

蛋白質鎖間の特異的ペアリングによる次世代バイオ医薬作製技術

山形大学大学院理工学研究科 化学・バイオ工学専攻

真壁 幸樹

1. はじめに

次世代のがん治療薬として研究されている二重特異性抗体 (図1) は異なる二種類の抗体を一つの分子中に組み上げたものであり、次世代のバイオ医薬品として研究が進められている (図1)。例えば、がん細胞に特異的に発現する細胞表面蛋白質と結合する抗体と免疫細胞表面に特異的に発現する蛋白質に結合する抗体から作り出した二重特異性抗体は、細胞間の架橋により、免疫細胞が効率的にがん細胞を攻撃することができるため効果の高いがん治療薬となる (図1)。しかし、

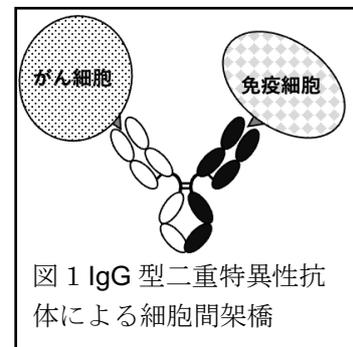


図1 IgG型二重特異性抗体による細胞間架橋

複数のポリペプチド鎖同士が、正しくない会合が起こるため副産物の除去や目的産物の収量が低くなってしまう問題がある (図2)。この問題を克服するためにこれまでに様々な抗体改変技術が開発されてきたが、どれも非天然の配列や構造が導入され分子が不安定化する問題があった。

そこで、本研究提案では特異的な分子間共有結合を誘導するユニット (Spy ユニット) を組み合わせ、任意の組み合わせで二重特異性抗体のヘテロ会合体をボトムアップで形成するシステムを作り出した (図3)。これにより、完全に

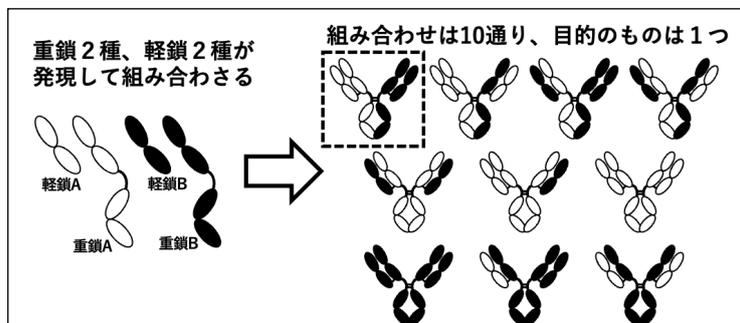


図2 IgG型二重特異性抗体の会合時における副産物の生成

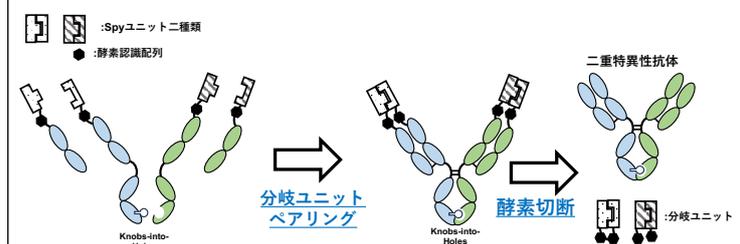


図3 分子の自発的会合による特異的なIgG型二重特異性抗体の生成。交差反応しないSpyユニットの組み合わせで特異的なヘテロ間会合を誘導。切断によってSpyユニットは除去。

天然の抗体配列を持つ安定な二重特異性抗体分子を作り出すための基盤技術が確立できる。効果の高いバイオ医薬品を効率的に作り出せる分子技術の社会実装から、長い健康寿命の実現を目指す。

2. 天然配列をもつ二重特異性抗体作製方法

図 3 に我々が考案した二重特異性抗体の作製方法を示す。IgG 型の二重特異性抗体では重鎖 2 種類、軽鎖 2 種類からなる全部で 4 種類の蛋白質鎖が特異的なペアリングをする必要がある。しかし、それぞれの重鎖、軽鎖は似ているため 4 種類の蛋白質から 10 種類の IgG 型を作り出す組み合わせができてしまう。これら 10 種類の中で正しい組み合わせは 1 種類でありそれを分離するために多数の精製工程が必要であり、収量の大幅な低下が起ってしまう。この問題を克服するために、これまでに様々な抗体改変技術が開発されてきた。例えば、Fc 領域の会合表面を凸と凹の形にして特異的な会合を実現した **Knobs-Into-Holes** や共通 L 鎖などを組み合わせたものが実際の医薬品製造の現場で用いられている。しかし、これまでに開発された技術はすべて非天然の配列や構造が導入されるため、安定性が低下することが報告されており、また、潜在的な免疫原性の上昇が懸念されている。このような状況であるため、二重特異性抗体を構成する 4 種類のポリペプチド鎖を天然の配列のままに正確に組み上げた、完全天然 IgG 型二重特異性抗体の実現が望まれている。

