

論文の内容の要旨

論文題目 無細胞 Fab ディスプレイ技術の開発とその応用

氏名 藤野 泰寛

序論

抗体医薬は高い開発成功率、顕著な薬効等の理由で近年その重要性が広く認識されている。蛋白質ディスプレイ技術は、既存の抗体医薬の開発において重要な役割を果たしてきた。蛋白質ディスプレイ技術で抗体の探索や最適化を行う場合、完全長抗体から抗原認識に関わる部分を取り出した single-chain Fv (scFv) または Fab といった分子フォーマットを利用する。scFv は分子量が 27kDa 程度と小さいため発現効率は高いが、熱力学的不安定性、多量体化傾向、IgG 変換時の活性変化等が問題となる。これに対し Fab は分子量が 50kDa 程度に達するため発現効率は低下するが、単量体で安定に存在し、IgG 変換時に活性が変化しないため研究効率が良い。

蛋白質ディスプレイ技術は細胞系と無細胞系に大別できる。ファージディスプレイに代表される細胞系は安定した運用が可能だが、細胞への遺伝子導入が律速となりライブラリ構築作業の負担が大きい。無細胞系の代表例として知られるリボゾームディスプレイは、ライブラリ DNA をベクターに連結して細胞へ導入する作業が必要ないため、簡便かつ迅速にライブラリを構築できる。しかし RNA を遺伝媒体とするため系が不安定で、scFv への応用例は報告されているものの、Fab を扱った報告はない。

抗体の親和性向上や親和性を維持しながら特異性や配列など他の性質を改変する試みは最適化の基本といえる。しかし、蛋白質間相互作用を支配する物理化学や蛋白質の構造・機能の変異耐性は非常に複雑であるため、X線結晶構造データと高性能な計算機システムを用いた計算科学的アプローチをもってしても 1000 倍以上の親和性向上を報告した例はない。一方、蛋白質ディスプレイ技術によるアプローチは過去に 1000 倍以上の親和性向上の報告があるものの、その成否はライブラリの設計やディスプレイ系の性能に依存し、多大な時間と労力を必要とするものであった。

本研究では、再構築型無細胞翻訳系 PURE system の採用により安定性を強化した pure ribosome display (PRD) を用いて Fab を選択する技術 (Fab-PRD) を開発した。さらに Fab-PRD の迅速なライブラリ構築の強みを活かした、独自の親和性向上技術 (Ymacs) の開発を試みた。

Fab-PRD の技術開発

Fab-PRD の動作確認に使用するモデル Fab として Her-2 に結合する Fab(以下 Fab-HH)と TNF α R に結合する Fab(以下 Fab-TT)を大腸菌分泌発現系で調製し、結合活性、特異性、L 鎖・H 鎖相互依存性を確認した。次に Bicistronic 型と Monocistronic 型の 2 種類の Fab-PRD 用鑄型 DNA を構築した。Bicistronic 型は 1 本の RNA 分子内に天然型 Fab を構成する L 鎖と H 鎖の 2 つの ORF を設置し、双方にリンカー配列を介してリボゾームストールを誘導する SecM 配列を連結した。Monocistronic 型は L 鎖と H 鎖を GS リンカーで接続した single-chain Fab (scFab)を単一の ORF として設置し、下流にリンカー配列を介して SecM 配列を連結した(図 1)。Bicistronic 型、Monocistronic 型それぞれの Fab-PRD 用鑄型 DNA から天然型 Fab および single-chain Fab (scFab)を合成し、ウエスタンブロットによる全長翻訳産物の確認、および ELISA による標的結合活性の確認を行った。

2 つのモデル Fab の鑄型 DNA を任意の比率で混合し、Fab-PRD による 1 ラウンドの選択実験を実施した。その結果、1 ラウンドあたりの濃縮倍率は Bicistronic 型で 90 倍程度、Monocistronic 型で 3500 倍程度と算出された(図 2)。これにより Monocistronic 型で、1 ラウンドの濃縮倍率の目標値であった 1×10^3 倍を達成した。また回収率を最大化するために、最初の RT-PCR による cDNA 回収領域を 6 つの相補性決定部位(CDR)を含むコア領域に限定し、次に前後の DNA 断片と PCR 連結することで全長化する方式を確立した。さらに SecM 配列のコピー数、リンカー領域の長さを検討し回収率の目標値であった 1×10^{-3} を達成した。また 1.2×10^{12} 分子の Fab-HH 中に Fab-TT を 4×10^2 分子スパイクし、ここから 1 ラウンドの Fab-PRD で Fab-TT の mRNA を回収することに成功した。

