鏡像抗体様分子の創製基盤の確立と医薬応用

京都薬科大学　創薬科学系　薬品化学分野
大石　真也

抗体やサイトカインをはじめとするタンパク質製剤を医薬として利用するとき、これらの薬剤に対する抗体が患者の血中に出現することが知られている。これらは抗薬物抗体や中和抗体と呼ばれ、タンパク質製剤の治療薬としての効果を低減し、特に長期間投与を必要とする場合において期待された薬効が徐々に得られなくなるなどの問題を引き起こす。また、抗薬物抗体が想定外の標的分子に作用すると、予期しない有害事象を引き起こし、患者は当初の疾患への治療効果が得られたとしても、抗薬物抗体が引き起こした新たな症状に対する治療に向き合う必要が生じる。実際、ニボルマブの投与を受けた患者の約13%に抗薬物抗体が検出されることが報告されており（*J. Clin. Pharmacol.* **2017**, *57*, 394）、他の抗体では数十%にのぼる抗薬物抗体の出現が認められるものもある（*J. Immunother. Cancer*, **2019**, *7*, 105）。同様に、臨床試験において治験薬を投与した患者に抗薬物抗体や中和抗体が出現すると、有効性の適切な判断が困難となったり、想定外の重篤な副作用により臨床研究の継続自体が困難となるリスクがある。多額の経済的負担を必要とするタンパク質製剤による治療や臨床試験の成功確率を向上させるためには、抗薬物抗体や中和抗体の出現に伴う治療効果の減弱や有害事象の発生リスクを限りなく最小化することが望ましい。こうした背景のもと、我々は、安全性が高く持続的な薬効が期待できるタンパク質製剤の新しいモダリティの開発に向けた研究に取り組んでいる。

すべての配列がD-アミノ酸からなるペプチドやタンパク質（鏡像型ペプチド・鏡像型タンパク質）は、L-アミノ酸からなる一般的なペプチド・タンパク質と比較して、ペプチダーゼの基質になりにくく、生体内での安定性が高いことが知られている（*Proteins* **1993**, *16*, 306）。同様の理由により、鏡像型タンパク質は、免疫細胞中でのペプチダーゼによる分解が起こりにくく、抗原提示細胞上の主要組織適合遺伝子複合体上に提示されにくいため、抗薬物抗体や中和抗体の出現頻度の低減が期待できる。我々は、医薬シーズの新しいモダリティとして注目されている抗体様分子の鏡像型タンパク質が、標的分子に対する高い結合親和性と低い免疫原性の両方を兼ね備えた新規創薬モダリティとして有用であると考えた。本研究では、抗原への高い結合親和性を示す最小のドメイン構造として知られるVHH抗体に着目し、この鏡像型タンパク質（D-VHH抗体）の化学合成法を確立するとともに、免疫調節剤として利用可能なケモカイン機能調節剤の探索プロセスの確立を目指した研究を実施した（図１）。

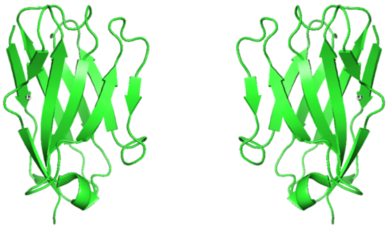

図１：VHH 抗体とその鏡像型タンパク質

［１］鏡像抗体様分子の化学合成法の確立と機能評価

VHH 抗体は、ラクダ科の動物に由来する重鎖抗体の可変領域部分からなる単一ドメイン抗体である。我々は、鏡像 VHH 抗体（D-VHH 抗体）の創薬研究への応用を目指して、配列が知られている抗 GFP-VHH 抗体の化学合成プロセスの確立に向けた検討を行った（図２）。まず、C 末端に His タグを配置した 122 残基からなる全長配列を 4 つのペプチドセグメントに分割し、各セグメントを Fmoc 固相合成法により合成した。続いて、NCL によるペプチドセグメントの連結を行った。まず、2 つの中間セグメントを NCL により連結した後、脱硫反応と Acm 保護基の脱保護処理を行った。これにより得られたセグメントに対して、N 末端セグメント、C 末端セグメントの順に NCL 反応を行い、抗 GFP-VHH 抗体の全長を取得した。ファージディスプレイによりランダム化する可変配列は最終工程で導入する C 末端セグメントに含まれていることから、本法は鏡像スクリーニングにより得られる多様な VHH 抗体の化学合成にも応用可能である。引き続き、化学合成により得られたペプチド鎖を適切なフォールディング条件に付すことにより、GFP への結合親和性を示す抗 GFP-VHH 抗体を取得した。同様のプロセスにより、抗 GFP-VHH 抗体の鏡像型タンパク質（D-抗 GFP-VHH 抗体）を化学合成した。

