

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840015

研究課題名(和文) 構造情報に立脚した変異型IDH1/2抗体MsMab-1/-2の多重特異性の改良

研究課題名(英文) Improvement of the multi-specificity for anti-IDH1/2 mAb MsMab-1 and 2 based on structure

研究代表者

小笠原 諭 (Ogasawara, Satoshi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30546685

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)：1アミノ酸変異が生じたイソクエン酸デヒドロゲナーゼ(IDH)1/2に対して多重特異性を有するMsMab-1、及び2に対する構造解析を試みた。MsMab-1の立体構造情報から、基質特異性に寄与するアミノ酸残基を同定し、変異導入を行ったところ、基質特異性の変化を確認した。一方、MsMab-2は生産性が悪く、構造解析実験まで至らなかった。

変異型IDHに対して多重特異性を有するMsMab-3を新たに樹立した。この抗体は変異型IDHペプチドに対して反応するがタンパク質には反応しない抗体であった。

研究成果の概要(英文)：We tried to solve the crystal structure of MsMab-1 and 2. We identified a critical amino acid residue for the multi-specificity from the crystal structure of MsMab-1. Hence MsMab-1 was mutated the amino acid residue of antigen recognition site based on the structure. Mutated MsMab-1 was changed the specificity against mutated IDH1/2. MsMab-2 was not able to try a crystallization experiment for its low level of productivity. We generated a novel multi-specific anti-IDH1/2 monoclonal antibody MsMab-3, which could bind mutated IDH1/2 peptides but not mutated IDH1/2 proteins.

研究分野：構造生物化学

キーワード：モノクローナル抗体 多重特異性 X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(isocitrate dehydrogenase: IDH)は、ヒトでは IDH1、IDH2、IDH3 の 3 つのサブタイプが知られている。その中で、酵素活性中心である **IDH1 の 132 残基目のアルギニン(R132)、IDH2 の 172 残基目のアルギニン(R172)**に変異が入ると、イソクエン酸を α -ケトグルタル酸に変換する本来の活性を失い(loss of function)、 α -ケトグルタル酸を 2-ヒドロキシグルタル酸(2-HG)に変換する新たな酵素活性を得る(gain of function)。この 2-HG は Oncometabolite (癌代謝物)であり、グリオーマの発生に重要である。

変異型 IDH1/2 は、WHO 分類のグレード II、III のグリオーマや、そこから進行したグレード IV のグリオブラストーマ (secondary glioblastoma:sGBM) で高頻度に検出されるが、グリオブラストーマとして初発するグリオーマ (primary/de novo glioblastoma: prGBM) ではほとんど変異が検出されない。**IDH1/2 に一旦変異が入ると、アストロサイトーマにおける p53 の変異、オリゴデンドログリオーマにおける 1p/19q loss などの一連の変異が生じ、悪性化が進むことが報告され、グリオーマの発生に最も重要な分子として現在注目されている (図 1)**。また、米国デューク大学メディカルセンターを中心に、**変異型 IDH1/2 が検出されるグリオーマの予後は野生型 IDH1/2 の予後よりも格段に良く、**グリオーマの予後診断マーカーとして有用であることが示されてきた (Yan *et al*, NEJM, 2009)。

変異型 IDH1/2 については現在のところ、IDH1 で少なくとも 6 種類(R132H/C/S/G/L/V): 比率として 90%/4%/2%/1%/<1%/<1%)、IDH2 で少なくとも 5 種類(R172K/M/W/G/S): 比率として 3%/<1%/<1%/<1%/<1%)のアミノ酸変異が報告されている。以上のことから、変異型 IDH1/2 を検出することは、グリオーマの

予後診断に重要であることは自明である。しかし現在主流である生体サンプルから DNA を抽出し、IDH1/2 ダイレクトシーケンス法による変異の検出は困難なことが多い。また、血清中等から 2-HG 量を測定する方法もあるが、前処理の問題や質量分精機装置等、高額な装置を必要とするため汎用性が低い。そこで、野生型には反応せず、変異型 IDH1/2 のみに反応する抗体は、診断において非常に有用である。

