

論文の内容の要旨

論文題目 プレターゲティング法による薬物輸送を指向した新規融合抗体の創出

氏名 湯村 恭平

【研究背景】

ドラッグデリバリーシステムの有力な手法としてプレターゲティング法が期待されている。この手法は抗原とは異なる分子認識部位を融合した融合抗体を投与し、十分に患部へと集積させた後で、分子認識部位と結合するように修飾を施した薬剤を投与することで、薬剤輸送を達成する手法である。抗体に直接薬剤を標識して輸送する手法と比べると、薬剤が小分子であるために余剰分の排出が早い点が利点として挙げられる。プレターゲティング法のための融合抗体には患部へと蓄積できる高い結合力と、抗原以外の強固な分子認識部位という二つの要素が必要となる。担体としてコア

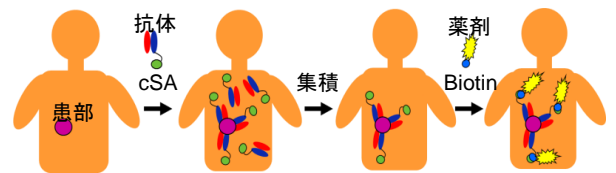


図 1. cSA 融合抗体によるプレターゲティング法

ストレプトアビジン(cSA)を用いた系(図 1)や二重特異性抗体を用いる系などが研究されている。

cSAは小分子であるbiotinと強固な結合($K_D \sim 10^{-15}$ M)を形成する蛋白質である。cSA自体が四量体を形成するために、抗体部位が多価になることで抗原からの解離が遅くなる avidity 効果も期待されている。しかし、細菌由来であるためにcSAが持つ免疫原性が大きな問題となっている。

当研究グループは低免疫原性変異体を構築することに成功した(図 2)。六変異体である314 (E116N)、414 (E116Q)において顕著な抗原性の低下が観測された。しかし、変異がcSAの物性面、機能面に与える影響については不明瞭である。また、低免疫原性を目指した変異はalanineなどが多く、今回導入された変異は極めて興味深いと言える。

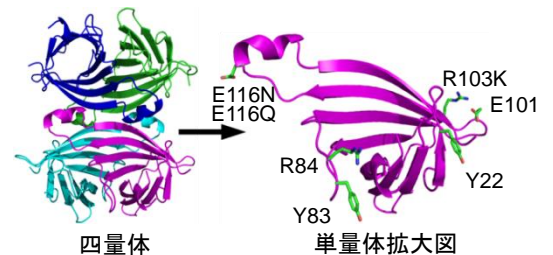


図 2. cSA の変異導入部位

二重特異性抗体を用いるプレターゲティング法は一方の抗体で患部を認識し、もう一方の抗体が薬剤の輸送を担当する(図 3 左)。しかし、抗体を二種融合させた分子を安定して発現させることが難しい。各抗体を発現させた後で複合体化させる手法も盛んに研究され、更に、一種の抗原を二点で認識させることで結合を強くできる(図 3 右)という報告もされている二重特異性抗体の新規フォーマット構築、及び解析が持つ意義は大きいと言える。

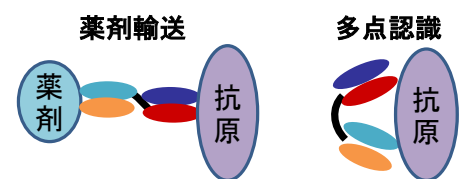


図 3. 二重特異性抗体による薬剤輸送と多点認識

二重特異性抗体の各部位について評価できる系が重要であると考え、二種の抗体を架橋する方法を採用した。その際、抗体部位の活性に影響を与えない新規の融合抗体系を構築するために、我々は Spytag (Stag) と Spycatcher (Spy) によるタグシステムを用いた。このシステムは混ぜるだけで共有結合を形成することができるシステムである。更に、biotin 結合部位を保持することが可能であれば、自在に抗体部位を変更できる非常に有用なツールになると期待される。Biotin 結合部位として二量体 avidin である

