

201438025A

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

膜型 C4.4A を標的とした大腸がんに対する

転移再発予測診断技術の開発

平成 26 年度 委託業務成果報告書

研究代表者 堤 康央

平成 27 年 3 月

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

膜型 C4.4A を標的とした大腸がんに対する転移再発予測診断技術の開発

平成 26 年度 委託業務成果報告書

研究代表者 堤 康央

平成 27 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業による委託業務として、堤 康央が実施した平成26年度「膜型C4.4Aを標的とした大腸がんに対する転移再発予測診断技術の開発」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括） 研究全体の統括と候補抗体の取得・評価 堤 康央	1
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. 臨床検体の収集と膜型C4. 4Aの臨床学的な特性の評価 森 正樹	12
2. 情報科学によるシミュレーションの精度向上とリード抗体の構造予測 浜窪隆雄	14
3. X線結晶構造解析技術の最適化とリード抗体の構造決定 井上 豪	16
4. 熱力学的解析技術の最適化とリード抗体の構造安定性予測 津本浩平	18
5. 候補抗体の取得・評価とリード抗体に対するデザイン 向 洋平	20
III. 学会等発表実績	27
IV. 研究成果の刊行物・別刷	32

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
総括報告書

研究全体の統括と候補抗体の取得・評価

研究代表者 堤 康央 大阪大学大学院薬学研究科

本申請課題は、大腸がんにおける血行性転移を事前予測し得る新規バイオマーカー候補「膜型C4.4A」を特異検出可能なモノクローナル抗体を「ファージ抗体ライブラリ技術」により取得し、我が国発の転移再発予測体外診断薬を実用化しようとするものである。

膜型C4.4Aの発現が大腸がんに対する血行性転移のマーカーと成り得ることは、分担者の森らにより見出されているが、膜型C4.4Aを特異検出するためのモノクローナル抗体が単離できておらず、本診断技術は実用化されていない。この点、我々は抗体の高速単離技術として、130億種類の多様性を有するファージヒト型抗体ライブラリの構築に成功するなど、あらゆるシーズに対する抗体を僅か2週間で単離可能な体制を樹立済みである。本研究の目的を達成するためには、膜型C4.4Aに対する抗体を複数クローン取得し、スクリーニングすることで目的の抗体を取得する必要がある。しかしながら、18アミノ酸という小さな標的に対し、エピトープが異なる複数の抗体を取得することは難度が高く、これまでの実績から、得られる抗体の親和性は低いものと予想される。そこで、本申請課題では、我が国独自の抗体改変技術により、得られた抗体の親和性の低さの問題をも克服可能な体制で、診断薬グレードの抗体の開発を目指す。また、得られた抗体の性能評価については、森らの保有する臨床サンプルを用いバリデーションを試みる。

本年度ではファージ抗体ライブラリを用いて膜型C4.4Aに対する複数のモノクローナル抗体候補の取得、親和性向上技術の確立、C4.4Aの機能解析を試みた。

研究分担者

森 正樹：大阪大学大学院医学系研究科消化器外科・教授

浜窪隆雄：東京大学先端科学技術研究センター・教授

井上 豪：大阪大学大学院工学研究科・教授

津本浩平：東京大学大学院工学研究科・教授

向 洋平：独立行政法人 医薬基盤研究所・サブプロジェクトリーダー

A. 研究目的

大腸がんの確定診断は、術後の切除腫瘍を用いた病理診断によって行われている。この病理診断において患者の再発率に最も影響を与えるのが、中間ステージがん (stage II, III) の治療方針の決定である。

中間ステージがんでは、現在、リンパ節転移の有無により治療方針が決定されている。例えば、リンパ節転移無し (stage II：再発率15%) では原則無治療であり、リンパ節転移有り (stage III：再発率35%) には転移再発

を事前予測できないという理由から、再発しない患者も含めた全例に術後化学療法が実施されている。このように現在では、stage II、stage IIIの治療方針に再発率が加味されておらず、非常に不合理な治療が行われており、患者に優しい医療の実現を目指す我が国では、早急に克服すべき課題となっている。従って、中間ステージがんにおいては、転移再発の予測精度を向上させることで、①転移再発例 (高危険度群) を早期に予測し適切な先制医療 (予防医療) を施すこと、②転移再発のリスクが

低い患者には、不要な化学療法を避け、患者のQOLの向上に努めること、即ち患者背景に応じた個別医療の推進が求められている。

この点、分担者の森らは、がんの転移に関するGPIアンカー蛋白質：C4.4Aの「細胞膜への局在」が、未だバイオマーカーが存在しない血行性転移を予測し得ることを見出しており、これは既存のリンパ節転移と合わせることで、新規大腸がん転移再発予測診断に繋がる可能性を示すものであった。

これまでの森らの検討では、リンパ節転移陰性（stage II）かつ膜型C4.4A陰性であった患者は9.1%であるのに対し、リンパ節転移陽性（stage III）かつ膜型C4.4A陽性であった患者は、実に64.3%の確率で再発することが明らかとなった。一方で、同じリンパ節転移陽性（stage III）であっても、C4.4Aが陰性であれば、再発率は16.7%とstage IIの再発率と大差がないことも明らかとなった（Table 1）。即ち、膜型C4.4Aの発現による転移再発診断は、既存のリンパ節転移による転移再発診断の確度をさらに向上させ、大腸がんの先制医療による死亡率の軽減、さらには、術後化学療法の適正化による患者QOLの向上の双方に貢献できる新たな診断技術となる。しかしながら、膜型C4.4Aを特異検出するためのモノクローナル抗体が単離できておらず、本診断技術は実用化されていない。

本研究では、如何にして膜型C4.4Aを特異検出できる抗体を取得するかがポイントとなる。これまで森らは、C4.4AのN末端近傍に対するポリクローナル抗体が細胞全体を染色すること、一方でGPIアンカー近傍の断片ペプチドに対するポリクローナル抗体が細胞膜を強く染色することを明らかとしている。この免疫染色の結果から、C4.4AのGPIアンカー近傍領域の18アミノ酸の中には、膜型C4.4Aを特異的に認識できる結合領域（エピトープ）が含まれることが強く示唆されるものの、その部位は明らかでない。通常のモノクローナル抗体のエピトープは5-8アミノ酸とされ、この18アミノ酸の中にも複数のエピトープの存在が示唆されるため、膜型C4.4Aを特異認識で

