

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25640085

研究課題名(和文)革新的がん治療抗体化を目指した低分子四重特異性四価抗体の創製に向けた挑戦

研究課題名(英文)Challenge to the development of small tetraspecific and tetravalent antibody as innovative cancer therapeutic antibodies

研究代表者

浅野 竜太郎 (ASANO, Ryutaro)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80323103

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)：低分子二重特異性抗体は、魅力的な分子であるが、結合価数と体内半減期が減少することが問題である。本研究は、これらを多量体化により解消し、さらに合計4種類の抗体を用いることで、その多量体構造を完全に制御すると同時に、薬効を高めた低分子四重特異性四価抗体の創製を目的とした。結果、大腸菌発現系では機能的な分子を取得することができなかったが、動物細胞発現系を用いることで、高活性の分子を得ることに成功し、さらに精製は容易になるもののFc領域の融合が活性の低下をもたらすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Although small bispecific antibodies are attractive molecules, their decreases in binding valency and in vivo half-life are left as a problem. Multimerization of small antibodies is one strategy to solve these drawbacks. In this study using four kinds of antibody fragments, we tried to develop small tetraspecific and tetravalent cancer therapeutic antibodies to regulate multimeric structure and to enhance therapeutic efficacy. We couldn't obtain the functional molecules in bacterial expression system; however, we successfully prepared tetraspecific and tetravalent antibodies with high therapeutic effects in mammalian expression system. Further, our results showed that Fc fusion to facilitate their purification causes decreases in their cytotoxic effects.

研究分野：応用生物学

キーワード：癌 蛋白質 バイオテクノロジー 生物・生体工学 四重特異性四価抗体

1. 研究開始当初の背景

世界的な問題となっている抗体医薬の低コスト化において、投与量の軽減を目指した高機能化と、安価な微生物でも調製可能な低分子化が鍵である。人工抗体である二重特異性抗体は、例えば T 細胞とがん細胞を架橋するように設計することで、特異的な抗腫瘍効果が誘導され、また組換え技術により低分子化も可能である(図 1)。この低分子二重特異性抗体は、高機能性と低分子性を兼ね備えた魅力的な分子であるが、現状は国内企業では開発自体が皆無であり、海外でも実用化された例は 1 件のみとなっている。通常の IgG 型の抗体に比べて、結合価数と体内半減期が減少することが大きな問題であり、実用化を加速させるためには、これらを解消する必要がある。

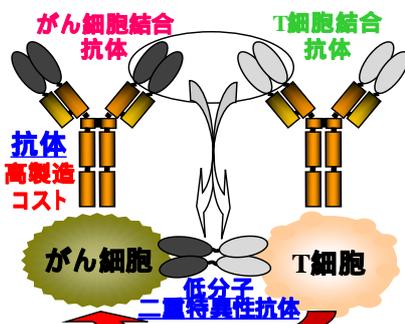


図1 架橋効果により強力な傷害性を誘導

2. 研究の目的

申請者は、低分子二重特異性抗体の開発研究に従事してきたが(*Clin. Cancer Res.*, 12, 4036 (2006)など)、最近その調製溶液中に、強い活性を有する多量体化した分子の存在を見出した(*J. Biol. Chem.*, 285, 20844 (2010), 286, 1812 (2011)など)。中でも diabody 型二重特異性抗体(図 2 左)の多量体化分子は、環状に四量体化した四価の分子であることを明らかにしている(図 2 中)。低分子抗体の多量体化は、微生物を用いた安価な製造を維持したまま、結合価数の増加と高分子量化による、薬効と体内半減期の向上が期待できる。そこでさらに 2 種類の抗体を加えることで四重特異性四価抗体の創製を目指す本提案の着想に至った(図 2 右)。各々由来が同じ抗体ドメイン間で生じる最も有利な会合を利用することで、四量体の完全な制御と比活性の飛躍的な向上、および汎用性の高い技術の完成に期待がもたれる。



図2 抗体を4種類用いた高活性環状四量体分子の構造制御

3. 研究の方法

これまでに diabody 型の低分子二重特異性抗体を複数構築してきた結果、がん関連抗原としてヒト上皮増殖因子受容体(EGFR)、T 細胞表面抗原として CD3 を標的とした分子(Ex3)に最も高い効果が認められた(*Clin. Cancer Res.*, 12, 4036 (2006))。また、前述の通り、最近 Ex3 の調製溶液中に、強い活性を有する多量体化した分子の存在を見出し、環状に四量体化した四価の分子であることを明らかにしている。そこで本研究では、潜在的に四量体化することが可能な Ex3 を基盤に、低分子四重特異性四価抗体の創製を目指した。

