

バイオインターフェイス構築への蛋白質工学的展開

Protein Engineering for Construction of Bio-interfaces

熊谷 泉 (Kumagai Izumi)
東北大学・大学院工学研究科・教授



研究の概要

ヒト抗体遺伝子群は天然に存在する蛋白質の機能単位の膨大なライブラリーととらえることができる。本研究では、抗体医薬開発、ナノ材料への応用の著しい加速を可能にする技術基盤の構築を目的に、特に生体免疫系では特異的抗原性が発現し難い、細胞表面抗原、工学材料表面に焦点を絞り、特異的認識抗体分子の人工選択とその機能評価を進めた。結果、新たに取得した抗体の人工組換えや精密機能解析に基づき、医用への現実的な展開が期待できる複数の非天然型抗体分子の構築や、蛋白質間、あるいは蛋白質と工学材料間のバイオインターフェイスとして機能する抗体分子の構築に成功した。

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：抗体、蛋白質工学、医薬分子設計、生体機能材料、ナノバイオ材料

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム解析がほぼ完了し、研究の重点は医薬品や診断技術等への具体的応用を目指した蛋白質の構造・機能解析に移りつつある。特に網羅的解析の中から得られたゲノム情報と蛋白質の立体構造情報に基づいて、社会的要請に応じた機能性蛋白質分子の創製を目指した研究が重要な位置付けとなっている。このような中、標的分子に対して高い特異性・親和性を持つ蛋白質分子の網羅的な創製は、さまざまな分野での要請が極めて高い。抗体は、そのような中で最も理想的かつ現実的な蛋白質である。

2. 研究の目的

ヒト抗体遺伝子群は天然に存在する蛋白質の機能単位の膨大なライブラリーととらえることができる。本研究では、抗体医薬開発、ナノ材料への応用の著しい加速を可能にする技術基盤の構築を目的としている。特に生体免疫系では特異的抗原性が発現し難い、細胞表面抗原、工学材料表面に焦点を絞り、特異的認識抗体分子の人工選択とその機能評価を進め、細胞表面および材料表面に存在する認識場に関する知見に基づき、抗体の人工組換えによる、蛋白質や細胞間と工学材料間のバイオインターフェイスの人工設計の基盤構築を目指した。

3. 研究の方法

本研究では1、ヒト抗体分子の選択と調製、2、人工的分子形態の構築と利用、3、選択された抗体の高効率な調製系の構築の観点から開発を進め、1、ではさらに(1)ヒト細胞表面抗原、(2)工学材料、(3)得られた抗体の分子認識能の解析に、それぞれ焦点を絞り進めた。抗体ライブラリーの構築や、スクリーニング後の配列解析、発現ベクターの確認等にジュネティックアナライザを用いた。倒立電動リサーチ顕微鏡は、蛍光顕微鏡用冷却 CCD カメラを搭載させ、治療抗体と材料表面特異的抗体の両者の機能評価に、高速冷却遠心機と恒温振とう培養機は、組換え抗体の大量調製にそれぞれ用いて研究開発を推進させた。

4. 研究の主な成果

①ヒト抗体分子の選択と調製

(1)ヒト細胞表面抗原：生細胞パニング等を組み合わせた新規選択手法の確立などにより、DR5 に対する抗体の取得や CD16 特異的抗体のヒト型化とその最適化等、多くの成果を得た。EGFR 特異的ヒト型化抗体は結晶構造解析により得た情報も加えることで、数 10 倍親和性を向上させることに成功し、さらに、この抗体に基づく低分子二重特異性抗体 diabody は医薬化に向けても進展している。

[4. 研究の主な成果 (続き)]

(2)工学材料：新規選択システムの開発により、世界に類を見ない金表面特異的抗体を取得し、さらに無作為変異導入と高温下での選択により、安定性と発現量を向上させた。また機能性ペプチドの CDR 領域法に基づくハイスループットな新規抗体取得法も確立し、酸化亜鉛特異的抗体など、複数の材料特異的抗体の取得に成功した。

(3)得られた抗体の分子認識能の解析：結晶構造解析、速度論的解析、熱力学的解析等により、得られた抗体の精密機能解析を行った。変異体や CDR 置換体も逐次作製し評価を行うことで、ヒト型化により低下した親和性の回復に向けた知見や生分解性プラスチック(PHB)などの材料特異的抗体の親和性創出機構に関する考察を深めた。

