

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06959

研究課題名(和文)細胞膜タンパク質の天然構造を用いた構造エピトープ同定法

研究課題名(英文)Detection of epitope using native structure of a membrane protein

研究代表者

伊勢 知子(Ise, Tomoko)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 創薬デザイン研究センター・プロジェクト研究員

研究者番号：20771900

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)：治療抗体として望ましい機能を示す抗体を効果的に選別するには、取得した抗体の抗体結合部位(エピトープ)をいち早く解析し、機能に相関するエピトープを同定することが重要である。しかし、生体膜上で発現する膜抗原の天然高次構造を従来のエピトープ同定法に用いるには、抗体の精製や標識など多大な労力と時間を要するため、技術的に困難であった。本研究では、蛍光ビーズを使ったフローサイトメトリーを用いて、これまで簡単ではなかった、生体膜上に発現した膜抗原の天然構造に対する抗体結合の競合阻害を検出できる新規エピトープ同定法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高次構造が保たれている天然膜抗原を発現させた細胞を用いたフローサイトメトリーにより、その抗原に結合する抗体を未精製、未標識の状態でも行え、しかも、膜抗原に普遍的に応用できる可能性がある新しいエピトープ同定法を開発した。これにより、従来の方法では多大な時間と労力を要していた、高次構造に基づいたエピトープグループの同定を、抗体取得の早い段階で容易にできるようになることが期待される。高次構造があって初めて現れるエピトープグループは、その膜抗原において重要な機能に関連している可能性があり、この点においても新しい治療抗体開発への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：To effectively select antibodies that exhibit desirable functions as therapeutic antibodies, it is important to quickly analyze the antibody binding sites (epitopes) of the obtained antibodies and identify epitopes that correlate with their functions. However, it is technically challenging to use the native higher-order structure of membrane antigens expressed on biological membranes for conventional epitope identification methods because it requires much labor and time, such as antibody purification and labeling. In this study, using flow cytometry using fluorescent beads, we developed a novel epitope identification method that can detect competitive inhibition of antibody binding to the native structure of membrane antigens expressed on biological membranes, which has been difficult to date.

研究分野：免疫学

キーワード：抗体 エピトープ 膜抗原 競合結合阻害 フローサイトメトリー

1. 研究開始当初の背景

- (1) 抗体の機能は大きく抗原の抗体結合部位（エピトープ）に依存することから、機能を有する治療抗体の開発のためには、取得した抗体の機能に 관련된 エピトープを早い段階で迅速に同定することが重要である。抗原機能に 관련된 エピトープの同定法としては、抗体相互の競合結合を測定し、その結果を基準にして抗体をグルーピングする手法（ビンニング：binning）が有効であることがよく知られている。しかしながら、膜抗原の場合、エピトープの高次構造を保持するには、抗原と膜との相互作用も重要であるため、膜に発現した、全長の抗原分子と抗体の結合を解析する必要がある。このためには、各モノクローナル抗体を精製し、さらにラベルして競合阻害実験を行う必要があり、非常に煩雑であるため、そのことが開発候補抗体の迅速な選択を妨げてきた。
- (2) 一方、抗原ペプチド断片やアラニンスキャンなどのアミノ酸置換の変異体を用いるエピトープ同定法は、抗原のアミノ酸一次配列上の部分を記述できるという点で、汎用されてきた。しかし、これらの方法では本来の高次構造を保った抗原を用いていないため、同定できるエピトープは限られており、膜抗原をターゲットとすることが多い治療抗体のエピトープ同定には適していない。
- (3) 我々がこれまでに開発した、各抗体のペアの競合阻害を両者の抗体の逐次結合として検出するエピトープ同定法は、アミノ酸配列上不連続な構造上のエピトープを含めて抗体を分類できる方法であり、しかも、各々の抗体の精製も標識も必要がないという点で画期的であった。しかし、膜タンパク質の細胞外ドメインとIgG Fc部分との融合タンパク質を用いたELISAの系であるため、融合タンパク質として発現できるような抗原で、しかも融合タンパクにしても高次構造が変わらないような抗原でしか、実際の膜抗原における結合モードを再現できていない可能性があり、膜抗原に普遍的に適用できる方法ではなかった。
- (4) 本来の高次構造を保った抗原に対する反応性を評価するには、生細胞に発現した全長抗原を用いたフローサイトメトリーが最も適していると考えられた。