そこで、我々は 4 種類のポリペプチドを末端に融合した、Spy ユニットによって、特異的なペアリングを実現し、会合後にユニットを切断除去する方法を考案した (図 3)。これは特異的なペアリングを IgG 構造の外側に配置し、正しくペアリングされた後に、Spy ユニートを除去するものである。この方法を **BsAb by external Pairing and Excision (BAPE)** と、命名した。BAPE では 4 種類の蛋白質をコードする遺伝子を単一の細胞に導入して培養するだけで目的の正しいペアリングが実現できる。また、ペアリングを誘導している部位はプロテアーゼ切断後に除去されるため、IgG 型二重特異性抗体は天然配列を維持することが可能となる。今回は重鎖と軽鎖のペアリングに着目して分子を作製した。重鎖同士のペアリングでは従来の **knobs-into-holes** 変異を用いた。

3. 天然配列をもつ二重特異性抗体作製方法

図 4 に実際に作製した抗 CD3/抗 Her2 bsAb の分子設計を示す。がん治療薬として医薬品への応用に適した二重特異性抗体の組み合わせとして、抗 CD3/抗 Her2 bsAb のクローンを 2 つ選択しました。CD3 は免疫系 T 細胞に発現する抗原であり、Her2 は乳がんなどのがんで特異的に発現している抗原である。選択した抗 CD3 抗体は、ヒト化 M291 抗体クローン HuM291 をえらんだ。これは、これまでの二重特異性抗体の研究で T 細胞を腫瘍部位に誘導するために広く使用されている抗体クローンである。また、抗 Her2 抗体にはハーセプチンを選択した。ハーセプ

チンは、乳がんの治療に使用される FDA 承認の抗体クローンであり、承認済みの ADC である Kadcyla と Enhertu の抗体部分、および臨床試験中の抗体薬物複合体がん治療薬にも使用されているなど実績が多い抗体クローンである。次に、これらのクローンから得られた二重特異性抗体の N 末端に SpyCatcher /Tag および SnoopCatcher/Tag ペアを融合し、重鎖/軽鎖ペアリングの外部ペアリングユニットとした（図 4）。

SpyCatcher/Tag と SnoopCatcher/Tag は蛋白質工学で広く用いられているペアリングユニットであり、溶液中で自発的にイソペプチド結合を形成する（本文中では Spy ユニットとまとめて表記する）。また、これらの 2 種類は交差反応しないため、溶液中で特異的にペアリングを実現できる。重鎖同士のペアリングでは、knobs-into-holes 変異を導入し、正しい対合を形成した。ノブ変異はハーセプチン側に導入し、ホール変異は抗 CD3 抗体側に導入した。SpyCatcher と SpyTag はそれぞれ抗 CD3 抗体側に導入し、SnoopCatcher と SnoopTag はそれぞれ抗 Her2 抗体側に導入した。それぞれの Spy ユニットの後にトロンピン切断部位を挿入している。効率的な発現を誘導するために N 末端には VHH を融合した。

4. 二重特異性抗体の作製と活性評価

作製した 4 種類の発現ベクターを動物細胞発現系を用いて組換え体蛋白質として調製を行った。動物細胞として Expi293F 細胞を用いて培養した。得られた培養上清をプロテイン A カラムに添加し、溶出画分から目的蛋白質を得た（図 5）。目的の蛋白質が Spy ユニットによって連結されていることが、SDSPAGE のバンドの推定分子量から示唆された。したがって、この結果は、発現中に鎖間ペアリングが起こったことを示している。組換え蛋白質の発現収量は 1.0 mg/1L 培養だった。

次に、トロンピン消化およびプロテイン L 精製を行い、調製した蛋白質分子から 2 つの Spy ユニット部分を除去して二重特異性抗体を構築した(図 5)。消化反応は 25°Cで一晩行

