

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：37401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16434

研究課題名(和文) FabエンジニアリングによるADAs産生抑制に関する研究基盤の確立

研究課題名(英文) The establishment of a research platform for the depression of ADAs production by Fab engineering.

研究代表者

中村 仁美 (Nakamura, Hitomi)

崇城大学・薬学部・講師

研究者番号：60510691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：抗体医薬品の有効性と安全性を確保する上で、抗薬物抗体(anti-drug antibodies, ADAs)の産生を抑えることが望ましい。我々は抗原蛋白質の安定化がそれに対する抗体産生を抑制することを報告している。この知見がADAs産生抑制のための抗体エンジニアリングに応用できるか検証するため、これまでのモデル蛋白質よりも複雑な構造をもつ抗体フラグメントFabについて安定性と抗体産生の相関性について調べた。フレームワーク領域への疎水性アミノ酸の導入によりFabの安定化体作製に成功し、野生型と安定化体を用いた免疫実験等の結果から、安定性の高いFabほど抗体産生が抑えられる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体医薬品は、がんや自己免疫疾患の治療に欠かせない存在となっており、今後も市場規模の拡大が予想されている。抗体医薬品はその性質上、ADAs産生の問題が避けられず、これを評価するための研究が活発に行われている一方で、抗体そのものの改変によるADAs産生抑制に関する報告はまだ少ない。本研究課題ではFabの安定化デザインに加えて、これまでに我々が基礎研究で見出してきた知見をADAs産生抑制へと応用できる可能性が示され、抗体医薬品の有効性と安全性の確保に貢献できるのではないかと考えている。

研究成果の概要(英文)：Depression of anti-drug antibodies (ADAs) production is an important issue for the efficacy and safety of therapeutic antibodies. We previously reported that the structural stabilization of protein antigens leads to depression of the antibody production. In this study, we examined the correlation between conformational stability of protein and the amount of antibody production against antigen in mice using Fab to prove whether our findings are applied to engineered Fab. The Fab was successfully stabilized by introducing hydrophobic amino acids in the framework region, and the results of the immunization experiment with wild-type and mutated Fabs suggested that the more stable Fab tended to depress the antibody production.

研究分野：蛋白質工学、生化学

キーワード：ADAs Fab 安定化 フレームワーク領域

## 1. 研究開始当初の背景

抗体医薬品は少ない副作用で優れた治療効果を発揮することができ、がんや自己免疫疾患の治療に欠かせない存在となっている。本研究開始当初に世界で承認されていた抗体医薬品は約70品目だったが、現在ではその数が100品目を超えており、アンメットメディカルニーズを満たす医薬品として今後も市場規模の拡大が予想される。抗体医薬品の有効性と安全性を確保する上で、抗薬物抗体 (Anti-Drug Antibodies, ADAs) の問題を避けて通ることはできない。患者体内で ADAs が産生されてしまうと、ADAs によるクリアランスの増加、あるいは抗体医薬品の機能部位への結合による治療効果の減弱などが起こる。バイオテクノロジーの進展によりヒト抗体を医薬品として使用できるようになったため、この問題は解決できたかにみえたが、アダリムマブなどの完全ヒト抗体医薬品において ADAs の産生が報告されるようになった (Harding *et al.* mAbs 2010)。そのため、抗体医薬品の ADAs 評価系に関するさまざまな研究が展開されている一方で、ADAs 産生を抑えるためのさらなる抗体エンジニアリングに関する報告はまだ少ないのが現状である。

## 2. 研究の目的

リゾチームやアレルゲンといった比較的コンパクトな蛋白質をモデルとして、抗原蛋白質の構造安定性が高いほど免疫原性が抑制されることを報告している (Ohkuri *et al.* J. Immunol. 2010, Nakamura *et al.* BBA 2016)。より複雑な構造を持つ抗体にもこの知見を応用できるかは明らかになっていないが、もし応用可能であれば、抗体医薬品の安定化が免疫原性を低減させる手法のひとつになると考えられる。近年、抗体フラグメント Fab (Y字型をしている抗体の2本の手の部分) の安定化が抗体分子全体の安定化につながる可能性が示唆されており (Brader *et al.* Mol. Pharm. 2015)、また、当研究室には酵母 *Pichia pastoris* を用いて Fab を発現させるノウハウがある。そこで本研究課題では、Fab をモデル蛋白質として Fab の安定性と免疫原性の相関性について調べることにした。

