

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：膜タンパク質の細胞外ドメインを結合標的とする機能性ヒト抗体の高効率作製と構造デザイン
Generation and structure-based design of functional human antibodies that bind to the extracellular domains of membrane proteins

研究開発実施期間：平成 30 年 5 月 1 日～令和 5 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：岩田 想
So Iwata

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
国立大学法人京都大学 大学院医学研究科 教授
Kyoto University, Graduate School of Medicine, Professor

II 研究開発の概要

(1) 創薬標的膜タンパク質の細胞外ドメイン (ECD) に結合する立体構造認識抗体の作製技術の高度化

これまでに代表者(岩田)と分担者(野村)は、膜タンパク質に対する立体構造認識抗体の探索において、柱となる技術はリポソーム ELISA であった。しかしながらリポソームに膜タンパク質を再構成した場合、その配向性を制御できないという弱点がある。そのためリポソーム ELISA では細胞外ドメイン・細胞内ドメイン両方に対する抗体が取得される。この弱点を補完するために、抗体医薬候補として有用な細胞外ドメイン認識抗体を高効率で取得するのに有効な手法、バキュロウイルス標的 ELISA 法 (BV-ELISA 法) を新たに確立した。開発技術の有用性の検証として、大腸がんの転移・悪性化進展に関与する膜タンパク質 A をモデル標的として ECD の立体構造を認識する抗体取得を実施した。まず、代表者(岩田)と分担者(野村)が保有する既存の抗体スクリーニング技術(リポソーム免疫、リポソーム ELISA、蛍光ゲル濾過分析等)を適用し、膜タンパク質 A に対する立体構造認識抗体(膜タンパク質の部分ペプチド配列ではなく、膜タンパク質の親水性表面の立体構造を特異的に認識し結合するモノクローナル抗体)を 5 株取得した。さらに、当該抗体が膜タンパク質の細胞外ドメイン/細胞外ドメインのいずれに結合しているかを識別する BV-ELISA 法を用いて、少なくとも 3 株が細胞外ドメインの立体構造に結合することを明らかにした。

さらに分担者(香月)らと協力して、完全ヒト抗体産生染色体改変マウスを用いて、創薬標的膜タンパク質の細胞外ドメインの立体構造を結合標的とするヒト抗体(ヒトに投与した場合に低免疫原性であるというメリットがあり、抗体医薬開発に直結するシーズを発見できる可能性が高い)を作製する技術も確立した。

(2) 膜タンパク質の ECD の立体構造を認識する機能性抗体取得の実施例

1) 大腸がん細胞の転移・悪性化進展に関与するヒト膜タンパク質 A に対する ECD 立体構造認識抗体

大腸がん発生過程では、遺伝子変異の蓄積により段階的に悪性化進展する「多段階発がん」の概念が確立している。分担者(大島)のグループのこれまでの研究では、大腸がん悪性化に関与するドライバー遺伝子の中から異なるパスウェイの制御に関わる 4 種類 Apc、Kras、Tgfr2、Trp53 (A、K、T、P と略す) に異なる組み合わせで変異を導入したヒト大腸がん組織由来オルガノイド細胞を作製し、それらの細胞塊をそれぞれマウス脾臓に移植して肝転移を観察すると AKTP の四重変異によって高い転移能が獲得されることが明らかになっている。また、形成した肝転移巣から細胞試料を採取して網羅的遺伝子発現解析を行い、AKTP 細胞に特異的に発現誘導する遺伝子群を絞り込んだ結果から、膜タンパク質 A は転移・悪性化進展に関わる因子の候補であることがわかっている。本研究では、膜タンパク質 A が大腸がんの転移・悪性化進展においてどのような役割をもつかを明らかにするため、CRISPR-Cas ゲノム編集技術により膜タンパク質 A 遺伝子をノックアウトした AKTP オルガノイド細胞を用いて前記の生体がん移植・転移実験を行った。その結果、肝転移は認められるものの頻度がきわめて低く、その後の増殖(生着)が脆弱であった。さらに膜タンパク質 A を強制発現した AKTP 細胞では転移能が上昇することを確認した。

