

スーパーチャージ抗体修飾ナノ粒子の分散安定性の解析

笠原 慶亮¹, 土屋 裕輝²

¹工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻 津本研究室

²工学系研究科 化学システム工学専攻 太田研究室

著者紹介

笠原 慶亮：専門は計算デザインを取り入れた抗体エンジニアリングと蛋白質の物性解析に関する研究。本研究計画の考案を主導し、抗体デザインと発現・精製を担当した。
土屋 裕輝：専門はナノ粒子の合成および表面修飾と粒子の品質評価に関する研究。本研究では、ナノ粒子への抗体修飾と粒子の物性評価を担当した。

1. 研究背景

ナノ粒子は、イメージングや薬物送達などの医療応用において注目を集める。医療応用におけるナノ粒子の物性向上や機能付加のためには表面修飾が必要であり、(具体的には) 標的生体分子に特異的に結合できる抗体修飾や、表面電荷や親水性を制御するための PEG 修飾が行われる。また、ナノ粒子の粒子径によって生体との相互作用が変化するため、その最適化も重要である。ナノ粒子の合成や表面修飾の過程で生じる凝集は、粒子径を変化させるのみならず表面修飾分子の機能が阻害される可能性があり、機能の低下や結果の誤認に繋がる。そのため、医療応用を指向したナノ粒子の凝集の適切な評価と制御が求められる。

これまで、一見分散して見える粒子に含まれる二量体や三量体のような僅かな凝集は、動的光散乱 (DLS) などの既往の凝集評価手法では適切に評価することが困難であった。そこで我々は、遠心 Field-Flow Fractionation (FFF) と呼ばれる分級装置を用いた、僅かな凝集の評価系を開発した [1]。遠心 FFF はサンプルを質量基準で分級し検出することが可能であり、表面修飾分子の影響を受けずに僅かな凝集を検出することが可能である。この遠心 FFF を用いることで、一般的な手法で作製した抗体修飾ナノ粒子において僅かな凝集が生じ、下流のバイオアッセイへ影響を与えることを明らかにした。しかしながら、僅かな凝集の発生メカニズムの解明には至っていない。

抗体修飾ナノ粒子の僅かな凝集の発生メカニズム解明のためには、抗体同士やナノ粒子-抗体間の相互作用の考慮が必要と考えられる。そこで我々は、抗体の表面電荷に着目した。これまで、蛋白質表面への荷電アミノ酸残基変異導入デザイン手法スーパーチャージによる、抗体を含む蛋白質の物性・機能変化が報告されている [2, 3]。我々も既に、抗原結合フラグメント (Fab) 抗体をモデルとして、Rosetta 計算を用いた可変領域

へのスーパーチャージを行い、構造を維持しながら表面電荷改変を行うことに成功している [4, 5]。抗体の表面電荷改変によって、抗体間の分子間反発をより強くすることに加え、負に帯電しているナノ粒子に対して修飾効率を向上させることや、その配向を制御することが可能になると考えられる。

2. 研究目的

抗体エンジニアリングによって抗体修飾ナノ粒子の凝集発生メカニズム解明及び制御を目指す。サイズや表面電荷の異なる抗体を発現精製し、それらの抗体を修飾したナノ粒子の凝集評価を行う。その結果を踏まえて医療応用に適したナノ粒子を修飾するための抗体設計指針を検討する。

3. 結果及び考察

3.1. 抗体の作製

モデル抗体として抗 EGFR 抗体 cetuximab を選択し、サイズの比較のため全長抗体である IgG 抗体と抗原結合フラグメント (Fab) 抗体を使用することとした。また、Fab 抗体において抗原結合部位とは反対側の定常領域部分を正電荷に帯電させるため、Rosetta [4]を用いたスーパーチャージデザインを行なった (Fig. I)。C_{H1}/C_Lドメインへの Lysine または Arginine 残基変異導入によって、野生型 (wt) に対して実効電荷を 12 増やす正電荷変異体 (c+12) の配列を得た。

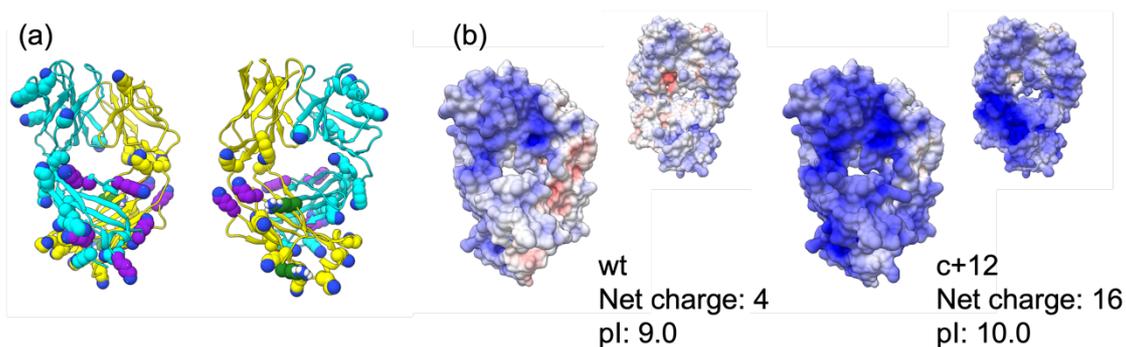


Fig. I. cetuximab Fab c+12 のスーパーチャージデザイン.

