

1b) 100 μ Lを眼窩静脈叢から接種した。

Day0、day7、day14、day21、day28、day35、day42の採血液を用いて血清中HCVゲノムRNA量を測定した。採取した血清5 μ LからSepaGene RV-R (エーディア株式会社) を用いてRNA抽出を行い、RNAを1 mM DTT (Promega) と 0.4 U/ μ L ribonuclease inhibitor (Takara Bio) を含む 10 μ L の Nuclease-free water (Life Technologies) に溶解した。PCR反応液は、溶解したRNA原液もしくは希釈したRNAを 2.5 μ L と TaqMan EZ RT-PCR Core Reagents (Life Technologies) を用いて調製した。PCR反応と解析にはABI Prism 7500 (Life Technologies) を用いた。RT-PCR反応は、50°C 2分→60°C 30分→95°C 5分→(95°C 20秒→62°C 1分) の50サイクルで行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、現段階ではヒト臨床材料・実験動物等を直接用いていない。そのために倫理面での問題はない。

C. 研究結果

C-1 細胞レベルでのCL-1抗体の安全性の検討

以下の3種類の検討を行った。

1) タイトジャンクションへのCL-1の分布に対する抗CL-1モノクローナル抗体の影響

これまでの検討から、抗 CL-1 抗体のうち、クローン 2C1 と 3A2 は 0.2 μ g/ml 程度で、クローン 7A5 は 1 μ g/ml 程度で強く

HCV 感染を阻害し、クローン 5F2 は 5 μ g/ml 程度で有意に HCV 感染を阻害することがわかっている。そこで、各抗体 5 μ g/ml で 4 日間細胞を処理し、タイトジャンクションへの CL-1 の分布に対する抗 CL-1 モノクローナル抗体の影響を検討した。その結果、CL-1 のタイトジャンクションへの分布は抗 CL-1 モノクローナル抗体処理により影響を受けない事が明らかとなった(図 1)。

2) タイトジャンクションのインテグリティに対する抗CL-1抗体の影響

次に、タイトジャンクションのインテグリティについて、BC の数を測定することにより行った。コンフルエント状態になった HepG2 細胞をコントロール抗体及び各 CL-1 抗体を 5 μ g/ml で 4 時間処理後、5 μ M CMFDA で BC を染色し、BC 数を測定した。ポジティブコントロールとして TNF α (0.1 μ g/ml) の処理も行った。その結果、TNF α 処理により BC 数の低下が見られた一方で、コントロール抗体及び各 CL-1 抗体処理では BC 数に変化は見られなかった(図 2)。このことから、タイトジャンクションのインテグリティは抗 CL-1 モノクローナル抗体処理により影響を受けない事が考えられた。

3) タイトジャンクションバリア機能に対する抗CL-1抗体の影響

タイトジャンクションのバリアがタイトに形成されるヒト小腸上皮細胞由来 Caco-2 細胞を用い検討を行った。Transwell chamber上でシールを形成した Caco-2細胞に対して、1, 10, 50 μ g/mlの

各CL-1抗体を処理し、細胞上下の抵抗値を経時的に測定した。ポジティブコントロールとして用いたm19ペプチドでは経時的に抵抗値が低下し、タイトジャンクションが破綻している一方で、各CL-1抗体処理では50 µg/mlの濃度でも抵抗値の低下が見られなかった(図3)。以上の結果から、Claudin-1抗体はバリア機能に影響しない事が強く考えられた。

B-3 in vivo HCV感染阻害能測定

In vivoのHCV感染系については、チンパンジーを用いることが現実的でない現在、効率的な感染が見られる唯一の系が本研究で用いたヒト肝臓キメラマウスを用いる系である。

本感染阻止実験を行うに当たり、まず、ヒト肝細胞が低置換率のヒト肝臓キメラマウスを用い、抗CL-1抗体の毒性試験を行った(培養細胞レベルで感染阻害能が高かった、5F2 以外の3クローンについて)。その結果30 mg/kgまで静脈投与を行ったが、明らかなヒトアルブミン値の低下は見られず、ヒト肝細胞への毒性(脱落)は見られないと考えられた。

そこで、3A2, 7A5の2クローンを用いて感染阻止能の検討を行った。感染8時間前にコントロール抗体及び各抗体30 mg/kgで1回処理し、感染後、20 mg/kg、10 mg/kg、10 mg/kgで3回処理を行った。その結果、コントロール抗体処理では、経時的に血中HCV RNAが上昇したのに対して、3A2クローンでは4匹中3匹でHCV RNAが検出されず、残りの1匹も上昇が遅れる傾向が見られた。また、クローン7A5に

についても4匹中1匹でHCV RNAが検出されず、残りのマウスも上昇が遅れる傾向が見られた(図4)。また、CL-1抗体処理マウスでは体重減少、ヒト肝臓への障害性も認められなかった(図5)。以上の結果から、in vivoにおいても抗CL-1抗体は毒性を示さずHCV感染を有意に阻害できることが明らかとなった。なお、in vivoでの感染阻害活性のクローン間の違いは、in vitroでのHCV感染阻害活性の違い(3A2クローンの方が阻害活性が強い)と相関していた。

D. 考察

昨年度までの検討から、樹立した抗CL-1抗体が培養細胞レベルで強いHCV感染阻害能を有することが明らかとなった。本感染実験系では、抗体による細胞毒性は全く見られなかったものの、タイトジャンクション形成への影響は懸念されるころではあった。そこで、今回はまず、細胞レベルでの抗CL-1モノクローナル抗体の安全性(タイトジャンクションバリアへの影響)を検討した。その結果、3つの異なる検討により、感染阻害を示す抗体濃度ではタイトジャンクションのバリア機能に影響を及ぼさないことが明らかとなった。ヒト肝臓キメラマウスでの検討からもヒト肝細胞の機能低下(アルブミンの減少)は見られないことも明らかとなった。このことから、本CL-1抗体はタイトジャンクションの形成や機能に影響を及ぼさずに、HCVの感染を有意に阻害できることが考えられ、創薬シーズとしては、安全性も兼ね備え、非常に有望であると考えられた。

CL-1の生理機能については、CL-1ノックアウトマウスでは皮膚の重層上皮バリアが破綻し、生後24時間以内に死亡することが知られており、皮膚バリアに重要であることがわかっている (Furuse et al., JCB, 2002)。一方、最近の学会において、CL-1ノックダウンマウスでは、幼児期を過ぎた後の成体マウスでは、CL-1発現量がかなり低くても皮膚の異常を始め全身の異常が見られないことが報告された。恐らくは他の分子が機能を相補しているものと考えられる。この事実からも、CL-1の機能阻害が多少生じたとしても、成体では重篤な影響が回避できるのではないかとも思われる。しかしながら、ヒトへの適用を考える場合には、サルや大型動物など、さらなる毒性試験を行う必要があるだろう。サルを使った抗体の体内動態についても情報を収集すべきであろう。

抗HCV作用を示すCL-1抗体としては、これまでにラットモノクローナル抗体が報告されている (HEPATOLOGY 2010; 51:1144-1157) が、*in vivo*でのHCV感染阻害の報告はない。我々の抗体では今回世界で初めて *in vivo*でのHCV感染阻害を示すことができた。ラット抗体に対して我々のマウス抗体は、細胞培養レベルで約1/50-1/500量で同様のHCV阻害活性を示すことから、よりアフィニティの高い優れた抗体である事が考えられ、それゆえに *in vivo*での有効性も見られたのではないかと推察している。

*In vivo*での感染阻害実験では、培養系での実験 (遺伝子型2a) と異なり、遺伝子型1bのHCVを用いた。昨年度、遺伝子型1b

の偽ウイルスを用いた系で培養細胞レベルでのウイルス侵入阻害は観察していたが、*in vivo*の実験により実際の1b型ウイルスにおいても抗CL-1抗体が感染を阻止できることが明らかとなった。偽ウイルスを用いた検討では、これまでに知られたすべての遺伝子型のウイルスがCL-1依存的に細胞に侵入することが知られていることから、我々のCL-1抗体は他の遺伝子型のウイルスに対しても阻害能を示す可能性があるものと考えている。

