

令和 6 年 9 月 25 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06486

研究課題名（和文）革新的アルツハイマー病治療薬を目指した2機能性抗体酵素の開発

研究課題名（英文）Development of bifunctional catalytic antibody aiming at innovative therapeutic drug for Alzheimer's disease

研究代表者

田口 博明 (Taguchi, Hiroaki)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号：20549068

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）：高齢者の増加に伴い、アルツハイマー病患者は増加の一途をたどっており、治療・予防薬の開発が喫緊の課題となっている。研究代表者は、効果的な治療薬がないアルツハイマー病の予防・治療薬の創製を目指し、原因物質を分子標的とした抗体酵素を得ることを目的とした。米国にて承認されたアルツハイマー治療薬（抗体医薬品）より抗体軽鎖と抗体軽鎖の95位プロリンを欠失した変異体を作製した。これら抗体軽鎖について合成基質を用い加水分解活性を測定したところ、変異体に加水分解活性を見いだした。以上のことから、抗体医薬品より抗体酵素を作製することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

効果的な治療薬がないアルツハイマー病の予防・治療薬の創製を目指し、アミロイドに対する抗体医薬品より軽鎖抗体を作製し、軽鎖抗体より95位のProを除去することにより酵素活性の付与に成功した。抗体医薬品のアミロイド除去機構には、免疫細胞の関与が必要であるが、抗体酵素は単体でアミロイドの除去が可能である。また、抗体酵素1分子はその触媒作用により、生体内の半減期で多くのアミロイドを除去することができる。その結果、既存の抗体医薬品に比べ、投与量を大幅に減少させることができる。このことから、抗体医薬品がかかえる副作用や高額な医療費などの問題を解決することが可能であり、社会的意義もあると考えている。

研究成果の概要（英文）：As the elderly population increases, the number of people with Alzheimer's disease is steadily increasing, making the development of treatment and preventive agents an urgent priority. The principal investigator aimed to develop a preventive and therapeutic agent for Alzheimer's disease, a condition for which there is currently no effective treatment and sought to produce catalytic antibodies targeting the causative molecules. An antibody light chain and a mutant form, in which the proline at position 95 of the antibody light chain was deleted, were engineered from an FDA-approved Alzheimer's drug. The hydrolytic activity of these antibody light chains was measured using a synthetic substrate, revealing hydrolytic activity in the mutant. Based on these findings, it was concluded that a catalytic antibody was successfully generated from an antibody drug.

研究分野：医薬品化学

キーワード：抗体酵素 アルツハイマー病 アミロイド

## 1. 研究開始当初の背景

厚生労働省発表の認知症施策推進総合戦略(新オレンジプラン)では、我が国での認知症高齢者の数は2012年で462万人(高齢者の約7人に1人)と推計されている。そしてこの数は、人口の高齢化に伴い大きく増加することが予想されており、2025年には約700万人(高齢者の約5人に1人)になると推測されている。認知症の約60%以上を占めると考えられているアルツハイマー病は、海馬をはじめ大脳皮質の萎縮が起り、記憶力などの認知機能が低下していく疾患である。アルツハイマー病の原因物質として考えられている物質に、アミロイドβタンパク質と微小管結合タンパク質であるタウタンパク質がある。アミロイドβタンパク質が脳内に蓄積し、さらにタウタンパク質が神経細胞内で蓄積することにより、神経細胞死を引き起こしアルツハイマー病の発症にいたるアミロイド仮説が提唱されている。研究開始当初、高齢化により患者数は急増し、治療・予防薬の開発が喫緊の課題となっていた。

研究代表者は、2000年より抗体酵素に関する研究を開始し、2008年にヒト血液中にアミロイドβタンパク質を加水分解する抗体酵素を発見した。またアルツハイマー病患者では、血液中の抗体酵素が増加していることを明らかにし、さらにアミロイドβタンパク質を加水分解する抗体酵素をアルツハイマー病動物モデルに投与することにより、脳へのアミロイドβタンパク質の沈着が減少することを示した。その後、病原性タンパク質を加水分解する多くの抗体酵素が報告され、この分野の研究が急速に展開している。

