

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19760548
 研究課題名（和文） 組換え抗体の超活性クラスター構造の解析と高効率調製プロセスの開発
 研究課題名（英文） Analysis on superactive clustering structure of recombinant antibodies and study on its production process with high efficiency
 研究代表者
 浅野 竜太郎 (ASANO RYUTARO)
 東北大学・大学院工学研究科・助教
 研究者番号：80323103

研究成果の概要：研究代表者らは、独自に開発した低分子組換え抗体の調製時に、微量だが強力ながん細胞殺傷能を有する高分子量の分子種が含まれることを、近年明らかにした。本研究は、この構造体の詳細な解析と高効率な調製プロセスの開発を目的に進めた。各種手法を用いた精密解析の結果、高分子は比較的均一な四量体分子であることが明らかになり、またリンカー配列の改変や、大腸菌発現系の検討により、収量を向上させることにも成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：二重特異性抗体, 二重特異性 diabody, 多量体化, クラスター構造, 多価化, がん細胞傷害活性, 表面プラズモン共鳴法, 等温滴定型熱量測定

1. 研究開始当初の背景

二重特異性 diabody は、リンパ球とがん細胞間の架橋効果により特異的な傷害性を誘導する最小構成の二重特異性抗体の1つである。研究代表者は、従来大腸菌内可溶性画分からの調製が常套手段とされてきた diabody に対し、世界で初めて不溶性顆粒から巻き戻し法による調製に成功し、収量の劇的な増加、また精製度、及び調製の簡便性の向上を示してきた (*Protein Eng.*, 13, 583-8 (2000)、*J. Biochem.*, 132, 903-9 (2002).)。様々な抗体可変領域を用いて、あるいは抗腫瘍分子

と融合した diabody を構築するなど、巻き戻しによる調製の実用性を示し (*Cancer Immunol. Immunother.*, 51, 33-44 (2002).)、さらに近年、独自にクローニングした抗 EGFR 抗体と抗リンパ球表面抗原 CD3 抗体を用いて構築した diabody (Ex3) が、非常に低濃度で強力ながん細胞殺傷能を有することを明らかにし、医薬として現実的な展開を示してきた (*Cancer Immunol. Immunother.*, 53, 497-509 (2004))。低免疫原性化を目指したヒト型化にも成功しており、担がんマウスを用いた *in vivo* 治療実験における顕著な効果も確認、既

に臨床応用に向けて着手している (*Clin. Cancer Res.*, **12**, 4036-42 (2006))。

その研究過程で、研究代表者は、調製した Ex3 溶液中に、微量ながら存在する自己集合により多量体化したと思われる分子が極めて高活性を有することを見いだした。100 倍以上の効果を期待させる結果で、多量体化による多価化に起因していると推察した。そこで、そのクラスター構造を同定し、制御、均一な調製プロセスを確立することは、有効性の高い治療薬の調製に向けた意義の高い試みと考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では以上の背景を受けて、強力ながん細胞殺傷効果を誘導する多量体化二重特異性 diabody の均一な調製プロセスの確立を目指し、

(1)、そのクラスター構造の同定、

(2)、均一なクラスター構造の形成を促す最適なリンカー配列の選択、

(3)、クラスター化構造体の詳細機能解析と調製プロセスの実用性の検証、
の観点から研究を進めた。

まず、(1)に関しては、それぞれの標的抗原に対する親和性、結合価数を物理化学的に評価し、質量解析と併せて、そのクラスター構造の同定を試みた。(2)に関しては、リンカー長、及びその構成アミノ酸のランダム化を行い、フェージ提示法を用いて均一なクラスター構造の形成を促す最適なリンカー配列の選択を進めた。(3)に関しては、(2)で得られたクラスター化構造体、即ち多価化をもたらす親和性、安定性、及びがん細胞殺傷能の向上等、機能解析を進めた。

3. 研究の方法

(1) Ex3 のクラスター構造の同定

研究代表者がこれまでに、その組換え体の調製系を確立した Ex3 の 2 つの標的抗原、CD3 と EGFR を用いて表面プラズモン共鳴法を行った結果、多量体画分は二量体画分と比べ両抗原に対し、明らかな親和性の向上が確認された。多量体化により、多価性を獲得したと考えられるが、それぞれ裏付けるために、まず等温滴定型熱量測定により両抗原に対する結合化学量論比等を解析した。また静的光散乱法、動的光散乱法を用いた分光学的解析によっても、その多量体構造を観察し、標的抗原と表面プラズモン共鳴法を用いて、Ex3 の抗原間の架橋能の違いも評価した。さらに、蛍光標識した抗原とフローサイトメトリーからも Ex3 の細胞-抗原間の架橋能を観察した。

