

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25420836

研究課題名(和文)高機能抗体創製を指向する分子連結技術の開発

研究課題名(英文)Development of a molecular connection method for generating highly functional antibodies

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヘテロ4量体を形成する短鎖ペプチドを利用することによって、微生物発現系により、がん細胞を標的とする二重特異性抗体の調製を試みた結果、2種の標的分子に対して同時に結合する組換え抗体を作製することができた。また、標的がん細胞に対する傷害性を評価したところ、市販の抗体医薬品と同等のがん細胞傷害性を有することがわかった。以上の結果から、本研究で構築した手法は、高機能抗体を安価に作製するために役立つと期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used a bacterial expression system to produce a bispecific antibody that was heterotetramerized through hetero-associating peptides and that targeted cancer cells. As the results, we succeeded in preparing the recombinant antibody which bound to two target molecules simultaneously. Furthermore, the bispecific antibody showed cytotoxic activity against target tumor cells, and its cytotoxicity was comparable to that of a commercial therapeutic antibody. These results show that our method has high potential for the cost-efficient production of highly functional antibodies.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：抗体 酵素 受容体 タンパク質工学 分子認識

1. 研究開始当初の背景

近年、抗体医薬は、がんやリウマチなど治療困難な疾患に対する治療薬として注目されている。医薬としての価値が高まるにつれて、現在、主に用いられている完全長(IgG)型抗体のコスト高が課題となっており、低コスト化に対する社会的要請は高い。一方、微生物を用いて効率良く生産可能な低分子化抗体では、製造コストの低減が期待できるものの、低分子化に伴う機能性の低下が指摘されている。このような背景の下、従来のIgG型抗体と比べて機能的に同等、さらには上回る組換え抗体を低コストで生産する技術の開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、優れた生産性と機能性を兼ね備えた組換え抗体を創製することを目標として、新規な分子連結技術の開発を目指した(図1)。

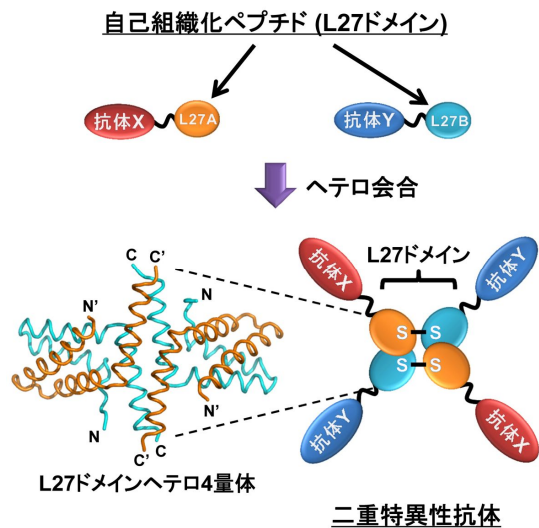


図1 高機能抗体創製を指向する分子連結法の模式図

3. 研究の方法

(1) ペプチド会合体の安定化

本研究では、ヒト由来のヘテロ4量体形成ペプチドを利用することによって、特異的かつ堅牢なタンパク質連結技術の開発を試みた。以前の研究において、ペプチド会合体は、低濃度条件下で解離することが明らかとなった。そこで、会合体の安定化を図るために、立体構造情報に基づいて、システイン残基を変異導入した。変異型ペプチドを用いて、抗体酵素複合体を調製し、その機能を評価した。

(2) 二重特異性抗体の作製

(1)で作製した変異型ペプチドを利用して、CD16 特異的抗体可変領域と上皮増殖因子受容体(EGFR)特異的可変領域から成る二重特異性抗体を大腸菌発現系により調製した。ゲ

ルろ過クロマトグラフィーおよび質量分析法を用いて、調製した二重特異性抗体の会合状態を調べた。

(3) 二重特異性抗体の機能評価

フローサイトメトリーおよび表面プラズモン共鳴(SPR)法により抗原結合性を分析した。さらに、CD16 陽性エフェクター細胞存在下で、EGFR 陽性がん細胞に対する傷害性を調べた。

(4) 二重パラトープ抗体の作製と評価

EGFR に特異的な2種の抗体可変領域に対して、2種の会合ペプチドを融合し、大腸菌発現系を用いて二重パラトープ抗体を調製した。フローサイトメトリーおよびSPR法により抗原結合性を分析した。

4. 研究成果

(1) ペプチド会合体の安定化

電気泳動法により、ジスルフィド結合の形成を確認できた。ジスルフィド結合の導入によって、酵素活性に変化は見られなかったが、標的細胞への結合力は向上したことから、ペプチド会合体の安定化が機能向上に結び付くことがわかった。

(2) 二重特異性抗体の作製

ゲルろ過クロマトグラフィーおよび質量分析法を用いて会合状態を調べた結果、抗体可変領域間を連結している2種のヘテロ4量体形成ペプチドは、ヘテロおよびホモの組み合わせでジスルフィド結合を形成していた。この結果より、作製した二重特異性抗体には、2種の異なる会合状態が存在すると考えた。

(3) 二重特異性抗体の機能評価

フローサイトメトリーおよびSPR法による分析結果から、二重特異性抗体は、2種の標的抗原に対して同時に結合できることがわかった。また、作製した二重特異性抗体は、EGFR を標的とする市販の抗体医薬品に匹敵するがん細胞傷害性を有していた。