高齢者の増加に伴い、アルツハイマー病患者は増加の一途をたどっている。アルツハイマー病は、患者のQOLのみならず介護者にもその影響をおよぼし、社会問題にまで発展している。しかしながら、アルツハイマー病の発症メカニズムはいまだ解明されていない。重要な仮説の一つであるアミロイド仮説に基づき、アミロイドβタンパク質の生成阻害、タウタンパク質のリン酸化を阻害するリン酸化酵素阻害剤、アミロイドβタンパク質やタウタンパク質の凝集阻害剤、免疫療法の臨床研究が進行していた。特に抗体医薬品はアメリカにおいて承認申請されており大きな期待が寄せられていた。(その後条件付承認が得られた。)

研究代表者は、効果的な治療薬がないアルツハイマー病の予防・治療薬の創製を目指し、アミロイドβやタウを分子標的とした抗体酵素を得ることを目的とした。共同研究者の一二三らが開発した軽鎖抗体より95位のProを除去することにより酵素活性を付与することが可能な方法を用い、現在臨床開発中のアミロイドβやタウを分子標的とした抗体医薬品の酵素化およびこれら抗体軽鎖の二量体化を目指す。アミロイドβやタウを特異的に除去する抗体酵素が開発されれば、これまで根本的治療薬がなかったアルツハイマー病の治療を大きく前進させることができると考える。また、抗体酵素1分子はその触媒作用により、生体内の半減期で約数万個の病原分子を破壊することができる。その結果、既存の抗体医薬品に比べ、投与量を大幅に減少させることができる。このことから、抗体医薬品がかかえる副作用や高額な医療費などの問題を解決することが可能であり、社会的意義もあると考えている。

## 2. 研究の目的

これまでアミロイドβを標的分子とする抗体医薬品は、脳内に蓄積した凝集体を除去することにより認知機能が保持されることが報告されている。抗体医薬品は、脳内に蓄積したアミロイドβを、免疫細胞を介して脳内から取り除く。しかしながら、抗体医薬品だけでは、アミロイドβを分解することが出来ず、免疫細胞のような助けが必要となる。この点が大きな課題であり、効果的な治療薬の開発ができない核心部分である。この課題を解決するために最も適切な手法として、標的分子であるアミロイドβやタウを直接的に分解することである。共同研究者の一二三らが開発した抗体を抗体酵素に変換する方法を用いることにより、抗体医薬品を抗体酵素に変換し、アミロイドβやタウを直接的に分解することができる。本研究課題では、アルツハイマー病の原因物質であるアミロイドβとタウを同時に加水分解する新規2機能性抗体酵素の作製を目指す。原因物質を分解することによりアルツハイマー病治療薬へと展開するための創薬研究基盤を確立する。

## 3. 研究の方法

### 3.1 アミロイドβに特異的な軽鎖抗体酵素の分子設計と作製

アルツハイマー病ではアミロイドβまたは過剰にリン酸化されたタウが、凝集体を形成し脳内に蓄積する。現在アルツハイマー病治療薬を目指したアミロイドβまたはタウに特異的な抗体医薬品の開発が進められている。申請者らは、典型的な抗体から抗体酵素へ変換する技術の開発に成功しており、この技術を用いてアミロイドβに特異的なIgG抗体であるaducanumabから軽鎖抗体酵素の作製を行う。(図1)

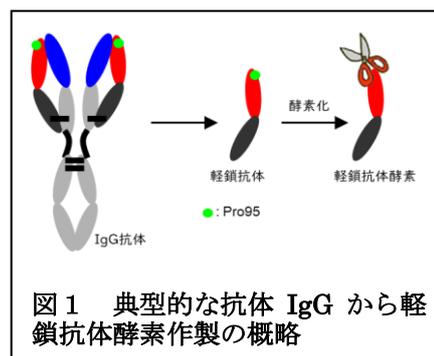
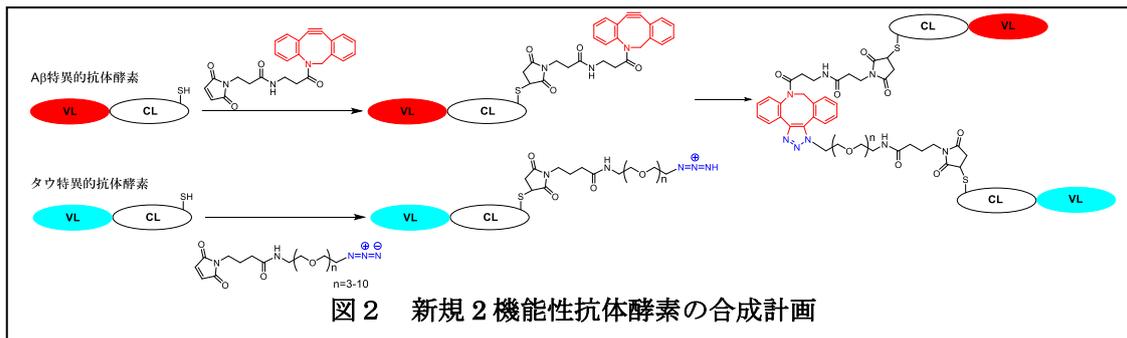


