

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 4 月 5 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16403

研究課題名（和文）プロテオームデータに基づく細胞組成解析手法の開発と胃がん治療効果予測への応用

研究課題名（英文）Development of a proteome-based cell-type deconvolution method and its applicability to treatment effect prediction for gastric cancer

研究代表者

伊藤 寿宏 (Ito, Toshihiro)

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 プロテオームリサーチプロジェクト・特任研究員

研究者番号：40806593

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）：本研究では、止血因子のキャリアタンパク質であるVWFを特異的に切断する酵素であるADAMTS13の過剰活性により生じる出血症の治療を目的として、抗マウスADAMTS13抗体A10とヒト抗体の組み換えによりヒト化A10抗体を作製した。抗体のカイネティクス解析の結果から、作製されたヒト化A10抗体はマウスA10抗体と比較しても遜色のない結合活性を有することが確認された。また、バイオインフォマティクス解析による抗体の立体構造予測の結果から、ヒト化A10抗体の相補性決定領域の立体構造が高度に保存されていたことから、抗体親和性に関与する領域の構造類似性が抗体の活性に影響することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植込型左室補助心臓（LVAD）を用いた治療において、ADAMTS13の過剰活性により生じる出血合併症は、同治療を実施している臨床現場において重篤な合併疾患として認識されているものの、有効な治療法は未だ確立されていない。本研究では、既存の抗マウスADAMTS13抗体A10の臨床応用を目的としてヒト化A10抗体を作製した。LVADを用いた治療の症例は増加傾向にあることから、作製したヒト化抗体の臨床応用を目指している本研究の社会的意義は極めて高いといえる。また本研究では、抗原-抗体結合の分子機序を抗体の構造類似性の観点から検証したことから、関連する研究分野において新たな知見を提供することができた。

研究成果の概要（英文）：ADAMTS13 is an enzyme that specifically cleaves the blood clotting factor-carrier protein VWF, and its overactivation causes excessive cleavage of the VWF, resulting in a bleeding disorder. To develop a therapeutic agent for the ADAMTS13-related bleeding disorder, we constructed humanized antibodies of mouse anti-ADAMTS13 antibody A10 (mA10) and assessed the binding affinity in vitro. The results indicated that the humanized antibodies show the comparable binding activity to mA10. To compare the antibody structures, we performed antibody structure modeling and structural similarity analysis in silico. As a result, the humanized antibodies showed higher structural similarity to mA10, and particularly retained the original conformation in the complementarity-determining region, suggesting that the structural similarity of the region affects the binding activity in the antibody humanization.

研究分野：医薬品工学

キーワード：抗体医薬 ヒト化抗体 バイオインフォマティクス

1. 研究開始当初の背景

ADAMTS13 (A disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type-1 motif 13) は止血因子であるフォンウィルブランド因子 (von Willebrand factor: VWF) を特異的に切断する酵素であり、血管内において VWF 依存性血小板凝集を抑制している (Zheng, X. L. *Annu. Rev. Med.* 2015)。一方で、植込型左室補助心臓 (Left ventricular assist device: LVAD) を用いた治療において、植込型 LVAD のポンプ圧力から発生した高張り応力により ADAMTS13 が過剰活性化し、VWF の過剰切断による出血を呈する。こうした出血の合併症は後天性フォンウィルブランド症候群 (Acquired von Willebrand syndrome: AVWS) と呼ばれ、急性心不全治療における機械的補助循環で高頻度に認められている (Uriel, N. *et al. J. Am. Coll. Cardiol.* 2010)。我が国における植込型 LVAD を用いた症例の増加に伴い、AVWS は植込型 LVAD 治療における重篤な出血合併症として広く認識され始めているものの、AVWS に対する有効な治療法は未だ確立されていない。

