

平成30年6月7日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14227

研究課題名（和文）低分子二重特異性抗体の機能的な構造の解明に向けた既存抗ペプチド抗体の結晶化抗体化

研究課題名（英文）Development of antibodies for crystallization based on anti-peptide antibody to elucidate the functional structure of small bispecific 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） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：低分子二重特異性抗体の機能的な構造の解明に向けた結晶化抗体の新たな調製法の開発を目指した。既に特異的抗体との共結晶構造が報告されている抗原ペプチドをデータベースより選抜後、低分子二重特異性抗体に導入し、特異的抗体を結晶化抗体として用いることを試みた。結果、可溶性のタンパク質として十分な量を確保することが出来なかったため、発現宿主の検討も含めてさらなる検討が必要であるが、低分子二重特異性抗体のリンカー部位に選別した抗原ペプチドを導入し得ることが示された。

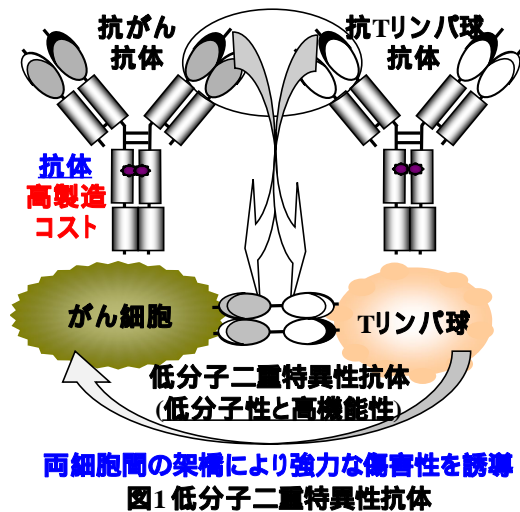
研究成果の概要（英文）：We tried to develop a novel method for preparation of antibodies for crystallization to elucidate the functional structure of small bispecific antibodies. We selected the pair of anti-peptide antibodies and its antigen peptide from Protein Data Bank, an archive-information about the 3D shapes of proteins, to use anti-peptide antibodies as antibodies for crystallization after integrating the antigen peptide into small bispecific antibodies. Although further investigation is needed to obtain soluble small bispecific antibody integrated with the antigen peptide, it was shown that the antigen peptide can integrate into the linker region in small bispecific antibody.

研究分野：応用生物学

キーワード：蛋白質 バイオテクノロジー 抗体

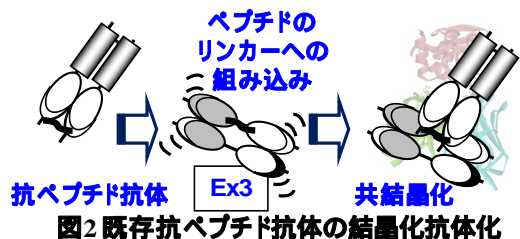
1. 研究開始当初の背景

世界的な問題となっている抗体医薬の低コスト化は、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となっている。人工抗体である二重特異性抗体は、例えばTリンパ球とがん細胞間を架橋する様にデザインすることで、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、世界でも実用化された例は1件のみである。これは、機能的な低分子二重特異性抗体医薬シーズをデザインするための技術基盤が未整備、特に十分な立体構造情報がないことに一因がある。結晶化が容易ではないタンパク質の結晶化を促す手法として、結合により結晶化を促進するような、結晶化抗体と呼ばれる抗体の利用が考えられる。しかしながら、新たに任意のタンパク質に対する結晶化抗体の取得は容易ではないため、汎用性の高い結晶化抗体の取得法の開発が望まれている。



2. 研究の目的

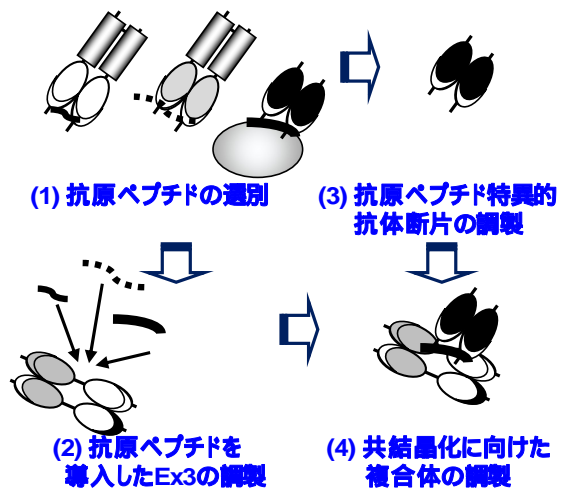
本研究は、既に特異的抗体との共結晶構造が報告されている抗原ペプチドをデータベースより選抜し、独自に開発した低用量で極めて強い抗腫瘍効果を発揮する低分子二重特異性抗体 Ex3 に含まれるリンカーに導入することで、当該特異的抗体を結晶化抗体として利用し、最終的に Ex3 の機能的な構造を解明すると共に、汎用的な結晶化手法として確立すること目的としている(図2)。



