

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23686118

研究課題名(和文) 新世代治療抗体分野を切り拓く汎用的抗体多特異性化プロセスの開発

研究課題名(英文) Development of the generation process of multi-specific antibodies as next-generation therapeutic antibodies

研究代表者

浅野 竜太郎 (Asano, Ryutaro)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80323103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、モノクローナル抗体でありながら2つ目の特異性を人為的に付加させた二特異性抗体の取得プロセスの開発を目指した。抗ヒト上皮増殖因子受容体抗体を基盤に、変異導入箇所や変異アミノ酸種、さらには結合活性の評価法も検討しつつ研究を進めた。結果、複数の変異導入ライブラリと標的抗原を強制的に発現させた動物細胞を用いた生細胞選択を行うことで、また酵素抗体法を用いて評価することで、他の増殖因子受容体にも結合活性を示すクローンの取得に成功した。さらに、他の二特異性抗体の取得を進めることで本プロセスの汎用性の検証も行った。

研究成果の概要(英文)：Here, we tried to develop the generation process of integrating the second specificity into a monoclonal antibody. Based on an anti-human epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody, we examined a mutation site, mutant amino acid species, and evaluation method of binding activity. Using multiple libraries and living cell panning with mammalian cells artificially expressing target antigens, we finally succeeded in integrating another specificity into anti-EGFR antibody and evaluated them using enzyme-linked immunosorbent assay. We also confirmed general versatility of this process through developing another antibody with two specificities.

研究分野：応用生物学

キーワード：癌 蛋白質 バイオテクノロジー 二特異性抗体 ファージ提示法

1. 研究開始当初の背景

抗体は高い特異性と親和性から、ガンを始めとする難治療性の疾患に対する安全な医薬として期待されてきたが、効果を高めるための放射性同位体標識や複数の抗ガン剤との併用など、抗体医薬の現状は必ずしも安全性が担保されていない。また治療を続けると、標的としていた抗原の発現量が低下するなどのガン細胞の形態変化が生じ、短期間で奏功しなくなることも多々みられる。そこで近年、治療抗体の併用が盛んに研究、報告されるようになってきた。例えば、しばしば抗ガン剤が併用される B リンパ腫に対する抗体医薬リツキサンに対し、他の B リンパ腫表面抗原を認識する抗体を併用したところ、抗ガン剤の代替となり得ることが報告されている(*Cell*, **142**: 699-713 (2010))。しかしながら、薬価の高さも抗体医薬の大きな問題となっているため、医療負担を考えると現実的なアプローチとはいえず、新世代治療抗体の開発は急務であるといえる。一方、モノクローナル抗体でありながら 2 つ目の特異性を人為的に付加させた二特異性抗体の開発が海外のグループにより報告された(図 1: *Science*, **323**: 1610-4 (2009))。全く新しい概念であるが、特にガン治療に於いては形態の変化に対応するために複数の表面抗原を標的とすることが重要であることから、もし汎用的に、かつ安定性と生産性を兼ね備えた二特異性抗体を創製することができれば、今後の抗体医薬開発を一変させ得るといえる。

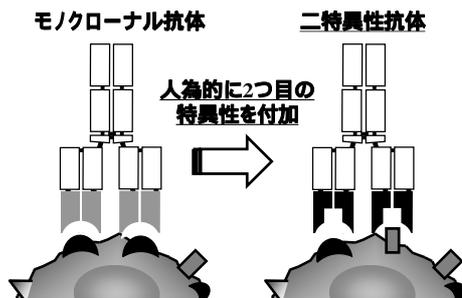


図1 二特異性抗体の概念図

2. 研究の目的

抗体医薬の併用は特にガン治療に於いて、安全性と治療効果を向上させることができるが、薬価の高さも大きな問題の一つであるため現実的ではない。本提案は、モノクローナル抗体に 2 つ目の特異性を付加させることで、併用投与と同等以上の効果を発揮する二特異性抗体の汎用的、かつ安定性と生産性を兼ね備えた調製プロセスの開発を目的としている。

