

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08368

研究課題名(和文)革新的なバイオ医薬創製に向けた分子連結技術の高度化

研究課題名(英文)Development of an advanced protein linking technology for generating innovative biopharmaceuticals

研究代表者

中西 猛 (NAKANISHI, Takeshi)

大阪市立大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：20422074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、研究代表者らが開発したヘテロ4量体形成ペプチドを利用した特異性タンパク質連結技術の高度化を図ることによって、次世代抗体医薬の開発に資する技術の確立を目指した。まず、以前に作製した二重特異性抗体に対して、異なる特異性を付与することによって、三重特異性を達成した。さらに、二重特異性抗体薬物複合体を作製し、その機能を評価した結果から、特異的タンパク質連結技術が薬物送達系の構築に利用できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体医薬は、がんやリウマチなど治療が難しい疾患に対する副作用の少ない治療薬として期待され、その重要性はますます高まっている。その一方で、高額な治療費が課題とされていることから、治療費の低減に向けた取り組みは医療経済的観点から重要である。本研究では、抗体高機能化技術の高度化を達成できたことから、抗体医薬の機能向上による低用量化を通じて、抗体治療の低コスト化に貢献できると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to establish the technology for the development of next-generation antibody therapeutics by advancing our protein linking method based on the hetero-tetramerization of the peptides. First, we succeeded in preparing the trispecific antibody by imparting different specificity to the previously produced bispecific antibody. Furthermore, we successfully produced the functional bispecific antibody-drug conjugate, indicating that our protein linking method is useful for construction of drug delivery system.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：抗体 バイオ医薬 タンパク質工学

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

抗体は、生体防御機構である免疫系において、重要な役割を担っており、標的分子に対する優れた特異性および親和性を有する。その特性を活かして、幅広い分野で重要な生命分子となっており、特に近年では、がんやリウマチをはじめとする難治性の疾患を対象とした治療薬、すなわち抗体医薬として応用されている。国際的な開発競争は激しさを増しているが、その一方で、主流の天然型抗体を医薬として用いる場合、一般に大量投与を必要とすることから、製造方法に起因するコスト高と相まって、極めて高額な治療法となっている。加速する少子高齢化社会において、国民医療費が増大する中、高度先進医療開発の重要性もさることながら、高度医療の低コスト化は解決すべき喫緊の課題である。したがって、抗体医薬分野においても、従来の天然型抗体と比較して機能的に優れた組換え抗体を低コストで生産する技術の開発は、医療経済的観点から重要である。また、新規抗体の開発だけでなく、既存の治療用抗体を改変して機能向上を図ることによって、医薬としての価値を高める戦略にも期待が寄せられていることから、新規な抗体高機能化技術は極めて有用である。

### 2. 研究の目的

研究代表者らは、以前の研究において、ヘテロ4量体を形成する2種のペプチドを利用した新規なタンパク質連結技術を開発し、2種の抗体可変領域を連結した二重特異性抗体の創製に成功している(Osaki, Nakanishi *et al.*, *FEBS J.*, **282**, 4389-4401, 2015) (図1)。そこで、研究代表者らがこれまでに取り組んできた微生物発現系を駆使した低分子化組換え抗体の作製技術を基盤として、独自に開発した特異的タンパク質連結技術の高度化を図ることによって、安価で優れた治療効果を示す革新的な次世代抗体医薬の開発に向けて展開できると考えた。

本研究では、研究代表者らが開発した特異的タンパク質連結技術を発展させることによって、優れた機能を発揮するバイオ医薬開発技術を確認することを目指した。特にがん関連抗原特異的な抗体分子を主な研究対象とし、優れた生産性と機能性を兼ね備えた組換え抗体を創製することを目的とした。

