

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06453

研究課題名（和文）化学的連結法による低分子化抗体ターゲティングシステムの開発

研究課題名（英文）Development of fragment antibody targeting system based on antigen-templated chemical reaction

研究代表者

秋葉 宏樹 (Akiba, Hiroki)

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号：70739945

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、低分子化抗体ターゲティングシステムの開発につながるために有機化学的な連結反応を利用するための基礎技術開発を実施した。抗原上の2つの異なるエピトープに結合する抗体に対して互いに反応する官能基を修飾すると、これらの抗体が抗原分子上に同時結合する際に、抗体間に共有結合が生じる。これによって、1価結合する抗体が2価の強固な結合をみせる分子へと変換される。蛍光団形成反応によってこのシステムの成立を実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果として新たに開発された抗原テンプレート反応は、当初目的とした低分子化抗体ターゲティングシステムの基盤技術としてさらなる開発を進めることで、従来抗体とは異なる特性を示す抗原結合モダリティの実用化につながる。このほかにも抗原分子上に結合した抗体表面での化学反応というシステムを、薬剤送達や抗原検出など多様な応用につなげることで、抗体が従来、医薬や生物科学に利用されてきた領域をさらに広げることができる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed biepitopic antigen-templated chemical reaction (BATER) as a novel kind of templated chemistry. Two antibody fragments binding two different epitopes of the antigen are conjugated with a pair of chemical groups that react and form covalent bonds between them. On binding of two antibody fragments to the antigen, two reacting groups are in proximity and the covalent bond formation occurs. Through this process, monovalent antibody fragments are turned into bivalent molecule with strong interaction. The reaction was proven by fluorogenic click chemistry.

研究分野：蛋白質工学

キーワード：抗体 コンジュゲート化学 テンプレート反応

1. 研究開始当初の背景

抗体の低分子化は、微生物発酵による生産コスト低減、組織深部への迅速な浸透等の利点から、治療、診断への有効性が期待される。主にヒトやマウス抗体の抗原結合フラグメント (Fab) や一本鎖可変領域 (scFv) が用いられる。scFv は、分子量が 30,000 程度と小さいが、定常領域による構造安定化がなく、多くの場合熱・化学的な安定性を失うことで投与後に体内で失活する可能性がある、多価結合を失い標的結合能が低下する、といった欠点を有し、最適化が極めて煩雑である。定常領域の一部を利用した Fab の利用によって、2 つの scFv を連結させることでの多価結合の回復により解決されるが、これらの要件を単純に両立させた $F(ab)_2$ はかなり大きく、生産方法や組織内動態を大きく変化させることはできないと考えられる。この 2 つを兼ね備えた抗体の新しいデザインが求められた。

2. 研究の目的

この問題を解決しうる新たな技術の創製のため、本研究の目的を、「化学的連結技術を利用した Fab 抗体ターゲティング技術の創製とその最適化」と設定した (図 1)。標的抗原中の異なるエピトープに結合する 2 つの抗体 Fab の間に、連結反応をもたらす官能基を導入する。別々に投与された 2 つの修飾 Fab が標的上に集積すると、連結反応により二価結合を示す分子 (バイパラトピック抗体; BpAb) を形成し、強固に結合する。本法は「投与時には安定な Fab (低分子抗体) であり、標的上で強固な多価結合を示す分子に変換される」システムとなるために、上述の問題を同時に解決できる全く新しい手法となりうる。

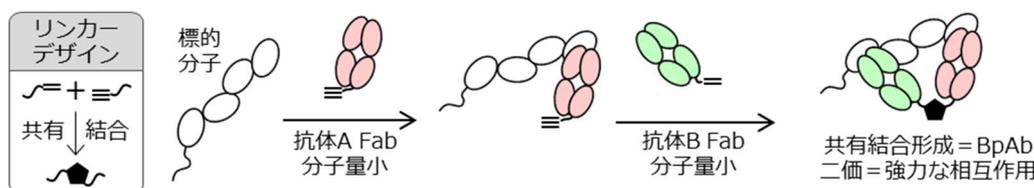


図 1. 抗体 A と抗体 B の Fab (安定性良好) を別々に作用させる場合、それぞれの分子量は小さく、組織浸潤性に利点を示す。予め導入された反応性官能基 (= リンカーデザイン) により標的上で連結するとバイパラトピック抗体 (BpAb) となり、二価の強力な結合をもたらす。

