

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790136

研究課題名（和文） 天然リガンドを起点とした高効率機能抗体作製法の開発

研究課題名（英文） Development of a highly efficient method for generating functional antibodies based on grafting natural ligands

研究代表者

中西 猛 (NAKANISHI TAKESHI)

大阪市立大学・大学院工学研究科・講師

研究者番号：20422074

研究成果の概要（和文）：本研究では、タンパク質性リガンド由来のペプチド断片を抗体可変領域に対して導入することにより、機能抗体作製手法の開発を目指した結果、相補性決定領域に外来ペプチドを挿入したペプチド断片移植抗体を作製することができた。また、数種類のペプチド断片移植抗体の作製を試みたところ、哺乳類細胞を用いて安定的に調製可能であることがわかった。以上の知見に基づき、哺乳類細胞発現系を利用し、ペプチド断片移植抗体の選択系を構築することによって、様々な標的分子に対する機能抗体を高効率に作製する手法の確立に向けて展開できると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, to develop a method for generating functional antibodies, we grafted the peptide fragment, which was derived from the proteinous ligand, onto the variable region of a human antibody. As the results, we succeeded in preparing the peptide-grafted antibody in which an extraneous peptide fragment was inserted into the complementary determining region. We also constructed robust mammalian expression system of peptide-grafted antibodies. These results encouraged us to enable highly efficient generation of functional antibodies with specificity for the various target molecules.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：抗体、ペプチド移植、タンパク質工学、受容体、分子認識、リガンド

1. 研究開始当初の背景

近年、医薬品産業における抗体医薬開発の重要性はますます高まっている。治療用抗体の多くはアンタゴニストあるいはアゴニストであることから、機能抗体を効率的に作製する手法に関する基盤技術の重要性は今なお高い。現在では種々のモノクローナル抗体

作製法が報告されているが、いずれかの手法により標的分子特異的抗体を取得できたとしても、アンタゴニストあるいはアゴニスト活性を有する機能抗体を取得できるか否かは偶然性によるところが大きい。

元来優れた分子認識能を持つ抗体に天然のタンパク質性リガンド由来のペプチド断片を導入し、高機能化を図ることによって、

医薬として十分な活性を有する機能抗体の作製を目指した。これらの手法を確立することによって、機能抗体を効率良く作製可能であり、抗体医薬開発への貢献が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト抗体の可変領域に対してタンパク質性リガンド由来のペプチド断片を導入し、アンタゴニストあるいはアゴニスト活性を有する機能抗体を高い効率で作製する手法の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) ペプチド断片移植抗体の設計

本研究では、ヒト抗体可変領域に対して、ヒト上皮増殖因子(EGF)由来のペプチド断片の導入を試みた。EGF と EGF 受容体(EGFR)の複合体結晶構造に基づいて、相互作用に関与すると考えられる EGF 由来ペプチド断片を選定した。EGF 由来ペプチド断片を相補性決定領域(CDR)に挿入した複数種の抗体配列に対して、各々構造モデルを構築し、ペプチド導入箇所を決定した。

(2) ペプチド断片移植抗体の発現・調製

EGF 由来ペプチド断片を挿入したヒト抗体可変領域遺伝子を合成し、大腸菌発現系を構築した。形質転換体から得た不溶性タンパク質をグアニジン塩酸で可溶化後、金属キレートアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製し、希釈法による巻き戻し操作を行った。また、ペプチド断片移植抗体遺伝子の哺乳類細胞発現ベクターを作製し、ヒト胎児腎細胞株 HEK293T を用いて、抗体遺伝子を発現させた。

(3) ペプチド断片移植抗体の機能評価

作製したペプチド断片移植抗体を用いて、フローサイトメトリーにより EGFR を過剰発現するがん細胞に対する結合活性を評価した。

(4) 変異型ペプチド断片移植抗体の作製

標的分子に対する結合活性を高めるために、導入した EGF 由来ペプチド断片の根元に位置する領域に対して、スペーサー配列を導入した。

4. 研究成果

(1) ペプチド断片移植抗体の設計

構築した構造モデルに基づき、ヒト抗体重鎖可変領域の 2 番目の CDR に対して、EGF 由来ペプチド断片を挿入した。

(2) ペプチド断片移植抗体の発現・調製

大腸菌分泌発現系を用いて、可溶性タンパク質として調製を試みたが、目的タンパク質の大部分は不溶性画分に存在していた。得られた不溶性タンパク質を用いて、希釈法により巻き戻し操作を行い、可溶性ペプチド断片移植抗体を調製することができたが、その収量は僅かであった。今後、巻き戻し条件の更なる検討が必要であると考えられる。一方、哺乳類細胞発現系を用いて、大腸菌の場合と同様に分泌発現を試みたところ、培養上清に目的タンパク質の存在を確認できたことから、可溶性タンパク質として調製することができた。

(3) ペプチド断片移植抗体の機能評価

フローサイトメトリーにより EGFR 陽性細胞に対する結合活性を評価した結果、コントロール抗体と比べて有意な結合を確認できなかった。結合活性を示さなかった原因として、①導入した EGF 断片が分子表面に十分露出していない、もしくは②EGF の断片化により結合力が著しく低下した可能性を考えた。