まず Ex3 に NK 細胞表面抗原である CD16 への特異性も付与させた三重特異性四価抗体(EGFR/CD3-EGFR/CD16)の構築を目指した。抗 CD16 抗体自体は既に利用しており同様に EGFR と CD3 の両者を標的とした Ex16 も効果的であることを確認している(*FEBS J.*, 279, 223 (2012))。しかしながら必要な 4 つの遺伝子を、すべて共発現させると、単に従来の Ex3 と Ex16 が優先的に調製される可能性がある。申請者はこれまで diabody を構成する 2 種のヘテロ scFv の中で、1 種のみを個別に調製すると、それぞれホモダイマーが形成されるが、これらを試験管内で混合すると diabody を再構成できることを明らかにしている(*Protein Eng. Des. Sel.*, 21, 597 (2008))。そこで抗 EGFR 抗体を対角に配置するように設計した 2 種のヘテロ diabody を個別に調製後、再構成を目指した(図 3)。

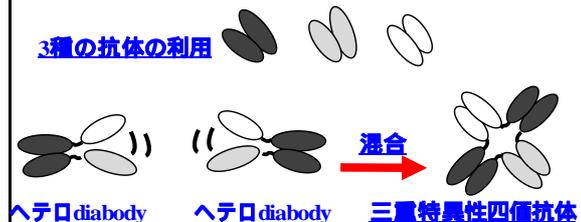


図3 三重特異性四価抗体の設計

また最終目的である 4 種類の抗体を用いた四重特異性四価抗体の作製も並行して進めることとし、異なる抗 EGFR 抗体の可変領域を加えた四重特異性四価抗体(EGFR/CD3-EGFR/CD16)の設計も行った。四重特異性四価抗体は図 2 に示すような環状構造のみの開発を目指していたが、より多角的に研究を進めるために環状型に加えて直鎖状型の四重特異性四価抗体の開発、さらには真核細胞を用いた発現系の利用も目指し、動物細胞発現系用のベクターの設計および作製を行った。動物細胞発現系を用いることで、三重特異性四価抗体の調製も容易となることを期待し、併せて三重特異性四価抗体の動物細胞を用いた調製を進めた。

4. 研究成果

2種のヘテロ diabody 共発現ベクターを作製し、大腸菌発現系を用いた調製を目指した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)、および Western blotting の結果、培地上清画分、ペリプラズム画分、市販の Bug Buster 試薬により抽出した菌体内可溶性画分のいずれにも発現がみられたため各画分からの精製を進めた。金属キレートアフィニティクロマトグラフィー(IMAC)、およびゲル濾過クロマトグラフィーにより精製を行ったところ、培地上清とペリプラズム画分を混合させた画分(可溶性画分 A)の方が、菌体内可溶性画分(可溶性画分 B)に比べ、より純度が高いサンプルを得ることができた。続いて、それぞれのサンプルを用いて、T細胞を多く含む活性化リンパ球(T-LAK)と MTS 試薬を用いた生細胞測定法によりがん細胞に対する細胞傷害活性を調べた。精製した2種のヘテロ diabody 単独と、これらを等モル混合し、静置させた後のサンプルを用いて評価した結果、興味深いことに活性を示さないと予想されたヘテロ diabody にそれぞれがん細胞の傷害活性がみられた(図4)。由来の異なる VH と VL 間でも、相同性の高さ等の理由から会合が生じ、さらにある一定の親和性を示したため、傷害活性を発揮できたと考えられるが、いずれにしても混合により、優位な細胞傷害活性の向上は認められなかったため、溶液中で三重特異性四価抗体が再構成できていない、あるいは構成できていても期待するような高い活性を構造上有さない可能性が示された。フローサイトメトリーによる結合活性など、要因を調べるためのより詳細な評価には収量を向上させる必要があったため、発現誘導時期、および培養温度の検討等を進めたが、優位な発現量の上昇はみられなかった。