3. 研究の方法

上述の目的に適う化学反応システムはこれまでに報告されていなかった。一方で、代表研究者らはこれまでに、2 型 TNF 受容体 (TNFR2) に対する BpAb を開発してきた。この中で、単一 TNFR2 分子上の 2 つのエピトープに結合し分子内架橋構造を形成することで、強結合を示すことが示唆されるものを見いだした (図 2)。すなわち、Fab 間を化学的に連結してリンカー構造を最適化することで、同様の構造・結合能が期待される。そこで、この 2 つの抗体 Fab を利用することで、複合体構造形成を指標に、Fab 間を反応性官能基で連結するという研究目的が達成されるのではないかと考えた。

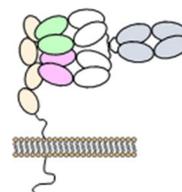


図 2. 分子内架橋結合する抗 TNFR2 BpAb。

4. 研究成果

(1) 抗原上反応を観察する分子設計とその取得

本研究では、抗体間連結反応進行の実証のため、共有結合形成と共に蛍光団が形成される系を利用した。Azidocoumarin はそのアジド基がアルキンとのクリック反応によって環化すると、蛍光性の分子となることが知られている (Sivakumar, K. *et al. Org. Lett.* 2004, 6, 4603)。ここでは、アルキンとして bicyclononyne を選択した。

2 つの抗体由来の Fab に対して azidocoumarin と bicyclononyne を位置選択的に 1 つずつ修飾した分子を取得するために、Fab の C 末端にあるジスルフィド結合へ選択的に導入できる dibromomaleimide 基を介したコンジュゲーションを実施した。コンジュゲート化合物のみ (図 3) あるいは Fab コンジュゲートの濃厚溶液の混合によって得られた環化化合物が実際に蛍光性を示すことを確認した。

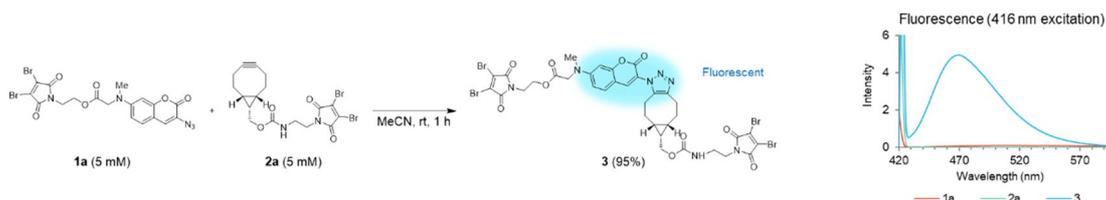


図 3. コンジュゲート化合物のみでのクリック反応産物の蛍光スペクトル。

これに並行して、TNFR2 1 分子上での反応を観察するために最適な組換え TNFR2 タンパク質の取得を検討した。形成する複合体の分析を実施するためには、インキュベーション中に分解しない安定な TNFR2 組換え体が必要である。C 末端へのタグ導入による安定化を期待して、複数のタグから検討したところ、maltose binding protein (MBP)の融合によって、比較的長期の保存、さらには分析中にほとんど分解しない安定な分子を得ることに成功した。

(2) TNFR2 分子上での抗体間連結反応の観察

TNFR2 の隣接したエピトープに結合する、TR92 と TR109 の 2 つの抗体 Fab に対して azidocoumarin、bicyclononyne を導入し、TR92-AC1 ならびに TR109-BN0 をそれぞれ得た。これらを TNFR2 と希薄な条件 (2 μM) で混合し、時間依存的な蛍光強度変化をサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) によってその複合体サイズとともに分析したところ、TR92-AC1:TR109-BN0:TNFR2=1:1:1 に相当する溶出画分において、蛍光強度が時間依存的に増大する様子が観察された (図 4)。

これに対して、TNFR2 不在では蛍光強度の上昇がほとんど観察されなかった。さらには、隣接しないエピトープに結合する抗体ペア (TR92-AC1+TR96-BN0) を利用した場合には、同様の蛍光強度上昇が観察されなかった (図 5)。このことから、近接して結合する抗体を利用することが抗原分子上でのクリック反応進行に必須であることも理解された。

