

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06597

研究課題名（和文）P2X4に対する高親和性抗体を利用した痛みを抑制する誘導体化抗体の開発

研究課題名（英文）Development of Pain-Inhibiting Derivatized Antibodies Using High-Affinity Antibodies to P2X4

研究代表者

阿部 義人（Abe, Yoshito）

国際医療福祉大学・福岡薬学部・教授

研究者番号：60315091

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）：「神経障害性疼痛」のターゲット分子もしくはバイオマーカーとして、ATP受容体であるP2X4は世界的に注目を集めている。これまで我々は、ラットミクログリア細胞表面上のP2X4を認識する10nMの高親和性を持つモノクローナル抗体を調製した。この抗体は、P2X4の機能に關与するATP結合部位近傍の立体構造を特異的に認識する。本研究では、痛み抑制を目的とし、この高親和性抗体の調製法の改良、アミノ酸変異型抗体へ金属キレートやATP加水分解酵素を付加した誘導体化抗体の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

P2X4に対して機能抑制効果のある分子は「痛み抑制分子」として、現在、世界に2000万人以上も存在する「神経障害性疼痛」に苦しんでいる患者の救済につながると考えられる。また、抗体に薬剤、酵素、タンパク質などを付加する誘導体化により、ターゲットを拡大する試みも行われている。そこで本研究では我々が調製した抗P2X4抗体を「痛み抑制分子」を付加することにより誘導体化し、P2X4機能抑制による「痛みの抑制」、さらに将来的にヒトをターゲットとした「痛み創薬」が可能になるのではないかと考えた。

研究成果の概要（英文）：Molecules that have an inhibitory effect on P2X4 are considered to be "pain suppressor molecules" that can help patients suffering from neuropathic pain, which currently affects more than 20 million people worldwide. In addition, attempts are being made to expand the target by derivatization, in which drugs, enzymes, or proteins are added to the antibody. We have prepared a monoclonal antibody with a high affinity of 10 nM that recognizes P2X4 on the surface of rat microglial cells. This antibody specifically can recognize the structure near the ATP-binding site involved in the function of P2X4. For the purpose of pain suppression, we improved the preparation method of this high affinity antibody and developed a derivatized antibody by adding metal chelates or ATP hydrolyzing enzymes using amino acid mutant antibodies.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：P2X4 抗体 神経障害性疼痛 タンパク質化学

1. 研究開始当初の背景

世界にはモルヒネも効かない痛み「神経障害性疼痛」等に罹患する患者が 2000 万人以上も存在し、救われ難い「痛み」に苦しんでいる。発症原因はガンの浸潤、外科手術の不手際、ヘルペスなど様々であるが、詳細なメカニズムは不明のため有効な治療法は確立されていない。九州大学薬学研究院の井上らは「脊髄内ミクログリアの異常な活性化とそこに発現する ATP 受容体サブタイプ P2X4 の刺激により神経障害性疼痛が発症する」ことを報告した [1]。この報告以降、P2X4 は神経障害性疼痛のターゲット分子として世界的に研究が進められている。P2X4 は ATP 結合に連動した Ca^{2+} 流入によってミクログリアの活性化を引き起こす。その ATP 結合と関連した細胞外ドメインの構造変化、チャネル開閉、 Ca^{2+} の流入のメカニズムは近年の X 線結晶解析などにより明らかにされてきている [2]。これらのメカニズムを基盤として ATP 結合、構造変化もしくはチャネルの開閉などを阻害すれば、直接痛みを抑制し、将来的にヒトをターゲットとした「痛み創薬」につながる。現在約 30 種類のターゲットタンパク質に対しての抗体医薬品が存在するが、抗体に薬剤、酵素、タンパク質などを付加する誘導体化 (ADC; Antibody-Drug Conjugate や ADEPT; Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy など) により、ターゲットを拡大する試みも行われている。そこで本研究では抗 P2X4 抗体を誘導体化し、P2X4 機能抑制による「痛みの抑制」が可能ではないかと考えた。

