

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：17501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21255

研究課題名(和文)がん関連タンパク質の働きを同時に制御するハイブリッド抗体酵素の開発

研究課題名(英文)Development of a hybridized catalytic antibody regulating the function of cancer-related proteins

研究代表者

一三三 恵美(HIFUMI, EMI)

大分大学・研究マネジメント機構・教授

研究者番号：90254606

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文):生体内では、がん化した異常細胞の攻撃役としてT細胞が用意されている。このT細胞を活性化状態で維持すれば、がんの種類とは無関係に殺傷出来る。しかしながら、がん細胞の中には、T細胞からの攻撃を回避するためのツール(PD-L1)を発現しているものがある。T細胞がPD-L1により不活性化されると、がん細胞の増殖を抑えることが出来ず、病態は悪化の一途を辿る。本研究では、研究代表者独自の抗体酵素作製技術を用いてT細胞上のPD-1とがん細胞上PD-L1に対する抗体酵素の作製を進め、ハイブリッド化を行った。また、今回作製した抗体酵素は新たな活性サイトを構築していることを明らかにし、抗体酵素の可能性を広げた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複数のがん関連タンパク質を同時に制御する革新的な「機能性分子標的薬」の創出に繋がり、新ジャンルを切り開く先駆けとなる技術である。標的タンパク質(抗原)を変えることで、標的分子型の抗体医薬は勿論のこと、感染症や自己免疫疾患などの幅広い疾患に適用出来る。ADCC活性やCDC活性を必要としないので、生体外での使用も可能となるのに加えて、通常の抗体よりもピンポイントで標的を絞り込み、抗原を不活化する事が可能であるため、例えばRNAウイルスの保存領域などの重要・かつ極めて狭い(限られた)領域もターゲットとして扱うことが出来る。

研究成果の概要(英文):T-cells are existing in our body and play a role in attacking cancer and/or abnormal cells. When these T cells are kept in an activated state, they can attack and eliminate cancer cells regardless of the type of cancer. However, some cancer cells express a ligand PD-L1 to avoid from attacking of T cells. Once T-cells are inactivated by PD-L1, they cannot suppress the proliferation of cancer cells, resulted in the progression of the disease. In this study, we advanced the production of catalytic antibody targeting both PD-1 on T cells and PD-L1 on cancer cells by using our unique technology. As the results, we succeeded in the production of a hybridized catalytic antibody to simultaneously degrade both PD-1 and PD-L1 molecules. In addition, the catalytic antibody produced in this study possessed a new active site and expanded the potential of application of catalytic antibody.

研究分野：抗体工学

キーワード：抗体酵素 免疫チェックポイント PD-1 PD-L1 抗体軽鎖

1. 研究開始当初の背景

生体内では、がん化した異常細胞の攻撃役として T 細胞が用意されている。この T 細胞を活性状態で維持すれば、がんの種類とは無関係にこれを殺傷することが出来る。しかしながら、T 細胞の暴走が起こると正常細胞に傷害を及ぼすため、健全な状態では、T 細胞に発現している「活性化分子群」と「活性抑制分子群」によりその活性はコントロールされている (図 1)。PD-1 分子 (programmed cell death-1, 免疫チェックポイント分子: 本庶らが発見、*EMBO J*, 1992) は、活性抑制分子群の一つで、がん細胞の増殖・抑制に深く関与していることから、そのリガンドである PD-L1 分子とともに、世界的な注目が集まっている。健全な状態では、PD-L1 分子は抗原提示細胞表面に発現され、T 細胞の暴走を防ぐ役割を担っている。

