

2014年 模擬授業

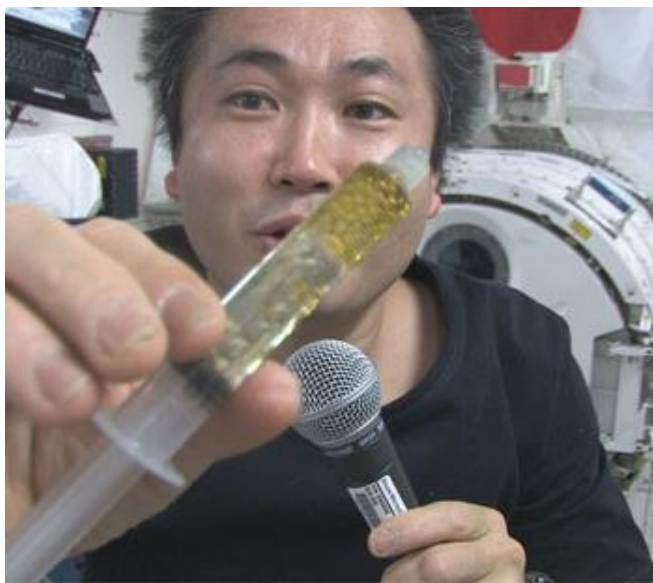
<新しい抗体治療薬の設計>

# 抗体でがんをやっつける

東大 先端研 計量生物医学 浜窪隆雄

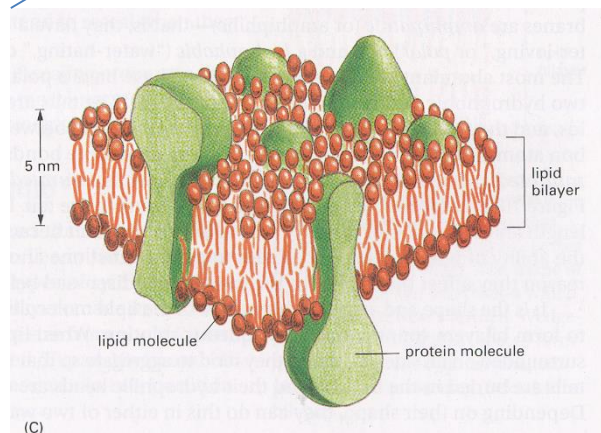
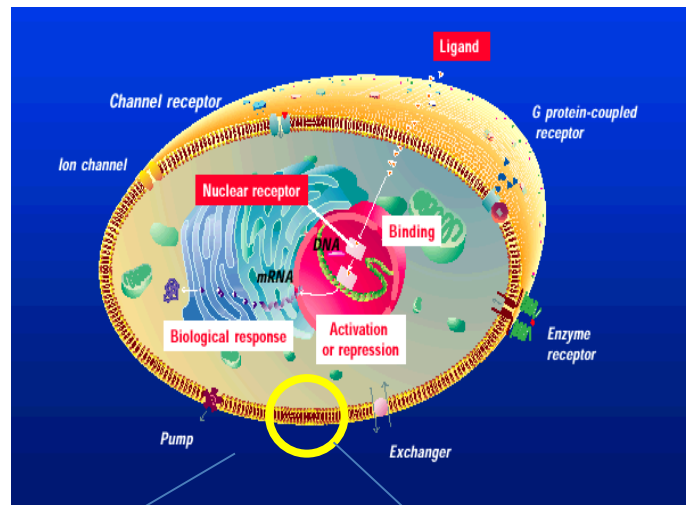
# コレステロールの研究から膜タンパク質へ

水と油はまじりあうのか？  
若田光一さんの宇宙実験(2009年)