Ymacs の技術開発

抗体の親和性向上を目的としたライブラリ設計は、可変領域全体を対象としたランダム点変異の導入や、CDR に限定したアミノ酸配列のランダム化が主流といえる。これらのライブラリは容易に構築できるが、性能は必ずしも高くない。これに対し個々の親抗体ごとに CDR の有用変異を網羅的に同定し、これらを組み合わせてテーラーメイドライブラリを構築する手法は、効率的な親和性向上が期待できる反面、個々の変異体を生化学的手法で評価しながら有用変異を探索するという負担の大きい作業が別途必要になるため、報告例は非常に少なかった。有用変異を探索する別の方法として、蛋白質ディスプレイ系によるライブラリ濃縮過程で個々の変異体の濃縮速度を測定する方法がある。この手法は大規模な DNA 配列解析を必要とするが、次世代シーケンス技術の普及によりこの問題点が解消しつつある。

本研究では Fab-PRD の迅速なライブラリ構築能力と次世代シーケンス技術の高い配列解析能力を組合せることで、CDR の高速かつ網羅的な有用変異探索(変異スキャン)を実施し、得られた情報に基づいてテーラーメイドライブラリを構築し、その性能を評価した。

Fab-TT(KD=7nM)の 6 つの CDR を構成する全 50 ポジションを対象に、1 ポジションずつ天然アミノ酸 20 種類にランダム化する 1 アミノ酸置換ライブラリを構築した。合計 50 ポジション分のライブラリを L 鎖と H 鎖で別々にグループ化し、L 鎖および H 鎖の 1 アミノ酸置換マトリクスライブラリとした。TNF α R をベイトとした合計 3 ラウンドの Fab-PRD で 2 つの 1 アミノ酸置換マトリクスライブラリを平行して濃縮し、CDR1 から CDR3 にかけての DNA 配列を Roche454 次世代シーケンサーで解析した。理論的に考えられる合計 1000 種類の 1 アミノ酸置換体について濃縮比(選択後ライブラリ中の頻度/選択前ライブラリ中の

頻度)を算出し、濃縮比の高いアミノ酸置換を優先的に採用しながら組合せライブラリを構築した。

ペイトの TNF α R の濃度を徐々に下げながら、合計 5 ラウンドの Fab-PRD で組合せライブラリを濃縮した。scFab をコードする濃縮後のライブラリからインバース PCR クローニングで天然型 Fab 発現ベクターを構築し、大腸菌の培養上清に分泌した Fab を用いて個々のクローンを評価した(図3)。合計 92 クローンから 43 個の ELISA 陽性クローンを同定し、これらを表面プラスモン共鳴(SPR)で評価したところ、上位クローンは SPR での精密な親和性測定が困難なレベルにまで親和性が向上していることが明らかとなった(図4)。ここから 3 クローンを選抜し kinetic exclusion assay (KinExA)による親和性の精密測定を実施した結果、それぞれの Fab の KD は 18.2 pM(400 倍向上)、14.1 pM(516 倍向上)、3.45 pM(2110 倍向上)と算出された(図5)。43 個の ELISA 陽性クローンのアミノ酸配列は全て異なっており、KinExA 測定を実施した3つのクローンは5または7と非常に少ないアミノ酸置換数で高度な親和性向上を達成したことが明らかとなった(図6)。

結論

Fab-PRD の技術開発では、Monocistronic 型 Fab-PRD で 1 ラウンドの濃縮倍率 $\geq 10^3$ 倍以上、必要最低コピー数 $\leq 10^3$ 分子、の目標値を達成した。これらの数値は phage display に匹敵するパフォーマンスであり、Fab-PRD が高い実用性を持つと考えられる。また無細胞蛋白質ディスプレイ技術で Fab を扱った唯一の先行研究である emulsion DNA display は無細胞翻訳反応 50 μ l 当り 1.5×10^8 分子しか処理できないのに対し、Fab-PRD は無細胞翻訳反応 50 μ l 当り 3×10^{12} 分子という高密度反応で動作するため、より大規模なライブラリの運用が可能と考えられる。