3. 研究の方法

申請者は、これまでガン治療を目指した非天然型の組換え抗体の開発研究に従事し、近年では特に上皮増殖因子(ErbB)受容体群の 1 つ EGFR とリンパ球表面抗原である CD3 を標的とした二重特異性抗体に焦点を絞って研究を進めてきた(*Clin. Cancer Res.* **12**,

4036-42 (2006), *J. Biol. Chem.*, **282**: 27659-65 (2007), *J. Biol. Chem.*, **285**: 20844-9 (2010)など)。ErbB 受容体群は他に HER2、ErbB3、ErbB4 から成り、これらを介したシグナル伝達は、ガン化やその悪性度と高い相関があるため古くからこれらを標的とした治療薬の開発が行われてきた。既に ErbB 受容体群を標的とした抗体医薬は複数上市されているものの、やはり単独では劇的な効果は得られず、近年では同様に併用に関する報告がなされている(*Cancer Res.*, **70**: 2485-94 (2010)など)。即ち、汎用的な抗体の二特異性化プロセスの開発に於いて、抗 EGFR 抗体をモデルに、他の ErbB 受容体への特異性の付加を目指すことで、同時に新規抗体医薬として実現性の高いシーズを創製できると考えた。

まず EGFR と ErbB3 が互いに構造上の類似性が高いことから、これらの両者に結合する EGFR/ErbB3 二特異性抗体の創製を目指した。抗 EGFR 抗体の重鎖可変領域断片(VH)に変異を導入したライブラリとファージ提示を用いた選択操作を行った後、軽鎖可変領域断片(VL)に変異を導入したライブラリと新たに開発したドメインスワッピングを利用した選択法を用いて二特異性抗体の取得を進めた。変異導入箇所や変異アミノ酸種、さらには結合活性の評価手法も検討しつつ開発を進めた。EGFR/ErbB3 二特異性抗体を取得した後は、本手法の汎用性を検証するため、抗体医薬の主要な標的抗原である HER2 と EGFR の両者に結合する EGFR/HER2 二特異性抗体の開発も進めた。

4. 研究成果

まず抗 EGFR 抗体の VH に変異を導入したライブラリを提示したファージを調製後、既にこれまでに樹立している ErbB3 強制発現 CHO 細胞を用いた生細胞パニングを行った。得られたクローンの配列解析の結果、濃縮クローンは得られなかったもののアミノ酸の出現頻度には偏りがみられたため、可溶性の Fv(VH + VL)として調製しフローサイトメトリーにより結合活性を評価したが、EGFR への結合活性は担保していたものの ErbB3 への結合活性はみられなかった。変異導入箇所

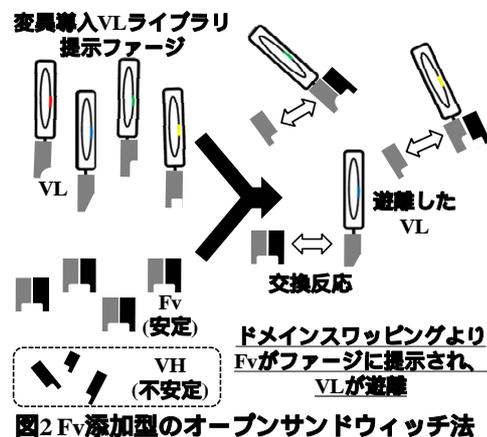


図2 Fv添加型のオープンサンドウィッチ法

の拡大は、EGFR への結合活性の喪失が懸念されるため、VL への変異導入ライブラリの作製と選択操作を目指したが、選択時に必要な可溶性のVHは調製が困難である。そこで、新たに Fv 添加型のオープンサンドウィッチ法の開発を進めた(図 2)。本手法は、ファージに提示させた VL と Fv を構成している VL がドメインスワッピングにより入れ換わることを前提としているため、まずこのことを実証するために、検出用のペプチドタグを付加した VL と検出用のペプチドタグを含まない Fv をそれぞれ個別に大腸菌発現系を用いて調製し、両者を混合後 EGFR に対する結合活性の有無により交換反応を評価した。結果、混合比等を検討することで、効率的にドメインスワッピングを起こす条件を得ることに成功した(図 3)。