細胞膜は脂質でできている

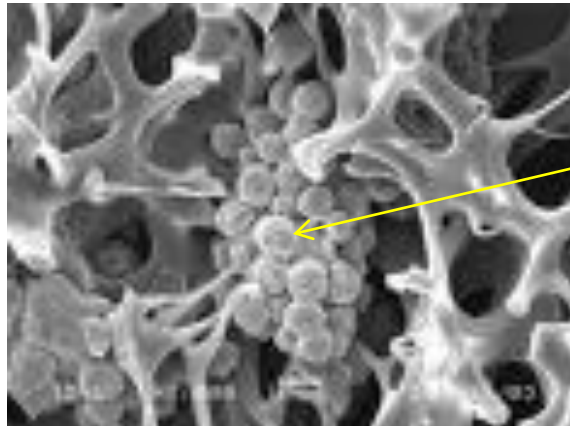
## 細胞の断面図



親水性  
疎水性  
両親媒性

# カリフォルニアヨトウ蛾

*Spodoptera frugiperda*

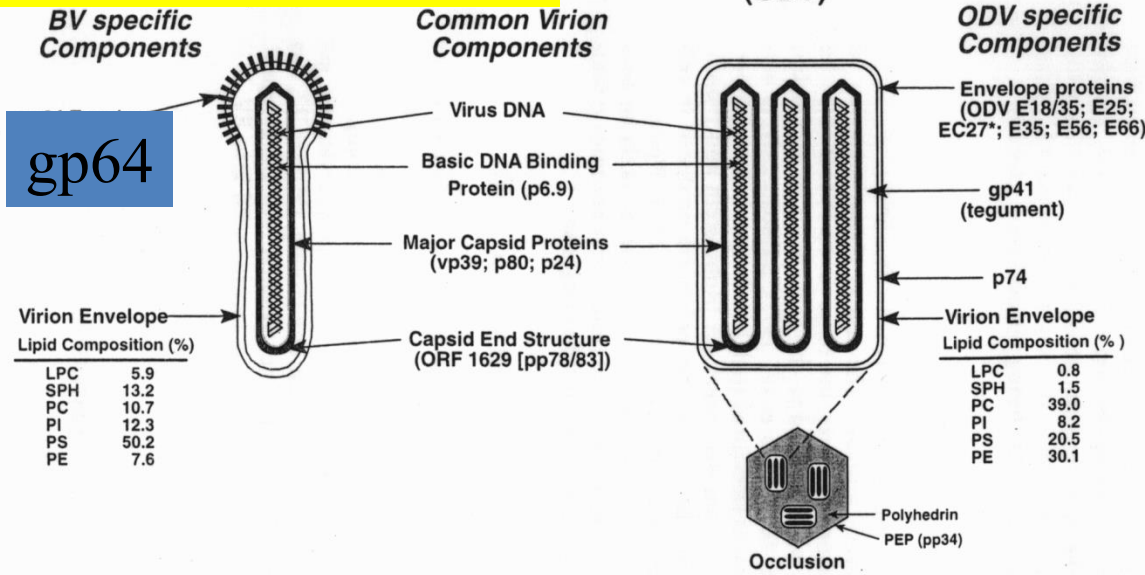


Sf9細胞

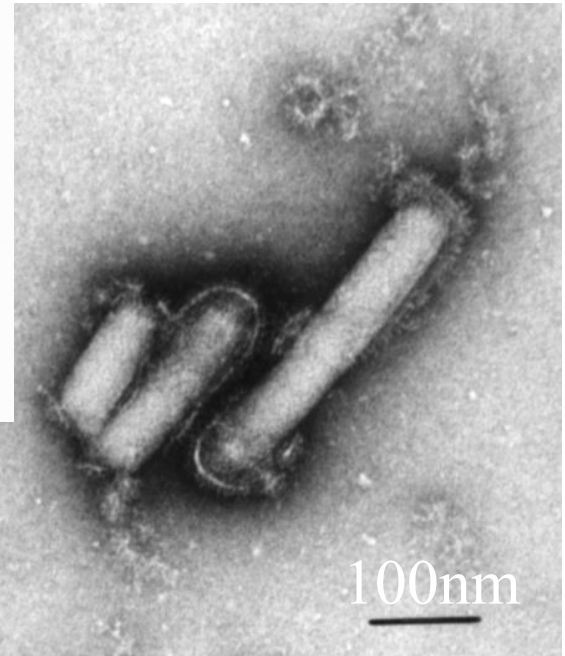
# バキュロウイルス

## 核封入体ウイルス

### 発芽ウイルス (BV)

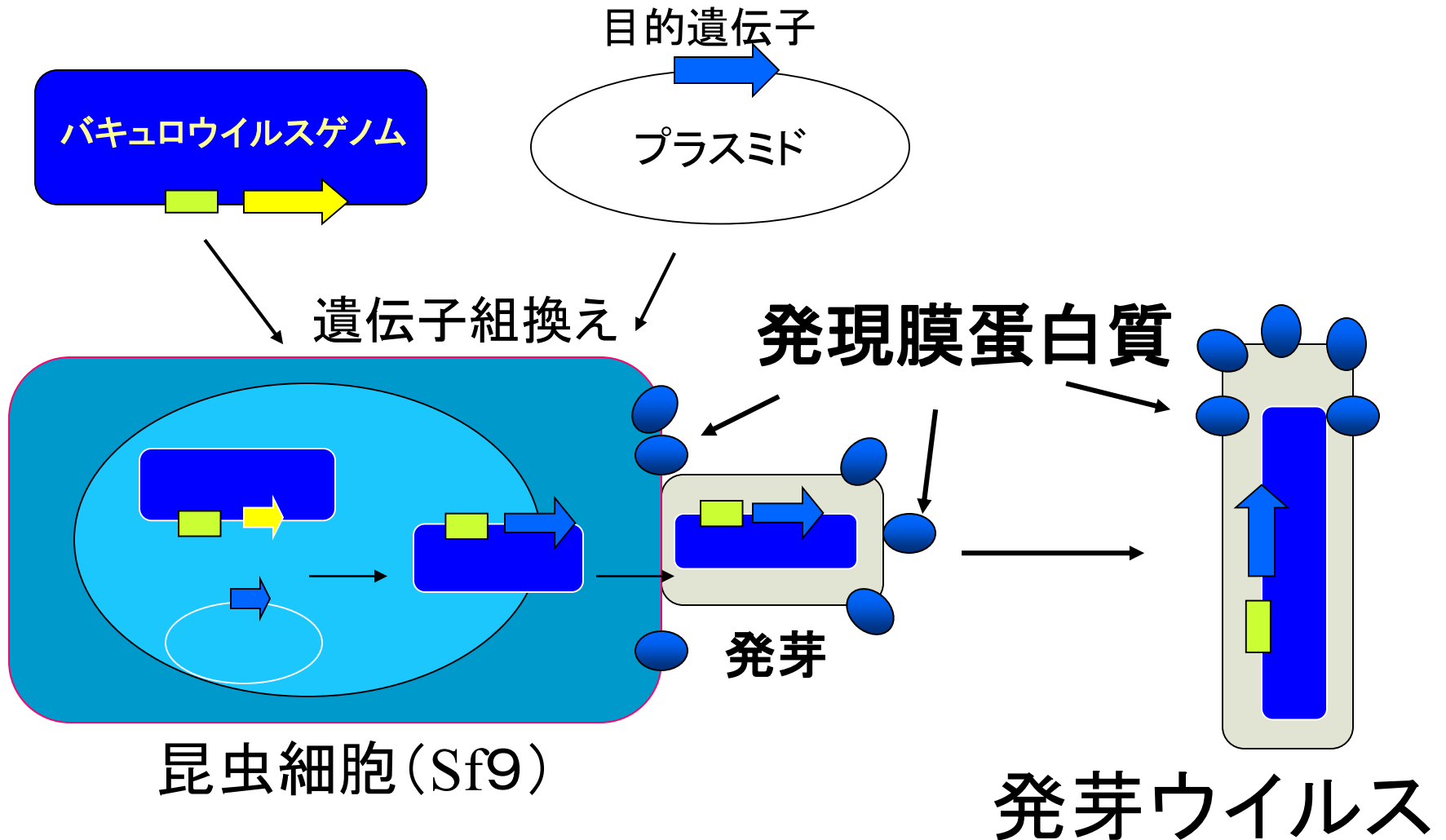


## 発芽ウイルス BV

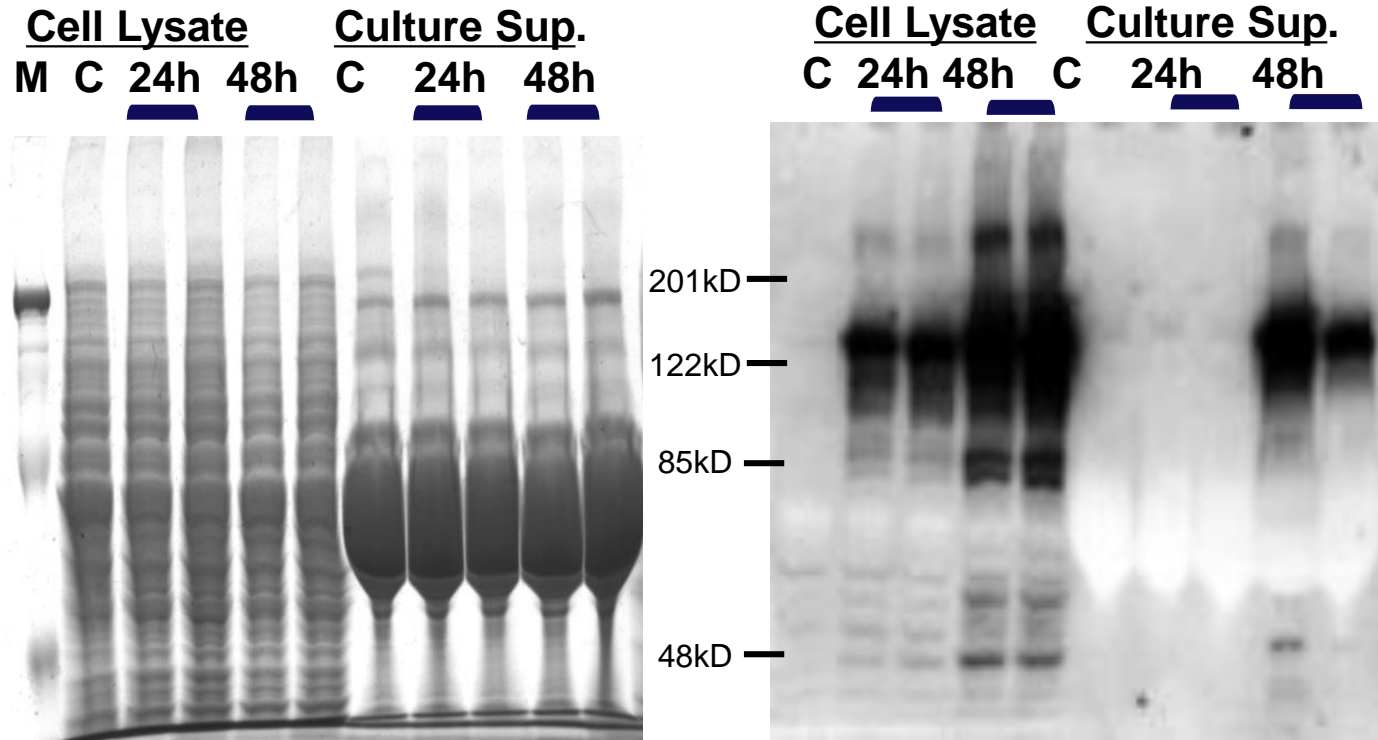


Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV)

# バキュロウイルスを用いた 膜蛋白質発現法



# Time course for Expression of SREBP-2



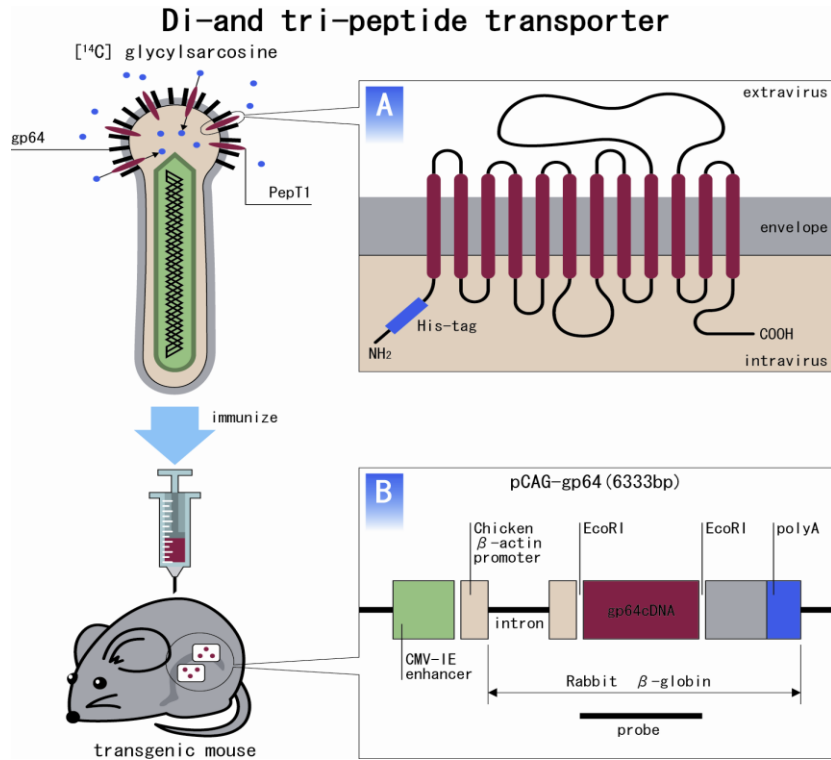
**CBB staining**

**Immunoblot staining  
with anti-SREBP2**

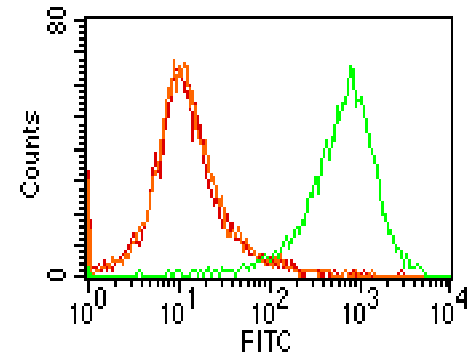
膜タンパク質がバキュロウイルス上に発現されることを見つけた時のデータ



# バキュロウイルスディスプレイを用いた膜タンパク質抗体作製法

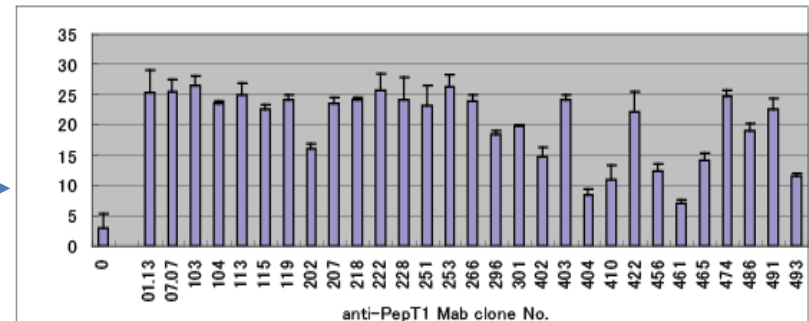


ペプチドトランスポーター（小腸上皮にあるペプチドを吸収するタンパク質）：この免疫法ではじめてがん細胞を殺す抗体がとれた。



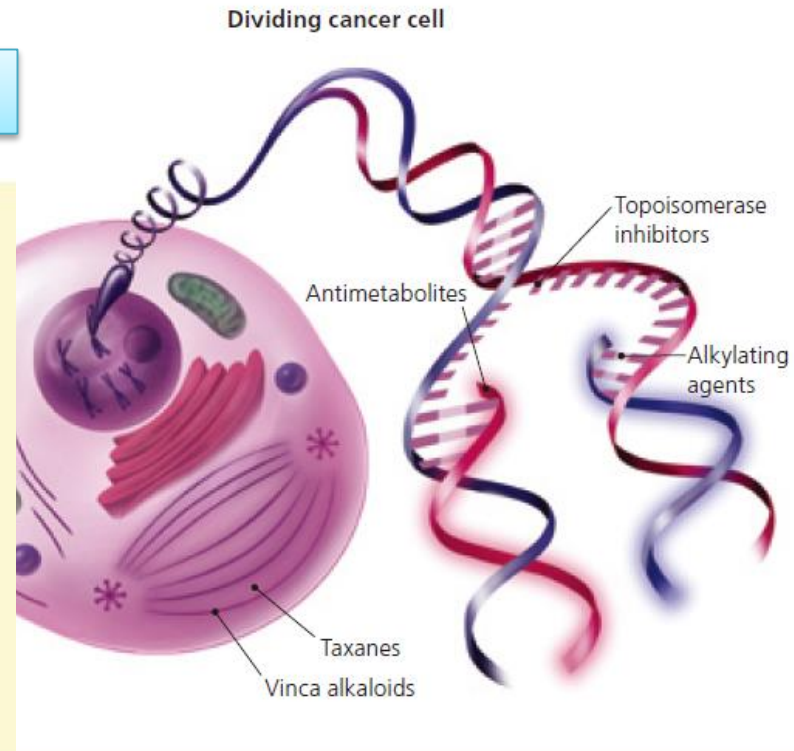
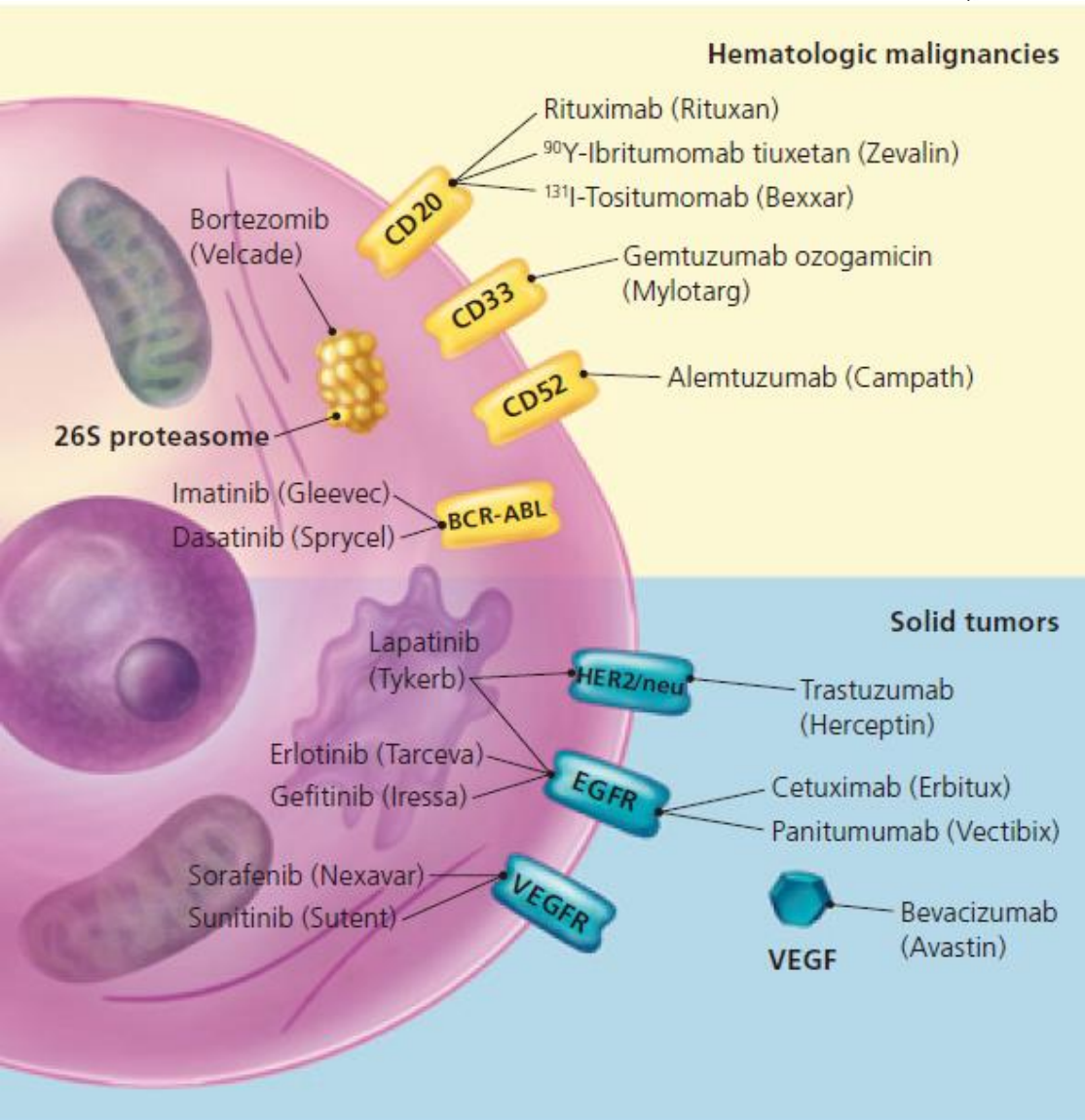
膵がん細胞を認識する

膵がん細胞に対する細胞障害活性



# 分子標的医薬

## Targeted Therapies



Stanley Cohen

EGF (上皮成長因子)  
Epidermal growth  
factorの発見  
1986年ノーベル賞



# 現在認められている抗体医薬一覧

アルツハイマー症: ソラネズマブ solanezumab

多発性硬化症: ナタリズマブ Natalizumab (タイサブリ)

