

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07019

研究課題名(和文)重症筋無力症に対する二重特異性抗体薬を用いた根治治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a curative treatment for myasthenia gravis using a bispecific antibody drug

研究代表者

森脇 康博 (Moriwaki, Yasuhiro)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・講師

研究者番号：00392150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：重症筋無力症(MG)は、神経筋接合部のシナプス後膜上にある幾つかの抗原に対する自己抗体の作用により、神経筋接合部の刺激伝達が障害されて生じる自己免疫疾患である。現在の治療は全て対症療法であり根治的治療法は存在しない。根治のためには自己抗体のメモリーB細胞を駆逐する必要がある。最近、B細胞性がん細胞を駆逐する方法として細胞傷害性T細胞(CTL)を利用するCTL誘導二重特異性抗体(BiTE)が上市された。本研究では、MGの病因となる自己抗体産生メモリーB細胞を駆逐する方法として、BiTEを改良した医薬品の開発を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、MG(重症筋無力症：Myasthenia gravis)の根治治療法の開発の礎を築くことを目的とし、その目的を達成するため、これまでの我々のグループが培ったBiTE(CTL誘導二重特異性抗体)の技術を用いる。BiTEはがん免疫領域での研究は目覚ましいが、自己免疫疾患領域での応用例は未だ無い。MGを標的としてBiTEの有効性を検討することは、MGの根治治療の可能性を提示するだけでなく、ひいては、他の自己免疫疾患へのBiTE応用の可能性を示すことに繋がると考えられる

研究成果の概要(英文)：Myasthenia gravis (MG) is an autoimmune disease that results from impaired stimulus transmission at the neuromuscular junction due to the action of autoantibodies against several target antigens on the postsynaptic membrane of the neuromuscular junction. All current treatments for MG are symptomatic and there is no curative therapy. To cure the disease, it is necessary to eradicate the memory B cells of autoantibodies. Recently, CTL-induced bispecific antibodies that utilize cytotoxic T cells (CTLs) have been launched as a method to eradicate B-cell cancer cells. In this study, we aimed to develop a drug with improved CTL-induced bispecific antibody as a method to destroy autoantibody-producing memory B cells, which are the etiologic agent of MG.

研究分野：薬理学・免疫学

キーワード：重症筋無力症 二重特異性抗体 ニコチン性アセチルコリン受容体メモリーB細胞 CD3

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重症筋無力症 (Myasthenia gravis: MG) は、神経筋接合部のシナプス後膜上にある幾つかの標的抗原に対する自己抗体の作用により、神経筋接合部の刺激伝達が障害されて生じる自己免疫疾患で、自己抗体の 70% 以上はニコチン性アセチルコリン受容体 (Nicotinic Acetylcholine Receptor: nAChR) $\alpha 1$ サブユニットに対する抗体である。治療の基本戦略は、早期に臨床症状の改善を図り寛解導入後、適切な免疫抑制で寛解を維持することである。寛解導入法として、血中抗 $\alpha 1$ nAChR 抗体を除去するために血中の IgG を除去する血液浄化療法が用いられている。しかし、血液中の IgG が低下すると B 細胞からの抗体産生が促進されてしまうため (rebound synthesis) 効果が限定的で効果の維持が困難となっている。根治のためには、自己抗原に対する抗体を産生するメモリー B 細胞を駆逐する必要がある。

がん細胞を特異的に破壊する手段として、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を利用する CAR-T 細胞 (Chimeric-Antigen Receptor T cell) 療法や CTL 誘導二重特異性抗体 (Bispecific T-cell Engager: BiTE) が注目を集めている。CAR-T (キムリア) や BiTE (プリナツモマブ) は、B 細胞由来の難治性のリンパ腫や白血病に対して優れた治療効果を示し、すでに本邦でも医療承認されている。そのため、これらの治療法は同じ B 細胞由来のメモリー B 細胞の駆逐にも優れた効果を発揮できると期待される。