図1 典型的な抗体 IgG から軽鎖抗体酵素作製の概略

aducanumab の軽鎖 DNA 配列を用い、遺伝子工学的にアミロイドβ に特異的な抗体の軽鎖を発現する野生型ベクターを作製する。次に、大腸菌として BL21 (DE3)pLysS を用いタンパク質の発現を行い、ニッケルカラムと陽イオン交換カラムを用い精製する。得られた野生型ベクターから 95 位の Pro を除いたベクターを作成し、同様の方法で変異体を作製する。発現量が低い場合は、培養温度、ベクターの種類、大腸菌の種類などの検討を行い計画に必要なタンパク質を得る。得られた抗体軽鎖は電気泳動でその純度を確かめる。抗体軽鎖 95 番目の Pro は CDR-3 に存在し、抗原との結合における寄与が大きいと言われているので、変異体のアミロイドβ への親和性について調べる。変異体の加水分解活性と基質特異性について、16 種類の合成蛍光基質を用いて調べる。また、アミロイドβ 加水分解活性の測定は、HPLC 分析で行い、アミロイドβ 加水分解部位は、得られたアミロイドβ 部分ペプチドの質量分析によって決める。

### 3. 2 新規 2 機能性抗体酵素の合成

軽鎖抗体酵素を選択的にヘテロ 2 量体化するため、各々の軽鎖抗体酵素の C 末端に存在する Cys 上の SH 基を、クリックケミストリーが適用できるようにマレイミド誘導体で修飾する (図

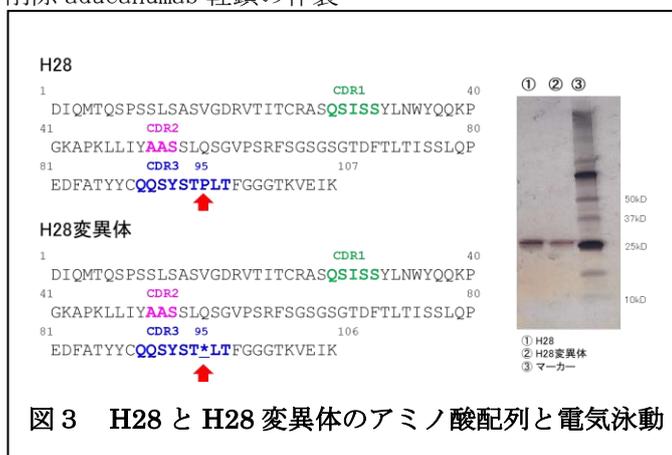


2)。クリックケミストリーは銅 (I) イオンを必要としないシクロオクテン誘導体とアジド基の組み合わせで行う。修飾された軽鎖抗体酵素を緩衝液中で混合し、反応終了後ゲルろ過カラムを用い精製することにより 2 機能性抗体酵素を得る。また、加水分解活性と特異性を最適化するためにリンカー部分 (ポリエチレングリコール) の長さの異なる 2 機能性抗体酵素を合成し検討する。

## 4. 研究成果

### 4. 1 aducanumab 軽鎖と 95 位 Pro 削除 aducanumab 軽鎖の作製

aducanumab 軽鎖 (H28) とその 95 位 Pro 削除体 (H28 変異体) の遺伝子を大腸菌 (BL21 (DE3)pLysS) に形質転換し、IPTG による発現を試みた。可溶性に発現してくる軽鎖タンパク質量は、これまでの軽鎖と比較し良好であった。得られた粗軽鎖タンパク質を、Ni-NTA カラムクロマトグラフィーにより精製した。得られた H28 と H28 変異体の純度は、電気泳動と銀染色にて確認した。図 3 に H28 と H28 変異体のアミノ酸配列と電気泳動の結果を示す。



