

L1211-1	電荷ペプチドタグ付き抗 EGFR-VHH 抗体の物性・相互作用解析と					
	<i>in vitro</i> での機能評価					
	氏名	嶋武 優香子	主査	黒田	副査	野口・平田・Vavricka

[背景・目的] VHH 抗体はラクダ由来重鎖一本鎖抗体の可変領域部分のみからなるシングルドメイン抗体である。全長モノクローナル抗体(mAb)と比較して分子量が小さいため、発現が容易であることや細胞への浸潤性が高いことなどがメリットとして挙げられ、創薬分野での応用が期待されている。当研究室ではがん細胞表面に多量発現する EGFR に結合する VHH-7D12 を研究対象としている。我々はがん細胞表面が負電荷を帯びていることに着目し、VHH-7D12 に付加した電荷タグとの静電的相互作用によって親和性が向上するのではないかという仮説をもった。一連の実験から、電荷タグの付加が親和性制御に関係しているか、またそれが抗体の機能に効果をもたらすか調べることを目的とする。

[手法] 7D12 野生型(7D12-WT)、C 末端に 5 価または 9 価の正電荷ペプチドタグを付加した変異体(7D12-C5K, C9K, GSlinker-C5K, C5R, C9R)と負電荷ペプチドタグを付加した変異体(7D12-C5D, C9D)の計 8 種を発現・精製した。円偏光二色性(CD)測定、熱安定性(T_m)測定、トリプトファン蛍光測定、動的光散乱(DLS)測定によって野生型と各変異体の物性評価を行った。また、表面プラズモン共鳴(SPR)測定によって EGFR 細胞外ドメインとの相互作用解析を行った。さらに *in vitro* 試験として EGFR を過剰発現する A431 細胞株を用いて MTT による細胞増殖アッセイを行った。野生型と C5R, C9R, C9D について Alexa fluor® 488 での蛍光色素標識を行い、フローサイトメトリーで蛍光を検出することで細胞に対する抗体の結合量を比較した。

[結果・考察] 各種の物性測定を行い、いずれの電荷タグを付加した変異体も野生型と比較して大きな変化はみられなかった。SPR 測定では C9K, C9R で野生型と比較して結合能の増強がみられた(fig.1)。細胞非存在下でこの結果を得たことから、仮説で想定していた細胞表面よりむしろ EGFR 細胞外ドメインの表面電荷が静電的相互作用に関係していることが示唆された。細胞増殖アッセイでは、C9K, C9R について野生型と比較して 3 倍の細胞増殖抑制作用がみられた(Fig.2)。蛍光検出アッセイでは正電荷タグの付加による抗体結合量の増加は確認されなかった。実は、以上の実験結果および実験条件の詳細を考慮すると、タグによる結合親和性の増強が細胞増殖抑制作用の向上の要因であるとする考えにはギャップがある。正電荷を含むペプチドは細胞のリン脂質と相互作用し、細胞内輸送を促進する作用を持つことが知られている。このことから、EGFR に結合した正電荷タグを付加した抗体が EGFR の内部化を誘導し、それによって細胞増殖抑制が促進された可能性も考えられる。

[結論] 9 価の正電荷タグ(C9K, C9R)を付加した 7D12 は、EGFR 細胞外ドメインの表面電荷との静電的相互作用による結合能増強が示唆された。さらに興味深いことにこの 2 つの変異体は野生型よりも高い細胞増殖抑制作用がみられた。増殖抑制作用のメカニズムについては抗体の内部化などの別の要因が関係している可能性も考えられることから、今後、蛍光標識などで抗体の内部化に関して観察する実験などを通して更なる検証を行いたい。

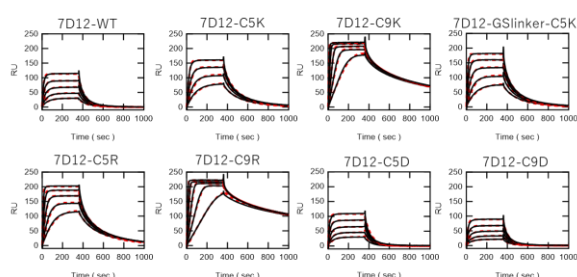


Fig.1 SPR 測定

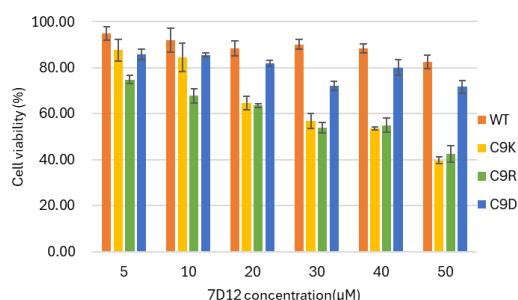


Fig.2 MTT による細胞増殖アッセイ