E. 結論

昨年度、4 クローンのマウス抗 CL-1 モノクローナル抗体を樹立し、細胞レベルで強いHCV感染阻害活性を示す事を報告した。本年度は、本抗体の安全性を細胞レベルでまず検討し、HCV感染を阻害する抗体濃度ではタイトジャンクションのバリア機能に影響がないことを示した。さらに、ヒト肝臓キメラマウスを用いた *in vivo* HCV感染系の解析から、検討した 2 クローンの抗 CL-1 抗体 (3A2, 7A5) では、毒性を示さずに HCV感染阻止能を有することが明らかとなった。以上の結果から、創薬シーズとしての抗 CL-1 抗体の有用性をより踏み込んだ形で提示できた。*In vivo*の結果も含め、PCT 特許も出願することができた。以上のように、本年度の目標は十分達成されたと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Maehama T, Fukasawa M, Date T, Wakita T, Hanada K. "A class II phosphoinositide 3-kinase plays an indispensable role in hepatitis C virus replication." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 440(1), 150-156 (2013)
 - 2) Fukasawa M, Cornea A, Varlamov O. "Selective control of SNARE recycling by Golgi retention" *FEBS Letters* 587, 2377-2384 (2013)
 - 3) Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, Suzuki T, Wakita T, and Fukazawa H. "Retinoids and rexinoids inhibit hepatitis C virus independently of retinoid receptor signaling." *Microbes and Infection*, 16, 114-122 (2014)
 - 4) Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly HH, Fukasawa M, Fujimoto A, Suzuki R, Aizaki H, Ito T, Koiwai O, Kusahara H, Wakita T. "Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP" *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 443, 808-813 (2014)
2. 学会発表
- 1) 深澤征義、白砂圭崇、長瀬翔太郎、近藤昌夫、八木清仁、安部 良、花田賢太郎、Claudin 1抗体の樹立と本抗体によるC型肝炎ウイルス感染阻害、第86回日本生化学会大会、横浜、2013. 9. 11-13
 - 2) 白砂圭崇、鈴木哲朗、脇田隆字、花田賢太郎、安部良、深澤征義、C型肝炎ウイルスへの感染感受性を欠損した宿主肝細胞変異株の分離と性状解析、第86回日本生化学会大会、横浜、2013. 9. 11-13
 - 3) Masayoshi Fukasawa, Shotaro Nagase, Mayo Yamashita, Manami Iida, Yoshitaka Shirasago, Akihiro Watari, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita, Kiyohito Yagi, Masuo Kondoh, Inhibition of hepatitis C virus infection by mouse anti-claudin 1 monoclonal antibodies, The 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses , Melbourne, Australia, 2013. 10. 6-10
 - 4) 深澤征義、近藤昌夫、長瀬翔太郎、白砂圭崇、飯田愛未、山下真代、鈴木哲朗、脇田隆字、八木清仁、安部 良、花田賢太郎、宿主Claudin 1—ウイルス相互作用を標的としたC型肝炎ウイルス感染阻害、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013. 11. 10-12
 - 5) 白砂圭崇、鈴木哲朗、脇田隆字、花田賢太郎、安部良、深澤征義、Huh7.5.1細胞由来C型肝炎ウイルス非感染感受性変異株の分離と性状解析、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013. 11. 10-12
 - 6) 谷田以誠、深澤征義、脇田隆字、花田賢太郎、HCV感染におけるVimentinの細胞内分布変化、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013. 11. 10-12

7) Masayoshi Fukasawa, Ryo Anai, Yoshitaka Shirasago, Kyoko Saito, Yuko Murakami, Hidesuke Fukazawa, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita, Jo Chiba, Kentaro Hanada, In vitro and in vivo inhibition of hepatitis C virus infection by mouse anti-human claudin 1 monoclonal antibodies, The 2013 ASCB Annual Meeting, New Orleans, USA, 2013.12.14-18

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

1) (発明者) 近藤昌夫、深澤征義、石井明子、多田稔、八木清仁、渡利彰浩「抗体、フラグメント、分子及び抗 HCV 治療剤」(PCT/JP2013/006602) 出願中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1

