

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム
セットアップスキーム (ACT-MS)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) ヒト腸内細菌叢改善のためのヒト化 IgA 抗体医薬の開発
(英語) Development of oral humanized IgA antibody drug for the treatment of gut dysbiosis

研究開発実施期間：2016年10月25日～2018年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 新藏 礼子
(英語) Reiko Shinkura

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
(日本語) 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授
(英語) Nara Institute of Bioscience and Technology・Graduate School of Biological Sciences・Professor

II 研究開発の概要

高橋 亘チームリーダー (第一三共株式会社) らのグループとともに、ヒト腸内細菌叢改善のための経口ヒト化 IgA 抗体の開発を目指した。研究期間中に得た4つの研究成果を以下に示す。

1. 開発すべき抗体のサブタイプとフラクションは IgG1 ではなく IgA で、且つ、単量体ではなく多量体である。

同一の可変領域を持つマウス W27 IgA 多量体抗体 (ハイブリドーマ培養上清からヒドロキシアパタイトカラムによる粗精製) とリコンビナントヒトキメラ W27IgG1 抗体 (プロテイン A カラムによる精製) を作製し、各抗体の細菌に対する結合力、および増殖抑制効果を比較した。

ELISA アッセイによる細菌への結合力の強弱の評価は EC50 値を用いた。つまり、最大の吸光度の半分の吸光度を示す抗体濃度を両者で比較した。その結果、マウス W27 IgA 多量体はヒトキメラ W27 IgG1 抗体に比べて、3-5 倍 2 種類の大腸菌に対する結合力が強いことが明らかとなった。 *Lactobacillus casei* には両方の抗体ともほとんど結合が観察されなかった。細菌の増殖抑制効果の比較ではヒトキメラ W27 IgG1 抗体による細菌の増殖抑制効果はほとんど見られなかった。一方、W27 抗体は 2 種類の大腸菌の増殖を有意に抑制した。特に、腸炎の原因菌と考えられている上皮付着性の ATCC 25922 株は DH5 α 株に比べて増殖が早かったが、W27 抗体は ATCC 25922 株に対してより強い増殖抑制効果を示した。

2. マウス W27 IgA 抗体はヒトの腸内細菌に結合する能力がある。
マウス W27 IgA 抗体がヒトの腸内細菌に結合するかどうかの検定をまず健常者の便サンプルで検証した。

同時にヒト抗 IgA 抗体による腸内細菌への結合もフローサイトメトリーで解析し、比較した。健常者の便サンプルを PBS で希釈し、十分攪拌後遠心操作を行い、上清を得て細菌液とした。細菌液に W27 抗体を加え反応させ、結合した W27 抗体を PE 標識抗マウス IgA 抗体で検出した。ヒト便サンプルにはすでに IgA 抗体が結合しているはずなので、細菌液に PE 標識抗ヒト IgA 抗体を加え反応させた。マウス W27 IgA 抗体はヒト腸内細菌の一部に結合することがわかった。

W27 結合菌のソーティングを健常者 2 例と炎症性腸疾患患者 10 例について行い腸内細菌叢解析を行った。全細菌叢構成とともに結合菌として出てくる細菌種も個体差が大きいことがわかった。今後、詳細に検討する予定である。

3. ヒト化 W27 IgA 抗体の *in vivo* 効果を確認するための dysbiosis マウスモデルを構築した。

SPF 飼育環境下にて人為的な細菌感染を必要としない dysbiosis モデルマウスを構築した。構築したモデルマウスから糞便を採取し、16S rRNA 遺伝子配列解析に基づく網羅的な細菌叢解析を実施した。当該 dysbiosis モデルは、既報 (Nat Com 6: 7806, 2015) に基づき、ヒト IBD 患者の腸内もしくは便中で増加が報告されている大腸菌 (もしくは Enterobacteriaceae 属、Proteobacteria 門) が多く検出されることを期待したが、予想どおり、大腸菌の増加を確認した。同時に、培養法による確認の結果、網羅的遺伝子解析結果と一致し、大腸菌が含まれる Enterobacteriaceae 属の優位な増加を確認した