2. 研究の目的

抗体医薬品の創製には、高親和性と特異性をもったモノクローナル抗体が必要であるが、そのような抗 P2X4 抗体は存在していなかった。研究代表者らは痛み評価に用いる実験動物ラットの P2X4 のヘッドドメイン (P2X4 構造はイルカの形に例えられ、頭に相当する部分をヘッドドメイン“HD”と呼んでいる。以下 P2X4HD) を立体構造を持った状態での調製に成功した [3]。この P2X4HD を抗原とし、10nM の強い親和性を持ち、立体構造特異的に認識できる抗体を得ることができた [4]。さらにこの抗体は研究分担者の山下との共同研究によってラット脳ミクログリア細胞上の P2X4 の蛍光イメージングが可能であることを示すことができた。しかし本抗体は P2X4 の Ca^{2+} 流入を阻害する機能は持っていない。一方で P2X4 立体構造上では Ca^{2+} 流入を阻害する機能を持つ Cu^{2+} の結合部位 [3] 及び ATP の結合部位 [2] は抗体の P2X4 上のエピトープ部位と近接している。そこで本研究では ATP 結合阻害活性、加水分解活性を持った金属イオンをキレートした分子や ATP 加水分解酵素を導入した新規の誘導体化抗体を作製し (図 1)、ラットミクログリア細胞や動物を用いて、P2X4 の機能抑制が可能かを検討する。この検討がうまくいけば「誘導体化抗体を用いた痛み抑制分子開発」という分野を開拓できると考えている。

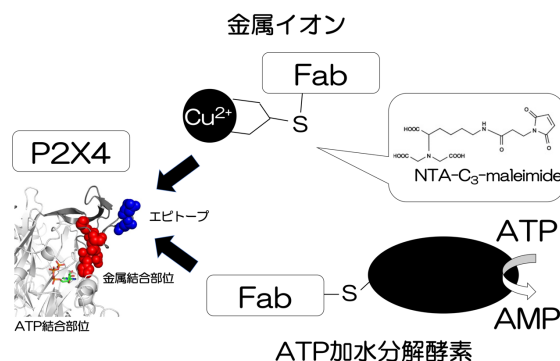


図 1. 誘導体化抗体の概念図

3. 研究の方法

1) 酵母 *Pichia Pastris* による Fab 大量調製系の確立

12-10H 抗体は大腸菌を用いて少量のリコンビナント Fab を調製できる。一方、以下の解析・検討のためには常時 10mg 程度回収できる大量調製法が必要である。よって酵母 *Pichia Pastris* を用いた発現系を確立する。当研究室では以前 *Pichia Pastris* を用いたヒト抗体 Fab 発現系を構築しており、他の抗体では 1L 培養あたり 10mg の発現量を得ている [5]。本研究ではこの方法を利用して、酵母による大量発現系の構築を目指した。

2) 複合体結晶構造解析

抗体と P2X4HD への結合部位は、エピトープ解析、パラトープ解析からわかっている。しかし阻害分子導入部位に後述の阻害化合物を効果的に導入するためには、抗体側の導入部位と P2X4 の阻害部位が相互作用するような部位間の詳細な距離情報が必要である。よって、P2X4HD と Fab の複合体の X 線結晶構造解析を行う。

3) システイン (Cys) 変異体の作成

リコンビナント Fab を利用し、2) で得られた複合体の立体構造情報をもとに抗体表面のアミノ酸を Cys

を置換し、阻害剤の位置を適切に配置できる変異体を作製する。また Cys 変異体から抗原結合活性および構造安定性に変化のないものもしくは向上したものを選択し、1)の大量調製を行う。

4) 化学修飾による P2X4 機能阻害分子導入

A. 金属イオンキレート化合物

3.で得られた Cys 変異体に金属イオンをキレートできる Maleimido-C₃-NTA などで化学修飾を行う。その後 Ca²⁺流入を阻害させる効果のある Cu²⁺をキレートさせ、結合と同時に Cu²⁺を P2X4 の機能阻害部位に配置できるようなコンジュゲート抗体を作成する。

B. ATP 加水分解酵素

Fab 変異体表面の Cys と ATP 加水分解酵素を架橋試薬による化学修飾を用いて、コンジュゲート抗体の作成を行う。ATP 加水分解酵素としては、ENTPD3(NTPase ファミリーの一種で ATP を P2X4 と親和性の低い AMP まで分解できる)を用いる。現在、本酵素の調製を検討しているが、調製がうまくいかない場合には、同様の ATP 加水分解活性を持つ市販のアピラーゼを利用する。その後、作成したコンジュゲート抗体の酵素活性および抗体としての結合活性などを調べる。

5) P2X4 機能抑制の確認

作成した誘導体化 Fab とラット P2X4 が発現したヒト 1321N1 細胞もしくはラットの初代培養ミクログリア細胞の Ca²⁺流入機能を検出し、P2X4 の機能抑制が実際に可能かどうかを確認する。さらにラットを用いて実際に痛みの抑制が可能かどうかを調べる。