きるモノクローナル抗体の同定には、この18アミノ酸を中心として、エピトープが異なる抗体を複数単離し、その中から膜型C4.4Aを特異認識できるクローンをスクリーニングする必要がある。

この点、我々は独自のファージ表面提示法を有効活用し、あらゆるシーズに対するヒト型抗体およびヒト型低分子抗体を取得可能な、130億種類のファージ抗体ライブラリを構築済みであり、通常の抗体作成法では取得困難なリン酸化ペプチド特異抗体をも複数単離した実績を有するなど、本申請課題における抗体単離を円滑に実施できる基盤を保有している。上記でも記載したように、これまでの森らの検討から、GPIアンカー近傍領域に対するポリクローナル抗体中に膜型C4.4Aを染色する抗体が含まれると予想される。そのため、GPIアンカー近傍に対する抗体を複数取得し、スクリーニングすることで目的の抗体を選別することが、本研究の目的を達成できると考えられる。しかしながら、18アミノ酸という小さな標的に対し、エピトープが異なる複数の抗体を取得することは難度が高く、これまでの実績から、得られる抗体の親和性は低いものと予想される。そこで、本申請課題では、我が国独自の抗体改変技術により、得られた抗体の親和性の低さの問題をも克服可能な体制で、診断薬グレードの抗体の開発を目指す。また、得られた抗体の性能評価については、森らの保有する臨床サンプルを用いバリデーションを試みる。

本年度ではファージ抗体ライブラリを用いて膜型C4.4Aに対する複数のモノクローナル抗体候補の取得、親和性向上技術の確立、C4.4Aの機能解析を試みた。

Table 1 : 中間ステージがん患者の再発率(n=82) 森ら

		膜型C4.4A		
		(+)	(-)	
リンパ節転移	(+)stage III	34.2%	64.3%	16.7%
	(-)stage II	13.6%	27.3%	9.1%

B. 研究方法

B-1. 臨床検体の収集と膜型C4.4Aの臨床学的な特性の評価

C4.4Aの細胞浸潤に果たす役割について

- ① 細胞表面の膜タンパクであるC4.4Aがどのような基質と結合するのかをコラーゲン (I型、IV型)、ラミニンと比較した。
- ② 細胞遊走能について各基質間での差異を比較検討した。
- ③ コラーゲン培養下における浸潤のメカニズムについてどのようなタンパク分解酵素が関与しているのかについて各種のMMPを中心に検討した。

B-2. 情報科学によるシミュレーションの精度向上とリード抗体の構造予測

会合過程の超並列MD計算

抗原・抗体の自然な会合過程をシミュレーションすることにより、複合体構造を予測する。成功確率を上げるために、多くのトラジェクトリーを同時に走らせる超並列MD計算をする。

自由エネルギー曲線解析

親和性を予測する1つの方法として、解離経路に沿った自由エネルギー曲面を解析する。MDシミュレーションを工夫して解離経路を上手く設定することにより計算精度を高める。

B-3. X線結晶構造解析技術の最適化とリード抗体の構造決定

抗体の親和性向上に関するノウハウの蓄積

既にX線構造解析に成功している抗原-抗体の3次元立体構造情報を基に、親和性向上を目指した変異導入とITC測定も行うことによって、構造と機能(親和性)との相関を明らかにすることによって、抗体の親和性向上に関するノウハウを蓄積した。

Hot Spot周辺で変異導入をデザインすれば良いか、離れた場所に変異導入すれば良いか、種々の変異体導入を行って、小分子化抗体の変異体として発現し、高純度精製サンプルについてITC実験を行って分子設計に関する指

針を構築した。

新たな結晶化方法の開発

抗体の親和性向上を目指して分子設計を行うには、変異導入を加える度に、変異体の大量精製と結晶化を行い、抗原-抗体複合体のX線構造を次々と明らかとし、抗原認識部位の構造変化を的確に捉えることが必須となる。

この目的を加速するためにゲルを用いた新たな結晶化方法の改良/開発を進めた。

B-4. 熱力学的解析技術の最適化とリード抗体の構造安定性予測

熱力学的解析技術の最適化

既構造情報が入手可能なモデルとなる単鎖抗体(scFv)2種類について、Ala- Scanningならびに変異体を用いた抗原との相互作用に関する熱力学的情報を獲得した。

B-5. 候補抗体の取得・評価とリード抗体に対するデザイン

ペプチド結合タンパク質の合成

GenScript社に依頼し、下記に示す①~④のペプチド結合タンパク質を合成した。

①AGHQDRSNSGQYPAKGC 結合 KLH

②SGQYPAKGGPQQPHNKGC 結合 KLH

③AGHQDRSNSGQYPAKGC 結合 BSA

④SGQYPAKGGPQQPHNKGC 結合 BSA

以降、AGHQDRSNSGQYPAKGCはC4.4A₃₀₁、SGQYPAKGGPQQPHNKGCはC4.4A₃₀₉と略称する。

タンパク質定量

タンパク質の定量には、BCA protein assay kit (Pierce) を使用した。

イムノチューブによるパンニング

各ペプチド結合 BSA (C4.4A₃₀₁-BSA:11.38 mg/ml、C4.4A₃₀₉-BSA:3.36 mg/ml) をピカルボネートバッファー (pH 9.6) でC4.4A₃₀₁-BSAは1000倍、C4.4A₃₀₉-BSA 300倍に希釈し、10 µg/mlの溶液を調製後、Nunc イムノチ