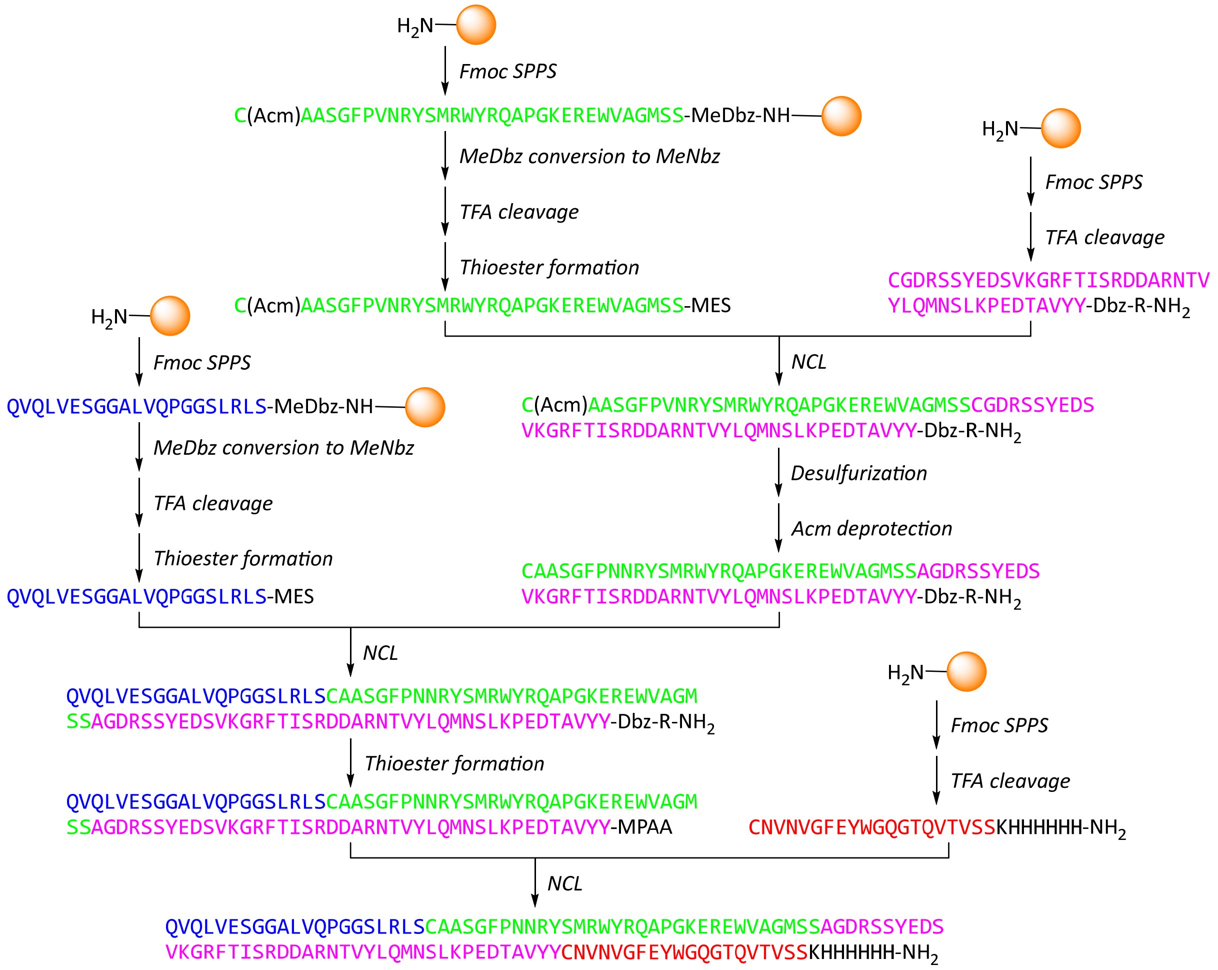

図２：抗 GFP-VHH 抗体の化学合成プロセス

化学合成した L-抗 GFP-VHH 抗体と D-抗 GFP-VHH 抗体の免疫原性を評価した。L-抗 GFP-VHH 抗体もしくは D-抗 GFP-VHH 抗体のいずれかをアジュバント存在下でマウスに免疫し、初回の免疫後 28 日目にマウスから採取した血清に含まれる抗薬物抗体の産生量を定量した。L-抗 GFP VHH 抗体投与群からは抗薬物抗体の存在が確認された一方で、D-抗 GFP VHH 投与群からは抗薬物抗体が検出されなかった。以上のことから、鏡像 VHH 抗体の投与では抗薬物抗体の生成の抑制が期待できることが示唆された。

