

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：13302

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16561

研究課題名(和文) 光刺激で薬効制御が可能な抗体薬物複合体の開発

研究課題名(英文) Development of antibody-drug conjugate for controlling drug efficacy by photo-irradiation

研究代表者

渡邊 貴嘉 (WATANABE, TAKAYOSHI)

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：70554020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、非天然アミノ酸を用いずに、タンパク質の活性を損なうことなく、タンパク質のN末端特異的に機能性分子を修飾する新手法の開発を行った。そして、このN末端特異的修飾法を用いて、抗体医薬として臨床で用いられているIgG抗体に対して抗がん剤を修飾した抗体薬物複合体の新規合成法を開発した。さらに、これらの研究過程を通じて、ケージド抗体薬物複合体の合理的な設計指針に関する知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, a novel method for modifying functional molecules specific to the N-terminus of proteins while maintaining the activity of proteins without using non-natural amino acids was developed. By using this N-terminal-specific modification method, development of a novel method for synthesizing an antibody-drug conjugate in which an anticancer drug has been modified against IgG antibody used in clinical practice as antibody drugs was achieved. Furthermore, through these research processes, the findings on rational design guidelines for synthesizing caged antibody-drug conjugate could be obtained.

研究分野：化学生物学

キーワード：タンパク質 抗体 抗体薬物複合体 非天然アミノ酸 ケージド化合物

### 1. 研究開始当初の背景

近年、抗体医薬として抗体に抗がん剤などの薬剤を結合させた「抗体薬物複合体」が注目されている。これは、抗体の高い抗原特異性を利用して薬剤を疾患部位に効率よく送達できるため、単独では生体内毒性が強すぎる薬剤が改めて薬剤候補となる可能性を持っている。抗体薬物複合体は「①抗体」、「②抗がん剤などの薬剤」、「③抗体と薬剤を連結するリンカー配列」から構成され、複合体は標的細胞に取り込まれた後リソソーム分解系においてリンカー配列が分解されることで薬剤が放出される (*Acc. Chem. Res.* **41**, 98-107 (2008))。そのため、抗体薬物複合体は標的細胞内で適切に薬剤が放出されるように設計する必要があり、現在はリンカー配列にジスルフィド結合や標的細胞内で発現上昇している酵素で分解される構造を組み込み、標的細胞内で自発的にリンカーが分解され薬剤を放出させる設計が一般的である (*Bioconjugate Chem.* **21**, 5-13 (2010))。しかし、このようなリンカー配列は血中で分解される場合があり、標的細胞送達前に毒性の高い薬剤が非特異的に放出されることに伴う副作用が懸念されている (*Cancer Res.* **69**, 2358-2364 (2009))。よって、標的細胞に送達されるまでは複合体が安定かつ薬剤活性も抑えられ、標的細胞内で確実に薬剤を放出可能な抗体薬物複合体が開発できれば、副作用が抑えられて高い治療効果が見込める新規抗体医薬の開発に繋がると期待される。

このような抗体薬物複合体を開発するために、ケージド化合物の化学は有用である。タンパク質や核酸などの生理活性に関わる官能基を光分解性保護基で修飾しその生理活性を一時的に不活性化させたケージド化合物は、光照射により生理活性を ON にすることができる。そこで、抗体にケージド薬剤を連結させることで、薬剤にドラッグデリバリー機能を付与するだけでなく、標的細胞のみで活性を持つ薬剤の放出を制御可能だと着想した。

一方、抗体のリシン側鎖やシステイン側鎖にランダムに薬剤を修飾する従来法では、抗原認識部位まで修飾されて抗原との親和性が低下したり (*Clin. Cancer Res.* **10**, 7063-7070 (2004))、抗体の Fc 部位が修飾されて抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性が低下することが懸念される (*Biochem. Soc. Trans.* **30**, 487-490 (2002))。このようなランダム修飾法に対し、研究代表者らは 4 塩基コドン法などの拡張遺伝暗号を用いて非天然アミノ酸をタンパク質へ部位特異的に導入する技術を開発してきた。さらにこの技術を応用し、研究代表者は生細胞内で芳香族アミンを有する非天然アミノ酸を導入したタンパク質を発現させ、その芳香族アミン特異的に化学修飾する技術を開発してきた。しかし、生細胞内における非天然アミノ酸を導入したタンパク質の発現量はそこまで高くない