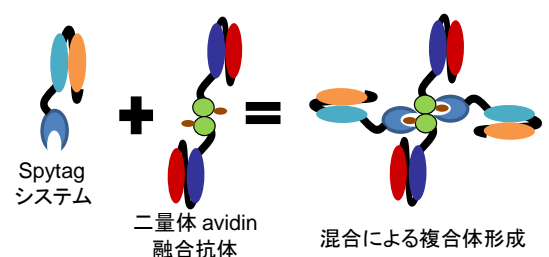


図 4 新規融合抗体のデザイン

Rhizavidin(RA)を採用し、図のような融合抗体を設計した(図 4)。

【研究目的】

本研究は、プレターゲットング法を指向した融合抗体の創出を最大の目標としている。

低免疫原性 cSA 変異体について、熱力学的解析によって物性、機能評価を行うことで有用性を示すことを目指した。そして、単鎖抗体 scFv の融合抗体である scFv-cSA について評価することを目指した。

また、高機能な抗体を目指して、biotin 結合部位を保持し、容易に抗体部位を変更可能な Spy タグシステムを用いた二重特異性抗体の構築を行った。二種の分子を認識する二重特異性抗体、及び同一抗原を二点で認識する二重特異性抗体を構築し、この抗体の有用性と汎用性を示すことを目指した。

【結果と考察】

cSA 単体の解析

cSA 変異体の biotin 結合能について等温滴定型熱量測定(ITC)を用いて測定した(図 5)。六変異体は野生型と同様、ITC の測定限界を超える強力な結合能を保持していることが明らかとなった。

熱安定性について示差走査型熱量測定(DSC)を用いて測定した(図 6)。結果より、変異体はわずかに不安定化していることが明らかとなった。しかし、最も不安定なものでも変性温度は 65 °C 以上であり、治療目的の応用においては十分な熱安定性を持っていることが示された。また、biotin の存在によって変性温度が上昇するという cSA に特徴的な現象も観測された。

cSA の溶液中での分子サイズについてフィールドフローフラクショネーション(FFF)によって解析した(図 7)。その結果、六変異体はどちらも野生型と比べてわずかに溶出が遅くなっていることが示された。分子サイズが大きくなり、構造が緩んでいることが示唆される。

今回 cSA に導入された変異は機能を保持していることが明らかとなった。過去の報告例や E116 単変異体の解析を考慮すると、水素結合に関わる残基や電荷が類似した変異を導入することが機能と構造の保持に重要であるといえる。一方で、これらの変異は、蛋白質表面に露出する残基の形を変え、構造を緩ませることで生じるわずかな形状変化によって免疫系の認識を妨げ、低免疫原性化に貢献している可能性が示唆される。

cSA 融合抗体の構築と解析

cSA 変異体に関して有用性が示されたため cSA と肝臓癌特異的に発現する ROBO1 を抗原とする B5209B(5209B)抗体の scFv を用いた融合抗体 5209BscFv-cSA を構築した。

5209BscFv-cSA の熱安定性について DSC を用いて測定した(図 8)。その結果、両部位に由来する変性温度が独立して観測された。Biotin 存在下で cSA 部位のみが安定化したという現象も観測されたため、5209BscFv-cSA の両部位は互いに独立した状態で存在していることが示された。