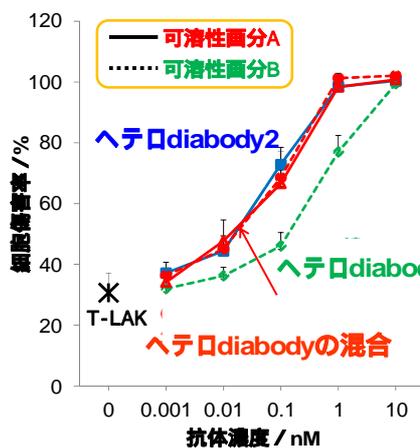


図4 三重特異性四価抗体の機能評価

一方、最終目的である4種類の抗体を用いた四重特異性四価抗体の設計も並行して進めた。まず、三重特異性四価抗体と同様に、4種の抗体の抗原結合部位に基づく、2種の

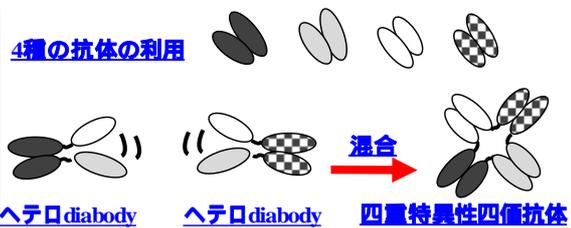


図5 四重特異性四価抗体の設計

ヘテロ diabody 共発現ベクターをそれぞれ作製し、大腸菌発現系を用いて調製後、これらを試験管内で混合させることを目指した(図5)。2種のヘテロ diabody 共発現ベクターをそれぞれ作製し、大腸菌を形質転換後、SDS-PAGE、および Western blotting により発現確認を行った。一方のヘテロ diabody は可溶性画分 A に、もう一方のヘテロ diabody は可溶性画分 B に最も多く発現がみられたため、それぞれこの画分からの調製を行った。IMAC で精製後、ゲル濾過クロマトグラフィーを行ったところ、いずれも二量体と思われる画分にピークが観察されたことから由来の異なる抗体の抗原結合部位が含まれていても diabody 構造を有することが明らかになった。続いて、それぞれを等モル混合し、四重特異性四価抗体、即ち四量体構造が形成されるかをゲル濾過クロマトグラフィーにより評価した。結果、期待に反し二量体構造が維持され、四量体と思われる画分にピークは認められなかった。三重特異性四価抗体では、ヘテロ diabody 単独でもがん細胞に対する細胞傷害活性が認められたため、混合後に得られた画分を用いた生細胞測定法を行った。四重特異性四価抗体は、T細胞を標的とした抗体とNK細胞を標的とした抗体の両者が含まれるため、両細胞を含む末梢血リンパ球(PBMC)を用いて評価を行った結果、コントロールとして用いた Ex3 四量体が強い活性を示したのに対し、四重特異性四価抗体は全く活性を示さなかった(図6)。やはり四量体構造が形成できていないこと、それぞれのヘテロ diabody を調製後に混合していることなどが要因であると考え、すべてを一本鎖で連結した構造を設計し、かつ高分子量となった事により大腸菌発現系では調製が困難と考え、動物細胞発現系の利用を進めた。

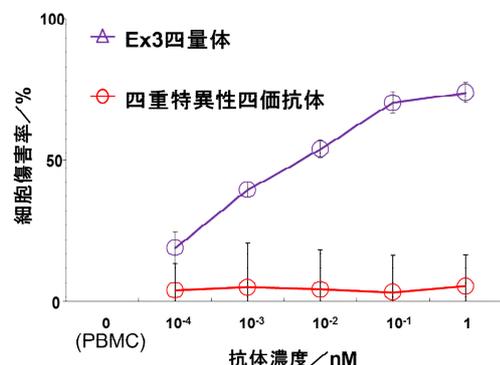


図6 四重特異性四価抗体の機能評価

動物細胞に関しては、収量が少ない場合に精製が困難であることが予想されたため、プロテイン A 樹脂を用いた簡便な精製が可能なヒト抗体の Fc 領域を融合させた分子の調製も進めた。結果、前述の通り大腸菌発現系を用いて調製した四重特異性四価抗体は、がん細胞傷害性試験に於いて期待するような効果は認められなかったのに対し、動物細胞を用いて調製した分子には顕著な活性が認められた。興味深いことに、Fc 領域を融合させた分子は、活性は示したものの融合させていない分子に比べ低下が見られた。既往の研究により、低分子二重特異性抗体は、Fc 領域の融合により活性が向上することが示されていたが(MAbs, 6, 1243 (2014))、より複雑な四重特異性四価抗体は標的抗原への結合に際して何らかの立体障害が生じたものと考えられる。以上より、低分子四重特異性抗体の調製に成功したと言え、今後の詳細な解析に期待が持たれる結果が得られた。