ことから、この技術を実用的なレベルに発展させるためには、抗原認識部位や ADCC 活性に関与しない抗体部位に薬剤を修飾した抗体薬物複合体の大量合成を可能にする必要がある。さらに、非天然アミノ酸を用いずに市販の抗体の特定部位に薬剤を修飾する技術が開発されれば、様々な抗体に適用可能な抗体薬物複合体の汎用的な合成法になることが期待される。

### 2. 研究の目的

以上のような背景のもと、本研究では標的細胞に送達されるまでは複合体が安定かつ薬剤活性が抑えられ、標的細胞において光照射によって確実に薬剤を放出可能なケージド抗体薬物複合体の開発を目的とする (図 1)。

そのためにまず、薬剤もしくはケージド薬剤を抗体の特定部位に高効率に修飾するための新手法の開発を行う。具体的には、タンパク質の活性を損なうことなく薬剤を抗体の N 末端特異的に修飾する新手法の開発を進める。

続いて、この部位特異的修飾法を用いて、抗体医薬として用いられている IgG 抗体に対して抗がん剤を修飾した抗体薬物複合体の新規合成法の開発を目指す。さらに、抗がん剤に光分解性保護基を修飾し薬効を一時的に抑えたケージド抗がん剤を合成し、IgG 抗体への部位特異的修飾についての検討も行う。

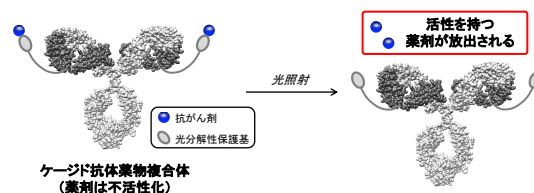


図 1. ケージド抗体薬物複合体

### 3. 研究の方法

#### (1) タンパク質の N 末端特異的修飾法の開発

これまでの研究を通じて、アルデヒド誘導体を用いることでタンパク質やペプチドの N 末端特異的な機能性分子の修飾が可能になるだろうと着想した。そこで、N 末端特異的修飾法を構築するために、機能性分子として蛍光標識アルデヒドを化学合成し、弱酸性条件下で市販の IgG 抗体と還元剤を混合し還元的アミノ化反応を行った。IgG 抗体への蛍光基の修飾は、電気泳動および質量分析で評価した。さらに、蛍光標識 IgG 抗体に対して抗原を添加し蛍光スペクトル測定を行うことで、抗原の結合に伴う蛍光強度変化を測定した。

#### (2) N 末端特異的に抗がん剤を修飾した抗体薬物複合体の開発

上記のタンパク質の N 末端特異的修飾法を用いて、IgG 抗体の N 末端特異的に抗がん剤を修飾した抗体薬物複合体の合成を行っ

た。まず、抗がん剤 Monomethyl auristatin F (MMAF) の末端アミノ基に対して、末端アルデヒドを有する PEG リンカーを連結させた抗がん剤アルデヒドを化学合成した。その後、抗体医薬であるハーセプチン抗体 (抗 Her2 IgG 抗体) とともに弱酸性条件下で混合し還元的アミノ化を行った。反応液を電気泳動で分離し CBB 染色を行うことで、抗がん剤の修飾効率を評価した。

さらに、光照射によって抗がん剤の放出を制御可能なケージド抗体薬物複合体の合成を目指して、ケージド抗がん剤の合成を行った。光分解性保護基として光分解効率が優れた 6-Bromo-7-hydroxycoumarin-4-ylmethyl 基 (Bhc 基) を用い、Bhc 基の 4 位に抗がん剤 MMAF を修飾し、7 位に末端アルデヒド基を持つ PEG リンカーを修飾したケージド抗がん剤の合成を試みた。