タイトジャンクションへのCL-1の分布に対する抗CL-1モノクローナル抗体の影響

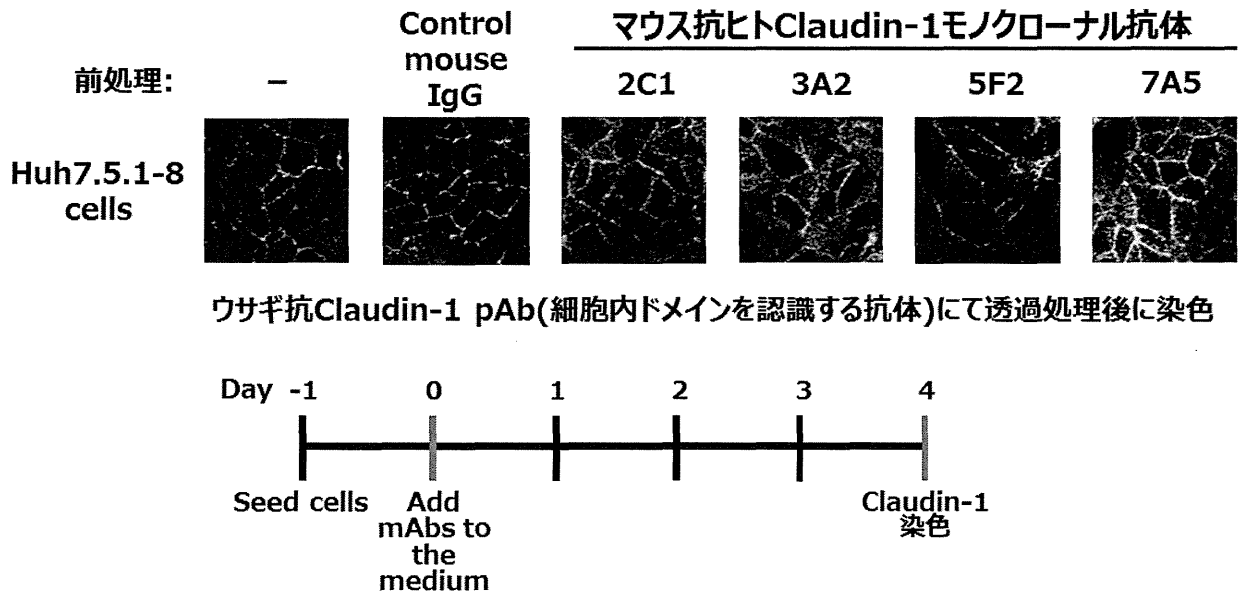


図2

タイトジャンクションのインテグリティに対する抗CL-1抗体の影響

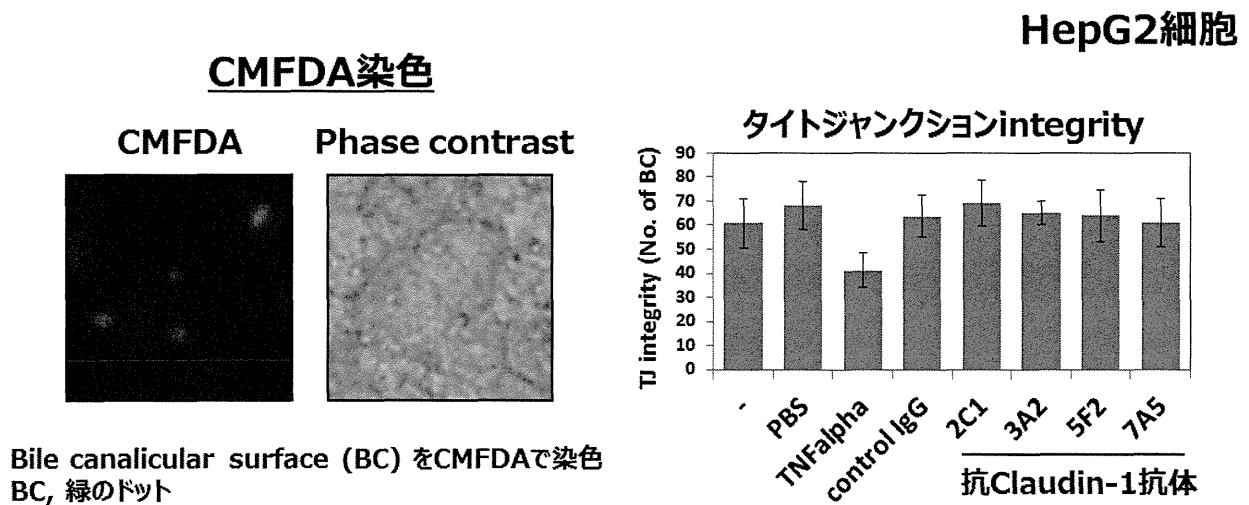
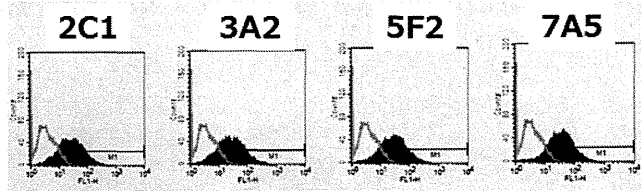


図3

タイトジャンクションバリア機能に対する抗CL-1抗体の影響

Caco-2 細胞への各CL-1抗体の結合



バリア制御活性評価

Caco-2 細胞 (小腸上皮)

抗体添加 (50 µg/mL)

↓
電気抵抗値 (TER) 測定

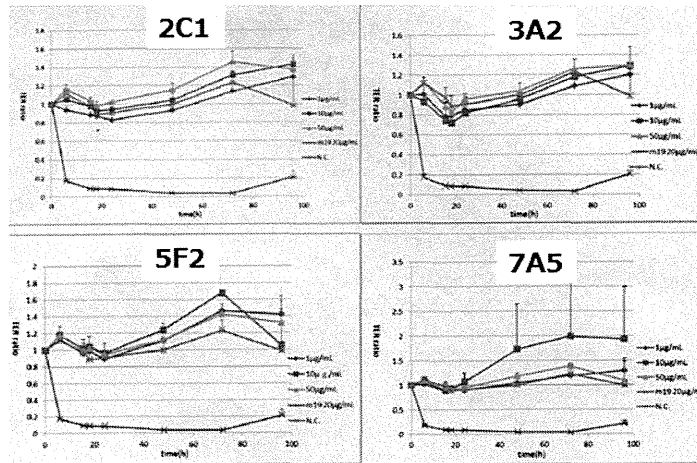
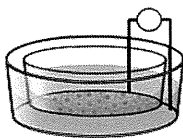
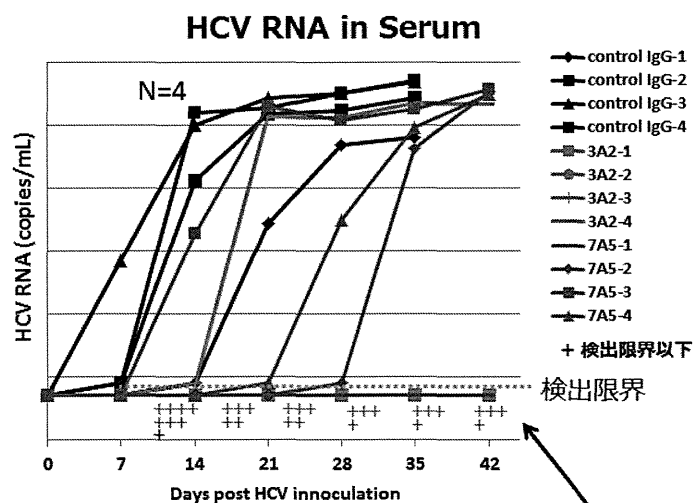
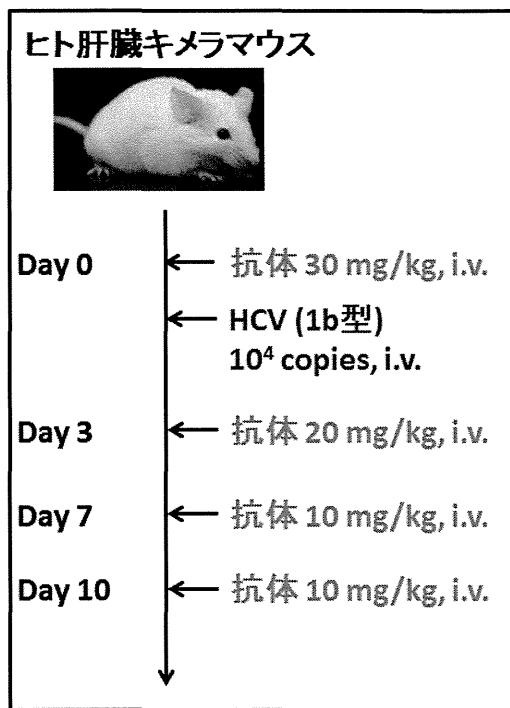


図4

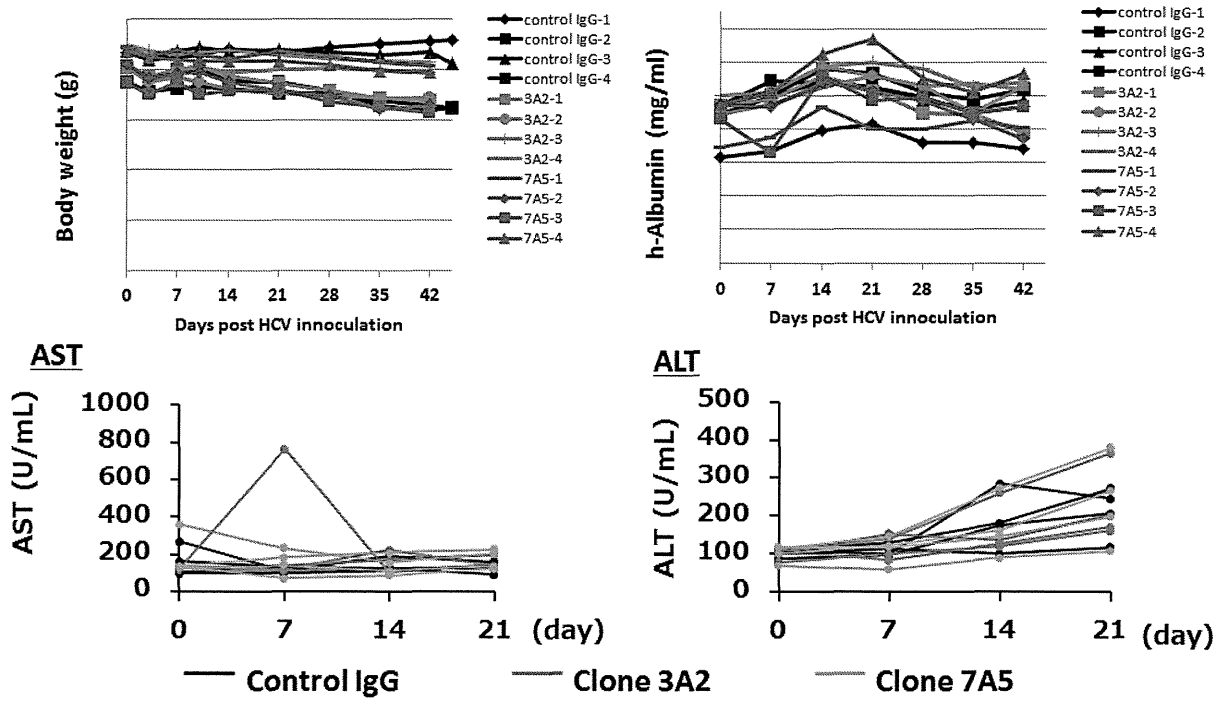
In vivo HCV感染防御試験



3A2の3匹
7A5の1匹
は、検出限界以下
(感染見られず)