ところが、一部のがん細胞は自ら PD-L1 分子を発現し、PD-1 分子を活性化させることで T 細胞を不活性化して攻撃を回避することが知られている (図 2)。PD-1 分子に対する抗体医薬の“Nivolumab”は、PD-1/PD-L1 結合を阻害することで、PD-L1 発現性がん細胞による T 細胞の不活性化を防ぐもので、免疫療法が成功した典型例である。しかしながら皮膚がんなどに対する奏効率は 20~30%と低く、副作用も報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、奏効率の向上と副作用の軽減を目指して、T 細胞とがん細胞の双方に作用して T 細胞の不活性化を防ぐハイブリッド型抗体酵素の開発を計画した。抗体酵素は、PD-1 分子と PD-L1 分子を削り取る (分解する) ので、PD-L1 発現性がん細胞による T 細胞の不活性化をより確実に防ぐことが出来、がん細胞は効率的に処理される。一方で、T 細胞上の PD-1 分子は抗体酵素によって一旦は削り取られるが、遺伝子は残っているので PD-1 分子は再び発現されて、T 細胞は健全な状態に戻る。従って、T 細胞の暴走による副作用は回避出来ると考えられる。

代表者は申請前の段階からこの方向での研究に着手しており、PD-1 分子に対する軽鎖型抗体酵素は取得していた (第 13 回バイオ関連シンポジウム)。そこで、本研究では PD-L1 に対する抗体酵素の取得から開始し、両抗体酵素のハイブリッド化を進めることとした。これは次世代に向けた「新しい分子標的薬」であり、日本独自技術で完成させる意義は大きい。

3. 研究の方法

(1) 合成基質 FRET-peptide(MCA/DNP 系)の設計と作製:

PD-L1 に対する抗体酵素の取得で使用するスクリーニング用のペプチド抗原を用意した。具体的には、PD-L1 と PD-1 の相互作用を調べ、PD-1 との結合部位近傍のペプチド配列を元に、FRET 修飾に適した配列を選択した。2 カ所の配列を元にペプチドを合成し、N 末端に蛍光基の MCA、C 末端に消光基の DNP を導入して FRET-peptide とした。

(2) PD-L1 に対する軽鎖型抗体酵素の探索:

一二三研究室では、抗体軽鎖遺伝子の特徴に着目する手法で、軽鎖型抗体酵素ライブラリーを作製し、大腸菌で発現・精製することで軽鎖タンパクをバンク化している。この「軽鎖型抗体酵素バンク」に対して (1) で用意した FRET-PD-L1 peptide によるスクリーニングを実施した。

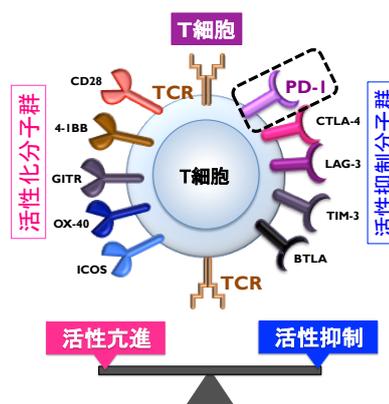


図 1 T 細胞上の活性化や抑制に関連する分子群

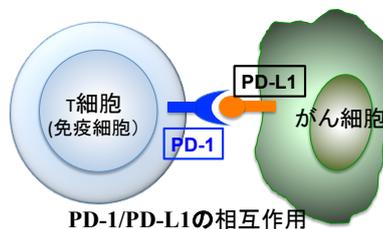


図 2 PD-1/PD-L1 相互作用:がん細胞の PD-L1 が T 細胞の PD-1 に結合することで T 細胞は不活性化し、がん細胞を攻撃しなくなる。

(3) PD-1 に対するスーパー抗体酵素 H34 のキャラクタリゼーション :

H34 クローンは PD-1 分子を分解するユニークな抗体軽鎖型抗体酵素である。しかしながらこのクローンは、通常の Asp, Ser, His からなる触媒三ツ組残基が存在しない。そこで本研究では、分子モデリングの結果を元に触媒サイトを推定し、遺伝子工学的手法による検証を進めた。具体的には、6 種類の変異体 (図 5) を作製して大腸菌の系で発現・精製し、FRET-PD-1 peptide や rec PD-1 タンパクに対する免疫学的反応性や、分解活性を調べた。

(4) ハイブリッド抗体酵素の設計 :