(4) 二重パラトープ抗体の作製と評価

二重パラトープ抗体は、4量体として存在し、主にヘテロ鎖間でジスルフィド結合を形成していることがわかった。SPR解析の結果、標的抗原に対する二重パラトープ抗体の結合速度は、単一パラトープ抗体に比べて若干遅かったが、解離速度に違いは見られなかった。フローサイトメトリーを用いて抗原陽性細胞に対する結合を比較したところ、二重パラトープ抗体では、単一パラトープ抗体に比べて僅かに大きいピークシフトを観測した。これらの結果から、二重パラトープ抗体は、細胞表面の標的受容体に対して、効果的に作用する可能性があると考えた。

以上の研究結果から、本研究で構築したヘテロ4量体形成ペプチドを利用したタンパク質連結法は、高機能抗体創製において汎用的かつ有用性の高い技術であると考えている。

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3件)

Tomohiro Osaki, Cai-Xia Wang, Taro Tachibana, Masayuki Azuma, Masaya Kitamura, and Takeshi Nakanishi, Generation and characterization of rat monoclonal antibodies against epidermal growth factor receptor. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.* **34**, 418-422, 2015. DOI: 10.1089/mab.2015.0034 査読有

Tomohiro Osaki, Shingo Fujisawa, Masahiro Kitaguchi, Masaya Kitamura, and Takeshi Nakanishi, Development of a bispecific antibody tetramerized through hetero-associating peptides. *FEBS J.* **282**, 4389-4401, 2015. DOI: 10.1111/febs.13505 査読有

Ryutaro Asano, Takashi Kumagai, Keisuke Nagai, Shintaro Taki, Ippei Shimomura, Kyoko Arai, Hiromi Ogata, Mai Okada, Fumitaka Hayasaka, Hideaki Sanada, Takeshi Nakanishi, Teemu Karvonen, Hiroki Hayashi, Yu Katayose, Michiaki Unno, Toshio Kudo, Mitsuo Umetsu, and Izumi Kumagai, 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. DOI: 10.1093/protein/gzt009 査読有

[学会発表](計13件)

大水 貴裕, 大崎 智弘, 青木 基, 北村 昌也, 中西 猛, 大腸菌発現系による TNF 融合抗体の作製, BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会 合同大会) 2015年12月3日, 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)

中西 猛, 大崎 智弘, 藤沢 真吾, 北口 将大, 北村 昌也, 二重特異性抗体の作製におけるヘテロ会合ペプチドの利用, 第15回日本蛋白質科学会年会, 2015年6月26日, あわぎんホール (徳島県徳島市)

西浦 大祐, 工藤 光代, 大崎 智弘, 北

村 昌也, 中西 猛, ドメイン置換による EGFR 特異的リボヌクレアーゼ融合抗体の高機能化, 第66回日本生物工学会大会, 2014年9月11日, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

大崎 智弘, 藤沢 真吾, 北口 将大, 北村 昌也, 中西 猛, 自己組織化ペプチドの融合によるシングルドメイン抗体の多量体化, 第66回日本生物工学会大会, 2014年9月11日, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

大崎 智弘, 藤沢 真吾, 北口 将大, 北村 昌也, 中西 猛, ヘテロ会合ペプチドによる抗体断片の多量体化, GE Life Sciences Day 2014, 2014年8月1日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

西浦 大祐, 工藤 光代, 大崎 智弘, 北村 昌也, 中西 猛, ドメイン置換によるリボヌクレアーゼ融合抗体の高機能化, 第14回日本蛋白質科学会年会, 2014年6月26日, 横浜産貿ホール マリネリア (神奈川県横浜市)

大崎 智弘, 藤沢 真吾, 北口 将大, 北村 昌也, 中西 猛, ヘテロ会合ペプチドの四量体形成による二重特異性抗体の作製, 第14回日本蛋白質科学会年会, 2014年6月26日, 横浜産貿ホール マリネリア (神奈川県横浜市)

大崎 智弘, 藤沢 真吾, 北口 将大, 北村 昌也, 中西 猛, 自己組織化ペプチドを利用した二重特異性抗体の作製, 日本化学会第94春季年会, 2014年3月29日, 名古屋大学 (愛知県名古屋市)

山田 陽介, 大崎 智弘, 中西 猛, 岡本 康弘, 澤田 鉄二, 木村 健二郎, 平川 弘聖, 北村 昌也, 膵癌治療薬開発に向けたムチン特異的組換え抗体の作製とその評価, 日本化学会第94春季年会, 2014年3月27日, 名古屋大学 (愛知県名古屋市)

大崎 智弘, 藤沢 真吾, 北口 将大, 北村 昌也, 中西 猛, ヘテロ四量体形成ドメインの利用による抗体の高機能化, 第65回日本生物工学会大会, 2013年9月20日, 広島国際会議場 (広島県広島市)

中西 猛, 工藤 光代, 西浦 大祐, 大崎 智弘, 北村 昌也, リボヌクレアーゼ融合抗体の機能におけるドメイン配置の影響, 第65回日本生物工学会大会, 2013年9月20日, 広島国際会議場 (広島県広島市)

中西 猛, 工藤 光代, 大崎 智弘, 北村 昌也, リボヌクレアーゼ融合抗体のドメイン構造と機能, 第 13 回日本蛋白質科学会年会, 2013 年 6 月 14 日, とりぎんホール(鳥取県鳥取市)

大崎 智弘, 藤澤 真吾, 北口 将大, 北村 昌也, 中西 猛, 自己組織化ペプチドの融合による低分子化抗体の高機能化, 第 13 回日本蛋白質科学会年会, 2013 年 6 月 13 日, とりぎんホール(鳥取県鳥取市)

〔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