図5

抗claudin-1抗体の安全性評価



厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

「Claudin を標的とした創薬基盤技術の開発」

研究報告書

Claudin binder の創製および活性解析

研究分担者 石井明子 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

研究協力者 多田 稔 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

研究要旨

本研究では、大阪大学にて作出された抗ヒト Claudin-1 抗体並びに抗ヒト Claudin-4 抗体に関して、抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC 活性) の発揮に関与する Fc γ 受容体活性化能に着目して、特性解析を実施した。抗 Claudin-1 抗体に関しては、実験に用いた 4 クローン全てが、Claudin-1 発現細胞に対して ADCC 活性を発揮する可能性があることを明らかにした。また、ヒト IgG4 型のキメラ抗体とすることで、ADCC 活性を減弱することが可能であることを見出した。抗 Claudin-4 抗体に関しては、樹立したクローン間で抗原結合に依存した Fc γ 受容体活性化能に差があること、特にクローン 5A5 は他のクローンに比べてより強い Fc γ 受容体活性化能を示す可能性を明らかにした。以上の結果は、抗 Claudin-1 抗体並びに抗 Claudin-4 抗体の創薬開発における、候補クローンの選択及びキメラ抗体作製の際の IgG サブクラスの選択に有用な知見を与えたと考えられた。

A. 研究目的

近年開発の進展の著しい抗体医薬品は、自己免疫疾患や悪性腫瘍等、これまでの化学薬品では治療困難であった様々な疾患の治療に大きく貢献している。抗体医薬品の最大の特徴は標的抗原に対して極めて特異的な結合能を有することであり、抗体医薬品の開発にあたっては、標的抗原に対して結合特異性の高いリード抗体を作出することが必須であることは言うまでもない。加えて、リード抗体の選別においては、抗体医薬品の適応疾患に応じて、目的とする薬理作用を発揮するクローンの選択が重要である。抗体医薬品の発揮する薬理作用は、①中和活性、②細胞傷害活性、③アゴニスト活性の3つに大別される。サイトカインやその受容体等

を標的とする抗体医薬品（抗 TNF α 抗体、抗 IL-6 受容体抗体等）は、受容体を介した細胞応答を阻害することにより薬理作用を発揮する（中和活性）。一方、腫瘍細胞表面に発現する膜タンパク質を標的とする抗体医薬品（抗 CD20 抗体等）は、抗原に結合した抗体の Fc 領域を介して補体経路や NK 細胞等の免疫エフェクター細胞を活性化することにより、補体依存性細胞傷害 (CDC) 活性や抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性を発揮し、標的細胞を攻撃することで薬理作用を発揮する（細胞傷害活性）。また、受容体等の膜タンパク質を標的とする抗体医薬品では、抗体医薬品の結合により標的受容体の介在するシグナル伝達経路を活性化することで薬理作用を発揮する場合もある（アゴニスト活性）。ある抗原を標的とする抗体医薬品が、これらの複数

のメカニズムを介して薬理作用を発揮することも少なくなく、例えば抗悪性腫瘍薬として用いられる抗 EGFR 抗体は、リガンドである EGF を介した細胞増殖シグナルを抑制(中和)することに加え、免疫エフェクター細胞を介した細胞傷害活性により標的腫瘍細胞を殺傷することで薬理作用を発揮する。抗悪性腫瘍薬のように抗原発現細胞の殺傷・除去を目的とする抗体医薬品ではこのような細胞傷害活性は目的とする薬理作用に適した活性である一方で、標的受容体のシグナル中和活性等を目的とする抗体医薬品では、細胞傷害活性が意図せぬ有害作用の発現の要因となり得ることも考慮すべきである。抗体医薬品による細胞傷害活性の発揮には、抗体医薬品の認識する抗原認識部位(エピトープ)が関連することから、抗体医薬品のシーズとなる候補抗体の選別の段階で細胞傷害活性の有無について検討を行うことは、その後の開発戦略の構築(ヒト IgG サブクラスの選択等)に有用な知見を与えらるると考えられる。

本研究では大阪大学にて作出されたマウス抗 Claudin-1 抗体及びラット抗 Claudin-4 抗体をシーズとする抗体医薬品の実用化に向けて、これらクローンの標的発現細胞に対する細胞傷害活性の有無について検討すると共に、ヒトキメラ抗体の発現・精製とそれらの特性解析を実施した。

B. 研究方法

B-1. マウス抗 Claudin-1 抗体及びラット抗 Claudin-4 抗体の Fc γ 受容体活性化能の評価

標的細胞としてヒト Claudin-1 あるいはヒト Claudin-4 を発現する HT1080 細胞(以下、HT1080/hCL-1、HT1080/hCL-4)、レポーター

細胞としてヒト Fc γ RIIa およびカルシウム応答性のレポーター遺伝子(NFAT-Luc)を導入した Jurkat 細胞(以下、Jurkat/Fc γ RIIa/NFAT-Luc)を用いた。標的細胞を 96 穴培養プレートに播種し(1×10^4 cells/well)、37°C、5% CO₂ 条件下で一晩培養した。培養液を除去した後、Opti-MEM® I Reduced Serum Media (Invitrogen) に懸濁した Jurkat/Fc γ RIIa/NFAT-Luc 細胞を播種し(1×10^5 cells/well)、マウスあるいはラットハイブリドーマ由来の各 Claudin 抗体(大阪大学にて調製)の存在下で、5 時間培養した。培養液と等量の ONE-Glo™ Luciferase Assay 試薬(Promega)を添加して懸濁した後、懸濁液 100 μ l を白色アッセイプレートに移し、発光プレートリーダー(Enspire, PerkinElmer)を用いてレポーター細胞で発現誘導されたルシフェラーゼ活性を測定した。

B-2. CHO 細胞を用いたキメラ抗体の発現と精製

FreeStyle™ CHO-S 細胞(Invitrogen)は、終濃度 8 mM となるように L-グルタミンを添加した FreeStyle™ CHO Expression Medium(Invitrogen)を用い、37°C、8% CO₂、125 rpm 条件下で旋回培養した。トランスフェクション前日に、 0.5×10^6 cells/ml となるように調製した細胞懸濁液 150 ml を 500 ml フラスコに播種し、24 時間培養した。トランスフェクション当日、抗体の重鎖及び軽鎖を発現するプラスミドベクター(大阪大学にて調製)を各々 93.75 μ g ずつ 15ml チューブに添加し、総量が 3 ml となるように OptiPro™ SFM(Invitrogen)で希釈した後、FreeStyle™ MAX Reagent(Invitrogen) 187.5 μ l を OptiPro™ SFM で 3 ml に希釈した溶液を加え、6 ml のトランスフェクション

溶液を調製した。CHO-S 細胞懸濁液 150ml に対し、上記のトランスフェクション溶液 6 ml を添加し、37°C、8% CO₂、125 rpm 条件下で旋回培養した。

6 日間培養後、細胞を含む培養液を遠心し、発現抗体を含む約 150 ml の培養上清を得た。あらかじめ Binding buffer (20 mM リン酸バッファー pH6.8) で平衡化した HiTrap Protein G HP カラム (GE ヘルスケア) に培養上清をアプライし、Binding buffer で洗浄した後、0.1M Glycine-HCl (pH3.0) を用いて抗体を溶出した。溶出液は 0.5 ml ずつ回収し、各 37.5 µl の 1M Tris-HCl (pH8.0) を用いて中和した。各画分の抗体濃度を吸光度 (OD₂₈₀) を指標に定量し、抗体濃度の高い 5 画分 (2.5 ml) を、PD-10 カラム (GE ヘルスケア) にアプライし、PBS により溶出することで 3.5 ml の抗体溶液を得た。