我々の研究グループは、BiTE を用いた抗がん抗体薬の開発を行っている。現在、我々が開発した中皮腫に対して高い特異性を持つ SKM9-2 抗体 [引用文献 1, 2] を用いた、高い殺中皮腫活性を有する BiTE の開発に成功し (第 42 回日本分子生物学会年会発表 (2019 年 12 月))、臨床応用に向けて開発を進めている。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに培った抗細胞薬としての BiTE の開発のノウハウを活かし、MG の原因であるメモリー B 細胞を駆逐しうる BiTE 開発を行う。MG の自己抗体の 70% 以上は $\alpha 1$ nAChR に対する抗体である。また、その抗体のエピトープとして WNPDDYGGVK や KVLLQYTGHI といった main immunogenic region (MIR) が同定されている。具体的には、 $\alpha 1$ nAChR に対する抗体を産生するメモリー B 細胞 (細胞膜上に抗 $\alpha 1$ nAChR 膜型 IgG を発現) を破壊するため、 $\alpha 1$ nAChR の細胞外領域 ($\alpha 1$ nAChR_{ex}) と抗 CD3 ϵ 抗体 OKT3 の scFv を融合した二重特異性タンパク質 ($\alpha 1$ -OKT) を作製し、抗 $\alpha 1$ nAChR メモリー B 細胞上の膜型抗体と CTL の CD3 を架橋することで殺細胞効果が期待できるかどうかについて検証を行う。

3. 研究の方法

(1) $\alpha 1$ -OKT の作製

我々はこれまでに $\alpha 7$ nAChR の細胞外領域をほ乳類細胞に発現させ、リコンビナント体を精製することに成功している。 $\alpha 1$ nAChR_{ex} は $\alpha 7$ nAChR と類似のアミノ酸配列となっているため、 $\alpha 1$ nAChR_{ex} をほ乳類細胞に可溶型体として発現させることが可能と考えられた。そこで、C 末端側に His タグを付加した $\alpha 1$ nAChR_{ex} と OKT3 scFv を融合した遺伝子 ($\alpha 1$ -OKT) を作製し、ほ乳類細胞を用いて $\alpha 1$ -OKT タンパク質を培養上清中に分泌させた。回収した培養上清から Ni-excel カラムを用いて $\alpha 1$ -OKT の精製タンパク質を得た。

(2) $\alpha 1$ nAChR_{ex} 改変-OKT の作製

$\alpha 1$ -OKT タンパク質の産生量が少ないことから、産生効率などを改善すべく、リンカー (GS、PGGGGS、3xGGGGGS、DKTHTGS など) や $\alpha 1$ nAChR_{ex} 構造の変更を行った。 $\alpha 1$ nAChR_{ex} 構造の変更に関しては、MIR を含む $\alpha 1$ nAChR_{ex} の最小化や、分子構造に影響を与えられられる配列の変異導入、nAChR が 5 量体を形成することから、抗体の重鎖定常域 1 と軽鎖定常域を用いた 2 量体化などを試みた。いずれも、OKT3 scFv と融合した遺伝子を作製し、ほ乳類細胞を用いて融合タンパク質を培養上清中に分泌させた。回収した培養上清から Ni-excel カラムを用いてタンパク質精製を行なった。

(3) $\alpha 1$ および $\alpha 1$ nAChR_{ex} 改変-Fc の作製

TIB-175 への細胞障害性が確認されている $\alpha 1$ nAChR_{ex}-Fc の作製を行なった。Fc にはマウス IgG2a の Fc を用いた。ほ乳類細胞を用いて融合タンパク質を培養上清中に分泌させた。回収した培養上清から Protein G カラムを用いてタンパク質精製を行なった。

(4) TIB-175 細胞および CD3 発現細胞への結合確認

MG を実験動物で発症させることが出来るラットモノクローナル抗体 mAb35 を産生するハイブリドーマ (TIB-175) は ATCC より購入した。TIB-175 はメモリー B 細胞と同様に膜型抗体を発現している [引用文献 3]。TIB-175 の膜型抗体の発現確認は PE 標識抗ラット Ig 軽鎖 κ 抗体 (MRK-81) により検討した。CD3 発現細胞としては、Jurkat 細胞を用いた。上記で精製した様々な $\alpha 1$ nAChR_{ex} 融合タンパク質の TIB-175 細胞への結合確認には、OKT 融合タンパク質では Alexa-488 標識抗 His 抗体を、Fc 融合タンパク質では、Alexa-488 標識抗マウス IgG2a Fc 特異的抗体を用いた。OKT 融合タンパク質の Jurkat 細胞への結合は Alexa-488 標識抗 His 抗体を用いて検出した。

