

博士論文

標的抗原ヒト P-cadherin の機能解析と
抗体医薬設計

工藤 翔太

第1章 ヒト P-cadherin を標的とした抗体医薬品開発の重要性

細胞接着蛋白質の P-cadherin は正常組織における発現量は低い一方、膵臓癌、肺癌等で特異的に高発現することが知られている^{1,2}。さらに、高発現した P-cadherin は浸潤能や転移能といった癌細胞の悪性化に寄与している³。P-cadherin の細胞接着を阻害する抗体は、癌の悪性化を抑制し、生体内での癌細胞の増殖を止める働きがあることも報告されている²。以上のことから P-cadherin は、癌治療戦略における有望な標的分子として期待されている。そして、P-cadherin の細胞接着阻害は癌の有効な治療戦略であると考えられている。しかしながら、抗体による P-cadherin の細胞接着阻害機構はいまだに解明されていない。接着阻害機構の解明は、より高品質な抗体医薬品の開発につながると期待できる。そこで私は、P-cadherin を標的とした高機能で高品質な抗体医薬品の開発を目指し、以下の2点を解明することを本研究の目的とした(図1)。

目的1. P-cadherin による細胞接着機構の解明 (抗原の理解)

目的2. 抗 P-cadherin 抗体による細胞接着阻害機構の解明 (抗体の理解)

抗原、抗体双方の理解を行うことで、抗体による細胞接着阻害機構の本質が理解でき、P-cadherin を標的とした抗体分子の合理的な設計が可能になるのではないかと考えた。

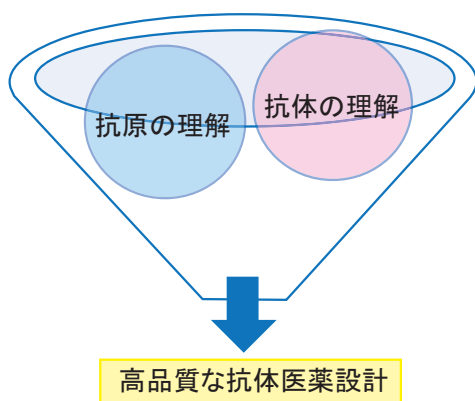


図1. 研究のコンセプト

第2章 ヒトP-cadherinによる細胞接着機構の解明

Cadherin による細胞接着と課題

Cadherin は Ca^{2+} 依存的に細胞同士を結び付ける蛋白質である。Cadherin には 100 種類以上の分子が知られており、Cadherin superfamily を形成している。最も解析されている family は Classical cadherin family であり、体内に広く存在する E-cadherin を中心に解析が進められている。P-cadherin も Classical cadherin に属している。Classical cadherin は 5 つの細胞外ドメイン(N 末端から EC1,2,3,4,5)を持ち、EC1 付近で homo-dimer を形成して細胞同士を結びつけている(図 2)。E-cadherin の結晶構造解析から、Strand-swap dimer が接着活性をもつ homo-dimer であることが分かっている。また、Strand-swap dimer を阻害する変異導入により、X-dimer と呼ばれる別の homo-dimer を形成することも報告されている(図 3)。分子レベル、細胞レベルの解析より、X-dimer は Strand-swap dimer の形成や解離を促進する働きがあると示唆されている⁴⁵。しかしながら X-dimer の発見は E-cadherin に限られており、生物学的な役割や、Strand-swap dimer の形成や解離を促進するメカニズムは分かっていない。本研究では、高品質な抗体医薬の設計方針を構築することだけでなく、Cadherin 一般の細胞接着機構を解明することも目指し、P-cadherin の細胞接着に関して、分子レベル、細胞レベルで解析を行った。分子レベルでの解析は主に EC1、EC2 の 2 ドメインから構成されるドメイン蛋白質を用いた(図 4)。