#### 4. 研究成果

##### (1) タンパク質の N 末端特異的修飾法の開発

非天然アミノ酸を導入したタンパク質を得るためには遺伝子から発現させることが必要となるが、市販のタンパク質やペプチドに対する部位特異的修飾法が開発されれば汎用性・実用性の高い技術になると期待される。そこで、修飾時の反応液の pH を制御することで、タンパク質やペプチドの N 末端特異的な修飾が達成することを試みた。つまり、N 末端アミノ基の pKa 値 (7~8) はリシン側鎖の pKa 値 (9~10) より低いため、pH 5 程度の弱酸性条件下における還元的アミノ化反応によって N 末端選択的な修飾が可能になると期待される。そこでまず、リシンを含まない HA ペプチドとリシンを含む FLAG ペプチドの 2 種類に対して、弱酸性条件下において蛍光標識アルデヒドを用いた還元的アミノ化を行った。そして得られたペプチドをタンデム質量分析で確認したところ、両ペプチドとも N 末端が蛍光標識化されていたことから、本手法は市販のペプチドの N 末端特異的修飾が可能であることが実証された。

続いて、市販の IgG 抗体に対してもペプチド同様に蛍光標識化を行い (図 2)、反応液を SDS-PAGE で分離後に蛍光イメージを確

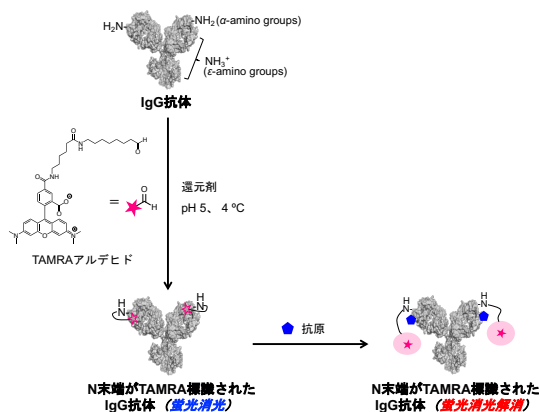


図 2. IgG 抗体の N 末端特異的蛍光標識化と抗原濃度依存的な蛍光応答

認したところ、IgG 抗体の重鎖・軽鎖それぞれが蛍光標識されていることが確認された。その後、蛍光標識された IgG 抗体をプロテアーゼ分解しフラグメントのタンデム質量分析を行った結果、蛍光標識アルデヒドと抗体の濃度比を調節することで N 末端特異的に蛍光標識されることが確認された。さらに、蛍光標識 IgG 抗体に抗原を添加することで、抗原濃度依存的な蛍光強度の増大が確認されたことから、本手法を用いて IgG 抗体の N 末端を修飾しても抗体の活性に影響しないことが実証された (図 2)。

##### (2) N 末端特異的に抗がん剤を修飾した抗体薬物複合体の開発

上記のタンパク質の N 末端特異的修飾法を、抗がん剤を修飾した抗体薬物複合体の合成に応用した。抗がん剤 MMAF のアルデヒド誘導体を化学合成し (図 3 a)、乳がん治療薬として臨床応用されているハーセプチン抗体とともに弱酸性条件下で混合し、還元的アミノ化による抗がん剤の修飾反応を行った (図 3 b)。反応液を SDS-PAGE で分離し CBB 染色したところ、抗体重鎖の N 末端アミノ基への MMAF の修飾は確認できたものの、IgG 抗体への修飾効率は低かった。この原因について、前述の研究では低分子の蛍光色素を用いたのに対し、MMAF アルデヒドはペプチド程度の中分子であることが反応効率に影響したためと推測した。

