

# 博士論文（要約）

論文題目 Fc改変による抗体医薬品の高機能化

氏名 味元 風太

## 目次

略号一覧	3
第1章 研究の目的と背景	4
抗体の特徴と医薬品への応用	4
抗体医薬品の最適化および高機能化	7
FcγR の機能と構造	9
FcγR に対する結合の最適化技術の現状と課題	14
本論文の構成	15
第2章 非対称 Fc 改変技術を用いた FcγRIIIa 結合を選択的に増強した ADCC 活性増強 Fc 改変体の創製	17
第3章 複数の FcγR に対する結合を増強した非対称 Fc 改変抗体の創製と結晶構造解析	18
第4章 FcγRIIb に対して選択的に結合増強した改変抗体の創製	19
第5章 総括および今後の展望	20
引用文献	23
報文目録	44
謝辞	45

## 略号一覧

ADCC: antibody dependent cellular cytotoxicity

ADCP: antibody dependent cellular phagocytosis

ADP: adenosine diphosphate

AI 比: 抑制型 FcγR に対する affinity と活性型 FcγR に対する affinity の比

CDC: complement dependent cytotoxicity

CDR: complementarity determining regions

DC: dendritic cell

DR5: death receptor 5

FcγR: Fc gamma receptor

FcRn: neonatal Fc receptor

IgG: immunoglobulin G

IL-6R: interleukin-6 receptor

ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif

ITIM: immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif

NK: natural killer

PBMC: peripheral blood mononuclear cell

PBS: phosphate buffer saline

PDB: Protein Data Bank

rsmd: root-mean-square difference

SLE: systemic lupus erythematosus

$T_m$ : melting temperature

TNFR: tumor necrosis factor receptor

## 第 1 章 研究の目的と背景

### 抗体の特徴と医薬品への応用

現在、新しい種類の医薬品として、生体中に存在する分子である抗体を利用した抗体医薬品が活発に開発されている (Brekke and Sandlie, 2003; Maggon, 2007)。抗体は細菌やウイルスなどの異物から生体を防御する機構である液性免疫において重要な役割を担う分子である。従来の低分子化合物を利用した医薬品の場合は標的分子に対する選択性が十分ではない、タンパク質間の相互作用を完全に阻害することができない等の課題がある。しかし、抗体医薬品の場合は標的となる抗原に対して特異的に結合し、その抗原と別の分子の相互作用を完全に阻害することが可能であり、低分子化合物が抱える課題を克服することが可能である。このような特徴に加えて、抗体はナチュラルキラー (NK) 細胞、マクロファージ、好中球などのエフェクター細胞に発現しているレセプターに結合する性質も有している。抗体はこの性質を利用して、標的となる抗原を発現する細胞に対してエフェクター細胞を誘導し、標的抗原を発現する細胞を殺傷する。抗体の特異性や阻害能に加えて、このような抗体を介した細胞傷害活性も抗体医薬品の特徴である (Imai and Takaoka, 2006)。

図 1-1 に示すように、抗体医薬品として主に用いられる IgG は 2 つの H 鎖、2 つの L 鎖から成る 4 量体である。H 鎖は V<sub>H</sub> ドメイン、C<sub>H1</sub> ドメイン、hinge、C<sub>H2</sub> ドメイン、C<sub>H3</sub> ドメインから構成される。同様にして、L 鎖は V<sub>L</sub> ドメインと C<sub>L</sub> ドメインから構成される。

V<sub>H</sub> ドメインと V<sub>L</sub> ドメインから構成される領域は可変領域と呼ばれ、抗体はこの領域を介して様々な抗原に対して結合する。可変領域中には complementarity determining regions (CDR) と呼ばれる配列の多様性に富む領域が存在し、この CDR の多様性が、抗体が様々な抗原に対して特異的に結合することを可能にしている。生体内では互いに CDR 配

列の異なる多様な抗体クローンが産生され、細菌やウイルス由来の抗原を含む様々な抗原に結合することで生体を防御している (Carter, 2006)。

残りの C<sub>H1</sub> ドメイン、hinge、C<sub>H2</sub> ドメイン、C<sub>H3</sub> ドメイン、C<sub>L</sub> ドメインから構成される領域は定常領域と呼ばれ、定常領域の中でも、hinge 下部、C<sub>H2</sub> ドメイン、および C<sub>H3</sub> ドメインから構成される領域は Fc 領域と呼ばれる。抗体は Fc 領域を介して Fc $\gamma$  受容体 (Fc $\gamma$ R)、胎児性 Fc 受容体 (FcRn)、補体等に対して結合する。これらの分子との結合を介して、抗体はリサイクルされ、また抗体依存的細胞障害活性 (ADCC 活性)、抗体依存的細胞貪食活性 (ADCP 活性)、補体依存的細胞障害活性 (CDC 活性)、免疫抑制的な作用、アゴニスト活性を発揮する (Beck et al., 2010)。

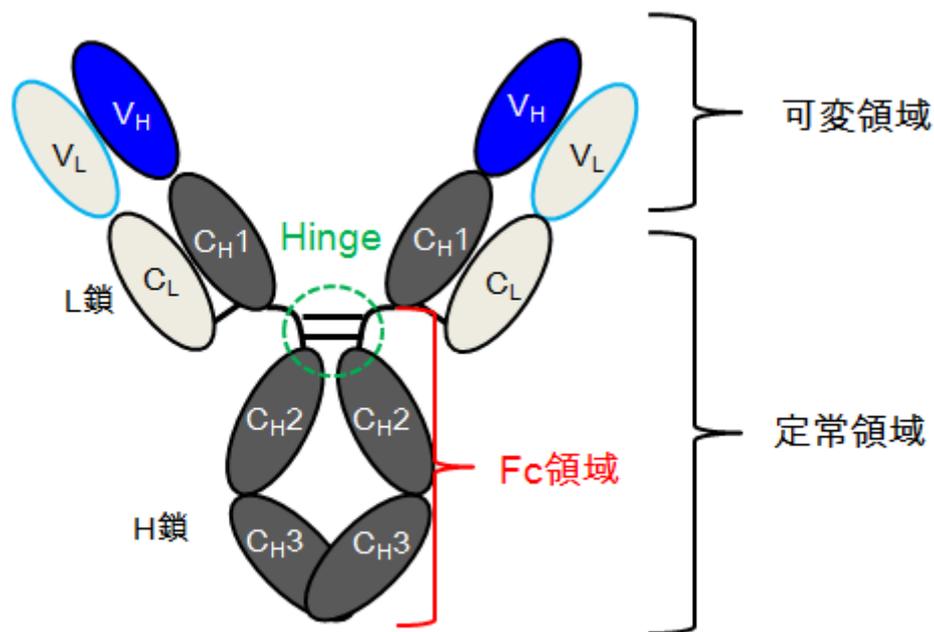


図 1-1 IgG 抗体の構造

これまでに承認された抗体医薬品の数は 30 を超え、300 以上の新規抗体医薬品が開発されている (Beck et al., 2010; Chames et al., 2009; Reichert, 2013)。抗体医薬は慢性疾患から癌まで幅広い疾患の治療に用いられている。

慢性疾患の治療を目的とした抗体医薬品の場合は、抗原に対する阻害能のみを作用機序として有する抗体が主である。抗体のこのような阻害能は中和活性と呼ばれ、このような性質を有する抗体は中和抗体と呼ばれる。慢性疾患の治療を目的にした抗体医薬の代表的な標的抗原はサイトカインである。サイトカインを標的とする抗体は標的分子に結合して、サイトカインとその受容体の相互作用を阻害する。

癌の治療を目的とした抗体医薬品の場合には、腫瘍の細胞膜上に発現している腫瘍抗原等を標的とする抗体が主であり、これらの抗体は中和活性に加えて、NK細胞、マクロファージ、好中球などのエフェクター細胞を介したADCC活性、ADCP活性、または補体を介したCDC活性を利用して標的抗原を発現する腫瘍細胞を傷害する活性を有している。また、これらの例に加えて、新たにT細胞を介して腫瘍細胞を傷害する抗体も開発されている(Reichert, 2013; Scott et al., 2012)。このように直接的な細胞傷害活性を有する抗体に加えて、生体内の膜上のリガンドと受容体の反応を模倣し、生体の免疫機能を賦活化することで間接的に抗腫瘍効果を示す抗体も新たな抗体医薬として注目されている。抗体は1分子中に2つの可変領域を有するため、可変領域を介して標的の抗原を架橋することが可能である。抗体のこの性質を利用して、標的抗原を架橋することで細胞内に種々のシグナルを伝達することが可能である。このような活性はアゴニスト活性と呼ばれ、アゴニスト活性を有する抗体はアゴニスト抗体と呼ばれる。アゴニスト抗体は目的の抗原を会合化することでシグナル伝達を誘導し、生体分子の機能を模倣している。現在は免疫機能の賦活化を目的に、CD40やOX40のような共刺激分子を標的としたアゴニスト抗体の研究開発が活発に進められている(Melero et al., 2013; Vonderheide and Glennie, 2013)。

今後も、抗体医薬の開発は活発に続けられると見込まれることから、その効果を高める抗体の高機能化技術の開発は極めて重要である。

## 抗体医薬品の最適化および高機能化

従来は天然型の抗体が主に医薬品として用いられてきたが、現在では抗体工学に基づいて改変が加えられた高機能化抗体の開発が進められている。抗体の改変は可変領域の改変と定常領域の改変とに大きく分けられる。可変領域の改変は抗原に対する結合を制御することを目的にしたものが主である。可変領域の配列は各抗体で異なることから、抗体ごとに加えるべき改変も異なる。それに対して、定常領域の改変は抗体とレセプターとの相互作用を最適化することを目的としたものが主である。定常領域の配列は抗体間で同一であるため、定常領域改変技術は汎用性が高い。

