

論文の内容の要旨

論文題目 標的抗原ヒトP-cadherinの機能解析と抗体医薬設計

氏名 工藤 翔太

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。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。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。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。

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。

P-cadherin による細胞接着機構

Cadherin は Ca^{2+} 依存的に homo-dimer を形成し、細胞同士を結び付ける蛋白質である。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。結晶構造解析から、E-cadherin は Strand-swap dimer と呼ばれる homo-dimer を形成して細胞同士を結びつけていることが知られている。また、Strand-swap dimer を阻害する変異導入により、E-cadherin は X-dimer と呼ばれる別の homo-dimer を形成し、X-dimer は Strand-swap dimer の形成や解離を促進する働きがあることも知られている。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。また、本研究の標的分子である P-cadherin の細胞接着機構に関しては、どのような homo-dimer が形成され、どのように細胞接着を達成しているかは未だに明らかになっていない。

P-cadherin の細胞接着機構の解明を目指し、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おり、Ca²⁺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。

次に、細胞接着の分子メカニズムを解明することを目指し、P-cadherin の細胞外ドメイン EC1、EC2 から構成されるドメイン蛋白質を設計した。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(EC12)と、Met を N 末端に付加したコンストラクト(MEC12)を調製した。サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)と多角度散乱法(MALS)を用いた解析の結果、両蛋白質は homo-dimer を形成することが分かった。

そこで、結晶構造解析により、EC12、MEC12 の dimer を同定を行った。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。さらに、Strand-swap dimer と X-dimer を阻害したコンストラクト(MEC12 K14E)において Monomer の結晶構造が得られた。

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。そこで、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 を形成していた。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、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。反応開始後、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 を阻害することで 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、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 が Strand-swap dimer 形成を促進する理由を解明するために、X-dimer 変異体の結晶構造解析を行った。得られた X-dimer 変異体の結晶構造中に、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)では、Trp2 は自身のポケットに入っており、終状態(Strand-swap dimer)では、相手のポケットに Trp2 が挿入されていることから、X-dimer による Strand-swap dimer 形成の促進機構は、strand-swap 反応の触媒であると考えられる。さらに、X-dimer 形成が strand-swap 反応に必要な理由を解明するために、X-dimer 形成の駆動力を解明した。等温滴定型熱量計(ITC)と結晶構造解析の結果、疎水性の相互作用と水素結合の形成が X-dimer の形成と、X-dimer 中における strand-swap 反応の駆動力であることが示唆された。

最後に、蛍光観察により X-dimer が細胞上における homo-dimer の会合体形成へ与える影響を解析した。観察には、P-cadherin と GFP monomer の融合蛋白質を発現す

る CHO 細胞を用いた。WT では、細胞境界面に秩序ある蛍光の Cluster が確認されたが、X-dimer を阻害した K14E 株では、蛍光が細胞境界面に一様に広がっており、密な Cluster の形成は確認されなかった。蛍光観察の結果から、X-dimer は P-cadherin の秩序ある cluster 形成に貢献していることが明らかになった。

本研究より、P-cadherin は Monomer、X-dimer、Strand-swap dimer、Assembly の複数の状態をとり細胞接着を達成していることが明らかになった。そして、X-dimer は Strand-swap dimer の形成を促進し、迅速な細胞接着形成に貢献していることが明らかになった。X-dimer は自己の Folding を助ける働きがあることから、Self-Chaperone として機能していると考えられる。Self-Chaperone 機能を持つ X-dimer が P-cadherin の細胞接着制御の中心であることから、「X-dimer の阻害」が細胞接着阻害剤設計の指針として提案できる。

抗 P-cadherin 抗体による細胞接着阻害機構

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。

分子レベルの解析から、3 種の抗体は全て P-cadherin の EC1 を認識し、親和性は $K_D \approx 10^{-8} M$ 程度であることが明らかになった。また、P-cadherin と配列相同性の高い E-cadherin には結合しないことから、3 種の抗体は P-cadherin に対して高い特異性を保持していることが分かった。

また、免疫染色や 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ところ、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。TSP7 は細胞接着形成を阻害するだけでなく、一度形成された細胞接着を破壊する働きもあることが明らかになった。また、TSP11 は濃度依存的に細胞接着の形成を阻害する働きもあることが分かった。分子レベルの解析においても、TSP7 は P-cadherin の Strand-swap dimer を阻害し、Monomer と Strand-swap dimer 間の速い平衡関係も阻害する働きがあることが分かった。その一方で、TSP5 や TSP11 の結合は monomer-dimer 間の速い平衡関係には影響を与えないことが分かった。

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。その結果、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。興味深いことに、全ての抗体は Strand-swap dimer や X-dimer の界面とは異なる部位に結合していた。

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。両抗体はエピトープマッピングで特定された箇所に結合していることが確認された。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(衝突体積 = 2400 ~ 3500 Å³)。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。

そこで直接、各抗体と各 dimer の相互作用解析を ITC と SEC により行った。その結果、TSP7 は Strand-swap dimer だけでなく、実際に X-dimer を阻害することが確認された。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。

以上のことから、P-cadherin の細胞接着には、Strand-swap dimer の阻害だけでは不十分であり、X-dimer の阻害が極めて重要であることが明らかになった。そして、TSP7 による X-dimer の阻害は、TSP7 同士の衝突によって引き起こされることが結晶構造解析より示唆された。

P-cadherin の細胞接着を阻害可能な抗体分子の設計方針

抗体、抗原双方の理解から、P-cadherin の細胞接着阻害を引き起こす抗体分子の設計方針として、以下の 2 点が提案できる。

条件 1. 始状態(monomer)と終状態(assembly)の熱力学的なエネルギー関係の逆転

条件 2. 始状態と終状態の反応過程における活性化エネルギーの上昇

条件 1 は Strand-swap dimer の阻害によって達成でき、条件 2 は X-dimer の阻害により達成できる。以上のことから、両 homo-dimer を阻害可能な TSP7 のような抗体に、細胞接着阻害剤としての可能性と癌の悪性化を抑制する治療剤としての可能性を期待できる。