5209BscFv-cSA の抗原結合能、biotin 結合能をそれぞれ

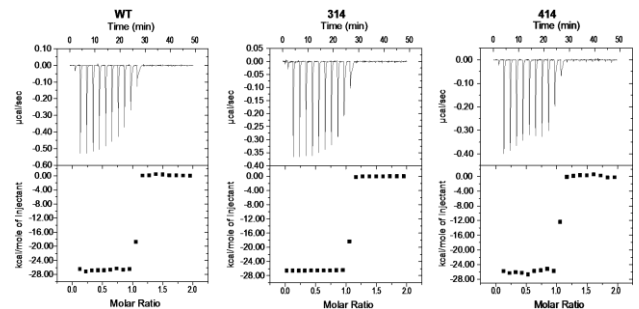


図 5.各種 cSA 単体における ITC

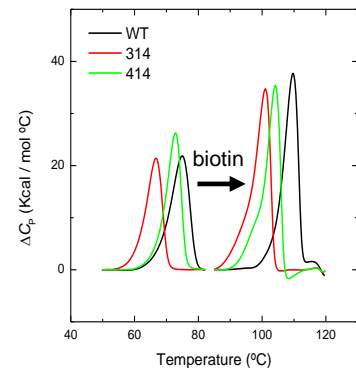


図 6.各種 cSA 単体における DSC

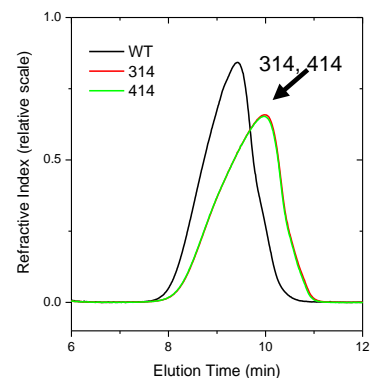


図 7.各種 cSA 単体における FFF

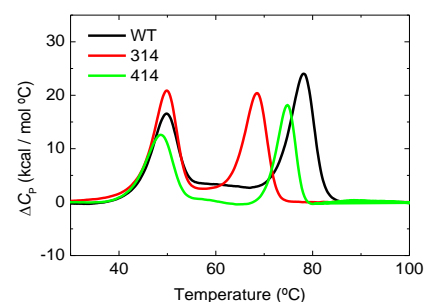


図 8.cSA 融合抗体における DSC

ITCによって測定した(図 9)。図では cSA414 を用いた融合抗体についてのみ示す。どちらの部位も融合前と同等の結合を保持していると示された。しかし、量論比について、biotin:cSA は 1:1 であったにもかかわらず、抗原:5209BscFv は 0.5:1 であった。形成される四量体の中で scFv 部位の約半分が直接結合に関与していなかった。立体障害によって機能しなくなってしまっていると考えられる。

抗原結合を詳細に解析するために、5209BscFv-cSA414 についてバイオレイヤー干渉法(BLI)という手法による結合の評価を行った(図 10)。ROBO1 をセンサーに固定化し、5209BscFv-cSA414 の結合と解離を観測することができ、顕著な avidity 効果による強固な結合を示した。BLI の結果において失活した単量体などの影響も見られなかったことから、ITC における量論比は立体障害によるものであると推察される。

二重特異性抗体の構築と解析

Stag と Spy によるタグシステムを用いた二重特異性抗体を設計した。抗原である ROBO1 を B2212A 抗体(2212)と HP103A 抗体の二つの scFv によって二点で認識することができる二重特異性抗体、及び α CCR5 抗体という異なる抗原であるペプチドタグ(CCR5tag)を認識する抗体と 2212 抗体の scFv による二重特異性抗体の構築を行った。ROBO1 を二点で認識する二重特異性抗体については、一つの抗原の多点認識について解析を行うために、RA を用いずに scFv 同士のみを架橋した単純な二重特異性抗体構築も行っている。

それぞれの抗体の結合活性について ITC を用いて測定した(図 11)。図では単純な ROBO1 二重特異性抗体についてのみ結果を示す。全ての抗体において結合が観測され、更に混合することで形成する二重特異性抗体についても結合が観測された。結合エンタルピーに可算性が見られたことから、各結合部位は複合体となっても機能することが示された。Spy によるタグシステムを用いた二重特異性抗体の構築に成功したといえる。

ROBO1 を多点で認識する二重特異性抗体について BLI を用いて結合について評価した(図 12)。図では ROBO1 に対する二重特異性抗体についてのみ示す。単量体の抗体が RA やタグシステムを介して多量体化していくに従って avidity 効果により結合が強固になる様子が観測された。詳細は割愛するが、同様に ROBO1 と CCR5tag の二種の分子を認識する二重特異性抗体についても結合が確認され、avidity 効果も観測されている。