抗体の可変領域を改変することによる抗体の高機能化技術としては、抗体の抗原に対する *affinity* を向上する技術、等電点を下げて抗体の血中動態を改善する技術、抗原に対して pH 依存的に結合する性質を付加して血中動態を改善する技術、二重特異性を付加する技術等がこれまでに報告されている。

*Affinity* を向上させる技術としては *saturation mutagenesis* を利用した方法、*error-prone PCR* を用いた方法等が報告されている (Chowdhury and Pastan, 1999; Martineau, 2002; Yang et al., 1995)。抗体の抗原に対する *affinity* を増強すると、より少量の抗体で標的とする抗原を中和することが可能になり、抗体の投与量を低減できる可能性がある (Maynard et al, 2002)。それに加えて、腫瘍細胞上に発現している抗原に対する抗体の *affinity* の向上は細胞傷害活性を高める有効な方法である (Tang et al., 2007)。しかし、いくら抗原に対する *affinity* を向上しても、抗原の量以下には抗体量を低減することはできず、投与量の低減には限界がある (Rathanaswami et al., 2005)。その限界を克服するために、1つの抗体分子をリサイクルさせることで、複数の標的抗原を中和することを可能にしたリサイクル抗体技術が開発されている (Igawa et al., 2010a)。また、抗体の血中動態を改善することによっても抗体の投与量は低減することが可能である。抗体の可変領域の等電点を下げることで、負電荷を帯びた細胞膜との相互作用を低減し、抗体の非特異

的な取り込みを抑え、結果として血中動態を改善する技術が報告されている (Igawa et al, 2010b)。

従来の抗体は特定の 1 つの抗原にしか結合できないが、2 つの異なる抗原に対して結合可能な抗体を作製する二重特異性抗体技術が開発されている。この技術を用いることで、単純に 2 つの異なる抗原に対する結合能を抗体に付与するだけではなく、新機能機能を付与することが可能である。その例として、第 IX 因子と第 X 因子の 2 つの分子を認識する性質を抗体に付与することで、第 VIII 因子の機能を模倣することが可能であることが報告されている。現在、この抗体は血友病の領域において開発されている (Kitazawa et al., 2012)。

抗体の定常領域を改変することによる抗体の高機能化技術としては、抗体のリサイクルレセプターである FcRn に対する affinity を向上させて血中動態を改善する技術、補体に対する結合を増強させて細胞傷害活性を増強する技術、FcγR に対する affinity を最適化することで、ADCC 活性、ADCP 活性、アゴニスト活性を増強する技術が報告されている。

抗体は他のタンパク質と同様に非特異的に内皮細胞等に取り込まれる。細胞内に非特異的に取り込まれたタンパク質は酸性のエンドソームに移行後、更にライソソームに移行し、分解される。しかし、抗体の場合は酸性のエンドソーム中でリサイクルレセプターである FcRn に結合し、再び血中にリサイクルされる。このリサイクル機能により、抗体は他のタンパク質のようにライソソームで分解されず、その結果として長い血中動態を示す。FcRn を欠損させたマウスを用いて抗体の血中動態を評価すると、wild type のマウスと比較して抗体の血中動態は著しく悪化することからも FcRn が抗体の血中動態に重要な役割を果たしていることが確認されている (Roopenian et al., 2003)。この性質を利用した技術として、抗体の FcRn 相互作用部位を改変し、酸性条件下での FcRn に対する affinity を増強し、リサイクル効率を向上させ、抗体の血中半減期を延長する技術が報告されている (Dall'Acqua et al., 2006)。

抗体は主に hinge、CH2 ドメインを介して補体の成分の 1 つである C1q と結合すること

で CDC 活性を發揮する。この点に注目して、C1q との相互作用部位にアミノ酸変異を導入することで、抗体の CDC 活性を増強する技術が報告されている (Moore et al., 2010)。

抗体の FcγR に対する affinity を最適化することで、抗体の多様な機能を向上可能であることが報告されている。FcγR を介した機能が癌を標的とした抗体の効果に重要な寄与を果たしていることが FcγR を欠損したマウスを利用した実験で示されている (Clynes et al., 2000; Uchida et al., 2004)。FcγR は複数の分子を含んだ受容体ファミリーの総称であるが、FcγR を構成する各受容体はそれぞれに特徴的な機能を有しており、それぞれの受容体と抗体の相互作用を最適に制御することで、抗体の ADCC 活性、ADCP 活性、アゴニスト活性等の機能を向上することが可能である (Lazar et al., 2006; Li and Ravetch, 2011; Li and Ravetch, 2012; Richards et al., 2008)。

現在、数多くの抗体医薬品が癌の治療を目的として開発されており、それらの中には ADCC 活性や共刺激分子などに対するアゴニスト活性を利用した抗体が含まれている (Reichert, 2013)。先に述べたように、これらの活性には抗体と FcγR との相互作用が重要であることから、FcγR との相互作用を最適化することで、FcγR を介した抗体の機能を強化する Fc 改変技術を開発することは抗体医薬の癌治療への更なる応用を進めるのに効果的であると考えられた。

## FcγR の機能と構造

図 1-2 に示すように、FcγR は複数の受容体からなるファミリー受容体である (Bruhns, 2012)。FcγR ファミリーはそれ自身の細胞内ドメインに ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) を有する、あるいは ITAM を有するサブユニットである γ 鎖と相互作用する活性型と、その細胞内ドメインに ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) を有する抑制型に分類することができる。ヒトの場合、活性型 FcγR には FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIIa が属し、FcγRI と FcγRIIIa はサブユニットで

ある  $\gamma$  鎖と会合化するが、Fc $\gamma$ RIIa はそれ自身の細胞内ドメインに ITAM を有する。それに対して、抑制型 Fc $\gamma$ R には Fc $\gamma$ RIIb のみが属しており、その細胞内ドメインに ITIM を有している。これらの Fc $\gamma$ R は NK 細胞、マクロファージ、単球、樹状細胞 (DC) などの免疫細胞に幅広く発現している (Bruhns, 2012)。

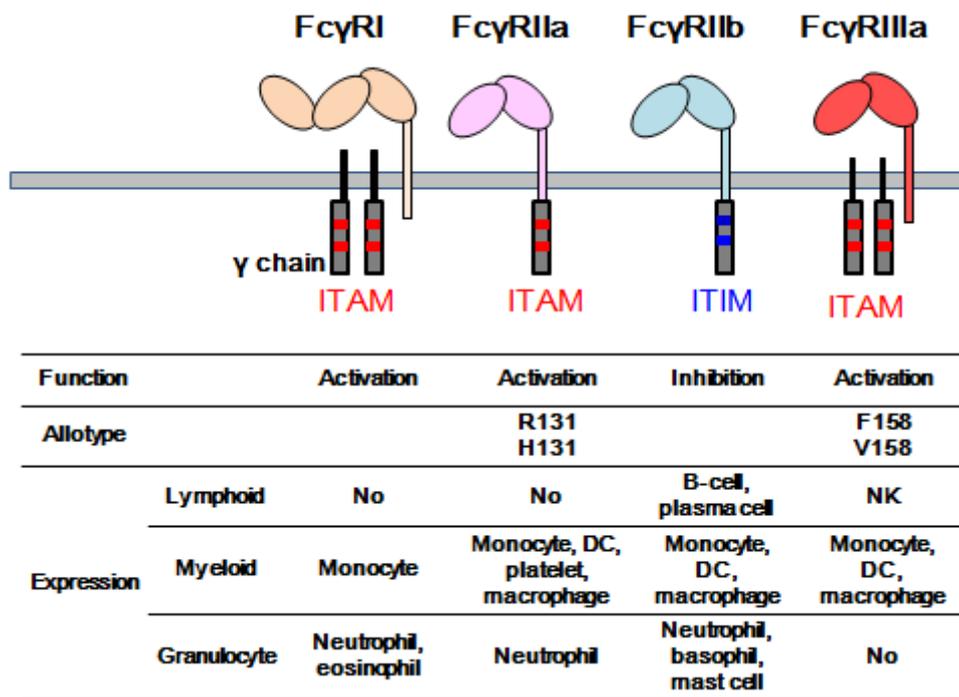


図 1-2 Fc $\gamma$ R ファミリーの概要

これまでに、種々の Fc $\gamma$ R を欠損したマウスを利用することで、各 Fc $\gamma$ R の抗体の抗腫瘍活性への寄与が研究されている。抗 Her2 抗体の抗腫瘍活性は、活性型 Fc $\gamma$ R を全て欠損したマウスでは両抗体の抗腫瘍活性が失われることが示されている (Clynes et al., 2000)。また、抗 CD20 抗体の B 細胞除去活性における各 Fc $\gamma$ R の寄与が調べられており、この研究においても抗 CD20 抗体の B 細胞除去活性には活性型 Fc $\gamma$ R が必要であることが示されている (Uchida et al., 2004)。抗体は活性型 Fc $\gamma$ R との相互作用を介して、NK 細胞、マクロファージ、好中球等の、エフェクター細胞を標的抗原が発現した細胞の近傍に誘導し、ADCC や ADCP 活性を発揮する (Beck et al., 2010)。その中でも、ADCC 活性は主に NK 細胞を