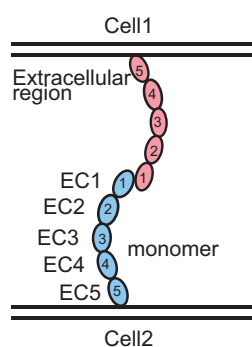


図 2. Cadherin による細胞接着

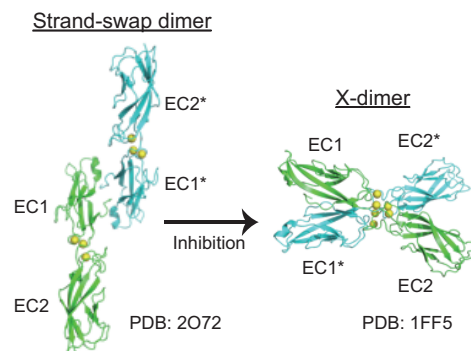


図 3. Strand-swap dimer と X-dimer

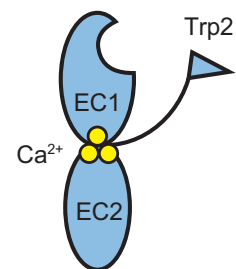


図 4. ドメイン蛋白質 EC12

P-cadherin の細胞接着活性評価

最初に、P-cadherin が細胞接着機能を保持するか解析した。Flp In system を用いてヒト P-cadherin を発現する CHO 細胞株を樹立し、免疫染色および cell aggregation assay を行った。その結果、P-cadherin は細胞境界面に局在していることが観察され、 Ca^{2+} 依存的に cell aggregation を形成することが分かった。以上のことから、P-cadherin は細胞接着機能を保持することが確認された。

P-cadherin ドメイン蛋白質の設計と dimer 形成能の評価

P-cadherin による細胞接着機能を解明するために、EC1、EC2 等のドメインから構成される蛋白質を設計し、大腸菌発現系で調製を行った。ドメイン蛋白質は、Asp から始まる成熟型の N 末端を持つコンストラクト(EC1、EC12)と、Met を N 末端に付加したコンストラクト(MEC1、MEC12)を作製した。各コンストラクトの分子サイズをサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)により解析し、分子量は多角度光分散法(MALS)により算出した。その結果、EC1 は dimer、MEC1 は monomer として溶出していた。このことから、付加した Met は EC1 の dimer 形成を阻害する働きがあることが分かった。興味深いことに、Met の有無に関わらず、EC12、MEC12 は共に dimer を形成していることが明らかになった。また、溶出位置の違いから、両者は分子形態の異なる homo-dimer を形成している可能性が示唆された。

結晶構造解析による homo-dimer の同定

結晶構造解析により、EC12、MEC12 の dimer を同定した。EC12 は 1.85 Å、MEC12 は 2.2 Å で結晶構造解析に成功した。EC12 は Strand-swap dimer を形成しており、MEC12 は X-dimer を形成していることが明らかになった。Strand-swap dimer 中では Trp2 の相手分子への挿入が確認され、X-dimer 中では Lys14 や Gln101 が形成する特異的な水素結合が確認された。また、EC12 W2A や MEC12 K14E or Q101L を用いた変異体解析から、実際に溶液中でも結晶構造中で観られる homo-dimer がそれぞれ形成されていることが確かめられた。さらに、Strand-swap dimer と X-dimer を阻害したコンストラクト(MEC12 K14E)では Monomer の結晶構造が得られた。Monomer 中では、Trp2 は自身の疎水ポケットに挿入されていることが明らかになった。

X-dimer が Strand-swap dimer 形成へ与える影響の解明

結晶構造解析の結果、P-cadherin は少なくとも Strand-swap dimer、X-dimer、Monomer の 3 種類の構造を形成可能であることが分かった。X-dimer のみを阻害する変異(K14E or Q101L)を設計し、X-dimer が Strand-swap dimer 形成へ与える影響を解析した。最初に、X-dimer の阻害が Strand-swap dimer 形成に与える熱力学的な影響を解析した。EC12 K14E、EC12 Q101L の結晶構造解析を行ったところ、共に Strand-swap dimer を形成しており、さらに SEC においても EC12 と同様の位置で溶出することが分かった。このことから、熱力学的には X-dimer の阻害は Strand-swap dimer 形成に影響を与えないことが分かった。

次に、X-dimer が Strand-swap dimer 形成に与える速度論的な影響を解析した。SUMO-tag の切断を dimer 形成開始反応として用いた。EC12 は迅速に dimer を形成した一方、X-dimer を阻害した変異体では、顕著に dimer 形成速度が低下した。反応速度(k_{obs})は X-dimer の阻害により 30 倍低下することが分かった。以上のことから、X-dimer は Strand-swap dimer 形成を促進する速度論的な中間体として機能していることが示唆された。