### 4. 2 95 位 Pro 削除 aducanumab 軽鎖の生化学的評価

H28 または H28 変異体を 16 種類の合成蛍光基質とマイクロプレート上でインキュベーションし蛍光の増加を経時的に測定することにより加水分解活性を測定した。H28 変異体は 3 種類の合成蛍光基質 (Bz-R-MCA、PFR-MCA、Boc-LRR-MCA) を加水分解した (図 4)。いずれの合成基質においても C 端部分に Arg を含んでおり、この基質特異性はこれまで報告されている抗体酵素が塩基性アミノ酸の C 端部分を加水分解する性質と一致する。また、いずれの基質においても H28 変異体の加水分解活性は、H28 と比較して高かった (図 4)。このことから 95 番目の Pro を削除することにより H28 の加水分解活性を増強することができた。さらに、H28 と H28 変異体の分子モデルを構築し、予想される活性中心近傍について詳細な解析を実施した。H28 変異体の活性中心と考えられる三つ組アミノ酸 (Thr22-Arg24-Asp70) の Arg24-Asp70 間、Arg24-Thr22 間の距離が H28 ではそれぞれ 6.75Å、5.95Å、H28 変異体では 3.95Å、4.58Å となり原子間の距離は短かった。これらの結果より、Pro95 を削除することにより、触媒活性を発揮するのに好ましい触媒中心を形成したと考えられる (図 5)。以上のことから、抗体医薬品の軽鎖から 95 位 Pro を削除することにより抗体酵素を簡便に作成できることを明らかとした。この手法はこれまでに

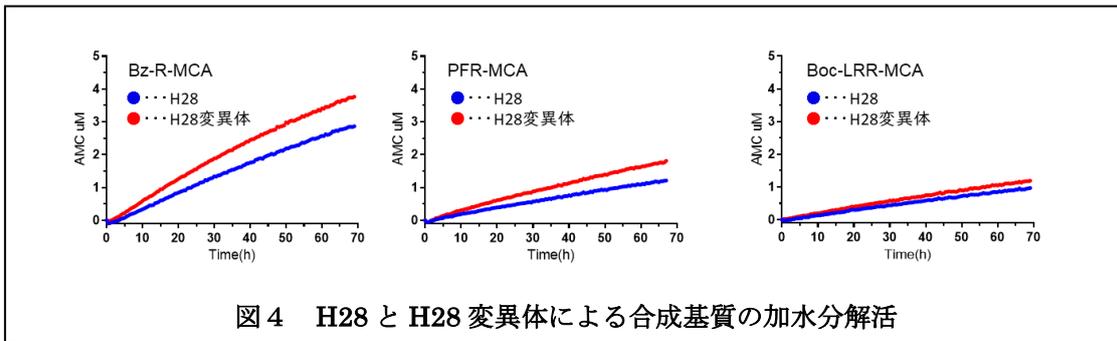


図4 H28 と H28 変異体による合成基質の加水分解活

開発されてきた多くの抗体医薬品を抗体酵素に変換できることを示唆する。次に、H28 と H28 変異体のアミロイドβ加水分解活性の測定を行うため、H28 または H28 変異体をアミロイドβ 1-40 とインキュベーションし、その反応液を HPLC にて分析した。いずれの HPLC 分析結果からもペプチド断片は検出されず、アミロイドβ が加水分解されていないことが明らかとなった。また、H28 はチオフラビン T を用いたアミロイドβ 凝集抑制アッセイにおいても凝集抑制が見られなかった。これらの結果より、aducanumab より作製した軽鎖抗体は触媒活性を示すものの、アミロイドβ への親和性が失われたと考えられる。すなわち、aducanumab のアミロイドβ への親和性には重鎖可変領域が必要であることが示唆される。今後の展開としては重鎖可変領域を組み込んだ scFV などを作製することにより、アミロイドβ に特異的な抗体酵素が開発できる可能性を示すことができた。