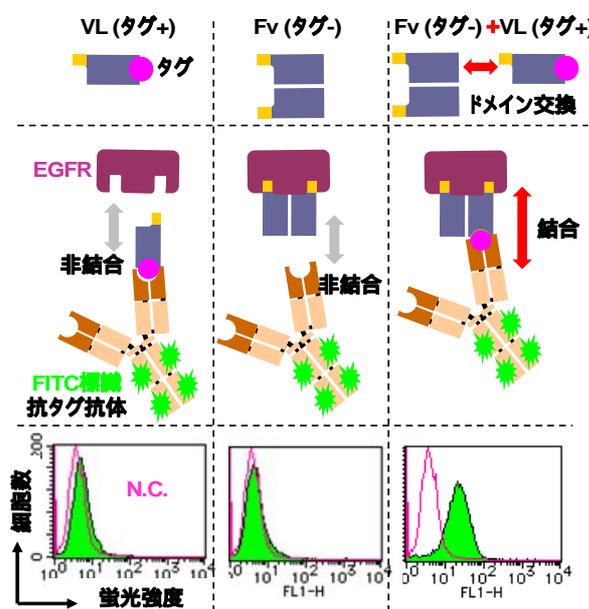


図3 ドメインスワッピングの検証

続いて、変異導入箇所を決定するために結晶構造を基に、溶媒表面に露出している残基を選抜した結果、14箇所が候補として挙げられた。しかしながら、終止コドンの出現頻度を減らすために通常、変異導入コドンとしてNNKが用いられるが、10箇所の場合でも理論規模は $32^{10} \sim 10^{15}$ となり調製可能なライブラリ規模をはるかに越えてしまう。一方、バイナリーコードと名付けられたチロシンとセリンの2種のアミノ酸だけで十分にタンパク質間相互作用を創出可能であることが報告されている。そこで、VL中にもEGFRへの結合ホットスポットが存在する可能性を考慮して、バイナリーコードに野生型のアミノ酸を加えた3アミノ酸に絞ったライブラリの作製を試み、結果理論規模を担保させたライブラリA(変異導入箇所14、出現アミノ酸種3)の調製に成功した。さらに、よりライブラリ規模を担保するため変異導入を10箇所に絞ったライブラリBも調製し、配列解析により多様性を確認した。これら2つのライ

ラリに加えて、既存のライブラリC(変異導入箇所3、出現アミノ酸種20)を用いて、ErbB3強制発現CHO細胞と正常なCHO細胞をそれぞれ利用した生細胞パニングを3ラウンド行った結果、ライブラリAのみ濃縮傾向がみられた。

続いて、選択操作後のライブラリをそれぞれ大腸菌発現用ベクターに移し替えた後、配列解析を行ったところ、ライブラリAとCからはクローンの濃縮がみられた。各々大腸菌を形質転換後、菌体内上清画分を用いてフローサイトメトリーにより、ErbB3強制発現CHO細胞、EGFR強制発現CHO細胞、さらには正常なCHO細胞に対して結合活性評価を行った。結果、いずれも強い活性はみられなかったため、二特异性抗体の濃度がフローサイトメトリーで評価できる十分な量ではないと判断し、ELISAを用いた新たな評価系の確立を進めた。結果、標的細胞をパラホルムアルデヒドで固定化した後、形質転換させた大腸菌の超音波破碎上清を添加し、1時間後にHRP標識した抗His-tag抗体を用いて検出を行うことで評価可能であることが示された。そこで、まず抗EGFR抗体のVLへの変異導入数が異なる3つのライブラリから得られたクローンを用いて、本来の標的抗原であるEGFRに対する結合評価を行った(図4)。EGFR強制発現CHO細胞を固定化させたプレートを用いて評価した結果、変異導入箇所数が少ないライブラリほど結合を保持しているクローンが多くみられ、ライブラリCの結合陽性率が最も高いことが明

