

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成24年度採択分

平成27年5月22日現在

研究課題名（和文） **ナノ空間インターフェイスのバイオデザイン**

研究課題名（英文） **Bio-design for interface molecules in nano scale**

課題番号：24000011

研究代表者

熊谷 泉 (KUMAGAI IZUMI)

東北大学・大学院工学研究科・名誉教授



研究の概要：本研究は、バイオ分子の中で機能デザインが進んでおり、かつ、様々な分子構造を認識する設計手法がある抗体分子に着目し、その機能抗体断片を構成要素として接合対象素材によらず素材間をナノレベルで正確に接合・アセンブリ制御できるバイオインターフェイス分子を創出するプラットフォーム技術を開発する。そして、架橋分子の立体構造と接合による機能発現の相関を立体構造解析と物理化学的機能解析から知識構造化することによって、細胞・工学ナノ材料が提供する様々なソフト・ハード界面に応じた接合設計を迅速に適応・進化できるナノ空間インターフェイス分子をバイオデザインする。

研究分野：生物機能・バイオプロセス

キーワード：分子認識、タンパク質、ナノバイオ、バイオテクノロジー、抗体

1. 研究開始当初の背景

近年、ナノ・分子レベルでのマニピュレーションが可能となり、ナノ・分子レベルでの正確な生体分子間・細胞間接合やナノ素材からのボトムアップ構造化から、マクロな接合設計では得られない効果の発現が期待されている。例えば、がん細胞表面に活性リンパ球を接合させることでがん細胞を効果的に死滅させる次世代がん免疫療法の場合、抗体分子を利用し受容体間を介してナノレベルで近接合させることによって顕著な治療効果を示す。また、工学材料においては、様々な無機・有機ナノ材料が構築されている現在、ナノ結晶同士の接合は界面間の電子や光子の伝達が変化する、バルク材料では得られない電場・光応答性を示し得る。

その中で我々は、ナノ領域での接合設計にはバイオ分子の特異的分子認識の利用が最も有効であると考え、細胞表層、タンパク質表面、有機分子表面、無機材料表面を特異的な分子認識場としてとらえ、バイオ分子の人工選択を通じて、その相互作用の精密解析に成功してきた。

2. 研究の目的

本研究では、バイオ分子の中で機能デザインが進んでいるタンパク質の抗体分子に着目し、その機能抗体断片を構成要素として接合対象素材によらず素材間をナノレベルで正確に接合・アセンブリ制御できるバイオイ

ンターフェイス分子を創出するプラットフォーム技術を開発する。そして、分子立体構造解析と詳細な物理化学的機能解析から裏付けされた、架橋分子の立体構造と接合による機能発現の相関を知識構造化することによって、細胞・工学ナノ材料が提供する様々なソフト・ハード界面に応じた接合設計を迅速に適応・進化できるナノ空間インターフェイス分子をバイオデザインする。

3. 研究の方法

(1) ソフト界面：次世代がん免疫療仕様様の二重特異性インターフェイス分子の創出

データベースとファージ提示法を利用して、がん細胞表面のヒト上皮増殖因子受容体群を標的とする抗体群と T リンパ球表面の CD 受容体を標的とする抗体群を選択する。そして、それら抗体群の結合機能ドメインから設計できる二重特異性抗体群を、迅速に遺伝子設計し大腸菌で発現させ、かつ、高速にそれらのがん細胞傷害性を評価できるプロセスを開発する。

また、ドメインスワッピングを利用した低分子二重二価抗体を調製し、がん細胞傷害性の評価およびマウスによる抗腫瘍効果を測定する。

(2) ハード界面：光電場応答性素子を目指した工学ナノ材料間のインターフェイス分子の創出

光機能や触媒機能を持つ工学ナノ材料に

結合性を示すペプチド・抗体を、ファージ提示法を利用して取得する。そして、それらペプチド・抗体断片から金属、半導体化合物などの光機能ナノ結晶間を連結できる二重特異性インターフェイス分子を設計し、光照射に応答するナノ集合体を作製する。光応答性の機能評価を行い、ナノ接合・架橋構造と機能の相関をとり、最適な機能発現の設計要素を抽出する。

