

最終報告

抗体医薬の問題を解決し、これを代替する新しい医薬の開発

研究代表者：森健 九州大学 准教授

共同研究者：原田結 九州大学 准教授



1. 研究の背景と達成目標

がんや自己免疫疾患の治療を目的とした抗体医薬は非常に高い効果を示すものの、薬価が高いため、今後、ますます国家財政を圧迫すると予想される。また、抗体医薬は、これに対する中和抗体（抗薬物抗体）が高い頻度で生成し、薬効が失われてしまう。これらの問題にも関わらず、今も新しい抗体医薬の開発が続けられているのは、低分子医薬にはない優れた機能を有するためである。抗体は定常領域(Fc)に由来する様々な機能を示す。Fc 領域は、ナチュラルキラー(NK)細胞などの免疫細胞の受容体(Fc γ R)と相互作用することで、標的細胞に対して細胞死（抗体依存性細胞傷害：ADCC）を誘導できる（図1左）。さらに、Fc 領域は上皮細胞などに存在する受容体（FcRn）と相互作用することで、エンドサイトーシスによる分解を回避することができるため、一般の血清タンパク質とは異なり、非常に長い血中半減期を示し、効果が長時間、持続する。

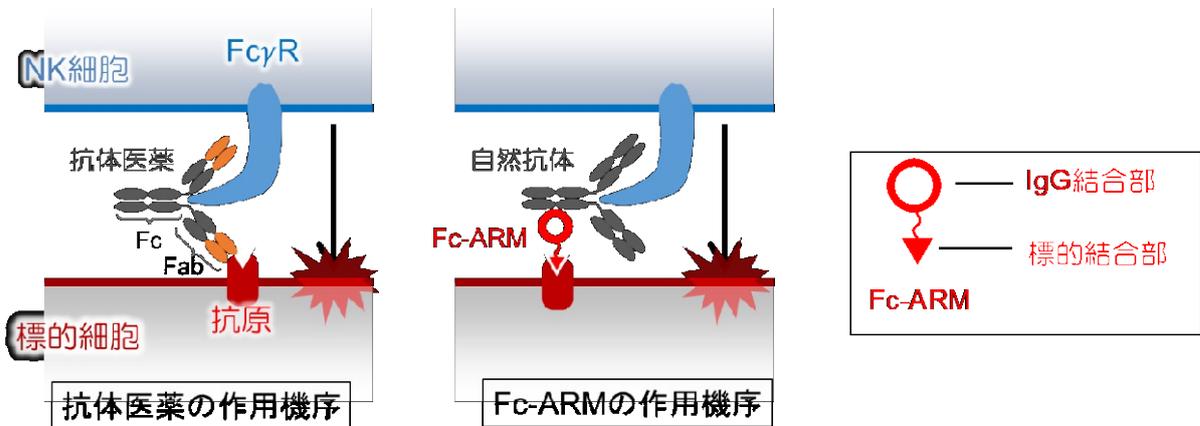


図1. 抗体医薬（左）および Fc-ARM が誘導する ADCC（右）

本研究では、抗体医薬が抱える上述の二つの問題を根本的に解決しつつ、抗体の作用機序を維持した新しい医薬として、「Fc-ARM」と名付けた分子の開発を目指す。これは、血中に大量に存在する抗体を標的細胞に向かわせることのできる分子である。ヒトの血中には、病原体や日常的に暴露される化学物質に対する抗体（自然抗体）が大量に存在する。この自然抗体を治療に用いるという戦略である（図1右）。Fc-ARM を従来の抗体医薬の問題を解決する実用的な医薬とするために、抗体医薬と同等の抗がん効果を示し、抗薬物抗体（ADA）を産生しない医薬を開発する。そのために、以下の項目を達成する。

- 現有の Fc-ARM の問題点の洗い出しを行いつつ、評価系を確立する。
- 抗体並みの親和性を持つ Fc 結合性のペプチドもしくは小タンパク質を探索する。
- 抗体に匹敵する性能をがん細胞傷害性と血中半減期において達成する。

