

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：84420

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19491

研究課題名（和文）がんの治療・診断に向けたmetamorphosis抗体分子の設計

研究課題名（英文）Design of metamorphosis antibody molecule for cancer treatment and diagnosis

研究代表者

鎌田 春彦（Kamada, Haruhiko）

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 創薬デザイン研究センター・プロジェクトリーダー

研究者番号：00324509

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：バイオ医薬全盛の現代において、その中心を担う抗体医薬の開発には、新規フォーマットを持つ抗体分子を開発する必要がある。そこで本研究では、次世代の抗体医薬の有用性を示すことを目的に、新規二重特異性抗体の創製を試みた。その過程で、2種類のBsAbフォーマット（taFv型ならびにscDb型）を基に、同一エピトープを認識すると考えられる二重特異性抗体が異なる特性を持つという興味深い結果を見出し、これらをmetamorphosis抗体と命名した。in vitroにおける各特性評価を実施したところ、BsAb自身の熱安定性の向上が活性向上につながる要因の1つであることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、抗体の構造学的変化から生物活性増強のメカニズムを解明することから、これまで活性が低いとされていた抗体の構造を改変し、優れた活性を持つ抗体へと最適化するための指針を解明できる可能性がある。さらに、抗原に結合した後の抗体のダイナミックな構造的変化が、その機能や生物活性に影響することが判明すれば、それらの情報を活用したがん治療法の開発や画期的診断薬の開発にも貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：It is necessary to develop an antibody molecule having a new format in order to develop the antibody drug. In this study, we attempted to create a novel bispecific antibody that shows the alternative function. In this process, we found an interesting result that bispecific antibodies that recognize the same epitope have different characteristics and that named them metamorphosis antibody. In the in-vitro assay, it was found that the improvement of the thermal stability of BsAb itself is one of the factors leading to the improvement of the activity.

研究分野：抗体工学

キーワード：抗体 二重特異性抗体

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

抗体は、医薬品としても、また診断ツールとしても極めて有用な分子である。最近、一般的な IgG の分子構造とは異なる新しい構造を持った抗体とその誘導体が次々に開発され、そのユニークな構造ゆえに、様々な分野に応用されつつある。特に、二重特異性抗体 (BsAb) は、一つの分子が二つの抗原を認識することで、一般的な IgG とは異なる性質を発揮することから、その応用範囲の拡大が期待されている。

我々はこれまで、抗体の抗原結合領域 Fv を利用した低分子型 BsAb に関して研究し、その過程で、同一のエピトープを認識する一本鎖抗体 (scFv) を連結した BsAb が異なる抗腫瘍効果を示すことを見出した。すなわち、各 scFv を構成するリンカー長と Fv 領域の組み合わせを変えることで、末梢血単核球からの IL-2 産生が亢進し、それに起因するがん細胞に対する殺細胞効果を著しく向上させることが明らかになった。しかし、そのメカニズムについては、未だ全く不明であった。

この活性向上のメカニズムの解明を目的として、各 BsAb のリンカー長と Fv 領域の組み合わせ (結合させる各ドメインの順序) の違いと、その構造的な変化の誘導に着目した。特に、このような抗原-抗体複合体の形成による抗体の構造変化は、野生型 IgG と比較して低分子型 BsAb に起こりやすい。そのため、我々はこれまでの低分子型 BsAb の開発から見出された、抗原との複合体形成によって、フェノタイプを変える抗体を「metamorphosis 抗体 (構造変化抗体)」として定義し、将来的にがんの診断や治療に応用したいと考えた。