4. 研究成果

1) 酵母 *Pichia Pastris* による Fab 大量調製系の確立

Pichia Pastris を用いた発現系に関しては、12-10H 抗体の Fab フラグメント部分の H 鎖および L 鎖を発現ベクター pPICZ α に同時に組み込み、X33 株を形質転換することによって、発現株を作成した。作成した発現株より、培養を行い、抗マウス Fab 抗体を用いた ELISA によって、その発現量を評価した。発現量が少なかった(1L 培地あたり 1mg 以下)ため、崇城大学大栗誉敏教授からの助言をもとに、培地の pH、誘導日数、分泌シグナルペプチドの変更、コドンの最適化などを行ったが、発現量は増えなかった。

一方で、大腸菌発現系の改良を試みた。これまでの大腸菌発現系では、H 鎖、L 鎖を封入体としてそれぞれ発現し、巻き戻し、精製を行い調製していた。この方法では、1mg/1L 培地程度の回収率を得ることが可能である[6]。しかしながら、巻き戻しに手間と時間がかかる。そこで2つの標的遺伝子を同時に発現できる pCOLADuet ベクターと S-S 結合形成を促進させる ShuffleT7 株を用いて、大腸菌培養で可溶性の抗 P2X4 抗体 Fab を簡便に回収できる方法を検討し、LB 培地 1L 中 200 μg の Fab を得ることができるようになった。さらに、本 Fab の1アミノ酸変異体で、結合親和性を変えることなく発現量が 6~7 倍増加することを見出した(図2)。このアミノ酸変異によってなぜ発現量の上昇が見られるかという疑問は令和3年度からの基盤研究(C)「抗 P2X4 抗体 Fab の構造を基盤とした大腸菌発現の改良および Fab の高機能化」にて調べる予定である。また、この結果は国際学会 Neuro2019 や第 93 回日本生化学会大会において発表した。

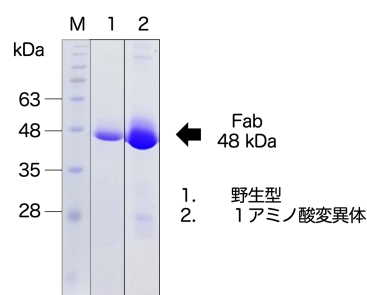


図2. 大腸菌発現による Fab の発現、精製

2) 複合体結晶構造解析

種々の結晶化条件を検討したが、複合体の結晶を得ることができなかった。結晶構造解析は困難であったが、論文として発表したエピトープ、パラトープ情報[4,6]を利用し、ドッキングモデル作成ソフト Rosetta(<https://rosie.rosettacommons.org>)により複合体モデルを作成し、以降の Cys 変異体のデザインに利用した。

3) システイン(Cys)変異体の作成

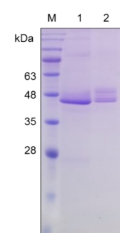
1)で作成した大腸菌抗体発現株を利用し、発現ベクターに変異を加え、12-10HFab のアミノ酸変異体を作成した。モデル構造をもとに、Fab の L 鎖表面にある Thr63, Ser65, Ser67, Thr72 をシステインに変

異したものを作成し、培養精製を行なった。その結果いずれの変異体も発現量が野生型よりも少なく、以後の解析が困難であると判断した。そこで、N 末端からペプチド鎖を伸ばし Cys を導入した-7C 変異体を作成したところ、野生型の半分程度の収量で回収することができた。-7C 変異体に関しては、Biacore を用いて抗原である P2X4 ヘッドドメインとの結合を調べたところ、結合活性は野生型と同等であることも確認し、これを以下の実験に用いることにした。Cys 変異体に関しては、回収率が悪いものが多いため、今後も種々の解析を進めていくことで、回収率の改善をすることが必要と考えている。

4) 化学修飾による P2X4 機能阻害分子導入

A. 金属イオンキレート化合物

3)で作成した-7C 変異体を使って Maleimido-C₃-NTA による化学修飾反応が起こるかを調べた。反応生成物を SDS-PAGE (図3)、陽イオン交換 HPLC、MALDI-TOF 型質量分析によって調べ、一部化学修飾が起こっていると考えられた。一方で、銅イオン存在下で、P2X4 ヘッドドメインへの結合活性を測定したが、期待した結合力の上昇は現時点で見えていないため、修飾部位の変更などを引き続き検討している。