さらに、X-dimer を阻害した変異体を発現する細胞(K14E 変異株)を用いて cell aggregation assay を行ったところ、野生型の P-cadherin を発現する細胞は時間依存的に大きな cell aggregation を形成した一方、K14E 変異株は全く cell aggregation を形成しなかった。このことから、細胞レベルでも実際に X-dimer が機能していることが分かった。

X-dimer による Strand-swap dimer 形成の促進機構

X-dimer が Strand-swap dimer 形成を促進する理由を解明するために、X-dimer 変異体(X-dimer 1, 2, 3)の結晶構造解析を行った。結晶構造中に促進機構の理解につながる重要な発見ができた。それは、X-dimer 中での strand-swap 反応である。Strand-swap 反応に伴い、Trp2 の移動(自身のポケットから相手分子のポケットへ)が確認された。始状態(Monomer)で Trp2 は自身のポケットに入っており、終状態(Strand-swap dimer)で相手のポケットに Trp2 が挿入されていることを考えると、X-dimer は strand-swap 反応を触媒することで Strand-swap dimer の形成を促進している可能性が強く示唆された。

各 homo-dimer の熱力学的安定性の評価

Monomer、X-dimer (X-dimer 1, 3)、Strand-swap dimer の熱力学的な関係性を理解するために、平衡超遠心分析を行い、homo-dimer の解離定数(K_D)を算出した。Strand-swap dimer の K_D は 1.95 μM であり、X-dimer 1, 3 は $K_D = 170 \sim 180 \mu\text{M}$ であった。したがって、熱力学的にも X-dimer は Strand-swap dimer の中間体として機能していることが明らかになった。

Strand-swap 反応の駆動力解析 1 (ITC を用いた熱力学的解析)

結晶構造解析より、X-dimer は strand-swap 反応を触媒することで Strand-swap dimer 形成を促進していることが分かった。strand-swap 反応に X-dimer 形成が必要である理由を解明するために、ITC を用いて dimer 形成の熱力学的な駆動力を解明した。X-dimer 1 はエントロピー(ΔS)駆動の結合様式を示した。このことから、X-dimer 1 は脱水和を伴う疎水性相互作用が主な駆動力で形成されることが示唆された。また、X-dimer 3 はエンタルピー(ΔH)駆動の結合様式を示した。このことから、X-dimer 3 の形成には水素結合等の非共有結合の形成が駆動力になって形成されることが示唆された。以上のことから、X-dimer 内での strand-swap 反応には、疎水性相互作用と水素結合の形成が重要な働きをすることが示唆された。

Strand-swap 反応の駆動力解析 2 (構造学的解析)

構造情報に基づき構造変化の駆動力を解析した。Swapping する N 末の β -strand を中心に相互作用解析を行った。Monomer 中では N 末の β -strand は疎水性相互作用により EC1 の疎水コアに結合していた。N 末 β -strand の 80% が疎水性アミノ酸で構成されていることを考慮すると、水溶液中で自発的に swapping することは起こりにくいと考えられる。そして、X-dimer が形成されると、疎水界面同士が接近し(X-dimer 1)、strand-swap 反応後は疎水界面同士が完全に一体化していた(X-dimer 3)。このことから、X-dimer 中に形成される疎水環境が strand-swap 反応において重要な役割をしていると考えられる。実際に、相互作用している疎水性アミノ酸の埋没表面積(BSA)は 67 \AA^2 (X-dimer 1)から 618 \AA^2 (X-dimer 3)と 550 \AA^2 増加していた。また、分子間で形成される水素結合の数も分子全体で 6 本から 19 本へ増加していた。以上のことから、ITC で示唆されたように、疎水性の相互作用と水素結合の形成が strand-swap 反応の駆動力であることが構造情報からも明らかになった。

細胞上での分子集合体形成へ X-dimer が与える影響

Cadherin は dimer 形成後に集合体を形成して、細胞同士を強固に結びつける働きがあることが知られている⁶。最後に、P-cadherin の分子集合体形成へ X-dimer が与える影響を、蛍光観察により解析した。観察には、P-cadherin の細胞内ドメインに GFP monomer を融合した融合蛋白質を発現させた CHO 細胞を用いた。WT では細胞境界面に秩序だつて密に集合した蛍光の Cluster が確認されたが、X-dimer を阻害した K14E 株では、境界面に蛍光が一様に広がっていた。蛍光観察の結果から、P-cadherin は dimer を形成後に細胞境界面に分子集合体を形成し、X-dimer は秩序ある cluster 形成に貢献していることが明らかになった。