3. 研究の方法

申請者は一貫して、がん治療人工抗体の研究に従事し(*J. Biol. Chem.*, 282, 27659 (2007)他)、近年、特に低分子二重特異性抗体のデザインや機能評価に注力してきたが、その開発過程で Ex3 と名付けたがん関連抗原であるヒト上皮増殖因子受容体(EGFR)とリンパ球表面抗原である CD3 を標的とした低分子二重特異性抗体が極めて効果的であることを明らかにした(特許 3803790 号, *Clin. Cancer Res.*, 12, 4036 (2006), *J. Biol. Chem.*, 286, 1812 (2011)他)。さらに最近、この Ex3 の配向性を改変させることで、基本構造としては相同であるものの、比活性が著しく増減することを見出した(PCT/JP2010/070127, *Protein Eng. Des. Sel.*, 26, 359 (2013))。低分子二重特異性抗体の機能的な構造を理解する上で、これらは極めて良いモデルであるが、現在までに構造解析に成功していない。2つの抗体を連結しているリンカー部位での揺らぎ等を抑える様な、結晶化抗体の利用が考えられるが、新たな抗体の取得は容易ではなく、また汎用性もない。そこで既に特異的抗体断片との共結晶構造が報告されている抗原ペプチドを低分子二重特異性抗体に含まれるリンカーに導入することで、特異的抗体を結晶化抗体として利用することを目指した。

具体的には、(1) データベースからの抗原ペプチドの選別、(2) 抗原ペプチドを導入した Ex3 の調製、(3) 選別した抗原ペプチド特異的抗体断片の調製、(4) 共結晶化に向けた抗原ペプチドを導入した Ex3 と抗原ペプチド特異的抗体断片複合体の調製、の観点から研究を進めた(図3)。



4. 研究成果

(1) データベースからの抗原ペプチドの選別

まず蛋白質構造データバンク(PDB)から抗体-抗原ペプチドの共結晶構造情報を抽出し、コンフォメーションな結合様式ではないこと、抗体中に深く埋没しておらずアクセ

スピリティが高いこと、認識ペプチドの長さが長すぎないこと、対応する特異的抗体の親和性が高いこと、など様々な観点からリンカーに導入する抗原ペプチドの選別を行った。結果、His tag や c-myc など精製・検出に用いられる抗ペプチドタグ抗体を 2 種類含む 8 種類のペプチド-抗体複合体を候補として選別した。一方で、短いペプチドは 5 アミノ酸程度であったため、リンカーに組み込んだ際に、立体障害により特異的抗体が結合できないことが懸念された。そこで、リンカーへの挿入に先駆けて Ex3 のリンカー長の延長の許容性に関して検討を行った。従来のリンカーの 3 倍の長さを有する Ex3 を調製し、機能評価を行ったところ、報告されている自己集合体の形成の促進は見られず、興味深いことに活性の向上が認められた。このことから、抗原ペプチドの挿入の際には両末端方向に対してある程度のスペーサー配列の挿入が可能であることが分かった。

一方で、結晶化を目指す上では、抗原ペプチド特異的抗体断片の大腸菌に於ける発現量も考慮すべき重要な観点である。低分子抗体の中でもラクダ科由来の VHH 抗体は、シングルドメインで結合活性を示すために、調製が簡便であり、また大腸菌発現系との相性が良く、多くの場合、高発現が見込まれることが知られている。これらも踏まえて、最終的に -catenin を認識する VHH 抗体と、その認識抗原ペプチドを選定した (*Sci Rep.*, 6, 19211 (2016))。

(2) 抗原ペプチドを導入した Ex3 の調製

申請者は、これまでに Ex3 のドメインの連結順を入れ換えた改変体を数多く構築してきたが、一本鎖 diabody (single chain diabody, scDb) 型と縦列一本鎖抗体 (tandem single chain Fv) 型に大別でき、いずれも構成する遺伝子は 1 つである (図 4, *J. Biol. Chem.*, 286, 1812 (2011), *Protein Eng. Des. Sel.*, 26, 359 (2013), *MAbs*, (2018) in press)。