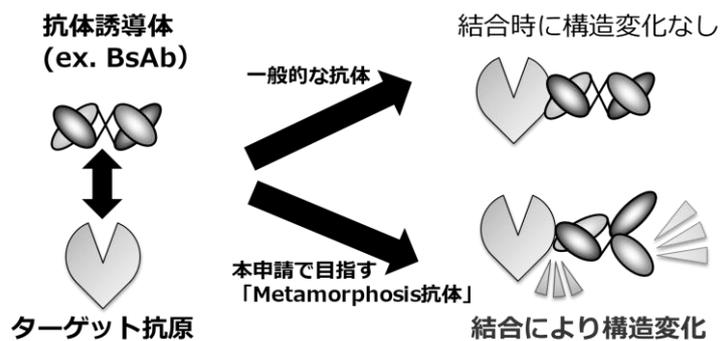


図 1 metamorphosis 抗体の概念

### 2. 研究の目的

本研究では、我々がこれまでの研究過程で偶然見出した低分子型二重特異性抗体 (BsAb) が、飛躍的に生物活性を向上させたメカニズムを、抗原-抗体複合体の形成に伴うダイナミックな構造変化から解き明かし、「metamorphosis 抗体」と独自に定義した新規フォーマットの抗体を設計することを目的とした。我々が独自に開発してきた低分子型 BsAb は、がん細胞との結合後、優れた殺細胞効果を示すが、その詳細なメカニズムはよく分かっていない。本研究では、この異なる分子構造を持つ低分子型 BsAb を用いて、抗原-抗体複合体を形成する過程を熱力学的・タンパク質立体構造学的に解析し、抗体の構造変化と生物活性との相関解析を行い、抗原と結合後に活性が変化する「metamorphosis 抗体」の創製に向けた情報収集を図ることとした。

### 3. 研究の方法

2 種類の分子フォーマットの熱安定性の違いに着目し、プレインキュベートした BsAb を用いて、結合活性および細胞傷害活性との関連について評価を実施した。その結果、熱安定性の向上が EphA10 に対する結合活性の安定化に寄与しているだけでなく、細胞傷害活性の増強に関連していることが判明した。即ち、BsAb を構成する Fv の熱安定性を向上させることができれば、細胞傷害活性の増強に繋がる分子設計が可能になると考えた。そこで本節では、BsAb を構成する  $V_L$ 、 $V_H$  にシステインを導入することで、Fv の安定化が可能となる disulfide-stabilized Fv (dsFv) をもとに、taFv フォーマットから成る抗体誘導体を作製し、熱安定性の向上が BsAb の高機能化に繋がるかについて評価を試みた。

### 4 種類の taFv dsFv 発現ベクターの構築

これまでに構築した taFv (EphA10/CD3)、taFv (EphA10/CD3<sub>IgM</sub>) 遺伝子をもとに、EphA10 もしくは CD3 抗体の  $V_L$ 、 $V_H$  ドメインにそれぞれシステインを導入した計 4 種類の taFv dsFv 発現ベクターの構築を試みた (図 2)。なお、システインの導入箇所に関しては、過去に報告されている文献情報と PDB に登録されている OKT3 Fab の結晶構造をもとに選定した<sup>109-113</sup>。まず、OKT3 の  $V_H$  CDR3 100 位に位置するシステインは、Ig フォールドには関与していないフリーのシステインとなっていることから、dsFv の構築において障害となる可能性を考慮し、1<sup>st</sup> PCR を行うことでセリンへ置換した<sup>114</sup>。次に、各プライマーセットを用いてインバース PCR を行ない、EphA10 および CD3 抗体の  $V_L$  にシステインを導入した。  $V_L$  への変異導入を確認後、同様の操作を行い、 $V_H$  への変異導入を試みた。