P-cadherin による細胞接着機構と生物学的意義

本研究より、P-cadherin は Monomer 状態から X-dimer を経てより安定な Strand-swap dimer を形成し、最終的に秩序だつた分子集合体を形成することが明らかになった。P-cadherin による迅速な細胞接着には、Strand-swap dimer の中間体である X-dimer が重要な働きをしていることも分かった。X-dimer は特殊な反応場を形成して Strand-swap dimer の形成を促進していることから、自己の Folding を助ける Self-Chaperone として機能していると考えられる。また、X-dimer は熱力学的安定性においても Monomer と Strand-swap dimer の間に位置することから、P-cadherin による細胞接着機構は、熱力学と速度論の両方が制御していると言える。そして、その制御の中心には Self-Chaperone としての X-dimer の働きがある。

P-cadherin の細胞接着において、Self-Chaperone 機能を持つ X-dimer が中心的な役割を果たすことから、私は「X-dimer の阻害」を細胞接着阻害剤探索の指針として提案できるのではないかと考えている。従来は、接着活性を持つ Strand-swap dimer を標的とした薬剤探索が行われてきたが、Strand-swap dimer と X-dimer の結合界面を Classical cadherin 内で比較すると、界面に存在するアミノ酸の類似性がそれぞれ 68%、40%であり、X-dimer を標的とする方が薬剤の特異性の観点からも実用であると考えられる。今後は、作用機序、特異性の観点から、P-cadherin の X-dimer を標的とした接着阻害剤の研究開発が期待される。

本研究で明らかになった、多様な構造変化を伴う細胞接着の生物学的意義は、特異性の制御であると私は考えている。各構造それぞれが Cadherin 間の特異性を制御するチェックポイントとして機能することで特異的に細胞同士を結びつけ、機能ある組織の形成や維持に貢献しているのだろう。

さらに、Classical cadherin の一次配列を比較すると、全ての cadherin において、swapping する N 末 β -strand の 70% ~ 80% が疎水性アミノ酸で構成されている。ことから、本研究で明らかになった細胞接着機構は他の Classical cadherin にも当てはまると考えることができるだろう。そして、全ての Classical cadherin がこの複雑な反応を起こすからこそ、類似した配列を持つにも関わらず、細胞接着の特異性を産み出すことができていると考えられる。

第3章 抗P-cadherin抗体による細胞接着阻害機構の解明

細胞接着阻害機構の解明に向けた抗体の調製

抗体分子による P-cadherin の細胞接着阻害機構を解明するために、3 種の抗 P-cadherin 抗体(TSP5、TSP7、TSP11)を調製した。P-cadherin は細胞上で分子集合体を形成することから、分子サイズが小さく、抗原結合部位を 1 つ持つ single chain Fv (scFv)を抗体の骨格として選択した。scFv は大腸菌発現系を用いて発現を行い、封入体からの巻き戻しにより調製を行った。

抗体の結合活性と特異性の評価

CM5 基盤上に Monomer 状態の P-cadherin (MEC1)を固定して、SPR により各抗体と P-cadherin の親和性評価を行ったところ、各抗体は $K_D = 10 \sim 30 \text{ nM}$ の強い結合活性を保持していることが分かった。また、P-cadherin と配列相同性が 72%と非常に高い E-cadherin には結合しなかったことから、3 種の抗体は正しく Folding しており、P-cadherin に対して高い特異性を保持していることが確認された。興味深いことに、P-cadherin を発現する CHO 細胞を用いた Cell ELISA において、抗体間で結合活性に違いが観られた。TSP7、TSP11 は強い親和性($EC_{50} \sim 1 \text{ nM}$)を示した一方で、TSP5 は 100 倍以上結合力が弱いことが分かった。原因として、細胞上における P-cadherin の Cluster 形成が TSP5 の結合活性に影響を与えている可能性が考えられる。