関節リウマチ: インフリキシマブ Infliximab (レミケード)  
アダリムマブ adalimumab (ヒュミラ)  
トシリズマブ Tocilizumab (アクテムラ)  
セルトリズマブペゴル Certolizumab pegol (シルジア)  
ゴリムマブ golimumab (シンポニ)  
オフアツムマブ ofatumumab (アルゼラ)

好酸球性食道炎: Reslizumab

CAPS: カナキヌマブ canakinumab (イラリス)

強直性脊椎炎: REGN88

全身性エリテマトーデス (SLE): エプラツズマブ Epratuzumab (リンフォサイド)

腎移植拒絶反応: バシリキシマブ Basiliximab (シムレクト)

クローン病潰瘍性大腸炎: Vedolizumab

I 型糖尿病: Otelixizumab  
teplizumab

発作性夜間ヘモグロビン尿症: エクリズマブ Eculizumab (ソリリス)

乾癬: T1h  
ustekinumab

ぶどう膜炎: AIN-457

黄斑変性症: ラニビズマブ Ranibizumab (ルセンティス)

骨粗しょう症: デノスマブ Denosumab (プロリア)

喘息: オマリズマブ Omalizumab (ゾレア)

心血管系: アブシキシマブ Abciximab (レオプロ)

扁平上皮癌(頭頸部): ニモツズマブ Nimotuzumab (BIOMab-EGFR)  
Zalutumumab

血液がん: リツキシマブ rituximab (リツキサン)  
ゲムツズマブ Gemtuzumab ozogamicin (マイロターグ)  
アレムツズマブ Alemtuzumab (キャンパス)  
イブリツモマブ ibritumomab (ゼヴァリン)  
トシツモマブ tositumomab (ベクサーール)  
ガリキシマブ galiximab  
ザノリムマブ Zanolimumab  
オフアツムマブ ofatumumab (アルゼラ)  
Obinutuzumab  
Brentuximab vedotin

非小細胞肺がん: Necitumumab  
Ipilimumab

乳がん: トラスツズマブ Trastuzumab (ハーセプチン)  
パートズマブ Pertuzumab (オムニターグ)  
ベバシヅマブ bevacizumab (アバステン)

胃がん: Ramucirumab  
リツキシマブ rituximab (リツキサン)

腎がん: Girentuximab  
Naptumomab estafenatox

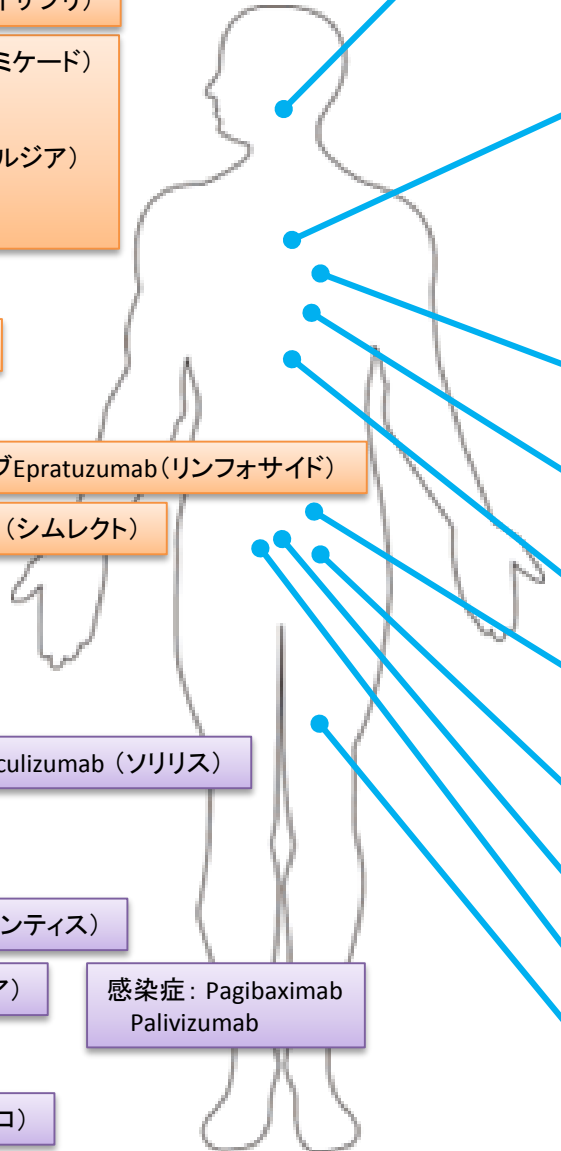
大腸がん: ベバシヅマブ bevacizumab (アバステン)  
セツキシマブ cetuximab (アービタックス)  
パニツマブ panitumumab (ベクティビックス)  
ダロツズマブ Dalotuzumab

卵巣がん: Farletuzumab

癌性腹水: カツマキシマブ Catumaxomab (レモマブ)

転移性黒色腫: tremelimumab  
Ipilimumab

感染症: Pagibaximab  
Palivizumab



# 抗体医薬の歴史

抗体医薬(免疫療法: ワクチン、抗血清)の歴史

Antibody drug (Immunotherapy, vaccine, antiserum, antitoxin)

18世紀初頭 アラビア 天然痘患者の膿疱抽出液が有効

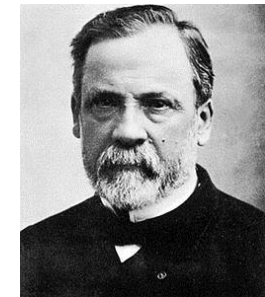
1796 天然痘に対する牛痘ワクチン Jenner

1879-1886 チキンコレラ、狂犬病ワクチン Pasteur

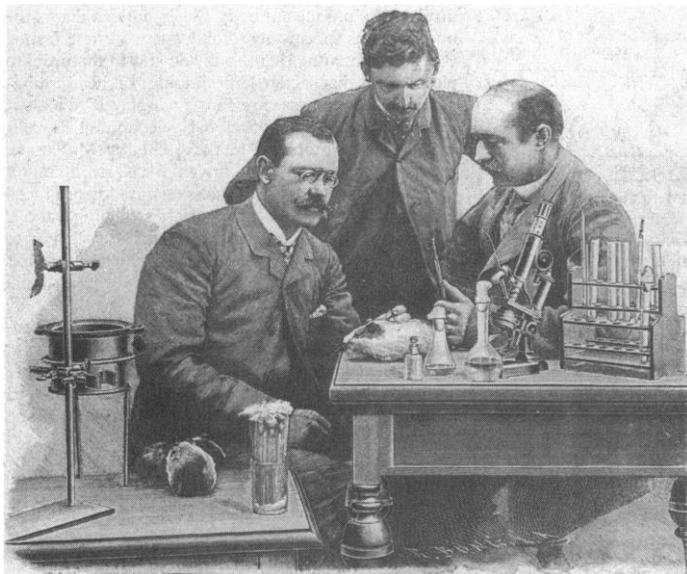
1890 ジフテリア抗血清・破傷風抗毒素の発見 Behring E. Kitasato S.



Edward Jenner (1749-1823)



Louis Pasteur (1822-1895)



Emil A von Behring (1854-1917)



ジフテリア抗毒素(1895年アメリカ)



北里柴三郎(1853-1931)

# 抗体医薬(免疫療法:ワクチン、抗血清)の歴史(続き)

1900 化学療法(chemotherapy)、  
 側鎖説(lateral chain theory) = 抗体  
 特効薬(magic bullet)  
 免疫学(immunology),  
 抗原抗体(antigen - antibody)  
 免疫グロブリン(immunoglobulin) = IgG  
 等々のコンセプトの確立 **Ehrlich P**

1975 モノクローナル抗体(Monoclonal antibody)  
**Kohler G, Milstein C**

1982 最初の治療用抗体

1986 ヒト化抗体

1997 悪性リンパ腫に対する治療用抗体認可

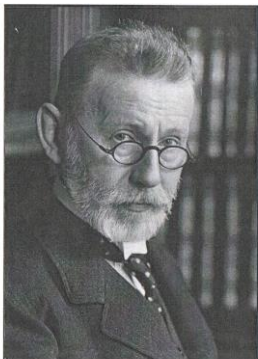


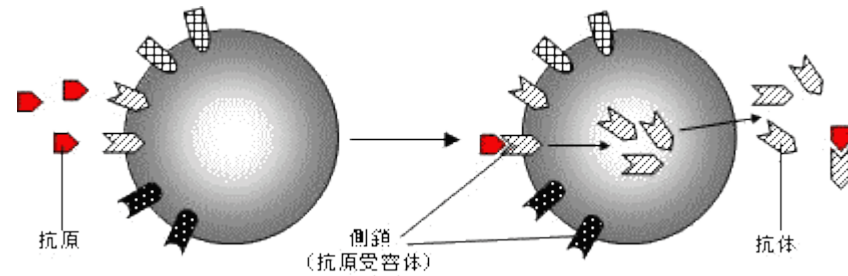
Fig. 16-1 Paul Ehrlich, Ehrlich and Michaelis, joint winners of the 1908 Nobel Prize, advocated opposing theories of the body's defence against invaders.  
 (Source: © The Nobel Foundation.)

Paul Ehrlich(1854-1915)



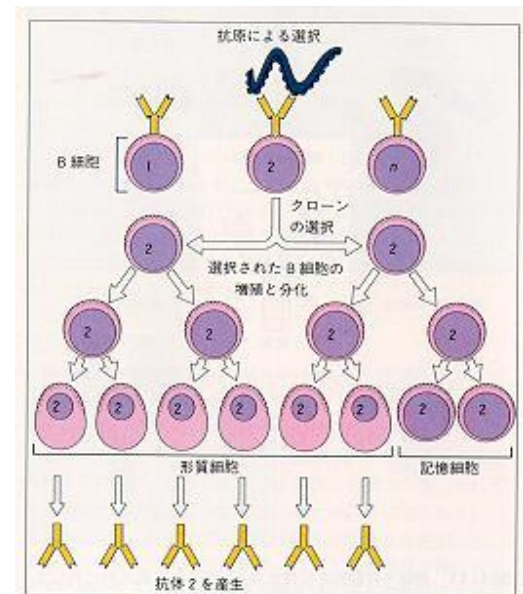
Cesar Milstein (1927-2002)

## エールリッヒの側鎖説



現在のB細胞

## モノクローナル抗体



# 生命情報の流れ

JD Watson & F Crick

1928~

1916~2004



## セントラルドグマ (Central Dogma)

転写 transcription

翻訳 translation

DNA

-->

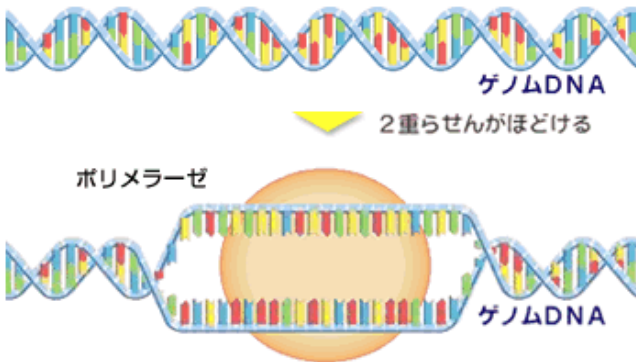
mRNA

-->

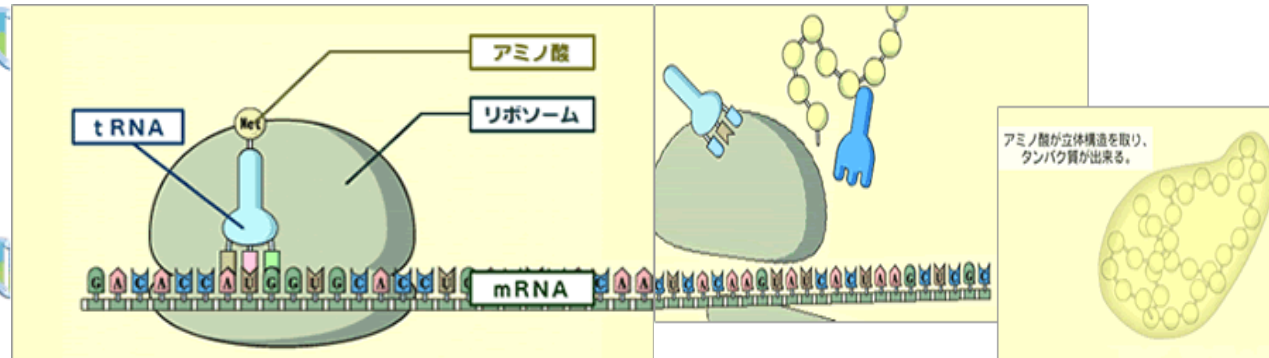
タンパク質

10億塩基対

2万~3万



ゲノミクス  
genomics



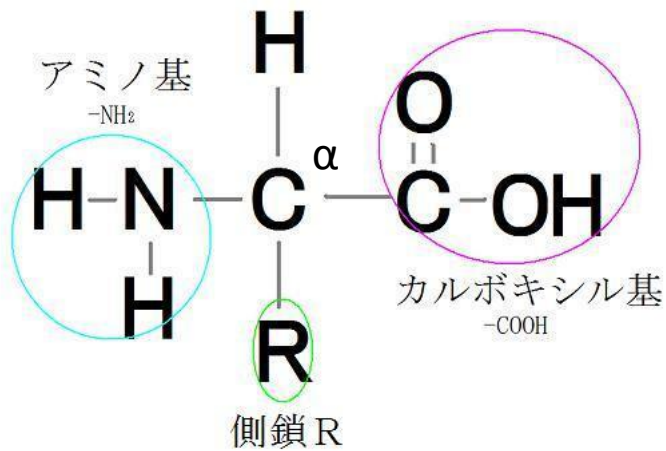
トランスクリプトミクス  
transcriptomics

プロテオミクス  
proteomics



# アミノ酸構造

## Amino acid



Residue (残基)