次いで、azidocoumarin、bicyclononyne それぞれと dibromomaleimide 基との間のリンカー長を種々検討した。それぞれ PEG 長が 4, 7, 24 となるリンカーならびに 3, 9, 23 となるリンカーを介した反応性ユニットを合成・取得した。これらを TR92 と TR109 それぞれにコンジュゲートし、プレートリーダーを用いて定量した蛍光強度の増加曲線から反応速度を求めたところ、リンカー長が長いほど反応速度が速いことを明らかにした。また、長鎖リンカーを利用した場合には反応速度の増大幅が小さくなり、ほとんど飽和することを明らかにした (図 6)。

この挙動は、並行で実施したクライオ電子顕微鏡単粒子解析によってさらに詳細を理解することができた。上述の MBP 融合 TNFR2 の安定性をさらに高めるべく、不要な領域を除去した融合蛋白質を得た。この分子は SEC での分離が悪く、HPLC 分析には適さなかったが、複合体構造解析には有用であった。IgG 型 BpAb と TNFR2 の複合体構造から、TR92 と TR109 の Fab はその C 末端間の距離が約 3 nm となることが明らかになった (Akiba, H. *et al. Commun. Biol.* **2023**, *6*, 987; 図 7)。一方で、本研究に利用した PEG リンカーはその末端間の平均距離が最長のものであっても約 2.5 nm 程度であることが計算科学により示されていた (Hazaveh, S. *et al. J. Chem. Phys.* **2012**, *136*, 124901)。したがって、PEG リンカーの自由運動の下で反応性官能基が近接することで反応が進行することには妥当性があると考えられる。ここまでの結果を論文として報告した (Nishiyama, K.; Akiba, H. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, 202306431)。