抗体の接着阻害活性の評価

最初に免疫染色によって抗体の結合が P-cadherin の細胞接着へ与える影響を解析した。抗体は、細胞に対して強く結合する TSP7 と TSP11 を用いた。TSP7 を加えた場合にのみ、細胞間の P-cadherin の局在が壊れることが明らかになった。このことから、TSP7 は細胞接着を破壊する可能性が示唆された。次に、直接 cell aggregation assay により 3 種の抗体が P-cadherin の細胞接着へ与える影響を解析した。免疫染色の結果と同様に、TSP7 は非常に強い細胞接着阻害能をもつことが明らかになった。1 nM という低い濃度でも、1 mM EDTA と同レベルまで aggregation 形成を阻害可能であることが明らかになった。そして、TSP7 は cell aggregation 形成を阻害するだけでなく、一度形成された cell aggregation を破壊する働きもあることが明らかになった。また、TSP7 に比べると非常に阻害能は弱い、TSP11 も濃度依存的に cell aggregation 形成を阻害する働きもあることが分かった。しかしながら、一度形成された cell aggregation の破壊能は TSP11 には確認されなかった。

抗体が P-cadherin の dimer 形成へ与える影響の解析

抗体による細胞接着阻害が接着形成で重要な Dimer 形成と関係があるかどうか解析した。P-cadherin の EC12 と各抗体を等量混合して反応させ、抗体の結合が Dimer に与える影響を SEC により解析した。TSP7 と反応したときのみ、明確な 2 つのピークが観察された。TSP5 や TSP11 と反応させた場合は SEC のピークが 1 つであることから、TSP7 は P-cadherin 分子の Dimer 阻害と、Monomer-Dimer 間の速い平衡を阻害することで、細胞接着を阻害している可能性が示唆された。また、TSP7 の Dimer 阻害能の時間依存性を評価したところ、250 min で反応が終わるまで、時間依存的に Dimer を破壊していることが明らかになった。

抗体のエピトープマッピング

機能の違いが、抗体のエピトープに関係しているのではないかと考え、3種の抗体のエピトープマッピングを行った。エピトープマッピングは、P-cadherin の Ala 変異体を用いて行った。Ala 変異体は、E-cadherin と P-cadherin のアミノ酸配列を比較して、P-cadherin 特異的なアミノ酸を Ala に変異することで調製した。SPR を用いて各抗体と Ala 変異体の相互作用解析を行った結果、3種の抗体は EC1 中の異なるエピトープをそれぞれ認識していることが明らかになった。このことから、抗体の機能の違いが、エピトープと関係している可能性が示唆された。

抗体と P-cadherin の共結晶構造解析

抗体間の細胞接着阻害機能の違いを明らかにするために、TSP7 と TSP11 に関して、P-cadherin との共結晶構造解析を行った。2.6 Å で結晶構造解析に成功した。抗体の結合が P-cadherin の各 dimer 形成へ与える影響を解明するために、P-cadherin の X-dimer や Strand-swap dimer の構造と共結晶構造の重ね合わせを行った。興味深いことに、X-dimer への重ね合わせを行ったところ、TSP7 の共結晶を用いた場合、抗体同士が衝突することが分かった。Enc-X-dimer と TSP7 の重ね合わせでは、VH と VL の衝突が見られ (衝突体積: 2430 Å³)、Strand-swap X-dimer との重ね合わせでは、VH 同士の衝突が観察された (衝突体積: 3550 Å³)。終状態の Strand-swap dimer へ重ね合わせを行った場合、衝突は Loop の一部に限られていた。その他の dimer や TSP11 を用いた場合、分子同士の衝突は確認されなかった。このことから、TSP7 は X-dimer を阻害しており、X-dimer の阻害が細胞接着阻害に重要であることが示唆された。

抗体が P-cadherin の各種 dimer へ与える影響

各抗体と各 dimer との相互作用解析を ITC と SEC により行った。ITC の結果、TSP7 は X-dimer に対して特異的に弱い結合の親和性を示し ($\Delta\Delta G = 2 \text{ kcal mol}^{-1}$)、X-dimer に対して1分子の TSP7 しか結合できないことが分かった。このことから、結晶構造で確認されたように、TSP7 は X-dimer 上で衝突を起こしていることが確かめられた。TSP5 と TSP11 は monomer、X-dimer、Strand-swap dimer 全ての状態に対して同等の親和性で認識することが分かった ($\Delta G \approx -10 \text{ kcal mol}^{-1}$)。また、SEC の結果、TSP7 は Strand-swap dimer だけでなく、X-dimer を阻害することが確認された。X-dimer の阻害は、monomer に結合した TSP7 同士の衝突が原因であると考えられる。また、TSP11 は Strand-swap dimer を阻害する働きがあることが明らかになった。