2. 研究の目的

本研究では AVWS 治療法の開発を目的として、抗マウス ADAMTS13 抗体 A10 を用いた治療用抗体の作製を行った。具体的には、Complementarity determining region (CDR) グラフティング法 (Jones, P. T. *Nature* 1986) と呼ばれるマウスなどの動物抗体由来の CDR をヒト抗体に移植することによりヒト化抗体を作製する手法を用いて、ヒト抗体 8A7 および 16E8 とマウス A10 抗体を組み換えることによってヒト化抗体 A10/8A7 および A10/16E8 を作製し、その結合活性および阻害活性を *in vitro* で評価した。また、ADAMTS13 に対するマウス A10 抗体とヒト化 A10 抗体の結合活性の違いを抗体立体構造の観点から評価するために、それぞれの抗体のアミノ酸配列から抗体立体構造を *in silico* で予測・比較した。

なお、本研究は、新型コロナウイルス感染症拡大の影響により当初予定していた実験サンプルの取り寄せなどを断念せざる負えない状況となったため、急遽予定を変更して AVWS 治療用抗体の作製ワークフローを確立した。

3. 研究の方法

ヒト化 A10 抗体の作製ワークフローは CDR グラフティング法に基づいており、マウス A10 抗体の CDR および近傍のフレームワーク領域 (framework region : FR) に由来するアミノ酸残基 (約 5 アミノ酸) をヒト抗体 8A7 および 16E8 に移植することによって、ヒト化抗体 A10/8A7 および A10/16E8 のアミノ酸配列をデザインした。デザインしたヒト化 A10 抗体を作製するために、ヒト化 A10 抗体の重鎖および κ 軽鎖の遺伝子をそれぞれ含むベクターを Expi293F 細胞に導入することでトランスフェクタントを作製し、そのトランスフェクタントの培養上清中に含まれるヒト化 A10 抗体を回収・精製することによって、ヒト化 A10 抗体を得た。

ADAMTS13 に対するヒト化 A10 抗体とマウス A10 抗体の結合活性および阻害活性は ADAMTS13 タンパク質と VWF タンパク質をそれぞれ固相化させた 96 ウェルプレートを用いた酵素免疫測定法 (ELISA) により評価した (Ito *et al. Sci. Rep.* 2021)。抗体のアミノ酸配列に基づいた抗体構造予測は、RosettaAntibody ソフトウェアを用いて行った (Weitzner, B. D. *et al. Nat. Protoc.* 2017)。ヒト化 A10 抗体とマウス A10 抗体の構造類似性は、得られた抗体構造の予測結果を用いて平均二乗偏差 (RMSD) および Q-score を計算することにより評価された (Krissinel, E. & Henrick, K. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2004)。

4. 研究成果

ヒト化 A10 抗体とマウス A10 抗体の結合活性試験および ADAMTS13 阻害活性試験の結果をそれぞれ図 1 および図 2 に示す。それぞれの試験において、キメラ A10 抗体およびヒト抗体 8A7・16E8 はそれぞれヒト化抗体のポジティブコントロールとネガティブコントロールとして用いられた。図 1 より、ヒト化抗体 A10/16E8 はキメラ A10 抗体と比較しても遜色のない結合活性を有することが確認された。一方で、ヒト化抗体 A10/8A7 はキメラ A10 抗体および A10/16E8 と比較して ADAMTS13 に対する結合活性が低かった。同様の結果は ADAMTS13 阻害活性試験のおいても確認され、A10/8A7 はキメラ A10 抗体と比較して ADAMTS13 の阻害活性が低く、一方で A10/16E8 はキメラ A10 抗体と同程度の ADAMTS13 阻害活性を有していた (図 2A) (Ito *et al. Sci. Rep.* 2021)。

上述の結果を抗体立体構造の観点から検証するために、ヒト化 A10 抗体とマウス A10 抗体の抗体立体構造の予測結果 (図 3) を比較し、ヒト化 A10 抗体とマウス A10 抗体の抗体立体構造の差異を RMSD および Q-score の計算結果から評価した (表 1)。表 1 より、A10/8A7-マウス A10 ペアおよび A10/16E8-マウス A10 ペアの重鎖および κ 軽鎖の RMSD はすべて 1 以下であった。一般的に、タンパク質間における構造類似性の高さを示す RMSD の基準値が 2 以下であることから (Krissinel, E. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 2004)、A10/8A7 および A10/16E8 はともにマウス A10 抗体に対して高い構造類似性を有することが示された。

