

フジサンケイビジネスアイ賞

## 抗体分子の親和性改変技術の開発

<sup>1</sup>シスメックス株式会社 <sup>2</sup>東京大学大学院工学系研究科 <sup>3</sup>東京大学医科学研究所

福永 淳<sup>1</sup> 前田 真吾<sup>1,2</sup> 中田 智史<sup>1</sup>  
バジャジュリーマ<sup>1</sup> 江頭 由里子<sup>1</sup> 津本 浩平<sup>2,3</sup>

## 1. 諸言

現在の世界の総人口は約75億人であり、2060年には100億人を超えると見込まれている。総人口に占める高齢化率(65歳以上の割合)は18%まで上昇するといわれ、これまで高齢化が進行してきた先進国だけでなく、開発途上地域においても高齢化が急速に進展する<sup>1)</sup>。高齢化率の上昇に伴い、医療費の増加が社会問題として深刻化している。例えば、我が国の国民医療費は約30兆円の規模であり、その中で高齢者にかかる老人医療費は約10兆円となっており、その割合は毎年増加している。このような状況において、個別化医療のようなより効率的な医療を実現することが医療費削減へとつながり、また同時に患者のQOLを向上させる方策として期待されている。これらの社会的背景・ニーズに基づきシスメックスグループでは、病気の予防のほか、早期発見、早期治療、治療方針の決定、予後の予測など、各ステージで患者一人一人に貢献できる診断技術の進化を図っている。その一環として、我々はリキッドバイオプシーを実現する検査・診断技術の開発を行ってきた。リキッドバイオプシーとは、主にかん領域で、腫瘍組織を採取する従来の生検(バイオプシー)に代えて、血液などの検体を使って診断や治療効果予測を行う技術である。リキッドバイオプシーを実現する手段の一つとして、抗原抗体反応を利用した免疫測定法の更なる高感度化が期待されている。免疫測定の世界規模は世界で約250億米ドルにのぼり、高感度な免疫測定を実現することは世界の医療産業や人々の健やかな暮らしに多大な恩恵をもたらす。免疫測定法は、ELISA(酵素免疫測定法)、FIA(蛍光免疫測定法)、CLEIA(化学発光・酵素免疫測定法)、IC(免疫クロマト法)などが代表的な方法であり、それぞれの測定原理を高感度化するために、検出材料(酵素・発光物質・コロイド粒子など)を改良することで発展を遂げてきた<sup>2)</sup>。一方で、免疫測定法の基幹材料である抗体分子を改良した高感度化はこれまで実現されていなかった。そこで我々はすべての免疫測定法に不可欠となる抗体分子の親和性を向上させることに着目した。

## 2. これまでの抗体親和性改変技術の課題

抗体分子はヒトではIgG、IgA、IgE、IgD、IgMの5種類のクラスが存在する。その中でも最も産業利用されているのはIgGである。IgGは4本のポリペプチド鎖から構成され、2本のH鎖と2本のL鎖がジスルフィド結合により共有結合して1分子を形成している(図1)。IgGは可変領域および定常領域からなり、Fv領域、Fab領域とFc領域に分けられる。さらにFab領域には6つの相補性決定領域(complementarity-determining regions; CDRs)が存在し、抗体分子はこのCDRで標的となる抗原分子を特異的に認識している<sup>3)</sup>。CDRには様々な抗原に結合できるように、アミノ酸配列に多様性が見られる。従って、従来技術では、抗体の親和性を向上するためにCDRと抗原分子上の抗体結合部位(エピトープ)の形状相補性を至適化することが主な戦略として選択されてきた。しかしながら、それら技術を診断薬として産業利用するには二つの問題があった。一つ目は、形状相補性を至適化するには、ファージディスプレイ法のような進化分子工学が常法であり<sup>4)</sup>、それには膨大な時間と工数が発生し、1分子の開発に高いコストを要するという問題があった。もう一つの問題は、従来技術によって得られた高親和性抗体を用いても、免疫測定試薬の飛躍的な感度向上は認められなかったという実用性である。形状相補性を至適化するという事は、相互作用界面の非共有