- 抗体に比べて抗薬物抗体が産生しにくい Fc-ARM を達成する。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ① ペプチド型の Fc-ARM は、Fc に対する親和性の向上に伴い、ADCC を増強できた。したがって、Fc 親和性が ADCC の強度を制御するという仮説が証明され、Fc-ARM 開発の重要な指標が得られた。
- ② ペプチド型の Fc-ARM について、抗薬物抗体が産生しないことを明らかにした。
- ③ 既存の Fc 結合性の小タンパク質で作製した Fc-ARM による ADCC の誘導に成功した。しかし、従来の抗体医薬に比べて ADCC が劣っていた。したがって、次項④で見出した高親和性の Fc 結合性タンパク質により大きな改善が期待される。
- ④ 抗体医薬に匹敵する親和性 (K_d ~数 nM) でヒトおよびマウス抗体の Fc に結合する小タンパク質を計 4 種、見出した。これらは、Fc-ARM のみならず、細胞への抗体修飾などさまざまに応用可能なツールとなる。
- ⑤ がん細胞への Fc-ARM の結合法として、がん抗原への結合ではなく、がん細胞膜に結合する pH-ARM の開発を目指した。これは、Fc-ARM の潜在的な問題点である耐性獲得した腫瘍にも適用できる一般性の高い戦略である。

3. 研究成果

① ペプチド型 Fc-ARM の Fc 親和性の影響

親和性を向上させた Fc 結合性ペプチドを作製し、葉酸をがん標的リガンドとするペプチド型 Fc-ARM を作製した。その *in vitro* における ADCC を、これまで用いてきた Fc-ARM と比較したところ、細胞傷害性が大きく向上した (図 2)。以上より、仮説として立てた「Fc-ARM が誘起する ADCC が、抗原/Fc-ARM/抗体の三元複合体の安定性に依存すること」を示す証拠を得た。

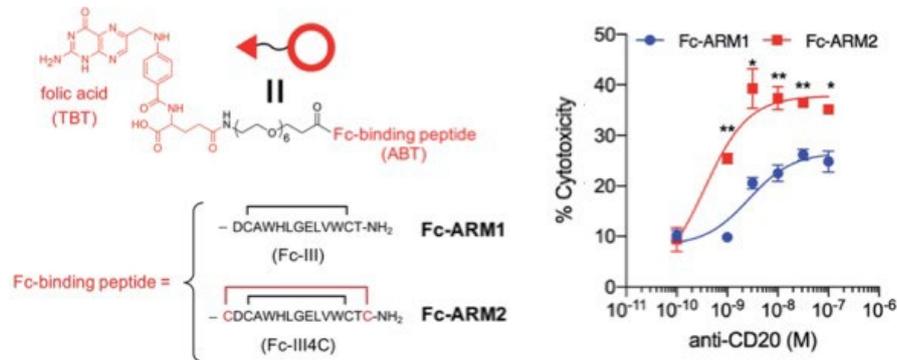


図 2. ペプチド型 Fc-ARM の Fc 親和性の影響

② ペプチド型 Fc-ARM の抗原性

ペプチド型 Fc-ARM について、その抗原性をマウスで評価した。対象として用いたヒト IgG は抗体を誘導したのに対して、Fc-ARM は抗体を誘導しないことを明らかにした。

③ 小タンパク質型 Fc-ARM の細胞傷害性

Fc 結合性のタンパク質として、protein G の Z ドメインを用い、Her2 結合する Affibody をがん標的部として用いたすべてがタンパク質で構成された小タンパク質型の Fc-ARM を作製した。Z ドメイン数を増やすことにより、Fc 親和性を増強できると考え、Z ドメインを 2 個連結した。その結果、抗体に対して高い親和性と結合時間を実現した ($K_d = 0.3$ nM、結合時間 98 分)。実際に、この Fc-ARM (A-ZZ)

は、in vitro で ADCC を誘導できたが、Z ドメインが一個のみの Fc-ARM (A-Z) では ADCC を誘導できなかった (図 3)。以上の結果からも Fc-ARM の ADCC 能は、Fc 親和性に依存することが示された。

④ Fc 結合性タンパク質の探索

nanobody をスカフォールドタンパク質とする巨大な候補ライブラリーを用いて、ヒト IgG およびマウス IgG の Fc に高い親和性で結合する nanobody を探索した。抗体医薬に匹敵する親和性 (Kd ~ 数 nM) を有する Fc 結合生タンパク質 4 種を見出した。現在、これらに対して特定残基の変異体ライブラリーを作製し、さらに親和性の高いものを選定中である。