ューブ (Thermo SCIENTIFIC) に添加して、室温で 12 時間静置し、固相化した。2% スキムミルク/PBS 5 ml 添加して、室温で 2 時間静置し、ブロッキングした。ブロッキング後のイムノチューブに合成ファージ抗体ライブラリ 1 ml、PBS 600 μ l、4% スキムミルク/PBS 2 ml、10 mg/ml BSA/PBS 400 μ l を添加して、室温で 30 分間回転、30 分間静置し、抗原とファージを結合させた。0.1% Tween 20/PBS (0.1% PBST) と PBS で各々 10 回洗浄後、100 mM triethylamine (pH 11) を 1 ml 添加して、5 分間転倒混和し、out put ファージ溶液を回収した。回収した out put ファージ溶液に 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 500 μ l を添加して、中和した。out put ファージは予め 2YT 培地で OD₆₀₀=0.4~0.5 まで培養しておいた大腸菌 TG1 株に 37°C で 30 分間感染させた。out put ファージが感染した大腸菌 TG1 株の一部を使用して、原液、100 倍希釈液、10000 倍希釈液を、100 μ l/ml ampicillin、2% glucose 含有 LB 培地プレートに播種し、タイターを測定した。残り的大腸菌 TG1 株は 4°C、3300×g で 10 分間遠心後、2YT 培地で再懸濁した。その後、上記のプレートに播種した。タイター測定用のプレートは 37°C で 12 時間、その他のプレートは 30°C で 12 時間培養した。

大腸菌 TG1 株感染ファージの増幅

培養プレートに 10% glycerol 含有 2YT 培地 5 ml 添加して、スプレッダーで穏やかに剥がした。剥がした大腸菌の一部を ampicillin (終濃度 100 μ g/ml)、2% glucose 含有 2YT 培地に添加して、200 rpm、37°C で OD₆₀₀=0.4~0.5 まで培養した。その後、培養液 10 ml にヘルパーファージ (2×10^{12} pfu/ml) 200 μ l を添加して、37°C、30 分間感染させた。3300×g、10 分間遠心して、ampicillin (終濃度 100 μ g/ml)、kanamycin (終濃度 50 μ g/ml) 含有 2YT 培地で再懸濁し、30°C、200 rpm で 12 時間培養することで、ファージを産生させた。

ファージの回収

大腸菌培養液を 3300×g、4°C で 30 分間遠心して、上清 40 ml に対して 20% PEG/2.5 M NaCl 10 ml 添加し、攪拌後に氷上で 30 分間静置した。その後、上記の条件で遠心して、ペレットを超純水 40 ml、20% PEG/2.5 M NaCl 10 ml で再懸濁し、氷上で 30 分間静置した。再度、上記の条件で遠心して、ペレットを PBS/10% Glycerol 2 ml に再懸濁し、11600×g、4°C で 2 分間遠心後に上清を回収した。以後は、上記のイムノチューブによるパンニング、大腸菌 TG1 株感染ファージの増幅、ファージの回収を 2 回繰り返した。

大腸菌培養上清を用いた ELISA によるスクリーニング

パンニング後に回収したファージを大腸菌 TG1 株に感染させ、生じたコロニーを予め ampicillin (終濃度 100 μ g/ml)、2% glucose 含有 2YT 培地に添加しておいた 96 well deep プレートにピックアップし、1000 rpm、37°C で 2 時間培養した。培養液の一部に 50% Glycerol を添加し、-80°C で保存した。残りの培養液に 5 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加して、1000 rpm、30°C で 12 時間培養し、培養上清中に一本鎖抗体 (scFv-FLAG tag) を産生させた。その後、1800×g、10 分で遠心し、培養上清を回収した。

別途 96 well プレート (Thermo SCIENTIFIC) に各ペプチド結合 BSA (C4.4A₃₀₁-BSA:11.38 mg/ml、C4.4A₃₀₉-BSA:3.36mg/ml) をジカルボネートバッファー (pH 9.6) で C4.4A₃₀₁-BSA は 1000 倍、C4.4A₃₀₉-BSA 300 倍に希釈し、10 μ g/ml の溶液を調製後、96 well プレートに添加して、室温で 12 時間静置し、固相化した。その後、PBS で 3 回洗浄して、4% スキムミルク/PBS 200 μ l 添加し、室温で 2 時間静置した。ブロッキングの後、100 倍希釈した Monoclonal Anti-FLAG M2 (SIGMA-ALDRICH) と上記で回収した培養上清を各 20 μ l、80 μ l ずつ添加して、室温

で2時間静置し、反応させた。0.1% PBST、PBSで各3回ずつ洗浄して、10000倍希釈したGoat Anti-mouse IgG-HRP conjugated (Abcam)を添加し、室温で1時間静置する。再度、0.1% PBST、PBSで各3回ずつ洗浄して、TMB+Substrate-chromogen (Dako) 100 μ l 添加し、室温で静置し、反応させた。その後、1 M H₂SO₄ 50 μ l 添加し、反応を停止させ、OD₄₅₀で吸光度を測定した。

シークエンス解析による塩基配列決定

タカラバイオ株式会社に依頼し、シークエンス解析を行った。

可溶性 scFv の産生誘導

まず、ELISAによるスクリーニングにより、各ペプチドに対して結合性を有するポジティブクローンの可溶性 scFv を産生誘導した。scFv の産生誘導に関しては、上記 scFv の産生誘導と同様の方法で行った。その後、大腸菌 TG1 株培養液を7000 rpm、4°Cで15分間遠心し、上清を0.45 μ m PES フィルターで濾過した。また、ペリプラズム画分にある scFv を回収するために、残ったペレット1gにつき高浸透圧バッファー(500 mM スクロース、30 mM Tris-Hcl、1 mM EDTA) 40 ml を添加して、懸濁後に3500 \times g、10°Cで30分間遠心した。遠心後、上清を捨て、ペレット1gにつき冷やした超純水25 ml 添加して、懸濁後に10000 \times g、4°Cで30分間遠心した。上清を0.45 μ l PES フィルターで濾過して、最初に回収した上清と混合し、タンパク質精製に供した。

可溶性 scFv の精製

Ultra-linked rProteinA resin (Sino Biological) を使用し、可溶性 scFv を精製した。まず、超純水100 ml を流して、resin を洗浄し、PBS 100 ml で平衡化した。平衡化後に回収した可溶性 scFv 溶液を流して、PBS 100 ml、0.1% PBST 100 ml、PBS 100 ml の順で洗浄した。その後、0.1 M Glycine-HCl (pH 2.7) を Protein A カラム

に添加して、scFv を1.2 ml ずつ5画分に溶出し、1 M Tris-HCl (pH 8.0) 300 μ l で中和した。

scFv のゲル濾過

scFv のゲル濾過には AKTA Pure (GE Healthcare) を使用し、カラムは HiLoadTM 16/60 SuperdexTM 75 Prep grade (Amesham Bioscience) を使用した。マーカーとしてニワトリ卵白アルブミン (OVA : 40 kDa) を使用し、単量体画分のみを回収した。

