

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15184

研究課題名(和文) Anti-Drug Antibodies 産生を抑制する抗体医薬品創製基盤の確立

研究課題名(英文) Fundamental Study on Preparations for Therapeutic Antibodies with Less Productions of Anti-Drug Antibodies

研究代表者

植田 正 (Ueda, Tadashi)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：90184928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：抗体医薬品には往々にして中和抗体(Anti-Drug Antibodies:ADAs)が産生され、その機能が消失する場合がある。医療費削減の観点から、ADAsの産生を抑制する方法の開発は喫緊の課題である。普遍的に抗体医薬品に対するADAsを抑制するため、本研究では、抗体医薬品(ヒト型)のFabの定常部(全てのヒト型Fabに共通した部位)を修飾し、その構造安定性を変動させ、ADAsの産生を抑制できるかどうかの研究を実施した。

研究成果の概要(英文)：Anti-Drug Antibodies (ADAs) are often found in patients whom therapeutic antibodies are administrated. ADAs will lead the attenuation of medical effects of therapeutic antibodies. From the standpoints of reduction in medical costs, we should develop the method to depress ADAs as early as possible. In order to depress ADAs in general, we focus on the constant region of humanized Fab, which are common in therapeutic antibodies. In this study, we prepared the humanized Fab with different conformational stability by the modification of the constant regions and examined the immunogenicities of these human Fab with different conformational stabilities.

研究分野：応用薬理学、抗体工学

キーワード：antibody stability immunolgy Anti-Drug Antibodies Derp2 Fab

1. 研究開始当初の背景

2012年の統計では、抗体医薬品は世界の医薬品売り上げのトップ10の中に6品目が入る程使用され、現在も150品目以上の臨床試験が実施されている。抗体医薬品は抗原結合部位を含むFab部分とFc部分からなる。抗体医薬品は抗原の特異性を決める部分(超可変部位:CDR)以外はヒト由来のアミノ酸配列である。本来、ヒト抗体は本来抗体医薬品を連続投与しても抗体産生が起らないはずだが、市販されているヒト抗体医薬品(panitumabなど数種)に対して臨床試験の段階で一部の患者がAnti-Drug Antibodies(ADAs)を産生することが報告されている(HardingらMABs,2010)。ADAs産生は免疫複合体等を形成して腎疾患などを引き起こす。さらに、重篤な免疫応答が生じると抗体医薬品の使用ができなくなる。従って、抗体医薬品の利用には、ADAsの発現を限りなくゼロにすることが理想である。しかし、ADAs低下に着目した基礎研究はほとんど報告されていない。

2. 研究の目的

抗体医薬品は難治性疾患に効果的であるが、いくつかの抗体医薬品において、抗体医薬品に対する抗体(ADAs)の産生が報告されている。ADAsの起因については明らかにされていないが、免疫学的な観点から、抗体医薬品で唯一アミノ酸配列に多様性がある超可変領域(CDR)とHLA(ヒト白血球抗原)のミスマッチングがADAs産生に起因する可能性が高い。我々は「蛋白質抗原の安定性を向上すると抗原性が低下する」(So et al. J. Biol. Chem.1998; Ohkuri et al. J. Immunol.2010)という学説を提唱している。そこで研究では、CDRを含む抗体医薬品のFab定常領域を安定化することで、抗体医薬品の抗原性を低下させることができるかどうかを解析する。

3. 研究の方法

(1) シートリッチなFab類似蛋白質における安定性と抗原性の評価

ダニアレルゲンDer p2(以下Der p2と記載)はシートリッチの蛋白質である(図1)。申請者の研究室では、大腸菌を用いたリコンビナントDer p2発現系の確立、変異体による安定性の異なる変異体の調製に関する研究を実施していた。本研究目的の対象蛋白質であるFabは、シートがリッチな蛋白質であることが知られており、「シートリッチな蛋白質の安定性を変動せると抗原性が変動するか」という、本研究目的の先

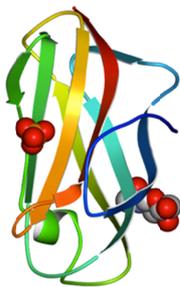


図1 Der p2の立体構造 (PDBid: 1NEP)

