

令和元年5月29日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04306

研究課題名（和文）高機能型低分子二重特異性抗体への革新的がん特異的構造変換デザイン

研究課題名（英文）Innovative cancer-specific structural conversion design into high functional small bispecific antibodies

研究代表者

浅野 竜太郎（Asano, Ryutaro）

東京農工大学・工学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：80323103

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,900,000円

研究成果の概要（和文）：がん特異的に高機能型へと構造変換する二重特異性抗体の新規デザイン開発を進めた。内部にがん特異的なプロテアーゼの認識配列を挿入することで、がん特異的な自由度の向上による高活性型への構造変換を目指したデザインでは、プロテアーゼ消化後に活性の低下が認められた。一方、Fc融合型二重特異性抗体のFc領域融合部位にがん特異的なプロテアーゼの認識配列を挿入することで、がん特異的に長半減期型から高組織浸透性型への構造変換を目指したデザインでは、プロテアーゼ消化により低分子化と活性の維持が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本提案では、がん組織に送達後にがん特異的に高機能型へと構造変換する新たな人工抗体のデザイン開発を進めた。一例として高分子量型の人工抗体の内部にがん特異的なプロテアーゼの認識配列を挿入することで、がんに送達する前は長い体内半減期を有し、送達後には低分子型へと構造変換することでのがん組織への浸透性の向上を期待した分子の開発を行った。結果、プロテアーゼ消化により活性を維持したまま低分子化が認められた。今後の次世代型の抗体医薬開発の一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We tried to develop novel designs for bispecific antibodies which can be converted into functional format around cancer tissues. First, we integrated a recognition sequence of cancer specific protease into bispecific antibodies to convert into flexible format with high therapeutic effects around cancer. However, decreases in the activity were observed. Then, we integrated the same recognition sequence into a hinge region of Fc-fused bispecific antibody to convert into the small format with high tumor penetration ability from the format with long in vivo half-life. This design successfully produced functional small bispecific antibody by protease digestion.

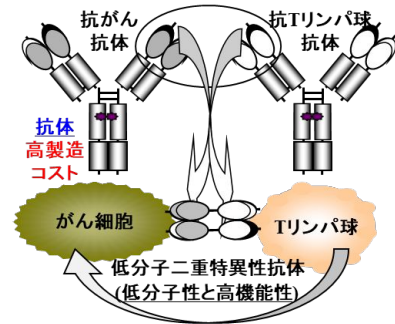
研究分野：応用生物学

キーワード：蛋白質 がん バイオテクノロジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

獲得免疫の中心的役割を担う抗体は、がんに対する効果的な治療薬としても利用されているが、高分子量のタンパク質であるため動物細胞を用いて製造せざるを得ず、このことに起因する抗体医薬のコスト高が世界的な問題となっている。また従来型の IgG 抗体では治療効果が限界との見方もある。低コスト化に向けては主に薬効の向上による投与量の軽減を目指した高機能化と、がん組織への高い浸透性と安価な微生物を用いた製造を期待した低分子化の観点から研究が進められており、前者の例としては高機能な人工抗体の開発が挙げられる。そのひとつである二重特異性抗体は、例えば、がん細胞と T リンパ球を標的とした抗体を用い、両細胞間を強制的に架橋させることで特異的な抗腫瘍効果が誘導され、さらに遺伝子組換え技術を駆使することで低分子型も作製可能である(図1)。この低分子二重特異性抗体は高機能性と低分子性を兼ね備えた魅力的な分子であるが、国内企業では開発自体が皆無、海外でも実用化された例はない。完全に非天然、かつ複雑な形態故に期待とは異なり大腸菌で必ずしも高発現ではなく、また低分子故の短い体内半減期も問題となっている。即ち、これらを改善・解消する低分子二重特異性抗体の新規高機能性構造デザインは、増加の一途を辿っているがん患者に福音をもたらす革新的な次世代型抗体医薬と成ることが期待される。