M: マーカー
1: 反応前
2: 反応後

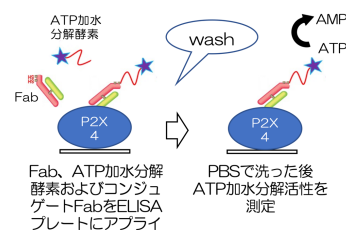
図3. Maleimido-C₃-NTA による化学修飾反応

B. ATP 加水分解酵素

計画初期では 12-10H Fab のシステイン変異体の大量調製が困難であった。そこでハイブリドーマ細胞から IgG 抗体として 12-10H 抗体を得て、ペプシン消化を行い、F(ab')₂ フラグメントを調製した。さらに、これを 2-メルカプトエタノールアミンで C 末端の分子間 S-S 結合を還元したものをゲル濾過クロマトグラフィーで精製し、を Fab' フラグメントとして以後の実験に使用した。

ATP 加水分解酵素は、cDNA を購入したマウス ENTPD3 を用いて、大腸菌発現系から得られたものを利用しようとした。ENTPD3 は不溶体として発現したため、活性体を得るため、種々の巻き戻し条件の検討、変異体の作成を行ったが、活性のある ENTPD3 を得ることはできなかった。ENTPD3 の発現に関しては、シンガポール大学理学部の Kini R Manjunatha 教授のもとに伺い、その発現系に関してアドバイスをいただいております、今後の検討課題としています。

リコンビナント ENTPD3 の活性体を得ることができなかったため、市販のジャガイモアピラーゼ (Sigma 社) を購入し、架橋実験を行うこととした。架橋は、アピラーゼ表面のアミノ基と Fab 由来の SH 基に対して、架橋試薬 BMPS (Thermo Fisher 社) により行った。SDS-PAGE 後の抗マウス Fab 抗体によるウェスタンブロッティングにより、一部がコンジュゲート Fab として、高分子量にバンドが出ていることを確認した。さらに ELISA プレートに P2X4HD を固定化し、コンジュゲート Fab を加え、洗浄後、P2X4HD に結合した架橋反応産物が ATP 加水分解活性を持つかどうかを、生じた無水リン酸の定量により確認した。その結果、アピラーゼおよび Fab' 単独では確認できなかった ATP 加水分解活性を確認することができた (図4)。しかしながら架橋産物が未反応物に比べ少量であり、精製も困難であったことから、pH、温度、反応時間などの反応条件を検討したが、収量の大幅な増加は見られなかった。収量の増加を目指し、架橋条件、架橋試薬の検討、3) で作成した Cys 変異体の利用などを行ったが、現時点で収量の大幅な増加は確認していない。今後さらなる検討を重ねる予定である。



コンジュゲート Fab の活性測定

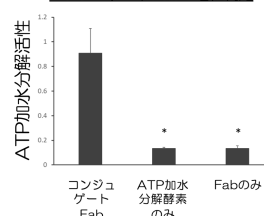


図4. ATP加水分解酵素
コンジュゲート Fab の調製と評価

5) P2X4 機能抑制の確認

ラット P2X4 が発現したヒト 1321N1 細胞を用いて、抗体を付加させていないジャガイモアピラーゼ単独では Ca²⁺流入阻害が起こることは確認できた。しかし、4)で作成した架橋産物については収量増加ができなかったため、細胞での阻害活性の確認はまだ行っていない。

6) その他

タイチュラロンコン大学薬学部 Phoolcharoen, W 准教授とともに、抗 PD1 抗体を植物から発現し、その

構造解析を行ない、共著論文として発表した[7]。また、凝集性のあるヒト抗体 L 鎖可変領域に関して、O-結合型糖鎖の影響を調べた[8]。これらの研究は、本研究結果とともに、令和 3 年度からの基盤研究 (C)「抗 P2X4 抗体 Fab の構造を基盤とした大腸菌発現の改良および Fab の高機能化」の研究につながる結果になると考えられるため、ここに記載する。

5. 引用文献

(ゴシック体で記載したものは、本研究計画期間に発表した論文を表す。)