我々の研究室では加藤らを中心に、現在までに野生型 IDH1/2 には反応せず、変異型 IDH1/2 のみに反応するモノクローナル抗体を多数樹立してきた(Kato *et al.*, BBRC, 2009, Kaneko, Kato *et al.*, BBRC, 2011, Kaneko, Kato *et al.*, BBRC, 2012, Kato *et al.*, BBRC, 2012, Kato and Kaneko, BBRC, 2012)。その中で、**MsMab-1、および MsMab-2 は、複数の変異型 IDH1/2 に対して反応性を有するという、多重特異性**を持った非常に興味深い抗体であった(業績 1、2、図 2)。これらの抗体は変異型 IDH1 を認識する抗体を作製する過程で樹立された抗体である。MsMab-1 は IDH1/2 を発現させる宿主により特異性が異なるが、IDH1-R132H/S/G、および IDH2-R172M/G/S を認識する。一方で MsMab-2 は IDH1-R132L と IDH2-R172M を認識するが、野生型の IDH1/2 に対しては全く認識しないという、それぞれが異なる多重特異性を有する抗体であった。

2. 研究の目的

申請者は MsMab-1/-2 の 2 つ抗体の多重特異性に着目した。診断において、個々の変異型を認識する抗体を使用する場合、現在までに知られている 11 個の変異に対する抗体が必要であり、それぞれ検出する場合は煩雑になってしまう。また、11 個の抗体を混合して使用する場合、交叉反応を十分検討しなくてはならない。一方、MsMab-1/-2 のような多重特異的抗体が、上記の問題が克服でき、診断

応用にも有用と考えた。そこで、本研究では MsMab-1/-2 の立体構造情報に立脚した抗体遺伝子改変を行って、**多重特異性の向上と結合親和性の増強**した**高感度な抗体**へ改良することを目的とする。そのため、以下の2つの研究目標を提案し、改良型抗体を作製する。

3. 研究の方法

< MsMab-1/-2 の立体構造解析 >

MsMab-1/-2 がどのように基質と結合しているのか、**X線結晶構造解析により MsMab-1/-2 の詳細な立体情報を得る**ことを第一目的とした。MsMab-1/-2 の構造解析を行うにあたり、100mg を目標に研究期間内で使用する精製抗体を得る。得られた精製抗体 IgG をパパイン消化して一価の Fab フラグメントとして結晶構造解析のために用いる。結晶化の際、抗体によっては抗原結合部位が inducible fitting して構造変化と、安定性が増す場合があるので、基質となるペプチドを添加して結晶化に用いる。得られた結晶を、本学共通機器室の X 線回折データ測定装置にて分解能を測定し、分解能の良い結晶化条件について、さらなる最適化を施す。最適化した結晶について大型放射光施設を利用し、2 Å 以上のデータセットを収集し構造解析することを目標とした。

< 遺伝子工学的手法を用いた MsMab-1/-2 の多重特異性、および結合親和性の改変 >

MsMab-1/-2 の立体構造情報から、抗原との接触や、基質特異性に関与するがアミノ酸残基が予測できる。そこで、基質結合に関与するアミノ酸残基に対して直接的にアミノ酸変異を導入し、ELISA 等を用いて野生型/変異型の IDH1/2 ペプチドに対して基質特異性がどのように変化するのか検討し、**多重特異性、結合親和性の向上した変異体**を取得することを第二の目的とする。多重特異性が広がった変異体については、さらに表面プラズモン

共鳴(SPR)の原理を用いた抗原-抗体の結合親和性測定を行って、抗体側の変異導入位置と変異のアミノ酸、基質特異性、結合定数の関係についてまとめる。これらの結果を元に、構造シミュレーションを構築して基質特異性、特に多重特異性に関する相関性を見いだしていく。もし、相関性がない場合は、変異体について結晶構造解析を行い、変異導入前の構造と比較して新たな構造情報を得る。

