanzo, L.D., Duarte, J.M., Dutta, S., Feng, Z., Green, R.K., Goodsell, D.S., Hudson, B., Kalro, T., Lowe, R., Peisach, E., Randle, C., Rose, A.S., Shao, C., Tao, Y.P., Valasatava, Y., Voigt, M., Westbrook, J.D., Woo, J., Yang, H., Young, J.Y., Zardecki, C., Berman, H.M., and Burley, S.K. (2017) The RCSB protein data bank: integrative view of protein, gene and 3D structural information. *Nucleic Acids Res.* **45**: D271-D281.
- [15] Yokoyama, T., Mizuguchi, M., Nabeshima, Y., Kusaka, K., Yamada, T., Hosoya, T., Ohhara, T., Kurihara, K., Tomoyori, K., Tanaka, I. and Niimura, N. (2012) Hydrogen-bond network and pH sensitivity in transthyretin: Neutron crystal structure of human transthyretin. *J Struct Biol.* **177**, 283-290.
- [16] Episkopou, V., Maeda, S., Nishiguchi, S., Shimada, K., Gaitanaris, G. A., Gottesman, M. E., and Robertson, E. J. (1993) Disruption of the transthyretin gene results in mice with depressed levels of plasma retinol and thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**, 2375-9.
- [17] Inouye, H., Domingues, F.S., Damas, A.M., Saraiva, M.J., Lundgren, E., Sandgren, O., and Kirschner, D.A. (1998) Analysis of x-ray diffraction patterns from amyloid of biopsied vitreous humor and kidney of transthyretin (TTR) Met30 familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) patients: axially arrayed TTR monomers constitute the protofilament. *Amyloid.* **5**, 163-74.
- [18] Jiang, X., Smith, C. S., Petrassi, H. M., Hammarström, P., White, J. T., Sacchettini, J. C., and Kelly, J. W. (2001) An engineered transthyretin monomer that is nonamyloidogenic, unless it is partially denatured. *Biochemistry.* **40**, 11442-52.
- [19] Foss, T. R., Kelker, M. S., Wiseman, R. L., Wilson, I. A., and Kelly, J. W. (2005) Kinetic stabilization of the native state by protein engineering: implications for inhibition of transthyretin amyloidogenesis. *J Mol Biol.* **347**, 841-54.
- [20] Hurshman, A. R., White, J. T., Powers, E. T., and Kelly, J.W. (2004) Transthyretin aggregation under partially denaturing conditions is a downhill polymerization. *Biochemistry.* **43**, 7365-81.
- [21] Wisniewski, T., and Goñi, F. (2015) Immunotherapeutic approaches for Alzheimer's disease.

*Neuron*. **85**, 1162-76.

- [22] Logovinsky, V., Satlin, A., Lai, R., Swanson, C., Kaplow, J., Osswald, G., Basun, H., Lannfelt, L. (2016) Safety and tolerability of BAN2401--a clinical study in Alzheimer's disease with a protofibril selective A $\beta$  antibody. *Alzheimers Res Ther*. **8**, 14.
- [23] Sekijima, Y. (2015) Transthyretin (ATTR) amyloidosis: clinical spectrum, molecular pathogenesis and disease-modifying treatments. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. **86**, 1036-43.
- [24] Ando, Y., Ando, E., Tanaka, Y., Yamashita, T., Tashima, K., Suga, M., Uchino, M., Negi, A., and Ando, M. (1996) De novo amyloid synthesis in ocular tissue in familial amyloidotic polyneuropathy after liver transplantation. *Transplantation*. **62**, 1037-8.
- [25] Falk, R. H., and Dubrey, S. W. (2010) Amyloid heart disease. *Prog Cardiovasc Dis*. **52**, 347-61.
- [26] Said, G., Grippon, S., and Kirkpatrick, P. (2012) Tafamidis. *Nat Rev Drug Discov*. **11**, 185-6.
- [27] Bulawa, C. E., Connelly, S., Devit, M., Wang, L., Weigel, C., Fleming, J.A., Packman, J., Powers, E.T., Wiseman, R.L., Foss, T.R., Wilson, I.A., Kelly, J.W., and Labaudinière, R. (2012) Tafamidis, a potent and selective transthyretin kinetic stabilizer that inhibits the amyloid cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **109**, 9629-34.
- [28] Coelho, T., Adams, D., Silva, A., Lozeron, P., Hawkins, P. N., Mant, T., Perez, J., Chiesa, J., Warrington, S., Tranter, E., Munisamy, M., Falzone, R., Harrop, J., Cehelsky, J., Bettencourt, B. R., Geissler, M., Butler, J. S., Sehgal, A., Meyers, R. E., Chen, Q., Borland, T., Hutabarat, R. M., Clausen, V. A., Alvarez, R., Fitzgerald, K., Gamba-Vitalo, C., Nochur, S. V., Vaishnav, A. K., Sah, D. W., Gollob, J. A., and Suhr, O. B. (2013) Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med*. **369**, 819-29.
- [29] Goldsteins, G., Persson, H., Andersson, K., Olofsson, A., Dacklin, I., Edvinsson, A., Saraiva, M. J., and Lundgren, E. (1999) Exposure of cryptic epitopes on transthyretin only in amyloid and in amyloidogenic mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**, 3108-13.
- [30] Kohno, K., Palha, J. A., Miyakawa, K., Saraiva, M. J., Ito, S., Mabuchi, T., Blaner, W. S., Iijima, H., Tsukahara, S., Episkopou, V., Gottesman, M. E., Shimada, K., Takahashi, K., Yamamura, K., and Maeda, S. (1997) Analysis of amyloid deposition in a transgenic mouse model of homozygous familial amyloidotic polyneuropathy. *Am J Pathol*. **150**, 1497-508.
- [31] Terazaki, H., Ando, Y., Fernandes, R., Yamamura, K., Maeda, S., and Saraiva, M. J. (2006)