(a) cetuximab Fab c+12 のモデル構造. PDB: 1YY8 を元に MODELLER [6]によって作製した. シアンは重鎖, 黄は軽鎖. 全ての Lys 残基と変異導入した Arg 残基を球で表した. 紫は Lys 変異, 緑は Arg 変異, それ以外は wt の Lys 残基. (b) cetuximab Fab wt と c+12 の表面電荷. pH7 のときの静電ポテンシャルを PDB2PQR [7], APBS [8]によって計算し, UCSF Chimera [9]で色付けした. 青は正電荷, 赤は負電荷を表す.

pcDNA3.4 ベクターに cetuximab 全長重鎖、Fab ドメイン重鎖 wt/c+12、軽鎖 wt/c+12 の遺伝子を組み込んだ (Fig. IIa)。Expi293 Expression system を用いて、cetuximab IgG (wt), Fab (wt, c+12) を発現させた。IgG は Protein A、Fab は Ni-NTA Agarose を用いて粗精製し、それぞれサイズ排除クロマトグラフィーによって最終精製した (Fig. IIb)。SDS-PAGE によって純度を確認した (Fig. IIc)。

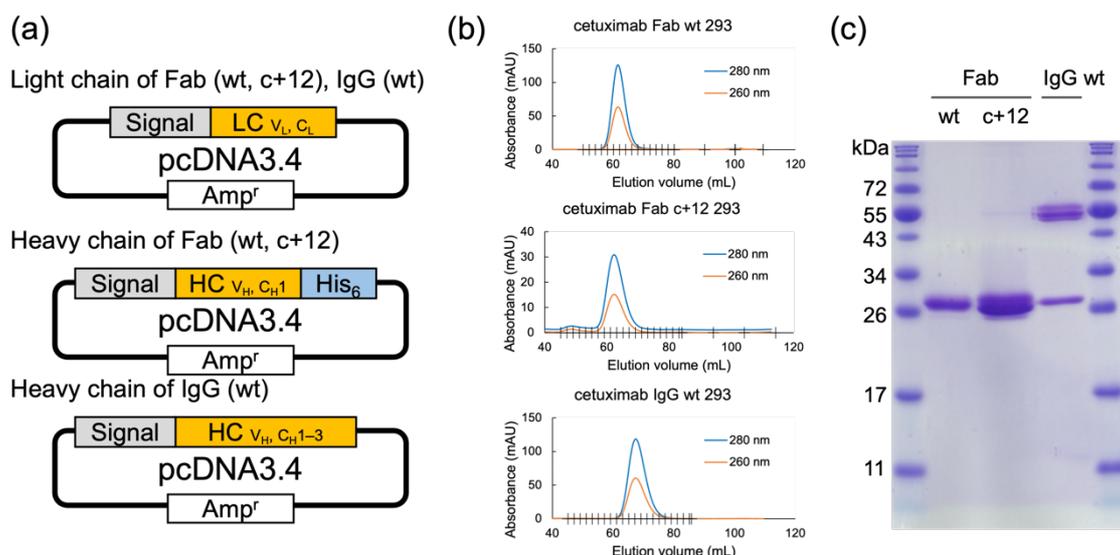


Fig. II. cetuximab の発現精製.

(a) 発現用ベクターのコンストラクト, (b) サイズ排除クロマトグラフィーによる精製. 使用カラム: HiLoad 16/600 Superdex 75 pg (Fab), HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (IgG). Buffer: 20 mM Tris-HCl pH 8, 200 mM imidazole pH 8, 500 mM NaCl (Fab), 1×PBS (IgG), (c) SDS-PAGE. Coomassie Brilliant Blue によって染色した.

