

医療分野研究成果展開事業/研究成果最適展開支援プログラム (AMED・A-STEP)

平成 27 年度終了課題 事後評価報告書

プロジェクトリーダー (企業責任者)	株式会社 A-CLIP 研究所 鈴木 和男
研究責任者	国立大学法人千葉大学医科学研究所 中山 俊憲
支援タイプ	ハイリスク挑戦
研究開発課題	組換え免疫ガンマグロブリン 204 クローンからの絞り込みによる治療薬候補の開発

1. 研究開発の目的

難治性血管炎は高齢者に発症し、その治療法は、ステロイドパルスやシクロホスファミド治療が主であり、高齢者には危険性が高く、感染症を誘発し死に至ることが多い。そのため、最近開発されたサイトカインの組換え体抗体医薬があるが、抗体医薬は、継続投与が必須であり、患者負担や医療経済への圧迫が懸念されている。最近、難治性血管炎であるアレルギー性血管炎 (CSS) に血液製剤免疫グロブリンの大量療法 (IVIg) 療法の保険収載が認められたように、血管炎の IVIg 療法の有効性が示されている。血液製剤免疫グロブリン治療は、血管炎の寛解導入に有効であるが、用途拡大・原材料の不足の懸念から、【組換え体】の開発が望まれていた。これまで、【ヒト型】組換え体免疫グロブリンとして 204 クローンからなるマスターライブラリーを構築した (特許出願中)。しかし、204 クローンでは医薬品としての開発に困難があるため、本開発研究では、204 クローンについて、1) 培養・発現、2) タンパク精製、3) 開発したモデルマウスで薬効評価をする。これら一連のステップを繰り返すことで、最適な 4-5 個のクローンを選択・確定する。選択した有効クローンを医薬品開発につなげる。

2. 研究開発の概要

① 成果

・マスターライブラリーからモノクローンを選択した

組換えガンマグロブリン hScFv のマスターライブラリーのクローンから治療に有効な 1 クローンを選択した。

・組換えモノクローンからの ScFv 組換えタンパク質の大量調整

Ni-resin にて濃縮、Ni chromatography、DEAE chromatography、4) HPLC Gelfiltration により 1 mg/L 産生を実現。

・最適クローン産生 ScFv 組換えタンパク質の治療効果判定

血管炎モデルマウスへの投与による血管炎の改善。

1) 腎・肺機能: 尿所見: スコア、腎糸球体半月体形成率、腎糸球体組織の顕微鏡所見、肺組織の改善の顕微鏡所見

2) 免疫機能: 末梢血中の細胞数の比較、脾臓重量、脾臓組織の顕微鏡所見

・免疫学的検証での評価および治療効果の分子生物学的解析

血清中のバイオマーカー: MPO-ANCA、モエシン抗体の低下を認め、32 種類サイトカイン・ケモカインの内、IL-10、IL-12p40、TNF- α の顕著な低下および PDGF-BB で顕著な増加を認めた。また、腎臓でのモエシン抗原の発現抑制が確認できた。

