

令和 3 年 6 月 13 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K04860

研究課題名(和文)抗体医薬品の変性構造を特異的に認識する人工タンパク質を用いた高次構造分析技術

研究課題名(英文)Quality control monitoring of therapeutic antibodies on the basis of artificial proteins specific for the higher-order structure of antibody domains

研究代表者

渡邊 秀樹 (Watanabe, Hideki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：90422089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：抗体医薬品の高い治療効果は抗体の精密な高次構造に依存しているため、その高次構造分析技術は、医薬品としての有効性・安全性確保に不可欠の品質分析技術として位置づけられている。本研究では、高感度・高分解能・高スループット性を満たす高次構造分析技術を目指し、治療用抗体の高次構造変化をドメイン特異的に検出できる人工タンパク質をファージディスプレイ法によって作出し、これを分析プローブとして用いることで、抗体の変性をドメイン特異的に分析できるバイオセンシング技術を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的特色として、開発した人工タンパク質の分子認識能は、従来は非特異的な疎水性相互作用が支配的とみなされていた変性タンパク質の結合様式に「変性構造の特異的な認識」という新たな視点・知見を提供した。本研究成果によって、抗体の変性領域の特定がドメイン単位で可能となり、高感度・高スループット性を特徴とするバイオセンシング技術の分析分解能が質的に向上し、抗体医薬品の品質分析技術に適した高感度・高分解能・高スループット性を満たす高次構造分析技術が実現する。抗体医薬品の開発競争が激化する中、本技術は高品質な抗体医薬品製造への貢献として、技術的・経済的にも大きな波及効果が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：Analysis of the higher-order structure of therapeutic antibodies (mAbs) is indispensable for ensuring their efficacy and safety because their therapeutic efficacies, e.g., specificity for antigens and effector functions, are governed by their higher-order structures of mAbs. In this study, biosensing-based quality control monitoring of mAbs was developed by using artificial protein that can recognize higher-order structural changes of mAbs. Specific artificial proteins were generated by using phage display. The generated artificial protein distinguishes between the denatured Fab and Fc regions, showing the domain-specific recognition of denatured mAbs. This specificity could provide more detailed structural information regarding which part of mAbs is structurally collapsed. This biosensing will be able to contribute to the manufacture of high-quality therapeutic mAbs.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：抗体医薬品 品質分析 バイオセンサー 人工タンパク質 進化分子工学 ファージディスプレイ

## 1. 研究開始当初の背景

抗体医薬品は、生物活性に基づく高い治療効果から難治性疾患への適用が進められ、高成長率の市場規模拡大を続けている。抗体の生物活性は精密な高次構造に依存しているため、その高次構造分析は、医薬品としての有効性・安全性の確保に不可欠の品質分析技術として位置づけられている。高次構造分析には、これまでクロマトグラフィーや分光学的手法などが用いられてきたが、製造工程の品質分析技術として求められる高感度・高分解能・高スループット性を同時に満たすことは難しく、迅速かつ精密な高次構造分析技術の革新が、産業界・規制当局の双方から求められている。この要請に応える技術開発として、当研究室では、独自に開発した人工タンパク質の設計技術を基に、抗体の定常領域である Fc 領域の高次構造変性を認識する人工タンパク質 AF.2A1 を作製した。この AF.2A1 は、天然型の高次構造をもつ抗体には結合せず、酸や熱などの物理的・化学的ストレスによって、高次構造が変性した抗体にのみ結合する。当研究室では、この高次構造変性に特異的な人工タンパク質をプローブとするバイオセンシング技術が、抗体製造工程の品質分析技術に求められる高感度・高分解能・高スループット性を同時に実現できる新たな高次構造分析技術につながると考え、その開発を進めてきた。

## 2. 研究の目的

バイオセンシング技術において、プローブの特性は、分析の感度と選択性を決定する。タンパク質の高次構造変性を検出するプローブとして、これまで蛍光性有機化合物、疎水性タンパク質、高分子ポリマーなどが報告されてきた。これらのプローブは、主にタンパク質の変性に伴って露出した疎水領域に吸着することで、変性を非選択的に検出する。そのため、これらのプローブは、多くのタンパク質に汎用的に利用できる一方、抗体のような複数の領域(それぞれでコンパクトな高次構造を形成する、一般に「ドメイン」と呼ばれる領域)から構成されるタンパク質の「どのドメインが変性しているのか」といった、より具体的な高次構造変性の情報を取得することはできない。抗体の各ドメインは、抗原との結合や免疫細胞受容体との結合など、固有の機能を担っているが、既存プローブを用いた変性検出では、ドメイン単位の高次構造変性の情報が欠落していることが、分析技術上の課題であった。この課題解決に向け、先行研究で得た人工タンパク質の分子認識能に着目し、「人工タンパク質の分子認識能によって、抗体の変性をドメイン特異的に識別できる多面的な高次構造分析は可能か」と提起した。本研究では、先行研究で開発した Fc 領域の変性構造を認識する人工タンパク質 AF.2A1 に加え、他の抗体ドメインの高次構造変性を特異的に認識する人工タンパク質を用いたバイオセンシング技術を開発する。これら複数の人工タンパク質をプローブとして用いることで、抗体の高次構造変性をドメイン単位で多面的に分析できる品質評価技術の確立を目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、抗体ドメインの変性構造に特異的な人工タンパク質プローブの作出と、各ドメイ