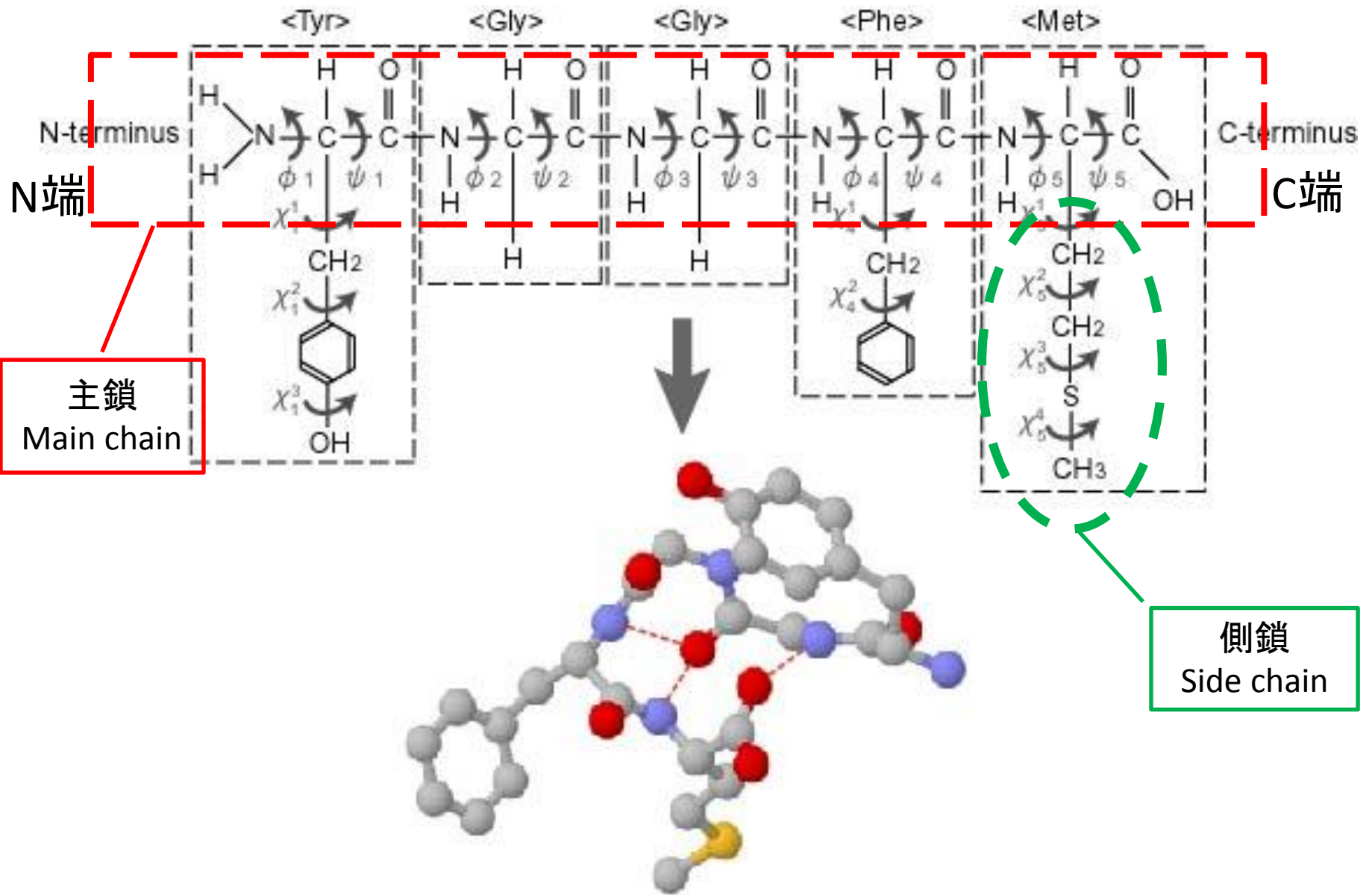
塩基性	$\begin{array}{c} O^- \\   \\ H \\   \\ C \\   \\ CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_3^+ \\ +H_3N \end{array}$ リジン (Lys)
	$\begin{array}{c} O^- \\   \\ H \\   \\ C \\   \\ CH_2-CH_2-CH_2-NH-C(=NH_2^+) \\   \\ NH_2 \\ +H_3N \end{array}$ アルギニン (Arg)
	$\begin{array}{c} O^- \\   \\ H \\   \\ C \\   \\ CH_2-C(=CH) \\   \\ NH \\   \\ CH \\   \\ H \\ +H_3N \end{array}$ ヒスチジン (His)
親水性アミノ酸	$\begin{array}{c} O \\   \\ H \\   \\ C \\   \\ CH_2-COO \\ +H_3N \end{array}$ アスパラギン酸 (Asp)
	$\begin{array}{c} O \\   \\ H \\   \\ C \\   \\ CH_2-CH_2-COO \\ +H_3N \end{array}$ グルタミン酸 (Glu)
	$\begin{array}{c} O \\   \\ H \\   \\ C \\   \\ CH_2-OH \\ +H_3N \end{array}$ セリン (Ser)
	$\begin{array}{c} O \\   \\ H \\   \\ C \\   \\ CH-C(=O)CH_3 \\   \\ OH \\ +H_3N \end{array}$ トレオニン (Thr)
中性	$\begin{array}{c} O \\   \\ H \\   \\ C \\   \\ CH_2-C(=O)NH_2 \\ +H_3N \end{array}$ アスパラギン (Asn)
	$\begin{array}{c} O \\   \\ H \\   \\ C \\   \\ CH_2-CH_2-C(=O)NH_2 \\ +H_3N \end{array}$ グルタミン (Gln)

脂防族	$\begin{array}{c} O^- \\   \\ H \\   \\ C \\   \\ CH_3 \\ +H_3N \end{array}$ アラニン (Ala)
	$\begin{array}{c} O^- \\   \\ H \\   \\ C \\   \\ H \\ +H_3N \end{array}$ グリシン (Gly)
	$\begin{array}{c} O^- \\   \\ H \\   \\ C \\   \\ CH-CH_3 \\   \\ CH_3 \\ +H_3N \end{array}$ バリン (Val)
分岐鎖	$\begin{array}{c} O^- \\   \\ H \\   \\ C \\   \\ CH-CH_2-CH_3 \\   \\ CH_3 \\ +H_3N \end{array}$ イソロイシン (Ile)
	$\begin{array}{c} O^- \\   \\ H \\   \\ C \\   \\ CH_2-CH-CH_3 \\   \\ CH_3 \\ +H_3N \end{array}$ ロイシン (Leu)
疎水性アミノ酸	$\begin{array}{c} O \\   \\ O \\   \\ H \\   \\ C \\   \\ CH_2-C_6H_5 \\ +H_3N \end{array}$ フェニルアラニン (Phe)
	$\begin{array}{c} O^- \\   \\ H \\   \\ C \\   \\ CH_2-C_6H_4-OH \\ +H_3N \end{array}$ チロシン (Tyr)
	$\begin{array}{c} O^- \\   \\ H \\   \\ C \\   \\ CH_2-C(=O)-NH-C_6H_5 \\ +H_3N \end{array}$ トリプトファン (Trp)
含硫	$\begin{array}{c} O^- \\   \\ H \\   \\ C \\   \\ CH_2-CH_2-S-CH_3 \\ +H_3N \end{array}$ メチオニン (Met)
	$\begin{array}{c} O^- \\   \\ H \\   \\ C \\   \\ CH_2-SH \\ +H_3N \end{array}$ システイン (Cys)
特殊アミノ酸	$\begin{array}{c} O \\   \\ H \\   \\ C \\   \\ CH_2-CH_2 \\   \\ NH-CH_2 \\ +H_3N \end{array}$ プロリン (Pro)



# ペプチド (peptide)

= アミノ酸がペプチド結合でつながったもの



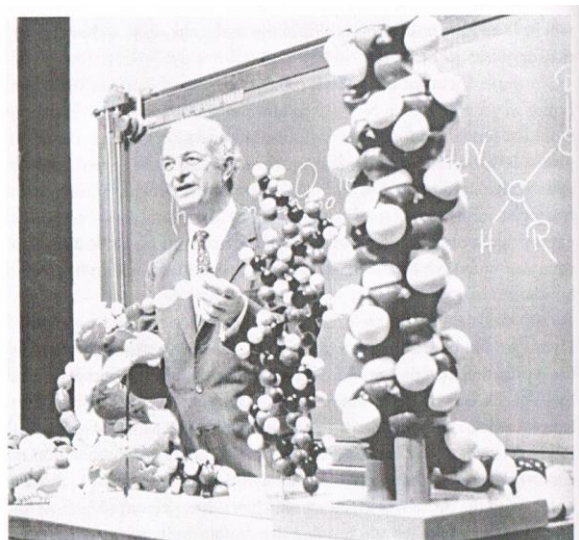
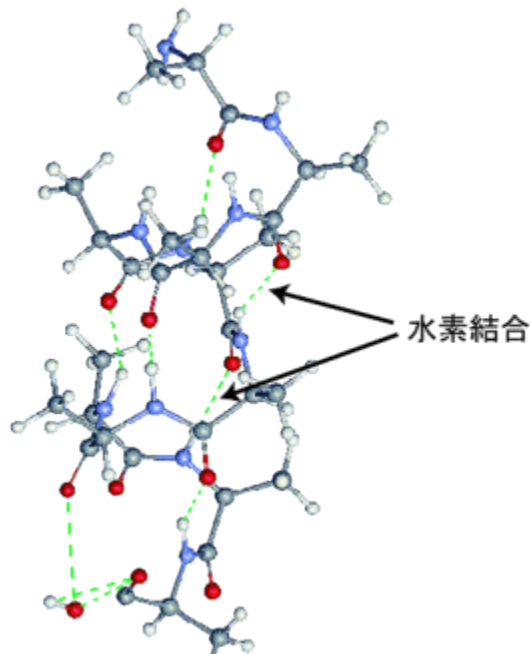
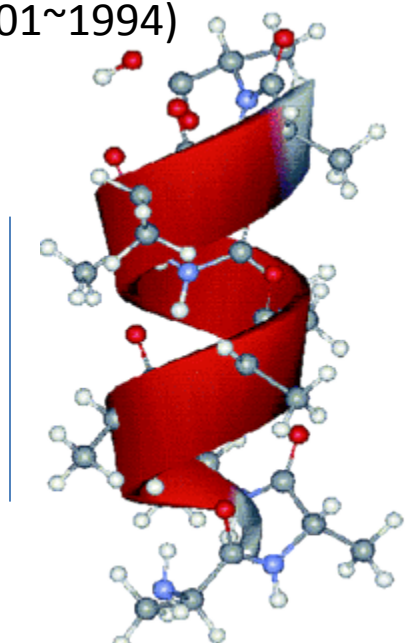


Fig. 11.1 Linus Pauling lecturing, with molecular models at his side. (From the Ava Helen and Linus Pauling papers, Oregon State University special collection.)