マウスへの免疫

BALB/c、MRL/MpJmsSlc-lpr/lpr マウス (6 week, ♀) は、日本 SLC より購入した。各マウスに Titer Max Gold とペプチド結合 KLH を混合し、抗原 50 μ g/mice を1週間おきに4回マウスの頸部皮下、大腿四頭筋内に各50 μ l ずつ (大腿四頭筋内には片足25 μ l ずつ) 免疫した。

免疫マウスの抗原特異的抗体価測定

96 wellプレート (Thermo SCIENTIFIC) にビカルボネートバッファーで10 μ l/ml に調製した各ペプチド結合 KLH を添加し、室温で12時間静置した。その後、PBS で3回洗浄して、4% ブロックエース 200 μ l 添加し、室温で2時間静置した。ブロッキングの後、0.4% ブロックエースで2倍ずつ6段階に希釈 (2⁷, 2⁸, 2⁹, 2¹⁰, 2¹¹, 2¹², 2¹³倍希釈) した血漿を添加し、室温で1時間静置した。0.05% PBST で3回洗浄した。その後、0.4% ブロックエースで10000倍希釈した Anti-mouse IgG-HRP conjugated (Abcam) 100 μ l 添加し、室温で1時間静置した。0.05% PBST で3回洗浄した。洗浄後に、TMB+Substrate-chromogen (Dako) 100 μ l 添加し、発色させた。発色後、2 N H₂SO₄ 50 μ l 添加し、反応を停止させ、OD₄₅₀で吸光度を測定した。

C. 研究結果

C-1. 臨床検体の収集と膜型 C4.4A の臨床学的な特性の評価

C4.4A の細胞浸潤に果たす役割について

- ① リコンビナント C4.4A 蛋白との結合能はラミニンよりも、I 型・IV 型コラーゲンの方が強力であった。C4.4A 蛋白は S-S 結合がリッチであり、リコンビナント蛋白とは非特異的の反応を起こす可能性もあるので哺乳類の細胞に強制発現させた C4.4A から抽出した C4.4A 蛋白でも同様の実験を行ったが、やはりコラーゲンとの結合が最も強かった。
- ② ラミニン、I 型・IV 型コラーゲンを塗布したプレートで wound healing assay を実施すると 24 時間～48 時間で wound 部分がすべて修復される程度の細胞遊走がみられた。C4.4A siRNA 処理を行うとラミニンのプレートでは細胞遊走能が維持されたが、コラーゲンプレートでは細胞の遊走が大幅に阻害された。以上①、②の結果から、大腸癌の先進部からの細胞の遊走には C4.4A とコラーゲンとの interaction が重要であることが示唆された。実際、ヒト大腸癌の間質成分としては IV 型コラーゲンが最も豊富であり C4.4A が働く下地となっている。
- ③ 大腸癌細胞をコラーゲン内に包埋すると経時的にコラーゲンを融解して細胞浸潤がみられた。一方、C4.4A siRNA 処理を行うとコラーゲンの融解が全くみられなくなった。このことから C4.4A がコラーゲンを融解するタンパク分解酵素を recruit することが示唆された。そこで、どのようなタンパク分解酵素が関与するのかを調べるためにコラーゲンの中で大腸癌細胞を 3D 培養し、2D 培養と比べて発現増加する因子を microarray によって検索した。同時にコラーゲン培養で C4.4A siRNA 処理した際に発現の減弱分子として MMP14 が候補となったが、RT-PCR 法による確認作業では再現性が

得られなかった。浸潤に関する代表的な分子である MMP2, MMP9, MT1-MMP をパイロット的に調べたところ 3D コラーゲン培養下で MMP2, MT1-MMP が発現上昇し、C4.4A siRNA 処理によってこれらの分子の発現減弱が得られコラーゲンの分解、浸潤に関与する分子であると考えられた。

C-2. 情報科学によるシミュレーションの精度向上とリード抗体の構造予測

抗原・抗体の会合過程を超並列 MD 計算

従来の形状相補性による複合体構造予測法は、溶液中におけるタンパク質の柔らかい動きの効果を無視してしまい、結果として複合体形状予測の精度が悪くなる。本研究では、超並列 MD 計算の方法により、従来法よりも結晶構造に近い構造を与えることに成功した。

自由エネルギー曲線解析

新しく開発した multistep targeted MD 法により、タンパク質の人為的な構造歪みを無くした解離経路が生成できた。その経路に沿った自由エネルギー曲線を解析することで、リゾチーム抗体の変異による親和性の変化を再現することに成功した。

C-3. X 線結晶構造解析技術の最適化とリード抗体の構造決定

抗体の親和性向上に関するノウハウの蓄積

ROBO1 は肝癌特異的に高発現する標的蛋白質で、膜型 C4.4 と同様に Ig ドメイン (5 つ) と Fn ドメイン (3 つ) からなる 1 回膜貫通型の蛋白質である。本標的蛋白質の Fn2 ドメインを認識する抗体 B2122 について合計で 9 種類の変異体作製と iTC の測定を行うとともに、結合活性が顕著に変化したものについては X 線構造解析も進めた。その結果、抗原を認識する際に 92 度も側鎖が回転する Tyr50 を Ala に置換した変異体ではエンタルピー項が 10 kJ/mol ほど改悪となるものの、エントロピー項が 4.2 kJ/mol も改良されることにより自由エネルギー変化としては大きなロスにはなら

ず、X線構造解析からもこのことを示す結果が得られ、複合体形成に伴う構造変化と結合の際のエネルギー変化に相関があることが判明した。長年研究を継続して行ってきた成果ではあるが、抗体の最適化について知見が得られた。

なお、変異体はHot Spot付近より離れた位置での変異体の作製が重要であるとの認識に至った。

新たな結晶化方法の開発

Insulin を用いてゲル上で結晶育成を行い、結晶周囲の溶液を攪拌することでより高品質に結晶が育成できることを、温度に対する安定性試験により確認した。結晶の安定性は2度上昇することが判明した(論文リスト1)。また、レーザーアブレーションによる結晶核の発生法やマイクロクリスタルを生成して種結晶化に用いる方法などについて review にまとめた。