両細胞間の架橋により強力な傷害性を誘導
図1 低分子二重特異性抗体の模式図

2. 研究の目的

申請代表者は一貫して、がん治療人工抗体の研究に従事し、近年、特に低分子二重特異性抗体のデザインや機能評価に注力してきたが、その開発過程で上皮増殖因子受容体(EGFR)と T リンパ球上の CD3 分子を標的とした Ex3 と名付けた diabody(Db) 型の低分子二重特異性抗体が極めて効果的であることを明らかにした(特許第 3803790 号)。またこの Ex3 を様々な観点から高機能化を進めた結果、構造形態を Db 型から tandem scFv(taFv) 型に改変するだけで比活性が顕著に向上することを見出した(図2, 特許第 5082104 号)。細胞間架橋における構造的自由度の向上が寄与したと考えられるが、その自由度の高さが大腸菌での調製をより困難にさせた。一方で Db 型は比較的大腸菌での調製が容易とされているが、さらに最近同じ Db 型でも構成する各ドメインの配置の入れ換え、即ち配向性を改変させることで、活性のみならず発現量も増減し得ることを明らかにした(図3, PCT/JP2010/05000865)。

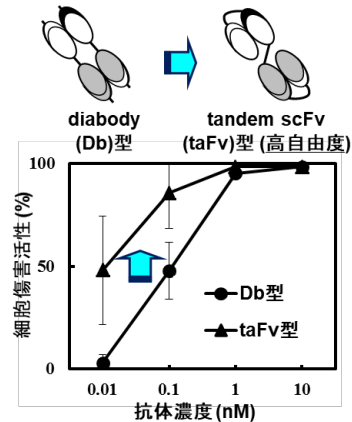
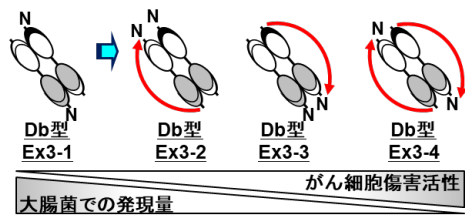


図2 構造改変による活性の向上

これらの知見を基に、発現量が最も高い配向性を有する Db 型 Ex3 を基盤に、がん組織近傍で自由度を向上させる様な構造デザインを行うことで、高い収量と高い活性を併せ持つ低分子二重特異性抗体の開発が可能と考え本提案の着想に至った。具体的には、Ex3 に含まれるリンカー配列に、がん細胞で亢進しているプロテアーゼの認識配列の挿入を目指した。また、低分子二重特異性抗体の短い半減期を解消するために、Fc 融合型低分子二重特異性抗体の Fc 領域との連結部分にプロテアーゼの認識配列を導入することで、がん組織送達前は長い半減期と高い親和性を有し、送達後は低分子型へと構造変換することで副作用の低減と浸透性の向上が期待されるデザインの開発を目指した。



配向性の異なるDb型Ex3改変体
図3 配向性の異なるDb型Ex3改変体

3. 研究の方法

(1) Db 型 Ex3 をモデルに、がん特異的プロテアーゼの認識配列をリンカー配列へ挿入することで、がん特異的に高活性型へと構造変換する新規構造デザインの開発を進めた(図4)。

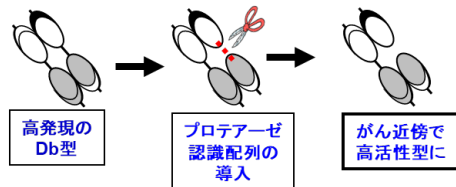


図4 高発現型から高活性型へのがん特異的構造変換

(2) Fc 融合型低分子二重特異性抗体の Fc 領域との連結部分にがん特異的プロテアーゼの認識配列を挿入することで、がん特異的に長半減期型から高組織浸透性型に構造変換する新規構造デザインの開発を進めた(図5)。