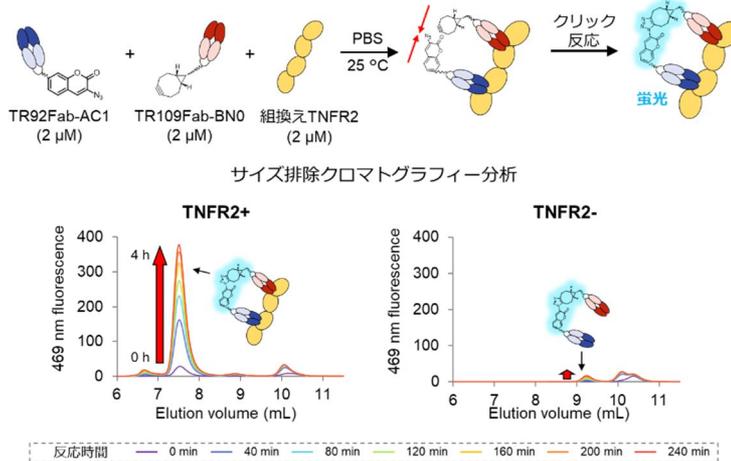


図 4. 抗体間に生じる反応の抗原依存性。抗原存在下 (左) では迅速な反応進行が観察されるが、抗原不在 (右) では反応がほとんど進行しない。

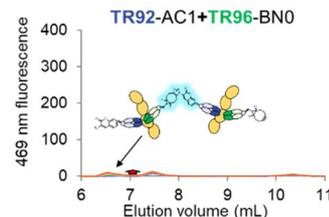


図 5. 非隣接エピトープに結合する抗体を利用した場合。反応がほとんど進行しない。

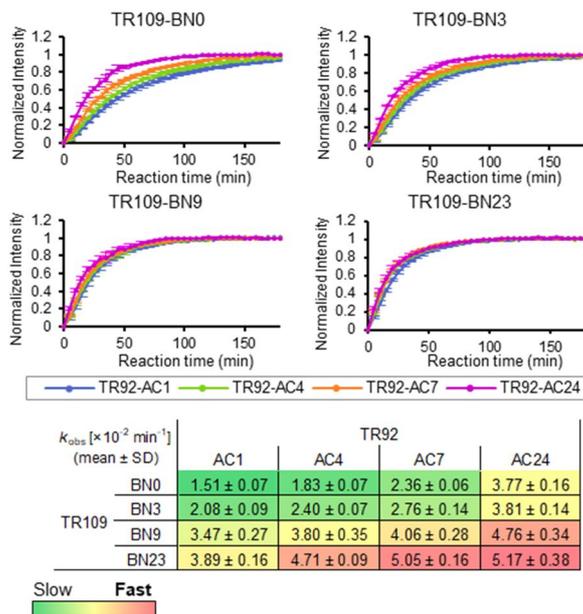


図 6. 反応速度のリンカー長依存性。

(3) 細胞上での反応観察とその応用に向けた検討

Azidocoumarin と bicyclononyne の反応で生じる蛍光団は一般的に蛍光観察に用いられる分子よりも暗く、細胞系での直接の観察が困難であったことから、次に細胞等の夾雑系でも利用しうる三官能性リンカーを設計した。アジド基に加えて検出系に利用できる、ビオチンを修飾したコンジュゲート体を作製した。TNFR2 を発現する細胞上での反応を western blotting によって分析したところ、クリック反応の進行に伴って、分子量の大きいバンドが出現した。このことから、反応が細胞表層上でも進行していることが実証された。一方で、殺傷性薬剤を修飾した抗体を利用し、抗原上反応による機能向上を観察しようとしたものの、増殖抑制は観察されなかった。このことは、当初利用した細胞株の薬剤への感受性に起因すると考えられたため、次に他の抗原を標的とした複数のモデルでの検討をすることとした。

既に ADC 標的として報告されており、評価のより容易な CD30、Her2 という 2 つのモデルへの展開をするために、それぞれの複数のエピトープに対する抗体を採用し、それらの Fab に AC24、BN23 リンカーを修飾し、抗原上での反応が生じるかどうかを TNFR2 と同様に HPLC を用いた蛍光観察によって観察した。その結果、CD30 の場合には反応の生じる抗体のペアを見出すことができた。一方で、Her2 の場合には結晶構造上で近接する抗体のペアを利用しても反応が観察されなかった。リンカー長の不足を補うために、Her2 の Fab C 末端に抗体の Fc 領域を融合した Fab-Fc 型の分子を取得し、この C 末端側に反応性官能基を導入した。この結果、Her2 を標的とする場合にも反応が観察された。本方法は、Fab 抗体を利用する場合と比較して低分子化の度合いが限られるものの、組織深部への浸透には分子量のみならず抗体の結合能が重要であることも指摘されているため (Tsumura, R. *et al. J. Control. Release* 2018, 224, 49)、最終的な目的の達成のための有用な手段の 1 つになると考えられる。

以上のように、抗原上での化学反応により抗体が 1 価から 2 価結合分子になるという反応を新たに開発することに成功した。また、広範な標的抗原に対して適用可能であることも示した。本研究の成果は、新たな抗体医薬品の開発のみならず分子検出など多様な目的への応用が期待される。