B-3. ヒトマウスキメラ抗 Claudin-1 抗体及びヒトラットキメラ抗 Claudin-4 抗体の Fc γ 受容体活性化能の評価

標的細胞として HT1080/hCL1 あるいは HT1080/hCL4、レポーター細胞としてヒト Fc γ RIIIa およびカルシウム応答性のレポーター遺伝子 (NFAT-Luc) を導入した Jurkat 細胞 (以下、Jurkat/Fc γ RIIIa/NFAT-Luc) を用い、B-1 と同様の条件でレポーター細胞の活性化を測定した。

B-4. ヒトマウスキメラ抗 Claudin-1 抗体の ADCC 活性の評価

標的細胞として HT1080/hCL-1 細胞、エフェクター細胞としてヒト末梢血単核球 (CTL 社) を使用した。両細胞をヒトマウスキメラ抗 Claudin-1 抗体

存在下で 37°C、4 時間共培養した (HT1080/hCL-1:PBMC=1:20)。培養上清中に死細胞より放出される LDH の活性を Cytotoxicity Detection Kit (Roche) により測定した。並行して標的細胞に終濃度 1% となるように Triton-X を加えたサンプルを調製し、これから得られた LDH 活性を 100% として死細胞の割合を算出した。

C. 研究結果

C-1. マウス抗 Claudin-1 抗体及びラット抗 Claudin-4 抗体の Fc γ 受容体活性化能の評価

大阪大学にて樹立されたマウス抗 Claudin-1 抗体発現ハイブリドーマの上清を用いて、各クローンの抗原 (Claudin-1) 結合に依存した Fc γ 受容体活性化能を評価した。標的細胞 (HT1080/hCL-1) およびレポーター細胞 (Jurkat/Fc γ RIIIa/NFAT-Luc) をマウス抗 Claudin-1 抗体 (clone 2C1,3A2,5F2,7A5) 存在下で共培養した結果、何れのクローンにおいても、抗体添加濃度に依存したレポーター細胞の活性化が認められた (Fig. 1)。標的細胞非存在下では各クローンによるレポーター細胞の活性化は認められなかった (データ未掲載) ことから、実験に用いたマウス抗 Claudin-1 抗体は何れも抗原結合に依存した Fc γ 受容体活性化能を有することが明らかとなった。

同様に標的細胞として HT1080/hCL-4 を用いて、ラット抗 Claudin-4 抗体 (clone 3B11, 3G2, 4D3, 4F4, 4F10, 9G7, 4B8, 5A5, 5D12, 10A6, 12B2) による Fc γ 受容体活性化能を評価した。その結果、活性化の強度に違いはあるものの、何れのクローンも添加濃度に依存したレポーター細胞の活性化を示し (Fig. 2)、抗原結合に依存した Fc γ 受容体活性化能を有することが明らか

かとなった。

C-2. CHO 細胞を用いたヒトマウスキメラ抗 Claudin-1 抗体 (IgG1) 及びヒトラットキメラ抗 Claudin-4 抗体 (IgG1) の発現と精製

大阪大学にて作製された、ヒトマウスキメラ抗 Claudin-1 抗体 (IgG1) 及びヒトラットキメラ抗 Claudin-4 抗体 (IgG1) の発現ベクターを CHO-S 細胞に導入し、プロテイン A カラムを用いた抗体精製を実施した。精製抗体を非還元条件にて電気泳動した結果を Fig. 3 に示した。ヒトラットキメラ抗 Claudin-4 抗体クローン 4D3 を除き、全ての抗体で分子量 150 k 付近に単一のバンドが検出されたことから、抗体重鎖 (約 50 kDa) 及び軽鎖 (約 25 kDa) が 2 分子ずつ会合した完全抗体の精製が確認された。

C-3. ヒトマウスキメラ抗 Claudin-1 抗体 (IgG1) の特性解析

HT1080/hCL-1 を標的細胞として、ヒトマウスキメラ抗 Claudin-1 抗体 (IgG1) の Fc γ 受容体活性化能を評価した結果、マウス抗体を用いた場合と同様に、何れのクローンでも抗体添加濃度に依存したレポーター細胞の活性化が認められた (Fig. 4A)。各クローンの EC₅₀ 値は、2C1 = 約 65 ng/ml、3A2 = 約 29 ng/ml、5F2 = 約 74 ng/ml、7A5 = 約 15 ng/ml であり、クローン 3A2 及び 7A5 は、クローン 2C1、5F2 と比較して、より強い Fc γ 受容体活性化能を有することが示唆された。

HT1080/hCL-1 (標的細胞) 及びヒト末梢血単核球 (エフェクター細胞) を、クローン 3A2 存在下で共培養した結果、抗体添加濃度に依存した細胞傷害活性が認められ (Fig. 4B)、ヒトマウスキ

メラ抗 Claudin-1 抗体 (IgG1) は Claudin-1 発現細胞に対して ADCC 活性を発揮することが示唆された。

C-4. ヒトラットキメラ抗 Claudin-4 抗体 (IgG1) の特性解析

HT1080/hCL-4 を標的細胞として、ヒトラットキメラ抗 Claudin-4 抗体 (IgG1) の Fc γ 受容体活性化能を評価した結果、ラット抗体を用いた場合と同様に、何れのクローンでも抗体添加濃度に依存したレポーター細胞の活性化が認められた (Fig. 5)。本実験条件の抗体濃度では最大反応に達していないクローンがあるため、EC₅₀ 値の比較はできないが、クローン 5A5 は他のクローンと比較してより低濃度でエフェクター細胞の活性化が認められており、抗原結合に依存した Fc γ 受容体活性化能が高いクローンであることが示唆された。

C-5. ヒトマウスキメラ抗 Claudin-1 抗体 (IgG4、IgG4m) の発現・精製及び特性解析

上記のように、ヒトマウスキメラ抗 Claudin-1 抗体 (IgG1) において、抗原結合に依存した Fc γ 受容体の活性化及び Claudin-1 発現細胞に対する ADCC 活性が認められたため、これらの低減を目的として、ヒト IgG4 骨格を有するヒトマウスキメラ抗 Claudin-1 抗体 (IgG4) を作製した。大阪大学にて作製されたヒトマウスキメラ抗 Claudin-1 抗体 (IgG4) の発現ベクターを CHO-S 細胞に遺伝子導入し、プロテイン A カラムを用いた抗体精製を実施した。精製した IgG4 型のキメラ抗体は IgG1 型のキメラ抗体と同様の分子量 (約 150 kDa) に主要なバンドが認められる一方で、75 kDa 付近にもバンドが検出された (Fig. 6)。

ヒト IgG4 はヒンジ領域のシステイン残基が鎖内ジスルフィド結合を形成することがあるため、重鎖及び軽鎖一分子ずつからなる半量体 (half-antibody) を形成することが知られており、実験に用いた IgG4 型キメラ抗体で検出された 75 kDa 付近のバンドは半量体に相当するものであると考えられた。そこで、重鎖のヒンジ領域に変異を導入することにより、鎖間ジスルフィド結合の安定性を向上した IgG4 変異体 (IgG4m) を骨格とするキメラ抗体を作製し、半量体に相当するバンドが認められないことを確認した (Fig. 6)。

標的細胞として HT1080/hCL-1、レポーター細胞として Jurkat/Fc γ RIIIa/NFAT-Luc を用い、ヒトマウスキメラ抗 Claudin-1 抗体 (IgG1, IgG4, IgG4m) の Fc γ 受容体活性化能を評価した結果、IgG1 型のキメラ抗体とは異なり、IgG4 および IgG4m 型のキメラ抗体では抗原結合に依存した Fc γ 受容体活性化能が著しく減弱していることが明らかとなった (Fig. 7A)。