4. ヒト化 W27 IgA 抗体の候補を得た。

ヒト化 W27 抗体は、マウス W27 抗体の相補性決定領域をヒト抗体のフレームワーク領域にグラフィティンングすることで設計した。設計した可変領域を有するヒト化 W27 IgG 抗体を Expi293 細胞にて発現させ、バイオレイヤー干渉法により抗原との結合親和性を確認した。その結果、マウス W27 抗体の可変領域を有するヒトキメラ IgG 抗体と同等の抗原親和性を有するヒト化 W27 IgG 抗体を取得でき、ヒト化 W27 IgA 抗体の候補となる可変領域のアミノ酸配列を得た。

ヒト化 W27 IgA 多量体とマウス W27 IgA 多量体 (ともに抗原ペプチドによるアフィニティ精製抗体) を用いて大腸菌に対する増殖抑制試験を行った。抗原結合力は同等であるのにリコンビナントヒト化 IgA 多量体抗体がマウス IgA 多量体抗体よりも細菌増殖抑制効果が弱かった。この現象の一つの可能性は、抗原結合部位の特性だけではなくリコンビナントとマウスハイブリドーマで産生される IgA 多量体抗体が持つ未知の機能の違い (糖鎖修飾など) により細菌への効果が異なる可能性である。ATCC25922 株に対する結合力を ELISA で比較検討したところ、ヒト化 IgA 多量体抗体はマウス W27 IgA 多量体抗体よりも相対的に約 3 分の 1 の結合力しか示さなかった。ELISA による結合力の違いが細菌に対する増殖抑制効果の違いに反映されている可能性が示唆された。

考察

問題点は、ヒト化 IgA 多量体抗体の *in vitro* 細菌増殖抑制効果が W27 マウス IgA 多量体抗体と同等の効果が見られなかったこと、ヒト化 IgA 多量体抗体の Expi293 細胞における産生量が極めて低かったことである。このまま抗体医薬として開発するには非常に困難であることがわかった。今回の結果から、W27 抗体は生物活性を保持した状態で容易にヒト化できないことがわかった。また、最近 IgA 抗体の精製に利用されるようになった Protein L に W27 抗体の kappa 鎖は反応しないため、抗体の精製が非常に難しいことも解決すべき重要な点であることがわかった。

これまで抗体薬として開発に成功したものは、その殆どが IgG クラスであり、IgA を生物製剤として開発しようとした今回の試みは世界的にも稀有な挑戦であった。可変領域部分の物理化学的性質は、ほぼ完全に温

存できた一方で、生物活性を保持できなかった科学的説明は、粘膜分泌型 IgA 分子自体の作用メカニズムが十分解明されていない現状から、IgG で見られる antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity のような IgA 特異的な新たな機構の存在が疑われた。今回少なくとも、親であるマウス W27 IgA 抗体の薬効成分が、多量体であることが必要条件であることを再確認し、結合特異性以外のメカニズムを解明する上で、マウス W27 IgA をベンチマークとして、複数クローンを多元的に解析することにより、潰瘍性大腸炎に限らず、腸管免疫をはじめとして粘膜免疫に関する新たな発見と治療につながると思われる。

腸管内には多くの IgA クローンが存在しており、再度ハイブリドーマを作製してスクリーニングすることで、開発に有利でしかも W27 抗体と同等の細菌への効果を有するクローンが得られる可能性がある。今までの研究からスクリーニングで選択すべき条件(抗原への結合力判定にバイオレイヤー干渉法に加えて細菌に対する ELISA による結合力判定も必要)が明確になったため、早期にハイブリドーマのスクリーニングを行う予定である。

事業化への展望

経口 IgA 抗体による腸内細菌叢改善は今後も臨床応用の必要性はますます高まると考える。最近の Science には現在最も注目を浴びている抗 PD-1 抗体による制ガン作用に腸内細菌がその効果を大きく修飾することがヒトガン患者のデータを使って 3 報同時に掲載された。このように、腸炎のような消化器疾患だけでなく、広汎な疾病の発病に腸内細菌叢構成が関与することが次々と報告されている。