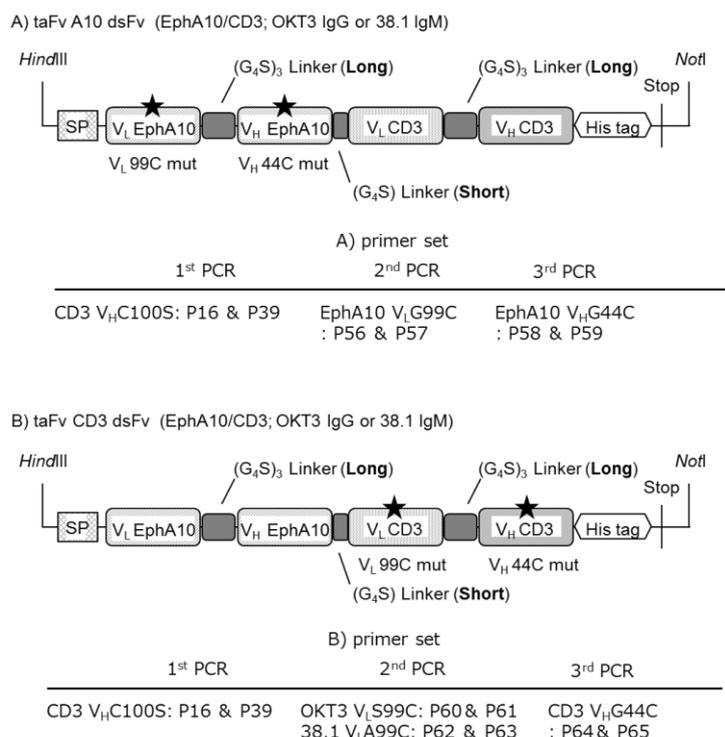


図 2 Gene construct of each taFv-dsFv (A; taFv A10 dsFv (EphA10/CD3, EphA10/CD3<sub>IgM</sub>), B; taFv CD3 dsFv (EphA10/CD3, EphA10/CD3<sub>IgM</sub>)) in plasmid. Black stars mean mutation of a single cysteine residue.

#### 哺乳類発現系を使用した taFv dsFv の調製

構築した 4 種類の taFv dsFv 発現ベクターを用いて、哺乳類発現系による調製を試みた。発現ベクターを導入するためのトランスフェクションの手順 (ExpiFectamine™ 293 Transfection Kit; Life Technologies) ならびに組換えタンパク質を発現させるまでの培養操作は、Invitrogen; Life Technologies のプロトコルに準じた。

まず、HiSpeed Plasmid Kits (QIAGEN) を用いて発現ベクターの大量調製を行った後、300  $\mu$ g の DNA (発現ベクター) ならびに Expifectamin 試薬をそれぞれ Opti-MEM I (Invitrogen; Life Technologies) に懸濁し、5 min 静置した (each final volume; 15 mL)。次に、DNA 溶液とトランスフェクション試薬を含む溶液を混合し (total; 30 mL)、室温で 25~30 min 反応させた。DNA-Expifectamin 混合液は、 $3 \times 10^6$  cell/mL (250 mL medium) の Expi293F 細胞を含む三角フラスコ (1L 容量) に添加後、37°C、8% CO<sub>2</sub> 供給下のインキュベーターで振とう培養を行った。試薬を添加してから 16~18 hr 培養後、キットに含まれるエンハンサー試薬 (1; 15 mL, 2; 1.5 mL) を添加し、さらに 1 week 培養を行った。その後、遠心操作 (4°C, 6,000G, 20 min) により回収した上清画分は、IMAC による粗精製を行い、目的タンパク質が溶出された画分を回収し、ゲルろ過クロマトグラフィーによる最終精製を試みた。各 taFv 型 BsAb の精製度は、SDS-PAGE ならびに Western blot により評価した。

#### TSA による熱安定性評価

調製した taFv CD3 dsFv (EphA10/CD3), taFv CD3 dsFv (EphA10/CD3<sub>IgM</sub>) を用いて、TSA による熱安定性評価を試みた。まず、タンパク質濃度: 0.1~14 mg/mL の範囲内で 1/2 ずつ希釈したサンプル溶液 (20  $\mu$ L) を 7 点調製し、96 well プレートに添加した (各濃度サンプル: n=2, 3)。次いで、各反応液に 1/20 希釈した蛍光試薬 SYPRO Orange (Life Technology S-6650, Ex 472 nm, Em 570 nm) を 1  $\mu$ L 加えた (反応スケール: 21  $\mu$ L/well)。その後、サーマルサイクラー (C1000 Thermal Cycler; Bio-Rad) を用いて、最初に 4°C で 5 min 反応させた後、0.5 °C/10 sec で温度を 90°C まで上昇させていき、継時的に 570 nm の吸光度を測定した。また、各 T<sub>m</sub> 値は、希釈したサンプルで示された値の平均値を記載した。