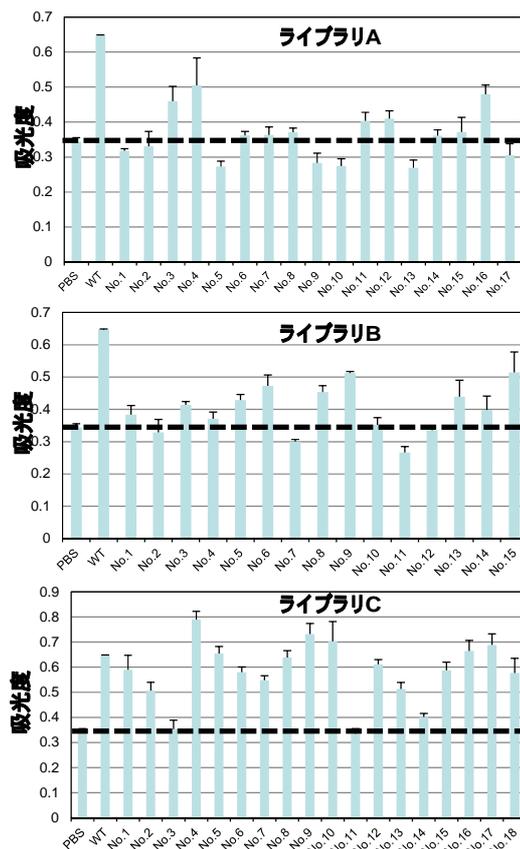


図4 ELISAを用いたEGFRへの結合活性評価

らかになった。

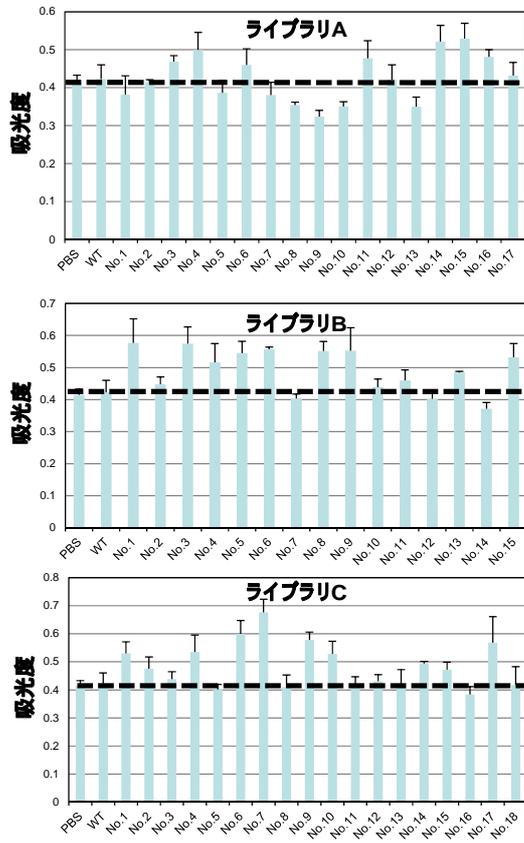


図5 ELISAを用いたErbB3への結合活性評価

続いて、ErbB3 に対する結合活性評価を ErbB3 強制発現 CHO 細胞を固定化させたプレートを用いて行ったところ(図 5)、変異導入箇所数との相関はみられなかったもののいずれのライブラリ中にも結合活性を示すクローンがみられた。