## 3. 研究の方法

### (1) Fab 野生型の調製

当研究室で取得したマウス IgG 抗体の  $V_H$  (H鎖可変領域) と  $V_L$  (L鎖可変領域)、ヒト抗体医薬品由来の  $C_H1$  (H鎖定常領域) と  $C_L$  (L鎖定常領域) を連結したキメラ Fab をモデル蛋白質として新たに作製するため、 $V_H+C_H1$  (IgG1 サブクラス) 遺伝子と  $V_L+C_L$  遺伝子の全合成を行った。さらに  $V_H+C_H1$  (IgG1 サブクラス) 遺伝子を鋳型に変異導入 PCR を行い、 $C_H1$  を IgG1 から IgG4 に変更した H鎖遺伝子を作製した。また、 $V_H+C_H1$  遺伝子の3'側にはヒスタグを付加するためのコドンを追加した。キメラ Fab 野生型発現酵母株の作製と大量培養は既報 (Nakamura *et al.* BBRC 2018) に従って行った。酵母培養上清に分泌された Fab を硫酸アンモニウムにより回収後、精製法の検討を行った。

### (2) Fab 変異体のデザインと調製

Fab 安定化体の作製を目指して、ヒト抗体由来の定常領域とマウス抗体由来の可変領域でそれぞれ異なるアプローチでの変異体デザインを行った。すなわち、定常領域については分子内部に疎水性アミノ酸を導入する cavity filling での安定化デザインを行った。一方、可変領域については abYsis (<http://www.abysis.org/abysis/index.html>) での解析結果をもとに、アミノ酸の出現頻度に着目して変異導入部位を決定した。各種 Fab 変異体発現酵母株の作製と大量培養および精製は野生型と同様に行った。

### (3) Fab 野生型および変異体の安定性評価

熱安定性を測定するため、Fab 精製品を 0.05 M リン酸緩衝液 (pH6.5) に置換し DSC (示差走査熱量測定) を行った。

### (4) Fab の構造安定性が抗体産生に与える影響

マウス (Jcl:ICR) 1匹あたりの投与量が 15  $\mu$ g/100  $\mu$ l となるように、PBS に置換した Fab 野生型と安定化体をそれぞれアジュバント (TiterMax Gold) と 1:1 で混合してエマルジョンを作製し皮下投与を行った。4週間後に尾静脈から採血し、各 Fab を固相化した 96 ウェルプレートを用いて ELISA を行い、血漿中に含まれる抗 Fab 抗体量を測定した。また、免疫実験に使用した Fab のプロテアーゼ耐性を比較するため、Fab 精製品を 0.01 M Tris-HCl (pH7.8) に置換したのち、プロテイナーゼ K での消化実験 (50°C) を行った。消化 1、2、4 時間後にサンプリングし、10%酢酸を添加して酵素消化を止めたのち SDS-PAGE を行い、未消化体の残存量を比較した。

## 4. 研究成果

### (1) Fab 野生型の調製

本研究課題で作製した Fab は、最終的にマウスに投与してその免疫原性を評価したいので、当研究室で取得したマウス IgG 抗体由来の Fab をキメラ化したものをモデル蛋白質として用いることとした (図 1)。また、現在承認されている抗体医薬品の大部分が IgG1 であることから、まずは C<sub>H</sub>1 が IgG1 サブクラスのものを作製した。当初は L 鎖に対してアフィニティを示す Protein L と陰イオン交換カラム RESOURCE Q を用いた 2 段階での精製を行っていたが、この方法で得られた精製品の大部分は L 鎖二量体であることを示唆する実験結果が得られたため、精製法の見直しを行った。検討の結果、Fab の H 鎖 C 末端にヒスタグを付加し、これにアフィニティを示す Ni カラムでの精製を追加した 3 段階のカラムクロマトグラフィーにより Fab 野生型の精製品を得ることに成功した。図 2 には最終精製段階の RESOURCE Q 溶出パターンと溶出容積 20 ml 付近のピークを用いて行った SDS-PAGE の結果を示す。非還元条件 (NR) では Fab の分子量に相当する 48,000 付近に 1 本、還元条件 (R) では H 鎖と L 鎖に由来する 2 本のバンドが現れ、Fab 野生型の精製品であることを確認した。