がん微小環境における膜タンパク質 A 機能を解析するためのツールとして、ヒト膜タンパク質 A の ECD の立体構造を認識する複数株のモノクローナル抗体を作製した。これらの抗体投与の有無が前記の生体がん移植・転移実験に及ぼす影響を調べた結果、YN5848 株抗体 IgG を投与した実験区ではがん転移が顕著に促進されていることが認められた。肝臓腫瘍病変から転移巣を採取し組織解析を行なった結果、著しい線維化が観察された。またこれらの抗体クローン投与では肝臓全体に占める転移巣面積の相対比の割合が有意に大きかったため、これらの抗体は大腸がん転移を促進する機能性抗体であると結論した。さらに、*in vitro* での AKTP がんオルガノイド細胞の増殖実験において、当該抗体を投与して培養したときのみ細胞に遊走性仮足状の突起構造が有意に高頻度で出現することが確認された。内在性の増殖因子でも低頻度で細胞の形態変化が現れることはあるが、人工的な抗体の投与によってこのような細胞骨格の制御を伴う浸潤性形態変化が高効率で人為誘導された例は他に報告がなく、当該抗体は大腸がん転移・悪性化のメカニズムの解明において貴重なツールとなる可能性が高い。

2) B 型肝炎ウイルス感染受容体 NTCP に対する ECD 立体構造認識抗体

全世界で B 型肝炎ウイルス (HBV) キャリアは約 2.9 億人、HBV 感染を原因とした肝硬変・肝がんの発症による死亡数は年間 90 万人と推定されている。HBV の病原体としての発見は半世紀以上に遡るが、感染の分子機構の理解は未だ断片的である。HBV 感染成立には、エンベロープタンパク質 LHB s (large hepatitis B virus surface antigen) と、ヒト肝細胞の侵入受容体であるナトリウム・タウロコール酸共輸送体 (NTCP) との高親和性の結合が必須である。ウイルス学的解析から、LHBs の N 末端の脂質修飾 (N-ミリストイル化) とそれに続く N 末端側 47 残基のペプチド部分 (myr-preS1) が NTCP との結合において重要であることが知られている。また、NTCP 遺伝子領域を対象としたゲノム疫学解析から、S267F 変異の SNPs を両アレルに持つ個体は HBV 感染に対して抵抗性となる。これらは、NTCP が HBV 感染制御の面の魅力的な創薬ターゲットであることを示唆しており、その立体構造解明が長年待望されていた。

このような背景のもと、今年度の本研究ではクライオ電子顕微鏡を用いて NTCP の精密立体構造解明に

世界で初めて成功した。この構造決定には、本研究の開発技術をもちいて作製した NTCP の細胞外ドメイン認識抗体を用いることが不可欠であった。NTCP は肝細胞基底膜を貫通する 9 本のヘリックス束からなり、これらが 2 つのドメインに分かれていることが明らかになった。一つは 6 本の膜貫通ヘリックスで構成されるコアドメインで、残りの 3 本の膜貫通ヘリックスは、パネルドメイン（平らな板のような形をしているドメイン）を構成する。コアとパネルの相対位置が反対方向に約 5Å シフトしている細胞外側に開いた状態のコンフォメーションのスナップショットが得られた。二つのドメイン間にトンネルのような空間があり、基質（胆汁酸）の輸送経路であると考えられた。基質結合部位の近くのコアドメイン内に、二つのナトリウムイオン結合部位があり、いわゆる「エレベータ機構」によって細胞外側および細胞内側から交互に NTCP 内部の基質・ナトリウムイオン結合部位へのアクセスが可能な状態が生み出され、共輸送が実現されるものと想定された。また、ウイルスとの高親和性結合に重要な NTCP の残基の配置を立体構造上でマッピングし、感染制御・抗ウイルス薬開発に向けての基盤を築いた。成果は 2 報の Nature 論文として発表した。(Asami et al., Nature, 2022; Park et al., Nature, 2022)。