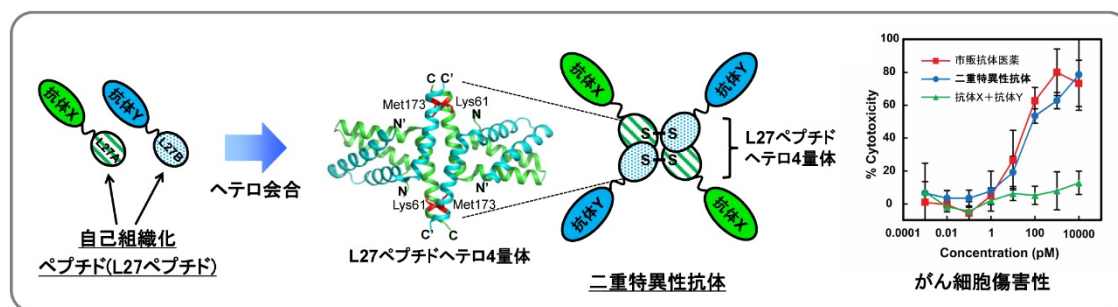


図1 以前の研究で開発した新規なタンパク質連結技術の概略図

### 3. 研究の方法

#### (1) 三重特異性抗体の作製

ナチュラルキラー細胞表面抗原 CD16 および 2 種の ErbB 受容体 (EGFR および HER2) を標的とする三重特異性抗体の作製を試みた。具体的には、L27A ペプチドの N 末端および C 末端へ、ヒンジ領域を介して、EGFR および HER2 特異的抗体可変領域をそれぞれ融合し、L27B ペプチドを融合した CD16 特異的抗体可変領域とともに大腸菌を用いて共発現させた。培養上清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目的タンパク質を精製した。ゲルろ過クロマトグラフィーにより会合状態を分析し、フローサイトメトリーにより標的細胞への結合を評価した。また、表面プラズモン共鳴法 (SPR 法) を用いて、作製した組換え抗体の標的分子に対する結合を調べた。

#### (2) 二重特異性抗体薬物複合体の作製

2 種の ErbB 受容体 (EGFR および HER3) を標的とする二重特異性抗体を作製し、薬物送達系への応用を試みた。具体的には、大腸菌を用いて、L27A ペプチドを融合した HER3 特異的抗体可変領域と L27B ペプチドを融合した EGFR 特異的抗体可変領域を共発現させた。培養上清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目的タンパク質を精製した。ゲルろ過クロマトグラフィーおよび質量分析により会合状態を分析し、フローサイトメトリーにより標的細胞への結合を調べた。次に、SMCC リンカーを介して、チューブリン重合阻害剤である DM1 をアミンカップリング法により結合させ、抗体薬物複合体を調製した。MTS 法を用いて、がん細胞に対する傷害性を調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) 三重特異性抗体の作製

ヘテロ4量体を形成する2種のペプチド (L27A および L27B) を利用することによって、6つの抗体可変領域を有する三重特異性抗体を構築した (図2A)。ゲルろ過クロマトグラフィーによ

り組換え抗体の会合状態を調べたところ、目的のヘテロ 4 量体と考えられるピークが見られたが、2 量体と考えられる分子種も同程度存在することがわかった。以前に作製した二重特異性抗体では、主にヘテロ 4 量体として存在したことから、新たに 2 つの抗体可変領域を連結したことにより立体障害が生じ、L27A-L27B ペプチド間の相互作用に影響を与えたと考えている。フローサイトメトリーにより、2 種のがん細胞 (A431 および SKBR-3) に対する結合を調べたところ、組換え抗体は両方のがん細胞に対して特異的に結合した。SPR 法を用いて、可溶性 CD16 に対する速度論的解析を行った結果、結合価が 1 価の抗体と比較して、解離速度が遅いことがわかった。さらに、可溶性 EGFR を固定化したセンサーチップに対して、組換え抗体を添加した後、さらに可溶性 CD16 および可溶性 HER2 を順に添加したところ、すべての添加においてレスポンスの上昇が見られたことから、作製した組換え抗体は三重特異性を有すると考えた (図 2B)。以上の結果から、研究代表者らが開発した特異的タンパク質連結技術を利用することによって、二重特異性化に留まらず、三重特異性化も可能であると結論付けた。