介しており、NK 細胞は FcγR として FcγRIIIa のみを発現している。抗体は FcγRIIIa との結合を介して NK 細胞を標的細胞に誘導する (図 1-3)。

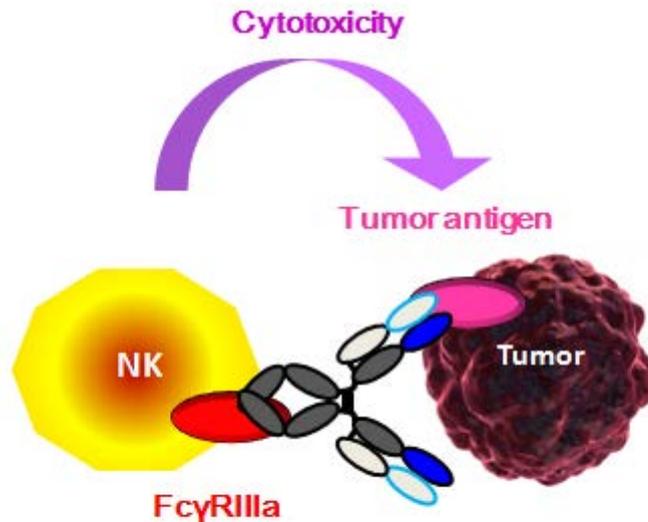


図 1-3 抗体の FcγRIIIa の結合を介した NK 細胞による細胞傷害活性誘導メカニズム

そのため、抗体の ADCC 活性には FcγRIIIa との相互作用が重要である。ADCC 活性は主にマクロファージを介しており、マクロファージ上の FcγRIIa や FcγRIIIa など複数の活性型 FcγR との相互作用が重要であることが報告されている (Richards et al., 2008)。FcγRIIIa と抗体の相互作用の強さが、抗体の薬効に重要であることは過去の臨床試験からも示唆されている。濾胞性リンパ腫患者を抗 CD20 抗体であるリツキサンで治療した際に、高 affinity の FcγRIIIa 遺伝子型である FcγRIIIa の V 型をホモザイガスに有する患者において、無増悪生存期間の改善が観察された。これらの結果から、抗体の抗腫瘍効果は活性型 FcγR との相互作用が重要とであると考えられている (Carton et al., 2002; Weng and Levy, 2003)。

抑制型 FcγR である FcγRIIb は、活性型 FcγR には観察されてない特徴的な機能を有することが報告されている。B 細胞は FcγR として唯一 FcγRIIb を発現しており、FcγRIIb は B 細胞の抗体産生を制御している。自己抗原とそれに対する自己抗体の免疫複合体が抗原を介して B 細胞受容体に結合すると同時に、Fc 領域を介して FcγRIIb に結合する。その結果、B 細胞受容体と FcγRIIb が架橋され、自己抗原を認識する B 細胞のプライミングを抑制し、自己抗原を認識する自己抗体の産生を制御していると考えられている (Heyman, 2003; Nimmerjahn and Ravetch, 2008)。これを支持する結果として、マウスにおいて FcγRIIb を欠損させると、自己抗体を産生し、自己免疫疾患様の症状を呈することが報告されている (Bolland and Ravetch, 2000)。それとは反対に、抗核抗体などの自己抗体を産生する自己免疫疾患として知られる全身性ループスエリテマトーデス (SLE) のモデルマウスに FcγRIIb を強制発現させると、自己免疫疾患様の症状が緩和されることが報告されている (Clynes et al., 2005)。

また、FcγRIIb が抗体の細胞傷害活性にも影響を与えることが報告されている。ノーマルマウスと比べて、FcγRIIb を欠損させたマウスでは、抗 Her2 抗体または抗 E-cadherin 抗体を投与した際に、腫瘍の退縮が促進することが報告されている (Clynes et al., 2000; Green et al., 2002)。この結果は、抑制型 FcγR に対する affinity と活性型 FcγR に対する affinity との比率 (A/I 比) が抗体の抗腫瘍効果に重要であることを示唆している (Nimmerjahn and Ravetch, 2006)。

これらの機能に加えて、近年になって FcγRIIb が tumor necrosis factor receptor (TNFR) superfamily に対する抗体のアゴニスト活性に重要な役割を果たしていることが報告されている (White et al., 2013)。TNFR superfamily は CD40 等の共刺激分子に代表されるように、免疫機構において重要な作用を持つ分子群である。TNFR superfamily に対する抗体は標的抗原を会合化させることで、アゴニスト活性を発揮する。しかし、可変領域のみを介した場合は、2 つの抗原しか会合化させることができず、十分なアゴニスト活性を発揮す

ることができない。そのため、図 1-4 に示すように、抗 TNFR superfamily 抗体のアゴニスト活性には細胞表面上に発現した FcγRIIb を介した抗体同士の架橋が重要であることが示されている。抗体自体が架橋されることで、2 つ以上の複数の標的抗原が架橋され、アゴニスト活性が発揮される。

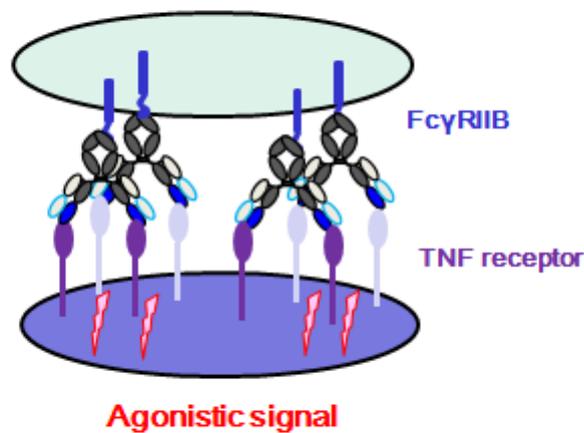


図 1-4 抗 TNFR superfamily 抗体の FcγRIIb の架橋を介したアゴニストシグナル誘導メカニズム

FcγR にはいくつかの遺伝子多型が報告されている。FcγRIIa では細胞外ドメイン中の 131 番目のアミノ酸が His である H 型、Arg である R 型が報告されている。FcγRIIb では細胞膜貫通ドメイン中の 232 番目の Ile が Thr になることが報告されており、T 型では FcγRIIb が lipid raft 中への局在が減り、FcγRIIb の抑制シグナルの伝達が抑制されることが報告されている (Floto et al., 2005)。SLE 患者の 10%から 30%でこの I232T の遺伝子型が報告されており、FcγRIIb の免疫抑制的な作用を減弱することで、自己免疫疾患に関与している可能性が示唆されている (Li et al., 2003)。FcγRIIIa では細胞外ドメイン中の 158 番目のアミノ酸が Phe である F 型、Val である V 型が報告されている。IgG1 は FcγRIIa

に対しては H 型、R 型のいずれであっても同程度の affinity で結合するが、FcγRIIIa に対しては F 型よりも V 型に対して数倍強い affinity で結合する (Bruhns et al., 2009)。これらの FcγR の遺伝子型の違いが自己免疫疾患の発症に関与していることが示唆されている。例えば、SLE 患者では健常人と比較して FcγRIIIa の H 型の頻度が少ないことが報告されている (Salmon et al., 1996)。また、先に述べたように、リツキサンの臨床試験において、FcγRIIIa の遺伝子型の違いが癌を標的とした抗体医薬の効果に違いをもたらす可能性が示唆されている。

このように抗体は各 FcγR との相互作用を介して、様々な特徴的な機能を発揮しており、これらの機能が抗体医薬品においても重要な役割を果たしている。

#### FcγR に対する結合の最適化技術の現状と課題

抗体の ADCC 活性の向上を目的に、タンパク質改変技術や糖鎖改変技術を用いて FcγRIIIa との相互作用を増強する技術がこれまでに開発されている (Lazar et al., 2006; Shields et al., 2002; Shinkawa et al., 2003)。また、それに加えて、抑制型 FcγR である FcγRIIb に対する相互作用を最小化する方法も抗体の抗腫瘍活性を増強する方法として開発されている (Stavenhagen et al., 2007)。これらの技術の効果に期待が寄せられる一方で、課題も報告されている。従来技術には、FcγR に対する結合の増強が十分でない、活性型 FcγR に対する結合の特異性が十分でない、抗体の物理化学的安定性が損なわれる (Oganesyan et al., 2008) 等の、課題が残されている。これらの課題を克服することができれば、より優れた抗体医薬品を創製することが可能であると考えられた。

また、FcγRIIb との相互作用を高めることで、FcγRIIb に由来する特徴的な機能を利用できる可能性がある。このような高機能化を目的として、FcγRIIb に対する結合を高めた Fc 改変体についても過去に開発されている (Chu et al., 2008)。この改変技術を適用した抗 CD19 抗体は FcγRIIb と B 細胞受容体とを架橋することで生体内の作用を模倣し、SLE の

