

論文の内容の要旨

論文題目 抗体機能・物性向上の合理的な設計を指向した物理化学研究

氏 名 木吉 真人

【研究背景】

抗体はその高い抗原特異性・親和性から、がん免疫療法、診断薬、バイオセンサーなど応用範囲は多岐にわたる。加えて、ゲノム創薬としての抗体の位置づけは高く、治療薬や診断薬の創製における抗体の合理的設計は厳しい国際競争下にある。その中で、既存のバイオ医薬品に改良を加えるバイオベター戦略が生産効率という観点から盛んに取り組まれている。したがってバイオ医薬展開を指向した抗体への変異導入とその物性の精査は、きわめて重要な研究課題である。計算化学的手法は合理的設計の戦略において注目されているが、改変後の分子の挙動の予測は難しく、合理的に高親和性抗体を作製するための知見は未だ不足している。本研究では、計算化学的手法を用いた合理的な設計と実験的検証により、親和性の向上を目指した。

第一章 相互作用界面への変異導入による親和性の向上

【目的】

本研究では、変異導入による親和性へのエネルギー寄与を計算化学的手法によって評価することで、抗体の合理的な親和性の向上を試みる。ターゲットとして、単球の走化性因子である MCP-1(Monocyte chemoattractant protein-1)に対する scFv(single chain Fv)を用いた。MCP-1 は、動脈硬化、遅延型アレルギー、関節リウマチといった各種炎症性疾患において単球及び T 細胞の組織浸潤に関与すると考えられている。このため、抗 MCP-1 抗体として知られる 11K2 は、炎症性疾患に対する新規な治療薬・診断薬として期待されている。本研究では、11K2 の合理的な設計に基づいた親和性の向上を目指した。

【方法】

まず計算化学的手法によって、抗体の CDR ループにアミノ酸残基を変異導入した際の親和性へのエネルギー寄与を算出した。その結果、エネルギー寄与が向上するとされた変異体は、全て荷電残基の導入によるものであった。以上を踏まえ、13 種類の scFv 変異体を設計し、大腸菌を用いて封入体として発現し、さらに巻き戻しによって調製した。MCP-1 との親和性については、表面プラズモン共鳴(SPR)を用いて解析を行った。SPR を用いて、温度を変化させた条件で解析を行うことで、親和性の速度論的、熱力学的なパラメーターを求めた。

【結果と考察】

5 種類の変異体(N31R, S53E, S53D, T56D, T56E)について顕著な親和性の向上を確認することができた。特に変異体 N31R に関しては、親和性が野生型に比べ約 5 倍向上し、解離定数 $K_d=1.7 \times 10^{-10}$ と、非常に強固に結合していた。これらの変異体における親和性の向上は、結合速度定数 (k_{on})の増加ではなく、解離速度定数(k_{off})の低下に起因する事が明らかとなった。これらの結果は、荷電性アミノ酸の変異導入が、解離速度を低下させ、高親和性抗体の創出が可能であることを強く示唆している。

また、野生型及び変異体 scFv について熱力学的な解析を行い、親和性に対するエンタルピー寄

与、エントロピー寄与を求めた。その結果、これらの変異体における親和性の向上は、エンタルピー寄与の増大に起因することが明らかとなった。特に N31R 変異体は、エンタルピー変化(ΔH)が $-25.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ と、顕著に増大していた。これは、最終複合体において、抗原-抗体間に新規な非共有結合が形成されたことを示唆している。さらに、遷移状態における熱力学的パラメータを算出した。その結果、親和性の向上した変異体は、活性化エンタルピーが顕著に低下していた。これは、荷電残基の変異導入によって、遷移状態において強く抗原と相互作用し、活性化エンタルピー障壁を下げることを示している。これらはバイオベター戦略における合理的分子設計において、Encounter Complex 形成時及び遷移状態を含めた、複合体形成過程の非共有結合に関する考察が重要である事を強く示唆するものである。

第二章 ジスルフィド結合の変異導入による親和性の向上

【目的】

分子内へのジスルフィド結合の変異導入は、変性状態のエントロピーの減少による安定化を目的として用いられる手法である。本研究では、抗体 scFv の β ストランド間にジスルフィド結合を導入することによって、結合によって生じるエントロピー損を抑え、親和性の向上を試みた。

【方法】

ターゲットとして、抗インターフェロンガンマレセプター(IFN γ R)抗体である A6 を用いた。まず、計算化学的手法によって、システインを変異導入する部位を 2 箇所選択した。変異導入する部位は、抗原への親和性の低下を避けるため、CDR ループの構造に変化を与えないよう、距離の近い β ストランド間に導入することとした。1 章で述べた方法と同様に、大腸菌より封入体として発現し、さらに巻き戻しによって調製した。SPR を用いて抗原との親和性を解析した。さらに、示差走査型熱量計(DSC)を用いて scFv の熱安定性について解析を行った。

