

# 論文の内容の要旨

論文題目 ドメイン蛋白質のコンホメーション安定性とコロイド安定性解析  
による抗体凝集機構の解明

氏 名 八桁 清樹

## 1. 序論

抗体医薬品の市場は、今後も拡大するものと予測され、製造や品質管理分野での継続的な技術革新が求められている。抗体の抗体凝集反応は、製造段階で抑制されるべき重要な副反応の一つであり、凝集抑制の技術開発に向けた抗体凝集機構の分子論的な理解が求められている。

抗体は、複数種のドメインから構成されるマルチドメイン蛋白質である。抗体中の各ドメインのコンホメーション安定性とコロイド安定性は相互に異なることから、抗体凝集において異なる寄与をしていることが示唆されている。そこで本論文では、各ドメイン固有のコンホメーション安定性とコロイド安定性を詳細に解析し、複雑な抗体凝集機構をドメインレベルのコンホメーション変化や凝集反応に基づいて理解することを試みた。さらにマルチドメイン構造をもつ抗体においては、構成する各ドメインが隣接するドメインと相互に影響を及ぼし合うことが予測されることから、抗体中のドメイン間相互作用の特定とそれが凝集機構に与える影響を明らかにすることを目指した。

本論文は、まず抗体の定常領域を構成する 4 種類のドメインを独立した蛋白質として合成し、異種ドメイン間の相互作用を排除した上で、各ドメイン固有のコンホメーション安定性とコロイド安定性を評価した。次に  $C_{H2}$  と  $C_{H3}$  ドメインから成る  $Fc$  を合成し、そのコンホメーション変化と凝集反応の解析結果を単独ドメインの解析結果と比較することにより、 $Fc$  におけるドメイン間相互作用を評価した。さらに、 $Fc$  の  $C_{H3}$  ドメインの C 末端にドメイン間ジスルフィド結合を導入した変異体(cyclic  $Fc$  variant (cycFc))を作製し、人為的なドメイン間相互作用の導入が cycFc のコンホメーション安定性とコロイド安定性に与える影響を解析した。

## 2. 実験手法

### 抗体定常領域ドメインの合成と解析

ヒト由来イムノグロブリン G1 の定常領域を構成するドメイン( $C_{H2}$  モノマーおよび  $C_L$  モノマー、 $C_{H3}$  ホモダイマー、 $C_{H1}$ - $C_L$  ヘテロダイマー)を大腸菌組換え蛋白質発現系を用いて合成した。合成した蛋白質の溶液を pH 2-8 および 0-300 mM NaCl からなる計 49 種の溶液へ透析した。各溶液条件におけるコンホメーション状態を、円偏光二色性(CD)スペクトルおよび内部トリプトファン蛍光スペクトル測定により解析した。また各溶液条件における凝集反応を動的光散乱(DLS)測定により解析した。

得られた CD および蛍光スペクトルに対して統計的処理(特異値分解および empirical phase diagram (EPD)の作成)を行い、測定した溶液条件に存在する複数のコンホメーション状態の特定と分類を行った。また各 pH 条件の CD スペクトルにおいて、各コンホメーション状態を代表するスペクトル(天然状態：pH 7 および 150 mM NaCl、変性凝集状態：pH 3 および 300 mM NaCl、変性分散状態：pH 2 および 0 mM NaCl)が含まれる割合を計算することにより、各コンホメーション状態の存在比を計算した。動的光散乱測定により得られた各溶液条件の粒子サイズの大小と赤色の濃淡を対応させた粒子径分布図(particle size diagram (PSD))を作成することにより、各ドメインで凝集体が形成されている溶液条件を特定した。

## Fc の合成と解析

野生型 Fc (wtFc)および Fc の CH3 ドメインの C 末端にドメイン間ジスルフィド結合を導入した Fc 変異体(cycFc)を大腸菌組換え蛋白質発現系を用いて合成した。合成した wtFc および cycFc に対して CD スペクトル測定を行い、0 または 300 mM NaCl を含む pH 2 – 8 の溶液条件範囲におけるコンホメーション変化を解析した。得られた CD スペクトルに対して、統計的な処理(特異値分解および 3 状態転移解析)を行うことで、酸変性途上に現れる Fc 中の CH2 および CH3 ドメインのコンホメーション変化を特定し、さらに各コンホメーション状態の各 pH 条件における存在比を算出した。また動的光散乱測定を行い、上記と同様の溶液条件における凝集反応を解析した。