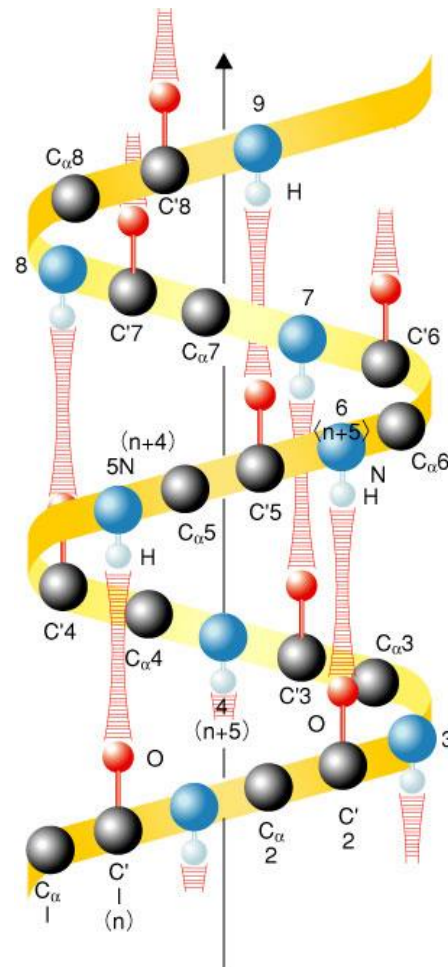
# α ヘリックス構造

Linus Pauling (1901~1994)

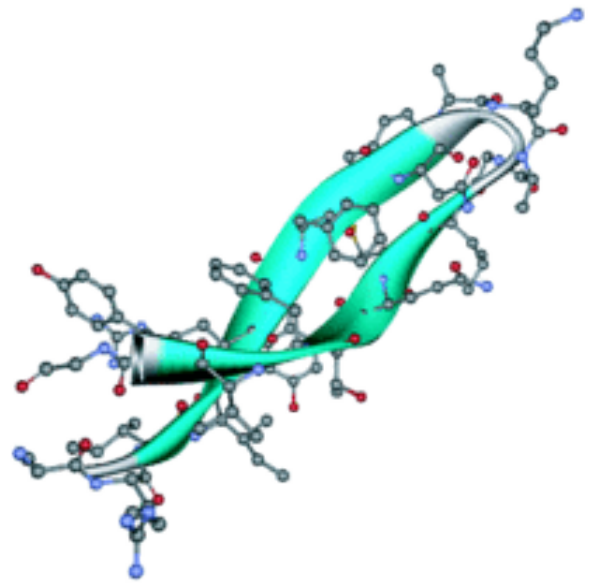
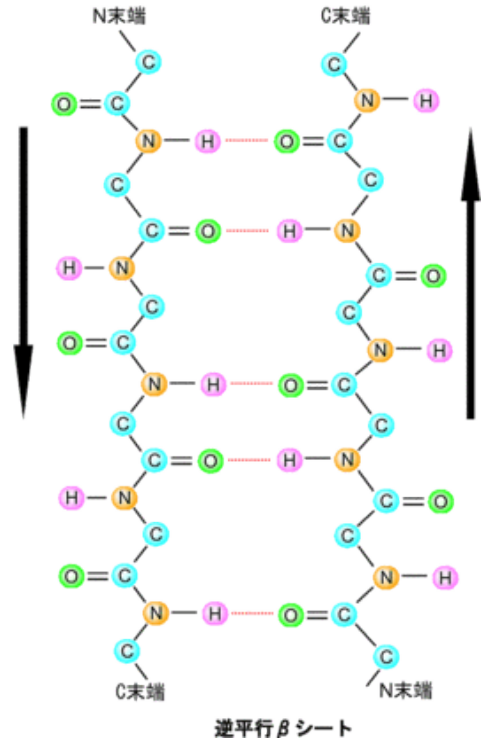
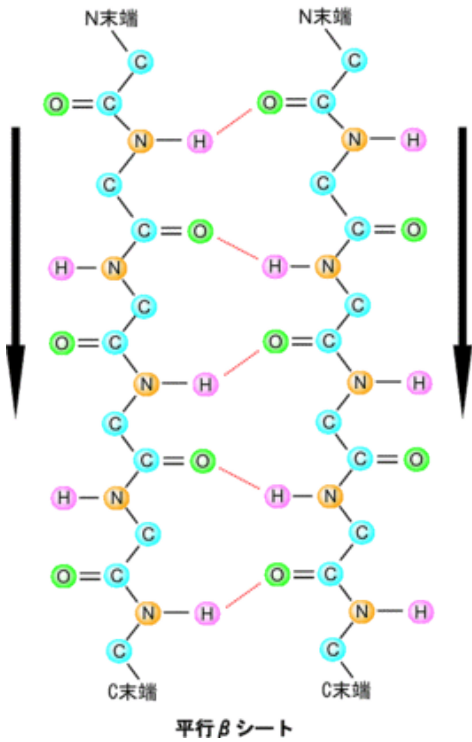
5.4 Å  
3.6 aa



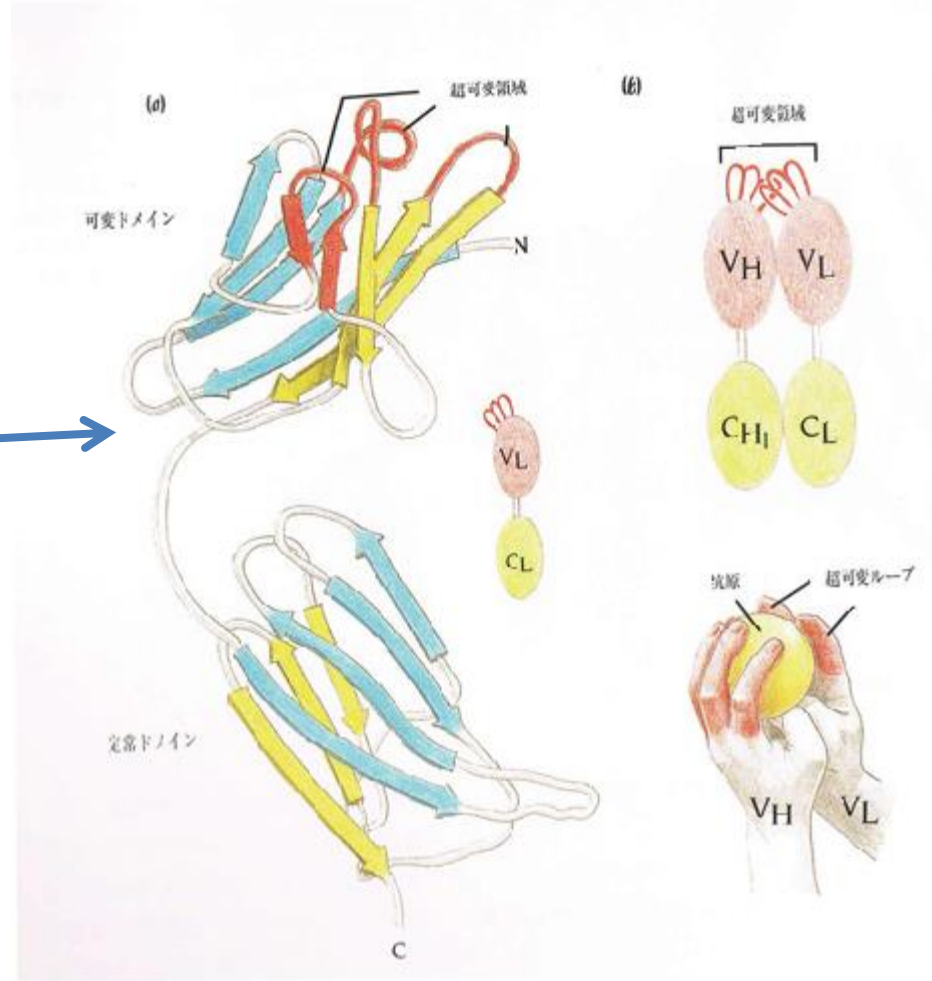
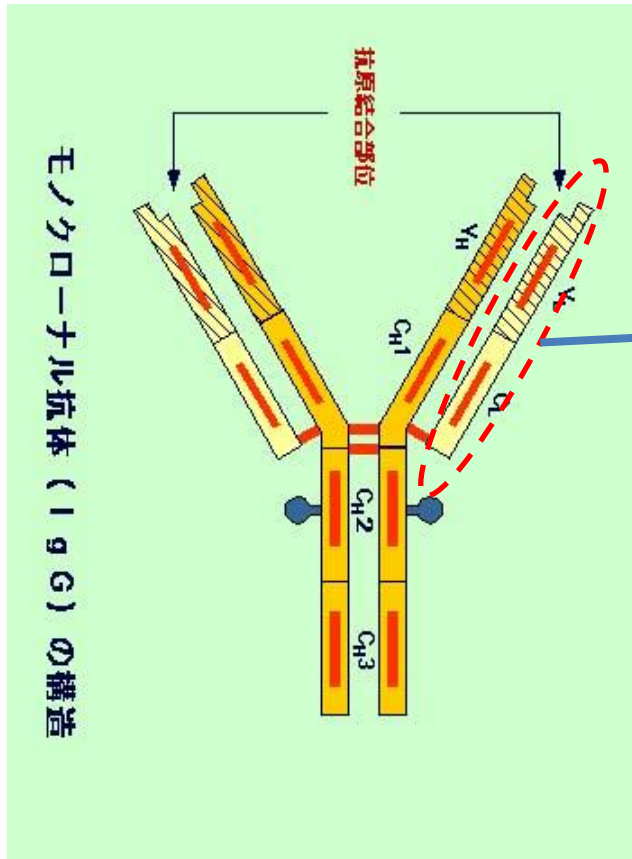
主鎖のペプチド結合 (C=OとN-H) が水素結合を形成する。  
主に右巻きらせん。



# β シート構造

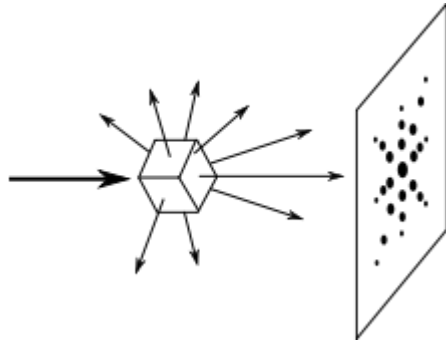


# 抗体 (IgG) 構造

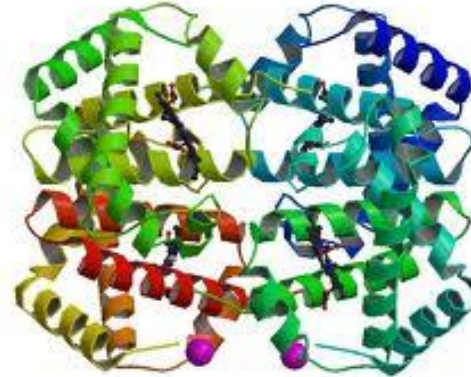
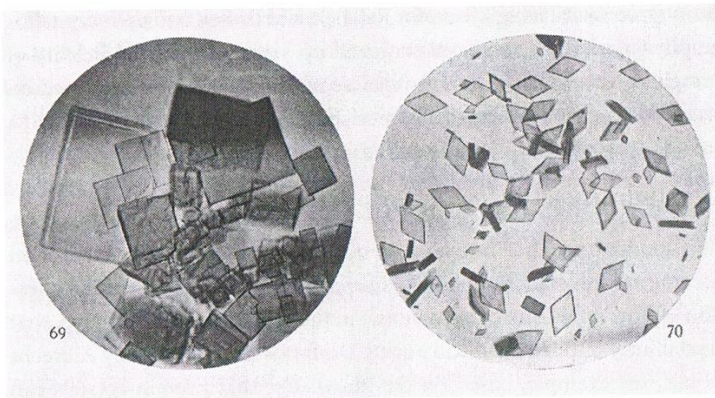




# X線結晶解析(X-ray crystallography)



分子が順序良く並んだ結晶にX線をあてると回折が起こる。回折縞を解析することによって原子の空間的位置を推定する。

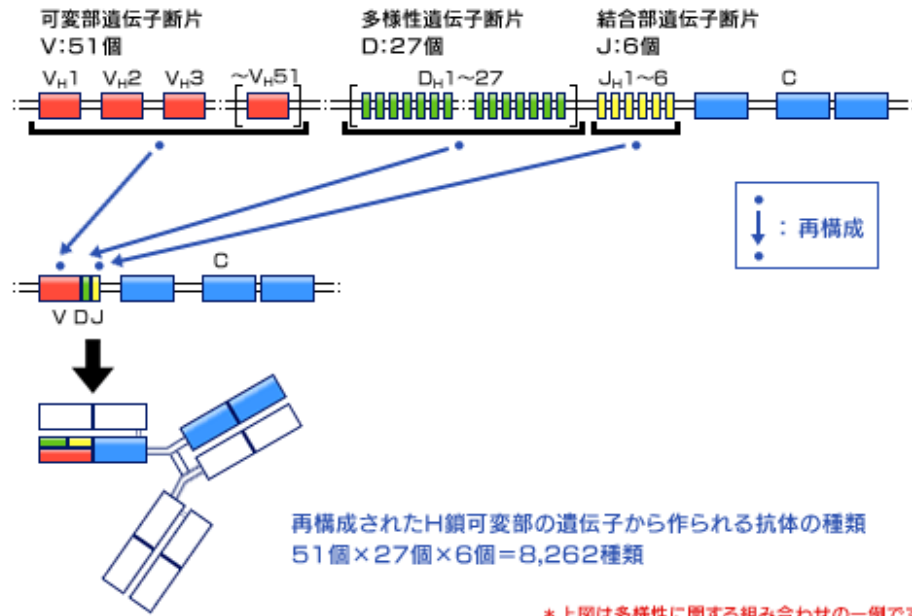


Max Perutz(1914-2002)

Fig. 2.1 Haemoglobin crystals, photographed in 1909 (from ref. 7). No. 69 is from the quail, no. 70 is from the guinea-fowl. Several hundred species were compared in all.