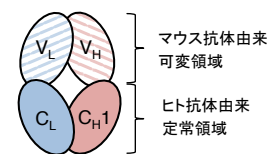


図 1 本研究課題で作製したキメラ Fab

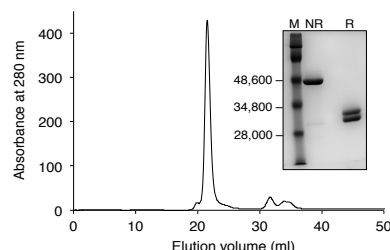


図 2 RESOURCE Q 精製時の溶出パターンと精製確認 M はサイズマーカー、NR は非還元、R は還元条件を表す。

### (2) Fab 変異体のデザインと調製

#### ① 定常領域をターゲットとした変異体

マウス IgG1 Fab の C<sub>H</sub>1/C<sub>L</sub> 境界面に位置する cavity に疎水性アミノ酸を導入することで安定化したとの報告がある (Teerinen *et al.* JMB 2006)。この論文の変異部位は、本研究課題のキメラ Fab の場合、アミノ酸配列のアライメントから L 鎖の Gln164 と Thr182 に相当することがわかった。SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) を用いてキメラ Fab のホモロジーモデリングを行った結果、ヒト抗体由来の定常領域に位置する Gln164 と Thr182 もマウス IgG1 Fab と同様に C<sub>H</sub>1/C<sub>L</sub> 境界面に位置することがわかった (data not shown)。そこで、この 2 か所をより疎水性の高いアミノ酸に置換し、cavity filling による安定化を目指した変異体 Q164F/T182V をデザインした。この変異体を酵母で発現させ、野生型と同様の手順で精製品を得ることに成功した。

#### ② 可変領域をターゲットとした変異体 (V<sub>H</sub> 変異体)

H 鎖および L 鎖可変領域のアミノ酸配列を abYsis で解析したところ、H 鎖フレームワーク領域 (FR) に位置する Ile11 と Thr84 は、その部位における出現頻度が 1% 未満の unusual residue であることがわかった。11 番目は Leu の出現頻度が 71% と最も高く、84 番目は Leu が 47%、Met が 41% と同程度の出現頻度となっていた。アミノ酸の側鎖構造や 11 番目と 84 番目の立体構造上の位置から、いずれも出現頻度が高いアミノ酸に置換することで疎水性相互作用の増強により安定化すると考えられた。そこで 5 種類の V<sub>H</sub> 変異体 I11L、T84L、T84M、I11L/T84L、I11L/T84M をデザインし、酵母で発現させたのち、野生型と同様の手順で精製品を得ることに成功した。

### (3) Fab 野生型および変異体の安定性評価

Fab 野生型と変異体の安定性を比較するために DSC を行い、安定性の指標である変性中点温度 (T<sub>m</sub>) を算出した。なお、I11L 変異体は他の V<sub>H</sub> 変異体と比べて精製品の収量が 1/10 程度と少なかったため、DSC は行わなかった。通常、Fab の DSC 曲線は単一のピークを示すが、今回新たに作製したキメラ Fab 野生型の DSC 曲線は 60°C 付近で変性が始まったのち高温側に肩を持つような曲線となり (図 3a)、T<sub>m</sub> 値はそれぞれ 65.7°C、72.3°C だった (表 1)。この結果は想定外のものだったが、今回作製したキメラ Fab の可変領域と定常領域の組み合わせが影響したものと考えられる。定常領域に疎水性アミノ酸を導入した Q164F/T182V 変異体では低温側の T<sub>m</sub> 値はほとんど変化しなかったのに対し、高温側の T<sub>m</sub> 値は野生型と比較して 4.8°C 上昇した (図 3b、表 1)。野生型とこの変異体の DSC の結果から、低温側ピークは可変領域、高温側ピークは定常領域のものであると考えられ、C<sub>H</sub>1/C<sub>L</sub> 境界面に導入した疎水性アミノ酸は、期待通りに定常領域の安定化には寄与したものの、もともと安定性が低かった可変領域までは影響が及ばなかったと考察している。次に 4 つの V<sub>H</sub> 変異体は、