結合エネルギーを増加させることであり、そこで得られるエネルギーの多くは解離速度定数の低下に寄与する。抗体分子の結合の強さを表す親和性 ( $K_d$ 、単位：M) は、 $K_d = k_{off}/k_{on}$  で表され、 $k_{on}$  は結合速度定数(単位： $M \cdot s^{-1}$ )、 $k_{off}$  は解離速度定数(単位： $s^{-1}$ )である。ここで、短時間の抗原抗体反応において、 $k_{on}$ 、 $k_{off}$  という速度論的パラメータが感度にどう影響するかを示す。抗体 A に対し、親和性が10倍高い抗体 B 及び抗体 C があるとする。抗体 C は抗体 A に対し結合速度定数が10倍高く、一方、抗体 B は抗体 A に対し解離速度定数が10倍低い。このような速度論的パラメータを有する抗体 A、B、C が5分間で一定量の抗原に結合できる量を BIA simulation (GE Healthcare) ソフトウェアにより比較した結果を図2に示す。抗体 A に対し  $k_{off}$  が10倍低い抗体 B の結合量は、抗体 A の結合量と同様である。しかしながら、抗体 A に対し  $k_{on}$  が10倍高い抗体 C の結合量は、抗体 A の結合量より10倍以上高い値を示している。従って、診断薬のような数分間で抗原抗体反応を完了する系においては、 $k_{off}$  を改良するのではなく、 $k_{on}$  を向上させることが高感度化には重要である。そこで我々は上記問題を解決すべく、簡便かつ短期間で抗体の結合速度定数を向上させる抗体改変技術の開発を行った。

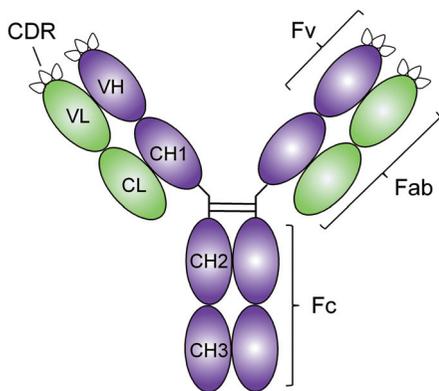
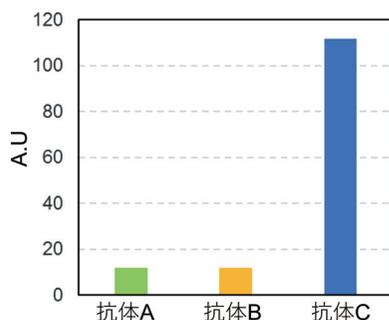


図1 IgG の模式図



	$k_{on}(M/s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	$K_d(M)$
抗体A	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^{-4}$	$1 \times 10^{-8}$
抗体B	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-9}$
抗体C	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^{-4}$	$1 \times 10^{-9}$

図2 速度定数と結合量の関係

### 3. 当社の抗体親和性改変技術について

#### 3.1 改変抗体分子の設計指針

抗体工学の分野において結合速度定数を向上させることは極めて難題であると考えられていた。従って、本課題を解決するためには斬新なアプローチが必要であると考え、筆者らは従来の親和性改変技術とは全く異なるコンセプトに基づく技術開発を行った。

生体分子の中でも、非常に高い結合速度定数で相互作用する Barnase 及び Barstar は、その相互作用に荷電アミノ酸を積極的に利用している<sup>5)</sup>。同様にして、抗体分子に荷電アミノ酸を複数導入することができれば、その結合速度定数を向上させることができるのではないかと考えた。しかしながら、荷電アミノ酸により形成される非共有結合のエネルギーは10～30kJ/molにも及び、人工的に導入した荷電アミノ酸と分子内のアミノ酸が塩橋を形成す

れば、抗体分子の立体構造が崩壊し得る。そのため、側鎖間で非共有結合のネットワークが形成されている CDR への荷電アミノ酸導入は、その親和性・特異性を失うリスクが非常に高いと想定された。そこで変異導入箇所としては、CDR ではなく、CDR を支えるフレームワーク領域 (FR) を選択することにした。さらに、フレームワーク領域の中でも、①側鎖が CDR の近傍に位置する、② Vernier zone (CDR ループ構造を支えるアミノ酸残基群<sup>6)</sup>) を除く、③側鎖が分子表面に露出しており、抗体分子内の側鎖と非共有結合を形成していない、という三つの基準を設け変異導入箇所を選定した (L 鎖 63、65、67、70、72)。図3に Fv の立体構造を示す。グリーンは重鎖の CDR を示し、ライトブルーは軽鎖の CDR を示す。また、マゼンタは軽鎖 FR3 に位置する変異導入箇所を示す。