(2) Ex3 の均一な多量体分子の形成を促す最適なリンカー配列の選択

Ex3 の多量体形成を促す最適なリンカー配列の選択に向けて、まず抗 EGFR 抗体 528 scFv の多量体化を試みた。過去の報告に基づき、リンカー長を 5 アミノ酸前後から減少させていき、ゲルろ過等により多量体形成を評価した。続いて、これらの知見に基づき、Ex3 の最適リンカーを設計、実際に組換え体を調製し、同様に機能評価を行った。さらに、フェージ提示法を用いた Ex3 の多量体形成を促す最適なリンカー配列の選択に向けた検討も進めた。

(3) クラスター化構造体の詳細機能解析と調製プロセスの実用性の検証

選択により得られた多量体 Ex3 をフローサイトメトリー、細胞傷害試験、表面プラズモン共鳴法等により詳細な機能評価を進めた。一方、これまで Ex3 に関しては主に大腸菌発現、及び巻き戻し法により調製を行ってきたが、医薬化に向けては、適用困難なプロセスも多く含まれる。このため共発現系等、大腸菌の可溶性画分からの調製系の確立を目指すと共に、他の組換え抗体への適用も考慮するなど実用性の検証も行った。

4. 研究成果

(1) Ex3 のクラスター構造の同定

ゲル濾過により分取した二量体画分と多量体画分を標的抗原である CD3 と EGFR に対して等温滴定型熱量測定を行った結果、二量体は両抗原に対し 1 対 1 の結合を示したのに対し、多量体においては 2 対 1 の結合がみられた。これは、多量体画分は四量体構造を形成している可能性を強く示す結果であるといえる。続いて、親 IgG 抗体をコントロールにして、静的光散乱法、動的光散乱法により分子量、及び粒子径を解析した結果、多量体は二量体の約 2 倍の分子量を有していることが分かり、粒子径も妥当な値であるなど、等温滴定型熱量測定の結果を裏付けるものであった。以上の結果から、Ex3 溶液に含まれる多量体画分は均一な四量体で構成されていることが明瞭になった。国内外において、このような二重特異性 diabody 中に含まれる四量体構造分子の精密解析の報告例はなく、意義の高い結果といえる。

一方、これまでに四量体化による細胞傷害活性の向上はみられていたが、さらに複数の解析手法を用いて、その機能の向上を評価した。まず、EGFR をセンサーチップに固定化後、各画分の Ex3 を添加し、さらに CD3 を添加し、表面プラズモン共鳴を測定することで、2 抗原間の架橋能を調べた (図 1)。結果、四量体分子も期待通りの二重特異性を示すことが分かり、また EGFR への結合において、より明確にその多価効果を観察することができ

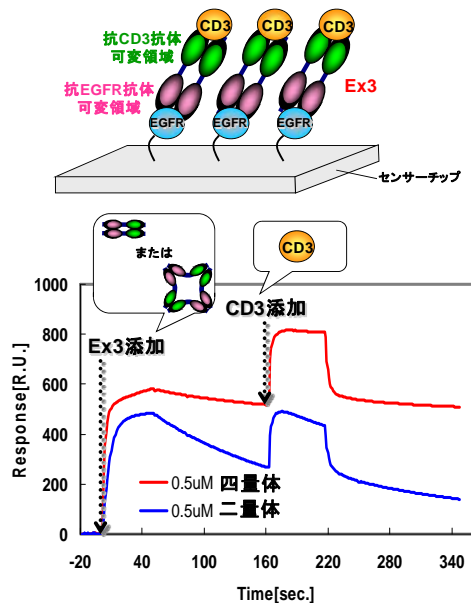


図1 表面プラズモン共鳴法による解析

た。さらに、EGFR を蛍光標識して、CD3 陽性細胞に対するフローサイトメトリーを行った結果、本手法からも、クラスター化により2細胞間の架橋能が向上するという結果を得ることができた。この四量体分子は、今後、がん治療薬としての展開に大いに期待がもたれる。