マウスモデルにおいて B 細胞の活性化、増殖を抑制することが報告されている (Horton et al., 2011)。加えて、FcγRIIb に対する affinity を高めることで、抗 CD40 抗体、抗 DR5 抗体等の抗 TNFR superfamily 抗体のアゴニスト活性を増強可能であることが報告されている (Li and Ravetch, 2011; Li and Ravetch, 2012)。しかし、この Fc 改変体は FcγRIIb に対する結合を増強するが、同時に FcγRIIb に最も相同性の高い活性型 FcγR である FcγRIIa の遺伝子型の 1 つ、FcγRIIa の R 型に対しても結合を増強しており、FcγRIIb に対する選択性が十分ではないという課題がある (Smith et al., 2012)。これまでに VEGF および CD154 に対する抗体が血小板上の FcγRIIa を介して血小板の活性化および凝集を誘導し、血栓塞栓症のリスクを上昇させることが報告されている (Boumpas et al., 2003; Scappaticci et al., 2007)。このことから、FcγRIIa に対する結合が増強した抗体は FcγRIIa の架橋を介して血小板を活性化、凝集させ、血栓を形成するリスクを上昇させることが懸念される。この課題を克服した FcγRIIb に対して選択的に結合を増強した Fc 改変体を作製することができれば、高機能な抗体医薬品として応用することが可能であると考えられた。

## 本論文の構成

FcγR との相互作用を最適化した高機能化抗体は、次世代の抗体医薬品としての可能性が期待される一方で、従来の技術にはいくつかの課題が報告されていた。これらの課題を克服したより優れた Fc 改変技術を開発することが本論文の研究目的である。

活性型 FcγR との相互作用についてこれらの課題を克服し、ADCC 活性を増強した分子の創製を目指したのが、本論文の研究課題の「第 2 章 非対称 Fc 改変による ADCC 増強抗体の創製」(Mimoto et al., 2013a) および「第 3 章 複数の FcγR に対する結合を増強した非対称 Fc 改変抗体の創製と結晶構造解析」(Mimoto et al., 2014) である。

抑制型 FcγR である FcγRIIb との相互作用について従来技術の課題を克服し、FcγRIIa に対する結合を増強することなく、FcγRIIb に対する結合のみを選択的に増強した Fc 改変

体を作製したのが本論文の研究課題の「第 4 章 FcγRIIb に対して選択的に結合増強した改変抗体の創製」(Mimoto et al., 2013b) である。

このように、本論文は活性型 FcγR および抑制型 FcγR との相互作用を Fc 改変技術により最適化し、これまでの抗体医薬品の課題を克服し、より高機能な抗体医薬品の創製に貢献することを目指したものである。

## 第 2 章 非対称 Fc 改変技術を用いた FcγRIIIa 結合を選択的に増強した ADCC 活性増強 Fc 改変体の創製

本章の内容は、共著論文として学術雑誌に掲載されており、インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため公表できない。本章の内容は、mAbs (2013) Vol. 5, No.2, pp. 229-236 に掲載されている。

### 第3章 複数のFcγRに対する結合を増強した非対称Fc改変抗体の創製と結晶構造解析

本章の内容は、共著論文として学術雑誌に掲載されており、インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため公表できない。本章の内容は、*Molecular Immunology* (2014) Vol. 58, Issue 1, pp. 132-138 に掲載されている。

## 第 4 章 FcγRIIb に対して選択的に結合増強した改変抗体の創製

本章の内容は、共著論文として学術雑誌に掲載されており、インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため公表できない。本章の内容は、**Protein Engineering Design & Selection** (2013) Vol. 26, No. 10, pp. 589-598 に掲載されている。

## 第5章 総括および今後の展望

現在、モノクローナル抗体技術は一般的な技術となり、様々な疾患の治療薬に応用されている。その一方で、従来型の抗体では十分な効果が得られない場合もあり、より優れた機能を有する抗体医薬が望まれている。これまでの研究から得られた知見に基づいた抗体工学技術の発展に伴い、抗体を改良することにより、高機能化することが可能になっている。このような背景の下、本研究では新規な抗体の高機能化技術を検討した。本研究では特に IgG 抗体とそのレセプターである FcγR との相互作用を最適化することにより、抗体の機能を高めることを目的とした。

第2章の研究では、新機能抗体改変技術である非対称 Fc 改変技術を用いることで、活性型 FcγR のうち、抗体の ADCC 活性に特に重要である FcγRIIIa に対する affinity を特異的に増強可能か検討した。その結果、非対称的に Fc 領域を改変するほうが、対称的に Fc 領域を改変するよりも、FcγR に対する affinity および ADCC 活性を増強することが可能であることを確認した。また、Fc 領域のアミノ酸改変は抗体の高い熱安定性を損なってしまうことが課題として認識されていた。本研究では、非対称的に Fc 領域を改変することで、FcγR に対する結合を増強する一方で、熱安定性を損なう改変の数を最小化することにより抗体の高い熱安定性を維持することを可能にし、その課題を克服した。また、非対称 Fc 改変技術を用いることで、従来の対称 Fc 改変技術と比較して抑制型の FcγRIIb に対する結合は変化せずに、活性型の FcγRIIIa に対してのみ特異的に結合を増強した Fc 改変体を作製した。このことは非対称 Fc 改変技術を用いることで、Fc と FcγR の非対称な相互作用をより精緻に制御し、その結果として相同性の高い各 FcγR をより精緻に区別することが可能になったことを示唆している。この技術を用いることでより高い ADCC 活性を有する抗体医薬を開発することが可能であると考えられる。

第 3 章の研究では、上述の非対称 Fc 改変抗体の FcγR との相互作用を分子レベルで解明することを目的に X 線結晶構造解析を実施した。理論上、非対称 Fc 改変抗体は 2 通りの方向で FcγR と相互作用することが考えられるが、X 線結晶構造解析の結果では 1 通りの方向でのみ相互作用する Fc 改変体と FcγRIIIa との複合体の結晶構造が得られた。この結果は、非対称に Fc 領域を改変することにより、Fc と FcγR の 2 方向の相互作用のうち、一方のみが選択的に増強していることを示唆している。また、本研究の X 線結晶構造解析結果からは、今回研究に用いた非対称 Fc 改変体においては、各変異の FcγRIIIa に対する結合増強への寄与はそれぞれ僅かであることが示唆された。非対称 Fc 改変体の FcγRIIIa の相互作用は天然型 IgG1 と比べて 1000 倍増強していることから、この著しい活性の向上は直接的な相互作用による効果に加えて、間接的な効果が累積的に作用して達成されたと考えられた。FcγR に対する結合の増強と、高い熱安定性の維持を同時に達成することは困難であるが、非対称 Fc 改変技術を用いること、Fc 領域へ導入する変異の合計数を最小限にとどめることができるため、より多くの種類の変異を利用することができ、例え各変異による結合増強への寄与が小さくとも、それらの寄与を利用することが可能である。本研究の構造情報から得られた知見を利用することで、更に優れた性質を有する非対称 Fc 改変体を作製することが可能であると考えられた。

第 4 章の研究では FcγRIIb に対する結合を特異的に増強することを検討した。FcγRIIb は TNFR superfamily に対するアゴニスト抗体の活性に重要な役割を果たしていることが報告されている。このことから、FcγRIIb に対する抗体の affinity を高めることで、抗体のアゴニスト活性を高めることが可能であると考えられた。FcγRIIa のうち、特に R 型は FcγRIIb と非常に相同性が高く、過去に報告された FcγRIIb に対して結合増強した Fc 改変体では FcγRIIa の R 型に対する結合も増強してしまっていた。FcγRIIb に対して特異的に affinity を増強するためには、FcγRIIa と区別することが課題であったが、本研究では網羅的に改変体を探索し、FcγRIIb と FcγRIIa を厳密に区別する P238D 変異を見出し、この変

異を活用し、最終的には FcγRIIb に対する affinity を特異的に 200 倍増強した Fc 改変体を作製した。先に報告された Fc 改変体は FcγRIIa への結合を介して、血小板の活性化、凝集を誘導したが、私たちが作製した Fc 改変体は誘導しなかった。この Fc 改変体を TNFR superfamily の 1 つである CD137 に対するアゴニスト抗体に適用すると、そのアゴニスト活性の向上が観察された。これらの結果から、本研究で作製した Fc 改変体を用いることで、血小板活性化の副作用のリスクを上昇させることなく、抗体のアゴニスト活性の向上など、抗体の高機能化が可能であると考えられた。

第 2 章から第 4 章までの研究を通じて得られた新規の抗体高機能化技術を用いることで、より付加価値の高い医薬品の創製に貢献可能であると考えられた。

## 引用文献

### 第 1 章

- Beck, A., Wurch, T., Bailly, C., and Corvaia, N. (2010) Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat. Rev. Immunol.*, 10, 345-52.
- Bolland, S, and Ravetch, J. V. (2000) Spontaneous autoimmune disease in Fc(gamma)RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity*, 13, 277-85.
- Boumpas, D. T., Furie, R., Manzi, S., Illei, G. G., Wallace, D. J., Balow, J. E., and Vaishnav, A; BG9588 Lupus Nephritis Trial Group. (2003) A short course of BG9588 (anti-CD40 ligand antibody) improves serologic activity and decreases hematuria in patients with proliferative lupus glomerulonephritis. *Arthritis Rheum.*, 48, 719-27.
- Brekke, O. H., and Sandlie, I. (2003) Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2, 52–62.
- Bruhns, P, Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D. A., Fernandez, N., Jorieux, S., and Daëron, M. (2009) Specificity and affinity of human Fc gamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*, 113, 3716-25.
- Bruhns, P. (2012) Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood*, 119, 5640-49.
- Carter, P. J. (2006) Potent antibody therapeutics by design. *Nat. Rev. Immunol.*, 3, 343-57.
- Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., and

Watier, H. (2002) Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene. *Blood*, 99, 754-58.

- Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E., and Baty, D. (2009) Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br. J. Pharmacol.*, 157, 220-33.
- Chowdhury, P.S. and Pastan, I. (1999) Improving antibody affinity by mimicking somatic hypermutation in vitro. *Nat. Biotechnol.*, 17, 568-72.
- Chu, S. Y., Vostiar, I., Karki, S., Moore, G. L., Lazar, G. A., Pong, E., Joyce, P. F., Szymkowski, D. E., and Desjarlais, J. R. (2008) Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and FcgammaRIIb with Fc-engineered antibodies. *Mol. Immunol.*, 45, 3926-33.
- Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G., and Ravetch, J. V. (2000) Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.*, 6,443-6.
- Clynes, R. A., Calvani, N., Croker, B. P., and Richards, H. B. (2005) Modulation of the immune response in pristane-induced lupus by expression of activation and inhibitory Fc receptors. *Clin. Exp. Immunol.*, 141, 230-7.
- Dall'Acqua, W. F., Kiener, P. A., and Wu, H. (2006) Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). *J. Biol. Chem.*, 281, 23514-24.
- Floto, R. A., Clatworthy, M. R., Heilbronn, K. R., Rosner, D. R., MacAry, P. A., Rankin, A., Lehner, P. J., Ouwehand, W. H., Allen, J. M., Watkins, N. A., and Smith, K. G. (2005) Loss of function of a lupus-associated FcgammaRIIb polymorphism through exclusion from lipid rafts. *Nat. Med.*, 11, 1056-8.

- Green, S. K., Karlsson, M. C., Ravetch, J. V., and Kerbel, R. S. (2002) Disruption of cell-cell adhesion enhances antibody-dependent cellular cytotoxicity: implications for antibody-based therapeutics of cancer. *Cancer Res.*, 62, 6891-900
- Heyman, B. (2003) Feedback regulation by IgG antibodies. *Immunol. Lett.*, 88, 157-61.
- Horton, H. M., Chu, S. Y., Ortiz, E. C., Pong, E., Cemerski, S., Leung, I. W., Jacob, N., Zalevsky, J., Desjarlais, J. R., Stohl, W., and Szymkowski, D. E. (2011) Antibody-mediated coengagement of FcγRIIb and B cell receptor complex suppresses humoral immunity in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.*, 186, 4223-33.
- Igawa, T., Ishii, S., Tachibana, T., Maeda, A., Higuchi, Y., Shimaoka, S., Moriyama, C., Watanabe, T., Takubo, R., Doi, Y., Wakabayashi, T., Hayasaka, A., Kadono, S., Miyazaki, T., Haraya, K., Sekimori, Y., Kojima, T., Nabuchi, Y., Aso, Y., Kawabe, Y., and Hattori, K. (2010a) Antibody recycling by engineered pH-dependent antigen binding improves the duration of antigen neutralization. *Nat. Biotechnol.*, 28, 1203-07.
- Igawa, T., Tsunoda, H., Tachibana, T., Maeda, A., Mimoto, F., Moriyama, C., Nanami, M., Sekimori, Y., Nabuchi, Y., Aso, Y., and Hattori, K. (2010b) Reduced elimination of IgG antibodies by engineering the variable region. *Protein Eng. Des. Sel.*, 23, 385-92.
- Imai, K. and Takaoka, A. (2006) Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 6, 714-27.
- Kitazawa, T., Igawa, T., Sampei, Z., Muto, A., Kojima, T., Soeda, T., Yoshihashi, K., Okuyama-Nishida, Y., Saito, H., Tsunoda, H., Suzuki, T., Adachi, H., Miyazaki, T.,

- Ishii, S., Kamata-Sakurai, M., Iida, T., Harada, A., Esaki, K., Funaki, M., Moriyama, C., Tanaka, E., Kikuchi, Y., Wakabayashi, T., Wada, M., Goto, M., Toyoda, T., Ueyama, A., Suzuki, S., Haraya, K., Tachibana, T., Kawabe, Y., Shima, M., Yoshioka, A., and Hattori, K. (2012) A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. *Nat. Med.*, 18, 1570-4.
- Lazar, G. A., Dang, W., Karki, S., Vafa, O., Peng, J. S., Hyun, L., Chan, C., Chung, H. S., Eivazi, A., Yoder, S. C., Vielmetter, J., Carmichael, D. F., Hayes, R. J., and Dahiyat, B. I. (2006) Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103, 4005-10.
  - Li, X., Wu, J., Carter, R. H., Edberg, J. C., Su, K., Cooper, G. S., and Kimberly, R. P. (2003) A novel polymorphism in the Fcγ receptor IIB (CD32B) transmembrane region alters receptor signaling. *Arthritis Rheum.*, 48, 3242-52.
  - Li, F. and Ravetch, J. V. (2011) Inhibitory Fcγ receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies. *Science*, 333, 1030-4.
  - Li, F. and Ravetch, J. V. (2012) Apoptotic and antitumor activity of death receptor antibodies require inhibitory Fcγ receptor engagement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109, 10966-71.
  - Maggon, K. (2007) Monoclonal antibody "gold rush". *Curr. Med. Chem.*, 14, 1978-87.
  - Martineau, P. (2002) Error-prone polymerase chain reaction for modification of scFvs. *Methods. Mol. Biol.*, 178, 287-94.
  - Maynard, J. A., Maassen, C. B., Leppla, S. H., Brasky, K., Patterson, J. L., Iverson, B. L., and Georgiou, G. (2002) Protection against anthrax toxin by recombinant antibody fragments correlates with antigen affinity. *Nat. Biotechnol.*, 20, 597-601.

- Melero, I., Hirschhorn-Cymerman, D., Morales-Kastresana, A., Sanmamed, M. F., and Wolchok, J. D. (2013) Agonist antibodies to TNFR molecules that costimulate T and NK cells. *Clin. Cancer Res.*, 19, 1044-53.
- Mimoto, F., Igawa, T., Kuramochi, T., Katada, H., Kadono, S., Kamikawa, T., Shida-Kawazoe, M., and Hattori, K. (2013a) Novel asymmetrically engineered antibody Fc variant with superior FcγR binding affinity and specificity compared with afucosylated Fc variant. *MAbs.* 5, 229-36.
- Mimoto, F., Katada, H., Kadono, S., Igawa, T., Kuramochi, T., Muraoka, M., Wada, Y., Haraya, K., Miyazaki, T., and Hattori, K. (2013b) Engineered antibody Fc variant with selectively enhanced FcγRIIb binding over both FcγRIIa(R131) and FcγRIIa(H131). *Protein Eng. Des. Sel.*, 26, 589-98.
- Mimoto, F., Kadono, S., Katada, H., Igawa, T., Kamikawa, T., and Hattori, K. (2014) Crystal structure of a novel asymmetrically engineered Fc variant with improved affinity for FcγRs. *Mol. Immunol.*, 58, 132-38.
- Moore, G.L., Chen, H., Karki, S., and Lazar, G.A. (2010) Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions. *MAbs*, 2, 181-9.
- Nimmerjahn, F. and Ravetch, J. V. (2006) Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity*, 24, 19-28.
- Nimmerjahn, F. and Ravetch, J. V. (2008) Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.*, 8, 34-47.
- Oganessian, V., Damschroder, M. M., Leach, W., Wu, H., and Dall'Acqua, W. F. (2008) Structural characterization of a mutated, ADCC-enhanced human Fc fragment. *Mol. Immunol.*, 45, 1872-82.

- Rathanaswami, P., Roalstad, S., Roskos, L., Su, Q. J., Lackie, S., and Babcook, J. (2005) Demonstration of an in vivo generated sub-picomolar affinity fully human monoclonal antibody to interleukin-8. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 334, 1004-13.
- Reichert, J. M. (2013) Which are the antibodies to watch in 2013? *MAbs*, 5, 1-4.
- Richards, J. O., Karki, S., Lazar, G. A., Chen, H., Dang, W., and Desjarlais, J. R. (2008) Optimization of antibody binding to FcγRIIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol. Cancer Ther.*, 7, 2517-27.
- Roopenian, D. C., Christianson, G. J., Sproule, T. J., Brown, A. C., Akilesh, S., Jung, N., Petkova, S., Avanesian, L., Choi, E. Y., Shaffer, D. J., Eden, P. A., and Anderson, C.L. (2003) The MHC class I-like IgG receptor controls perinatal IgG transport, IgG homeostasis, and fate of IgG-Fc-coupled drugs. *J. Immunol.*, 170, 3528-33.
- Salmon, J. E., Millard, S., Schachter, L. A., Arnett, F. C., Ginzler, E. M., Gourley, M. F., Ramsey-Goldman, R., Peterson, M. G., and Kimberly, R. P. (1996) Fc gamma RIIA alleles are heritable risk factors for lupus nephritis in African Americans. *J. Clin. Invest.*, 97, 1348-54.
- Scappaticci, F. A., Skillings, J. R., Holden, S. N., Gerber, H. P., Miller, K., Kabbinavar, F., Bergsland, E., Ngai, J., Holmgren, E., Wang, J., and Hurwitz, H. (2007) Arterial thromboembolic events in patients with metastatic carcinoma treated with chemotherapy and bevacizumab. *J. Natl. Cancer Inst.*, 99, 1232-9.
- Scott, A. M., Wolchok, J. D., and Old, L. J. (2012) *Nat. Rev. Cancer.*, 12, 278-87.
- Shields, R. L., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L. Y., Hong, K., Meng, Y. G., Weikert, S. H., and Presta, L. G. (2002) Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity.