- Immunization in familial amyloidotic polyneuropathy: counteracting deposition by immunization with a Y78F TTR mutant. *Lab Invest.* **86**, 23-31.
- [32] Gustavsson, A., Engström, U., and Westermark, P. (1994) Mechanisms of transthyretin amyloidogenesis. Antigenic mapping of transthyretin purified from plasma and amyloid fibrils and within in situ tissue localizations. *Am J Pathol.* **144**, 1301-11.
- [33] Eneqvist, T., Olofsson, A., Ando, Y., Miyakawa, T., Katsuragi, S., Jass, J., Lundgren, E., and Sauer-Eriksson, A.E. (2002) Disulfide-bond formation in the transthyretin mutant Y114C prevents amyloid fibril formation in vivo and in vitro. *Biochemistry.* **41**, 13143-51.
- [34] Bergström, J., Engström, U., Yamashita, T., Ando, Y., and Westermark, P. (2006) Surface exposed epitopes and structural heterogeneity of in vivo formed transthyretin amyloid fibrils. *Biochem Biophys Res Commun.* **348**, 532-9.
- [35] Ueda, M., Ando, Y., Hakamata, Y., Nakamura, M., Yamashita, T., Obayashi, K., Himeno, S., Inoue, S., Sato, Y., Kaneko, T., Takamune, N., Misumi, S., Shoji, S., Uchino, M., and Kobayashi, E. (2007) A transgenic rat with the human ATTR V30M: a novel tool for analyses of ATTR metabolisms. *Biochem Biophys Res Commun.* **352**, 299-304.
- [36] Su, Y., Jono, H., Torikai, M., Hosoi, A., Soejima, K., Guo, J., Tasaki, M., Misumi, Y., Ueda, M., Shinriki, S., Shono, M., Obayashi, K., Nakashima, T., Sugawara, K., and Ando, Y. (2012) Antibody therapy for familial amyloidotic polyneuropathy. *Amyloid.* **19**, 45-6.
- [37] Köhler, G., and Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* **256**, 495-7.
- [38] Winter, G., and Milstein, C. (1991) Man-made antibodies. *Nature.* **349**, 293-9.
- [39] Foote, J., and Winter, G. (1992) Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *J Mol Biol.* **224**, 487-99.
- [40] Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H., Gottesman, K., and Foeller, C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. *NIH Publication No.* **91**-3242.
- [41] Khurana, R., Coleman, C., Ionescu-Zanetti, C., Carter, S. A., Krishna, V., Grover, R. K., Roy, R., and Singh, S. (2005) Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *J Struct Biol.* **151**, 229-38.
- [42] Arsequell, G., and Planas, A. (2012) Methods to evaluate the inhibition of TTR fibrillogenesis induced by small ligands. *Curr Med Chem.* **19**, 2343-55.

- [43] 山岡清, 谷川原祐介 (1983) マイコンによる速度論入門, 南江堂.
- [44] Phay, M., Blinder, V., Macy, S., Greene, M. J., Wooliver, D. C., Liu, W., Planas, A., Walsh, D. M., Connors, L. H., Primmer, S. R., Planque, S. A., Paul, S., and O'Nuallain. B. (2014) Transthyretin aggregate-specific antibodies recognize cryptic epitopes on patient-derived amyloid fibrils. *Rejuvenation Res.* **17**, 97-104.
- [45] Higaki, J.N., Chakrabarty, A., Galant, N. J., Hadley, K. C., Hammerson, B., Nijjar, T., Torres, R., Tapia, J. R., Salmans, J., Barbour, R., Tam, S. J., Flanagan, K., Zago, W., and Kinney, G. G. (2016) Novel conformation-specific monoclonal antibodies against amyloidogenic forms of transthyretin. *Amyloid.* **23**, 86-97.
- [46] Lannfelt, L., Relkin, N. R., and Siemers, E. R. (2014) Amyloid- $\beta$ -directed immunotherapy for Alzheimer's disease. *J Intern Med.* **275**, 284-95.
- [47] Matsubara, K., Mizuguchi, M., and Kawano, K. (2003) Expression of a synthetic gene encoding human transthyretin in Escherichia coli. *Protein Expr Purif.* **30**, 55-61.
- [48] Yonemura, H., Imamura, T., Soejima, K., Nakahara, Y., Morikawa, W., Ushio, Y., Kamachi, Y., Nakatake, H., Sugawara, K., Nakagaki, T., and Nozaki, C. (2004) Preparation of recombinant alpha-thrombin: high-level expression of recombinant human prethrombin-2 and its activation by recombinant ecarin. *J Biochem.* **135**, 577-82.
- [49] Ueda, M., Ando, Y., Nakamura, M., Yamashita, T., Himeno, S., Kim, J., Sun, X., Saito, S., Tateishi, T., Bergström, J., and Uchino, M. (2006) FK506 inhibits murine AA amyloidosis: possible involvement of T cells in amyloidogenesis. *J Rheumatol.* **33**, 2260-70.
- [50] Haruta, M., Tomita, Y., Yuno, A., Matsumura, K., Ikeda, T., Takamatsu, K., Haga, E., Koba, C., Nishimura, Y., and Senju, S. (2013) TAP-deficient human iPS cell-derived myeloid cell lines as unlimited cell source for dendritic cell-like antigen-presenting cells. *Gene Ther.* **20**, 504-13.

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なるご指導・ご協力を頂きました、一般財団法人 化学及血清療法研究所の中島敏博様、副島見事部長、鳥飼正治室長、樋口浩文室長、石川大輔技師、竹尾智予技能職、大堀真代技能職、原田明子さんに感謝申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、共同研究を進めながらご指導・ご協力を賜りました、熊本大学の安東由喜雄先生、城野博史先生、蘇宇先生、植田光晴先生、郭建莹先生、末永元輝先生、本川拓誠先生、池田徳典先生、千住寛先生に、謹んで感謝申し上げます。

## 目録

本博士論文の各章は次の文献および特許にて発表された。

### **Novel Antibody for the Treatment of Transthyretin Amyloidosis.**

Akihiko Hosoi, Yu Su, Masaharu Torikai, Hirofumi Jono, Daisuke Ishikawa, Kenji Soejima, Hirofumi Higuchi, Jianying Guo, Mitsuharu Ueda, Genki Suenaga, Hiroaki Motokawa, Tokunori Ikeda, Satoru Senju, Toshihiro Nakashima and Yukio Ando. (2016).

*Journal of Biological Chemistry*, **291**:25096-25105.

### **国際特許：ANTI-TRANSTHYRETIN HUMANIZED ANTIBODY**

細井 亜樹彦, 鳥飼 正治, 竹尾 智予, 上野 真代, 樋口 浩文, 副島 見事, 中島 敏博, 安東 由喜雄, 城野 博史, 蘇 宇 (WO2015/115331)

### **国際特許：ANTI-TRANSTHYRETIN HUMAN ANTIBODY**

鳥飼 正治, 細井 亜樹彦, 竹尾 智予, 上野 真代, 副島 見事, 中島 敏博, 安東 由喜雄, 城野 博史, 蘇 宇, 水口 峰之 (WO2015/115332)