次に、A10/8A7-マウス A10 ペアおよび A10/16E8-マウス A10 ペアにおける重鎖および κ 軽鎖の Q-score の計算結果から、 κ 軽鎖において A10/16E8-マウス A10 ペアは A10/8A7-マウス A10 ペアと比較して Q-score がわずかに高いことが確認された。Q-score は 0~1 の間で変動する無次元数であり、Q-score が 1 に近いほど高い構造類似性を有することが示される (Krissinel, E. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 2004)。RosettaAntibody ソフトウェアから得られた A10/8A7、A10/16E8 およびマウス A10 抗体の抗体立体構造予測モデルを視覚的に比較した場合においても同様の傾向が認められることから、 κ 軽鎖において A10/16E8 は A10/8A7 と比較してマウス A10 抗体に対する類似性が高いことが示された。以上より、A10/16E8 はマウス A10 抗体の CDR 近傍のループ構造を保持しており、その結果としてキメラ A10 抗体と同程度の結合活性および ADAMTS13 阻害活性を有することを示唆する結果が得られた (Ito *et al. Sci. Rep.* 2021)。

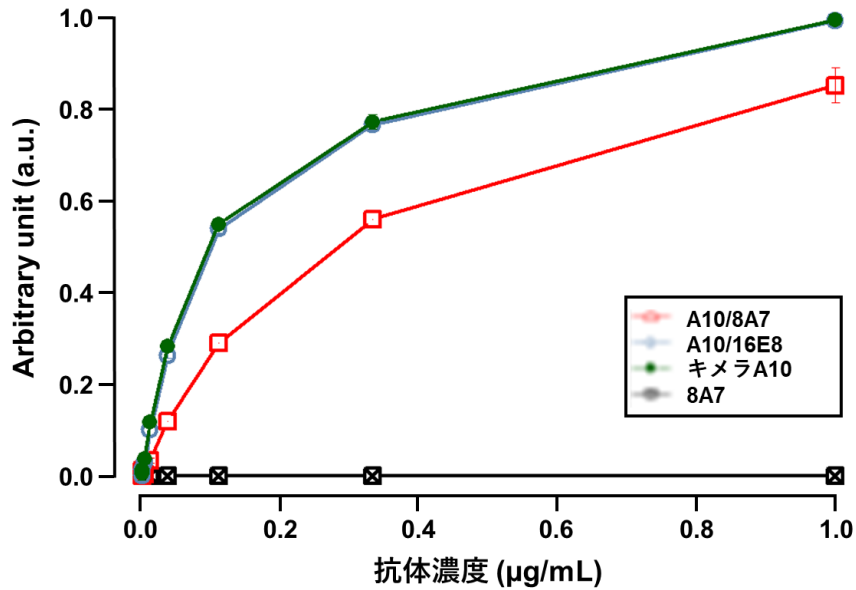


図 1 ADAMTS13 固相化 ELISA プレートを用いたヒト化 A10 抗体の結合活性試験の結果

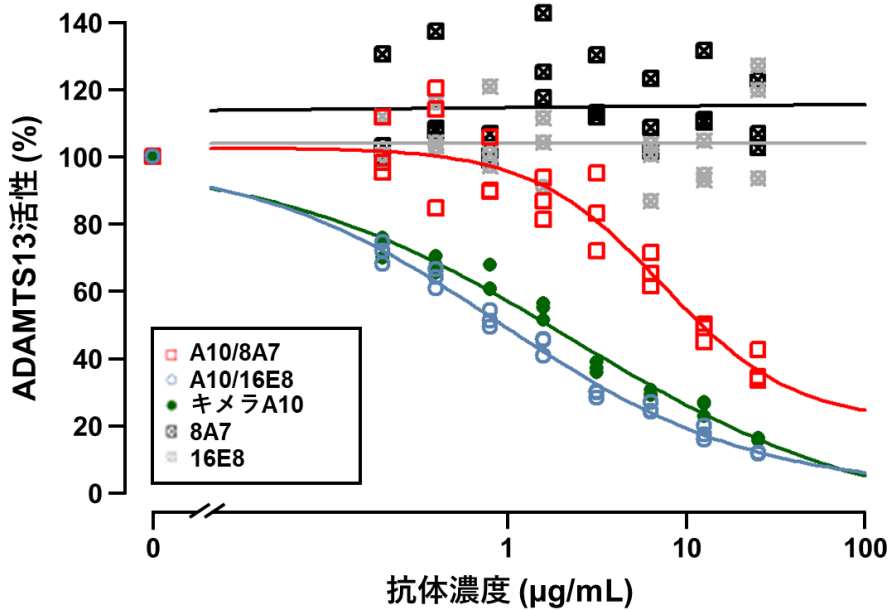


図 2 VWF 固相化 ELISA プレートを用いたヒト化 A10 抗体の ADAMTS13 阻害活性試験の結果

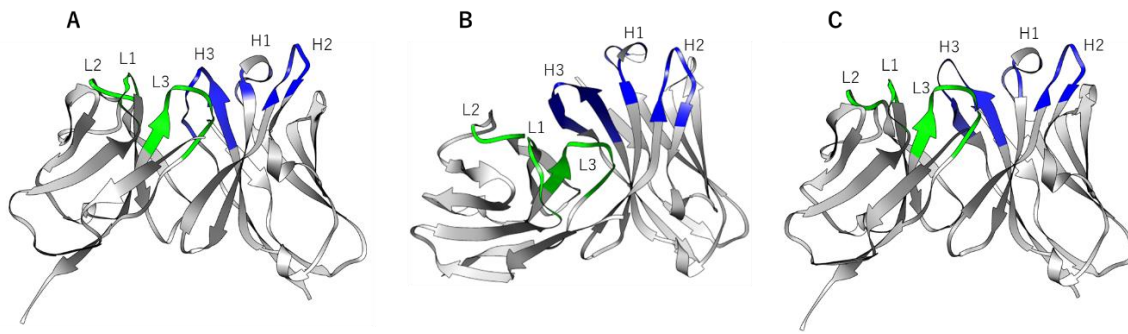


図3 ヒト化 A10 抗体およびマウス A10 抗体の立体構造予測
 (A) A10/8A7、(B) A10/16E8、(C) マウス A10 抗体
 (青：重鎖 CDR、黄緑：軽鎖 CDR)

表1 A10/8A7-マウス A10 ペア、A10/16E8-マウス A10 ペアにおける重鎖および κ 軽鎖の RMSD および Q-score の計算結果

抗体ペア	RMSD (Å)		Q-score	
	重鎖	κ 軽鎖	重鎖	κ 軽鎖
A10/8A7-マウス A10	0.48±0.11	0.84±0.01	0.96±0.02	0.92±0.00
A10/16E8-マウス A10	0.59±0.13	0.71±0.01	0.95±0.02	0.95±0.00

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Minamitani Takeharu, Kiyose Karin, Otsubo Ryota, Ito Toshihiro, Akiba Hiroki, Furuta Rika A., Inoue Tsuyoshi, Tsumoto Kouhei, Satake Masahiro, Yasui Teruhito	4. 巻 11
2. 論文標題 Novel neutralizing human monoclonal antibodies against tetanus neurotoxin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-91597-2	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 Ito Toshihiro, Minamitani Takeharu, Hayakawa Masaki, Otsubo Ryota, Akiba Hiroki, Tsumoto Kouhei, Matsumoto Masanori, Yasui Teruhito	4. 巻 11
2. 論文標題 Optimization of anti-ADAMTS13 antibodies for the treatment of ADAMTS13-related bleeding disorder in patients receiving circulatory assist device support	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-01696-3	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Toshihiro Ito
2. 発表標題 In silico identification of EBV-encoded microRNAs in human blood
3. 学会等名 The 19th International Symposium on Epstein-Barr Virus and associated diseases (EBV2021)（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤寿宏
2. 発表標題 ヒト血液RNA-SeqによるヒトヘルペスウイルスmicroRNAの同定
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会
4. 発表年 2021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
---------	---------