(5) mAb35 を用いた ELISA 系の作製

mAb35 を用いた ELISA 系を作製した。OKT 融合タンパク質には抗 His 抗体を、Fc 融合タンパク質には抗マウス IgG Fc 抗体を 96well ELISA half プレートにコーティングした。検出抗体として精製あるいは購入した mAb35 そして、HRP 標識抗ラット IgG 抗体を用いた。

(6) FACS を用いた mAb35 の結合阻害実験

α 1nAChR 発現細胞として、ヒト横紋筋肉腫細胞株である RD 細胞を用いた。mAb35 を予め精製タンパクと反応させた後、RD 細胞と反応させ、その後、Alexa488 標識抗ラット IgG 抗体を用いて検出を行なった。

4. 研究成果

第一膜貫通領域の 23 アミノ酸上流までの α 1nAChRex が PGGGGS リンカーで OKT に接続した α 1nAChRex-OKT を恒常的に発現する RK13 細胞を樹立した。得られた α 1nAChRex-OKT タンパク質を、抗 α 1nAChR 抗体 (mAb35) を産生するハイブリドーマ TIB-175 細胞、ヒト CD3 を発現する Jurkat 細胞を用いてフローサイトメトリーでの結合性の評価を行った。Jurkat 細胞との結合は確認できたが、TIB-175 細胞との結合は確認できなかった。TIB-175 細胞との結合が確認できなかった一因として、 α 1nAChRex-OKT タンパク質濃度が低いことが考えられた。 α 1nAChRex-OKT は構造的問題により、低いタンパク産生効率/安定性が認められる。そこで、 α 1nAChRex-OKT タンパク質の産生効率などを改善すべく、リンカー長の変更や α 1nAChRex 構造の変更を行った。 α 1nAChRex 構造の変更に関しては、MIR を含む α 1nAChRex の最小化や、分子構造に影響を与えると考えられる配列の変異導入、nAChR が 5 量体を形成することから、抗体の重鎖定常域 1 と軽鎖定常域を用いた 2 量体化などを試みた。結果、MIR を含む最小配列で、それぞれのエピトープの中間部位に変異を導入した α 1nAChRex を DKHTHTGS リンカーで OKT に接続した融合タンパク質 (α 1nAChRex 改変-OKT) で培養上清への高いタンパク産生と、Jurkat 細胞への結合を確認することができた。次に、タンパク質医薬品産生に多用されている CHO DG44 細胞を用いて、 α 1nAChRex 改変-OKT を安定的に産生される細胞を樹立した。この細胞の培養上清より精製した α 1nAChRex 改変-OKT を用いて、TIB-175 細胞への結合をフローサイトメトリーにより確認した結果、結合を確認するに至らなかった。

上記した通り、 α 1nAChRex 改変-OKT タンパクの安定産生系を構築するに至った。一方で、 α 1nAChRex 改変-OKT タンパクの TIB-175 細胞への結合を確認することはできなかった。TIB-175 細胞が形質膜上にラット抗体を発現していることは、ラット抗体の軽鎖を認識する抗体 (MRK-81) を用いた FACS による解析で確認している。TIB-175 細胞の産生する抗 α 1 抗体である mAb35 は MIR を認識することが報告されていることから、今回、申請者が作製した MIR を含む α 1nAChRex 改変-OKT タンパクでは、タンパク質濃度による問題では無く、mAb35 により認識されない可能性が高いと考えられた。既に実用化が検討されている α 1nAChRex-Fc に関しては、TIB-175 細胞への結合と細胞障害活性が確認されている[引用文献 4]。そこで、TIB-175 細胞より mAb35 を精製し、その抗体を用いた ELISA 系の作製と、ポジティブコントロールとしての α 1nAChRex-Fc タンパクの作製を試みた。