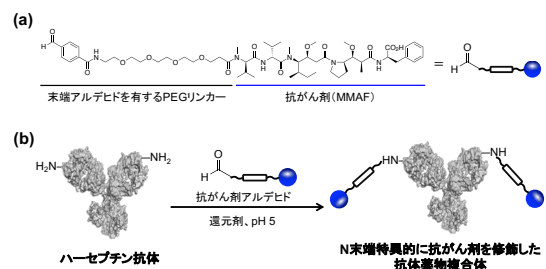


図 3. (a) 抗がん剤アルデヒドの構造、(b) N 末端特異的に抗がん剤を修飾した抗体薬物複合体の合成

そこで修飾条件の最適化を MMAF アルデヒドに近い分子量の PEG アルデヒドを用いて進めたところ、反応効率が低下すると考えられる 0 °C 以下の低温において、IgG 抗体の N 末端特異的修飾反応が促進されることを発見した。これは凍結濃縮効果によって修飾反応が促進したと推測しており、引き続き検証を進めている。一方、0 °C 以下の低温で修飾反応を行うことによる IgG 抗体の活性への影響を調べるために、前述の IgG 抗体の N 末端特異的蛍光標識化を低温で行ったあとに抗原を添加し蛍光スペクトル測定したところ、抗原濃度依存的に蛍光強度が増大したことから、IgG 抗体の抗原結合活性は保持されていることが確認された。よって、新たに発見した低温条件下における N 末端特異的修飾反応は、IgG 抗体の活性に影響を与えな

いことが示された。

続いて、これまでに化学合成した MMAF アルデヒドに光活性化機能を付与するため、光分解性保護基である Bhc 基の 4 位に MMAF を、7 位に末端アルデヒド基を持つ PEG リンカーを修飾したケージド抗がん剤の合成を試みた。ケージド抗がん剤の合成は、MMAF アルデヒドを用いた IgG 抗体の修飾反応条件の結果をケージド抗がん剤の設計に反映させながら進めているため、引き続き新たな設計に基づいたケージド抗がん剤の合成を行い、今後、IgG 抗体への修飾および光反応性の評価を行う予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Keisuke Fukunaga, Takayoshi Watanabe, Takahiro Hohsaka, Site-specific N-terminal Fluorescent Labeling of Unprotected Peptides, *Peptide Science 2015*, 289-290 (2016) (査読有)  
<https://www.prf.or.jp/ps.html>
2. Atsushi Yamaguchi, Takayoshi Matsuda, Kazumasa Ohtake, Tatsuo Yanagisawa, Shigeyuki Yokoyama, Yoshihisa Fujiwara, Takayoshi Watanabe, Takahiro Hohsaka, Kensaku Sakamoto, Incorporation of a Doubly Functionalized Synthetic Amino Acid into Proteins for Creating Chemical and Light-Induced Conjugates, *Bioconjugate Chem.*, **27**, 198-206 (2016) (査読有)  
doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00602

[学会発表] (計 15 件)

1. 福永圭佑、Dian Novitasari、渡邊貴嘉、芳坂貴弘、抗原依存的蛍光変化を示す N 末端蛍光標識抗体の開発、日本化学会第 98 春季年会、2018 年 3 月 21 日、日本大学理工学部船橋キャンパス (千葉県・船橋市)
2. Keisuke Fukunaga, Dian Novitasari, Takayoshi Watanabe, Takahiro Hohsaka, A novel IgG-based fluorescent probe showing increased fluorescence upon binding of antigen, The 6<sup>th</sup> Official Conference of the International Chemical Biology Society (ICBS2017), Oct. 19<sup>th</sup>, 2017, Shanghai (China)
3. 福永圭佑、Dian Novitasari、渡邊貴嘉、芳坂貴弘、抗原応答性蛍光プローブ抗体の開発、第 11 回バイオ関連化学シンポジウム、2017 年 9 月 8 日、東京大学弥生キャンパス (東京都・文京区)
4. 芳坂貴弘、福永圭佑、Dian Novitasari、渡邊貴嘉、阿部亮二、大橋広行、N 末端

蛍光標識 IgG による抗原のリアルタイム蛍光検出、第 17 回日本蛋白質科学会年会、2017 年 6 月 22 日、仙台国際センター (宮城県・仙台市)