### 3. ドメイン蛋白質の解析

#### 円偏光二色性スペクトルおよび内部トリプトファン蛍光スペクトル測定による抗体ドメインのコンホメーション安定性の解析

pH 2 – 8 および 0 – 300 mM NaCl からなる計 49 種の溶液条件における CD スペクトルデータを基に作成した EPD を Figure 1 に示す。EPD では、各溶液条件におけるコンホメーション状態の違いが、色の違いとして表現されている。CH2 モノマーおよび CH3 ホモダイマーでは 3 つの主要なコンホメーション状態が、CL モノマーおよび CH1-CL ヘテロダイマーでは 2 つの主要なコンホメーション状態が存在した。各ドメインは pH 2 また pH 3 において酸変性を生じ、さらに CH2 モノマーおよび CH3 ホモダイマーでは pH 2 – 3 および高濃度 NaCl 条件下において部分的折りたたみ構造を形成した。状態解析により算出した pH 3 における変性状態の存在比から、コンホメーション安定性の序列は、CL モノマー > CH1-CL ヘテロダイマー > CH3 ホモダイマー > CH2 モノマーとなることが明らかになった。

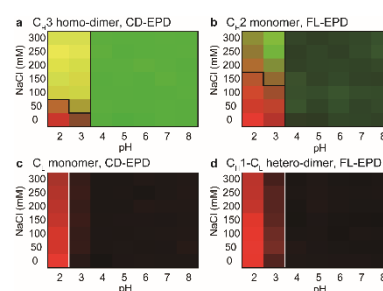


Fig. 1 CD スペクトルデータを基に作成した EPD. 黒と白の太線はクラスター分析により分類された主要なコンホメーション状態の境界線を示す。

#### 動的光散乱測定による抗体ドメインのコロイド安定性の解析

上記同様の 49 種類の溶液条件の粒子サイズを基に作成した PSD を Figure 2 に示す。PSD では、赤色が濃いほど粒子サイズが大きい、つまり凝集体を形成していることを示している。50 mM – 300 mM NaCl が含まれる pH 2 – 4 の溶液条件範囲において、CH2 と CH3 ドメインが凝集体を生じた。PSD の凝集溶液条件が、EPD の部分的折りたたみ構造を有する溶液条件と一致するため、この部分的な折りたたみ構造が凝集体の形成に関与することが示唆された。

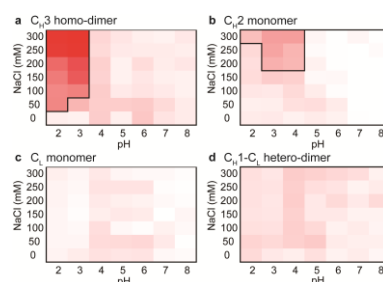


Fig. 2 粒子サイズデータを基に作成した PSD. 黒太線はクラスター分析により分類された凝集体形成領域の境界線を示す。

CH2 モノマーと CH3 ホモダイマーでは凝集し始める NaCl 濃度が異なり、また CH3 ホモダイマーが最も大きい凝集体を形成したことから、2 つのドメインでコロイド安定性が異なることが確認された。pH 3 および 300 mM NaCl における粒子サイズから、コロイド安定性の序列は、CL モノマー  $\approx$  CH1-CL ヘテロダイマー > CH2 モノマー > CH3 ホモダイマーとなることが明らかになった。

#### 4. Fc 領域の解析

##### 円偏光二色性スペクトル測定による wtFc のコンホメーション状態の解析

pH 2 – 8 の溶液条件における wtFc の CD スペクトルデータに対して特異値分解を行った結果、2 つのコンホメーション転移反応と 3 つのコンホメーション状態が存在することがわかった。3 状態転移解析を行った結果、pH 変化に対する wtFc の 3 つのコンホメーション状態の転移曲線が、CH2 モノマーおよび CH3 ホモダイマーの転移曲線と重なることから、wtFc の 2 つの転移反応はそれぞれ wtFc 中の CH2 と CH3 ドメインの転移反応に対応していることがわかった (Figure 3)。したがって、wtFc 中の CH2 と CH3 ドメインは、各々が固有にもつコンホメーション安定性に依存して変性していると考えられ、マルチドメイン構造の形成が wtFc