［２］ケモカイン MCP-1/CCL2 機能阻害剤の探索に向けた鏡像スクリーニング系の構築

Monocyte chemoattractant protein 1（MCP-1/CCL2）は、炎症反応や組織の線維化に関与することが報告されているケモカインであり、この機能阻害剤は全身性強皮症や糖尿病性腎症などの重篤な疾患に対する治療薬としての応用が期待されている。MCP-1 に結合してその機能を阻害する鏡像 VHH 抗体の探索に向けて、鏡像スクリーニングに利用可能な鏡像 MCP-1 の化学合成と機能評価を行った。

76 残基からなる MCP-1 の化学合成は、文献情報の手法（*Pep. Sci.* **2010**, *94*, 350）をもとに改良を加え、2 つのペプチドセグメントの NCL により行った（図３）。N 末端セグメントのペプチド鎖は、NovaSynTGR 樹脂に導入した MeDbz リンカー上で Fmoc 固相合成法により構築した。続いて、MeDbz 部位を *p*-nitrophenyl chloroformate で処理することにより MeDbz 基へと変換後、樹脂からの切り出しと側鎖の脱保護を行うことで N 末端セグメントを取得した。C 末端セグメントは、Wang 樹脂上での通常の Fmoc 固相合成法により取得した。引き続き、N 末端セグメントと C 末端セグメントを NCL に付すことで MCP-1（還元型）を取得した。最後に pH を調整した緩衝液中での空気酸化条件でジスルフィド結合の形成を行い、活性型 MCP-1（L-MCP-1）を取得した。活性型 MCP-1 の鏡像型タンパク質（D-MCP-1）も同様のプロセスにより化学合成した。また、各種生物活性評価などに用いる His タグやビオチン標識を施した修飾 MCP-1（及びその鏡像型タンパク質）も化学合成した。

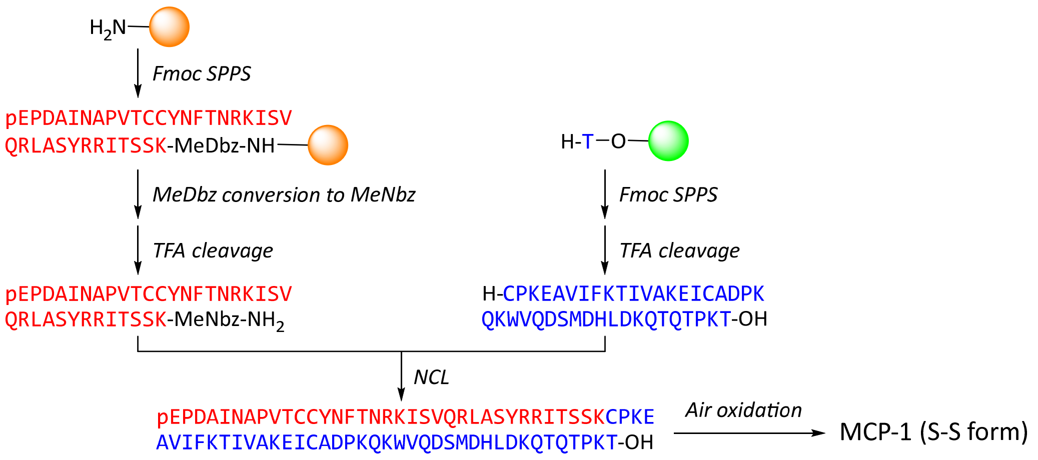

図３：MCP-1 の化学合成プロセス

化学合成により取得した L-MCP-1 の CD スペクトルは、報告されている組換え体の CD スペクトルと良い一致を示した。また、L-MCP-1 及び D-MCP-1 の CD スペクトル解析を測定したところ、両者は対称型のスペクトルを示した。続いて、D-MCP-1 の生物活性をマダニの唾液由来のタンパク質 evasin の鏡像型タンパク質への結合親和性を表面プラズモン共鳴解析により評価した。化学合成により取得した Evasin P991 の鏡像型タンパク質（D-Evasin P991）をセンサーチップ上に固定化し、ここに L-MCP-1 もしくは D-MCP-1 を添加したところ、D-MCP-1 のみにおいて D-Evasin P991 との結合が認められた。これらのことから、D-MCP-1 は内因性の MCP-1 の鏡像構造をとるとともに立体選択的な分子認識を示すことが示唆された。

現在までに、上述のプロセスで取得した D-MCP-1 を利用してファージディスプレイなどによる鏡像スクリーニングを実施し、これに結合活性を示す VHH 抗体の配列情報を取得した。また、この配列情報をもとに D-VHH 抗体の化学合成を進めており、引き続き L-MCP-1 への結合親和性の確認に向けた検討を行う予定である。