PD-L1 を分解する軽鎖型抗体酵素を作製後、PD-1 を分解する H34 クローンとのハイブリッド型抗体酵素 (ScFv 型) を設計し、遺伝子工学的手法による作製を進めた。発現には pET20b(+) プラスミドと大腸菌 BL21(DE3)pLysS を用い、IPTG 誘導を行った菌体から可溶性画分を調整し、Ni-NTA カラムクロマトグラフィー (QIAGEN) と陽イオン交換クロマトグラフィー (TOSOH, TSK gel SP-5PW) による精製を行った。

(5) ハイブリッド抗体酵素の性能試験 :

作製したハイブリッド型抗体酵素が、2 つの標的分子 PD-1 と PD-L1 分子が共存する環境下で機能するか否かを判断するために、これまでの「MCA/DNP 系」FRET-peptide に加えて、「EDANS(蛍光基)/DABCYL(消光基)系」の FRET-peptide を用意した。これらの FRET 基質とハイブリッド型抗体酵素(scFv type bifunctional catalytic antibody)とを反応させ、その分解性能を検証した。

4. 研究成果

(1) 合成基質 FRET-peptide(MCA/DNP 系)の設計と作製

PD-L1 の立体構造を図 3a に、そのアミノ酸配列を図 3b に示す。図 3b において赤の矢印で示した領域が PD-L1 の C または C' strand、緑の矢印で示している領域が、PD-L1 の F または G strand で、これらの領域が PD-1 と相互作用している。そこで本研究では前者の E60 から V76 まで (図 3a の赤リボン) と、後者の I116 から A132 まで (図 3a の緑リボン) を標的にした FRET-PD-L1 peptide を合成した。前者を FRET-PDL-1(60-76)、後者を FRET-PDL-1(116-132)と称す。

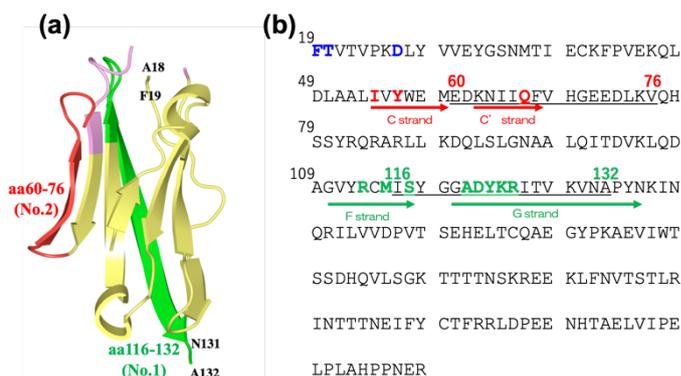


図 3 PD-L1 の立体構造とアミノ酸配列, (a);立体構造(PDB:5xxy), (b)アミノ酸配列

(2) PD-L1 に対するスーパー抗体酵素の探索

前項で作製した FRET-PD-L1 peptide を用いたスクリーニングの結果 (一部抜粋) を図 4a に示した。右端の Trypsin と同等あるいはそれ以上の分解活性を有するクローンを見出した。この中で、典型的な Profile を示した D-16 の反応結果を図 4b に示す。この反応で生じた分解断片の HPLC/MS 解析の結果、Ile126-Thr127 および Val128-Lys129 の間のペプチド結合が切断されていることが分かった。この他にも数種類のクローンについて同様の分析を行ったところ、クローンにより切断箇所は異なっていた。

(3) PD-1 に対するスーパー抗体酵素 H34 のキャラクタリゼーション

H34のキャラクタリゼーションを行うために、図5aに示す変異体を作製し、FRET-PD-1peptideに対する分解活性を調べた。その結果を図5bに示す。Pro95の挿入(Pro95(+)-mutant)はPD-1分解活性がほぼ消失した。殆どのkappa型軽鎖