⑤ pH-ARM の開発

がんは化学療法や免疫療法の標的となるタンパク質を欠失させるなどして、治療耐性を獲得する。これは、抗体医薬と Fc-ARM にとっても問題となる。本研究では、腫瘍の酸性に反応して細胞膜に集積する新概念の AMR として、pH-ARM の開発を目指した (図 4)。まず、細胞膜に挿入するペプチドを探索した。ヒトの膜貫通タンパク質について、酸性 pH に反応して細胞膜に挿入する配列をデータベース上で探索した。候補となるペプチドについて数種を合成して、酸性応答的にがん細胞に集積するペプチドを得た。このペプチドをがん標的部として合成した pH-ARM は、実際に pH 応答的にがん細胞に抗体をリクルートした。

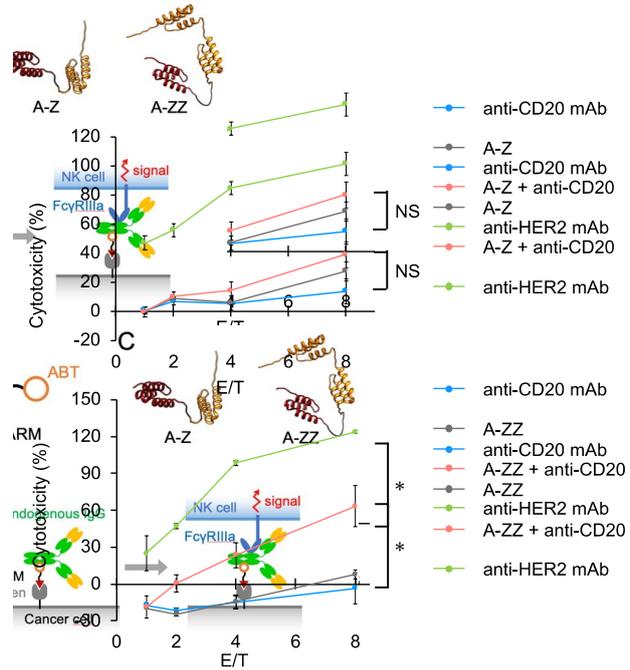


図 3. タンパク質型 Fc-ARM の Fc 親和性の影響

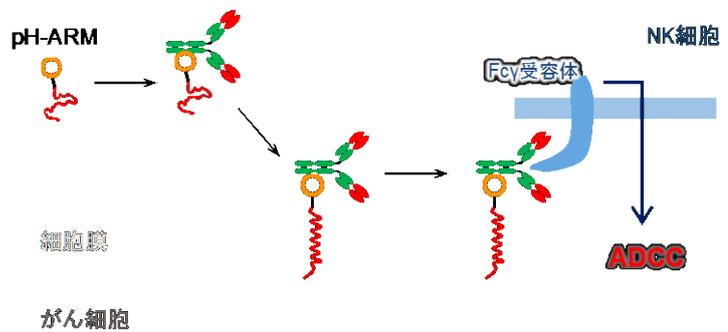


図 4. pH-ARM の作用機序

4. 今後の展開

本研究により、Fc-ARM 戦略についての仮説である抗原性と Fc 親和性の重要性を明らかにすることができた。

また、Fc-ARM において最重要の改善すべき点として、Fc 親和性の向上に取り組み、抗体に匹敵する親和性を持つ Fc 結合性の小タンパク質を巨大な候補ライブラリーから見出すことに成功した。我々による 2020 年の最初の Fc-ARM の報告の後、昨年、標的指向性ペプチドの開発で著名な Peptidream 社が Fc-ARM の開発を始めると発表した。今後、Fc-ARM は抗体医薬に変わる医薬として、アカデミアのみならず企業でも開発が進むと期待される。また、我々は Fc-ARM をはじめとするがん抗原標的化戦略が潜在的に抱える問題であるがんの耐性獲得に対して、これを克服する pH-ARM のアイデアを提案し、探索したペプチドにより、酸性応答的に抗体をがん細胞にリクルートできることを示した。

Fc-ARM は、血中に豊富に存在する自然抗体を本来の標的とは異なるがん細胞に「re-direction」するものである。今後、我々は、Fc-ARM の上位概念である re-direction に従って、アイデアを提案していく予定である。