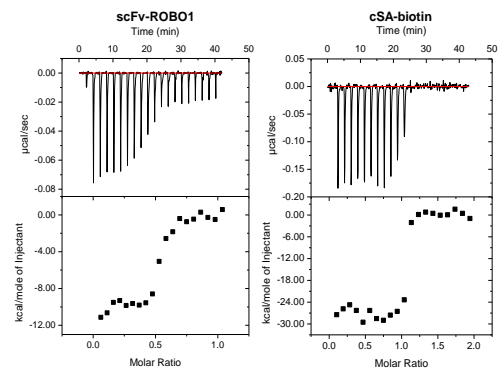


図 9.5209BscFv-cSA414 における ITC

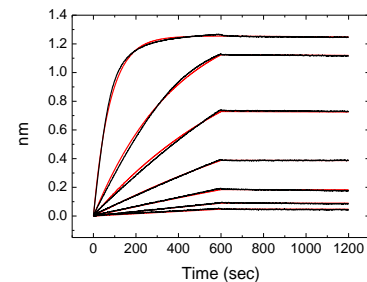


図 10.5209BscFv-cSA414 における BLI

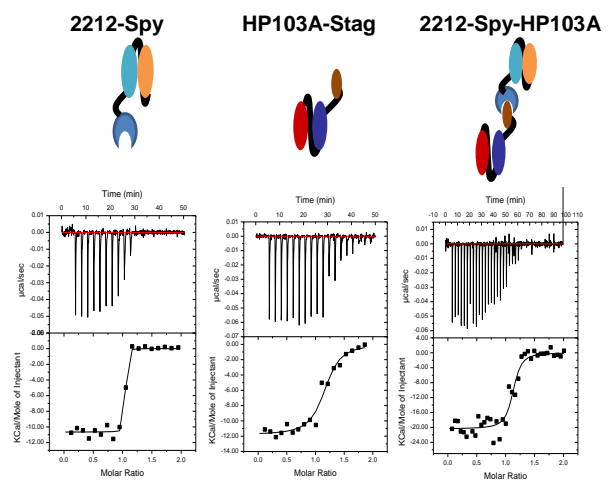


図 11.二重特異性抗体における ITC

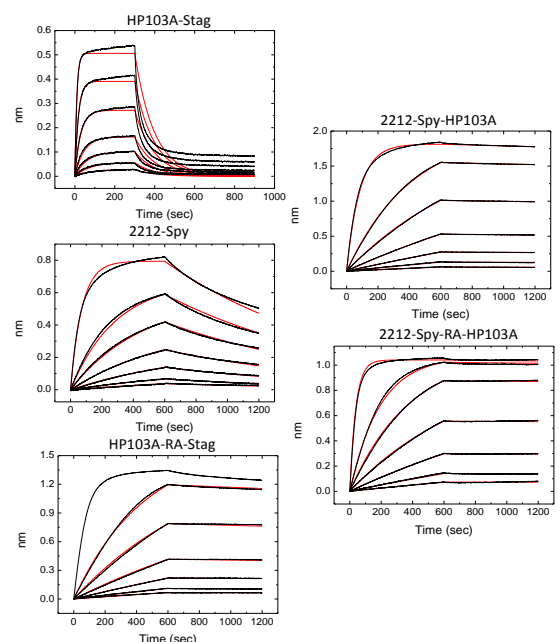


図 12. 二重特異性抗体における BLI

【結論】

本研究ではプレターゲティング法を指向して設計された融合抗体について解析を行った。

cSA 変異体についてはアミノ酸変異が物性面に与える影響や、低免疫原性化機構についても考察することができた。cSA 変異体を用いた融合抗体を実際に構築し、融合抗体として応用可能であると示すことにも成功した。四量体化による顕著な avidity 効果も観測されたため、低免疫原性化 cSA 融合抗体の有用性が期待される。

また、高機能で汎用性の高い Spytag システムを用いた新規の二重特異性抗体を設計し、解析を行った。熱力学的解析の結果より、システムの構築に成功したと結論付けられるデータを得ている。このシステムは、抗体部位を自由に変えることができるため、幅広い応用が期待される。実際に biotin 結合部位として RA を導入した系も構築し、肝臓癌特異的な抗原である ROBO1 における二点認識による二重特異性抗体や、二種の分子をそれぞれ認識可能な二重特異性抗体の構築に成功した。詳しくは博士論文本文中にて詳細に記述するが、二重特異性抗体は細胞上での結合も観測されている。この融合抗体システムは、益々の有用性が期待される。