#### taFv CD3 dsFv (EphA10/CD3), taFv CD3 dsFv (EphA10/CD3<sub>IgM</sub>) の細胞傷害活性評価

調製した taFv CD3 dsFv (EphA10/CD3), taFv CD3 dsFv (EphA10/CD3<sub>IgM</sub>) を用いて、LDH release assay による細胞傷害活性評価を試みた。エフェクター細胞である PBMC は、ターゲットであるがん細胞に対して、E/T=2.5 および 5 となるように添加した。その後 2 日間インキュベ

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{[(\text{experimental release}) - (\text{effector release}) - (\text{target release})]}{[(\text{target maximum release}) - (\text{target release})]} \times 100$$

- target release : ターゲット細胞 (がん細胞)のみから放出されたLDH (0% cytotoxicity)
- target maximum release : Lysis Solutionにより死滅したターゲット細胞 から放出されたLDH (100% cytotoxicity)
- effector release : エフェクター細胞 (PBMC)のみから放出されたLDH
- experimental release: 抗体とPBMCを加えたがん細胞から放出されたLDH

トシ、死細胞から上清中に放出された LDH 量を CytoTox 96 (Promega)により測定し、以下の計算式をもとに、各抗体の細胞傷害率を算出した (Day4)。

#### SPR 法を用いた速度論解析

調製した taFv CD3 dsFv (EphA10/CD3), taFv CD3 dsFv (EphA10/CD3<sub>IgM</sub>)を用いて、EphA10 と CD3 に対する結合特性について SPR 法による速度論解析を試みた。Biacore T200 (GE ヘルスケア・ジャパン)を用いて、2 種類の分子フォーマットから成る BsAb (taFv, scDb)の各標的抗原に対する結合特性について解析を試みた。今回の測定では、センサーチップである CM5 にリガンドとして anti-human Ab を固相化 (9,000~10,000 RU)し、その後、human IgG1 由来の Fc 領域が融合された hEphA10-Fc (R&D Systems; 5 μg/mL, 1 min 添加), hCD3 ε δ -Fc (SINO Biological; 1.6 μg/mL, 1 min 添加)タンパク質を Capture させた。その後、各抗体サンプル (1-240 nM range)をアナライトとして添加する測定系を採用した。また、各結合パラメータは、single kinetics 法により算出し、2-3 回測定したデータの平均値を記載した。ランニング緩衝液には、PBS-EP を使用し、流速 30 μL/s で結合する抗体量を測定した。

#### 4. 研究成果

今回、Fv の熱安定性の向上が期待できる dsFv に着目し、taFv (EphA10/CD3), taFv (EphA10/CD3<sub>IgM</sub>)遺伝子をもとに EphA10, CD3 抗体の V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub> ドメインにそれぞれシステインを導入した計 4 種類の taFv dsFv 発現ベクターを構築し、哺乳類発現系を利用した調製を試みた。その結果、EphA10 抗体のドメインにシステインを導入した taFv A10 dsFv (EphA10/CD3), taFv A10 dsFv (EphA10/CD3<sub>IgM</sub>)では、ゲルろ過クロマトグラフィーによる精製を試みたが、目的タンパク質に相当するピークは認められなかった (図 3 A, C)。これはおそらく、変異導入箇所が適切ではなかったため、Ig フォールドを形成するために必要なシステインを含め、誤ったジスルフィド結合が形成され、タンパク質の発現量が低下してしまったことが原因であると考えている。一方、CD3 抗体のドメインにシステインを導入した taFv CD3 dsFv (EphA10/CD3), taFv CD3 dsFv (EphA10/CD3<sub>IgM</sub>)では、これまでに調製した BsAb と同様に monomer ならびに dimer の形成が認められた (図 3 B, D)。そこで、以降の評価においては、これらの 2 種類の taFv dsFv のみを用いて機能解析を試みた。