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 6 件)

- (1) 浅野 竜太郎, 杉山在生人, 熊谷 泉, 二重特異性抗体を用いたがん治療. 細胞, 47(13), 50-53 (2015), 査読無
- (2) 浅野 竜太郎, 熊谷 泉, 二重特異性抗体のタンパク質工学を駆使した高機能化. YAKUGAKU ZASSHI, 135(7), 851-856 (2015), 査読無
- (3) Asano R., Hagiwara Y., Koyama N., Masakari Y., Orimo R., Arai K., Ogata H., Furumoto S., Umetsu M., Kumagai I., Multimerization of anti-(epidermal growth factor receptor) IgG fragments induces an antitumor effect: the case for humanized 528 scFv multimers. *FEBS J.*, 280(19), 4816-4826 (2013) 査読有, DOI:10.1111/febs.12451
- (4) Asano R., Kumagai T., Nagai K., Taki S., Shimomura I., Arai K., Ogata H., Okada M., Hayasaka F., Sanada H., Nakanishi T., Karvonen T., Hayashi H., Katayose Y., Unno M., Kudo T., Umetsu M., Kumagai I., Domain order of a bispecific diabody dramatically enhances its antitumor activity beyond structural format conversion: the case of the hEx3 diabody. *Protein Eng. Des. Sel.*, 26(5), 359-367 (2013) 査読有, DOI:10.1093/protein/gzt009

[学会発表](計 11 件)

- (1) 浅野 竜太郎, 抗体医薬品開発の最前線: トレンドと課題, 福島県病院薬剤師会 1 月福島支部学術講演会, 2016 年 1 月 20

日, ホテルサンルートプラザ福島(福島県福島市)

- (2) 浅野 竜太郎, 抗体医薬品開発の課題とトレンド, *Biologics Expert Meeting in Hokkaido*, 2015 年 10 月 17 日, ニューオータニイン札幌(北海道札幌市)
- (3) 浅野 竜太郎, 抗体医薬品開発の現状と展望 ~タンパク質工学の寄与~, 第 176 回 熊本県病院薬剤師会研修会, 2015 年 9 月 5 日, 熊本大学医学部付属病院(熊本県熊本市)
- (4) 浅野 竜太郎, 抗体医薬品開発の現状と次世代人工抗体の可能性, *Biologics Seminar for Pharmacist in Sendai*, 2015 年 3 月 17 日, 江陽グランドホテル(宮城県仙台市)
- (5) 浅野 竜太郎, 今野翔太, 下村一平, 尾形裕未, 岡田麻衣, 荒井杏子, 梅津光央, 熊谷 泉, Fc 融合二重特異性抗体のドメイン組換えによる *in vivo* 抗腫瘍効果の増強, 平成 26 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ, 2015 年 2 月 6 日, 琵琶湖ホテル(滋賀県大津市)
- (6) 浅野 竜太郎, 小山典明, 鉦 陽介, 古本祥三, 荒井杏子, 尾形裕未, 梅津光央, 熊谷 泉, がん細胞成長阻害活性を有する多量体化抗 EGFR 一本鎖抗体の精密機能解析, 第 66 回日本生物工学会大会, 2014 年 9 月 11 日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)
- (7) 浅野 竜太郎, 小山典明, 古本祥三, 荒井杏子, 尾形裕未, 梅津光央, 熊谷 泉, ヒト上皮増殖因子受容体を標的とした多価抗体の開発, 化学療法基盤支援活動第 3 回シンポジウム, 2014 年 5 月 12 日, 万国津梁館(沖縄県名護市)
- (8) 浅野 竜太郎, 熊谷 泉, Cytotoxic enhancement of a small bispecific antibody with specificity for EGFR and CD3 by rearranging a domain order, 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 30 日, 熊本大学文学部(熊本県熊本市)
- (9) Asano R., Kumagai T., Nagai K., Taki S., Umetsu M., Kumagai I., Cytotoxic enhancement of a small bispecific antibody with specificity for EGFR and CD3 by rearranging a domain order, ICSG2013-SLS, 2013 年 8 月 1 日, 京王プラザホテル札幌(北海道札幌市)

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
浅野 竜太郎 (ASANO, Ryutaro)
東京農工大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号: 80323103
- (2) 研究分担者
梅津 光央 (UMETSU, Mitsuo)
東北大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 70333846