C-4. 熱力学的解析技術の最適化とリード抗体の構造安定性予測

熱力学的解析技術の最適化

本解析から、相互作用に関与する各アミノ酸残基のエネルギー的、構造的知見に関して今まで得られてきた以下の知見がより一般的に適用されることを明らかにした。① Hot-Spot への Ala 変異により、単変異で想定される親和性の低下に比して顕著な低下が見られる、これは発熱量の大幅な減少に現れる、②それ以外の部位は熱力学的相補、すなわち発熱量の変化がエントロピー変化量の変化により相殺されることにより。Ala 変異導入の効果はほとんど現れない、③Ala への変異導入により親和性が向上する部位が存在する、それは Hot-Spot の構造を変化させないような相互作用界面の端に存在する部位である。以上は、特に蛋白質性抗原において、抗原抗体相互作用が面-面相互作用として性格付けできることによる。また、相互作用の遷移状態解析について、Eyring-Plot により実施することで、上記①~③について遷移状態におけ

るエンタルピー、エントロピー変化量を理解することの重要性を指摘することができた。

C-5. 候補抗体の取得・評価とリード抗体に対するデザイン

ペプチド結合 BSA に対する抗体取得

本年度では、2種類の C4.4A の GPI アンカー近傍のペプチドに結合する scFv クローンの取得を目的とし、各ペプチド結合 BSA に対して合成ファージ抗体ライブラリを利用して、膜型 C4.4A に対するモノクローナル抗体候補の取得を試みた。これまでに C4.4A の GPI アンカー近傍に対するポリクローナル抗体が膜型 C4.4A を認識することが報告されていることから、森らがポリクローナル抗体の取得に使用した断片ペプチドを使用した。また、これまでの検討により、GPI アンカー近傍に膜型 C4.4A を特異的に認識できるエピトープが含まれることが強く示唆されることから、より GPI アンカー近傍の断片ペプチドも使用した。合成ファージ抗体ライブラリを用いて3回のパンニングを行い、3rd パンニングの output ファージ感染大腸菌をモノクローン化し、その培養上清を用いた ELISA により C4.4A₃₀₁、C4.4A₃₀₉ に結合性を有するポジティブクローンをスクリーニングした。吸光度が 0.5 以上であるクローン数を評価した結果、C4.4A₃₀₁、C4.4A₃₀₉ に対して結合性を有する可能性のあるポジティブクローンはそれぞれ 69、32 個であった (Fig. 1)。その後、シーケンス解析により、候補クローンの塩基配列を決定したところ、C4.4A₃₀₁ に対して 4 種類、C4.4A₃₀₉ に対して 8 種類の scFv クローンを取得した。

マウスへの免疫

免疫マウスの脾臓から免疫ファージ抗体ライブラリを構築するために、まず C4.4A₃₀₁、C4.4A₃₀₉ 結合 KLH を各マウス (BALB/c、MRL/MpJmsSlc-lpr/lpr) に免疫した。ヒトの C4.4A とマウスの C4.4A の相同性が高いことから、C4.4A に対する抗体価が上昇しない可能性が考えられたため、本検討では通常

モノクローナル抗体の取得に使用される BALB/c マウスの他に自己免疫疾患マウスである MpJmsSlc-lpr/lpr マウスを使用した。各マウスに 4 回免疫後の抗原特異的抗体価の上昇を評価したところ、両マウスにおいて十分な上昇が認められた (Fig. 2)。今回は、免疫ファージ抗体ライブラリを構築するために抗体価を確実に上昇させるためにマウスへ 4 回免疫した。しかし、一般的に免疫回数を増やすことにより、マウス体内での親和性成熟が進み抗体の種類が減少することが考えられている。そのため、C4.4A に対する抗体をより複数取得するためには、マウスへの免疫回数を最適化する検討が必要であるかもしれないため、今後その点に関して検討していく。

D. 考察

C. 研究結果の欄に記載。

E. 結論

- C4.4A との結合基質としてコラーゲンが重要である。
- C4.4A に基づく間質浸潤に際しては MMP2、MT1-MMP の関与が示唆された。
- 超並列 MD 計算により、抗原抗体の複合体構造の予測精度が向上した。
- 新しい自由エネルギー曲線解析の方法により、親和性の予測精度が向上した。
- 抗体の最適化には、Hot Spot の位置を確認し、遠隔の位置での変異導入が有効である。
- ゲル上での溶液攪拌は結晶化に有効である。
- モデルとなる複合体について、提案している複合体の安定性に関する設計指針の一般性を示した。
- 遷移状態における熱力学の理解が重要であることを示した。
- 非免疫ファージ抗体ライブラリを用いて、C4.4A の細胞膜近傍のペプチドに対する抗体の取得を試みた結果、目的のペプチドに結合する可能性を有する 12 種類のクローンを取得した。

F. 健康管理情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Yamashita T. and Fujitani H. : On Accurate Calculation of the Potential of Mean Force between Antigen and Antibody: A Case of the HyHEL-10-Hen Egg White Lysozyme System., Chem. Phys. Lett., 609 : 50-53, 2014.
- ② Nakayama T., Mizohata E., Yamashita T., Nagatoishi S., Nakakido M., Iwanari H., Mochizuki Y., Kado Y., Yokota Y., Satoh R., Tsumoto K., Fujitani H., Kodama T., Hamakubo T. and Inoue T. : Structural features of interfacial tyrosine residue in ROBO1 fibronectin domain-antibody complex: Crystallographic, thermodynamic, and molecular dynamic analyses., Protein Sci., 24 : 328-340, 2015.
- ③ Hamakubo T, Kusano-Arai O, Iwanari H. : Generation of antibodies against membrane proteins., Biochimica et Biophysica Acta., 1844(11):1920-1924, 2014.
- ④ Aoki Y. et al. : A new practical technique for high quality protein crystallization with the solution stirring technique at the interface between high-concentrated hydrogel and solution., Jpn. J. Appl. Phys., 53 : 065502, 2014.
- ⑤ H. Y. Yoshikawa et al. : Laser ablation for protein crystal nucleation and seeding., Chem. Soc. Rev., 43 : 2147-2158, 2014.
- ⑥ Nakayama T. et al. : Structural features of interfacial tyrosine

residue in ROBO1 fibronectin domain-antibody complex: Crystallographic, thermodynamic, and molecular dynamic analyses, Protein Science., 24, 328-340, 2014.