一方で、腸内細菌叢を改善するための方策は便移植や菌移植の他に健康食品として分類されるプロバイオティクス製品があるだけであり、それらの機序はよくわかっていない。IgA 抗体は抗体であるがゆえに厳密な特異性(分子認識)を使って細菌を選択制御していることが研究の過程で明らかになった。これを臨床応用することができれば、宿主を利する細菌には反応せず宿主を病気に導くような細菌を選択的に抑制し、細菌叢全体の構成を改善することができ、結果として多くの病気の予防と治療につながると信じる。

今回の研究結果からマウスの細菌叢だけではなく、ヒトの腸内細菌にもマウス由来の IgA 抗体が反応することが明らかになった。残るは事業化のために必要な生産系に適したマウスの IgA 抗体を再度スクリーニングで探索することである。ヒト化あるいはマウス抗体も含めてリコンビナント IgA 抗体の工業生産系確立を目指せるクローンを獲得することであると考える。

In collaboration with Daiichi Sankyo (A research group of Dr. Tohru Takahashi), we have achieved our objectives for a project ‘Development of oral humanized IgA antibody drug for the treatment of gut dysbiosis’.

1. W27 IgA polymer, but not W27 chimeric IgG, was suitable as oral antibody drug.
We partially purified mouse W27 IgA polymer from hybridoma culture supernatant with hydroxyapatite chromatography, and purified recombinant human chimeric W27 IgG from CHO culture supernatant with Protein A chromatography. Their binding activity against *Escherichia coli* (*E. coli*) was measured by ELISA assay. W27 IgA polymer showed both stronger binding ability and growth inhibition activity against *E. coli* than human chimeric W27 IgG.
2. We confirmed that W27 mouse IgA could bind to some of human gut microbiota.
Human feces were collected from two healthy controls and ten IBD patients. Diluted feces samples were stained with W27 IgA or anti-human IgA antibodies and analyzed on flow cytometry. Then W27-binding human gut bacteria were sorted and analyzed by high-throughput 16S rRNA sequencing. As expected, W27-binding bacteria as well as total microbial composition were variable among individuals. Further analysis is necessary to identify what kind of human gut bacteria are targeted by W27 IgA.
3. We have set up a mouse ‘dysbiosis’ model in which Enterobacteriaceae (including *E. coli*) increases in their feces.
According to a previous report (Nat Com 6: 7806, 2015), we have developed dysbiosis mice under specific pathogen free condition. In feces of these mice, Enterobacteriaceae was increased significantly in both relative abundance of bacterial composition based on 16S rRNA analysis and absolute bacterial numbers based on culture experiment.
4. We have designed and manufactured the humanized W27 antibody that shows the comparable affinity to chimeric W27 IgG antibody against W27-epitope peptide.
We purified humanized W27 IgA polymer from Expi293 cell culture supernatant with affinity-chromatography. Total obtained amount of humanized W27 IgA polymer, however, was too low to perform the repeated experiments. An experiment showed that humanized W27 IgA polymer bound to *E. coli* about three times weaker than mouse W27 IgA polymer derived from hybridoma supernatant. Probably because of weak binding activity of it, humanized W27 IgA polymer showed weaker *in vitro* growth inhibition activity against *E. coli*.

Discussion

There are two hurdles to overcome for achievement of our project ‘Development of oral humanized IgA antibody drug for the treatment of gut dysbiosis’. One is that our manufactured humanized IgA polymer did not show comparable biological activities in binding and growth inhibition against *E. coli*, although it clearly

showed almost identical high-affinity to W27-epitope peptide as compared to chimeric W27 IgG. We suspect that unknown function of polymer IgA molecule may affect its biological activities against bacteria. Indeed, at present, all commercially available antibody drugs are IgG. The other is low productivity of recombinant humanized IgA polymer. To solve these problems, further basic research on IgA molecule (not only W27 but other IgA clones) is absolutely necessary to develop IgA drug corresponding to industrial productivity.