Ymacs の技術開発では、Fab-PRD の迅速なライブラリ構築の強みと次世代シーケンス技術の高い解析能力を組み合わせた高速・網羅的な変異スキャンを試み、効率的に有用変異を同定することに成功した。変異スキャンで得られた情報を基に設計した組合せライブラリからは、100 に満たない最小限の数のクローン解析から高度に親和性が向上したクローンが多数同定されており、親和性向上用のライブラリとして非常に質が高いと考えられる。今回確認された KD 値による 2110 倍の親和性向上倍率は、人為的な親和性向上の研究において、調べた限り文献的に最も高い値と考えられる。非常に少ないアミノ酸置換数で高い親和性向上倍率を達成している点も、予想外の機能変化リスクを回避する上で重要と考えられる。また本研究で開発された親和性向上戦略は本来的にテララーラーメイド戦略であるため、他の抗原抗体結合や抗体以外の蛋白質間相互作用の親和性向上にも状況適応的に高い汎用性を示すと考えられる。

図 1

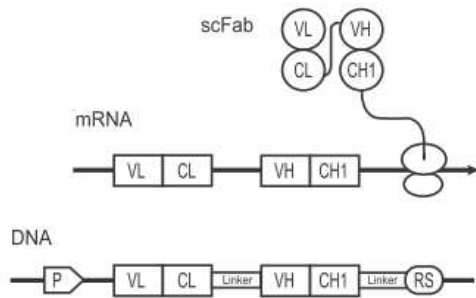


図 2

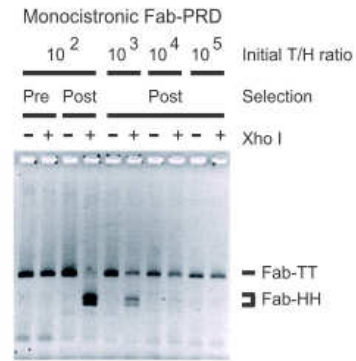


図 3

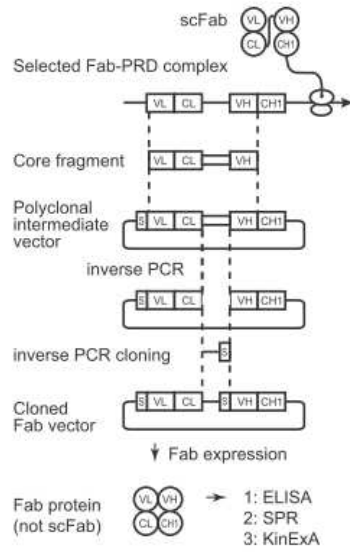


図 4

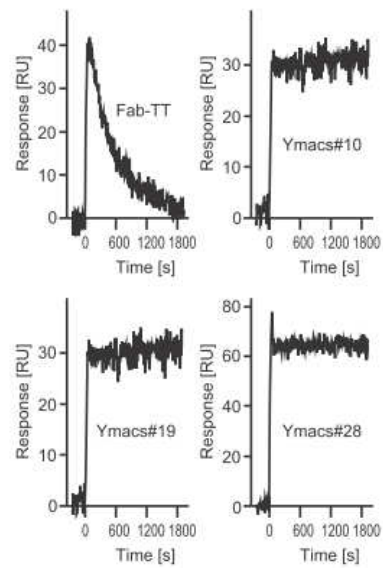


図 5

| Fab | Methods | K _d [M] | k _{on} [M ⁻¹ s ⁻¹] | k _{off} [s ⁻¹] | Relative K _d improvement |
|----------|---------|--------------------------|--|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Fab-TT | SPR | 7.28 × 10 ⁻⁹ | 3.14 × 10 ⁵ | 2.29 × 10 ⁻³ | |
| Ymacs#10 | KinExA | 1.82 × 10 ⁻¹¹ | 1.66 × 10 ⁶ | 3.02 × 10 ⁻⁵ | 400 |
| Ymacs#28 | KinExA | 1.41 × 10 ⁻¹¹ | 6.06 × 10 ⁶ | 8.55 × 10 ⁻⁵ | 516 |
| Ymacs#19 | KinExA | 3.45 × 10 ⁻¹² | 3.64 × 10 ⁶ | 1.26 × 10 ⁻⁵ | 2110 |

図 6

| | CDR-L1 | CDR-L2 | CDR-L3 | CDR-H1 | CDR-H2 | CDR-H3 |
|----------|---------------------|--------|--------|--------------------------|------------|--------|
| Fab-TT | DIKNYLSAGSNRQTYIYPI | | | TIERYAMGGTIYPWGDYTD | SNYPNGMYVM | |
| Ymacs-2 | -----XX-----XX--- | | | X-X---X---XX-X-----XX--- | | |
| Ymacs#10 | -----G-----SA--- | | | R-----LT--I----- | | |
| Ymacs#28 | -----A----- | | | -----A---FT--I----- | | |
| Ymacs#19 | -----AR--- | | | -----A---FT--V-----G--- | | |