【結果と考察】

SPR を用いて、A6 scFv と、その抗原である IFN γ R 間の親和性を測定した。それに伴い、これら蛋白質間相互作用の、25 °C における速度論的な解析を行なった。その結果を Table 2 に示す。野生型 WT の IFN γ R に対する親和性は、解離定数 $K_D = 1.1 \times 10^{-7} \text{ (M)}$ となった。各変異体における結合速度定数(k_{on})、解離速度定数(k_{off})、解離定数(K_D)を比較したところ、全ての変異体において親和性の向上は見られなかった。また、驚くべきことに、これら変異体における親和性の低下は、解離速度定数(k_{off})の上昇ではなく、結合速度定数(k_{on})の低下に起因していた。つまり、抗原-抗体複合体形成時(k_{on})には、可変領域の β ストランド間の揺らぎや、動きが非常に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

A6 scFv 野生型と S19C/K81C 変異体、S65C/T72C 変異体について、DSC を用いて熱安定性の解析を行った。その結果、野生型の変性中点温度(T_m) 47.2 °C に対し、S19C/K81C 変異体、S65C/T72C 変異体の T_m は、それぞれ 50.8 °C、50.4 °C と、変異体は野生型に比べ、熱安定性が向上していることが明らかとなった。

第三章 機能付加を目指した抗体 CDR-H3 ループの物理化学解析

【目的】

バイオベター戦略において、生理活性物質同士の付加(conjugate)は非常に重要で強力な手段になりうるが、異なる 2 つの分子同士を、性質を保ったまま効果を足し合わせることは難しく、安定性、体内動態、抗原性など、解決すべき課題は多い。そこで、本研究では PG9 抗体に着目した。PG9 抗体は、HIV の糖タンパク質を認識する抗体である。PG9 の特徴は非常に長い CDR H3 ルー

プにあり、現存するヒト抗体の中で最も長いものとして知られている。H3 ループの先端に、ペプチドなどの生理活性物質の付加によって、生体内で作用する足場としての利用を考えた。しかし、H3 ループの長さの限界や、水溶液中でのループの挙動、ループの伸長に伴う物理化学的性質を詳細に解析した例は無い。そこで本研究の目的として、H3 ループの伸長に伴う、発現量、可溶性、二次構造、リフォールディング、熱安定性などの物理化学的性質の変化を解析することとした。さらに、生理活性ペプチドを CDR ループに提示した抗体 scFv を作製し、その物性の評価を目指した。

【方法】

PG9 scFv を作製し、その物理化学的性質を解析する。次に、遺伝子操作により、H3 ループを伸長した変異体を作製し、その物理化学的性質の変化を解析する。変異導入部位は、PG9 抗体の結晶構造を基に、抗体本来の B ストランド間の相互作用に変化を与えないよう、表面に露出した B ストランドと B ストランドの間のループ領域に Gly-Gly-Gly-Ser を一つのユニットとして挿入することとした。変異導入は 2 アミノ酸ごとに行った。

【結果と考察】

PG9 scFv 野生型は、可溶性画分、不溶性画分共に大腸菌から高い発現量を示し、二次構造、Refolding 効率、熱安定性など、野生型とほぼ同じ物理化学的性質を示した。すなわち、PG9 scFv は、ループの伸長には寛容であり、発現量、refolding、二次構造、熱安定性、などの物性において著しく性質を損なうことはないことが示された。そこで、ループの伸長が可能であれば、ある程度の大きさまでであれば α ヘリックスなどの二次構造をループに提示することが可能なのではないかと考えた。そこで、実際に医薬品として用いられる α ヘリックス構造を持つペプチド、Teribone を CDR H3 ループに組み込んだ Teribone-PG9 scFv を作製した。

作製した Teribone-PG9 は、大腸菌からの発現量が著しく低下してしまった。封入体から得られた Teribone-PG9 について、巻き戻しを行った。ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて最終精製を行い、Teribone-PG9 を得た。CD スペクトルを用いて、二次構造解析を行った結果、 α ヘリックスと β シート構造を併せ持つような CD スペクトルを示した。一つの分子内に、抗体本来の相互作用界面と α ヘリックス構造を持つペプチド、の 2 つの機能性ドメインを持たせる分子デザインとしては成功したと言える。抗原との親和性や、熱安定性、Teribone としての薬効が維持されているか、など非常に興味深い。

【結論】

MCP-1 と抗 MCP-1 抗体 11K2 を用いて、分子シミュレーションに基づいた上で、荷電残基を変異導入することによって、2-5 倍の親和性の向上が見られた。荷電残基の変異導入によって、遷移状態のエンタルピー障壁が顕著に低下し、親和性向上に貢献する事が明らかとなった。また、抗 IFN γ R 抗体 A6 scFv 分子内にジスルフィド結合を導入し、結合に伴うエントロピー損を抑制することで、親和性の向上を試みた。2 つの変異体は、野生型に比べ熱安定性が上昇していたが、すべての変異体において顕著な親和性の向上は見られず、それは結合速度定数の低下に起因していることが明らかとなった。以上の知見は、抗体の抗原親和性向上に関する合理的設計に重要な指針を与えるものである。

第三章では、抗体 CDR H3 ループの伸長に伴う物理化学的性質の変化を精査した。PG9 scFv は、ループの伸長には寛容であり、発現量、refolding、二次構造、熱安定性、などの物性において著しく性質を損なうことはないことが示された。 α ヘリックス構造を持つペプチド、Teribone を CDR H3 ループに組み込んだ Teribone-PG9 scFv を作製し、CD スペクトルを用

いた二次構造解析を行った結果、 α ヘリックスと β シート構造を併せ持つような CD スペクトルを示した。