α 1nAChRex-Fc タンパクは、マウス IgG2a の Fc との融合により作製した。第一膜貫通領域の 23 アミノ酸上流までの α 1nAChRex を PGGGGS リンカーで Fc に接続した α 1nAChRex-Fc を恒常的に発現する RK13 細胞を樹立した。また、 α 1nAChRex 改変-OKT タンパクの OKT を Fc に置換したタンパクの作製も併せて行った。OKT の時と同様に α 1nAChRex 改変体の方が高いタンパク産生量が認められた。これまで精製した OKT 融合タンパクならびに Fc 融合タンパクが mAb35 により認識されるか ELISA による検出を試みた。抗 His 抗体あるいは抗マウス IgG Fc 抗体をプレートにコーティングし、得られたタンパク質、検出抗体として精製あるいは購入した mAb35 そして、HRP-抗ラット IgG を用いた。結果、いずれのタンパク質においても、mAb35 により検出することは出来なかった。

mAb35 が ELISA へのアプリケーションに適応出来ない可能性が考えられた。 α 1nAChR を発現している DB40 細胞への mAb35 への結合が他の抗 α 1nAChR 抗体により阻害されることが報告されている[引用文献 5]。そこで、上記作製した様々な α 1nAChR タンパク質を用いた mAb35 の細胞への結合阻害実験を FACS により行なった。細胞にはヒト横紋筋肉腫細胞株である RD 細胞を用いた。結果、OKT、Fc いずれの α 1nAChR 融合タンパク質においても mAb35 の細胞への結合阻害は認められなかった。

mAb35 はネイティブな α 1nAChR のみに反応するとの報告がある[引用文献 5 およびその参考文献]。ここで言うネイティブとは形質膜上に発現したタンパクのことを指す。今回、様々な種類の α 1nAChR タンパクの精製を行なったが、いずれも立体構造がネイティブとは異なった構造であったと考えられる。もう一つ懸念される点として、mAb35 の α 1nAChR に対する親和性が低い可能性が挙げられる。mAb35 の α 1nAChR の親和性が低く、標的抗原と結合したとしても、直ぐに乖離しているため、今回の研究で作製したいずれの精製タンパクにおいても mAb35 との結合が確認されなかった可能性がある。神経筋接合部におけるアセチルコリン受容体は α 1、 β 1、 ϵ 、 δ により構成される。ネイティブな立体構造に近づけるべく、抗体の重鎖定常域 1 と軽鎖定常域を用いた 2 量体化などを試みたが、タンパクの安定性が低く、医薬品レベルでの産生を行うには適さないと判断した。一方で、MIR を含む最小配列で、それぞれのエピトープの中間部位に

変異を導入した $\alpha 1nAChRex$ を DKTHTGS リンカーで OKT に接続した融合タンパク質 ($\alpha 1nAChRex$ 改変-OKT) で培養上清への高いタンパク産生が確認されている。そのため、 $\alpha 1nAChRex$ 改変-OKT をベースに様々な変異を導入し、mAb35 を用いた ELISA 系によりスクリーニングを行うことで、mAb35 との結合を担保して、高生産される融合タンパク質を獲得することが出来ると考えられる。自己抗体を産生するメモリーB細胞を破壊する上で BiTE を用いるというコンセプトは間違っていないと考えられることから、上記したスクリーニングを行うことで、MG の根治的治療法を開発できる可能性が残されているのではと考えている。

<引用文献>

Tsuji S, Washimi K, Kageyama T, Yamashita M, Yoshihara M, Matsuura R, Yokose T, Kameda Y, Hayashi H, Morohoshi T, Tsuura Y, Yusa T, Sato T, Togayachi A, Narimatsu H, Nagasaki T, Nakamoto K, Moriwaki Y, Misawa H, Hiroshima K, Miyagi Y, Imai K. HEG1 is a novel mucin-like membrane protein that serves as a diagnostic and therapeutic target for malignant mesothelioma. *Sci Rep.* 2017;7:45768.