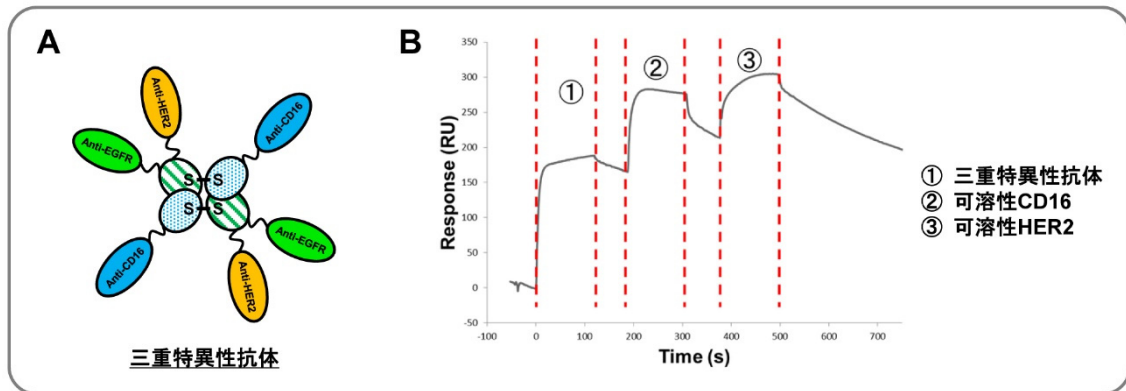


図 2 三重特異性抗体の模式図 (A) および SPR 法による結合活性の評価 (B)

## (2) 二重特異性抗体薬物複合体の作製

EGFR および HER3 を標的とする 4 量体型の二重特異性抗体を作製するとともに、比較として、EGFR を標的とする 4 量体型の単一特異性抗体を作製した。ゲルろ過クロマトグラフィーおよび質量分析の結果から、二重特異性抗体は異なるポリペプチド鎖間でジスルフィド結合を形成し、主に 4 量体として存在することがわかった。フローサイトメトリーを用いて、EGFR および HER3 を発現している膵臓がん細胞株 BxPC3 に対する結合を評価したところ、結合価が同一である単一特異性抗体に比べて、二重特異性抗体ではより大きなピークシフトが見られた。次にアミンカップリング法により調製した抗体薬物複合体を電気泳動法により分析した結果、未修飾の抗体に比べて、抗体薬物複合体は高分子量側に検出されたことから、DM1 を修飾できたと考えた。BxPC3 に対する細胞傷害性を調べたところ、2 種の抗体薬物複合体はともに傷害性を示したが、二重特異性抗体薬物複合体は、単一特異性抗体薬物複合体より高いがん細胞傷害性を有することがわかった (図 3)。以上の結果から、二重特異性抗体の薬物送達系への応用において、研究代表者らが開発した特異的タンパク質連結技術は有用であると結論付けた。