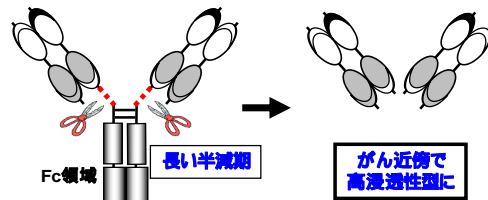


図5 長半減期型から高浸透性型へのがん特異的構造変換

4. 研究成果

(1) Db 型 Ex3 をモデルに、プロテアーゼの認識配列のリンカーへの挿入、および切断による構造的自由度の向上の有無を検証した。まず切断後にグルタチオンカラムによりプロテアーゼそのものの除去が容易な GST タグが予め融合されている PreSicsson Protease (GEヘルスケア社製) の認識配列の挿入を行った。Ex3 はリンカー配列を 2 つ含むため、それぞれに挿入した分子を作製し、大腸菌発現系により調製後、機能評価へと進めた。結果、興味深いことにプロテアーゼの認識配列を挿入することで、挿入前に比べがん細胞傷害活性が向上することが明らかになった(図 6)。これは、細胞間架橋に於いてより有利な結合角度を有することができたためであると考えられるが、一方で実際に PreSicsson Protease でリンカーを切断したところ、期待するような自由度の向上に伴う活性の向上は見られなかった。しかしながらリンカー改変の意義は認められたため、Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) や MMP-9 など実際に多くのがん細胞で亢進しているプロテアーゼの認識配列を導入した Ex3 の作製へと進めた。文献等を参考に、両 MMP により認識される候補配列を 4 種類選定し、同様に Ex3 の 2 つのリンカー配列に挿入した分子を計 8 種類デザインし、それぞれ発現ベクターを構築した。大腸菌発現系を用いて調製後、金属キレートクロマトグラフィー、次いでゲルろ過クロマトグラフィーにより単量体を精製後、機能評価へと進めた。結果、MMP の認識配列を導入することによるがん細胞傷害活性の低下はみられなかったため、続いて市販の MMP を用いた切断検討へと進めた。電気泳動により期待通り、MMP の認識配列特異的な切断が確認されたため、がん細胞傷害活性試験へと進めたが、期待に反し活性の低下が認められた。Db 型 Ex3 をプロテアーゼ消化することで得られる分子は、自由度の観点からは taFv 型 Ex3 と同等であると考えられるが、taFv 型 Ex3 とは異なり、非共有性の相互作用により、3 つのポリペプチド鎖が会合した構造となるため、プロテアーゼ消化が分子の不安定化をもたらしたと考えている。

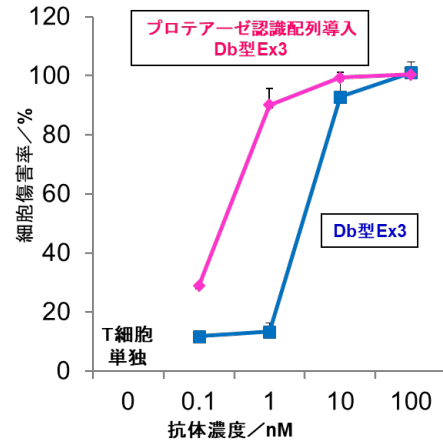


図6 プロテアーゼ認識配列導入前後のがん細胞傷害活性

(2) Fc 融合型 Ex3 をモデルに、半減期の長い高分子量型から高組織浸透型へ、すなわち高分子量型から低分子量型へのがん特異的な構造変換デザインを進めた。Fc 融合型 Ex3 に、(1)と同様に MMP の認識配列の Fc 融合部位への導入を行った遺伝子を設計後、動物細胞用発現ベクターに挿入した。続いて、CHO 細胞に遺伝子導入を行い、抗生剤によるスクリーニング後、限界希釈法により安定産生株を樹立した。ローラーボトル培養、トリプルフラスコ培養、および簡易高密度培養器を用いた培養検討後、最も発現量の高かった培養法を用いて大量培養後、プロテイン A カラムを用いた粗精製、次いでゲル濾過クロマトグラフィーにより最終精製を行った。まず MMP の認識配列を Fc 融合部位に導入したことによる機能への影響を、フローサイトメトリーによる結合活性評価、およびがん細胞傷害活性試験により調べた。結果、両標的細胞である EGFR 陽性がん細胞、および CD3 陽性活性化リンパ球に対する結合活性、がん細胞傷害活性共に十分保持していることが確認された。そこで、MMP による消化条件検討を行った後、切断効率の高い条件を用いて低分子量型の Ex3 の調製を目指した。切断後に未切断の Fc 融合型 Ex3 と切断された Fc をプロテイン A カラムにより取り除いた後、電気泳動を行った結果、十分に精製度の高い低分子量型の Ex3 を調製することに成功した(図 7)。続いて、切断前の Fc 融合型 Ex3 との活性比較をがん細胞傷害活性試験により行った。Fc 融合型 Ex3 は低分子二重特異性抗体である Ex3 を 2 分子含むため、Ex3 単独より高いがん細胞傷害活性が期待されるが、予想に反しプロテアーゼ消化により調製した Ex3 は、Fc 融合型 Ex3 と同等の活性を示した(図 8)。さらに、MMP 産生がん細胞株を用いて、がんが産生する MMP によりデザインした分子が切断されるかを評価した結果、MMP 認識配列の導入により、切断が進行している様子が確認できた。今後、さらに詳細な評価を行う必要があるが、本研究によりがんが亢進しているプロテアー