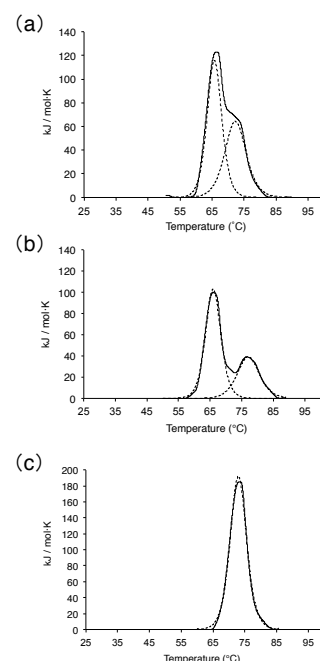


図 3 DSC による熱安定性測定 (a) 野生型 (b) Q164F/T182V (c) I11L/T84L (G1) 実線は real data, 点線は fitting curves を示す。

いずれも変性開始温度が 65°C 付近にシフトして DSC 曲線は単一のピークとなり (図 3c)、4 変異体の T<sub>m</sub> は 72.1~73.0°C の値を示した (表 1)。V<sub>H</sub> 変異体は、疎水性相互作用の増強で可変領域が安定化したことで Fab 全体の構造安定性が変化し、DSC における挙動も変化したと考察している。また、IgG4 サブクラスのキメラ Fab の調製系構築も進めたが、野生型は収量が低かったため、H 鎖 FR に I11L/T84L 変異を導入した Fab のみ DSC を行ったところ、DSC 曲線は単一のピークを示し、T<sub>m</sub> は 71.2°C だった (表 1)。以上のように、可変領域と定常領域で異なるアプローチで変異体デザインを行った結果、アミノ酸の出現頻度をもとにしたフレームワーク領域への変異導入が Fab 分子内で特に安定性が低かった可変領域の安定化につながり、Fab 安定化体の作製に成功した。

表 1 Fab 野生型および変異体の T<sub>m</sub> (°C)

	T <sub>m</sub> (°C)	サブクラス
野生型	65.7, 72.3	
Q164F/T182V	66.0, 77.1	
T84L	72.1	IgG1
T84M	72.1	
I11L/T84L	73.0	
I11L/T84M	72.4	
I11L/T84L	71.2	IgG4

#### (4) Fab の構造安定性が抗体産生に与える影響

抗体産生までの一連のプロセスのうち、我々は抗原蛋白質がリソソーム内でペプチド断片に消化される過程に着目している。構造安定性が高い抗原蛋白質ほど変性状態への移行が抑えられるため、プロテアーゼ消化を受けにくくなる。つまり、ペプチド断片の生成が低く抑えられることから抗原提示も抑えられ、最終的に抗体産生の抑制につながるのではないかと考えている。研究成果 (1) ~ (3) で作製したキメラ Fab のうち、野生型 (G1)、I11L/T84L 変異体 (G1)、I11L/T84L 変異体 (G4) のプロテアーゼ耐性を比較したところ、消化 4 時間後の未消化体の残存量は、野生型 (G1) < I11L/T84L 変異体 (G4) < I11L/T84L 変異体 (G1) の順になっており、Fab の安定性と相関のある結果になった (図 4)。この 3 つの Fab をそれぞれマウスに投与した時の免疫原性を比較した結果、安定性が高い