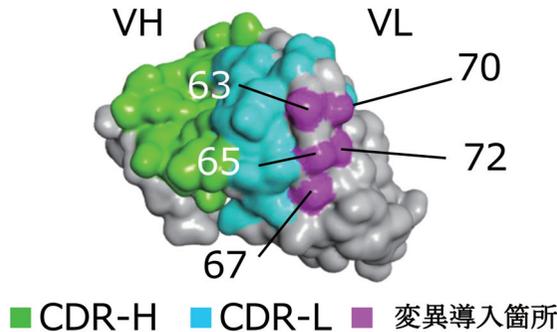


図3 Fv の立体構造と変異導入箇所  
(表示ソフトウェア : Discovery Studio ver.17.2 BIOVIA)

### 3.2 改変抗体分子の調製と親和性の解析

次に上述の設計指針に基づき抗体分子を作製し、実験を行った。親和性改変のモデル分子として、マウス由来の抗ニワトリリゾチーム抗体 (HyHEL10) を用いた<sup>7)</sup>。L 鎖、H 鎖をコードする遺伝子は人工合成遺伝子にて取得した。得られた L 鎖、H 鎖遺伝子をそれぞれ pcDNA3.4 TOPO expression system (Life technologies) に遺伝子工学技術により組みこんだ。また、変異導入には KOD -Plus- Mutagenesis Kit (TOYOBO) を用いた。変異は L 鎖 S63、S65、S67、S70、S72 (Kabat numbering) の 5 箇所をすべてアルギニン残基に置換した (R5 変異体)。野生型及び R5 変異体の VL アミノ酸配列を図4に示す。次に、得られた発現ベクターを用い Expi293 expression system (Life technologies) にて抗体分子の発現を行った。培養上清より Protein A resin (GE Healthcare) にて抗体分子を精製した後、Mouse IgG1 Fab and F(ab')<sub>2</sub> Preparation Kits (Pierce) を用いて抗体分子を Fab 断片に調製した。得られた Fab 断片は、Superdex 200 Increase 10/300GL (GE Healthcare) にて精製を行った。精製した Fab の親和性解析は BIAcoreT200 system を用いて実施した。ニワトリリゾチーム抗原 (SIGMA-ALDRICH) を CM5 センサーチップ (GE Healthcare) にアミンカップリングにより固定化し、ランニングバッファーには HBS-EP (10mM HEPES [pH 7.4], 150mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.005 % Surfactant P20) を用い、50µl/min の流速で測定した。得られたセンサグラムを図5に示す。センサグラムから BIA evaluation software version 2.0.2. (GE Healthcare) より、1:1 langmuir binding model にて解析した速度論的パラメータを表1に示す。また、野生型及び R5 変異体の各パラメータの比較を図6に示す。

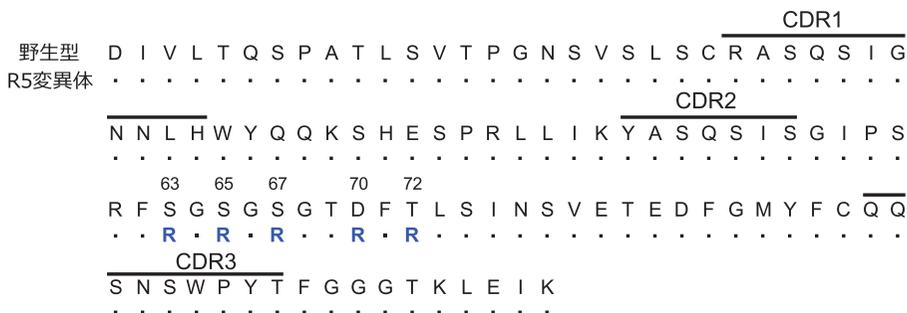


図4 野生型とR5変異体のVLアミノ酸配列

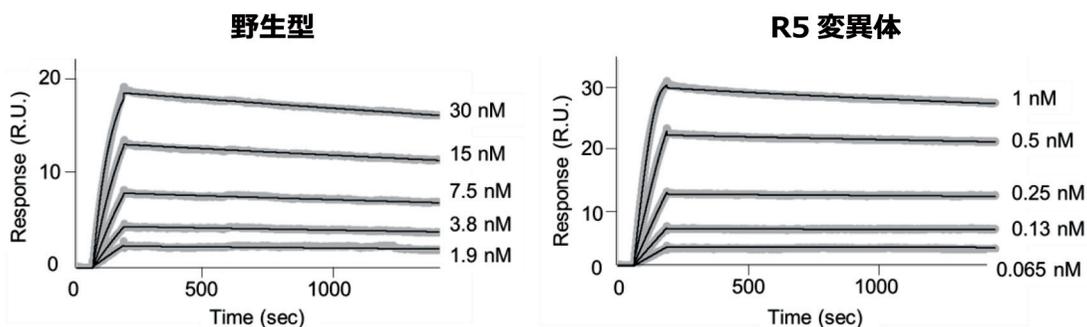


図5 野生型とR5変異体のセンサグラム (black: fitting curve)