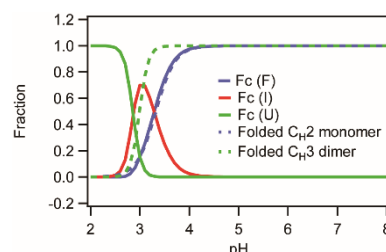


Fig. 3 Fc 中の CH2 と CH3 ドメインの pH 2 – 8 における状態変化. wtFc(F)および wtFc(I)、wtFc(U)はそれぞれ、wtFc の天然状態および中間状態、変性状態を示す。比較のために CH2 モノマーと CH3 ホモダイマーの状態変化を示した。

中のドメインのコンホメーション安定性に与える影響は少ないことが明らかとなった。Fc の結晶構造を参照した場合、CH2-CH3 境界面の相互作用数は CH3-CH3 境界面に比べて少なく、コンホメーション安定性が高い独立性を有していることの一つの要因であると考えられる。ドメイン間の相互作用が少ないことは、各ドメインのフォールディング効率の向上につながり、元来フォールディング反応と競合する凝集反応の回避につながると考えられる。またこの高い独立性から Fc 中のドメインは高い柔軟性を有するものと考えられ、この柔軟性は Fc の生物学的機能の発現において重要な役割を担うことが報告されている(Kiyoshi et al. (2015))。

##### 動的光散乱測定による wtFc の凝集反応の解析

300 mM NaCl を含む pH 2 – 8 における CD スペクトルを測定したところ、NaCl を含まない場合と同様に wtFc 中の CH2 と CH3 ドメインの独立した酸変性が観測された。同様の溶液条件における粒子径サイズの測定では、wtFc 中の 2 つのドメインの酸変性に対応した凝集反応が観測された(CH2, pH 3.62 – 4.23; CH3, pH 3.21 以下) (Figure 4)。wtFc 中の CH3 ドメインの酸変性は最も大きな凝集体を形成したが、その凝集体サイズは、CH3 ホモダイマーの凝集体サイズよりも小さかった。このことから wtFc のコロイド安定性は、CH2 ドメインの優れたコロイド安定性の影響を受け、安定化されていることが示唆された。Wright らは、マルチドメイン蛋白質において並列するドメイン間の配列同一性が低い場合に、マルチドメイン蛋白質全体の凝集反応が抑制されることを示しており(Wright et al. Nature (2005))、また Singh らは重要な生物学的機能を有するが凝集しやすいドメインと連結したドメインが優れたコンホメーション安定性を有することで、マルチドメイン蛋白質全体の安定性を向上させていることを報告している(Singh et al. (2015))。抗体定常領域を構成するドメインの配列同一性も 20%と低い値を示す。CH3 ドメインは、ホモダイマーを形成し抗体の構造維持において重要な役割を担うドメインだが、ダイマー形成面に疎水性領域をもち、

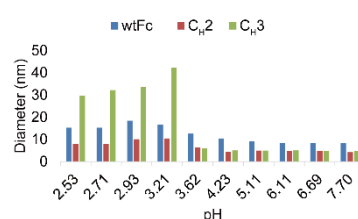


Fig. 4 pH 2 – 8 および 300 mM NaCl 条件における 5 時間のインキュベーション後の粒子サイズ。

コロイド安定性低下の要因となっていると考えられる。 $\text{CH}_2$  ドメインの良好なコロイド安定性は、抗体全体の凝集反応性を低下させるために獲得された特性であることが推察される。