続いてヒト末梢血単核球をエフェクター細胞として用いた ADCC 活性を測定した結果、IgG1 型のキメラ抗体 (2C1 IgG1, 3A2 IgG1) は添加濃度に依存して HT1080/hCL-1 に対する細胞傷害活性を発揮した一方で、IgG4 型のキメラ抗体 (2C1 IgG4, 3A2 IgG4) では細胞傷害活性は認められなかった。

以上の結果から、ヒトマウスキメラ抗 Claudin-1 抗体のヒト IgG サブクラスを IgG1 から IgG4 にすることにより、抗原結合に依存した Fc γ 受容体活性化能及び抗原 (Claudin-1) 発現細胞に対する ADCC 活性を抑制可能であることが明らかとなった。

D. 考察

D-1. 抗 Claudin-1 抗体の特性解析

本研究では大阪大学にて作製され、HCV 感染阻害薬あるいは抗悪性腫瘍薬としての創薬応用に向けて研究開発の進む抗 Claudin-1 抗体に関して、抗体 Fc 領域を介した免疫エフェクター細胞の活性化ならびにそれに伴って発揮される ADCC 活性に着目し、各抗体クローンの特性解析を実施した。

Fc γ 受容体発現レポーター細胞を用いた実験の結果、ハイブリドーマ由来のマウス抗 Claudin-1 抗体 4 クローン (2C1, 3A2, 5F2, 7A5) は何れも Claudin-1 結合に依存した Fc γ 受容体活性化能を有することが明らかとなった (Fig. 1)。大阪大学ならびに国立感染症研究所で実施された解析により、これらのクローンは異なる抗原エピトープを認識することが明らかとなっているが、本実験により、何れのクローンもエピトープの違いに依らず標的細胞に発現する Claudin-1 との結合により、免疫エフェクター細胞を活性化する可能性が示された。なおマウス IgG サブクラスによりヒト Fc γ 受容体に対する結合親和性が異なることが予想されるため、クローン間の活性の違いについては、本実験結果から推測することは困難であると考えられた。

次に、マウス由来の各抗体クローンの可変領域とヒト IgG1 の定常領域からなる、ヒトマウスキメラ抗 Claudin-1 抗体 (IgG1) の特性解析を実施した。マウス抗体と同様に HT1080/hCL1 を標的として Fc γ 受容体発現レポーター細胞の活性化を測定した結果、マウス抗体の結果から予測された通り、何れのクローンも抗原結合に依存した Fc γ 受容体活性化能を有することが明らかとなった (Fig. 4A)。また、EC₅₀ 値の比較から、

3A2 及び 7A5 が他の 2 クローンに比べて Fc γ 受容体活性化能に優れたクローンである可能性が示された。続いて Fc γ 受容体活性化能の高い 3A2 を用いて、HT1080/hCL-1 に対する ADCC 活性を測定した結果、抗体添加濃度に依存した細胞傷害活性が認められた。我々は他の実験により、レポーター細胞を用いて測定した Fc γ 受容体活性化能と ADCC 活性が良い相関を示すことを明らかにしており、本実験の結果から、3A2 以外の 3 クローンも各々の Fc γ 受容体活性化能に応じて、Claudin-1 発現細胞に対して ADCC 活性を発揮すると考えられた。

以上の結果から、本研究で解析したヒトマウスキメラ抗 Claudin-1 抗体 (IgG1) は何れも Claudin-1 を発現する腫瘍細胞に対して細胞傷害活性を発揮しうる、抗悪性腫瘍薬として有望である可能性が示された。

一方で、HCV 感染阻害薬としての適応を考える上では、Fc γ 受容体を介した免疫エフェクター細胞の活性化や標的細胞に対する細胞傷害活性は、意図せぬ有害反応を引き起こす要因となることから、望ましくない活性であるといえる。そこで、ヒト IgG1 と比べて Fc γ 受容体親和性の低い IgG4 およびジスルフィド結合の安定性を向上した IgG4 変異体 (IgG4m) を用いてヒトマウスキメラ抗体 (2C1、3A2) を作製し (Fig. 6)、その特性解析を実施した。Fc γ 受容体発現レポーター細胞を用いた実験の結果、期待した通り、IgG4 及び IgG4m 型のキメラ抗体では、IgG1 型のキメラ抗体に比べて、抗原結合に依存した Fc γ 受容体活性化能が著しく低下していることが明らかとなった (Fig. 7A)。また、IgG4 型のキメラ抗体では IgG1 型のキメラ抗体で認められた、Claudin-1 発現細胞に対する ADCC 活性が減弱していること

も確認された (Fig. 7B)。以上の結果から、IgG4 型のヒトマウスキメラ抗 Claudin-1 抗体は、免疫エフェクター細胞の活性化を低減することで、有害反応の発生リスクの少ない HCV 感染阻害薬として有用であることが示唆された。

D-2. 抗 Claudin-4 抗体の特性解析

本研究では大阪大学にて作製され、抗悪性腫瘍薬としての創薬応用に向けて研究開発の進む抗 Claudin-4 抗体に関して、ADCC 活性の発揮に寄与する Fc γ 受容体活性化能に関する特性解析を実施した。

Fc γ 受容体発現レポーター細胞を用いた実験の結果、ハイブリドーマ由来のラット抗 Claudin-4 抗体 11 クローンは何れも Claudin-4 結合に依存した Fc γ 受容体活性化能を有することが明らかとなった (Fig. 2)。ラット IgG サブクラスが同一のクローン間の比較では、ラット IgG2b サブクラスにおいては 4D3,4F3 > 9G7,3G2 > 4F2 > 3B11、IgG2a サブクラスにおいては 5A5 > 5D12 の順に強い Fc γ 受容体活性化能を示す傾向が認められた。次に CHO 細胞を用いて発現したヒトラットキメラ抗 Claudin-4 抗体 5 クローン (Fig. 3B) を用いて、同様の手法で Claudin-4 結合に依存した Fc γ 受容体活性化能を測定した結果、5A5 > 3G2,4B8 > 3B11,5D12 の順に強い活性を有することが明らかとなった (Fig. 5)。大阪大学にて実施された表面プラズモン共鳴法を用いた結合実験の結果、Claudin-4 に対する結合親和性は、5D12 ($K_D=1.41$ nM) > 5A5 (4.35 nM) > 4B8 (23.72 nM) > 3G2 (59.88 nM) > 3B11 (68.51 nM) の順に強いことが明らかとなっており、5A5、4B8、3G2、3B11 では、Claudin-4 結合親和性と Fc γ 受容体活性化能に相関関係が認めら

れた。一方、5D12 は他のクローンと比べて高い Claudin-4 結合能を示しながらも、Fc γ 受容体活性化能が低いことが明らかとなり、抗原エpiteープの違いが Fc γ 受容体活性化能に影響を及ぼす可能性が考えられた。このようなクローン間の差異は、ラット抗体を用いた実験でも検出されており (Fig. 2)、高 ADCC 活性を発揮する候補クローンの選別においては、Fc γ 受容体発現細胞を用いた実験系が有用であることが示唆された。

今回解析に用いたヒトラットキメラ抗 Claudin-4 抗体 5 クローンの中で最も高い Fc γ 受容体活性化能を示した 5A5 は、Claudin-4 発現癌細胞を移植した担癌マウスに対して、抗腫瘍活性を発揮することが明らかとなっており (大阪大学にて実施)、Fc γ 受容体の活性化を介した ADCC 活性が抗腫瘍活性の発揮に関与する可能性が考えられる。今後、Claudin-4 発現癌細胞株に対する *in vitro* の ADCC 活性を評価することに加え、ADCC 活性の異なる改変型抗体等を用いた実験により、抗 Claudin-4 抗体の抗腫瘍活性の発揮に関わる薬理作用メカニズム (MOA; Mechanism of Action) の理解が進むことが期待される。