表1 野生型とR5変異体の速度論的パラメータ

	$k_{on} (M^{-1} \cdot s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$	$K_d (M)$
野生型	$(4.9 \pm 0.01) \times 10^5$	$(1.1 \pm 0.01) \times 10^{-4}$	$2.3 \times 10^{-10}$
R5変異体	$(3.3 \pm 0.01) \times 10^7$	$(9.4 \pm 0.02) \times 10^{-5}$	$2.8 \times 10^{-12}$

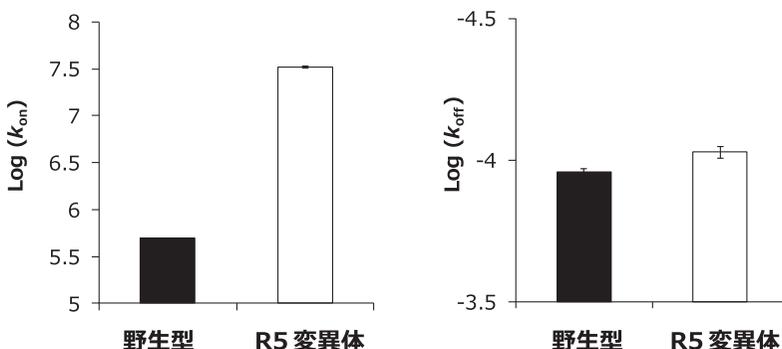


図6 野生型とR5変異体の速度定数の比較

野生型に対し、R5変異体において結合速度定数が飛躍的に向上した。一方で、解離速度定数には大きな変化が見られなかった。このように分子内にアルギニクラスタを導入することで高い結合速度定数を持つ抗体分子を得ることができた。次に本技術の汎用性を検証するために、異なる抗原に対する抗体を用い親和性改変を試みた。抗原には、Her2、TSH、インスリンを用いた。変異導入は同様にL鎖63、65、67、70、72番目をアルギニン残基に置換し、抗体の調製及び解析は上述と同様に行った。図7に示すように、すべての抗体で10倍以上の親和性向上がみられ、本技術の高い汎用性が確認された。

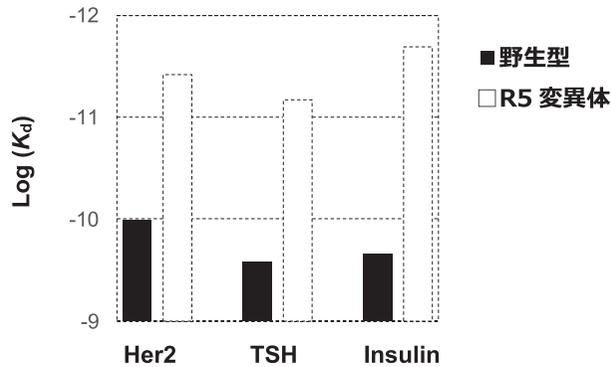


図7 様々な抗原における野生型とR5変異体の親和性比較

## 4. 免疫測定法の高感度化

### 4.1 ELISA(間接アッセイ)の高感度化

次に上述のようにして得られたR5変異体を用い、免疫測定の高感度化が可能となるか検証を行った。実験では、抗インスリン抗体(マウス由来)をモデル分子として用いた。抗原であるヒトインスリン(SIGMA-ALDRICH)をELISAプレートに固相化し、作製した抗インスリン抗体(野生型及びR5変異体)を1次抗体として10分間、室温にて反応させた。その後、ELISAプレートをPBSTにて洗浄後、HRP標識された抗マウス抗体-抗体を二次抗体として1時間反応させ、TMB基質を加え発色し、中心波長450nmの吸光度を測定した。得られた結果を図8に示す。野生型に対し、R5変異体を用いたELISAでは反応性が向上していることがいえる。また、ELISA法においては、1次抗体の反応時間は1時間程度設けるのが常法であるが<sup>8)</sup>、我々の開発したR5変異体は結合速度定数が高いことから、10分間の反応であっても十分な感度を得られている。このように改変された抗体を用いることで、免疫測定法の高感度化が可能となることが実証された。