J. Biol. Chem., 277, 26733-40.

- Shinkawa, T., Nakamura, K., Yamane, N., Shoji-Hosaka, E., Kanda, Y., Sakurada, M., Uchida, K., Anazawa, H., Satoh, M., Yamasaki, M., Hanai, N., and Shitara, K. (2003) The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. J. Biol. Chem., 278, 3466-73.
- Smith, P., DiLillo, D. J., Bournazos, S., Li, F., and Ravetch, J. V. (2012) Mouse model recapitulating human Fcγ receptor structural and functional diversity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 109, 6181-6.
- Stavenhagen, J. B., Gorlatov, S., Tuailon, N., Rankin, C. T., Li, H., Burke, S., Huang, L., Vihj, S., Johnson, S., Bonvini, E., and Koenig, S. (2007) Fc optimization of therapeutic antibodies enhances their ability to kill tumor cells in vitro and controls tumor expansion in vivo via low-affinity activating Fcγ receptors. Cancer Res., 67, 8882-90.
- Tang, Y., Lou, J., Alpaugh, R. K., Robinson, M. K., Marks, J. D., and Weiner, L. M. (2007) Regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IgG intrinsic and apparent affinity for target antigen. J. Immunol., 179, 2815-23.
- Uchida, J., Hamaguchi, Y., Oliver, J. A., Ravetch, J. V., Poe, J. C., Haas, K. M., and Tedder, T. F. (2004) The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy. J. Exp. Med., 199, 1659-69.
- Vonderheide, R. H. and Glennie, M. J. (2013) Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy. Clin. Cancer Res., 19, 1035-43.

- Weng, W. K. and Levy, R. J. (2003) Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *Clin. Oncol.*, 21, 3940-47.
- White, A. L., Chan, H. T., French, R. R., Beers, S. A., Cragg, M. S., Johnson, P. W., and Glennie, M. J. (2013) FcγRIIB controls the potency of agonistic anti-TNFR mAbs. *Cancer Immunol. Immunother.*, 62, 941-8.
- Yang, W. P., Green, K., Pinz-Sweeney, S., Briones, A. T., Burton, D. R., and Barbas, C. F. (1995) 3rd CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. *J. Mol. Biol.*, 254, 392-403.

## 第 2 章

- Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D. A., Fernandez, N., Jorieux, S., and Daëron, M. (2009) Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*, 113, 3716-25.
- Bruhns, P. (2012) Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood*, 119, 5640-49.
- Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., and Watier, H. (2002) Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood*, 99, 754-8.
- Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G., and Ravetch, J. V. (2000) Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.*, 6, 443-6.
- Ferrara, C., Grau, S., Jäger, C., Sondermann, P., Brünker, P., Waldhauer, I., Hennig, M., Ruf, A., Rufer, A. C., Stihle, M., Umaña, P., and Benz, J. (2011) Unique

carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between Fcγ<sub>3</sub> and antibodies lacking core fucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108, 12669-74.

- Green, S. K., Karlsson, M. C., Ravetch, J. V., and Kerbel, R. S. (2002) Disruption of cell-cell adhesion enhances antibody-dependent cellular cytotoxicity: implications for antibody-based therapeutics of cancer. *Cancer Res.*, 62, 6891-900.
- Gunasekaran, K., Pentony, M., Shen, M., Garrett, L., Forte, C., Woodward, A., Ng, S.B., Born, T., Retter, M., Manchulenko, K., Sweet, H., Foltz, I.N., Wittekind, M., Yan, W. (2010) Enhancing antibody Fc heterodimer formation through electrostatic steering effects: applications to bispecific molecules and monovalent IgG. *J. Biol. Chem.*, 285, 19637-46.
- He, F., Hogan, S., Latypov, R. F., Narhi, L. O., and Razinkov, V. I. (2010) High throughput thermostability screening of monoclonal antibody formulations. *J. Pharm. Sci.*, 99, 1707-20.
- Jung, S. T., Reddy, S. T., Kang, T. H., Borrok, M. J., Sandlie, I., Tucker, P. W., and Georgiou, G. (2010) Aglycosylated IgG variants expressed in bacteria that selectively bind Fcγ<sub>1</sub> potentiate tumor cell killing by monocyte-dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107, 604-9.
- Junttila, T. T., Parsons, K., Olsson, C., Lu, Y., Xin, Y., Theriault, J., Crocker, L., Pabonan, O., Baginski, T., Meng, G., Totpal, K., Kelley, R. F., and Sliwkowski, M. X. (2010) Superior in vivo efficacy of afucosylated trastuzumab in the treatment of HER2-amplified breast cancer. *Cancer Res.*, 70, 4481-9.
- Kitazawa, T., Igawa, T., Sampei, Z., Muto, A., Kojima, T., Soeda, T., Yoshihashi, K., Okuyama-Nishida, Y., Saito, H., Tsunoda, H., Suzuki, T., Adachi, H., Miyazaki, T.,

- Ishii, S., Kamata-Sakurai, M., Iida, T., Harada, A., Esaki, K., Funaki, M., Moriyama, C., Tanaka, E., Kikuchi, Y., Wakabayashi, T., Wada, M., Goto, M., Toyoda, T., Ueyama, A., Suzuki, S., Haraya, K., Tachibana, T., Kawabe, Y., Shima, M., Yoshioka, A., and Hattori, K. (2012) A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. *Nat. Med.*, 18, 1570-4.
- Klein, C., Sustmann, C., Thomas, M., Stubenrauch, K., Croasdale, R., Schanzer, J., Brinkmann, U., Kettenberger, H., Regula, J. T., and Schaefer, W. (2012) Progress in overcoming the chain association issue in bispecific heterodimeric IgG antibodies. *MAbs*, 4, 653-63.
  - Lazar, G. A., Dang, W., Karki, S., Vafa, O., Peng, J. S., Hyun, L., Chan, C., Chung, H. S., Eivazi, A., Yoder, S. C., Vielmetter, J., Carmichael, D. F., Hayes, R. J., and Dahiyat, B. I. (2006) Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103, 4005-10.
  - Neri, S., Mariani, E., Meneghetti, A., Cattini, L., and Facchini, A. (2001) Calcein-acetyoxymethyl cytotoxicity assay: standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8, 1131-5.
  - Nimmerjahn, F. and Ravetch, J. V. (2006) Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity*, 24, 19-28.
  - Niwa, R., Hatanaka, S., Shoji-Hosaka, E., Sakurada, M., Kobayashi, Y., Uehara, A., Yokoi, H., Nakamura, K., and Shitara, K. (2004) Enhancement of the antibody-dependent cellular cytotoxicity of low-fucose IgG1 is independent of FcγRIIIa functional polymorphism. *Clin. Cancer Res.*, 10, 6248-55.

- Oganessian, V., Damschroder, M. M., Leach, W., Wu, H., and Dall'Acqua, W. F. (2008) Structural characterization of a mutated, ADCC-enhanced human Fc fragment. *Mol. Immunol.*, 45, 1872-82.
- Radaev, S., Motyka, S., Fridman, W. H., Sautes-Fridman, C., and Sun, P. D. (2001) The structure of a human type III Fcγ receptor in complex with Fc. *J. Biol. Chem.*, 276, 16469-77.
- Richards, J. O., Karki, S., Lazar, G. A., Chen, H., Dang, W., and Desjarlais, J. R. (2008) Optimization of antibody binding to FcγRIIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol. Cancer Ther.*, 7, 2517-27.
- Ridgway, J. B., Presta, L. G., and Carter, P. (1996) 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng.*, 9, 617-21.
- Roden, M. M., Lee, K. H., Panelli, M. C., and Marincola, F. M. (1999) A novel cytotoxicity assay using fluorescent labeling and quantitative fluorescent scanning technology. *J. Immunol. Methods*, 226, 29-41.
- Scott, A. M., Allison, J. P., and Wolchok, J. D. (2012) Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer Immun.*, 12, 14.
- Shields, R. L., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L. Y., Hong, K., Meng, Y. G., Weikert, S. H., and Presta, L. G. (2002) Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J. Biol. Chem.*, 277, 26733-40.
- Shields, R.L., Namenuk, A.K., Hong, K., Meng, Y.G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., Fox, J.A., and Presta, L.G. (2001) High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc γRI, Fc γRII, Fc γRIII, and FcγRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc γR. *J.*

Biol. Chem., 276, 6591-604.

- Shinkawa, T., Nakamura, K., Yamane, N., Shoji-Hosaka, E., Kanda, Y., Sakurada, M., Uchida, K., Anazawa, H., Satoh, M., Yamasaki, M., Hanai, N., and Shitara, K. (2003) The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Biol. Chem.*, 278, 3466-73.
- Smith, P., DiLillo, D. J., Bournazos, S., Li, F., and Ravetch, J. V. (2012) Mouse model recapitulating human Fcγ receptor structural and functional diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109, 6181-6.
- Stavenhagen, J. B., Gorlatov, S., Tuailon, N., Rankin, C. T., Li, H., Burke, S., Huang, L., Vihj, S., Johnson, S., Bonvini, E., and Koenig, S. (2007) Fc optimization of therapeutic antibodies enhances their ability to kill tumor cells in vitro and controls tumor expansion in vivo via low-affinity activating Fcγ receptors. *Cancer Res.*, 67, 8882-90.
- Weng, W. K. and Levy, R. (2003) Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, 21, 3940-7.