E. 結論

本研究では、大阪大学にて作出された抗ヒト Claudin-1 抗体並びに抗ヒト Claudin-4 抗体について、抗原発現細胞に対する ADCC 活性の発揮に関与する Fc γ 受容体活性化能に着目して、各クローンの特性解析を実施した。

抗 Claudin-1 抗体に関しては、実験に用いた 4 クローン全てが、Claudin-1 発現細胞に対して ADCC 活性を発揮する可能性があること、ヒト

IgG4 型のキメラ抗体とすることで、ADCC 活性を減弱することが可能であることを明らかにした。ADCC 活性の発揮が望ましい抗悪性腫瘍薬としての適応にはヒト IgG1 型のキメラ抗体を、ADCC 活性の発揮を必要としない HCV 感染阻害薬としての適応にはヒト IgG4 型のキメラ抗体を用いることが適切であると考えられた。

抗 Claudin-4 抗体に関しては、樹立したクローン間で抗原結合に依存した Fc γ 受容体活性化能に差があること、特に 5A5 は他のクローンに比べてより強い Fc γ 受容体活性化能を示す可能性を明らかにした。Fc γ 受容体活性化能の強弱は抗原結合親和性とは必ずしも一致しておらず、本研究で実施した Fc γ 受容体発現レポーター細胞を用いた特性解析は、高 ADCC 活性を目的とする抗体候補クローンのスクリーニングに有用である可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 多田稔, 石井明子, 川崎ナナ

「ヒト初回投与量設定方法—バイオ医薬品—」
新薬開発にむけた臨床試験 (第 I ~ III 相臨床試験) での適切な投与量設定と有効性/安全性評価 第 4 章 第 2 節、サイエンス & テクノロジー (2013)

2) 石井明子, 鈴木琢雄, 多田稔, 川崎ナナ

「抗体医薬品の分子設計」、薬剤学 74(1), 1-8 (2014)

2. 学会発表

1) 長瀬翔太郎, 山下真代, 飯田愛未, 渡利彰浩, 近藤昌夫, 深澤征義, 多田稔, 石井明子, 八木清仁

「上皮細胞を標的とした創薬基盤研究第1報～
claudin-1 特異性抗体の創製～」

第29回日本DDS学会学術集会(2013.7)

2) 清水芳実, 李相儒, 渡利彰浩, 近藤昌夫, 深澤征義, 多田稔, 石井明子, 國安弘基, 八木清仁

「上皮細胞を標的とした創薬基盤研究第3報～
claudin-4 特異性抗体の創製～」

第29回日本DDS学会学術集会(2013.7)

3) 山下真代, 長瀬翔太郎, 飯田愛未, 白砂圭敬, 深澤征義, 近藤昌夫, 多田稔, 石井明子, 渡利彰浩, 八木清仁

「抗 Claudin-1 抗体の創製と評価」

日本薬物動態学会第28回年会 (2013.10)

4) Nagase, S., Yamashita, M., Iida, M., Shirasago, Y., Fukasawa, M., Tada, M., Ishii, A., Watari, A., Yagi, K., Kondoh, M.

“Claudin-1-specific monoclonal antibodies and their inhibitory activity against hepatitis C virus infection”

IBC's 24th annual Antibody Engineering & Therapeutics (2013.12)

5) Iida, M., Li, X., Kuniyasu, H., Fukasawa, M., Tada, M., Ishii, A., Watari, A., Yagi, K., Kondoh, M.
“Development of claudin-4-specific monoclonal antibodies and their anti-tumor activities”

IBC's 24th annual Antibody Engineering & Therapeutics (2013.12)

6) 石井明子, 多田稔, 鈴木琢雄, 川崎ナナ

「次世代抗体医薬品の非臨床評価」

日本薬学会第134年会シンポジウム (2014.3)

1) 近藤昌夫、深澤征義、石井明子、多田稔、八木清仁、渡利彰浩;発明の名称:抗体、フラグメント及び抗 HCV 治療剤;出願番号:PCT/JP2013/006602;出願日:平成25年11月8日