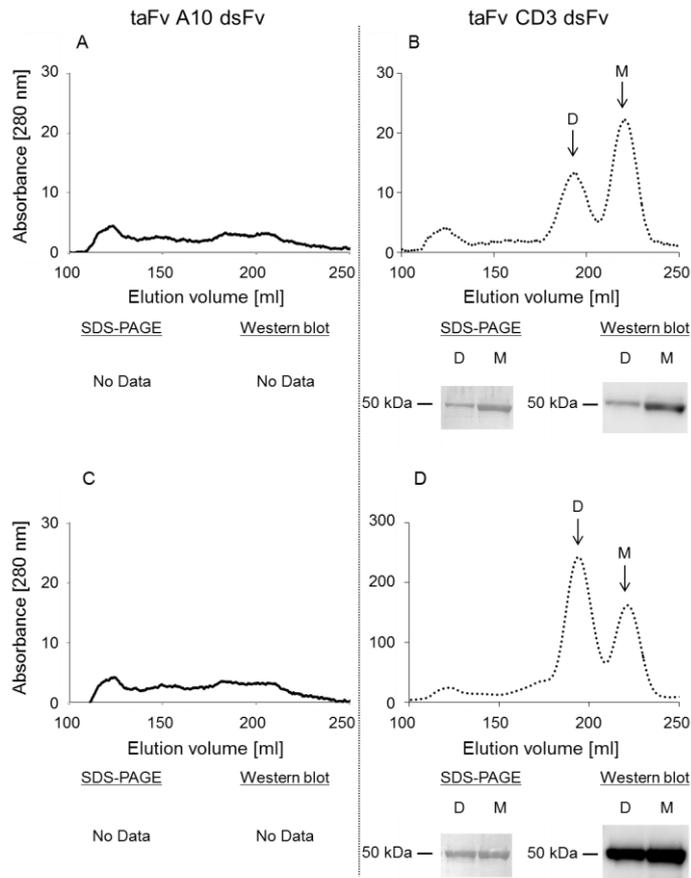


図 3. Characteristics of each taFv dsFv by Gel filtration chromatography profile and SDS-PAGE and Western blot analysis. A; taFv A10 dsFv (EphA10/CD3), B; taFv CD3 dsFv (EphA10/CD3), C; taFv A10 dsFv (EphA10/CD3<sub>IgM</sub>), D; taFv CD3 dsFv (EphA10/CD3<sub>IgM</sub>). The arrow shows molecular size standards with their apparent molecular weights in kiloDalton (kDa). Abbreviations: D is dimer, M is monomer.

次に、調製した2種類の taFv CD3 dsFv (EphA10/CD3), taFv CD3 dsFv (EphA10/CD3<sub>IgM</sub>)を用いて、ジスルフィド結合の導入による熱安定性の向上がみられるか TSA による評価を試みた。その結果、2種類の taFv CD3 dsFv は、ジスルフィド結合を導入する前の taFv (EphA10/CD3), taFv (EphA10/CD3<sub>IgM</sub>)と同様に、2つの T<sub>m</sub> 値が示された。さらに、システインの導入後において、2つのピークの内、より安定性に優れた T<sub>m</sub> 値が、さらに高温側にシフト (3~10°C程度上昇) することが見出され、ジスルフィド結合の導入による安定化が認められた (図4)。今回、2種類の CD3 抗体 (IgG, IgM) のドメインにそれぞれシステインを導入した結果、各 taFv CD3 dsFv においては、いずれも高温側の T<sub>m</sub> 値のシフトが観察されたのに対し、低温側の T<sub>m</sub> 値はほとんど変化がみられなかった。したがって、taFv フォーマットにおいてみられた2つの T<sub>m</sub> 値は、高温側が CD3 抗体の scFv に相当し、低温側が EphA10 抗体の scFv に相当する可能性が高いと考えられた。