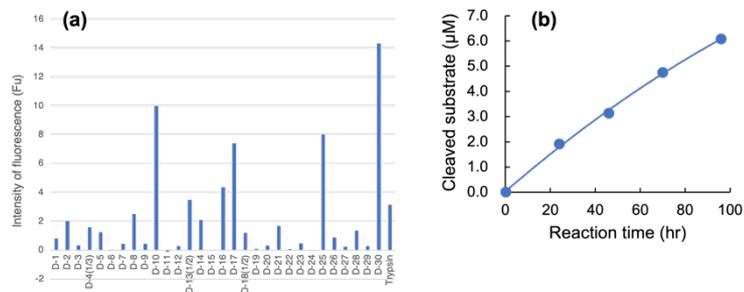


図4 FRET-PD-1L(116-132)を用いたスクリーニング, (a);スクリーニングの結果(抜粋), (b);典型的な反応プロファイル

では95位にProが配置しており、典型的な触媒三つ組残基を持つ軽鎖型抗体酵素に於いて、Pro95の欠損は酵素活性を向上させることが明らかになっている。95位にProを持たずに酵素活性を示すH34クローンに対するPro95の挿入が酵素活性の消失を招く結果は、「Pro95の存在は、酵素活性の発現には不利に作用する」ということをさらに強く裏付けた。言い換えると、「既存のモノクローナル抗体の中には、軽鎖Pro95欠失の変異を加えることで、軽鎖型抗体酵素として機能するものが存在する」ということを示唆する重要な知見である。

一方、Arg96(本来ならば95位に相当。95位にProを挿入した変異体を作製した関係で、図5ではArgを96位として表示している)の欠失は酵素活性だけでなく、抗原認識サイトの主要な役割を担うことが明らかとなった。加えて、Thr93がArg95と共に、Catalytic triad or Dyadを形成していることを見出し、H34はserine protease機構(His-Ser-Asp)とは異なる触媒メカニズムで抗原を分解していることが明らかとなった。これらの変異体については、H34 wtとともに分子モデリングによる構造予測と、酵素免疫測定法によるrecombinant PD-1 (rPD-1) 分子に対する免疫学的反応性を調べており、解析結果の纏めを図6に示した。赤の矢印で示したT97AとD1Aは酵素活性を発揮している。rPD-1に対する分子認識は、T97A変異体では増強されていた。Asp1が触媒部位を構成するアミノ酸残基ではないことが明らかになった。一方、青の矢印で示したT93A, Pro95(+), R96Aは酵素活性が低下した。T93AとR96Aでは酵素活性が大幅に低下すると同時に、rPD-1に対する認識能も低下していた。Pro95(+)-は分子構造がH34 wtとは大きく異なっており、これが酵素活性の消失と同時にrPD-1分子認識能の喪失に繋がったと考えられた。

これらの結果から、H34クローンはArg96(wtではArg95に相当)・Thr93・Gln89により酵素活性サイトが構成される新しいタイプの軽鎖型抗体酵素だと結論付けた。Hisの代わりにArgが酵素活性サイトとして機能するのは、同じ塩基性アミノ酸であることを考えれば理解出来ると同時に、抗体酵素の作製や抗体の酵素化において、候補となるクローンの幅を広げる観点から重要な知見である。

抗体医薬の特許切れが始まっており、高付加価値化するための技術開発が望まれている。「変異導入による抗体軽鎖の酵素化」は、代表者らの独自の技術であり、ここで得られた結果は、この技術を前進させる上で重要な知見となった。