- ⑦ Kawato T. T. et al. : Crystal structure of a streptavidin mutant with low immunogenicity., Journal of Bioscience and Bioengineering., S1389-1723(14), 2014.
- ⑧ Kawato T. et al. : Structure-based design and synthesis of a bivalent iminobiotin analogue showing strong affinity toward a low immunogenic streptavidin mutant., Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1, 1-3, 2015.
- ⑨ Kawato T. et al : Structure-based design of a streptavidin mutant specific for an artificial biotin analogue., J. Biochemistry, 2015, in press.

2. 学会発表

- ① 山下雄史 : 分子動力学法による抗原抗体解離過程の自由エネルギー地形に関する研究., 分子科学討論会., 東広島 (広島), 2014年9月.
- ② 山下雄史 : 分子動力学計算で見る抗体改変の影響., 日本生化学会., 京都 (京都), 2014年10月.
- ③ 浜窪隆雄 : 膜タンパク質抗体の作製とドラッグデザイン., 日本薬学会第135年会., 神戸 (兵庫), 2015年3月. (発表予定)
- ④ 杉山成 (他12名) : 難水溶性化合物., 標的蛋白質との複合体結晶作製へ向けた新規技術開発., 日本結晶学会., 東京大学, 2014年11月
- ⑤ 川戸達矢 (他6名) : 人工ピオチンアナログを特異的に認識するストレプトアビジン改変体の開発., 第14回蛋白質科学会., 2014年6月

- ⑥ 向 洋平, 小椋健正, 三里一貴, 永野貴士, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 長野一也, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: 新規非免疫ヒト型ファージ抗体ライブラリの構築とその品質評価., 日本薬学会第134年会., 熊本 (熊本), 2014年3月.
- ⑦ 小椋健正, 向 洋平, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 長野一也, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: 非免疫ファージ抗体ライブラリからの抗体取得の最適化に関する基礎検討., 日本薬学会第134年会., 熊本 (熊本), 2014年3月.
- ⑧ 向 洋平, 小椋健正, 三里一貴, 永野貴士, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 長野一也, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央., 新規非免疫ファージ抗体ライブラリの構築とその品質評価., 第30回日本DDS学会., 東京 (東京), 2014年7月.
- ⑨ 三里一貴, 向 洋平, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 長野一也, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: 独自に構築した非免疫ヒト型ファージ抗体ライブラリの品質評価., 日本薬学会第135年会., 神戸 (兵庫), 2015年3月. (発表予定)
- ⑩ Mukai Y., Ogura T., Misato K., Nagano T., Higashisaka K., Yoshioka Y., Nagano K., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Creation of a novel non-immune phage human antibody library which consists of four stable VH-VL pairs., 5th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress (PSWC) , Melbourne (Australia), 13-16 April, 2014.
- ⑪ Mukai Y., Ogura T., Misato K., Nagano T., Higashisaka K., Yoshioka Y., Nagano K., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Creation of a novel non-immune phage human antibody library comprising four stable VH-VL pairs., 2014

AAPS National Biotechnology
Conference, San Diego (USA) ,
19-21 May, 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

PCT/JP2015/054431

「ビオチン改変体、ストレプトアビジン

変異体およびその利用」(出願日 2015.2.17)

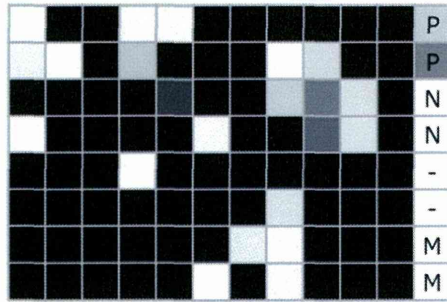
出願人：サヴィッド・セラピューティックス
株式会社

3. その他

講演会

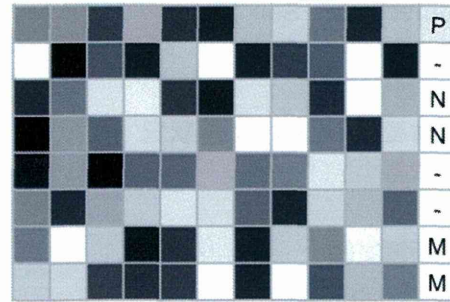
浜窪隆雄：Keynote lecture「診断・治療のため
の小分子化抗体の設計について」：次世代バ
イオ医薬品創出に向けた設計・基盤技術最前
線（ダイアローグ株式会社主催）2014年10
月

固相化抗原：C4.4A₃₀₁-BSA



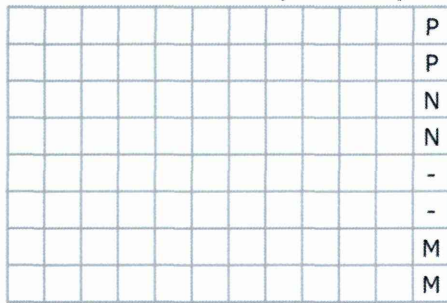
0.1 0.5
OD450

固相化抗原：C4.4A₃₀₉-BSA



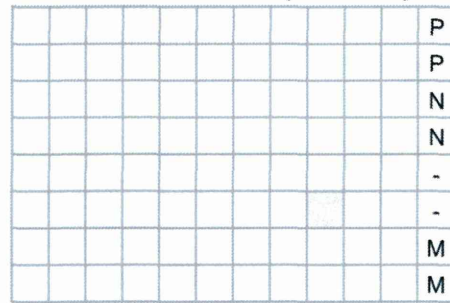
0.1 0.5
OD450

固相化抗原：BSA (control)



0.1 0.5
OD450

固相化抗原：BSA (control)