②人工的分子形態の構築と利用

異なる機能を有する抗体ドメインを組換えることで、強力な治療効果を発揮する組換え抗体群を創製した(図 1)。バイオインターフェイス分子として、材料と生体分子を同時に認識する人工抗体群を構築し、例えば金表面とリゾチームを標的とした diabody は、基板上にマイクロパターンニングされた金スポットへのリゾチームの自発的な固定化能を示した(図 2)。

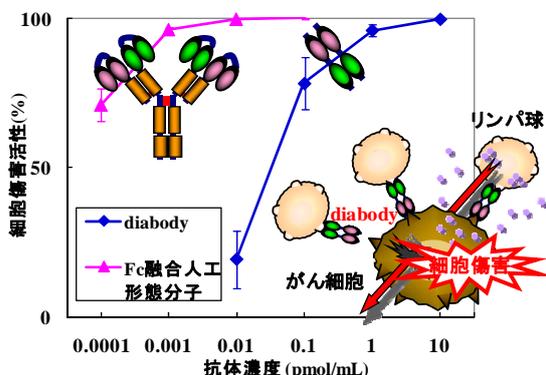


図1 がん治療を目的とするdiabodyとその高機能化

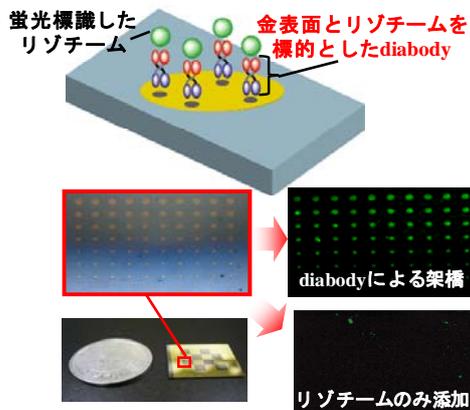


図2 diabodyによる金表面へのリゾチームの固定化

③選択された抗体の高効率な調製系の構築

高効率な調製系の構築を目指して従来の大腸菌発現系に加えて動物細胞、および昆虫細胞発現系の利用も進めた。動物細胞発現系に関しては遺伝子増幅による発現量の向上や一過性発現による迅速な調製の検討も行い人工抗体の用途、形態に応じた調製系を整備した。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

2008年に国外で初めて低分子二重特異性抗体の臨床治験が行われ、その顕著な効果が報告された。本研究課題で開発し、臨床への展開をみせている diabody は、極めて先駆的であり、世界の動向を鑑みても、研究水準は高いといえる。安価な大腸菌での製造を前提としている他、複数の効果的なバックアップ分子を確保している点でも優位性がある。

機能性ペプチドの CDR 移植による材料特異的抗体の取得法は、ラクダ由来のシングルドメイン抗体の利用と、ファージを用いた選択を行うことで、最適化された。取得が比較的容易なペプチドに、足場を与えることで、ペプチドでは発揮できない高親和性の生体分子を構築するプロセスは世界でも例がなく、学術的価値が高く、材料特異的生体分子の調製法として大きな波及効果が期待される。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者は二重下線、連携研究者は一重下線)

1) Makabe K., Nakanishi T., Tsumoto K., Tanaka Y., Kondo H., Umet su M., Sone Y., Asano R., Kumagai I., Thermodynamic consequences of mutations in Vernier zone residues of a humanized anti-human epidermal growth factor receptor (EGFR) murine antibody, 528, *J. Biol. Chem.*, **283**, 1156-1166 (2008)

2) Watanabe H., Nakanishi T., Umetsu M., Kumagai I., Human Anti-gold Antibodies: BIOFUNCTIONALIZATION OF GOLD NANOPARTICLES AND SURFACES WITH ANTI-GOLD ANTIBODIES., *J. Biol. Chem.*, **283**, 36031-36038 (2008)

3) Asano R., Watanabe Y., Kawaguchi H., Fukazawa H., Nakanishi T., Umetsu M., Hayashi H., Katayose Y., Unno M., Kudo T., Kumagai I., Highly effective recombinant format of a humanized IgG-like bispecific antibody for cancer immunotherapy with retargeting of lymphocytes to tumor cells, *J. Biol. Chem.*, **282**, 27659-27665 (2007)

ホームページ等

<http://www.che.tohoku.ac.jp/~kuma/>