- [1] Tsuda M et al. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature*. 2003 424:778-83.
- [2] Hattori M and Gouaux E. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature*. 2012 485:207-12.
- [3] Igawa T et al. Solution structure of the rat P2X4 receptor head domain involved in inhibitory metal binding. *FEBS Lett*. 2015 589:680-6.
- [4] Igawa T et al. Evidence for detection of rat P2X4 receptor expressed on cells by generating monoclonal antibodies recognizing the native structure. *Purinekirgic Signal*. 2019 15:27-35.
- [5] Ohkuri T et al. Characterization of deamidation at Asn138 in L-chain of recombinant humanized Fab expressed from *Pichia pastoris*. *J Biochem*. 2013 154:333-40.
- [6] Igawa T et al. Analysis of binding residues in monoclonal antibody with high affinity for the head domain of the rat P2X4 receptor. *J Biochem*. 2021 169:491-496.
- [7] Rattanapisit K et al. Structural and In Vitro Functional Analyses of Novel Plant-Produced Anti-Human PD1 Antibody. *Sci Rep*. 2019 9:15205.
- [8] Abe Y et al. Effect of O-glycosylation on amyloid fibril formation of the variable domain in the V λ 6 light chain mutant Wil. *Int J Biol Macromol*. 2021 166:342-351.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Igawa Tatsuhiko, Kishikawa Shuhei, Abe Yoshito, Tsuda Makoto, Inoue Kazuhide, Ueda Tadashi	4. 巻 169
2. 論文標題 Analysis of binding residues in monoclonal antibody with high affinity for the head domain of the rat P2X4 receptor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 491 ~ 496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa124	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 Abe Yoshito, Shibata Hinako, Oyama Kousuke, Ueda Tadashi	4. 巻 166
2. 論文標題 Effect of O-glycosylation on amyloid fibril formation of the variable domain in the V 6 light chain mutant W11	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 342 ~ 351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.194	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 Rattanapisit Kaewta, Phakham Tanapati, Buranapraditkun Supranee, Siritwattananon Konlavat, Boonkrai Chatikorn, Pisitkun Trairak, Hirankarn Nattiya, Strasser Richard, Abe Yoshito, Phoolcharoen Waranyoo	4. 巻 9
2. 論文標題 Structural and In Vitro Functional Analyses of Novel Plant-Produced Anti-Human PD1 Antibody	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-51656-1	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 該当する

1. 著者名 Igawa Tatsuhiko, Kishikawa Shuhei, Abe Yoshito, Yamashita Tomohiro, Nagai Saki, Shiroishi Mitsunori, Shinozaki Chinatsu, Tanaka Hiroyuki, Tozaki-Saitoh Hidetoshi, Tsuda Makoto, Inoue Kazuhide, Ueda Tadashi	4. 巻 15
2. 論文標題 Evidence for detection of rat P2X4 receptor expressed on cells by generating monoclonal antibodies recognizing the native structure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Purinergic Signalling	6. 最初と最後の頁 27 ~ 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11302-019-09646-5	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6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 御供田将士、阿部義人、宮原果歩、カアベイロホセ、植田正
2. 発表標題 大腸菌による可溶性抗P2X4受容体Fabの発現系の構築
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshito Abe, Tatsuhiro Igawa, Shuhei Kishikawa, Tomohiro Yamashita, Hiroyuki Tanaka, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Makoto Tsuda, Kazuhide Inoue, Tadashi Ueda
2. 発表標題 Preparation of monoclonal antibody for rat P2X4 receptor recognizing the native structure
3. 学会等名 Neuro2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masashi Otomoda, Yoshito Abe, Tatsuhiro Igawa, Shuhei Kishikawa, Caaveiro Jose, Tadashi Ueda
2. 発表標題 Establishment of Escherichia coli expression system of Fab fragment of anti-P2X4 antibody recognizing native P2X4 receptor
3. 学会等名 Neuro2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部義人
2. 発表標題 抗P2X4受容体抗体の作成 ~ 抗原および抗体の調製について ~
3. 学会等名 バイオインターラクション研究会 第3回ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阿部義人
2. 発表標題 抗痛み受容体抗体作成への挑戦
3. 学会等名 21世紀を明るく科学する会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 御供田将士、阿部義人、井川達弘、岸川秀平、Caaveiro Jose、植田正
2. 発表標題 抗ラットP2X4 head domain抗体Fab断片の大腸菌を用いた新たな発現系の確立
3. 学会等名 第6回生命分子科学研究会
4. 発表年 2019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
研究 分 担 者	山下 智大 (Yamashita Tomohiro) (30645635)	九州大学・薬学研究院・助教 (17102)	

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
---------	---------