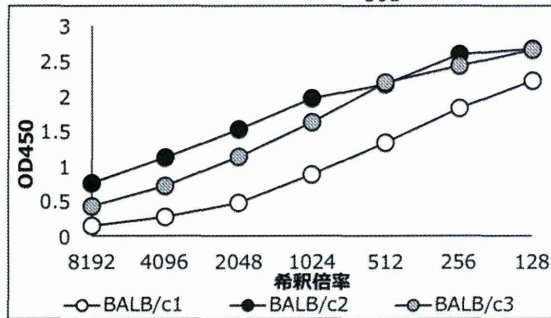


0.1 0.5
OD450

M : medium only、N : Negative control of sup.、P : sup. With anti C4.4A scFv

図1 ELISAによる親和性評価

Serum-anti C4.4A₃₀₁ IgG



Serum-anti C4.4A₃₀₉ IgG

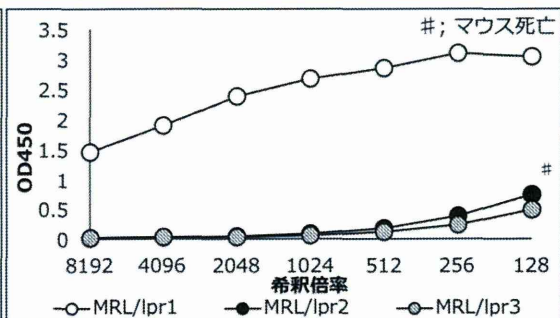
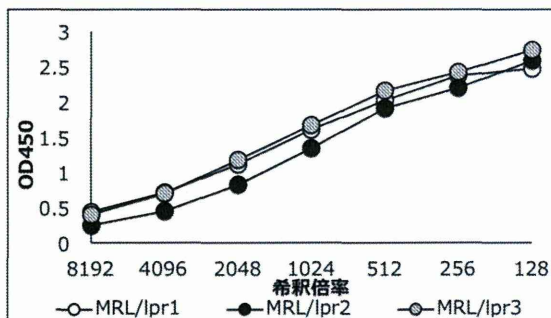
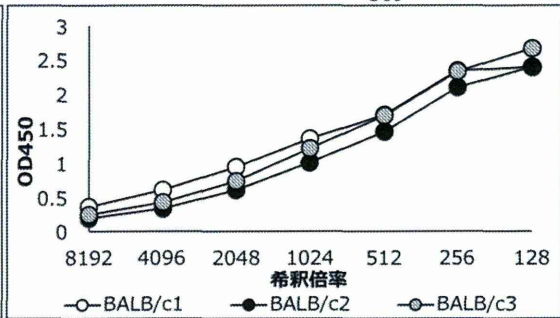


図2 免疫したマウスの血中抗体価測定

臨床検体の収集と膜型 C4.4A の臨床学的な特性の評価

分担研究者 森 正樹 大阪大学大学院医学系研究科消化器外科

大腸癌切除組織を用いた多施設研究の準備をはじめると共に、C4.4A が転移・再発のマーカーとなる分子メカニズムについて検討した。

A. 研究目的

大腸癌の先進部におけるC4.4A遺伝子発現が転移・再発マーカーとなることはわかっているが、実際にマーカーとして利用される際にはそのメカニズムについての理解が検査の普及のためには必要とされる。本研究ではC4.4Aの細胞浸潤に果たす役割について検討した。

また、多施設臨床試験の準備のために、関連病院の担当医を招集し試験コンセプトの説明会を行った。次年度（2015年）に倫理委員会を通してサンプルの収集を行う。

B. 研究方法

C4.4A の細胞浸潤に果たす役割について

- ① 細胞表面の膜タンパクである C4.4A がどのような基質と結合するのかをコラーゲン（I 型、IV 型）、ラミニンと比較した。
- ② 細胞遊走能について各基質間での差異を比較検討した。
- ③ コラーゲン培養下における浸潤のメカニズムについてどのようなタンパク分解酵素が関与しているのかについて各種の MMP を中心に検討した。

C. 研究結果

C4.4A の細胞浸潤に果たす役割について

- ① リコンビナント C4.4A 蛋白との結合能はラミニンよりも、I 型・IV 型コラーゲンの方が強力であった。C4.4A 蛋白は S-S 結合がリッチであり、リコンビナント蛋白とは非特異的の反応を起こす可能

性もあるので哺乳類の細胞に強制発現させた C4.4A から抽出した C4.4A 蛋白でも同様の実験を行ったが、やはりコラーゲンとの結合が最も強かった。

- ② ラミニン、I 型・IV 型コラーゲンを塗布したプレートで wound healing assay を実施すると 24 時間～48 時間で wound 部分がすべて修復される程度の細胞遊走がみられた。C4.4A siRNA 処理を行うとラミニンのプレートでは細胞遊走能が維持されたが、コラーゲンプレートでは細胞の遊走が大幅に阻害された。以上①、②の結果から、大腸癌の先進部からの細胞の遊走には C4.4A とコラーゲンとの interaction が重要であることが示唆された。実際、ヒト大腸癌の間質成分としては IV 型コラーゲンが最も豊富であり C4.4A が働く下地となっている。
- ③ 大腸癌細胞をコラーゲン内に包埋すると経時的にコラーゲンを融解して細胞浸潤がみられた。一方、C4.4A siRNA 処理を行うとコラーゲンの融解が全くみられなくなった。このことから C4.4A がコラーゲンを融解するタンパク分解酵素を recruit することが示唆された。そこで、どのようなタンパク分解酵素が関与するのかを調べるためにコラーゲンの中で大腸癌細胞を 3D 培養し、2D 培養と比べて発現増加する因子を microarray によって検索した。同時にコラーゲン培養で C4.4A siRNA 処理し

実際に発現の減弱する分子として MMP14 が候補となったが、RT-PCR 法による確認作業では再現性が得られなかった。浸潤に関する代表的な分子である MMP2, MMP9, MT1-MMP をパイロット的に調べたところ 3D コラーゲン培養下で MMP2, MT1-MMP が発現上昇し、C4.4A siRNA 処理によってこれらの分子の発現減弱が得られコラーゲンの分解、浸潤に関与する分子であると考えられた。

D. 考察

C.研究結果の欄に記載。

E. 結論

- C4.4Aとの結合基質としてコラーゲンが重要である。
- C4.4A に基づく間質浸潤に際しては MMP2、MT1-MMP の関与が示唆された。

F. 健康管理情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
分担研究報告書

情報科学によるシミュレーションの精度向上とリード抗体の構造予測

分担研究者 浜窪隆雄 東京大学先端科学技術研究センター

親和性向上のための抗体分子設計には、抗原との複合体構造と親和性の予測技術が必須である。今年度は、分子動力学(MD)計算に基づき複合体構造および親和性の計算予測技術の開発を行った。