行実験として、Der p2の野生型(wt)、グアニジン変性に対して野生型より安定性が向上したI13A、野生型より安定性が低下したA122IをPBSに溶解し、アラムアジュバンドと混合して、BALB/cマウスに免疫した(マウス1匹あたり50µg)。35日後の血清に存在するIgEクラスの抗体量をELISA法を用いた定法により検出した。一方、抗原性は蛋白質が不安定化することで、プロテアーゼ分解されやすくなるためであることが示唆されている(So et al. J. Biochem. Chem. 1998; Ohkuri et al. J. Immunol. 2010)。そこで、野生型ならびに2つの変異体蛋白質のサチライシンBPN'に対する安定性について評価した。すなわち、蛋白質を50mMリン酸緩衝液(pH7.5)に溶解し(1mg/mL)、蛋白質の1/100量のサチライシンBPN'を15分毎に3回加え、1時間、37℃でインキュベーションした。10%酢酸水溶液を加え反応を止め、イオン交換カラム(CM トヨパール、1 x 3cm)を用いて、未反応の蛋白質量を評価した。

(2)リウマトイド因子(ヒト型抗体)Fab変異体のX線結晶構造解析

リウマトイド因子(ヒト型抗体)由来のFabは、酵母(*Pichia pastoris*)を用いて、既に当研究室で大量発現に成功している(Ohkuri et al. J. Biochem. 2013)。この方法を用いて、リウマトイド因子由来のFab変異体を発現、精製した。リウマトイド因子はヒトFc領域に結合する性質を持っているので、ヒト型抗体由来Fcとリウマトイド因子Fabとの複合体の結晶化を市販されている結晶化キットにより行った。生成した結晶については、大型放射光施設を利用して回折データを収集し、分子置換法により構造決定を行った。

(3)カイコを用いたヒト型抗体(リウマトイド因子)Fabの発現系の作成と変異体のデザイン

研究分担者の日下部はカイコを用いた蛋白質の発現方法を確立している(Mitsudome et al. Appl. Biochem Biotechnol. 2014など)。そこで、リウマトイド因子のFabのH鎖のC末端側にENLYFQG(TEVプロテアーゼ切断サイト)HHHHHHHH(His-tagサイト)WSPHQFEK(Strep-tag)が付加されたポリペプチド及びL鎖のポリペプチドをコードするcDNAをそれぞれ異なるベクターに挿入し、一つのFabに関してカイコ100頭に共感染させた(この項目のアミノ酸表記は1文字で表記している)。4日後にカイコ血清を回収し、遠心(4℃、9000rpm x 30分)後、上清を集め、-20℃で冷凍保存した。解凍したサンプルを、遠心(4℃、22000rpm x 30分)後、上清を0.1M Tris緩衝液でpHを7.5に調整し、0.45µmのフィルターにより夾雑物を除いた、粗抽出液をHis Trap excelカラム(GEヘルスケア社製)に吸着後、十分カラムを0.1M Tris緩衝液

(pH7.5)で洗浄したのち、100mM イミダゾールを含む0.1M Tris 緩衝液にて溶出した。次に、この溶出画分を 150 mM NaCl を含むリン酸緩衝液(pH7.4) (PBS) に対して透析し、イミダゾール等を除いた。透析液は、Strep-Tactin® Superflow (IBA 社製)に吸着し、カラムを PBS で十分に洗浄したのち、2.5mM のデスチオビオチンを含む同緩衝液にて、目的物の Fab を溶出した。

変異体のデザインは(2)で得られた構造(図2)を基に人為的にデザインした。変異体の作成は、QuickChange Site-directed mutagenesis Kit によって行った。変異の確認は、それぞれのベクターで大腸菌を形質転換したもからプラスミドを抽出し、DNA シークエンス解析により行った。

(4)変異型ヒト型抗体(リウマトイド因子) Fab の安定性評価

野生型及び変異型 Fab を PBS で 40 μM に調整し、SyproOrange を加え、リアルタイム PCR 装置を用いて、DSF(Differential Scanning Fluorimetry)アッセイを用いて、Fab の変性温度を評価した。

(5) ヒト型抗体(アダリズマブ)分子間ジスルフィド結合欠損 Fab (Fab SS) 及び Fab SS に新規ジスルフィド結合を導入した Fab (mutSS Fab) の調製