4. 研究成果

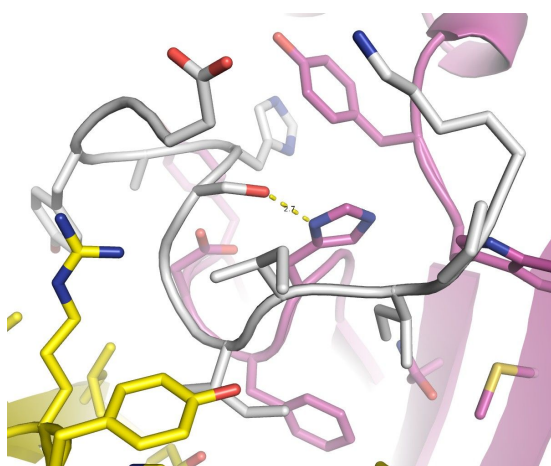
平成 26 年度は MsMab-2 抗体の結晶化実験を行うため、MsMab-2 の大量生産と精製、Fab フラグメント調製の検討を行った。まず、当研究室で通常行っている無血清培地での培養で精製 MsMab-2 の取得を試みた。しかし、無血清培地培養から得られる抗体修了は 1mg/mL 以下と非常に低いものであった。ハイブドーマを培養する血清含有培地から徐々に血清濃度を下げて無血清培地への馴化を試みたが収量は低いままであった。続いて、収量を重視し、血清含有培地のまま培養して、抗体精製を試みた。この時の収量は約 5mg/mL と増加した。しかし、混入する血清由来ウシアルブミンを除くため、100kDa の MWCO 限外濾過を行うと、回収率が半分程度となった。この原因はウシアルブミンの混入と、100kDa MWCO 膜では MsMab-2 抗体が一部、膜を通過してしまうことが考えられた。収量の問題は改善されなかったが、精製した IgG を用いて Fab フラグメントの調製を行った。パパイン消化時間を振って検討したが、SDS-PAGE を行うと、未消化断片と思われるバンドがどの条件でも確認された。次にゲルろ過クロマトグラフィーにより Fab フラグメントの精製を試みた。しかし、未消化断片に F(ab)₂ 断片と思われる約 100kDa のピークが混在しており、50kDa の Fab フラグメントのピークと重なっており、分離は難しいと判断した。またイオン交換カラムクロマトグラフ

イーを用いても両断片の違いは価数のみで、電荷はほぼ一緒と考えられるため、これらのカラムクロマトグラフィーによる精製は困難と判断した。

MsMab-2 の大量生産をする一方で、新たな多重特異性をもつ抗体の樹立を行った。IDH2-R172S の変異を認識する抗体樹立の過程で(Liu, Ogasawara, et al., BBRC, 2015)、多重特異性を有する MsMab-3 の樹立に成功した。この抗体は、IDH1/2 ペプチドには反応するが、IDH1/2 タンパク質には反応しない抗体ではあったが、X 線結晶構造解析することで本研究の目的である、多重特異性を決定する部位を特定できるだけでなく、ペプチドとタンパク質に対する反応性の違いに寄与する部位を特定できると考えた。

平成 27 年度では引き続き、MsMab-2/3 の生産を試みた。MsMab-3 は無血清培地培養で約 15mg/mL と高収量で得られることが分かった。MsMab-2 については、抗体遺伝子クローニングをすすめ、リコンビナント抗体の生産系を構築した。

一方、共同研究で進めていた MsMab-1 の X 線結晶構造解析が進み、抗原認識部位のアミノ酸が明らかとなった。



上図は MsMab-1 と R132S ペプチドとの結合部位の構造であるが、MsMab-1 の重鎖 118 残基目のヒスチジンが R132S ペプチドとの接触に関わっていた。これを実際に検証する

ため、重鎖 118 残基目のヒスチジンをアラニンに変換した H118A 変異型 MsMab-1 を作製し、精製したリコンビナント抗体を用いて基質特異性を検討した。興味深いことに H118A 変異型 MsMab-1 は、多重特異性のバラエティが狭くなり、IDH1-R132S/G、および IDH2-R172M にのみ反応した。この結果が示すように、構造情報から任意の変異を導入することで、基質特異性の改変が可能であることが示された。変異導入と基質特異性についての知見を蓄積することで、より理論的に変異型抗体の作製が可能であると考えられる。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

小笠原 諭 (OGASAWARA, SATOSHI)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30546685

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：