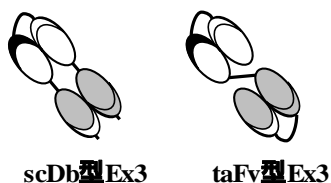


図4 Ex3の主な構造

本研究では、発現量が多いことも考慮し、scDb 型と taFv 型から 1 つずつ改変体を選抜した。いずれも人工のペプチドリンカー配列を 3 つずつ含んでいるが、その中の 1 つに選別した抗原ペプチドの導入を行った。PCR により抗原ペプチドを導入した各遺伝子断片を増幅させ、それぞれ大腸菌分泌発現用ベクターに挿入した。オートインダクション用培地を用いて大量培養を行った後、培養上清、

菌体内可溶性画分、菌体内不溶性画分に分離し、抗 his tag 抗体を用いた Western blotting により発現確認を行った。結果、scDb 型、taFv 型いずれも目的分子量付近に発現していることが確認されたが、可溶性画分には発現がみられなかった (図 5)。

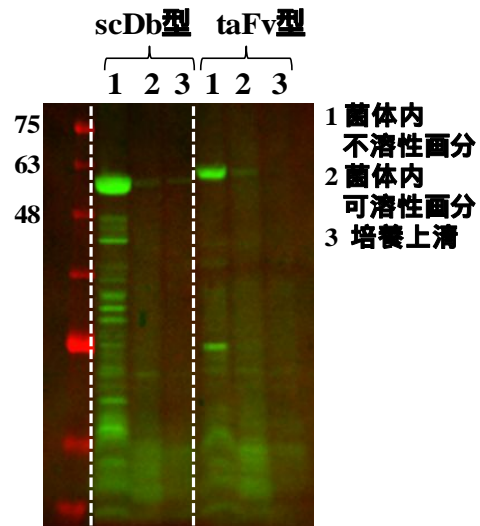


図5 抗原ペプチドを導入したEx3の発現確認

そこで、培養条件の検討を、主に培地の検討の観点から行った結果、LB 培地では、不溶性画分での発現さえも低下がみられたが、2xYT 培地では、特に抗原ペプチドを挿入した scDb 型に少量ではあるものの可溶性画分での発現がみられた。そこで、この画分からの金属キレートアフィニティクロマトグラフィーによる精製を試みたが、その後の SDS-PAGE 解析の結果、精製タンパク質を確認することは出来なかった。

いずれの培養条件でも、菌体内不溶性画分には発現が認められたため、抗原ペプチドを挿入した taFv 型の巻き戻し法による調製を目指した。超音波破碎後の菌体内不溶性画分に 6 M の塩酸グアニジンを添加することで可

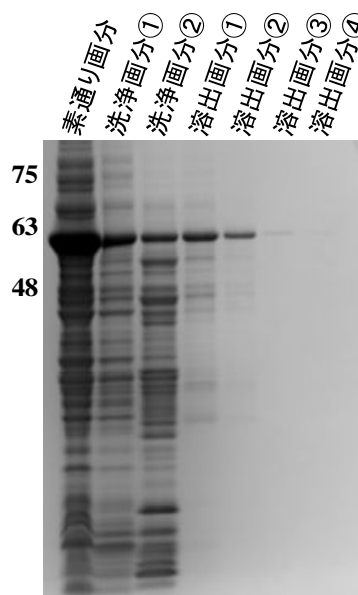


図6 抗原ペプチドの導入を行ったtaFv型の精製

溶後、金属キレートアフィニティークロマトグラフィーによる精製を行った結果(図 6)、高純度で精製することに成功したため、段階透析法による巻き戻し操作により調製を行った。

(3) 選別した抗原ペプチド特異的抗体断片の調製

-cateninの部分配列を認識するVHH抗体の遺伝子配列をデータベースより取得後、大腸菌に至適なコドンに置換した配列を設計し、全合成後、大腸菌分泌発現ベクターに挿入した。大腸菌を形質転換後、Western blottingにより発現確認を行った結果、菌体内不溶性画分、菌体内可溶性画分、および培地上清画分のいずれにも、期待通り大量に発現している様子が確認された。続いて、菌体内可溶性画分から金属キレートアフィニティークロマトグラフィーにより精製を行った結果、目的分子量に一致した精製度の比較的高いタンパク質バンドが観察されたため、抗原ペプチド特異的抗体の調製に成功したといえる(図 7)。