以上より、EGFR と ErbB3 の両者に結合する EGFR/ErbB3 二特異性抗体の取得に成功したため、本プロセスの汎用性を示すため、EGFR と HER2 の両者に結合する EGFR/HER2 二特異性抗体の取得を、同様の条件および手法を用いて進めた。まず選択に先駆けて、生細胞パニングに必要な HER2 を強制発現させた CHO 細胞株の樹立を目指した。ヒト乳ガン細胞株(SK-BR-3)から mRNA を抽出し、さらに cDNA を合成後、PCR 増幅させ、動物細胞用発現ベクターに挿入した。リポフェクション法により CHO 細胞に遺伝子導入後、抗生物質によるスクリーニングを経て、限界希釈法によるクローニングを行った。得られた HER2 強制発現 CHO 細胞の評価をフローサイトメトリーを用いて行った結果(図 6)、EGFR/ErbB3 二特異性抗体の取得に用いた ErbB3 強制発現 CHO 細胞が、抗 ErbB3 抗体のみ結合活性を示したのに対し、抗 HER2 抗体のみ結合活性がみられたことから HER2 強制発現 CHO 細胞の樹立に成功したといえる。そこで、この細胞と EGFR/ErbB3 二特異性抗体の取得時と同様に VL に変異度導入した 3 種類のライブラリ

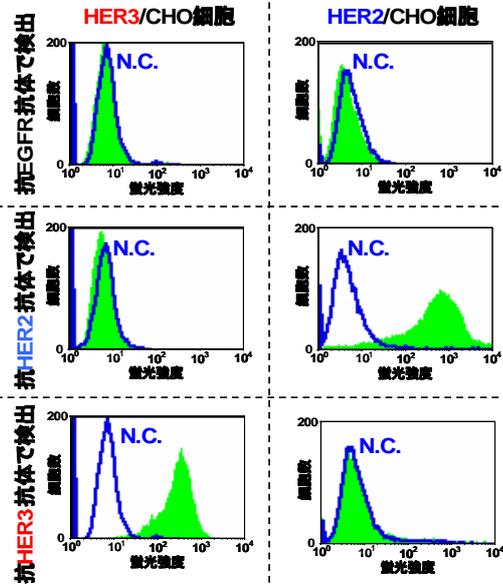


図6 樹立したHER2強制発現CHO細胞の評価

を用いて選択操作を行った後、ELISA により結合活性を評価した。結果、両者に結合を示すクローンの取得に成功したが、クローンの濃縮等を示したライブラリは、EGFR/ErbB3 二特異性抗体の取得の際とは傾向が異なっていたため、複数のコンセプトに基づくライブラリを準備することの重要性が示された。以上より、複数の VL 変異導入ライブラリを用い、Fv 添加型のオープンサンドウィッチ法を用いることで、モノクローナル抗体でありながら 2 つ目の特異性を人為的に付加させた二特異性抗体を取得可能なプロセスの構築に成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 17 件)

Asano R., Shimomura I., (1 番目他 17 名) Rearranging the domain order of a diabody-based IgG-like bispecific antibody enhances its antitumor activity and improves its degradation resistance and pharmacokinetics. *MABs*, **6**, 1243-1254 (2014) 査読有, doi: 10.4161/mabs.29445.

浅野竜太郎, 熊谷 泉, タンパク質工学を駆使した高機能性二重特異性抗体の開発. *生化学*, **86**, 469-473 (2014), 査読無

Lee K.H., Tsutsui T., Asano R., (4 番目他 4 名) Generation of high-producing cell lines by overexpression of cell division cycle 25 homolog A in Chinese hamster ovary cells. *J. Biosci. Bioeng.*, **116**, 754-760 (2013) 査読有, doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.05.032.

Asano R., Hagiwara Y., (1 番目他 8 名)

Multimerization of anti-(epidermal growth factor receptor) IgG fragments induces an antitumor effect: the case for humanized 528 scFv multimers. *FEBS J.*, **280**, 4816-4826 (2013) 査読有, doi: 10.1111/febs.12451.

Asano R., Kumagai T., (1 番目他 16 名) Domain order of a bispecific diabody dramatically enhances its antitumor activity beyond structural format conversion: the case of the hEx3 diabody. *Protein Eng. Des. Sel.*, **26**, 359-367 (2013) 査読有, doi: 10.1093/protein/gzt009.

Nakanishi T., Maru T., Asano R., (6 番目他 4 名) Development of an Affinity-Matured Humanized Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Antibody for Cancer Immunotherapy. *Protein Eng. Des. Sel.*, **26**, 113-122 (2013) 査読有, doi: 10.1093/protein/gzs088.