(4) 変異型ペプチド断片移植抗体の作製

(3)の結果から、導入した EGF 断片を分子表面に露出させるために、EGF 断片の根元に位置する領域に対して柔軟性の高いスペーサー配列を挿入した変異体を作製した。(3)と同様に、抗原結合活性を評価した結果、有意なピークシフトを観測できなかった。柔軟性の高い配列の導入によって、結合に伴うエントロピー損失が大きくなったため、結合力の向上に繋がらなかったと考えている。

本研究では、ヒト抗体可変領域に対して、タンパク質性リガンドに由来するペプチド断片を導入したペプチド断片移植抗体を作製した。ペプチド断片移植抗体は、哺乳類細胞を用いることで安定的に調製可能であることがわかった。

本研究期間中に達成し得なかったが、構築した哺乳類細胞発現系を利用し、ペプチド断片移植抗体の選択系を構築することによって、効率的な機能抗体作製法の確立に向けた展開が期待される。

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 6 件)

- ① Takeshi Nakanishi, Takamitsu Maru, Kazuhiro Tahara, Hideaki Sanada, Mitsuo Umetsu, Ryutarō Asano, and Izumi Kumagai, 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
- ② Takamitsu Hattori, Mitsuo Umetsu, Takeshi Nakanishi, Satoko Sawai, Shinsuke Kikuchi, Ryutarō Asano, and Izumi Kumagai, 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
- ③ Ryutarō Asano, Makoto Nakayama, Hiroko Kawaguchi, Tsuguo Kubota, Takeshi Nakanishi, Mitsuo Umetsu, Hiroki Hayashi, Yu Katayose, Michiaki Unno, Toshio Kudo, and Izumi Kumagai, Construction and humanization of a functional bispecific EGFR × CD16 diabody using a refolding system. *FEBS J.* **279**, 223-233, 2012. 査読有
- ④ Yasuhiro Watanabe, Ryutarō Asano, Kyoko Arai, Ippei Shimomura, Hiromi Ogata, Hiroko Kawaguchi, Hiroki Hayashi, Hideo Ohtsuka, Hiroshi Yoshida, Yu Katayose, Shinichi Egawa, Takeshi Nakanishi, Mitsuo Umetsu, Hiroshi Yasui, Tadao Ishida, Kohzoh Imai, Toshio Kudo, Michiaki Unno, and Izumi Kumagai, 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
- ⑤ Hideki Watanabe, Kengo Kanazaki, Takeshi Nakanishi, Hidenori Shiotsuka, Satoru Hatakeyama, Masaru Kaieda, Takeshi Imamura, Mitsuo Umetsu, and Izumi Kumagai, Biomimetic engineering of modular bispecific antibodies for biomolecule immobilization. *Langmuir* **27**, 9656-9661, 2011. 査読有
- ⑥ Ryutarō Asano, Keiko Ikoma, Ippei Shimomura, Shintaro Taki, Takeshi Nakanishi, Mitsuo Umetsu, and Izumi Kumagai, Cytotoxic enhancement of a bispecific diabody (Db) by format conversion to tandem single-chain variable fragment (taFv): THE CASE OF THE hEx3 DIABODY. *J. Biol. Chem.* **286**, 1812-1818, 2011. 査読有
- [学会発表] (計 7 件)
- ① 大崎 智弘, 中西 猛, 星 裕孝, 澤田 鉄二, 木村 健二郎, 内田 素行, 平川 弘聖, 北村 昌也, チロシン残基に着目した抗ムチン抗体Nd2の抗原認識機構の解析, 第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 16 日, 福岡国際会議場・マリメッセ福岡
- ② 工藤 光代, 中西 猛, 北村 昌也, 単一ドメイン抗体可変領域を用いて設計した RNase 融合抗体の作製と機能評価, 第 12 回日本蛋白質科学会年会, 2012 年 06 月 21 日, 名古屋国際会議場
- ③ 大崎 智弘, 藤澤 真吾, 北口 将大, 北村 昌也, 中西 猛, 安定性を高めたヘテロ会合ドメインの利用による抗体の高機能化, 第 12 回日本蛋白質科学会年会, 2012 年 06 月 21 日, 名古屋国際会議場
- ④ 水巻 耕輔, 北村 昌也, 中西 猛, ペプチド移植による抗体様 RNA 分解酵素の作製, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 2012 年 3 月 24 日, 京都女子大学
- ⑤ 中西 猛, 工藤 光代, 北村 昌也, がん関連抗原を標的とするリボスクレアーゼ融合抗体の作製と評価, 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 22 日, 京都国際会館
- ⑥ 工藤 光代, 北村 昌也, 中西 猛, EGFR を標的とした RNase 融合抗体の作製, 第 11 回日本蛋白質科学会, 2011 年 6 月 8 日, ホテル阪急エキスポパーク
- ⑦ 中西 猛, 藤澤 真吾, 北村 昌也, ヘテロ会合ペプチドの融合による低分子化抗体の多機能化, 第 11 回日本蛋白質科学会, 2011 年 6 月 8 日, ホテル阪急エキスポパーク
- [図書] (計 1 件)
- ① 中西 猛, 真田 英明, 熊谷 泉, 次世代医薬開発に向けた抗体工学の最前線(フージ提示系による親和性の向上), シーエムシー出版, 47-52, 2012.
- [その他]
ホームページ等
<http://www.bioa.eng.osaka-cu.ac.jp/bic/>
6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 猛 (NAKANISHI TAKESHI)

大阪市立大学・大学院工学研究科・講師

研究者番号：20422074