2.実用新案登録

該当無し

3.その他

該当無し

G.知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

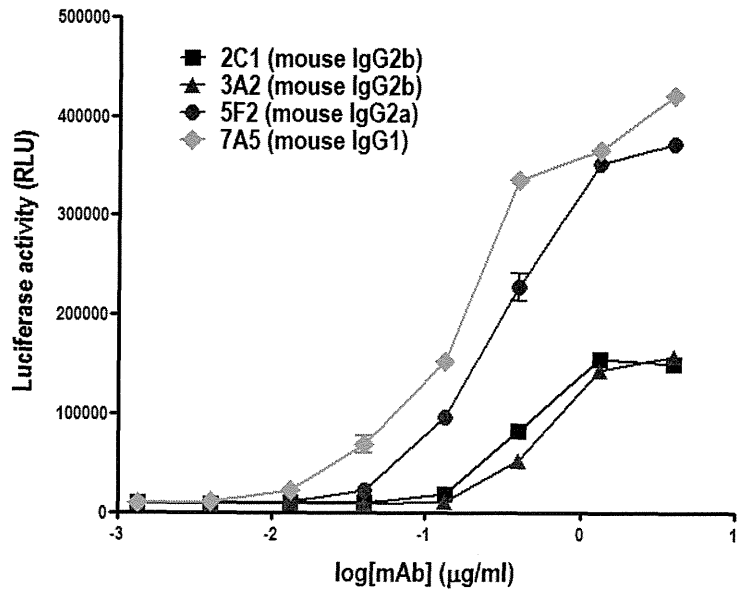


Fig. 1 マウス抗 Claudin-1 抗体の Fc γ 受容体活性化能

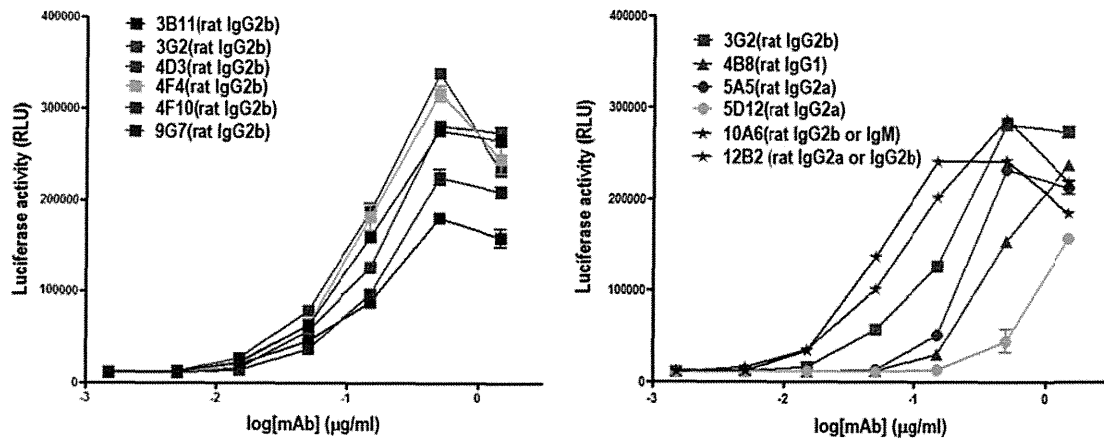


Fig. 2 ラット抗 Claudin-4 抗体の Fc γ 受容体活性化能

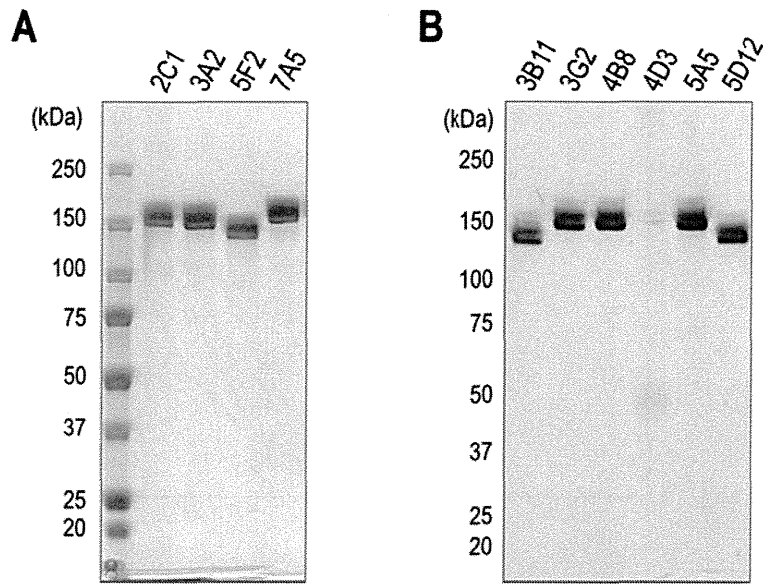


Fig. 3 CHO 細胞を用いて発現した(A)ヒトマウスキメラ抗 Claudin-1 抗体(IgG1) および(B)ヒトラットキメラ抗 Claudin-4 抗体(IgG1)の電気泳動図 (非還元 SDS-PAGE)

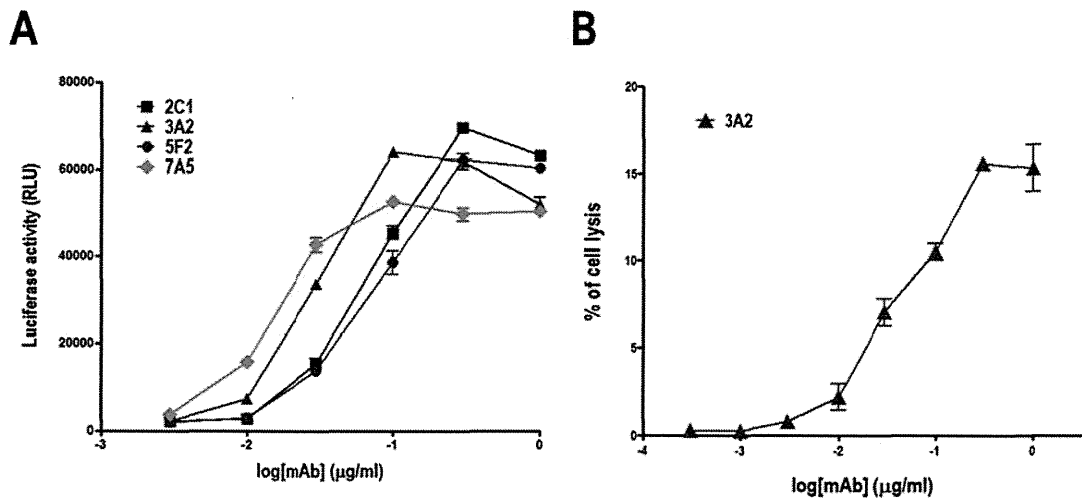


Fig. 4 ヒトマウスキメラ抗 Claudin-1 抗体(IgG1)の(A)Fc γ 受容体活性化能 および(B)ADCC 活性

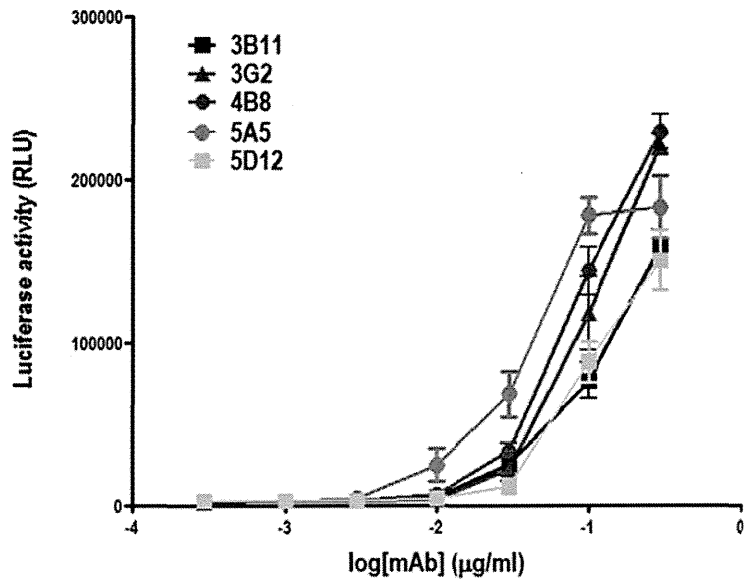


Fig. 5 ヒトラットキメラ抗 Claudin-4 抗体(IgG1)の Fc γ 受容体活性化能

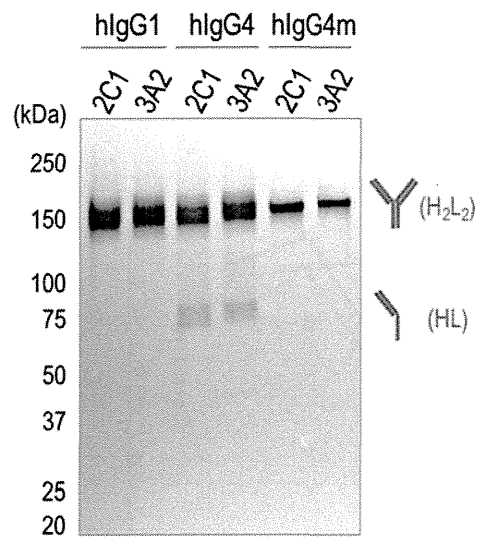


Fig. 6 CHO 細胞を用いて発現したヒトマウスキメラ抗 Claudin-1 抗体 (IgG1、IgG4、IgG4m)の電気泳動図(非還元 SDS-PAGE)

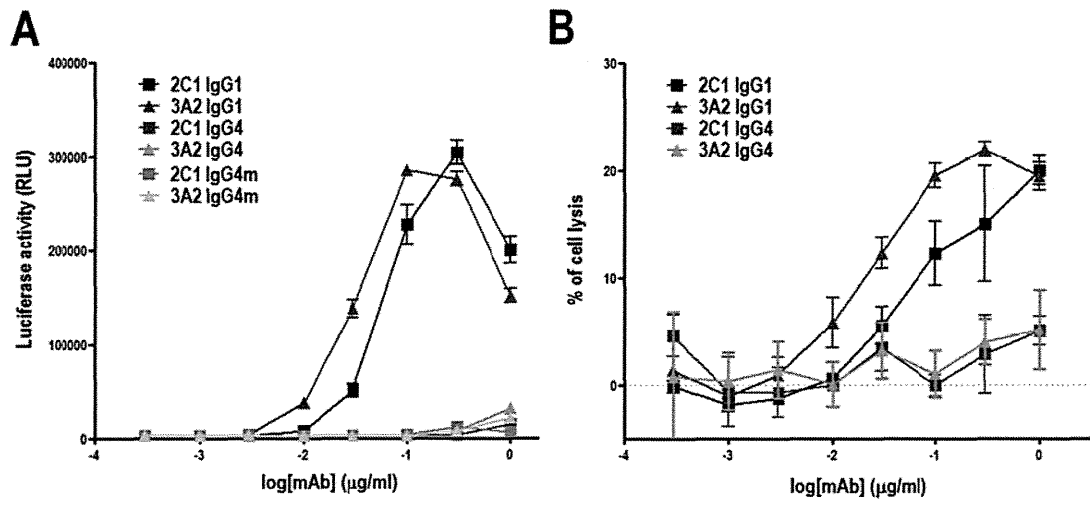


Fig. 7 ヒトマウスキメラ抗 Claudin-1 抗体(IgG1、IgG4、IgG4m)の
 (A)Fc γ 受容体活性化能および(B)ADCC 活性