2. 研究の目的

高次構造が保たれている天然膜抗原を発現させた細胞を用いたフローサイトメトリーにより、その抗原に結合する抗体を未精製、未標識の状態でも用いても行え、しかも、膜抗原に普遍的に応用できる新しいエピトープ同定法を探究する。これにより、従来の方法では多大な時間と労力を要していた、高次構造に基づいたエピトープグループの同定を、抗体取得の早い段階で容易にできるようになる。抗原全長の高次構造があって初めて同定できるコンフォメーションナルエピトープグループは、その標的膜抗原において重要な機能に関連している可能性が高く、この点においても治療抗体開発促進への貢献が期待できる。

3. 研究の方法

本研究では、競合結合阻害の実験を多くの抗体を用いて体系的、網羅的に行うことでその有用性を検証するため、ある程度の数の抗体群からなる抗体パネルが必要であった。そこで、我々が既に7抗体からなる抗体パネルを取得している、細胞膜タンパク質のひとつである TNF レセプター2 (TNFR2) をモデル抗原として用いた。

- (1) TNFR2 を細胞膜上に発現させた細胞と蛍光ビーズを用いて、フローサイトメトリーにより抗体の競合結合阻害を検出できる条件を検討した。

抗原 TNFR2 を発現した細胞の調整：293T 細胞に TNFR2 発現プラスミドを導入し、細胞膜上に TNFR2 を発現させた細胞を用いた。

抗体コート蛍光ビーズの調整：様々なサイズ径の蛍光ビーズを購入し、抗マウス IgG ポリクローナル抗体を介して抗 TNFR2 抗体をコートしたものを用意した。この抗体コートビーズと の細胞をインキュベートした後、フローサイトメトリーで解析し、抗体を介して結合した蛍光ビーズのシグナルを細胞上に効率よく検出できる条件を検討した。

競合阻害の検出： の細胞に過剰量の無標識競合抗体 1 を加えた後、 で調整した抗体 2 コートビーズを添加し、細胞上にビーズの蛍光シグナルが検出される細胞をフローサイトメトリーで解析した。抗体 1 と抗体 2 が同じエピトープグループに属する場合は抗体 2 が細胞に結合しないため細胞上にビーズの蛍光シグナルは検出されず、抗体 1 と抗体 2 のエピトープが異なる場合にのみ、抗体 2 が細胞に結合してシグナルが検出されることになる。この競合阻害実験を 7 抗体すべての組み合わせについて行い、その結果に基づいてエピトープのグルーピングを行った。

- (2) (1) で行った新規エピトープ同定法の有用性を検証した。

我々の従来の競合阻害実験：抗原として TNFR2 の細胞外ドメインと IgG Fc との融合タンパク質を用いた競合阻害実験を行った。

ドメインキメラ変異体：TNFR スーパーファミリーの分子は、一つ一つの細胞外ドメイン内に含まれるシステイン同士が形成するジスルフィド結合により、安定したドメイン構造をとるという特徴がある。そこで、高次構造が保持されるように、ヒト TNFR2 の 4 つの細胞外ドメインそれぞれをマウス TNFR2 のものと入れ替えたキメラ変異体の発現プラスミドを作製し、これを導入した 293T 細胞を用いてフローサイトメトリーで抗体の反応性を調べた。

TNFR2 オルソログ：オルソログもまた、高次構造を保った天然の変異体として、エピトープのグルーピングに利用することができる。ヒト TNFR2 の他にマウス、ラット、ウシ、カニクイザル、ラッコ、コクレルシファカの TNFR2 発現プラスミドを作製し、 と同様にフローサイトメトリーを行った。

4. 研究成果

- (1) 天然膜抗原を細胞膜上に発現させた細胞と蛍光ビーズを用いたフローサイトメトリーにより、抗体の競合結合阻害に基づいたエピトープマッピング法を確立した。

この方法では、蛍光を検出できる細胞の割合がもともと少ない上に発現量もまちまちなため、抗原 TNFR2 のみを発現した 293T 細胞では競合阻害の検出は不可能であった。そこで、抗原発現量の指標として蛍光タンパク質である TagBFP を同時発現できる抗原発現プラスミドを作製し、これを細胞導入する方法により、抗原の発現量を TagBFP の蛍光シグナル量として評価すると同時に、抗体の抗原に対する反応性を R-PE の別のスペクトル蛍光チャンネルで定量的に評価し、競合阻害を高感度で検出することを可能にした。

様々なサイズ径の蛍光ビーズを試し、検出効率が最大となる径のビーズを使用した。使用するビーズの数は、多すぎると死細胞が増加し、少ないと蛍光を検出できる細胞数が減少したため、死細胞がほとんど生じない条件に設定することで、競合阻害の検出を可能にした。