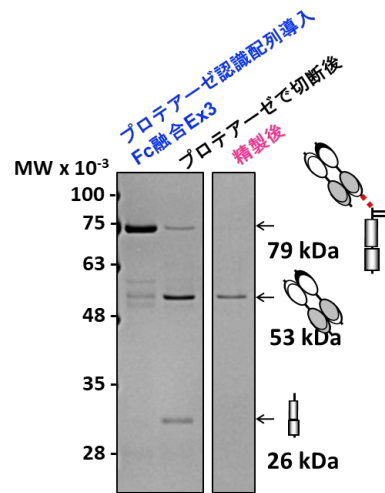


図7 プロテアーゼで切断後の電気泳動

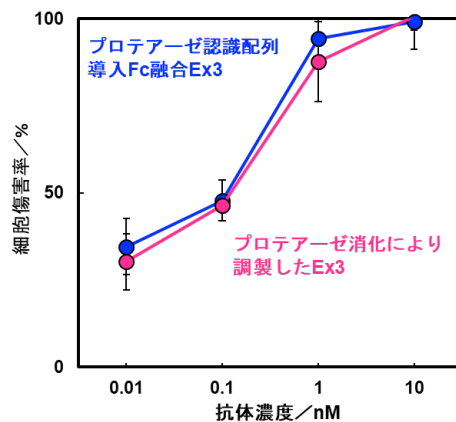


図8 プロテアーゼで消化前後の細胞傷害活性

ゼの認識配列を利用した高分子量型から低分子量型へのがん特異的な構造変換デザインの可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

Suzuki S., Annaka H., Konno S., Kumagai I., Asano R., Engineering the hinge region of human IgG1 Fc-fused bispecific antibodies to improve fragmentation resistance. *Sci. Rep.*, 8(1), 17253 (2018) 査読有, doi: 10.1038/s41598-018-35489-y.

Asano R., Kuroki Y., Honma S., Akabane M., Watanabe S., Mayuzumi S., Hiyamuta S., Kumagai I., Sode K., Comprehensive study of domain rearrangements of single-chain bispecific antibodies to determine the best combination of configurations and microbial host cells. *MAbs*, 10(6), 854-863 (2018) 査読有, doi: 10.1080/19420862.2018.1476815.

Sanada H., Kobayashi K., Oyama K., Maru T., Nakanishi T., Umetsu M., Asano R., Kumagai I., Affinity maturation of humanized anti-epidermal growth factor receptor antibody using a modified phage-based open sandwich selection method. *Sci. Rep.*, 8(1), 5414 (2018) 査読有, doi: 10.1038/s41598-018-23796-3.

Asano R., Nagai K., Makabe K., Takahashi K., Kumagai T., Kawaguchi H., Ogata H., Arai K., Umetsu M., Kumagai I. Structural considerations for functional anti-EGFR × anti-CD3 bispecific diabodies in light of domain order and binding affinity. *Oncotarget*, 9(17), 13884-13893 (2018) 査読有, doi: 10.18632/oncotarget.24490.

Shibuya Y., Haga N., Asano R., Nakazawa H., Hattori T., Takeda D., Sugiyama A., Kurotani R., Kumagai I., Umetsu M., Makabe K., Generation of camelid VHH bispecific constructs via in-cell intein-mediated protein trans-splicing. *Protein Eng. Des. Sel.*, 30(1), 15-21 (2017) 査読有, doi: 10.1093/protein/gzw057

浅野竜太郎, 熊谷 泉, 人工改変を駆使した高機能性次世代がん治療抗体の開発. 月刊ファインケミカル, 46(2), 13-18 (2017), 査読無

Asano R., Koyama N., Hagiwara Y., Masakari Y., Orimo R., Arai K., Ogata H., Furumoto S., Umetsu M., Kumagai I., Anti-EGFR scFv tetramer (tetrabody) with a stable monodisperse structure, strong anticancer effect, and a long in vivo half-life. *FEBS Open Bio*, 6(6), 594-602 (2016) 査読有, doi: 10.1002/2211-5463.12073.