### 第 3 章

- DeLano, W. L. (2002) *The PyMOL Molecular Graphics System* (Schrödinger, LLC, Palo Alto, CA)
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr.*, D66, 486-501.

- Evans, P. (2006) Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr.*, D62, 72-82.
- Ferrara, C., Grau, S., Jäger, C., Sondermann, P., Brünker, P., Waldhauer, I., Hennig, M., Ruf, A., Rufer, A.C., Stihle, M., Umaña, P., and Benz, J. (2011) Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between Fcγ<sub>3</sub> and antibodies lacking core fucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108, 12669-74.
- Kabsch, W. (1976) A solution for the best rotation to relate two sets of vectors. *Acta Crystallogr.*, A32, 922-3.
- Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Crystallogr.*, D66, 125-32.
- Krapp, S., Mimura, Y., Jefferis, R., Huber, R., and Sondermann, P. (2003) Structural analysis of human IgG-Fc glycoforms reveals a correlation between glycosylation and structural integrity. *J. Mol. Biol.*, 325, 979-89.
- Marvin, J. S. and Lowman, H. B. (2003) Redesigning an antibody fragment for faster association with its antigen. *Biochemistry*, 42, 7077-83.
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., and Read, R. J. (2007) Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.*, 40, 658-74.
- Murshudov, G. N., Skubak, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F., and Vagin, A. A. (2011) REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr.*, D67, 355-67.
- Oganessian, V., Damschroder, M. M., Leach, W., Wu, H., and Dall'Acqua, W. F. (2008) Structural characterization of a mutated, ADCC-enhanced human Fc fragment. *Mol. Immunol.*, 45, 1872-82.
- Radaev, S., Motyka, S., Fridman, W.H., Sautes-Fridman, C., and Sun, P.D. (2001)

The structure of a human type III Fcγ receptor in complex with Fc. *J. Biol. Chem.*, 276, 16469-77.

- Ramsland, P. A., Farrugia, W., Bradford, T. M., Sardjono, C. T., Esparon, S., Trist, H. M., Powell, M. S., Tan, P. S., Cendron, A. C., Wines, B. D., Scott, A. M., and Hogarth, P. M. (2011) Structural basis for Fc γ<sub>2</sub>RIIa recognition of human IgG and formation of inflammatory signaling complexes. *J. Immunol.*, 187, 3208-17.
- Schreiber, G. and Fersht, A. R. (1996) Rapid, electrostatically assisted association of proteins. *Nat. Struct. Biol.*, 3, 427-31.
- Sondermann, P., Huber, R., Oosthuizen, V., and Jacob, U. (2000) The 3.2-Å crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fcγ<sub>2</sub>RIII complex. *Nature*, 406, 267-73.
- Ten Eyck, L. F. (1973) Crystallographic fast Fourier transforms. *Acta Cryst.*, A29, 183-91.
- Winter, G. (2010) xia2: an expert system for macromolecular crystallography data reduction. *J. Appl. Crystallogr.*, 43, 186-90.

#### 第 4 章

- Bergtold, A., Desai, D. D., Gavhane, A., and Clynes, R. (2005) Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells. *Immunity*, 23, 503-14.
- Boruchoy, A. M., Heller, G., Veri, M. C., Bonvini, E., Ravetch, J. V., and Young, J. W. (2005) Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions. *J. Clin. Invest.*, 115, 2914-23.
- Boumpas, D. T., Furie, R., Manzi, S., Illei, G. G., Wallace, D. J., Balow, J. E., and Vaishnav, A; BG9588 Lupus Nephritis Trial Group. (2003) A short course of BG9588 (anti-CD40 ligand antibody) improves serologic activity and decreases

hematuria in patients with proliferative lupus glomerulonephritis. *Arthritis Rheum.*, 48, 719-27.

- Cemerski, S., Chu, S. Y., Moore, G. L., Muchhal, U. S., Desjarlais, J. R., and Szymkowski, D. E. (2012) Suppression of mast cell degranulation through a dual-targeting tandem IgE-IgG Fc domain biologic engineered to bind with high affinity to FcγRIIb. *Immunol. Lett.*, 143, 34-43.
- Chu, S. Y., Vostiar, I., Karki, S., Moore, G. L., Lazar, G. A., Pong, E., Joyce, P. F., Szymkowski, D. E., and Desjarlais, J. R. (2008) Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and FcγRIIb with Fc-engineered antibodies. *Mol. Immunol.*, 45, 3926-33.
- Chu, S. Y., Horton, H. M., Pong, E., Leung, I. W., Chen, H., Nguyen, D. H., Bautista, C., Muchhal, U. S., Bennett, M. J., Moore, G. L., Szymkowski, D. E., and Desjarlais, J. R. (2012) Reduction of total IgE by targeted coengagement of IgE B-cell receptor and FcγRIIb with Fc-engineered antibody. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 129, 1102-15.
- Crowley, J. E., Stadanlick, J. E., Cambier, J. C., and Cancro, M. P. (2009) FcγRIIb signals inhibit BlyS signaling and BCR-mediated BlyS receptor up-regulation. *Blood*, 113, 1464-73.
- Dall'Acqua, W. F., Cook, K. E., Damschroder, M. M., Woods, R. M., and Wu, H. (2006) Modulation of the effector functions of a human IgG1 through engineering of its hinge region. *J. Immunol.*, 177, 1129-38.
- DeLano, W. L. (2002) *The PyMOL Molecular Graphics System* (Schrödinger, LLC, Palo Alto, CA)
- Desai, D. D., Harbers, S. O., Flores, M., Colonna, L., Downie, M. P., Bergtold, A., Jung, S., and Clynes, R. (2007) Fc gamma receptor IIB on dendritic cells enforces

peripheral tolerance by inhibiting effector T cell responses. *J. Immunol.*, 178, 6217-26.

- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D*66, 486-501.
- Evans, P. (2006) Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr.*, D62, 72-82.
- Grueninger-Leitch, F., D'Arcy, A., D'Arcy, B., and Chène, C. (1996) Deglycosylation of proteins for crystallization using recombinant fusion protein glycosidases. *Protein Sci.*, 5, 2617-22.
- Hammer, O. (2012) CD19 as an attractive target for antibody-based therapy. *MAbs*, 4, 571-77
- He, F., Hogan, S., Latypov, R. F., Narhi, L. O., and Razinkov, V. I. (2010) High throughput thermostability screening of monoclonal antibody formulations. *J. Pharm. Sci.*, 99, 1707-20.
- Hernández, T., de Acosta, C. M., López-Requena, A., Moreno, E., Alonso, R., Fernández-Marrero, Y., and Pérez, R. (2010) Non-classical binding of a polyreactive  $\alpha$ -type anti-idiotypic antibody to B cells. *Mol. Immunol.*, 48, 98-108.
- Heyman, B. (2003) Feedback regulation by IgG antibodies. *Immunol. Lett.*, 88, 157-61.
- Horton, H. M., Chu, S. Y., Ortiz, E. C., Pong, E., Cemerski, S., Leung, I. W., Jacob, N., Zalevsky, J., Desjarlais, J. R., Stohl, W., and Szymkowski, D. E. (2011) Antibody-mediated coengagement of Fc $\gamma$ RIIb and B cell receptor complex suppresses humoral immunity in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.*, 186, 4223-33.

- Igawa, T., Tsunoda, H., Tachibana, T., Maeda, A., Mimoto, F., Moriyama, C., Nanami, M., Sekimori, Y., Nabuchi, Y., Aso, Y., and Hattori, K. (2010) Reduced elimination of IgG antibodies by engineering the variable region. *Protein Eng. Des. Sel.*, 23, 385-92.
- Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Crystallogr.*, D66, 125-32.
- Lehrnbecher, T., Foster, C. B., Zhu, S., Leitman, S. F., Goldin, L. R., Huppi, K. and Chanock, S. J. (1999) Variant genotypes of the low-affinity Fcγ receptors in two control populations and a review of low-affinity Fcγ receptor polymorphisms in control and disease populations. *Blood*, 94, 4220-32.
- Leibson, P. J. (2004) The regulation of lymphocyte activation by inhibitory receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, 16, 328-36.
- Li, F. and Ravetch, J. V. (2011) Inhibitory Fcγ receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies. *Science*, 333, 1030-4.
- Li, F. and Ravetch, J. V. (2012) Apoptotic and antitumor activity of death receptor antibodies require inhibitory Fcγ receptor engagement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109, 10966-71.
- Malbec, O. and Daëron, M. (2012) Antibodies against growth factor receptors can inhibit the proliferation of transformed cells via a cis-interaction with inhibitory FcR. *Immunol. Lett.*, 143, 28-33.
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., and Read, R. J. (2007) Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.*, 40, 658-74.
- Meyer, T., Robles-Carrillo, L., Robson, T., Langer, F., Desai, H., Davila, M., Amaya, M., Francis, J. L., and Amirkhosravi, A. (2009) Bevacizumab immune complexes

activate platelets and induce thrombosis in FCGR2A transgenic mice. *J. Thromb. Haemost.*, 7, 171-81.