(2) Ex3 の均一な多量体分子の形成を促す最適なリンカー配列の選択

Ex3 の多量体形成を促すリンカー配列の選択に向けて、まずモデルケースとして抗 EGFR 一本鎖抗体 (scFv) の多量体化から進めた。リンカー長、及び配向性を変化させ、ゲルろ過により評価を行ったところ、リンカー長の短縮に伴う scFv の多量体化を観察することができた。そこで、これらの知見に基づき、Ex3 のリンカーの検討も行ったところ、配向性を変化させ、リンカーを除去することで四量体を主とする分子の構築に成功した。また Ex3 そのものの活性を著しく向上させる分子も得ることができた。以上の結果から、リンカーの改変による多量体分子の形成の遷移が確認できたため、続いてファージ提示法を用いた最適なリンカー配列の選択に向けた検討を行った。前述のように抗 EGFR scFv をモデルにリンカー配列をランダム化して、生細胞パニングにより、高親和性クローンの選択を行った。結果、条件検討を重ねることで、多量体の形成をもたらすリンカー配列の取得に成功したため、同様に Ex3 のリンカーをランダム化したライブラリの調製を進めた。Ex3 は2種のヘテロ scFv から構成されるため、それぞれ個別にライブラリを構築後、その規模を極力担保した新規共発現ベクターを製作した。アンバーコドンを組み込むことで、コートタンパク質との融合によるファージ

提示と大腸菌における単独分子としての発現能を兼ね備えており、大変魅力的なベクターである。今後、本ベクターを用いて同様に生細胞パニングを用いることで、より付加価値の高いリンカー配列の選択に期待がもたれる。

(3) クラスター化構造体の詳細機能解析と調製プロセスの実用性の検証

上述の検討により調製された各種クラスター化 Ex3 の詳細な機能解析を進めた。結合活性をフローサイトメトリーにより、がん細胞傷害活性を MTS assay により評価した結果、多量体化、および配向性に応じた結合活性とがん細胞殺傷能の変化が観察された。さらに、巻き戻し法を用いない調製プロセスの開発を目指して、発現ベクター、宿主、培養条件等をそれぞれ検討した結果、可溶性画分から従来の調製法と同等の活性を有する Ex3 の調製に成功した。また他の分子種への適用も可能であったことからその実用性も示せたといえる。

二重特異性 diabody に関する研究は、主に国外で進められているが (*Cancer Res.*, **60**, 4336-41 (2000) など)、2008 年によく国外で 1 例だけ臨床試験に進んだ。しかし動物細胞を用いて調製しているため、その収量には限界があり、また天然の抗体とは異なり、標的抗原に対し、一価で結合せざるを得ないことに起因する親和性の低下や、低分子量化によるクリアランスの早さが、今後問題となってくると予想される。本研究で考察を進めた、クラスター化 Ex3 は、これらの問題を回避できる可能性を大いに有している。一方で、上述の臨床試験の結果は良好であることから、研究の方向性として、勇気づけられる結果であるといえ、今後の展開に大いに期待がもたれるといえる。

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 9 件)

- ① 熊谷 泉, 浅野竜太郎, 次世代抗体医薬の分子設計. ケミカルエンジニアリング, **54**, 65-71 (2009) 査読無
- ② Asano R., Kawaguchi H., Watanabe Y., Nakanishi T., Umetsu M., Hayashi H., Katayose Y., Unno M., Kudo T., Kumagai I., Diabody-based recombinant formats of humanized IgG-like bispecific antibody with effective retargeting of lymphocytes to tumor cells. *J. Immunother.*, **31**, 752-761 (2008) 査読

- 有
- ③ Asano R., Sone Y., Ikoma K., Hayashi H., Nakanishi T., Umetsu M., Katayose Y., Unno M., Kudo T., Kumagai I., Preferential heterodimerization of a bispecific diabody based on a humanized anti-EGFR antibody 528., *Protein Eng. Des. Sel.*, **10**, 597-603 (2008) 査読有
 - ④ Hattori T., Umetsu M., Nakanishi T., Tsumoto K., Ohara S., Abe H., Naito M., Asano R., Adschiri T., Kumagai I., Grafting of material-binding function into antibodies Functionalization by peptide grafting., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **365**, 751-757 (2008) 査読有
 - ⑤ Makabe K., Nakanishi T., Tsumoto K., Tanaka Y., Kondo H., Umetsu M., Sone Y., Asano R., Kumagai I., Thermodynamic consequences of mutations in Vernier zone residues of a humanized anti-human epidermal growth factor receptor (EGFR) murine antibody, 528. *J. Biol. Chem.*, **283**, 1156-1166 (2008) 査読有
 - ⑥ 熊谷 泉, 浅野竜太郎, リンパ球とがん細胞を認識するヒト型化二重特異性抗体. *Drug Delivery System*, **23**, 518-525 (2008) 査読無
 - ⑦ Akamatsu N., Yamada Y., Hasegawa H., Makabe K., Asano R., Kumagai I., Murata K., Imaizumi Y., Tsukasaki K., Tsuruda K., Sugahara K., Atogami S., Yanagihara K., Kamihira S., High IL-21 receptor expression and apoptosis induction by IL-21 in follicular lymphoma. *Cancer Lett.*, **256**, 196-206 (2007) 査読有
 - ⑧ Asano R., Watanabe Y., Kawaguchi H., Fukazawa H., Nakanishi T., Umetsu M., Hayashi H., Katayose Y., Unno M., Kudo T., Kumagai I., Highly effective recombinant format of a humanized IgG-like bispecific antibody for cancer immunotherapy with retargeting of lymphocytes to tumor cells. *J. Biol. Chem.*, **282**, 27659-27665 (2007) 査読有
 - ⑨ Nagamine K., Onodera S., Kurihara A., Yasukawa T., Shiku H., Asano R., Kumagai I., Matsue T., Electrochemical screening of recombinant protein solubility in *Escherichia coli* using scanning electrochemical microscopy (SECM). *Biotechnol. Bioeng.*, **96**, 1008-1013