ンに特異的なプローブを用いた高次構造変性の多面的バイオセンシング技術の実証を目的とする。これまで先行研究で、抗体の Fc 領域の高次構造変性を認識する人工タンパク質 AF.2A1 を開発している。本計画では、分析対象を Fab 領域に展開し、Fab 領域の高次構造変性を特異的に認識する人工タンパク質の作出を研究対象とした。

各抗体ドメインは、大腸菌を用いた組換え発現系によって調製した。調製した抗体ドメインは酸性緩衝液によってタンパク質変性を促し、これを非天然型立体構造をもつ抗体ドメインとした。人工タンパク質の取得は、独自に構築した人工タンパク質ライブラリをバクテリオファージ T7 に提示したファージディスプレイ法を用いた。このライブラリは、10 残基で安定なヘアピン構造を形成する微小タンパク質シニョリンを分子骨格として、これにランダムなアミノ酸配列を導入した人工タンパク質から構成されている。これらの試料を用いて変性構造特異的な人工タンパク質を取得し、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法により、非天然型立体構造に対する親和性等を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Fab 定常領域 CH-CL ドメインを対象とした人工タンパク質の選択

Fab 領域の定常領域である CH1-CL ドメインを対象とした人工タンパク質の選択、高機能化を進めた。人工タンパク質の選択、高機能化は T7 バクテリオファージを用いたファージディスプレイ法に基づき、無作為配列の伸長と親和性選択によって、nM オーダーの平衡解離定数で CH1-CL ドメインに結合する人工タンパク質 AF.ab920 を取得した。表面プラズモン共鳴法により詳細な特徴付けを行い、天然型立体構造の Fab 領域と高次構造が破壊された非天然型立体構造の Fab 領域を厳密に識別することを確認した。抗体ドメインの特異性を評価するため、Fab 領域、Fc 領域、IgG の天然型立体構造と非天然型立体構造に対する結合を測定したところ、非天然型立体構造の Fab 領域と Fab 領域を含む IgG の双方に対して強い結合を示し、一方、非天然型立体構造 Fc 領域に対しては全く結合を示さなかった。また、天然型立体構造の Fab 領域、Fc 領域、IgG に

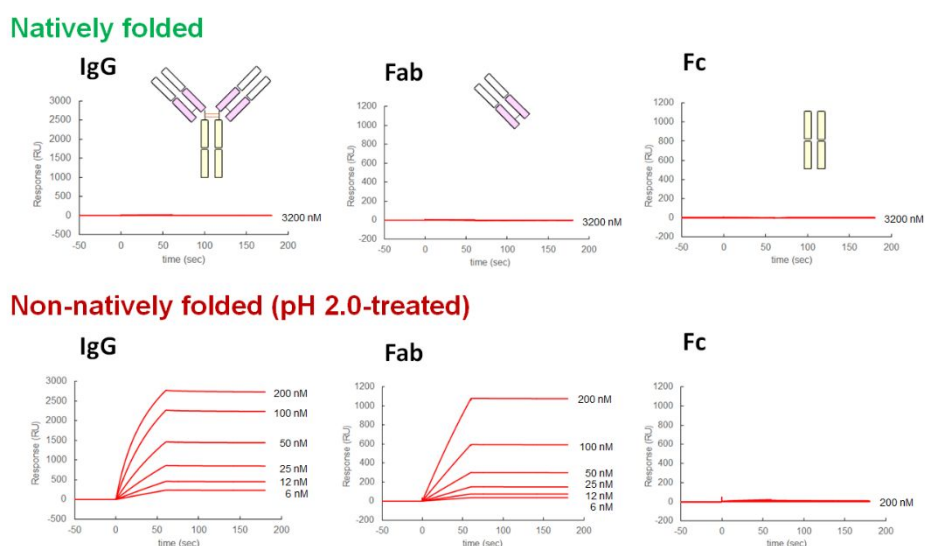


図 1. AF.ab920 と天然型および変性抗体との SPR センサーグラム

対してはいずれに対しても結合を示さなかった(図 1)。このことは、取得した小型人工タンパク

質が Fab 領域の天然型立体構造と非天然型立体構造を識別するのみならず、抗体ドメイン特異的に非天然型立体構造を識別していることを示している。

## (2) A Fab920 をプローブとした品質評価分析

治療用抗体を pH 4 ~ 2.8 の範囲で変化させた弱酸性緩衝液を用いて一定時間・一定温度の保管後に中和し、酸変性サンプルとした。抗体 Fab 領域を認識する人工タンパク質 AF.ab920 を表面プラズモン共鳴センサーチップに固定化し、酸変性サンプルを用いて結合応答を観測した。結合応答は pH 3 近傍から急激な上昇を示し、この条件下で Fab 領域の酸変性が明瞭に生じていることが示唆された。温度が