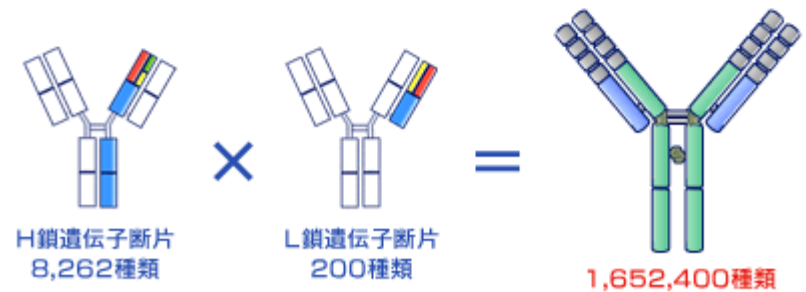
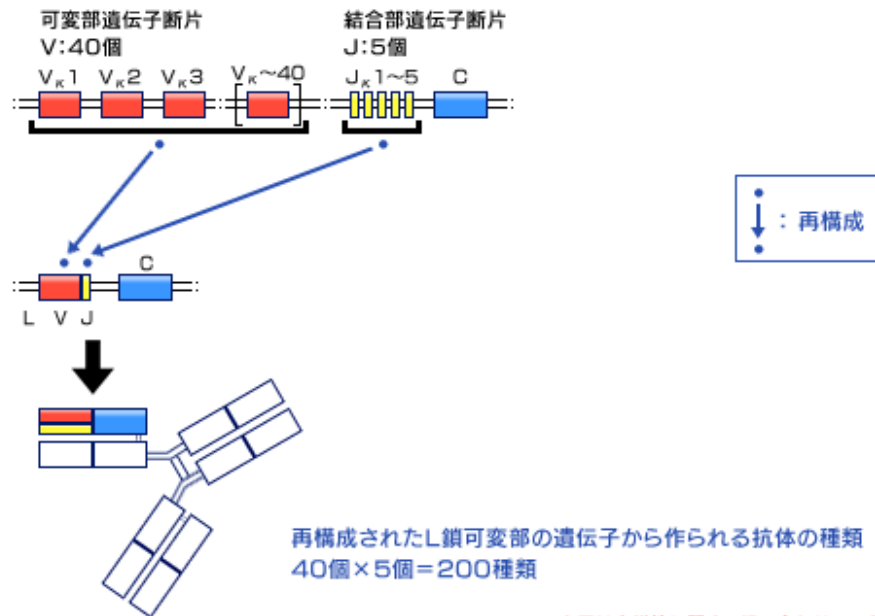
## H鎖



## 抗体の多様性の由来

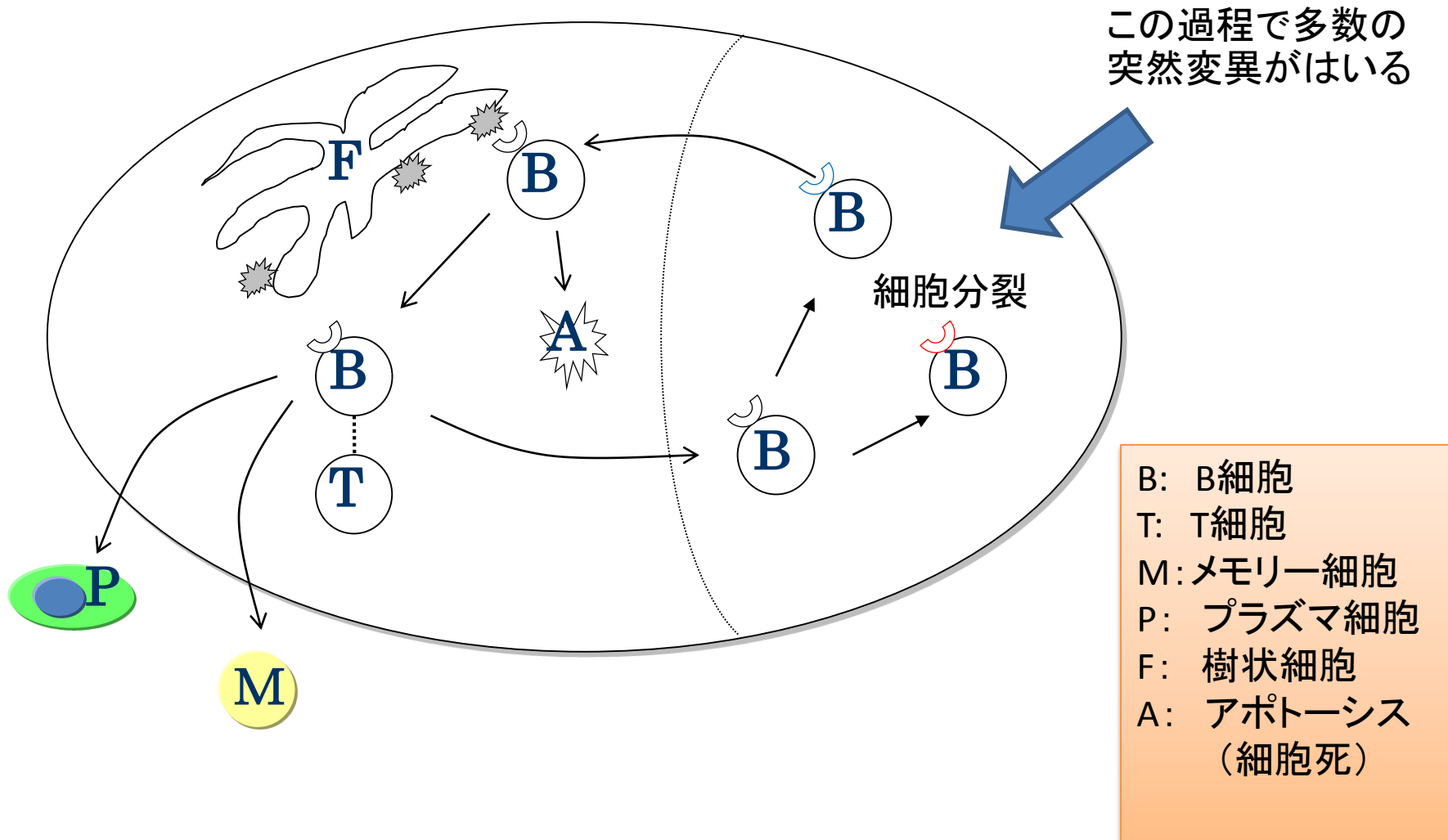
- どうやって多数の分子種に対応する抗体分子を作ることができるかのしくみ
- 抗体遺伝子のVDJ領域の組み換えにより約160万種の抗体タンパク質が可能

## L鎖

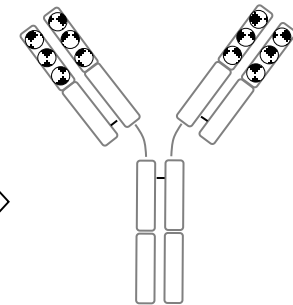
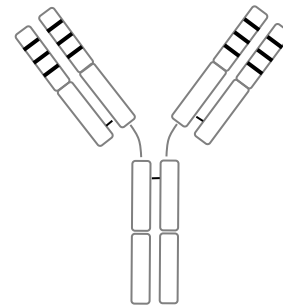
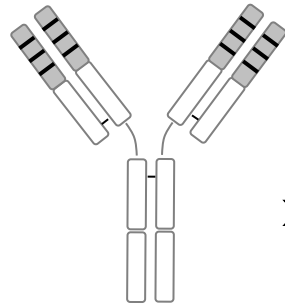
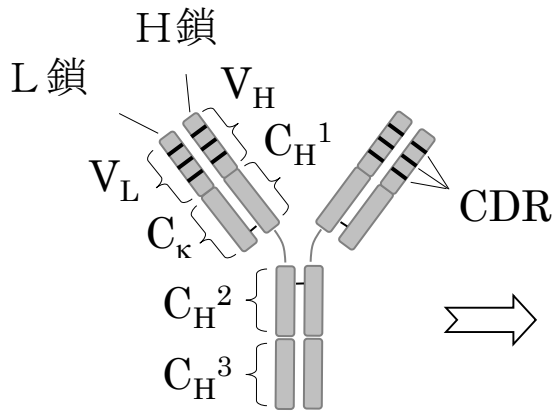


8,262種類の重鎖と200種類の軽鎖の組み合わせは  
 $8,262 \times 200 = 1,652,400 \text{種類}$ 。  
 さらに別の多様性を生む機構があるため、事実上ほとんどの  
 抗原と結合できる抗体を産生することが可能

# リンパ節胚中心で起こる親和性成熟 (affinity maturation mechanism at germinal center)



# CDR領域 (complementarity determining region)



マウス抗体  
**Tositumomab**(Be  
xxar)など

CD20Rceptor  
/non-Hodgkin  
Iodine-131

キメラ抗体  
**Rituximab**(Rit  
uxan)など

CD20  
/non-Hodgkin  
Y-90

CDR移植抗体  
(ヒト化抗体)  
**Trastuzumab**(  
Herceptin)など

Her2  
/breast cancer

ファージディスプレイ抗体  
**Adalimumab**(Hum  
ira)

TNFα  
/RA

**治療用モノクローナル抗体のヒト化への変遷**

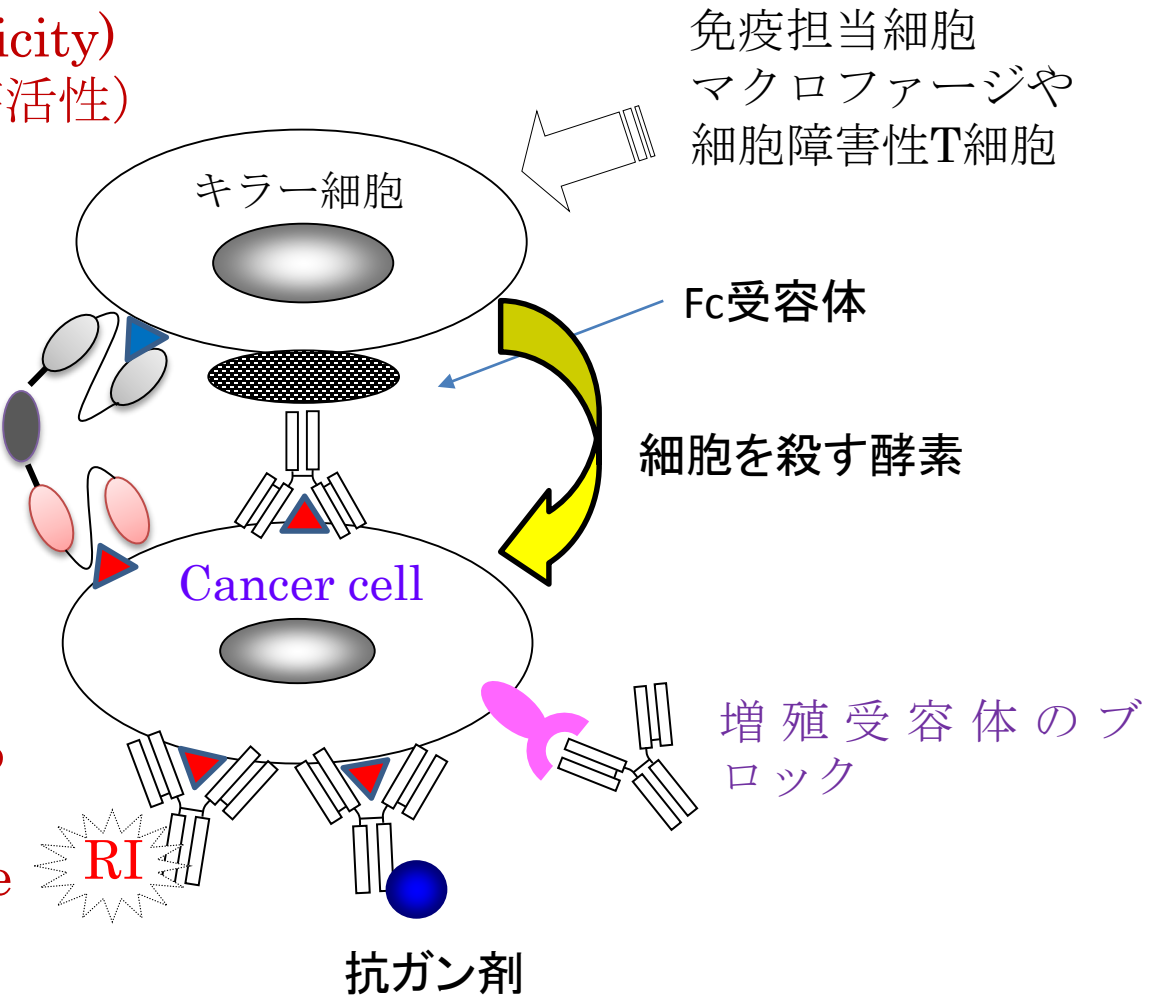
HAMA: human anti-mouse antibody

# モノクローナル抗体を用いた癌治療 Cancer immuno-therapy

ADCC(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)  
(抗体依存性細胞障害活性)