5. 福永圭佑、渡邊貴嘉、Dian Novitasari、芳坂貴弘、IgG 抗体の N 末端選択的修飾による抗原応答性蛍光プローブの開発、日本ケミカルバイオロジー学会 第 12 回年会、2017 年 6 月 8 日、北海道大学クラーク会館 (北海道・札幌市)
6. 渡邊貴嘉、リポソームを用いたアミノアシル tRNA 合成酵素の in vitro 分子進化法の開発と非天然アミノ酸導入タンパク質への応用、第 3 回新学術領域研究「動的秩序と機能」若手研究会、2016 年 10 月 12 日、加賀観光ホテル (石川県・加賀市) (招待講演)
7. 福永圭佑、渡邊貴嘉、Novitasari Dian、阿部亮二、大橋広行、芳坂貴弘、N 末端蛍光標識抗体プローブを用いた抗原の蛍光検出、第 68 回日本生物工学会大会、2016 年 9 月 28 日、富山国際会議場 (富山県・富山市)
8. 芳坂貴弘、Huynh Nhat Kim Phuong、吉越健輔、福永圭佑、渡邊貴嘉、部位特異的蛍光標識抗体の合成と抗原の蛍光検出、第 10 回バイオ関連化学シンポジウム、2016 年 9 月 7 日、石川県立音楽堂 (石川県・金沢市)
9. 渡邊貴嘉、植田淳子、松浦友亮、芳坂貴弘、リポソーム内アミノアシル tRNA 合成酵素の in vitro 分子進化法の開発と非天然アミノ酸を導入したタンパク質の合成への応用、第 10 回バイオ関連化学シンポジウム、2016 年 9 月 7 日、石川県立音楽堂 (石川県・金沢市)
10. 福永圭佑、渡邊貴嘉、Novitasari Dian、阿部亮二、大橋広行、芳坂貴弘、抗体の N 末端選択的蛍光標識による蛍光抗原センサーの開発、第 10 回バイオ関連化学シンポジウム、2016 年 9 月 7 日、石川県立音楽堂 (石川県・金沢市)
11. Takayoshi Watanabe, Novel Method for site-specific protein PEGylation using aromatic amine-containing non-natural amino acid, 8<sup>th</sup> Japan-Korea Seminars on Biomolecular Science: Experiments and Simulation, Feb. 15<sup>th</sup>, 2016, Okazaki Conference Center (Okazaki, Aichi) (invited).
12. Takayoshi Watanabe, Rumi Shiba, Takahiro Hohsaka, Site-specific protein PEGylation through incorporation of aromatic amine-containing non-natural amino acid, The international chemical congress of pacific basin societies 2015 (PACIFICHEM2015), Dec. 20<sup>th</sup>, 2015, Honolulu, Hawaii (USA)
13. Keisuke Fukunaga, Takayoshi Watanabe,

Dian Novitasari, Takahiro Hohsaka, Novel IgG-based fluorescent biosensor that shows antigen-dependent fluorescence enhancement, The international chemical congress of pacific basin societies 2015 (PACIFICHEM2015), Dec. 15<sup>th</sup>, 2015, Honolulu, Hawaii (USA)

14. 渡邊貴嘉、福永圭佑、Dian Novitasari、芳坂貴弘、阿部亮二、大橋広行、N 末端特異的に蛍光標識した IgG による抗原の蛍光検出、第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2015)、2015 年 12 月 3 日、神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)
15. 福永圭佑、渡邊貴嘉、Novitasari Dian、阿部亮二、大橋広行、芳坂貴弘、抗原依存的な蛍光増強を示す N 末端蛍光標識 IgG 抗体の開発、第 9 回バイオ関連化学シンポジウム、2015 年 9 月 10 日、熊本大学工学部黒髪南キャンパス (熊本県・熊本市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡邊 貴嘉 (WATANABE TAKAYOSHI)  
北陸先端科学技術大学院大学・先端科学  
技術研究科・助教  
研究者番号：70554020

### (2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者  
なし

(4) 研究協力者  
なし