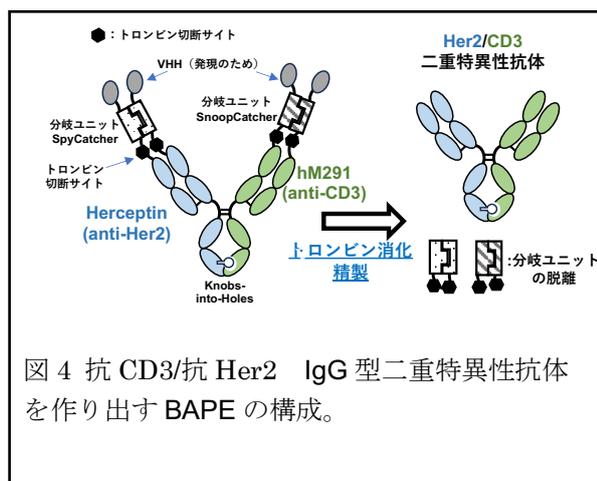


図 4 抗 CD3/抗 Her2 IgG 型二重特異性抗体を作り出す BAPE の構成。

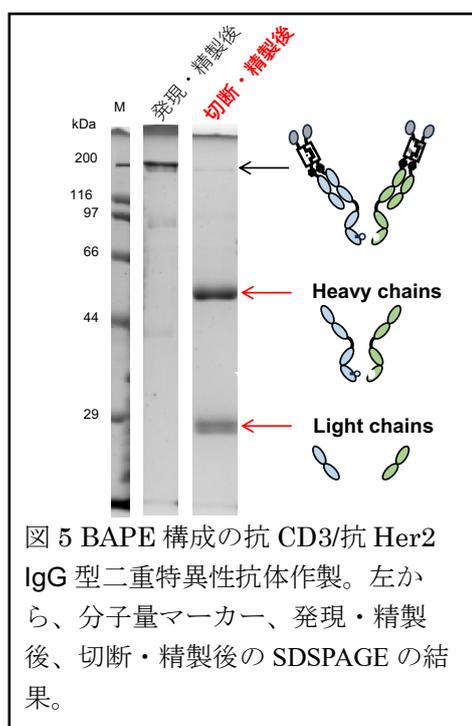


図 5 BAPE 構成の抗 CD3/抗 Her2 IgG 型二重特異性抗体作製。左から、分子量マーカー、発現・精製後、切断・精製後の SDS-PAGE の結果。

い、消化後、共有結合した重鎖/軽鎖複合体は消失し、重鎖と軽鎖のバンドが現れた。これは、Spy ユニット部分が正常に除去されたことを示している。

引き続き得られた二重特異性抗体の分子サイズを分析サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を使用して評価した (図 6)。BAPE により作製した二重特異性抗体はハーセプチン IgG に近い溶出容量で溶出され、IgG 様分子が形成されたことを示唆していることがわかった (図 6)。

さらに、標的である CD3 と Her2 への結合活性をフローサイトメトリーによって評価した (図 7)。CD3 陽性細胞として HPB-ALL 細胞株、Her2 陽性細胞として SK-BR-3 細胞株を用いて評価した。BAPE によって作製した二重特異性抗体は両方の細胞株に対して有意な結合活性を示し、二重特異性を確認した。

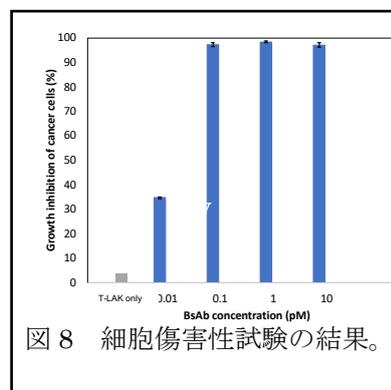
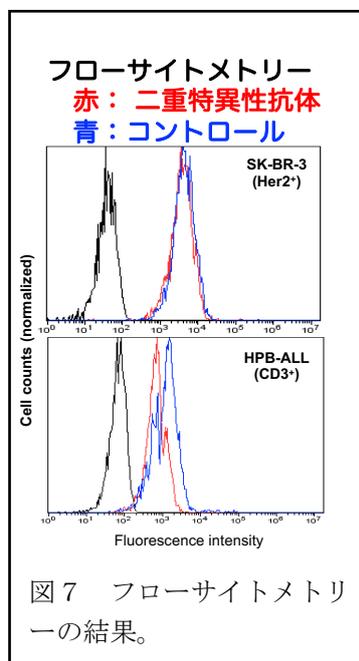
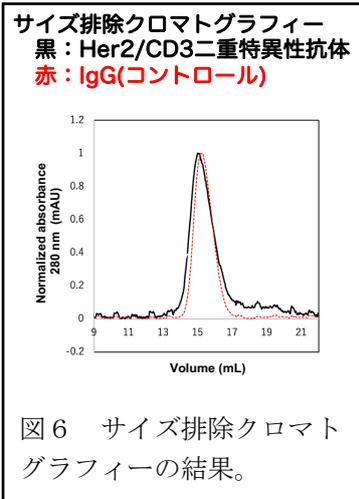
最後に、T 細胞が媒介するがん細胞傷害活性を評価した (図 8)。これを行うために、Her2 陽性 SK-BR-3 細胞を活性化 T 細胞 (T-LAK) とともにインキュベートした。添加した二重特異性抗体の濃度に応じて、用量依存的に増殖阻害活性が増加することが観察された。観察された抗がん細胞活性は、癌細胞と活性化免疫細胞の間を橋渡しする二重特異性活性を示唆している。

5. まとめ

本研究では、新しいバイオ医薬品の構築技術を作り出すことを目的として、蛋白質鎖間を特異的にペアリングできる技術に基づいた分子設計をおこなった。実験を通じて、目的の二重特異性抗体を作り出すことができた。また、作製した分子は免疫細胞を用いたがん細胞傷害性試験において濃度依存的に細胞傷害活性を持つことを示した。

謝辞

公益財団法人 天野工業技術研究所からのご支援を賜り、本研究を遂行することができました。ここに記して謝意を示します。



参考文献

- 1) Yoshida J, Kato Y, Isogawa A, Tanaka Y, Kumagai I, Asano R, Nakanishi T, Makabe K*
Construction of bispecific antibodies by specific pairing between the heavy chain and the light chain using removable SpyCatcher/SnoopCatcher units
J Biol Eng. 18(1), 57, 2024
doi: 10.1186/s13036-024-00454-z.