- Mössner, E., Brünker, P., Moser, S., Püntener, U., Schmidt, C., Herter, S., Grau, R., Gerdes, C., Nopora, A., van Puijenbroek, E., Ferrara, C., Sondermann, P., Jäger, C., Strein, P., Fertig, G., Friess, T., Schüll, C., Bauer, S., Dal Porto, J., Del Nagro, C., Dabbagh, K., Dyer, M. J., Poppema, S., Klein, C., and Umaña, P. (2010) Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood*, 115, 4393-402.
- Mousavi, S. A., Sporstøl, M., Fladeby, C., Kjekken, R., Barois, N., and Berg, T. (2007) Receptor-mediated endocytosis of immune complexes in rat liver sinusoidal endothelial cells is mediated by FcγRIIb2. *Hepatology*, 46, 871-84.
- Murshudov, G. N., Skubák, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F., and Vagin, A. A. (2011) REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. D*67, 355-67.
- Nimmerjahn, F. and Ravetch, J. V. (2005) Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science*, 310, 1510-2.
- Nimmerjahn, F. and Ravetch, J. V. (2008) Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.*, 8, 34-47.
- Nimmerjahn, F. and Ravetch, J. V. (2012) Translating basic mechanisms of IgG effector activity into next generation cancer therapies. *Cancer Immun.*, 12, 13-9.
- Osborne, J. M., Chacko, G. W., Brandt, J. T., and Anderson, C.L. (1994) Ethnic variation in frequency of an allelic polymorphism of human Fc gamma RIIA determined with allele specific oligonucleotide probes. *J. Immunol. Methods*, 173,

207-17.

- Paul, P. B. (2005) Omalizumab: A Monoclonal Anti-IgE Antibody. *MedGenMed*, 7, 27.
- Pollreisz, A., Assinger, A., Hacker, S., Hoetzenecker, K., Schmid, W., Lang, G., Wolfsberger, M., Steinlechner, B., Bielek, E., Lalla, E., Klepetko, W., Volf, I., and Ankersmit, H. J. (2008) Intravenous immunoglobulins induce CD32-mediated platelet aggregation in vitro. *Br. J. Dermatol.*, 159, 578-84.
- Ramsland, P. A., Farrugia, W., Bradford, T. M., Sardjono, C. T., Esparon, S., Trist, H. M., Powell, M. S., Tan, P. S., Cendron, A. C., Wines, B. D., Scott, A. M., and Hogarth, P. M. (2011) Structural basis for Fc gammaRIIa recognition of human IgG and formation of inflammatory signaling complexes. *J. Immunol.*, 187, 3208-17.
- Richards, J. O., Karki, S., Lazar, G. A., Chen, H., Dang, W., and Desjarlais, J. R. (2008) Optimization of antibody binding to Fc gammaRIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol. Cancer Ther.*, 7, 2517-27.
- Robles-Carrillo, L., Meyer, T., Hatfield, M., Desai, H., Dávila, M., Langer, F., Amaya, M., Garber, E., Francis, J. L., Hsu, Y. M., and Amirkhosravi, A. (2010) Anti-CD40L immune complexes potently activate platelets in vitro and cause thrombosis in FCGR2A transgenic mice. *J. Immunol.*, 185, 1577-83.
- Scappaticci, F. A., Skillings, J. R., Holden, S. N., Gerber, H. P., Miller, K., Kabbavar, F., Bergsland, E., Ngai, J., Holmgren, E., Wang, J., and Hurwitz, H. (2007) Arterial thromboembolic events in patients with metastatic carcinoma treated with chemotherapy and bevacizumab. *J. Natl. Cancer Inst.*, 99, 1232-9.
- Shuford, W. W., Klussman, K., Tritchler, D. D., Loo, D. T., Chalupny, J., Siadak, A. W., Brown, T. J., Emswiler, J., Raecho, H., Larsen, C. P., Pearson, T. C., Ledbetter, J.

A., Aruffo, A., and Mittler, R. S. (1997) 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *J. Exp. Med.*, 186, 47-55.

- Smith, P., DiLillo, D. J., Bournazos, S., Li, F., and Ravetch, J. V. (2012) Mouse model recapitulating human Fcγ receptor structural and functional diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109, 6181-6.
- Stavenhagen, J. B., Gorlatov, S., Tuailon, N., Rankin, C. T., Li, H., Burke, S., Huang, L., Vihj, S., Johnson, S., Bonvini, E., and Koenig, S. (2007) Fc optimization of therapeutic antibodies enhances their ability to kill tumor cells in vitro and controls tumor expansion in vivo via low-affinity activating Fcγ receptors. *Cancer Res.*, 67, 8882-90.
- Ten Eyck, L. F. (1973) Crystallographic fast Fourier transforms. *Acta Cryst.*, A29, 183-91.
- White, A. L., Chan, H. T., Roghanian, A., French, R. R., Mockridge, C. I., Tutt, A. L., Dixon, S. V., Ajona, D., Verbeek, J. S., Al-Shamkhani, A., Cragg, M. S., Beers, S. A., and Glennie, M. J. (2011) Interaction with FcγRIIB is critical for the agonistic activity of anti-CD40 monoclonal antibody. *J. Immunol.*, 187, 1754-63.
- White A. L., Chan H. T., French R. R., Beers S. A., Cragg M. S., Johnson P. W., and Glennie M. J. (2013) FcγRIIB controls the potency of agonistic anti-TNFR mAbs. *Cancer Immunol. Immunother.*, 62, 941-8.
- Wilson, N. S., Yang, B., Yang, A., Loeser, S., Marsters, S., Lawrence, D., Li, Y., Pitti, R., Totpal, K., Yee, S., Ross, S., Vernes, J. M., Lu, Y., Adams, C., Offringa, R., Kelley, B., Hymowitz, S., Daniel, D., Meng, G., and Ashkenazi, A. (2011) An Fcγ receptor-dependent mechanism drives antibody-mediated target-receptor signaling

in cancer cells. *Cancer Cell*, 19, 101-113.

- Winter, G., (2010) xia2: an expert system for macromolecular crystallography data reduction. *J. Appl. Crystallogr.* 43, 186-90.
- Zalevsky, J., Leung, I. W., Karki, S., Chu, S. Y., Zhukovsky, E. A., Desjarlais, J. R., Carmichael, D. F., and Lawrence, C. E. (2009) The impact of Fc engineering on an anti-CD19 antibody: increased Fcγ receptor affinity enhances B-cell clearing in nonhuman primates. *Blood*, 113, 3735-43.
- Zhang, C. Y. and Booth, J. W. (2010) Divergent intracellular sorting of FcγRIIA and FcγRIIB2. *J. Biol. Chem.*, 285, 34250-8.
- Zhang, Y., Liu, S., Yu, Y., Zhang, T., Liu, J., Shen, Q., and Cao, X. (2011) Immune complex enhances tolerogenicity of immature dendritic cells via FcγRIIb and promotes FcγRIIb-overexpressing dendritic cells to attenuate lupus. *Eur. J. Immunol.*, 41, 1154-64.

## 報文目録

- Mimoto, F., Igawa, T., Kuramochi, T., Katada, H., Kadono, S., Kamikawa, T., Shida-Kawazoe, M., and Hattori, K. (2013a) Novel asymmetrically engineered antibody Fc variant with superior FcγR binding affinity and specificity compared with afucosylated Fc variant. *MAbs*, 5, 229-36.
- Mimoto, F., Katada, H., Kadono, S., Igawa, T., Kuramochi, T., Muraoka, M., Wada, Y., Haraya, K., Miyazaki, T., and Hattori, K. (2013b) Engineered antibody Fc variant with selectively enhanced FcγRIIb binding over both FcγRIIa(R131) and FcγRIIa(H131). *Protein Eng. Des. Sel.*, 26, 589-98.
- Mimoto, F., Kadono, S., Katada, H., Igawa, T., Kamikawa, T., and Hattori, K. (2014) Crystal structure of a novel asymmetrically engineered Fc variant with improved affinity for FcγRs. *Mol. Immunol.*, 58, 132-38.

## 謝辞

本研究をまとめるにあたり的確なご指導を頂いた東京大学大学院農学生命科学研究科 田之倉 優教授に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、それまでに抗体工学の知識を全く持たなかった私に本研究テーマに挑戦する機会を与えてくださった中外製薬株式会社 服部有宏氏に深く感謝致します。また本研究の過程で研究の方針から実務に至るあらゆる面で、中外製薬株式会社 井川智之氏には数えきれないほどの有意義な助言を頂きました。ここに深く感謝致します。

本研究は共同研究者の方々の協力がなければ成し得ぬものでした。共同研究者の堅田仁氏には改変体のデザインについて、門野正次郎氏には改変体の構造解析およびその解析結果の解釈について、倉持太一氏には網羅的な改変体の評価について、川添明里氏および村岡優氏には改変体の物性的な側面の評価について、宮崎太郎氏、上川雄之氏および和田有希子氏には改変体の生物学的な評価について、原谷健太氏には改変体の血中動態評価について協力いただきました。ここに深く感謝致します。また、共同研究者以外の数多くの中外製薬株式会社、中外製薬医科学研究所の同僚たちの協力を得て、この研究を完遂することができました。ここに深く感謝致します。

また、精神的、物質的な支援を惜しまず、学生生活を含む私の研究生活を長きにわたって支えてくれた両親に深く感謝致します。

最後に、本研究論文は家族の理解と支援がなければ、完成させ得ぬものでした。畑違いの分野でありながら、本研究の意義について理解し、慣れない育児の中、終始暖かく励まし、支援を提供してくれた妻の弓佳に深く感謝致します。また、時には泣きながらも、共に論文を眺めて校正に付き合ってくれた生まれたばかりの息子の結太にも感謝致します。結太と過ごした時間のおかげで、本論文の執筆は一層思い出深いものになりました。