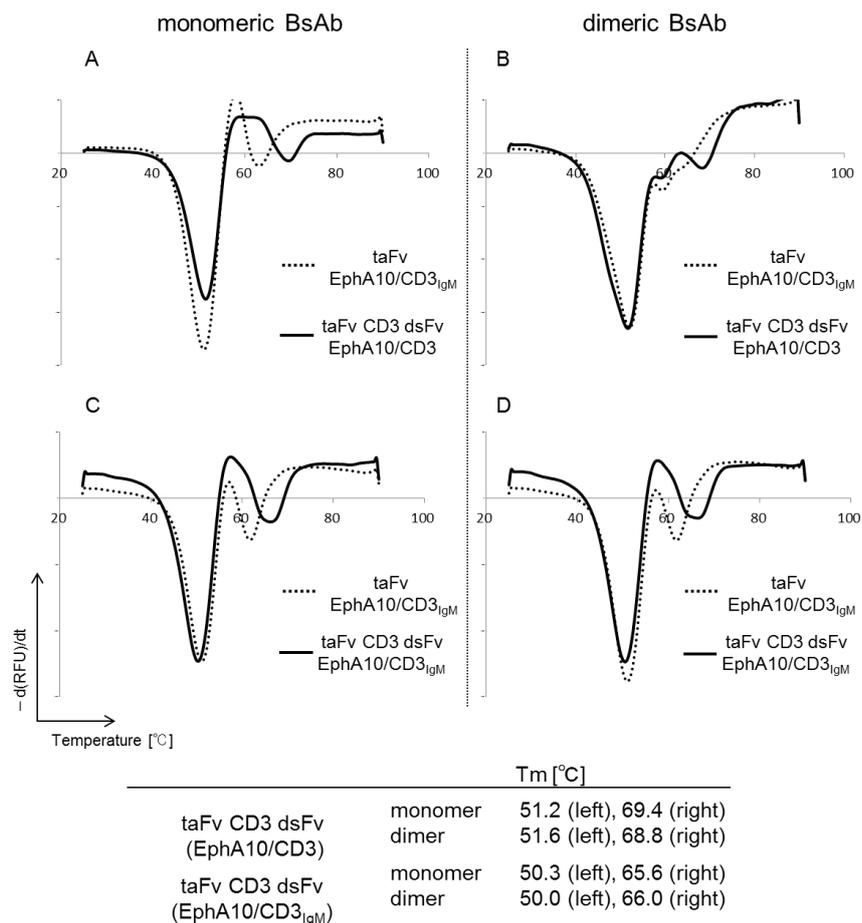


図4 Melting curves of monomeric and dimeric taFv CD3 dsFvs were determined. For taFv CD3 dsFv (EphA10/CD3); A, B, taFv CD3 dsFv (EphA10/CD3<sub>IgM</sub>); C, D melting curves were determined at concentration range of 0.06-1 mg/mL BsAb. taFv CD3 dsFv (EphA10/CD3) and taFv CD3 dsFv (EphA10/CD3<sub>IgM</sub>); Solid line, taFv CD3 dsFv (EphA10/CD3) and taFv CD3 (EphA10/CD3<sub>IgM</sub>); dotted line. The left panel is monomeric BsAbs and the right panel is dimeric BsAbs.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://www.nibiohn.go.jp/bio-r/index.htm>

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	井上 豪  (Inoue Tsuyoshi)  (20263204)	大阪大学・薬学研究科・教授    (14401)	