浅野竜太郎, 人工抗体の機能的構造形態に関する研究. 生化学, 88(4), 380-385 (2016), 査読無

浅野竜太郎, 熊谷 泉, がん治療を目指した二重特異性抗体の開発. 細胞, 48(4), 8-12 (2016), ニューサイエンス社 査読無

浅野竜太郎, 熊谷 泉, 次世代がん治療薬を目指した低分子二重特異性抗体の開発と高機能化. 酵素工学ニュース, 75, 11-14 (2016), 査読無

浅野竜太郎, 杉山在生人, 熊谷 泉, 二重特異性抗体を用いたがん治療. 細胞, 47(13), 50-53 (2015), 査読無

浅野竜太郎, 杉山在生人, 熊谷 泉, 高機能な二重特異性抗体医薬の開発. バイオサイエンスとインダストリー, 73(6), 455-461 (2015), 査読無

浅野竜太郎, 熊谷 泉, 二重特異性抗体のタンパク質工学を駆使した高機能化. *YAKUGAKU ZASSHI*, 135(7), 851-856 (2015), 査読無

〔学会発表〕(計 17 件)

浅野竜太郎, 次世代医療を目指した人工抗体の開発と高機能化, 未来がん医療プロフェッショナル養成プラン 講演会 秋田がんプロの挑戦., 2018年11月3日, 秋田ビューホテル(秋田県秋田市)

浅野竜太郎, 人工抗体の設計～がん治療からバイオセンシングへの展開～, 東京農工大学 国立精神・神経医療研究センター 第4回合同シンポジウム, 2018年5月30日, 国立精神・神経医療研究センター(東京都小平市)

浅野竜太郎, 抗体医薬品の課題と開発トレンド, 茨城県病院薬剤師セミナー, 2018年3月8日, オークラフロンティアホテルつくば(茨城県つくば市)

浅野竜太郎, 低分子二重特異性がん治療抗体の開発と高機能化, 医薬産業政策研究所 政策研究 第1回ワークショップ, 2017年12月22日, 日本橋ライフサイエンスビルディング(東京都中央区)

浅野竜太郎, 次世代低分子がん治療抗体の開発, 日本薬物動態学会 第31回年会, 2016年10月15日, キッセイ文化ホール(長野県松本市)

浅野竜太郎, 次世代がん治療薬を目指した二重特異性抗体の構造最適化, 若手研究者フォーラム 2016 次世代バイオ医薬・再生医療を支える基盤技術開発, 2016年7月26日, 御茶ノ水ソラシティ(東京都千代田区)

浅野竜太郎, がん細胞とリンパ球の架橋を目指した二重特異性抗体の高機能化, 第32回日本DDS学会学術集会, 2016年6月30日, 静岡県コンベンションアーツセンター(静岡県)

静岡市)

浅野竜太郎, がん治療を目指した二重特異性抗体の機能的構造形態, 第 20 回 生体材料融合研究会, 2016 年 1 月 27 日, 国立研究開発法人 物質・材料研究機構(茨城県つくば市)

浅野竜太郎, 今野翔太, 尾形裕未, 下村一平, 梅津光央, 熊谷 泉, Fc 融合型二重特異性抗体の安定性の向上を目指したヒンジ領域の設計, 第 67 回日本生物工学会大会, 2015 年 10 月 27 日, 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

Asano R., Kumagai I., Development of bispecific antibodies for cancer therapy using protein engineering, The 1st International Symposium on Drug Discovery from Bioresources, 2015 年 9 月 18 日, IPB International Convention Center (Bogor, Indonesia)

〔図書〕(計 2 件)

浅野竜太郎, 第 III 編 制御 第 6 章 巻き戻し法を用いた低分子抗体の調製. タンパク質のアモルファス凝集と溶解性-基礎研究からバイオ産業・創薬研究への応用まで-, 211-218 (2019), シーエムシー出版

浅野竜太郎, 第 13 章 低分子がん治療抗体の開発とその高機能化および動態解析. ドラッグデリバリーシステム-バイオ医薬品創成に向けた組織、細胞内、核内送達技術の開発-, 108-114 (2018), シーエムシー出版

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 古本 祥三

ローマ字氏名: (FURUMOTO, Shozo)

所属研究機関名: 東北大学

部局名: サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター

職名: 教授

研究者番号(8桁): 00375198

研究分担者氏名: 真壁 幸樹

ローマ字氏名: (MAKABE, Koki)

所属研究機関名: 山形大学

部局名: 大学院理工学研究科

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 20508072

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。