A. 研究目的

抗体の親和性を効率良く向上させるため、計算機による抗体分子設計法の開発をおこない、膜型C4.4A抗体へと応用することを目的とする。本年度は、親和性向上に必須の情報である抗原抗体複合体構造および親和性の予測精度を分子動力学(MD, Molecular Dynamics)計算を用いて高める新技術を開発することを目的とした。

B. 研究方法

会合過程の超並列MD計算

抗原・抗体の自然な会合過程をシミュレーションすることにより、複合体構造を予測する。成功確率を上げるために、多くのトラジェクトリーを同時に走らせる超並列MD計算をする。

自由エネルギー曲線解析

親和性を予測する1つの方法として、解離経路に沿った自由エネルギー曲面を解析する。MDシミュレーションを工夫して解離経路を上手く設定することにより計算精度を高める。

C. 研究結果

抗原・抗体の会合過程を超並列MD計算

従来の形状相補性による複合体構造予測法は、溶液中におけるタンパク質の柔らかい動きの効果を無視してしまい、結果として複合体形状予測の精度が悪くなる。本研究では、超並列MD計算の方法により、従来法よりも結晶構造に近い構造を与えることに成功した。

自由エネルギー曲線解析

新しく開発したmultistep targeted MD法により、タンパク質の人為的な構造歪みを無くした解離経路が生成できた。その経路に沿った自由エネルギー曲線を解析することで、リゾチーム抗体の変異による親和性の変化を再現することに成功した。

D. 考察

C.研究結果の欄に記載。

E. 結論

- 超並列MD計算により、抗原抗体の複合体構造の予測精度が向上した。
- 新しい自由エネルギー曲線解析の方法により、親和性の予測精度が向上した。

F. 健康管理情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Yamashita T. and Fujitani H. : On Accurate Calculation of the Potential of Mean Force between Antigen and Antibody : A Case of the HyHEL-10-Hen Egg White Lysozyme System., Chem. Phys. Lett., 609 : 50-53, 2014.
- ② Nakayama T., Mizohata E., Yamashita T., Nagatoishi S., Nakakido M.,

Iwanari H., Mochizuki Y., Kado Y., Yokota Y., Satoh R., Tsumoto K., Fujitani H., Kodama T., Hamakubo T. and Inoue T. : Structural features of interfacial tyrosine residue in ROBO1 fibronectin domain-antibody complex: Crystallographic, thermodynamic, and molecular dynamic analyses., Protein Sci., 24 : 328-340, 2015.

- ③ Hamakubo T, Kusano-Arai O, Iwanari H. : Generation of antibodies against membrane proteins., Biochimica et Biophysica Acta., 1844(11) : 1920-1924, 2014

2. 学会発表

- ① 山下雄史：分子動力学法による抗原抗体解離過程の自由エネルギー地形に関する研究., 分子科学討論会., 東広島（広島）, 2014年9月.
- ② 山下雄史：分子動力学計算で見る抗体改変の影響., 日本生化学会., 京都（京都）, 2014年10月.
- ③ 浜窪隆雄：膜タンパク質抗体の作製とドラッグデザイン., 日本薬学会第135年会., 神戸（兵庫）, 2015年3月.（発表予定）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

講演会

浜窪隆雄：Keynote lecture「診断・治療のための小分子化抗体の設計について」:次世代バイオ医薬品創出に向けた設計・基盤技術最前線（ダイアローグ株式会社主催）2014年10月

X線結晶構造解析技術の最適化とリード抗体の構造決定

分担研究者 井上 豪 大阪大学大学院工学研究科

GPI アンカー膜型 C4.4 を特異的に認識する抗体の構造情報を基に抗体の親和性を向上させることを目的として、抗体の親和性向上のための変異導入に関する知見の蓄積と結晶化技術の開発を進めた。

A. 研究目的

本研究課題では、大腸がんにおける血行性転移を事前予測し得る新規バイオマーカー「膜型C4.4A」のみを特異的に認識する抗体について、より親和性の高い抗体を分子設計するための技術開発を進めると同時に、そのノウハウを蓄積して大腸がんの診断薬を実用化することを目的としている。

B. 研究方法

抗体の親和性向上に関するノウハウの蓄積

既にX線構造解析に成功している抗原-抗体の3次元立体構造情報を基に、親和性向上を目指した変異導入とiTC測定も行うことによって、構造と機能（親和性）との相関を明らかにすることによって、抗体の親和性向上に関するノウハウを蓄積した。

Hot Spot周辺で変異導入をデザインすれば良いか、離れた場所に変異導入すれば良いか、種々の変異体導入を行って、小分子化抗体の変異体として発現し、高純度精製サンプルについてiTC実験を行って分子設計に関する指針を構築した。

新たな結晶化方法の開発

抗体の親和性向上を目指して分子設計を行うには、変異導入を加える度に、変異体の大量精製と結晶化を行い、抗原-抗体複合体のX線構造を次々と明らかとし、抗原認識部位の構造変化を的確に捉えることが必須となる。

この目的を加速するためにゲルを用いた新

たな結晶化方法の改良／開発を進めた。

C. 研究結果

抗体の親和性向上に関するノウハウの蓄積

ROBO1は肝臓特異的に高発現する標的蛋白質で、膜型C4.4と同様にIgドメイン(5つ)とFnドメイン(3つ)からなる1回膜貫通型の蛋白質である。本標的蛋白質のFn2ドメインを認識する抗体B2122について合計で9種類の変異体作製とiTCの測定を行うとともに、結合活性が顕著に変化したものについてはX線構造解析も進めた。その結果、抗原を認識する際に92度も側鎖が回転するTyr50をAlaに置換した変異体ではエンタルピー項が10 kJ/molほど改悪となるものの、エントロピー項が4.2 kJ/molも改良されることにより自由エネルギー変化としては大きなロスにはならず、X線構造解析からもこのことを示す結果が得られ、複合体形成に伴う構造変化と結合の際のエネルギー変化に相関があることが判明した。長年研究を継続して行ってきた成果ではあるが、抗体の最適化について知見が得られた。

なお、変異体はHot Spot付近より離れた位置での変異体の作製が重要であるとの認識に至った。

新たな結晶化方法の開発

Insulin を用いてゲル上で結晶育成を行い、結晶周囲の溶液を攪拌することでより高品質に結晶が育成できることを、温度に対する安