次世代抗体  
バイスペシフィック抗体

抗癌剤や放射線による  
抗腫瘍効果  
Toxin or radio isotope  
conjugate



免疫担当細胞  
マクロファージや  
細胞障害性T細胞

Fc受容体

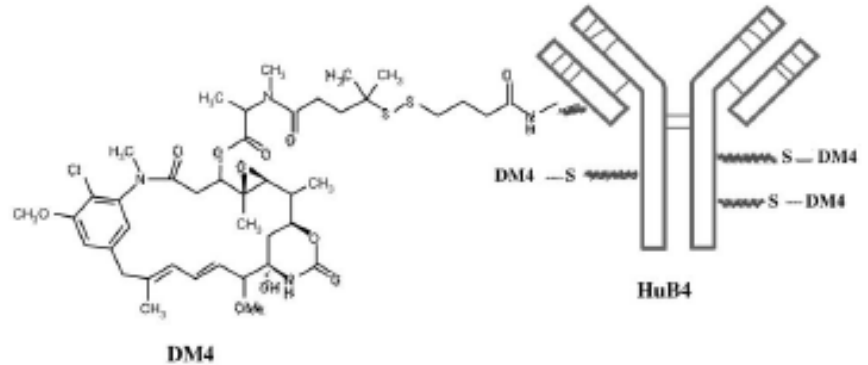
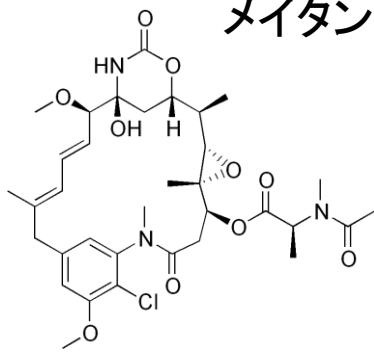
細胞を殺す酵素

増殖受容体のブ  
ロック

抗ガン剤

# 抗体医薬(トキシンコンジュゲート)に用いられる抗がん剤

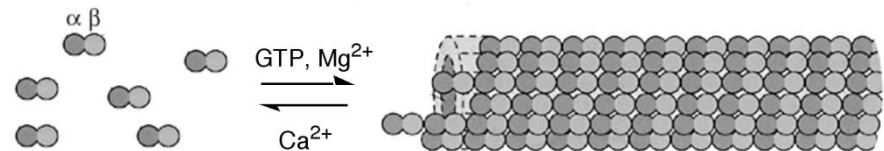
## メイタンシン(Maytansine) 構造



## メイタンシノイド薬(DM)抗体例 SAR3419



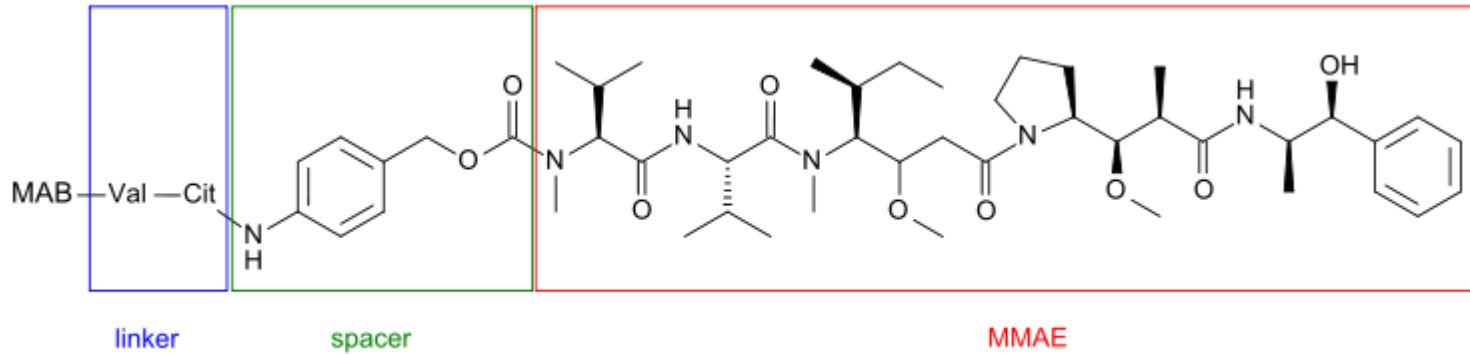
Ethiopian shrub  
 メイテナス・セラタ (Maytenus serrata)



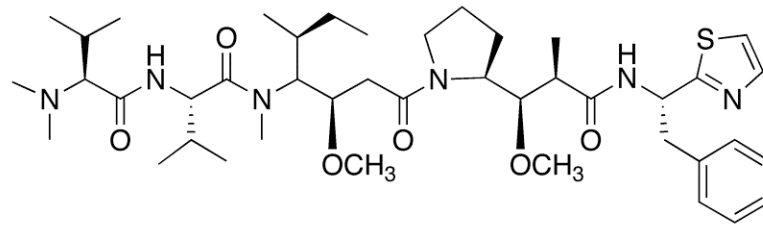
## チューブリン重合阻害



# モノメチルオリスタチン



# ドラスタチン10

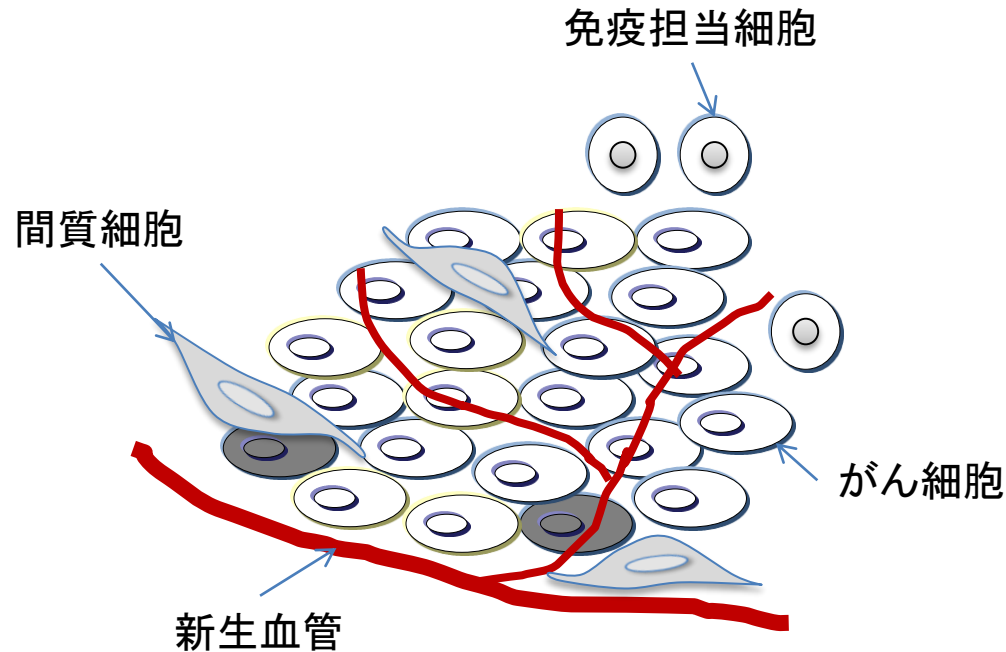


dolastatin 10 (IC<sub>50</sub> 3.0 μM)



タツナミガイ (Dolabella auricularia)  
後鰓目アメフラシ科 体長20cm  
分布: インド洋・太平洋の熱帯域  
日本では房総半島以南の太平洋沿岸