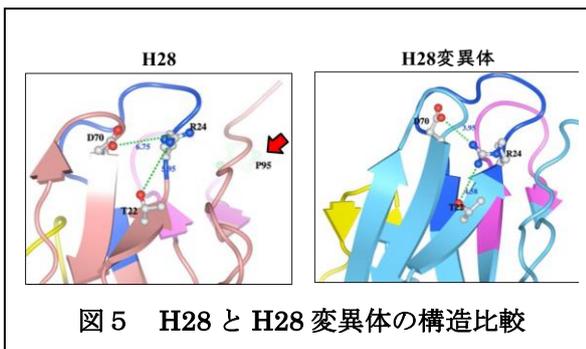


図5 H28 と H28 変異体の構造比較

#### 4. 3 新規 2 機能性抗体酵素の合成

軽鎖抗体酵素をクリック反応により連結し 2 量体化する条件検討のため、比較的タンパク発現量が多いモデル軽鎖抗体酵素の誘導体化とリンカーの合成に着手した。軽鎖抗体酵素は C 末端に存在する Cys を介して一部ホモ 2 量体を形成していることが知られている。そこで単量体を得るためにトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィンを用いジスルフィド結合の還元条件を種々検討し、電気泳動と銀染色により、単量体のバンドを確認した。続いて軽鎖抗体酵素上の SH 基を、クリックケミストリーが適用できるようにジベンゾシクロオクチン-マレイミドまた事前に調整したアジド-マレイミド試薬と反応した。ゲルろ過により過剰の試薬を取り除き、アルキルまたはアジド化された軽鎖抗体酵素を得た。修飾した軽鎖抗体酵素を種々の条件で混合することにより反応した。反応液を電気泳動で分離し銀染色したところ、一部 2 量体のバンドが見えるものの、ほとんどが未反応の単量体であった。反応が十分進行しなかった原因として、①タンパク質同士のクリック反応のため反応液中の基質濃度が通常のクリック反応に比べ低い。②リンカーの長さが短くタンパク質同士の立体障害が考えられた。これらの問題を解決するために、DNA の相補性を利用したリンカーやリンカー長の異なるリンカーを合成した。今後、これらを軽鎖抗体軽鎖と結合させ、ヘテロ 2 量体化により 2 機能性抗体酵素の合成を目指す。

## 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 0件/うちオープンアクセス 2件）

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 19185
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 -
1. 著者名 Emi HIFUMI, Hiroaki TAGUCHI, Tamami NONAKA, Taizo UDA	4. 巻 99
2. 論文標題 Direct conversion of a general antibody to its catalytic antibody and corresponding applications - Importance and role of Pro95 in CDR-3 -	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the Japan Academy, Series B	6. 最初と最後の頁 155-172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2183/pjab.99.010	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 Satoshi Nakagawa, Naoya Hatsuyama, Emi Hifumi, Taizo Uda and Hiroaki Taguchi	4. 巻 60
2. 論文標題 Increasing Hydrolytic Activity of Catalytic Antibody by Deletion of Pro95 in CDR3	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Peptide Science 2023	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） なし	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田口 博明、初山 直哉、一三三 恵美、宇田 泰三
2. 発表標題 -シヌクレインのNAC部分を標的としたヒト型軽鎖抗体酵素の開発
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Satoshi Nakagawa, Naoya Hatsuyama, Emi Hifumi, Taizo Uda, and Hiroaki Taguchi
2. 発表標題 INCREASING HYDROLYTIC ACTIVITY OF CATALYTIC ANTIBODY BY DELETION OF PR095 IN CDR3
3. 学会等名 60th peptide symposium
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中川智士、水谷百恵、一三三恵美、宇田泰三、田口博明
2. 発表標題 アデュカヌマブ軽鎖の抗体酵素化に関する研究
3. 学会等名 第69回 日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田口博明、一色亮汰、松尾有紗、中川智士、一三三恵美、宇田泰三
2. 発表標題 -シヌクレイン部分配列を含むペプチド性消光性基質の合成とヒト型抗体軽鎖のスクリーニング
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 田口博明、一色亮汰、松尾有紗、一二三恵美、宇田泰三
2. 発表標題 -シヌクレインを加水分解する 抗体酵素の開発
3. 学会等名 第41回日本認知症学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田口博明、一二三恵美、宇田泰三
2. 発表標題 アミロイド ペプチドを加水分解する 抗体酵素の開発
3. 学会等名 第40回日本認知症学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水谷百恵、一二三恵美、宇田泰三、田口博明
2. 発表標題 Inhibition of amyloid-beta aggregation by catalytic light chain antibodies
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
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
研究分担者	一二三 恵美  (Hifumi Emi)  (90254606)	大分大学・全学研究推進機構・教授   (17501)	

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