・有効モノクローンの対応分子:クローンが約 10kDa の分子との反応性を認めた。

研究開発目標	成果および達成度
<p>①マスターライブラリーから 3-4 のステップを経て、最適クローン群・4-5 クローンを選択</p> <p>Humnan ScFv(hScFv)のマスターライブラリーの 204 クローンから治療の有効性のある最適クローンを得る。204 クローンから精製した ScFv をモデルマウスに投与し、その薬効を判定して選択する。最も有望なクローングループから混合 ScFv として効果判定し、その操作を繰り返す、最適なクローン群を選ぶ。最終的には、医薬品開発用に最小単位の 4-5 クローンを確定する。</p> <p>② 組換えタンパク質発現調節法の調製とクローンの精査、および大量調整</p> <p>【発現】グループ分けて発現を抗ヒト Fab 抗体ウェスタンブロットで発現を確認し、発現効率の良い方法を採用する。</p> <p>【精製】有効モノクローンを最適化された大量生産法として確立する。菌体タンパクの抽出後、タンパクを Ni キレートカラムで精製する際必要に応じて、6M グアニジンバッファー(pH 12)を用いた精製により収量の多い方法を採用する。</p> <p>クローン数の最適化:培養・発現・タンパク質精製を繰り返し、クローンの構造を再度確認し、最適化クローンを選択する。</p> <p>【大量精製】パイロット試験で確立した調節法を大量培養に展開し、効果判定試験に供する組換えタンパク質を得る。</p> <p>③ 最適クローン産生 ScFv 組換えタンパク質の治療効果判定</p> <p>1)モデル動物での治療効果、2)生体の免疫系での評価、免疫学的検証が必須である。特に、「モデル動物 SCG/Kj マウスでの治療効果の判定」に必須な SCG/Kj マウスを使って治療判定する。本モデルマウスは、申請者らが効果判定のために開発し、高率に血管炎を自然発症する良いモデルである。</p>	<p>①マスターライブラリーから 3-4 のステップを経て、最適クローンを選択</p> <p>組換えガンマグロブリン hScFv のマスターライブラリーのクローンを培養し、発現したタンパクを精製し、免疫学的に検証し、ANCA 関連血管炎自然発症のモデルマウス SCG/Kj に投与し、治療に有効な1クローンを選択した。遺伝子により構造解析でクローンを確認した。</p> <p>②組換えタンパク質発現調節法の調製とクローンの精査、および ScFv 組換えタンパク質の大量調整</p> <p>【発現】タンパク精製に適したクローンの条件を決定した。収量を上げるため pQE32 ベクターに変更し、0.02 μM Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)にて誘導した。本クローンに hScFv がコードされていることを確認した。</p> <p>【精製】タンパク質の精製法を標準化した。Rq01 クローンを 0.02 mM IPTG を加え培養し、菌体を得て凍結保存後、可溶性画分を得、以下の標準的精製法を確立した。Ni-resin にて濃縮、2) Ni chromatography、3) DEAE chromatography、4) HPLC Gelfiltration により 1 mg/L 産生を実現した。</p> <p>③ 最適クローン産生 ScFv 組換えタンパク質の治療効果判定</p> <p>血管炎モデルマウス(SCG/Kj マウス)への投与による血管炎改善を以下の項目で評価した。</p> <p>1)腎・肺機能の改善:(1)尿所見:スコア、(2)腎糸球体半月体形成率、(3)腎糸球体組織の顕微鏡所見、肺組織の改善の顕微鏡所見</p> <p>2) 免疫機能の改善:(1)末梢血中の細胞数の比較、(2)脾臓重量、(3)脾臓組織の顕微鏡所見、(4) 血清中のバイオマーカー:MPO-ANCA、モエシン抗体</p>

<p>④免疫学的検証での評価および治療効果の分子生物学的解析 免疫学的パラメータ、血清マーカー、病理学的パラメータの解析方法を確立し、治療効果を分子生物学的正常から評価する。また、申請者が病態の進行にかかわるバイオマーカーとして発見したモエシン抗体を用いた評価も行う。</p> <p>⑤治療効果の判定 ③④で得られた解析から得られた評価結果から有効クローンを判定する。</p> <p>⑥有効モノクローンの対応分子の検索 有効モノクローンの対応分子を血液および内皮細胞を使って、免疫科学的(左)およびプルダウン法により検索する。</p>	<p>④免疫学的検証での評価および治療効果の分子生物学的解析 血管炎モデルマウスのサイトカイン・ケモカインの基礎データを解析した。血管炎モデルマウス(SCG/Kjマウス)のサイトカイン・ケモカインの基礎データを解析した。SCG/Kjマウスの Active Phase の血清中の 32 種類サイトカイン・ケモカインを測定・分析した結果、IL-10、IL-12p40、TNF-αの顕著な低下および PDGF-BB で顕著な増加が認められた。また、バイオマーカー：MPO-ANCA、モエシン抗体に加えて、腎でのモエシン抗原の発現抑制が確認できた。</p> <p>⑤治療効果の判定 ③④で得られた解析から得られた評価結果から有効なモノクローンとして判定した。</p> <p>⑥有効モノクローンの対応分子の検索 有効モノクローンの対応分子を血液により免疫科学的方法およびプルダウン法により約 10kDa の分子との反応性を認めた。</p>
--	--

②今後の展開

- 1) 2017 年末までに
素材の最適化、②反応条件の最適化、③スケールアップ検討
- 2) 2018 年末までに
品質検査、反応分子解析、規格設定
- 3) Phase III 完了まで
ヒト臨床試験用サンプル(GMP/GLP)製造
- 4) 2018-2019 年末
前臨床試験-1(動物毒性等 I)
前臨床試験-2(Phase I)
- 5) 2020 年-2024 年末まで
臨床試験 Phase II から Phase III

この間、可能な限り製薬企業との連携を図る。

3. 総合所見

血管炎を抑制するモノクロナル抗体を1クローンに絞り込み、目標をクリアされたことは評価される。しかしながら、有効性確認を実施した動物モデルは現段階ではやや不安の残る評価系であり、残りのクローンに候補となるものがないかどうかも含め、さらなる検討も必要と考えられる。

今後の検討のためにも、この抗体が結合する 10kDa の抗原を同定する作業を実施されることを望む。

また、社会的ニーズの高い課題でもあることから、この抗原の機能の解析等を進め、治験に向けて今後も開発を継続されることを期待する。

※記載の情報は平成 28 年 7 月時点の情報です。