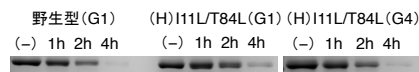


図 4 プロテアーゼ消化実験

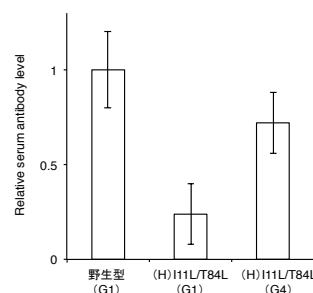


図 5 抗体価測定

Fab ほど、それに対する抗体産生量が抑えられる傾向が見られ (図 5)、プロテアーゼ消化実験の結果とも相関していた。これまでの研究で用いてきたモデル蛋白質と異なり、Fab はヘテロ二量体のより複雑な構造をとっているが、Fab においても安定性と抗体産生量に相関性がある可能性が示唆された。今回の免疫原性の検証は抗原として用いた Fab 変異体の種類や投与量などが限られているため、今後さらなる検討を重ねる必要があると考えているが、ADAs 産生抑制のための今後の Fab エンジニアリング研究の基盤となる知見が得られたと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hitomi Nakamura, Moeka Yoshikawa, Naoko Oda-Ueda, Tadashi Ueda, Takatoshi Ohkuri	4. 巻 11
2. 論文標題 A comprehensive analysis of novel disulfide bond introduction site into the constant domain of human Fab	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12937
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-92225-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hitomi Nakamura, Masato Kiyoshi, Makoto Anraku, Noritaka Hashii, Naoko Oda-Ueda, Tadashi Ueda, Takatoshi Ohkuri	4. 巻 169
2. 論文標題 Glycosylation decreases aggregation and immunogenicity of adalimumab Fab secreted from <i>Pichia pastoris</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 435 ~ 443
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvaa116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hitomi Nakamura, Makoto Anraku, Naoko Oda-Ueda, Tadashi Ueda, Takatoshi Ohkuri	4. 巻 43
2. 論文標題 C-Terminal Cysteine PEGylation of Adalimumab Fab with an Engineered Interchain SS Bond	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 418 ~ 423
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b19-00612	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tomohisa Ogawa, Naoko Oda-Ueda, Kanako Hisata, Hitomi Nakamura, Takahito Chijiwa, Shousaku Hattori, Akiko Isomoto, Haruki Yugeta, Shinichi Yamasaki, Yasuyuki Fukumaki, Motonori Ohno, Noriyuki Satoh, Hiroki Shibata	4. 巻 11
2. 論文標題 Alternative mRNA Splicing in Three Venom Families Underlying a Possible Production of Divergent Venom Proteins of the Habu Snake, <i>Protobothrops flavoviridis</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 581 ~ 581
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/toxins11100581	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村仁美、吉川萌香、上田直子、植田正、大栗誉敏
2. 発表標題 抗体医薬品Fabの酵母 <i>Pichia pastoris</i> を用いた調製
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉川萌香、中村仁美、上田直子、植田正、大栗誉敏
2. 発表標題 ジスルフィドスキャンによるアダリムマブFabの分子間SS結合導入部位のデザインと酵母による変異体の作製
3. 学会等名 第94回日本生化学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉川萌香、中村仁美、上田直子、植田正、大栗誉敏
2. 発表標題 定常領域における分子間S-S結合導入によるアダリムマブFabの安定性と結合活性への影響
3. 学会等名 令和3年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村仁美、吉川萌香、上田直子、植田正、大栗誉敏
2. 発表標題 ヒト型Fab定常領域への新規SS結合導入部位の網羅的解析
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村 仁美、大栗 誉敏、服部 正策、上田 直子
2. 発表標題 ハブ毒筋壊死因子に対するモノクローナル抗体の中和作用と抗体フラグメントFabの調製
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 仁美、木吉 真人、安楽 誠、上田 直子、植田 正、大栗 誉敏
2. 発表標題 ヒト型Fab定常領域への糖鎖配列の導入と糖鎖が及ぼす影響
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川 智久、長内 宏典、上田 直子、久田 香奈子、中村 仁美、千々岩 崇仁、服部 正策、磯本 明子、山崎 真一、服巻 保幸、大野 素徳、佐藤 矩行、柴田 弘紀
2. 発表標題 ハブベノミクス研究から明らかとなった毒タンパク質の多様化機構と新規機能
3. 学会等名 第66回トキシシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 弓削田 春貴、中村 仁美、上田 直子、柴田 弘紀、田中 良和、小川 智久
2. 発表標題 ハブ毒中のエクソソームは、毒の加速進化に関わっているのか？
3. 学会等名 第66回トキシシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 仁美、上田 直子、植田 正、大栗 誉敏
2. 発表標題 分子間SS結合を有したFabのC末端特異的PEG修飾体の調製
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉川 萌香、財津 佑衣、中村 仁美、上田 直子、植田 正、大栗 誉敏
2. 発表標題 ヒト抗体Fabの定常領域へのアミノ酸変異による新規分子間SS結合の導入
3. 学会等名 日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関