また、r-PD-1分子に対する分解性能を調べたところ、H34wtやD1A変異体で約17.6kDaの分

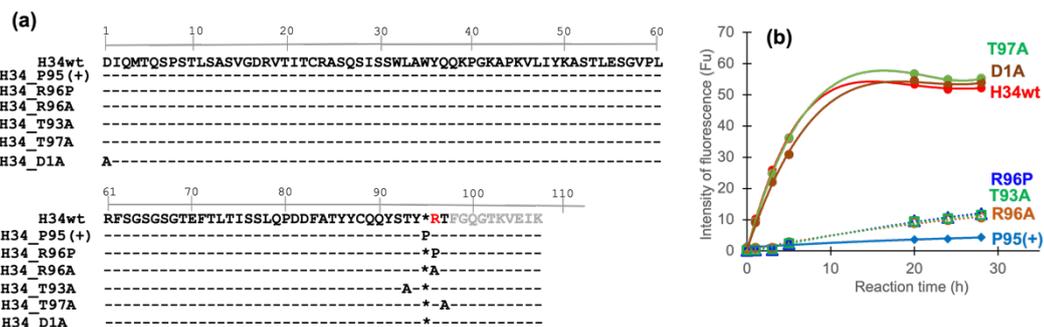


図5 H34変異体の配列とFRET-PD1 peptideに対する分解活性, (a);アミノ酸配列, (b);FRET-PD1 peptide分解の反応プロファイル

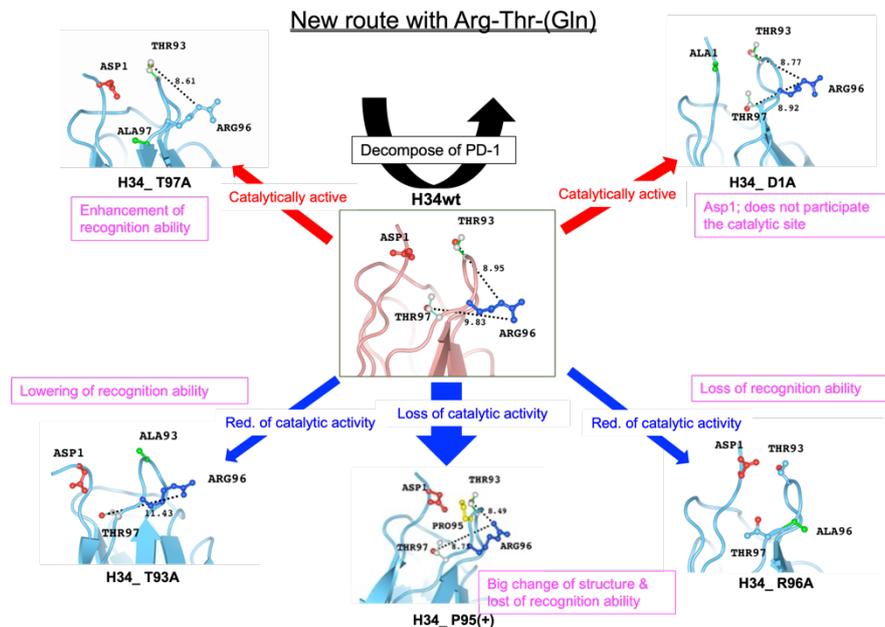


図6 H34 wt および変異体の構造と触媒活性の関係

解断片を検出した。H34 クローンおよびその一部変異体が FRET-PD-1 基質だけでなく、タンパク抗原にも有効であることが確認出来た。

(4) ハイブリッド抗体酵素の設計と性能試験

PD-L1 の分解には D-16 クローン、PD-1 の分解には H34 wt を用いることとし、図 7 に示すハイブリッド型抗体酵素を設計・合成した。図 7b では、予測される活性サイトを Space fill で示している。