Matsuura R, Kaji H, Tomioka A, Sato T, Narimatsu H, Moriwaki Y, Misawa H, Imai K, Tsuji S. Identification of mesothelioma-specific sialylated epitope recognized with monoclonal antibody SKM9-2 in a mucin-like membrane protein HEG1. *Sci Rep.* 2018;8:14251.

Chang T, Lin H, Gao J, Li W, Xu J, Sun CJ, Li H, Li FF, Song Y, Ye J, Li ZY. Selective recognition and elimination of nicotinic acetylcholine receptor-reactive B cells by a recombinant fusion protein AChR-Fc in myasthenia gravis in vitro. *J Neuroimmunol.* 2010;227(1-2):35-43.

Nakamura R, Makino T, Hanada T, Terakawa M, Nagahira K, Yamate J, Shiraishi H, Motomura M. Heterogeneity of auto-antibodies against nAChR in myasthenic serum and their pathogenic roles in experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Neuroimmunol.* 2018;320:64-75.

Makino T, Nakamura R, Terakawa M, Muneoka S, Nagahira K, Nagane Y, Yamate J, Motomura M, Utsugisawa K. Analysis of peripheral B cells and autoantibodies against the anti-nicotinic acetylcholine receptor derived from patients with myasthenia gravis using single-cell manipulation tools. *PLoS One.* 2017;12(10):e0185976.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ertle CM, Rommel FR, Tumala S, Moriwaki Y, Klein J, Kruse J, Gieler U, Peters EMJ.	4. 巻 12
2. 論文標題 New pathways for the skin's stress response: the cholinergic neuropeptide SLURP-1 can activate mast cells and alter cytokine production in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 631881
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.631881.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Mashimo M, Moriwaki Y, Misawa H, Kawashima K, Fujii T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Regulation of immune functions by non-neuronal acetylcholine (ACh) via muscarinic and nicotinic ACh receptors.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 6818
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22136818.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Moriwaki Y*, Kubo N, Watanabe M, Asano S, Shinoda T, Sugino T, Ichikawa D, Tsuji S, Kato F, Misawa H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Endogenous neurotoxin-like protein Ly6H inhibits alpha7 nicotinic acetylcholine receptor currents at the plasma membrane.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 11996
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-68947-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mashimo Masato, Fujii Takeshi, Ono Shiro, Moriwaki Yasuhiro, Misawa Hidemi, Kawashima Koichiro	4. 巻 82
2. 論文標題 Minireview: Divergent roles of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors expressed on antigen-presenting cells and CD4+ T cells in the regulation of T cell differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunopharmacology	6. 最初と最後の頁 106306 ~ 106306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.intimp.2020.106306.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村田大典, 森脇康博, 多胡憲治, 中澤洋介, 田村悦臣, 多胡めぐみ.
2. 発表標題 コーヒーによる神経炎症の抑制分子メカニズムの解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会,
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村田大典, 森脇康博, 多胡憲治, 中澤洋介, 田村悦臣, 多胡めぐみ.
2. 発表標題 コーヒー及び含有成分ピロカテコールによる神経炎症の抑制効果
3. 学会等名 第66回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村田大典, 森脇康博, 多胡憲治, 中澤洋介, 田村悦臣, 多胡めぐみ.
2. 発表標題 コーヒーによる神経炎症の抑制効果.
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村田大典, 森脇康博, 多胡憲治, 中澤洋介, 田村悦臣, 多胡めぐみ.
2. 発表標題 コーヒーによる神経炎症の抑制分子メカニズムの解析.
3. 学会等名 2021年度日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金守悠希, 森脇康博, 今井浩三, 辻祥太郎.
2. 発表標題 抗中皮腫活性を示す二重特異性抗体の薬効評価.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金守悠希, 森脇康博, 三澤日出巳, 今井浩三, 辻祥太郎.
2. 発表標題 抗中皮腫効果を有する二重特異性抗体の開発.
3. 学会等名 第40回日本分子腫瘍マーカー研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	辻 祥太郎 (TSUJI Shoutaro) (30285192)	群馬医療福祉大学・医療技術学部・教授 (32307)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------