## 5. ドメイン間ジスルフィド結合を導入した $\text{Fc}(\text{cycFc})$ の解析

$\text{cycFc}$  の pH 2–8 におけるコンホメーション変化と凝集反応を解析し、 $\text{wtFc}$  の解析結果と比較することで、導入したドメイン間ジスルフィド結合によるコンホメーション安定性とコロイド安定性に対する影響を解析した。CD スペクトルデータに対して特異値分解と 3 状態転移解析を行い、各コンホメーション状態の存在比を算出した (Figure 5)。  $\text{cycFc}$  の  $\text{CH}_2$  ドメインのコンホメーション転移曲線は、 $\text{wtFc}$  の  $\text{CH}_2$  ドメインの転移曲線にほぼ一致し、導入したジスルフィド結合は  $\text{CH}_2$  ドメインのコンホメーション安定性に影響を与えないことが示唆された。一方、 $\text{CH}_3$  ドメインの酸変性 pH は  $\text{wtFc}$  より低いことから、ジスルフィド結合導入により  $\text{CH}_3$  ドメインのコンホメーション安定性が増加したことがわかった。300 mM NaCl を含む溶液条件での動的光散乱による解析では、 $\text{cycFc}$  の pH 3.22 における凝集体サイズが  $\text{wtFc}$  より小さいことから、 $\text{cycFc}$  の  $\text{CH}_3$  ドメインのコンホメーション安定性の増加によって、 $\text{CH}_3$  ドメインの変性に依存した凝集反応が抑制されていることがわかった (Figure 6)。さらに、 $\text{CH}_3$  ドメイン変性後の凝集体サイズは、 $\text{cycFc}$  と  $\text{wtFc}$  の間で差がなく、ジスルフィド結合の導入は各ドメインのコロイド安定性には影響を与えないことが示唆された。

## 6. 結論

本論文では、抗体定常領域を構成する各ドメインのコンホメーション安定性とコロイド安定性が異なることを明確に示し、その解析結果を基礎とすることで、マルチドメイン構造をもつ  $\text{Fc}$  中の  $\text{CH}_2$  と  $\text{CH}_3$  ドメインのコンホメーション安定性の独立性とコロイド安定性の相互依存性を明らかにした。 $\text{CH}_2$  モノマーは  $\text{CH}_3$  ホモダイマーよりもコンホメーション安定性が低いため、穏やかな酸性 pH において  $\text{Fc}$  の凝集反応に寄与する。一方で、酸変性状態の  $\text{CH}_2$  モノマーは、 $\text{CH}_3$  ホモダイマーよりも優れたコロイド安定性を示した。その優れたコロイド安定性は、 $\text{Fc}$  のマルチドメイン構造中で長距離的な影響を及ぼし、 $\text{Fc}$  全体のコロイド安定性の増加に寄与していることが明らかとなった。これらの知見は、抗体ドメイン蛋白質の物性に寄り添った合理的な抗体製剤の探索や抗体の工学的改良につながるものと考えられる。この抗体の工学的改良に対する試行として行ったドメイン間ジスルフィド結合の導入では、 $\text{Fc}$  の  $\text{CH}_3$  ドメインのコンホメーション安定性を増加させることによって、 $\text{CH}_3$  ドメインの独立した変性に依存する凝集反応を抑制できることを示した。

## 7. 発表論文

Yageta S, Lauer T, Trout B, Honda S. Conformational and Colloidal Stabilities of Isolated Constant Domains of Human Immunoglobulin G and Their Impact on Antibody Aggregation under Acidic Conditions. *Molecular Pharmaceutics*. 2015;12(5):1443-55.

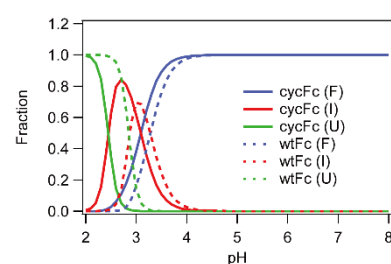


Fig. 5  $\text{Fc-Cys}$  中の  $\text{CH}_2$  と  $\text{CH}_3$  ドメインの pH 2 – 8 における状態変化. 比較のために野生型  $\text{Fc}(\text{wtFc})$  の状態変化を示した.

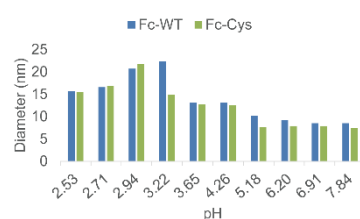


Fig. 6 pH 2 – 8 および 300 mM NaCl 条件における 10 時間のインキュベーション後の粒子サイズ