競合抗体なしに抗体コートビーズを添加したときに、細胞上にビーズの蛍光シグナルが検出される細

胞数に比較して、競合抗体存在下でその数がどれだけ減少するかを結合%で算出した。この競合阻害実験をすべての抗体の組み合わせについて行い、その結果に基づいてエピトープのグルーピングを行うことができた(図1)。

		indicator mAb (beads)						
		抗体1	抗体2	抗体3	抗体4	抗体5	抗体6	抗体7
competitor mAb	抗体1	15	52	84	73	77	38	43
	抗体2	27	5	53	67	63	55	50
	抗体3	99	87	18	17	81	78	86
	抗体4	92	78	14	15	80	84	60
	抗体5	89	84	80	65	19	36	82
	抗体6	75	76	70	84	40	11	60
	抗体7	54	52	81	74	86	75	9

図1 抗原発現細胞と蛍光ビーズをコートした抗体を用いたフローサイトメトリーによる競合阻害法に基づく抗TNFR2抗体のエピトープグルーピング。競合抗体なしでのビーズの蛍光を検出できる細胞数100に対する競合抗体存在下での蛍光細胞数の割合。

		indicator mAb						
		抗体1	抗体2	抗体3	抗体4	抗体5	抗体6	抗体7
competitor mAb	抗体1	58	81	98	97	102	104	88
	抗体2	53	51	99	99	98	100	86
	抗体3	100	100	55	55	100	102	102
	抗体4	98	99	53	52	100	105	101
	抗体5	102	99	99	99	64	55	99
	抗体6	100	99	99	100	66	52	100
	抗体7	78	89	96	97	98	101	42

図2 TNFR2の細胞外ドメインとIgG Fcとの融合タンパク質を用いた競合阻害法による抗TNFR2抗体のエピトープグルーピング。競合抗体なしでのシグナル100に対する競合抗体存在下でのシグナルの割合。

(2) (1)で行った新規エピトープ同定法によるエピトープグルーピングの結果を、我々の従来の競合阻害実験(図2)、ドメインキメラ変異体およびTNFR2 オルソログとの反応性(図3)と比較した結果、新規方法によるグルーピングがこれらの方法でのものと矛盾しないものとなった。これにより、新規方法の有用性が示された。

	Wt	MC1	MC2	MC3	MC4	マウス	ラット	カニクイザル	ウシ	ラッコ	コクレルシファカ
抗体1	100	75	79	4	111	0	0	24	3	101	11
抗体2	100	66	77	0	106	2	0	78	34	2	85
抗体3	100	70	81	0	84	1	0	100	2	0	0
抗体4	100	59	72	0	63	3	0	102	4	0	0
抗体5	100	60	0	69	108	0	0	94	3	0	0
抗体6	100	67	0	61	105	0	0	111	3	0	0
抗体7	100	0	0	61	99	2	0	104	3	1	0

図3 抗原の全長を発現させた細胞を用いたフローサイトメトリーにおける抗体の反応性。ヒトTNFR2(Wt)に対する反応性logMFIを100としたときの変異体に対する反応性の割合。MC1-4:ヒトTNFR2の細胞外ドメイン1-4をそれぞれマウスTNFR2の細胞外ドメイン1-4に置き換えた変異体。

(3) 今後は、他の膜抗原についてもこの方法でエピトープを同定できるか、をさらに検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Akiba H, Ise T, Nagata S, Kamada H, Ohno H, Tsumoto K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Production of IgG1-based bispecific antibody without extra cysteine residue via intein-mediated protein trans-splicing.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19411
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-98855-3	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 秋葉宏樹、藤田純三、伊勢知子、西山健太郎、宮田知子、加藤貴之、難波啓一、大野浩章、鎌田春彦、永田諭志、津本浩平
2. 発表標題 抗TNFR2バイパラトピックアンタゴニスト抗体の特性解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 秋葉 宏樹、永田 諭志、伊勢 知子、鎌田 春彦、大野 浩章、津本 浩平
2. 発表標題 TNFR2アンタゴニスト抗体のバイパラトピック抗体による高機能化
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 秋葉宏樹、永田諭志、伊勢知子、大野浩章、鎌田春彦
2. 発表標題 複数種オルソログ配列を利用したCD30/TNFRSF8に対する抗体群エピトープの精密同定
3. 学会等名 第23回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秋葉宏樹、永田諭志、伊勢知子、鎌田春彦、大野浩章、津本浩平
2. 発表標題 Intein-mediated protein trans-splicing の最適化による パイパラトピック抗体セレクション
3. 学会等名 第16回バイオ関連シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秋葉宏樹、永田諭志、伊勢知子、西山健太郎、黒田大祐、藤田純三、宮田知子、加藤貴之、大野浩章、鎌田春彦、津本浩平
2. 発表標題 パイパラトピック抗体を利用したTNFR2アゴニスト・アンタゴニストの合理的デザイン
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会 若手奨励賞シンポジウム
4. 発表年 2022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

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