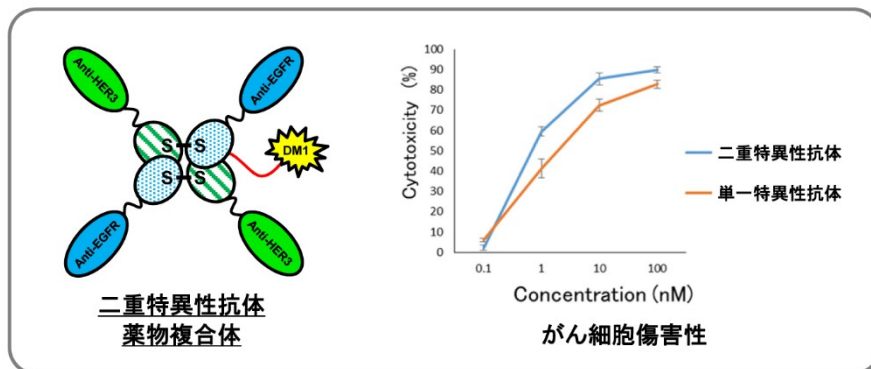


図 3 二重特異性抗体薬物複合体の模式図およびがん細胞傷害性の評価

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Asami Ueda, Mitsuo Umetsu, Takeshi Nakanishi, Kentaro Hashikami, Hikaru Nakazawa, Shuhei Hattori, Ryutaro Asano, Izumi Kumagai	4. 巻 21
2. 論文標題 Chemically crosslinked bispecific antibodies for cancer therapy: Breaking from the structural restrictions of the genetic fusion approach.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 E711
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21030711	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 Saki Hemmi, Ryutaro Asano, Kouki Kimura, Mitsuo Umetsu, Takeshi Nakanishi, Izumi Kumagai, Koki Makabe	4. 巻 523
2. 論文標題 Construction of a circularly connected VHH bispecific antibody (cyclobody) for the desirable positioning of antigen-binding sites.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 72-77
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.12.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ryutaro Asano, Katsuhiko Hosokawa, Shintaro Taki, Shota Konno, Ippei Shimomura, Hiromi Ogata, Mai Okada, Kyoko Arai, Masayoshi Onitsuka, Takeshi Omasa, Takeshi Nakanishi, Mitsuo Umetsu, Izumi Kumagai	4. 巻 10
2. 論文標題 Build-up functionalization of anti-EGFR × anti-CD3 bispecific diabodies by integrating high-affinity mutants and functional molecular formats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 4913
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-61840-3	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 -
1. 著者名 Liu Xu, Kan-ichiro Ihara, Saori Yoshimura, Daijiro Konno, Akira Tachibana, Takeshi Nakanishi, Taro Tachibana	4. 巻 -
2. 論文標題 Generation of the rat monoclonal antibody against the extracellular domain of human CD63 by DNA immunization.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/mab.2020.0007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomohiro Osaki, Takeshi Nakanishi, Motoshi Aoki, Takahiro Omizu, Daisuke Nishiura, Masaya Kitamura	4. 巻 37
2. 論文標題 Soluble expression in Escherichia coli of a single-domain antibody-tumor necrosis factor fusion protein specific for epidermal growth factor receptor.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.	6. 最初と最後の頁 20-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/mab.2017.0051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hideaki Sanada, Kazuki Kobayashi, Takamitsu Maru, Takeshi Nakanishi, Mitsuo Umetsu, Ryutaro Asano, Izumi Kumagai	4. 巻 8
2. 論文標題 Affinity maturation of humanized anti-epidermal growth factor receptor antibody using a modified phage-based open sandwich selection method.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 5414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-23796-3	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11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 神所 真佑, 立花 太郎, 北村 昌也, 中西 猛
2. 発表標題 タウを標的とするラビットモノクローナル抗体のヒト化
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野 慶祐, 中川 里彩, 北村 昌也, 中西 猛
2. 発表標題 2種のErbB受容体を標的とする二重特異性抗体薬物複合体の作製
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本 裕生, 森口 誠也, 立花 太郎, 立花 亮, 北村 昌也, 中西 猛
2. 発表標題 がん細胞とエクソソームを標的とする二重特異性抗体の作製
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角南 哲也, 中村 すみれ, 中村 亮太, 北村 昌也, 中西 猛
2. 発表標題 ヘテロ会合ペプチドの融合による三重特異性抗体の作製
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中西 猛, 津村 千尋, 北村 昌也
2. 発表標題 シングルドメイン抗体の融合によるIgG様二重特異性T細胞リクルート抗体の構築
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村 亮太, 津村 千尋, 北村 昌也, 中西 猛
2. 発表標題 ドメイン交換によるIgG様三重特異性T細胞リクルート抗体の改変
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福富 秀平, 池内 祐介, 平川 泰史, 岩瀬 瑛大, 北村 昌也, 中西 猛
2. 発表標題 HER2を標的とするIgG様バイパラトピック抗体薬物複合体の作製
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 津村 千尋, 北村 昌也, 中西 猛
2. 発表標題 シングルドメイン抗体を利用したIgG様二重特異性抗体の作製
3. 学会等名 第17回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中西 猛, 津村 千尋, 北村 昌也
2. 発表標題 がん関連抗原を標的とするIgG様二重特異性T細胞リクルート抗体の作製
3. 学会等名 第26回ポリマー材料フォーラム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村 亮太, 津村 千尋, 北村 昌也, 中西 猛
2. 発表標題 2種のがん関連抗原を標的とする三重特異性T細胞リクルート抗体の作製
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 池内 祐介, 平川 泰史, 岩瀬 瑛大, 北村 昌也, 中西 猛
2. 発表標題 HER2を標的とするIgG様二重パラトープ抗体の作製
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北村研究室ホームページ <a href="http://www.bioa.eng.osaka-cu.ac.jp/bic/">http://www.bioa.eng.osaka-cu.ac.jp/bic/</a>
--

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