4. これまでの成果

(1) ソフト界面：次世代がん免疫療仕様様の二重特異性インターフェイス分子の創出

データベースとファージ提示法を利用して、がん細胞とリンパ球を接合するインターフェイス分子の構成要素として、がん細胞表面のヒト上皮増殖因子受容体群を標的とする抗体群と T リンパ球表面の CD 受容体を標的とする抗体群の集団を作製した。そして、それら抗体群の結合機能ドメインから設計できる低分子型の二重特異性抗体群を迅速に遺伝子設計し大腸菌で発現させ、かつ、高速にそれらのがん細胞傷害性を評価できるプロセスを開発した。その結果、これまでの diabody 型抗体よりも飛躍的に傷害性が向上した抗体を取得すると共に、抗体の物性と薬効との相関を取ることができた(図 1)。

また、ドメインスワッピング設計を施して低分子でありながら標的結合サイトが多価な二重多価抗体の設計を行うことによって、さらに薬効が高い抗体を作製することができた(図 2)。

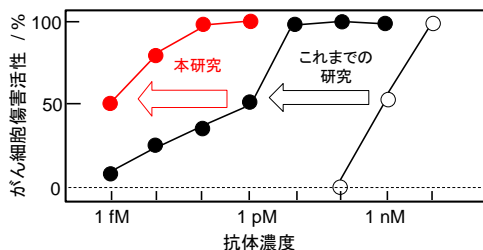


図 1. 二重特異性抗体を用いたがん細胞傷害性試験

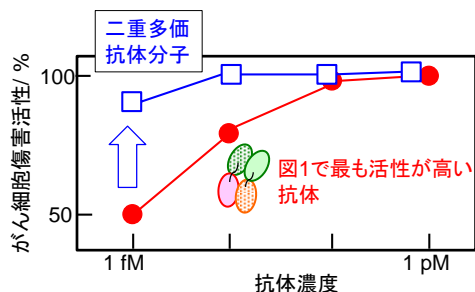


図 2. 二重多価設計によるがん細胞傷害性の向上

(2) ハード界面：光電場応答性素子を目指した工学ナノ材料間のインターフェイス分子の創出

金の多孔質膜は光を照射することによって還元反応を触媒する。我々は、金ナノ粒子は 300°C以下で融解し、酸化亜鉛は弱い酸で溶解する利点を活かし、金と酸化亜鉛に結合する抗体を構成要素として二重特異性インターフェイス分子を作製し、この抗体を介して金と酸化亜鉛のナノ粒子が均一に混合した薄膜を形成させた。そして、その薄膜を 300°Cで焼結後、希酸で酸化亜鉛を溶出させることによって、10 nm を切るサイズの孔を持つ金の多孔質膜を形成させることに成功し、その多孔質膜は通常のものより効果的に光応答で還元反応を触媒することを証明した(図 3)。

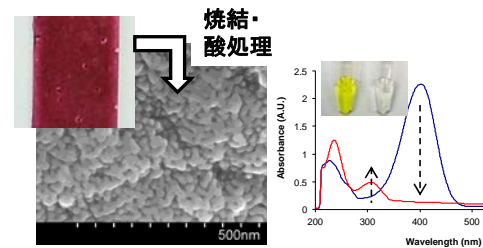


図 3. Au-ZnO ナノ粒子アセンブリから作製した Au 多孔質膜の構造と光応答性触媒反応

5. 今後の計画

(1) ソフト界面：次世代がん免疫療仕様様の二重特異性インターフェイス分子の創出

抗体物性の構造と機能指標を拡充し、抗体物性と薬効(がん細胞傷害性)との相関を充実させ、高い薬効を示す二重特異性抗体を確実に設計できる手法を開発する。

(2) ハード界面：光電場応答性素子を目指した工学ナノ材料間のインターフェイス分子の創出

工学材料特異的抗体断片から作製する二重特異性抗体の架橋構造を変化させて光応答に対する架橋構造と材料の機能との相関をとり、機能発現のルール抽出を行う。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

(1) R. Asano, M. Umetsu, I. Kumagai, et al., 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).

(2) T. Hattori, M. Umetsu, I. Kumagai, A high-affinity gold-binding camel antibody: Antibody engineering for one-pot functionalization of gold nanoparticles as biointerface molecules, *Bioconjugate Chemistry*, 23, 1934-1944 (2012).