Monomer 生成速度が TSP7 の細胞接着阻害能へ与える影響

結晶構造解析の結果、強い細胞接着阻害能を示す TSP7 は Monomer に結合後、TSP7 同士の衝突を利用して X-dimer 形成を阻害している可能性が示唆された。このことは、monomer への結合が TSP7 の細胞接着阻害効率に影響していることを示唆している。そこで、monomer と dimer の速い平衡関係を阻害した EC12 K14E 変異体を用いて、dimer 形成阻害に与える影響を解析した。同時に、K14E 変異体を発現する K14E 変異株を用いて細胞接着阻害速度に与える影響を解析した。その結果、monomer 生成速度の遅い K14E 体では dimer 阻害速度および、細胞接着阻害速度が顕著に低下することが分かった。以上のことから、TSP7 による細胞接着阻害には、monomer への結合が非常に重要であることが明らかになった。

抗体による P-cadherin の細胞接着阻害機構

TSP7 と TSP11 の比較から、P-cadherin の細胞接着阻害には接着の中間体である X-dimer の阻害が非常に重要であることが初めて明らかになった。TSP7 と TSP11 は接着活性をもつ EC1 に結合しており、共に接着活性体である Strand-swap dimer を阻害している。しかしながら、強い接着阻害は TSP7 のみに観られた。TSP7 は Strand-swap dimer だけでなく、Strand-swap dimer の中間体である X-dimer も阻害することから、X-dimer の阻害が接着阻害には極めて重要であることが分かった。P-cadherin の研究から P-cadherin の接着維持、形成には、X-dimer を介した速い Monomer と Strand-swap dimer の平衡状態が非常に重要な役割をしていることが分かってきた。抗体を用いた研究からも接着阻害における X-dimer の重要性が確認された。TSP7 は、終状態の安定性を下げる(Strand-swap dimer の阻害)だけでなく、この速い平衡状態を壊すことで(X-dimer の阻害)、P-cadherin の細胞接着を壊しているのだろう。実際に TSP7 と野生型(EC12)の反応を見ると、TSP7 は Dimer を破壊しているだけでなく、Monomer-Dimer 間の速い平衡状態を壊していることが分かる。以上 TSP7 と TSP11 の比較から、P-cadherin を標的とした細胞接着阻害剤設計において、中間体 X-dimer の阻害は極めて重要であると言える。本研究は細胞接着阻害における X-dimer の有用性を初めて明らかにした点で新規性があると言えるだろう。

第4章 総括と今後の展望

抗原、抗体双方の理解に基づく研究から、P-cadherin の細胞接着阻害剤の設計方針として以下の2点が提案できる。

方針1. 始状態と終状態のエネルギー順位の逆転 (Strand-swap dimer の阻害)

方針2. 活性化エネルギーの向上 (X-dimer の阻害)

上記の条件を満たすことで、不活性型の P-cadherin Monomer を細胞上に蓄積させることができ、結果として細胞接着阻害を引き起こすことができる。このメカニズムが機能するのは、P-cadherin 分子が X-dimer を介して、絶えず Monomer 状態と分子集合体状態の間を遷移することで細胞接着を達成しているからである。また本研究より、条件1、2を満たす抗体として TSP7 が見つかった。TSP7 と同じエピトープを認識する抗体には、細胞接着阻害機能が備わっており、同様のメカニズムで細胞接着を阻害することが期待できる。そして、TSP7 に対応する抗体には、P-cadherin を標的とした癌治療薬としての可能性を期待することができる。今後の発展課題としては、TSP7 自身の物性や、機能の向上、TSP7 や TSP7 の認識するエピトープを用いた新たな抗体のスクリーニング等が期待される。

参考文献

1. Imai, K. et al. *Clin Cancer Res* 14, 6487-95 (2008).
2. Zhang, C.C. et al. *Clin Cancer Res* 16, 5177-88 (2010).
3. Vieira, A.F. & Paredes, J. *Mol Cancer* 14, 178 (2015).
4. Harrison, O.J. et al. *Nat Struct Mol Biol* 17, 348-57 (2010).
5. Hong, S., Troyanovsky, R.B. & Troyanovsky, S.M. *J Cell Biol* 192, 1073-83 (2011).
6. Harrison, O.J. et al. *Structure* 19, 244-56 (2011).