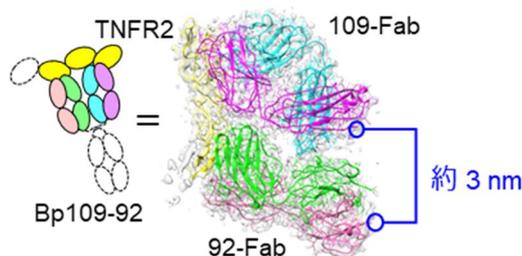


図 7. TR109 と TR92 の Fab をもつ IgG 型 BpAb の複合体構造。

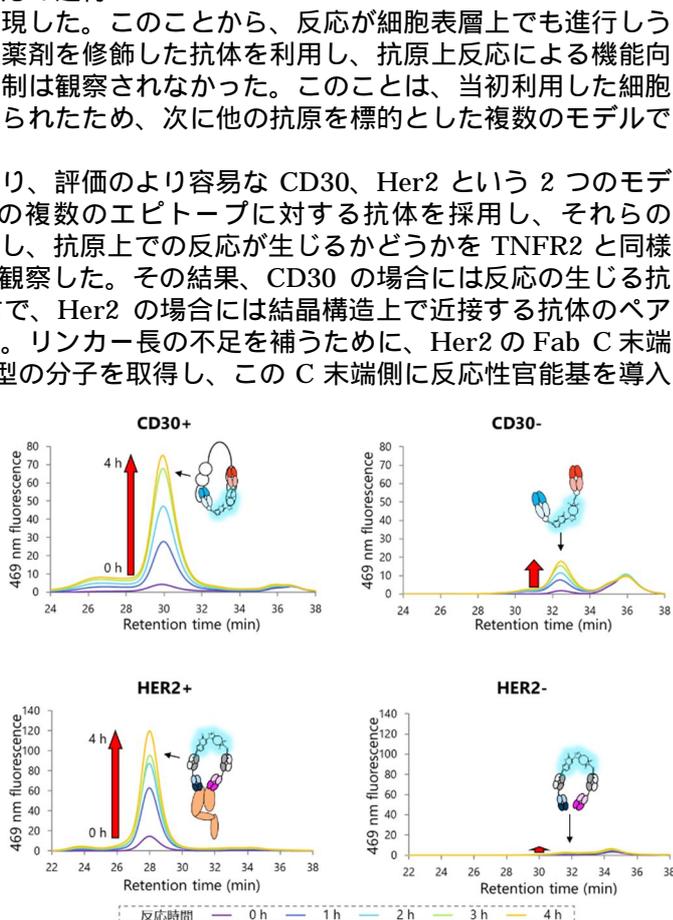


図 8. CD30 ならびに Her2 を標的に観察された、抗原に依存する抗体間の反応。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 1件）

1. 著者名 Akiba Hiroki, Fujita Junso, Ise Tomoko, Nishiyama Kentaro, Miyata Tomoko, Kato Takayuki, Namba Keiichi, Ohno Hiroaki, Kamada Haruhiko, Nagata Satoshi, Tsumoto Kouhei	4. 巻 6
2. 論文標題 Development of a 1:1-binding biparatopic anti-TNFR2 antagonist by reducing signaling activity through epitope selection	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 987
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-023-05326-8	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 Nishiyama Kentaro, Akiba Hiroki, Nagata Satoshi, Tsumoto Kouhei, Kamada Haruhiko, Ohno Hiroaki	4. 巻 62
2. 論文標題 A Proximity Induced Fluorogenic Reaction Triggered by Antibody?Antigen Interactions with Adjacent Epitopes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 e202306431
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/anie.202306431	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13件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 秋葉宏樹
2. 発表標題 基礎研究と実用化研究のあいだに
3. 学会等名 第3回蛋白質科学会若手の会研究交流会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西山健太郎、秋葉 宏樹、永田 諭志、津本 浩平、鎌田 春彦、大野 浩章
2. 発表標題 PEG リンカーの伸長による抗原テンプレート反応の促進
3. 学会等名 第17回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 秋葉宏樹、大槻拓也、藤田純三、伊勢知子、永田諭志、津本浩平、難波啓一、鎌田春彦、大野浩章
2. 発表標題 1:1結合型バイパラトピック抗体の創出と利用
3. 学会等名 第17回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2023年

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 1:1結合型バイパラトピック抗体によるTNFR2アンタゴニストの開発
3. 学会等名 第2回日本抗体学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 秋葉宏樹、西山健太郎、永田諭志、津本浩平、鎌田春彦、大野浩章
2. 発表標題 立体構造情報に基づいた抗原テンプレート反応の開発
3. 学会等名 日本化学会第104春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 秋葉宏樹
2. 発表標題 1:1結合型バイパラトピック抗体による機能開拓
3. 学会等名 日本薬学会第144年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西山健太郎、秋葉宏樹、鎌田春彦、大野浩章
2. 発表標題 抗原テンプレート反応を利用するための抗体選択の戦略
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 秋葉宏樹、西山健太郎、永田諭志、津本浩平、鎌田春彦、大野浩章
2. 発表標題 近接する抗体エピトープを蛍光により可視化する技術の開発
3. 学会等名 日本分子イメージング学会第16回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西山健太郎、秋葉 宏樹、永田 諭志、津本 浩平、鎌田 春彦、大野 浩章
2. 発表標題 Fluorogenic click reactionを用いた抗原上でのパイラトピック抗体形成の可視化
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第16回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西山健太郎、秋葉 宏樹、永田 諭志、津本 浩平、鎌田 春彦、大野 浩章
2. 発表標題 抗体抗原間の相互作用により加速されるひずみ解消型Click反応
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 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 西山健太郎、秋葉宏樹、永田諭志、津本浩平、鎌田春彦、大野浩章
2. 発表標題 クリックケミストリーによるTNFR2分子上での蛍光性バイパラトピック抗体の形成
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuki Minamide, Kentaro Nishiyama, Tomoya Niki, Hiroki Akiba, Satoshi Nagata, Haruhiko Kamada, Hiroaki Ohno, Akinori Kuzuya
2. 発表標題 Visualization of Antigen Binding on DNA Origami Using Atomic Force Microscopy
3. 学会等名 CBI学会2021年大会
4. 発表年 2021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
---------	---------