発表実績

【論文】

1. H. Tagawa, R. Saeki, C. Yamamoto, K. Tanito, C. Tanaka, S. Munekawa, T. Nii, A. Kishimura, H. Murakami, T. Mori*, Y. Katayama*, The effect of affinities to Fc region of protein-based ARMs on the antibody-dependent cellular cytotoxicity, submitted.
2. R. Saeki, S. Kobayashi, R. Shimazui, T. Nii, A. Kishimura, T. Mori*, M. Tanaka*, Y. Katayama*, Characterization of polypropyleneimine as an alternative transfection reagent, *Anal. Sci.*, **39**, 1015–1020 (2023).
3. 森 健, 細胞をがん細胞にリクルートする分子の進歩, 生物工学会誌, 101, 628–629 (2023).
4. K. Sasaki, M. Harada, T. Yoshikawa, H. Tagawa, Y. Harada, Y. Yonemitsu, T. Ryujin, A. Kishimura, T. Mori*, Y. Katayama*, Fc-binding antibody-recruiting molecules targeting prostate-specific membrane antigen: defucosylation of antibody for efficacy improvement, *ChemBioChem*, **22**, 496–500 (2021).
5. K. Sasaki, K. Muguruma, R. Osawa, A. Fukuda, A. Taniguchi, A. Kishimura, Y. Hayashi*, T. Mori*, Y. Katayama*, Synthesis and biological evaluation of a monocyclic Fc-binding antibody-recruiting molecule for cancer immunotherapy, *RSC Med. Chem.*, **12**, 406–409 (2021).
6. K. Tanito, Y. Oshiro, H. Tagawa, A. Kishimura, T. Mori*, Y. Katayama*, Comparative evaluation of natural killer cell-mediated cell killing assay based on the leakage of an endogenous enzyme or a pre-loaded fluorophore, *Anal. Sci.*, **37**, 1571–1575 (2021).

【学会発表】

1. 森 健, 免疫を制御するナノメディシン, 遺伝子・デリバリー研究会第 21 回夏期セミナー, 2023 年 8 月 27 日, 長崎【招待講演】
2. 森 健, 免疫系に見つからない/寛容される材料・医薬開発の試み, 第 13 回 CSJ 化学フェスト 2023, 東京, 2023 年 10 月 17 日, 東京【招待講演】
3. 宗川 彰毅, ヒト膜貫通タンパク質を由来とする新規酸性環境標的化ペプチドの探索, 第 45 回バイオマ, テリアル学会大会, 2023 年 11 月 6 日, 神戸【優秀ポスター賞】
4. 山本 智勇, 内在性抗体を利用して抗腫瘍効果を示すタンパク質医薬の開発, 日本バイオマテリアル学会大会, 2023 年 11 月 6 日, 神戸
5. 田川 寛, 内在性抗体とがん抗原を架橋し ADCC を誘導する二価性分子の開発, 第 38 回日本 DDS 学会学術集会, 2022 年 7 月 1 日【優秀発表賞】
6. 森 健, 抗体医薬はペプチド医薬で置き換えられるか, バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム, 2022 年 9 月 8 日, 名古屋【招待講演】
7. 山本 智勇, 内在性抗体を利用し抗腫瘍免疫応答を引き起こすペプチド医薬の開発, 日本バイオマテリアル学会 2022 年度九州ブロック研究発表会, 2022 年 12 月 9 日, 熊本【優秀ポスター賞】
8. 田川 寛, 内在性抗体をがん細胞に集積させ細胞傷害を誘導するがん免疫治療薬の開発, 第 15 回バイオ関連化学シンポジウム, 2021 年 9 月 8 日
9. 谷戸 謙太, GFP-fusion method for screening new transmembrane peptides, 第 8 回アジアバイオマテリアル学会, 2021 年 11 月 28 日
10. 田川 寛, Bispecific small molecules recruiting endogenous antibodies to cancer cells for inducing antitumor effect, Pacificchem 2021, 2021 年 12 月 18 日

【特許】

1. 森 健, 片山佳樹, 山本 智勇, 原田 結, 米満 吉和, NK 細胞の化学的改変技術, 出願準備中.