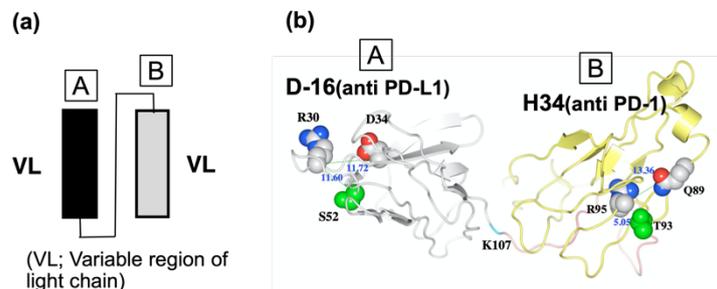


図7 ハイブリッド抗体酵素, (a);概念図, (b)分子モデリングによる構造予測

このハイブリッド型抗体酵素を大腸菌で発現・精製し、FRET-PD-1 peptide と FRET-PD-L1 peptide に対する分解反応を行った。この時の時間依存性を図 8 に示す。FRET-PD-L1 peptide の分解活性は、D-16 クローン単独の場合と同程度であったが、FRET-PD-1 peptide に対する分解は H34 wt よりも低下していた。ScFv 型への改変により H34 wt 側の構造が変化し親和性 and/or 酵素活性の低下が起こった可能性と、PD-L1 側ドメインとの配置の関係で立体障害が起き、PD-1 peptide の取り込みに問題が起こった可能性がある。いずれにしても、この点についてはリンカーの長さや種類を調整することで改善可能と考えている。

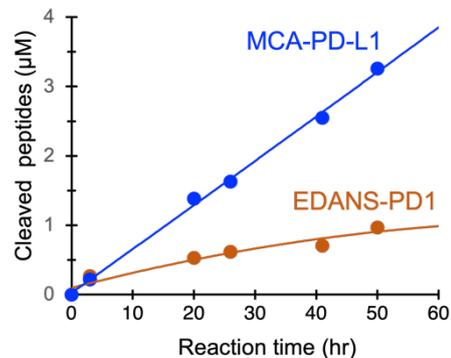


図8 ハイブリッド型抗体酵素による PD-1 peptide および PD-L1 peptide に対する分解試験の結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Hifumi Emi, Taguchi Hiroaki, Nonaka Tamami, Harada Takunori, Uda Taizo	4. 巻 2
2. 論文標題 Finding and characterizing a catalytic antibody light chain, H34, capable of degrading the PD-1 molecule	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RSC Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 220 ~ 229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0cb00155d	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 Hifumi Emi, Nonaka Tamami, Taguchi Hiroaki, Uda Taizo	4. 巻 12
2. 論文標題 A new catalytic site functioning in antigen cleavage by H34 catalytic antibody light chain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-022-23689-6	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 Nonaka Tamami, Taguchi Hiroaki, Uda Taizo, Hifumi Emi	4. 巻 23
2. 論文標題 Obtaining Highly Active Catalytic Antibodies Capable of Enzymatically Cleaving Antigens	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 14351 ~ 14351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms232214351	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大村飛鳥、宇田泰三、一二三恵美
2. 発表標題 抗体鎖に酵素機能を付与する新手法 ~ その一般化に向けて ~
3. 学会等名 2020年日本化学会九州支部秋期研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 一二三恵美、田口博明、野中玲実、宇田泰三
2. 発表標題 免疫チェックポイントPD-1分子を分会する抗体酵素H34クローンの特徴と性質
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会(2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宇田泰三、皆川哲郎、田口博明、一二三恵美
2. 発表標題 免疫チェックポイントPD-1分子を分解するヒト型スーパー抗体酵素(H34 clone)の触媒三ツ組残基活性に関する重要なアミノ酸残基
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村山椋、野中玲実、守山雅也、原田拓典、田口博明、宇田泰三、一二三恵美
2. 発表標題 免疫チェックポイントPD-1分子を分解するヒト型スーパー抗体酵素のキャラクタリゼーション
3. 学会等名 第27回日本生物工学会九州支部 大分大会(2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐土原万実、野中玲実、宇田泰三、一二三恵美
2. 発表標題 スーパー抗体酵素 #7TRを用いた最適精製法の確立
3. 学会等名 日本化学会第102回春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野中玲実、皆川哲郎、田口博明、宇田泰三、一二三恵美
2. 発表標題 抗体を抗体酵素へ
3. 学会等名 第32回バイオ高分子シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 一二三恵美、野中玲実、田口博明、宇田泰三
2. 発表標題 抗体を対応する抗体酵素に変換する新手法に関する研究
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 一二三 恵美、野中 玲実、田口 博明、宇田 泰三
2. 発表標題 PD-1及びPD-L1に対する各抗体酵素の探索と得られたクローンの性質
3. 学会等名 日本化学会第103回春季年会
4. 発表年 2023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
---------	---------