ヒト型抗体(アダリズマブ)分子間ジスルフィド結合欠損 Fab (Fab SS) は、Fab の CH1 の Cys224 と CL の Cys214 を同時に Ala にアミノ酸置換変異体である。一方、mutSS Fab は、Fab SS の CL の CH1 の Val177 と CL の Gln160 を同時に Cys にアミノ酸置換置換した変異体である。これらは、研究協力者の大栗らが自ら考案した変異体で、Nakamuraら(Biochem. Biophys. Res. Commun. 2018)の論文に従って調製した。mutFab SS 間の分子間ジスルフィド結合が形成していることも確認した。

(6) Fab SS 及び mutSS Fab の抗原性の評価

Fab SS 及び mutSS Fab の示差走査熱量計による評価の結果、pH6.5 での変性温度は、それぞれ 70、75 である(Nakamura et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 2018)。熱安定性の異なる Fab を PBS に溶解し、蛋白質の安定性が抗原性に及ぼす効果について解析した。それぞれの変異体 0.1 ml を、0、7、14、21、28、35 日目にマウス(C57BL/6)の腹腔内に投与した(1匹あたり 30 μg、計 10匹)、17 および 38 日目に眼窩採血を行い、Fab SS 及び mutSS Fab に対する血清抗体価を ELISA で評価した。

4. 研究成果

(1) シートリッチな Fab 類似蛋白質における安定性と抗原性の評価

37、pH 4 で、グアニジン塩酸塩変性に対して、蛋白質の半分量が変性する濃度は、蛋白質の安定性の指標の一つである。Der p2 の野生型(wt)が 2.0M、I13A は 2.8M、A122I は 1.5M であることは既に研究代表者の研究室で得られていたので、これらの蛋白質を抗原としてマウスに免疫し、35 日後の血清中の IgE の相対量を比較した。野生型に対する抗体量を 1 とすると、I13A は 0.4、A122I は 2.9 であった。誤差を考慮して評価した結果、抗体産生量は、A122I > wt > I13A と結論した。一方、プロテアーゼ分解後の残存量は、wt は 8%、I13A は 18%、A122I は 6%であった。プロテアーゼに対する分解の程度は、抗体産生量と同じであった。この結果は、Fab と同様のシートリッチの蛋白質(Der p2)において、安定性を向上させると抗体産生量が低下する結果が得られた。

(2)リウマトイド因子(ヒト型抗体) Fab の X線結晶構造解析

リウマトイド因子由来の Fab の X線結晶構造解析の結果を図2に示す。

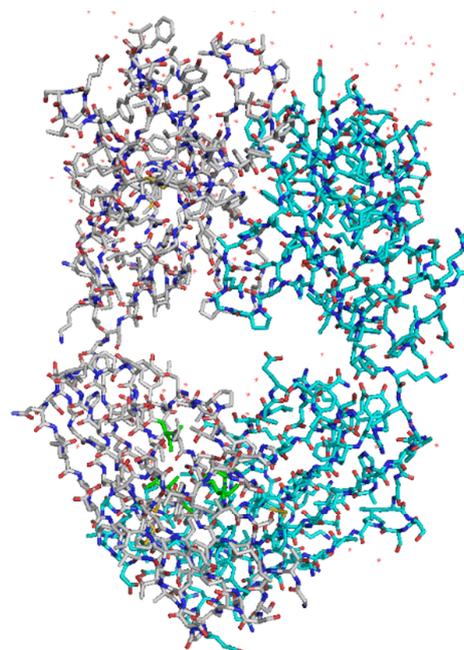


図2 リウマトイド因子由来の Fab の立体構造(PDBid:5XMH)(Fc領域との複合体であるが、Fc領域は図には記載していない)。

(3)カイクを用いたヒト型抗体(リウマトイド因子) Fab の発現と Fab の変異体作成

(2)の立体構造を基盤として、ヒト型 Fab 分子の熱安定性を向上するため、変異体のデザインを行った。研究分担者日下部は、カイクを用いた蛋白質の高発現の実績がある。そこで、カイク発現系を用いて種々の Fab 変異体を調製した。L鎖の Ser131 周辺の立体構造(図3)、Thr178 周辺の立体構造(図4)に示す。