構造解析に用いた細胞外ドメイン認識抗体の中に、myr-preS1 の結合阻害活性 (IC50 値は 1 μM 以下) を有するクローンがあることを明らかにした。さらに、NTCP と preS1 ドメインの相互作用様式もクライオ電子顕微鏡単粒子解析により高分解能で解像した (論文投稿中)。現在、myr-preS1 結合阻害活性を有する機能性抗体のエピトープが、NTCP-preS1 相互作用部位とどのようにオーバーラップしているかを検証している。今後、HBV 中和抗体として機能する抗体はどのようなエピトープ認識が必要かという問題をさらに探究していく。本研究で取得した機能性抗体の結合様式は、HBV 感染阻害薬の開発において重要な指針となる可能性が高い。

(1) Technological advancement in producing antibodies that bind to conformational epitopes in the extracellular domain (ECD) of drug target membrane proteins

So far, our group have used liposome ELISA as a key technology in the search for antibodies against conformational epitopes in membrane proteins. However, in reconstitution of membrane proteins in liposomes, their orientation cannot be controlled. Therefore, in liposome ELISA, antibodies to both extracellular and intracellular domains are obtained. To complement this weakness, we have established a new method, baculovirus-targeted ELISA (BV-ELISA), in which antibodies that specifically recognize ECD of membrane proteins. Furthermore, we have established human antibody-producing trans-chromosomal mice (TC-mAb mice) that stably maintain a mouse-derived, engineered chromosome containing the entire human Ig heavy and kappa chain loci in a mouse Ig-knockout background. The TC-mAb mice offer a valuable platform for obtaining fully human therapeutic antibodies.

(2) Examples of generating functional antibodies that recognize conformational epitopes of ECD in therapeutic target membrane proteins

1) Antibodies against human membrane protein A, which is involved in metastasis and malignant transformation of colon cancer cells

Membrane protein A is known to be a candidate factor involved in metastasis and malignant transformation progression. To investigate function of the membrane protein A in the cancer microenvironment, we generated several strains of monoclonal antibodies against the membrane protein A that recognize the conformational epitopes in its ECD. The effects of the administration of these antibodies on in vivo cancer transplantation and metastasis experiments were examined, and it was observed that cancer metastasis was significantly increased when the YN5848 strain antibody IgG was administered. The results of histological analysis of metastases collected from liver tumor lesions showed marked fibrosis. The relative ratio of metastatic area to the total liver area was significantly greater after treatment with the antibody, leading to the conclusion that these antibodies are functional antibodies that promote colorectal cancer metastasis. Furthermore, in vitro growth experiments of cancer organoid cells showed that migratory pseudopodia-like projection structures appeared significantly more frequently in the cells only when they were cultured with the antibodies. Although endogenous growth factors also induce morphological changes in cells at low frequencies, there is no other report of highly efficient artificial induction of invasive morphological changes involving cytoskeletal regulation by the administration of artificial antibodies. The antibody is likely to be a valuable tool in elucidating the mechanisms of colorectal cancer metastasis and malignant transformation.

2) Antibodies against the hepatitis B virus infection receptor NTCP

Around 250 million people are infected with hepatitis B virus (HBV) worldwide, and 15 million may also carry the satellite virus hepatitis D virus (HDV), which confers even greater risk of severe liver disease. The HBV receptor has been identified as sodium taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP), which interacts directly with the first 48 amino acid residues of the N-myristoylated N-terminal preS1 domain of the viral large protein. Despite the pressing need for therapeutic agents to counter HBV, the structure of NTCP remains unsolved. The use of antibodies in cryo-electron microscopy (cryo-EM) as fiducial markers is especially efficient in structure

determination of smaller membrane proteins (< 50kDa). We have generated antibodies that recognize conformational epitopes in ECD of NTCP and solve the structure by antibody-aided cryo-EM. Comparison of our structure with those of related proteins indicates a common mechanism of bile acid transport, but the NTCP structure displays an additional pocket formed by residues that are known to interact with preS1, presenting new opportunities for structure-based drug design (Asami et al., Nature, 2022; Park et al., Nature, 2022).