Hattori T., Umetsu M., Asano R., (6 番目他 4 名) A High-Affinity Gold-Binding Camel Antibody: Antibody Engineering for One-Pot Functionalization of Gold Nanoparticles as Biointerface Molecules. *Bioconjug. Chem.*, **23**, 1934-1944 (2012) 査読有, doi: 10.1021/bc300316p.

Asano R., Nakayama M., (1 番目他 9 名) Construction and humanization of a functional bispecific EGFR × CD16 diabody using a refolding system. *FEBS J.*, **279**, 223-233 (2012) 査読有, doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08417.x.

浅野竜太郎, 熊谷 泉, 進化する抗体医薬. *リウマチ科*, **47**, 700-706 (2012) 査読無

Watanabe Y., Asano R., (2 番目他 17 名) In vitro and in vivo antitumor effects of recombinant bispecific antibodies based on humanized anti-EGFR antibody. *Oncol. Rep.*, **26**, 949-955 (2011) 査読有, doi: 10.3892/or.2011.1382.

浅野竜太郎, 熊谷 泉, タンパク質工学を駆使した次世代抗体医薬の創製. *医工学治療*, **23**, 218-223 (2011) 査読無

浅野竜太郎, 熊谷 泉, 低分子抗体と抗体様スキャフォールドに基づく次世代抗体医薬の開発. *BIO INDUSTRY*, **28**, 22-27 (2011) 査読無

浅野竜太郎, 熊谷 泉, 抗体医薬の大腸菌を用いた製造技術のあゆみ. *PHARM TECH JAPAN*, **27**, 67-73 (2011) 査読無

浅野竜太郎, 熊谷 泉, 高機能性次世代

抗体医薬の分子設計. *細胞*, **43**, 24-28 (2011) 査読無

〔学会発表〕(計 19 件)

Asano R. 他, Cytotoxic enhancement of a bispecific diabody with specificity for EGFR and CD3 by rearranging a domain order, *FEBS-EMBO* 2014, 2014 年 9 月 1 日, パリ(フランス)

浅野竜太郎 他, 多角的視点からの低分子二重特異性がん治療抗体の高機能化デザイン, 日本生化学会東北支部 第 80 回例会・シンポジウム, 2014 年 5 月 10 日, アキタパークホテル(秋田)

浅野竜太郎 他, 二重特異性抗体のタンパク質工学を駆使した高機能化, 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 30 日, 熊本大学 文学部(熊本)

浅野竜太郎 他, 二重特異性抗体のタンパク質工学を駆使した高機能化, *GE Life Sciences Day* 2013, 2013 年 7 月 3 日, パシフィコ横浜(横浜)

Asano R. 他, Cytotoxic Enhancement of a Bispecific Diabody by Format Conversion to Tandem Single-chain Variable Fragment, *3Antibody Engineering & Antibody Therapeutics* 2012, 2012 年 12 月 3 日, サンディエゴ(米国)

浅野竜太郎 他, EGFR と CD3 を標的とした二重特異性 diabody のドメイン組換えによる細胞傷害活性の増強, 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 10 月 19 日, ロイトン札幌(札幌)

Asano R. 他, Characterization of dimeric bispecific diabody (tetrabody) with highly enhanced cytotoxicity, *Next Generation Protein Therapeutics Summit*, 2011 年 6 月 20 日, サンフランシスコ(米国)

浅野竜太郎 他, 多量体化抗 EGFR 一本鎖抗体の in vivo 機能解析と高機能化, 第 11 回日本蛋白質科学会年会, 2011 年 6 月 8 日, ホテル阪急エキスポパーク(大阪)

〔図書〕(計 3 件)

浅野竜太郎, 熊谷 泉, 次世代医薬開発に向けた抗体工学の最前線, 116-123 (2012), シーエムシー出版

浅野竜太郎, 熊谷 泉, 新機能抗体開発ハンドブック, 41-45 (2012), エヌ・ティー・エス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅野 竜太郎 (ASANO, RYUTARO)
東北大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号: 80323103