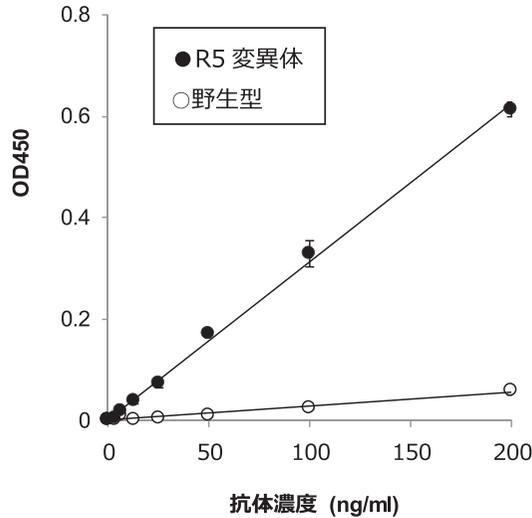


図8 野生型と R5 変異体の比較 (間接アッセイ)

## 5. 治療薬への応用

抗体医薬品は2000年以降、自己免疫疾患およびがん領域で開発・上市が急増し、現在では治療薬として欠かせないモダリティの一つとなっている<sup>9)</sup>。また、近年では免疫チェックポイント阻害剤、二重特異性抗体、抗体薬物複合体 (antibody-drug conjugate; ADC)、CAR-T 細胞など抗体分子の持つ特異性・親和性を利用した次世代治療薬の開発が活発化している。多くの分子が創製される中で、これまで抗体分子の速度論的パラメータとその薬効について記述された報告はほぼなかった。そのような状況において、津村ら<sup>10)</sup>は解離速度定数が低い抗体を ADC に用いることで、腫瘍組織内の分布が広がり抗腫瘍効果が高まることを報告した。その中で、彼らは治療薬としての抗体分子の選択及び設計に速度論的パラメータを考慮することの重要性を提案している。前述のように、本稿技術の革新性は抗体分子の結合速度定数を簡便に向上させられる点にある。我々は本技術を治療薬に適用することで、これまでにないメカニズムに基づく画期的な効果が得られると考えている。現在、次世代治療薬の実現に向け、国立がん研究センター、理化学研究所、株式会社凜研究所と連携し、AMED プログラムである「ACT-M」の支援を受けながら共同開発を推進している。これまで作製することが困難であった結合速度定数が高い抗体を用いることにより、最大薬効の向上、投与量の削減による副作用及びコストの低減、適用患者層の拡大などが期待できる。また、抗体医薬はターゲットの枯渇が問題とされているが、高親和性抗体を用いることで新たなターゲットバリデーションが進み、これまでとは異なる薬理活性に基づく新たな治療薬が創製される可能性も秘めている。

## 6. 結 言

従来とは全く異なるコンセプトによって、抗体の親和性を飛躍的に向上させる新たな技術

を開発した。本技術は簡便かつ効果的であり、さらには抗体の結合速度定数を向上させることができる極めてユニークな特徴を有する。本稿で示した抗体以外においても、既に25種以上の様々な抗原や動物種由来の抗体において親和性の向上に成功しており、その高い汎用性を確認している。現在、本技術を活用したこれまでにない診断薬及び治療薬の開発をオープンイノベーションにより推進している。我々は、本技術がヘルスケアの進化を担うものであると確信しており、世界の医療産業の発展及び個別化医療の実現に貢献していく所存である。

## 参考文献

- 1) UN, World Population Prospects : The 2017 Revision
- 2) 免疫測定法 基礎から先端まで 生物化学的測定研究会・編 (2014)
- 3) Kabat, E.A., Wu, T.T. and Bilofsky, H. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 4471-4473.
- 4) Ho, M., Kreitman, R.J., Onda, M. and Pastan, I. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 607-617.
- 5) Vijayakumar, M., Wong, K.-Y., Schreiber, G., Fersht, A.R., Szabo, A. and Zhou, H.-X. (2010) *J. Mol. Biol.*, **278**, 1015-1024.
- 6) Foote, J., & Winter, G. (1992) *J. Mol. Biol.* **224**, 487-499
- 7) Tsumoto, K., et al. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 18551-18557
- 8) タンパク質研究のための抗体実験マニュアル 4章 (2004) 羊土社
- 9) 2019年版 世界の抗体医薬品開発の方向性とビジネス展望 BBブリッジ
- 10) Tsumura R, Manabe S, Takashima H, Koga Y, Yasunaga M, Matsumura Y. (2018) *J Control Release.*, **284**, 49-56.