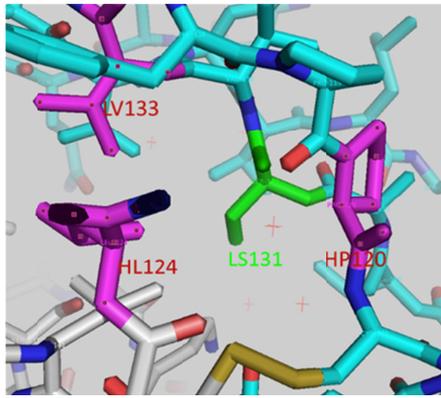


図3 リウマトイド因子 Fab の L 鎖 Ser131 周辺の立体構造

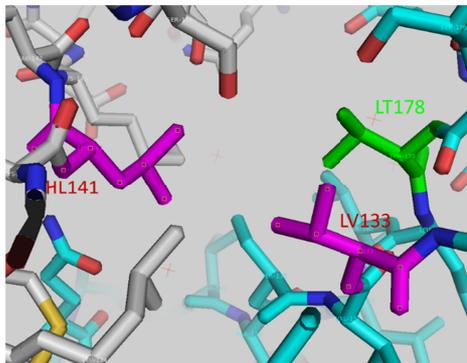


図4 リウマトイド因子 Fab の L 鎖 Thr178 周辺の立体構造

これらの構造から、L 鎖の Ser131 を嵩高いアミノ酸残基である、Phe、Leu 及び側鎖の末端にアミド結合を有する Asn に変異した。また、L 鎖の Thr178 を Leu に変異した。一方、H 鎖については、Leu141 を Trp、Ser177 を Leu、Val181 を Ile 及び Leu に変異した(いずれの残基周辺の図は割愛)。H 鎖の変異 Fab は、H 鎖変異体の cDNA を含む感染ベクターと、L 鎖野生型の cDNA を含む感染ベクターをカイコ 100 頭にそれぞれ感染させた。一方、L 鎖の変異 Fab は、L 鎖変異体の cDNA を含む感染ベクターと、H 鎖野生型の cDNA を含む感染ベクターをカイコ 100 頭にそれぞれ感染させた。

4 日後、カイコ血清を回収し、2つのアフィニティーカラムにより精製した。精製物を非還元状態で SDS-PAGE で分析し、CBB (クマジーブリリアントブルー) にて染色した。ほぼ単一でかつ目的の分子量に野生型、変異型 Fab が得られていることがわかった。収量は野生型を 6.5mg 得ることができた。変異体においては、変異型毎に収率が異なり、0.1mg-1.8mg であった。カイコ発現系は同時に多くの変異体を作成できるという利点を持っているので、野生型 Fab 並びに 8 種の変異体を調製できた。しかし、野生型は 6.5mg 入手できたが、変異体によっては発現量が低下したものが多かった。詳細は不明であるが、変異により Fab が不安定となり、野生型ほど

量が得られなかったと考察した。

(4) 変異型ヒト型抗体 (リウマトイド因子) Fab の安定性評価

野生型ならびに変異型 Fab の生成物の 210nm から 250nm の円偏光二色性スペクトルを測定し、変異体のスペクトルの形がシート構造を有していること、野生型と変異体のモル分子楕円率の比較から、変異導入による構造崩壊が起こっていないことを確認した。

DSF によると野生型の熱変性温度 (蛋白質の半分量が壊れる温度) は 64 であった。蛋白質が 1mg 程度量入手できた 4 種の変異体 Fab、L 鎖 Ser131Leu、L 鎖 Ser131Phe、L 鎖 Ser131Asn、L 鎖 Thr178Leu の変性温度は、それぞれ、62.8、61.0、63.0、63.5 であった。X 線結晶解析の結果から、L 鎖の Ser131 周辺には、小さなキャビティが存在したが、この部位の側鎖を大きくしても、都合のよい相互作用を得ることができなかった。L 鎖 Thr178 も小さなキャビティが存在したが、都合の良い相互作用が得られなかった。

(5) Fab の安定性変動に伴う抗原性の評価

研究成果(1)において、シートリッチな蛋白質である DerP2 においては、安定性を向上すると抗原性の低下が見出された。そこで、シートリッチな Fab において、同様な結果が得られるかどうかの検証を行った。

研究成果 (4) に記載したように、リウマトイド因子の Fab の立体構造を基盤に、カイコ発現系を用いて変異体を作成したが、野生型より安定な変異体 Fab は得られなかった。また、変性温度が大きく低下した変異体も得られなかった。

そこで、大栗らが報告 (Nakamura et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2018) した、Fab SS 及び、この変異体より 5 安定な mutSS Fab 野生型を用いて、Fab における安定性と抗原性の関係を解析した。いずれの変異体を PBS に溶解し、それぞれ C57BL/6 マウスに免疫した (マウス 1 匹あたり 30 µg、10 匹)、17 および 38 日目に眼窩採血を行い、Fab SS 及び mutSS Fab に対し IgG クラスの抗体量を ELISA 法により検出した (図 5、6)。