酸変性の抑制に与える影響を評価するため、pH 3 ~ 4 の範囲の酸処理温度依存性を評価し、急激な結合応答を示す温度・pH 条件、および酸変性を抑制できる条件を特定した。こうした pH・温度に鋭敏な高感度検出系は、抗体製造工程での工程パラメータ最適化にも有用と考える。

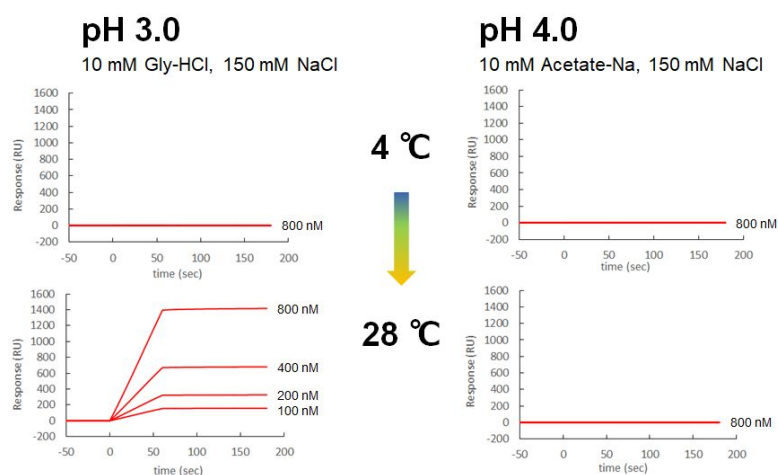


図 2. AF.ab920 を用いた抗体酸変性の pH、温度依存性試験。

高次構造変性を、タンパク質ドメイン単位で特異的に認識する分子は、天然・非天然由来を問わず極めてまれであり、これを技術基盤として高次構造変性を多面的に分析するバイオセンシング技術も未開発である。本研究で開発した人工タンパク質の分子認識能は、従来は非特異的な疎水性相互作用が支配的とみなされていた変性タンパク質の結合様式に、「変性構造の特異的な認識」という新たな視点・知見を提供した。本研究成果によって、抗体の変性領域の特定がドメイン単位で可能となり、高感度・高スループット性を特徴とするバイオセンシング技術の分析分解能が質的に向上することで、抗体医薬品の品質分析技術に適した高感度・高分解能・高スループット性を満たす高次構造分析技術が実現する。本研究の高次構造分析技術は、抗体医薬品の開発競争が激化する中、高品質な抗体医薬品の製造に貢献するものとして、技術的・経済的にも大きな波及効果が見込まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 0件）

1. 著者名 Hideki Watanabe, Chuya Yoshida, Ayako Ooishi, Yasuto Nakai, Momoko Ueda, Yutaka Isobe, and Shinya Honda	4. 巻 14
2. 論文標題 Histidine-Mediated Intramolecular Electrostatic Repulsion for Controlling pH-Dependent Protein-Protein Interaction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 2729-2736
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.9b00652	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 本田 真也、千賀 由佳子、今村 比呂志、野田 尚宏、宮房 孝光、渡邊 秀樹	4. 巻 34
2. 論文標題 バイオ医薬品の分析のコツ 品質評価のための基礎と応用 (第12回 バイオ医薬品に含まれる不純物)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ファームテックジャパン	6. 最初と最後の頁 1865-1877
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Takamitsu Miyafusa, Hideki Watanabe, and Shinya Honda	4. 巻 182
2. 論文標題 Local disorder of the C-terminal segment of the heavy chain as a common sign of stressed antibodies evidenced with a peptide affinity probe specific to non-native IgG	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 1697-1703
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijbiomac.2021.05.137.	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 渡邊秀樹、林田菜生子、本田真也
2. 発表標題 Domain-specific monitoring of higher-order structure of therapeutic IgG on the basis of molecular recognition of artificial proteins
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊 秀樹、本田 真也
2. 発表標題 抗体の高次構造変性を認識する人工タンパク質の創出と抗体品質分析技術への展開
3. 学会等名 第39回動物細胞工学シンポジウム「バイオ医薬品の高品質化に向けた物性解析」(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊 秀樹、林田 菜生子、本田 真也
2. 発表標題 人工タンパク質プローブによる抗体医薬品のドメイン特異的高次構造劣化モニタリング
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 渡邊 秀樹、八桁 清樹、今村 比呂志、本田 真也
2. 発表標題 Biosensing for quality control monitoring of the structural integrity of therapeutic antibodies
3. 学会等名 PepTalk: The Protein Science Week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 今村 比呂志、渡邊 秀樹、千賀 由佳子、本田 真也	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 15
3. 書名 タンパク質のアモルファス凝集と溶解性 基礎研究からバイオ産業・創薬研究への応用まで	

〔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
---------	---------