(2007) 査読有

[学会発表] (計 15 件)

- ① 浅野竜太郎, 低分子二重特異性抗体の新規調製法の開発, BMB2008(第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会), 2008 年 12 月 9 日, 神戸
- ② 萩原康世, 抗 EGFR 一本鎖抗体の多量体化とがん治療に向けた機能評価, BMB2008(第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会), 2008 年 12 月 9 日, 神戸
- ③ 階上健太郎, 低分子抗体の多価化設計と物理化学的相互作用解析, BMB2008(第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会), 2008 年 12 月 9 日, 神戸
- ④ 田中 翔, tandem scFv 型二重特異性抗体の巻き戻しによる調製法の検討, BMB2008(第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会), 2008 年 12 月 9 日, 神戸
- ⑤ 浅野竜太郎, Efficacy of humanized IgG-like bispecific antibodies for cancer immunotherapy with EGFR and CD3 retargeting, 第 67 回 日本癌学会学術総会, 2008 年 10 月 29 日, 名古屋
- ⑥ 浅野竜太郎, 動物細胞を用いた高機能性組換え型治療抗体の調製と機能評価, 第 60 回 日本生物工学会大会, 2008 年 8 月 28 日, 仙台
- ⑦ 浅野竜太郎, 低分子二重特異性抗体の高活性クラスター構造解析, 第 8 回 日本蛋白質科学会年会, 2008 年 6 月 11 日, 東京
- ⑧ 浅野竜太郎, EGFRとCD3 を標的とした高機能な二重特異性抗体の形態, BMB2007(第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会), 2007 年 12 月 11 日, 横浜
- ⑨ 田原和浩, フェージ提示法を用いた高親和性 EGFR 特異的抗体の選択, BMB2007(第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会), 2007 年 12 月 11 日, 横浜
- ⑩ 石山優奈, がん治療を目指した IgG 様二重特異性抗体の高機能化, BMB2007(第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会), 2007 年 12 月 11 日, 横浜
- ⑪ Ryutaro Asano, Efficacy of Humanized IgG-like Bispecific Antibody Formats in Cancer Immunotherapy, *Antibodies - Europe*, 2007 年 11 月 7 日, Wien
- ⑫ Kazuhiro Tahara, Affinity Maturation of the Humanized Anti-EGFR Antibody

Fragment by Phage Display, Antibodies
-Europe, 2007年11月7日, Wien

- ⑬ 渡邊志緒美, 生体分子の自己組織化能
を利用した低分子抗体の高機能化, 第
22回生体機能関連化学シンポジウム,
2007年9月29日, 仙台
- ⑭ 萩原康世, ジスルフィド安定化 diabody
の構築に向けた検討, 第7回日本蛋白質
科学会年会, 2007年5月26日, 東京
- ⑮ 田中 翔, Tandem scFv型二重特異性抗
体の大腸菌発現系を用いた調整と機能
評価, 第7回日本蛋白質科学会年会,
2007年5月26日, 東京

[図書] (計1件)

- ① 熊谷 泉, 浅野竜太郎, 中西 猛, シー
エムシー出版, 抗体ドメインの積み木
細工による高機能化と医用への展開(抗
体医薬の最前線), 3-13 (2007)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

- ① 名称: 多量体化低分子抗体
発明者: 熊谷 泉, 浅野竜太郎, 梅津光央
権利者: 国立大学法人東北大学
種類: 特許
番号: 特願 2008-292894 号
出願年月日: 2008年11月17日
国内外の別: 国内
- ② 名称: 組換え型ポリペプチドの製造方法
発明者: 熊谷 泉, 浅野竜太郎, 中西 猛,
梅津光央
権利者: 国立大学法人東北大学
種類: 特許
番号: 特願 2008-126612 号
出願年月日: 2008年5月14日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅野 竜太郎 (ASANO RYUTARO)
東北大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 80323103

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし