

学位論文内容要旨

氏名：細井 亜樹彦 印

題目：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

要旨：

家族性アミロイドポリニューロパチー（FAP）は、主にトランスサイレチン（TTR）遺伝子の変異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。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。FAP の治療法として、これまでに肝移植や TTR 四量体安定化剤の投与が行われており、症状の進行を遅らせる効果を示している。しかし、これらの治療法には課題も多く、また症状の進行を完全に抑えることはできていないのが現状であり、新たな治療法の開発が望まれている。

原因遺伝子である TTR に関して、これまで 120 以上の変異型が報告され、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い。正常な TTR はホモ四量体として血中で挙動しているが、V30M 変異 TTR は野生型と比較して四量体の安定性が損なわれ、単量体への解離が起こりやすい。単量体となった TTR は構造変化（ミスフォールディング）を起こし、凝集体を経て難溶性のアミロイド線維を形成し、全身の臓器に沈着し障害を起こす（図

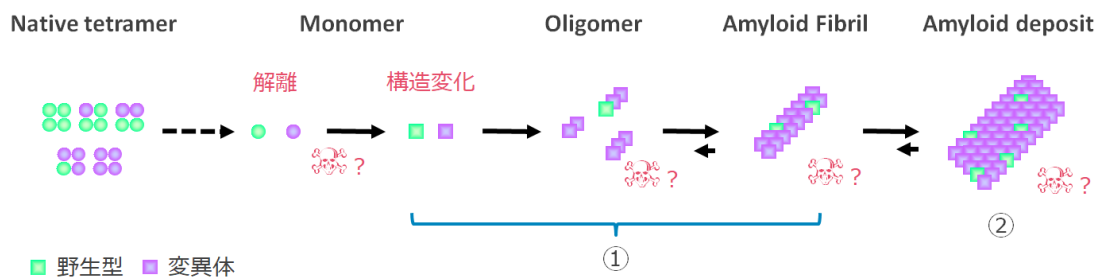


図 1. TTR がアミロイド化するまでのステップ

1)。一方で、組織毒性を示す TTR 分子種の同定は成されておらず、毒性発現のメカニズムについては未解明な部分が多い。

我々は、薬剤の標的として構造変化を起こした TTR (図 1. ①、及び②の分子種) をターゲットとすることが有用であると考え、これらの分子種を特異的に認識する抗体が FAP の新規治療薬になると考えた。構造変化を起こした TTR を特異的に認識する抗体医薬品であれば、血中で機能する四量体の TTR には作用せずに、TTR の線維化や TTR アミロイドの組織沈着の抑制、更には組織に沈着した TTR アミロイドの除去が期待できる。そこで、「構造変化を起こした TTR に対する特異的な抗体の創出、及びヒトへの投与を目指した抗体の改良と評価」を目的として研究を行った。

第 1 に、候補となる抗原の選定を行った。TTR アミロイドが形成される過程で、TTR の構造はドラスティックに変化し、構造変化に伴って新たなエピトープ(=cryptic epitope)が分子表面に露出することが知られている。また、cryptic epitope が露出しやすい TTR 変異体で FAP 病態モデルマウス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も報告されていた。そこで、共同研究者がこれまでに cryptic epitope として同定していた、TTR の 115 番目から 124 番目までのアミノ酸を抗原として選定した。

第 2 に、選定した抗原を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体の作製を試みた。KLH コンジュゲートした TTR の 115~124 番目までのペプチドを抗原として TTR ノックアウトマウスを免疫し、定法によって細胞融合を行った。HAT 培地選択後のハイブリドーマ培養上清について、抗原ペプチドに対する反応性を ELISA で評価し、10 個の陽性クローンを得た。得られたハイブリドーマから抗体遺伝子を単離し、抗体発現ベクターへの導入、293 細胞への形質転換、組換え抗体の発現、抗体培養上清の ProteinA クロマトグラフィー精製を経て、各々の組換え抗体精製品を調製した。人為的に線維化させた V30M TTR を直接固相化したプレートを用いた ELISA、及び抗 TTR ポリクローナル抗体を固相化させ、野生型の四量体 TTR をトラップさせたプレートを用いたサンドイッチ ELISA の 2 種類のアッセイを利用し、これら精製抗体の中から、四量体 TTR は認識せず、かつ TTR 線維を特異的に認識する抗体を 4 クローンに絞り込んだ。最後に、FAP 患者の腎臓切片を用いた免疫染色を行い、患者組織中に沈着した TTR を特異的に認識する抗体として、クローン T24 を得た。健常人血清、FAP 患者血清、及び FAP 患者の組織から抽出したアミロイドを用いた Western Blot の結果、T24 は健常人や FAP 患者の血清を認識せず、一方で FAP 患者の臓器に沈着したアミロイドを特異的に認識した。以上より、T24 は血中で作用する四量体 TTR を認識せずに、TTR アミロイドを特異的に認識する抗体であり、