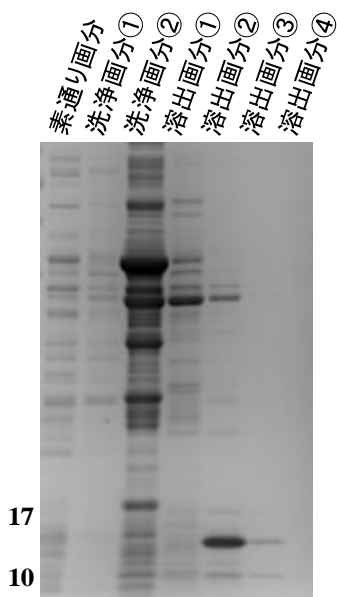


図7 抗原ペプチド特異的抗体断片の調製

(4) 共結晶化に向けた抗原ペプチドを導入したEx3と抗原ペプチド特異的抗体断片複合体の調製

(2)で巻き戻し法により調製した抗原ペプチドを挿入したtaFv型Ex3と(3)で可溶性画分より調製した抗原ペプチド特異的抗体をモル比1:1で混合した後、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った結果、複数のピークが観察された。それぞれのピークのSDS-PAGE解析を行った結果、抗原ペプチド特異的抗体の明確なバンドは観察されたものの抗原ペプチドを挿入したtaFv型Ex3に該当するバンドは認められなかった。混合過程、あるいはその後のゲル濾過工程で、抗原ペプチドを挿入したtaFv型Ex3が凝集・沈殿した可能性が考えられる。分子としての安定性を維持するようなペプチド配列の選択や挿入場所の

検討が必要であることが示されると共に、巻き戻し操作により得たタンパク質の不安定性も懸念された。大腸菌以外の微生物や真核細胞を用いた検討も必要であるが、本検討により二重特異性抗体のリンカー部位に選別した抗原ペプチドを導入し得ることが示された。

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) Asano R., Nagai K., Makabe K., Takahashi K., Kumagai T., Kawaguchi H., Ogata H., Arai K., Umetsu M., Kumagai I., Structural considerations for functional anti-EGFR × anti-CD3 bispecific diabodies in light of domain order and binding affinity. *Oncotarget*, 9(17), 13884-13893 (2018) 査読有, DOI:10.18632/oncotarget.24490
- (2) 浅野竜太郎, 熊谷 泉, 人工改変を駆使した高機能性次世代がん治療抗体の開発. 月刊ファインケミカル, 46(2), 13-18 (2017), 査読無
- (3) 浅野竜太郎, 熊谷 泉, がん治療を目指した二重特異性抗体の開発. 細胞, 48(4), 8-12 (2016), 査読無
- (4) 浅野竜太郎, 人工抗体の機能的構造形態に関する研究. 生化学, 88(4), 380-385 (2016), 査読無
- (5) 浅野竜太郎, 杉山在生人, 熊谷 泉, 高機能な二重特異性抗体医薬の開発. バイオサイエンスとインダストリー, 73(6), 455-461 (2015), 査読無
- (6) 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

〔学会発表〕(計 8件)

- (1) 浅野竜太郎, 抗体医薬品の課題と開発トレンド, 茨城県病院薬剤師セミナー, 2018年3月8日, オークラフロンティアホテルつくば(茨城県つくば市)
- (2) 浅野竜太郎, 低分子二重特異性がん治療抗体の開発と高機能化, 医薬産業政策研究所 政策研究 第1回ワークショップ, 2017年12月22日, 日本橋ライフサイエンスビルディング(東京都中央区)
- (3) 浅野竜太郎, 次世代低分子がん治療抗体の開発, 日本薬物動態学会 第31回年会, 2016年10月15日, キッセイ文化ホール(長野県松本市)
- (4) 浅野竜太郎, 次世代がん治療薬を目指した二重特異性抗体の構造最適化, 若手研究者フォーラム 2016 次世代バイオ医薬・再生医療を支える基盤技術開発, 2016年7月26日, 御茶ノ水ソラシティ(東京都千代田区)
- (5) 浅野竜太郎, がん細胞とリンパ球の架橋

を目指した二重特異性抗体の高機能化,
第 32 回日本 DDS 学会学術集会, 2016 年 6
月 30 日, 静岡県コンベンションアーツ
センター(静岡県静岡市)

- (6) 浅野竜太郎, がん治療を目指した二重特異性抗体の機能的構造形態, 第 20 回 生体材料融合研究会, 2016 年 1 月 27 日, 国立研究開発法人 物質・材料研究機構(茨城県つくば市)
- (7) Sugiyama A., Umetsu M., Nakazawa H., Hosokawa K., Asano R., Kumagai I., High throughput screening of cancer therapeutic small antibody designed from domain library, Pacificchem 2015, 2015 年 12 月 20 日, Sheraton Waikiki Hotel(Honolulu, USA)
- (8) 杉山在生人, 梅津光央, 中澤 光, 細川勝洸, 浅野竜太郎, 熊谷 泉, 最適な二重特異性低分子抗体を構成する抗体断片の迅速スクリーニング, 第 15 回日本蛋白質科学会年会, 2015 年 6 月 24 日, あわぎんホール(徳島県徳島市)

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

田中 良和 (TANAKA, Yoshikazu)
東北大学・生命科学研究科・教授
研究者番号: 20374225