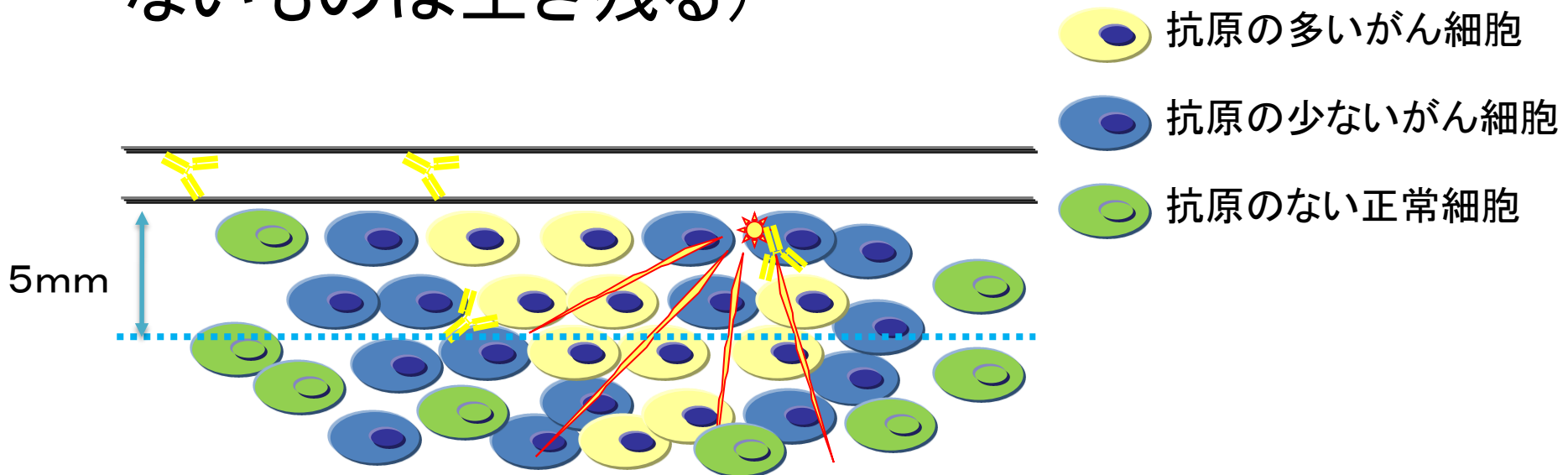
# がん微小環境の破壊戦略

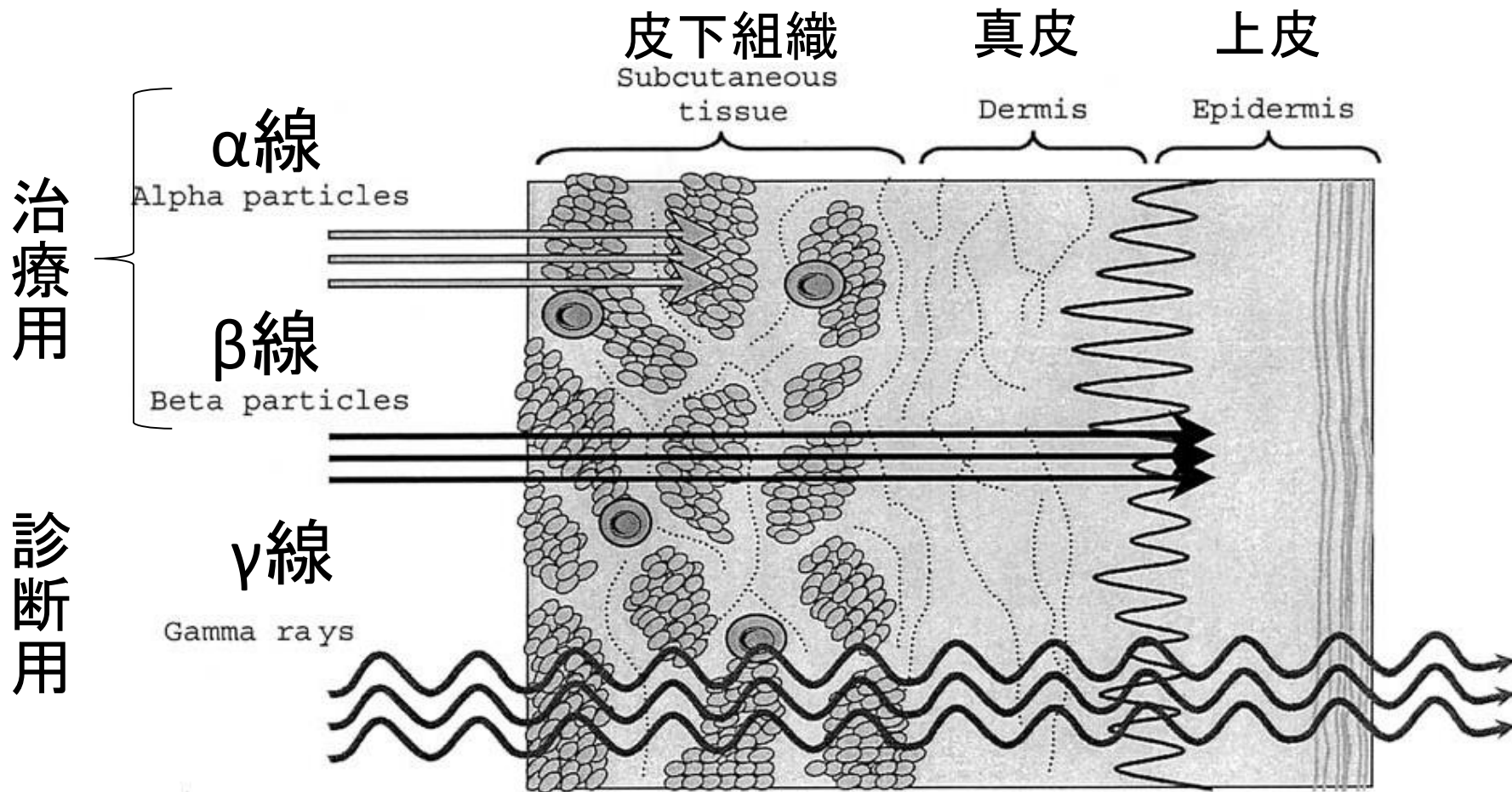


がんの一部の細胞は幹細胞(図に黒色で示した)として存在し、周囲に間質(ストローマ)細胞(CAF)を従え、Notchシグナル等により増殖性を持ち、治療抵抗性を示す。CAFはマクロファージなどの本来がんを認識し排除するはずの免疫担当の細胞に対しても、逆のシグナルを出し、また血管新生や転移を助けるシグナルを出している可能性も指摘されている。このような微小環境を破壊する戦略が今後の抗体医薬に求められている。

# ADCCによる抗体治療の問題点

- 抗体の組織浸透性；単純浸透 (simple diffusion) で5mm程度――>内部のがん細胞が殺せない。
- 癌表面抗原濃度が一様でない。(抗原量の少ないものは生き残る)





Penetration of particulate and electromagnetic radiation.  
(Adapted from Wootton R)

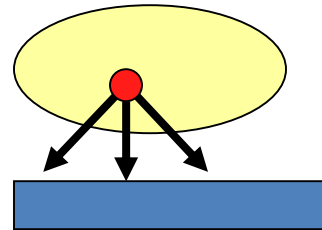
# PETイメージング

Better Resolution (<1mm) by PET

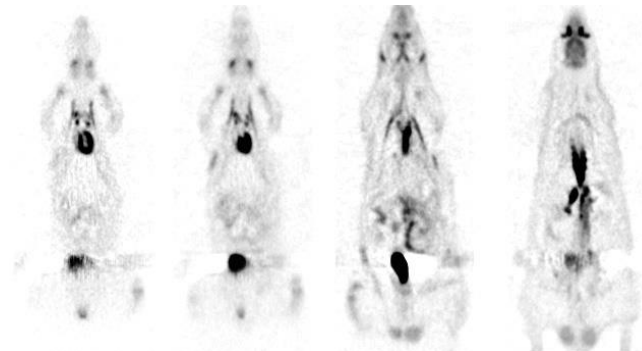
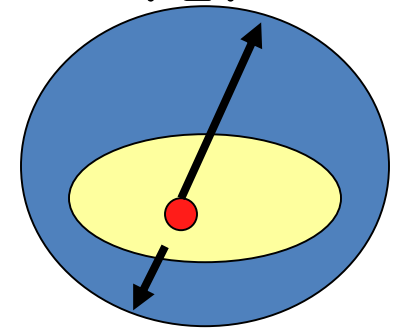
PET: Positron Emission Tomography  
(陽電子放射断層撮影)



SPECT

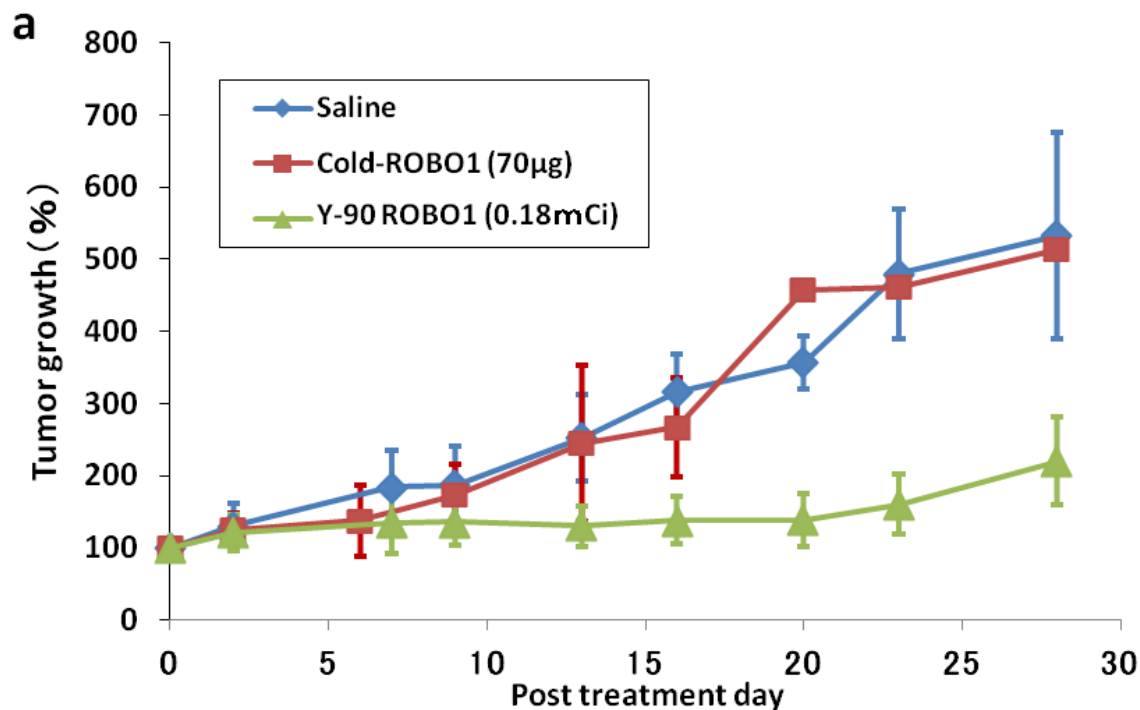


PET





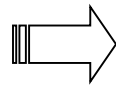
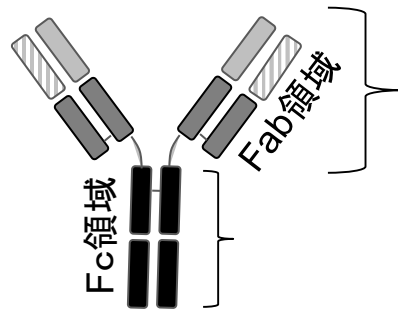
# $^{90}\text{Y}$ 標識抗ROBO1抗体 の肝がん治療効果



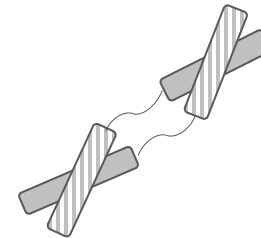
- $^{90}\text{Y}$ 標識抗ROBO1抗体のRITにより、マウス移植HepG2 腫瘍の成長が有意に抑制された。  
※グラフ縦軸はday 0を基準とした腫瘍の成長率

# 抗体工学 抗体の高機能化

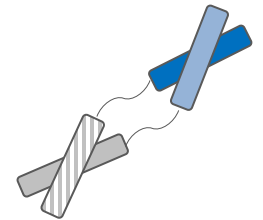
## a) 抗原認識部位の高機能化



一本鎖 (scFv)  
親和性増強

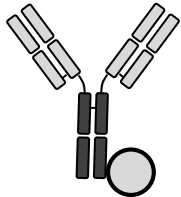


ダイアボディ  
(二価)

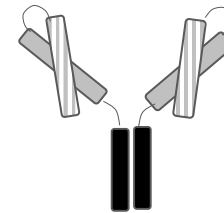


バイスペシフィック  
ダイアボディ

## b) Fc領域を用いた高機能化

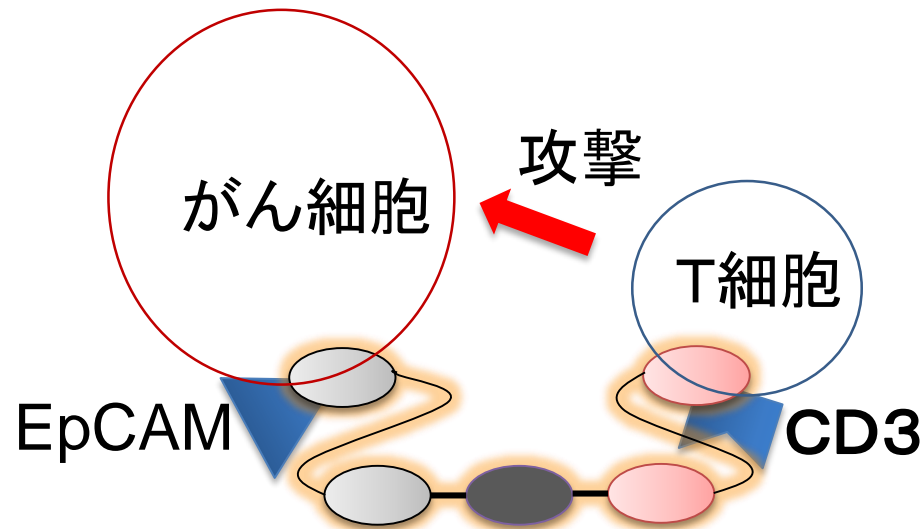


- ADCC機能亢進(脱フコシル化, Fc $\gamma$ RIII結合能調節等)
- CDC機能亢進(C1q結合能増進アイソタイプキメラ)
- 抗炎症作用増強(シアリルグリカン付加)
- トキシン・アイソトープ・酵素・ケモカインコンジュゲート
- ナノパーティクル付加
- 血中代謝動態の改善(FcRn受容体結合能増強)



Fcフュージョン  
ミニボディ  
ペプチボディ  
ミメティボディ

## バイスペシフィック抗体の戦略



細胞障害性T細胞をがん細胞のまわりにリクルートして効果を上げる。カツマキソマブやBiTEなど。

分子動力学計算

最小単位: 1ステップ

1ステップの中身: 立体構造のスナップショット

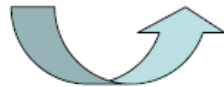
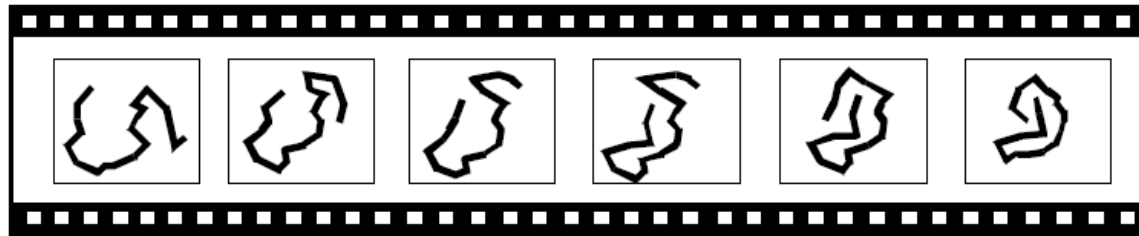
得られるもの: 構造変化の時系列、軌跡

映画

最小単位: 1コマ

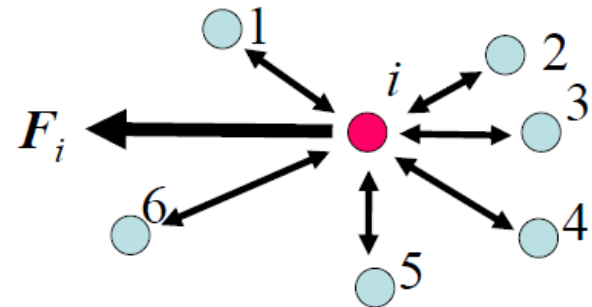
1コマの中身: 写真

得られるもの: フィルム全体、動画



立体構造変化: ニュートン方程式に従う

$$F_i = m_i \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} = m_i a_i \quad (1)$$



能勢修一



William Hoover

# Take-home message

- 敵を知り己を知れば百戦危うからず（孫子）
- 夢をもつこと（意志があれば道がある）
- Never give up, never ever.