FAP 治療用の候補のみならず、病態解析や FAP の診断にも利用可能な抗体であると考えられた。

第 3 に、取得した T24 のヒトへの投与に向けて、マウス抗体のヒト化を試みた。初めに、ホモロジーモデリングを用いて T24 の立体構造モデルを作成した。作成したモデルから、分子内、及び分子間の相互作用に必要なアミノ酸情報を取得し、T24 の CDR 領域の立体構造を維持するために必要なフレームワーク領域のアミノ酸の推定を行った。次に、鋳型となるヒト抗体に対し、得られた情報を加味し、T24 の CDR 配列、及びフレームワーク領域の一部のアミノ酸を移植したヒト化抗体を作製し、抗原結合能を ELISA で確認した。得られた結果を元に、移植するアミノ酸を変更・追加したヒト化抗体の改良版を作製し、同様に抗原結合能を確認した。以上の検討を繰り返し、最終的に T24 と同等の結合活性を持つヒト化抗体 RT24 を創出した。CDR 配列以外に移植したアミノ酸はいずれも、H 鎖と L 鎖の境界面の維持や CDR ループ構造の維持等に重要な役割を果たしていると考えられた。

第 4 に、抗体が有する TTR 線維形成阻害活性を、*in vitro* で評価できるアッセイ系の構築を試みた。これまで、TTR の線維化を短時間で行うためには、TTR を酸性 pH 下で反応させる必要があった。しかし、酸性 pH 下に曝すことで抗体は変性してしまうため、抗体が有する TTR 線維化形成阻害活性の評価が行えなかった。そこで、中性 pH 下において短時間で TTR の線維化が進行する条件の探索を行った。界面活性剤に着目し、使用する界面活性剤の種類と濃度、反応時間の検討を進めた。その結果、0.1%デオキシコール酸ナトリウムを含む PBS 溶液を用いて 37℃で 3 日間反応させることで、中性条件下においても TTR の線維化が進行することを見出した。この条件を利用し、抗体の TTR 線維化阻害試験系の構築に成功した。

最後に、得られた抗体が FAP 治療薬として望ましい特性を有しているか検証するため、TTR のアミロイド化のステップに対して RT24 が作用するか評価を行った。TTR の線維化、沈着が進行するステップ（図 1. ①）に対しては TTR 線維化阻害試験、及び FAP モデル動物を用いた TTR 沈着抑制能評価試験を、既に組織に沈着してしまったステップ（図 1. ②）に対してはマクロファージ貪食作用促進活性試験を行った。

- TTR 線維化阻害試験：V30M TTR と RT24 を混合した後、0.1%デオキシコール酸ナトリウムを含む PBS 環境下で 37℃ 3 日間静置し、TTR 線維形成の程度を評価した。その結果、RT24 添加群において抗体濃度依存的に V30M TTR の線維化は有意に抑制された。よって、RT24 は V30M TTR の線維化抑制作用を有することが確かめられた。
- TTR 沈着抑制能評価試験：FAP の疾患モデル動物として、ヒト V30M TTR

トランスジェニックラットが開発されており、12～18 ヶ月齢のラット消化管に **TTR** の沈着が認められる。そこで、**TTR** が沈着する前の 3 ヶ月齢のトランスジェニックラットに対し、**T24**、又は **PBS** を週 1 回、6 か月間投与し、大腸の筋層における **TTR** 沈着の程度を数値化した（長期間の投与となるため、ラットに対する免疫原性を考慮し、よりラット抗体の配列に近い **T24** を使用した）。その結果、**T24** 投与群において **TTR** の沈着を抑制する傾向が認められ、**T24** は **V30M TTR** の組織への沈着をある程度抑える作用を有すると考えられた。また、6 か月間に亘る投与期間中、生化学的データに変化は認められず、**T24** は長期間投与しても安全であると考えられた。

- ・マクロファージ貪食作用促進活性試験：**TTR** が沈着した臓器に対して **RT24** が結合することで、抗体のオプソニン化により、マクロファージの **TTR** 貪食能が亢進されるかどうかを *in vitro* で評価するための試験として実施した。iPS 細胞から誘導したマクロファージに **RT24**、及び組換え **TTR** (**V30M TTR** 線維、または野生型 **TTR** 四量体) を添加して 37℃で 3 日間静置し、液中の **TTR** の残量を **ELISA** で定量化した。その結果、**RT24** 添加群において **V30M TTR** 線維の量は有意に減少し、一方で、野生型の **TTR** 四量体の量に有意な変化は認められなかった。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作用を有しており、**RT24** の投与により、組織に沈着した **TTR** を除去する効果が期待できると考えられた。

以上の結果から、**RT24** は、**FAP** の治療薬として必要な特性を有していると考えられ、ヒトへの投与を狙える、**FAP** 治療用抗体医薬品候補の創出に成功した。本抗体は、正常型 **TTR** には作用せず、変異型 **TTR** によるアミロイド形成のみを抑えるという新たな治療戦略を可能にすると考えられ、安全性に優れた新規治療法を提供するものと期待される。現在、本抗体の臨床応用に向けた評価を、海外の製薬ベンチャーと共同で実施している。

以上