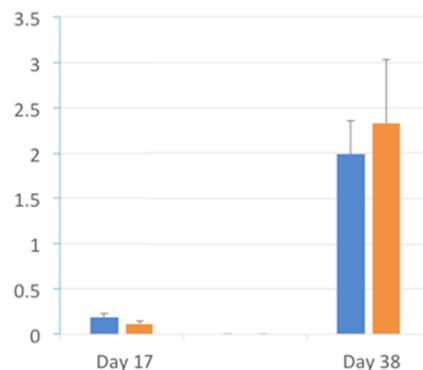


図5 Fab SS に対する抗体価。縦軸は ELISA 測定 の 450nm の値。青 (Fab SS)、橙 (mutSS Fab) 投与群。

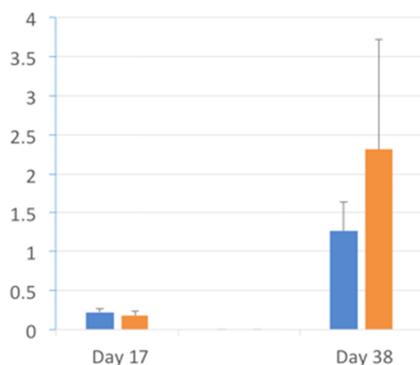


図6 mutSS Fab SS に対する抗体価。縦軸は ELISA 測定 の 450nm の値。青 (Fab SS)、橙 (mutSS Fab SS) 投与群。

いずれの変異体は立体構造が類似している ので、産生された抗体は交差反応が観測された。研究成果(1)から、シート構造がリッチな蛋白質において、蛋白質の安定性を向上すると抗原性が低下したことから、Fab SS の安定性を向上した mutSS Fab SS では、抗体産生量が低くなると予想していたが、この結果は有意差がない結果であった。この結果は、Fab SS と mutSS Fab SS の安定性の差が十分でないことに由来するのか、Fab 独自の性質によるのか、今後、安定化した Fab を調製して抗原性を評価してみる必要がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Mitsunori Shiroishi、Yuji Ito、Kenta Shimokawa、Jae Man Lee、Takahiro Kusakabe、Tadashi Ueda、Structure-function analyses of a stereotypic rheumatoid factor unravel the structural basis for germline-encoded antibody autoreactivity、J.Biol.Chem.、査読有、2018 年、293 巻、18 号、7006-7018、doi: 10.1074/jbc.M117.814475

Hitomi Nakamura、Takatoshi Ohkuri、Takanori So、Tadashi Ueda、Relationship between the magnitude of IgE production in mice and conformational stability of the house dust mite allergen, Der p 2、Biochim. Biophys. Acta.-General Subjects、査読有、2016 年、1860 巻、10 号、2279-8224. doi: 10.1016 /j.bbagen.2016.04.014.

〔学会発表〕(計 2 件)

白石充典、抗 IgG-Fc 抗体リウマトイド因子の分子認識機構の解明、第 4 回生命分子科学研究会、2017 年 3 月 5 日 (札幌市)

白石充典、リウマトイド因子 (IgM 抗体) の分子認識メカニズムに関する構造基盤、大阪大学蛋白質研究所セミナー ~抗体創薬の最前線 ~ 「バイオ医薬品開発の鍵となる分

子設計技術」、2016 年 11 月 1 日 (福岡市)

〔その他〕

ホームページ:

<http://meneki.phar.kyushu-u.ac.jp/Protein/TOP.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

植田 正 (UEDA Tadashi)

九州大学大学院・薬学研究院・教授

研究者番号: 90184928

(2) 研究分担者

阿部義人 (ABE Yoshito)

九州大学大学院・薬学研究院・准教授

研究者番号: 60315091

研究分担者

白石充典 (SHIROISHI Mitsunori)

九州大学大学院・薬学研究院・助教

研究者番号: 00380527

研究分担者

日下部 宜宏 (KUSAKABE Takahiro)

九州大学大学院・農学研究院・教授

研究者番号: 30253595

研究分担者

宗 孝紀 (SO Takanori)

東北大学大学院・医学研究科・准教授

研究者番号: 60294964