3.2. ナノ粒子への抗体修飾と凝集評価

二官能性ポリエチレングリコール (PEG) リンカーを用いた一般的な手法 [10] によって、cetuximab IgG (wt), Fab (wt, c+12) を金ナノ粒子 (AuNP) に化学修飾した (Fig. III)。まず、100 mM 重炭酸バッファー pH 8.2 において、IgG に対して 25 当量の 2 mg/mL オルトピリジルジスルフィド官能基化 PEG-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (OPSS-PEG-NHS, 分子量=5 kDa) を加え、4°C で一晩反応させた。Fab (wt, c+12) に対しては、抗体の分子量に対する PEG リンカー当量が IgG と等しくなるように 8.3 当量の OPSS-PEG-NHS を加え、同様に反応させた。つづいて、1w/v% テトラクロロ金 (III) 酸 1 mL に 3.3w/v% クエン酸 1 mL を加え、攪拌して還元することで、直径 15 nm の AuNP を合成した。得られた 320 nM 未修飾 AuNP 8 μL に 2 mg/mL 末端チオール化メトキシ PEG (mPEG-SH, 分子量=2 kDa) と PEG リンカー修飾 IgG 抗体溶液を 0.375 PEG/nm² と 0.075 antibody/nm² の当量で加え、1×PBS バッファー pH 7.4 を用いて 450 μL に希

積した後に、4 °Cで一晩反応させた。対して、PEG リンカー修飾 Fab は2種類の当量で同様に AuNP に修飾された。AuNP に対する抗体の質量が IgG と同値となる 0.225 antibody/nm²の当量 (Mass-based eq.) と AuNP に対する抗体の個数 (物質質量) が IgG と同値となる 0.075 antibody/nm²の当量 (Number-based eq.) である。

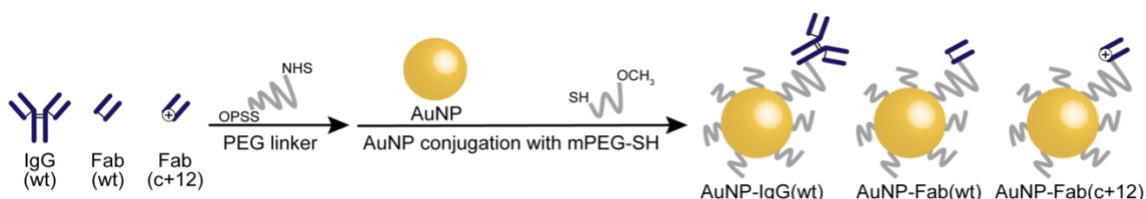


Fig. III. AuNP への抗体修飾.

作製した未修飾 AuNP と抗体修飾 AuNP を一般的な凝集の評価手法である紫外可視分光光度計 (UV-Vis, Fig. IV) と動的光散乱法 (DLS, Fig. V) を用いて評価した。AuNP において、局在表面プラズモン共鳴 (SPR) に起因する吸収スペクトルの変化から凝集の評価が可能であることが報告されている [11]。未修飾 AuNP と比較して、全ての抗体修飾 AuNP の吸収スペクトルに明確な変化は確認されず、ピーク波長の変化も -0.5 – $+0.7$ nm のみであった (Fig. IV, Table I)。また、抗体修飾による AuNP の流体力学的径の増大が確認されたものの、その増大は 5.7–11.3 nm であり (Fig. V, Table I)、抗体修飾由来の流体力学的径の増大と粒子の凝集を区別して検出することは困難であった。

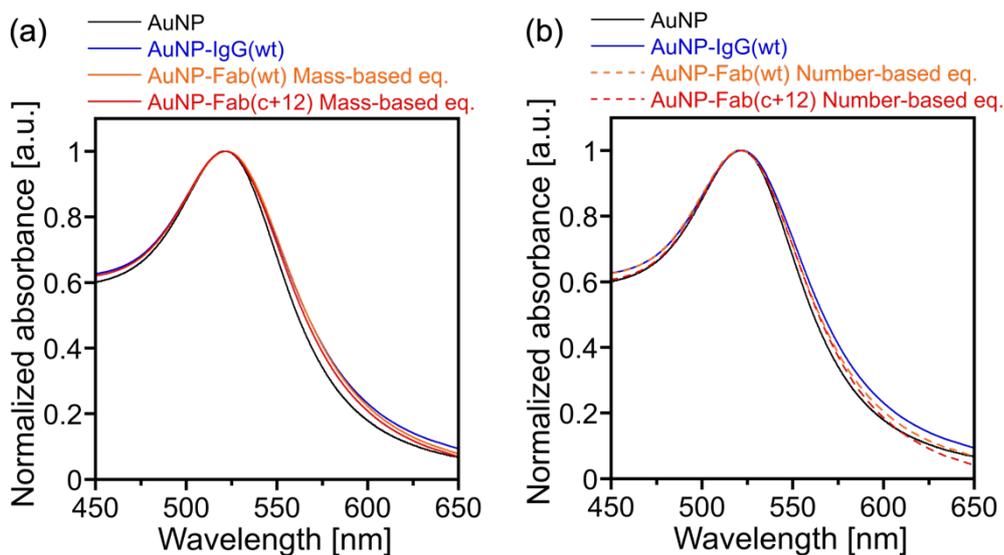


Fig. IV. 未修飾 AuNP と抗体修飾 AuNP の吸収スペクトル.

(a) IgG に対して質量基準で同量の Fab 修飾条件, (b) IgG に対して個数基準で同量の Fab 修飾条件.

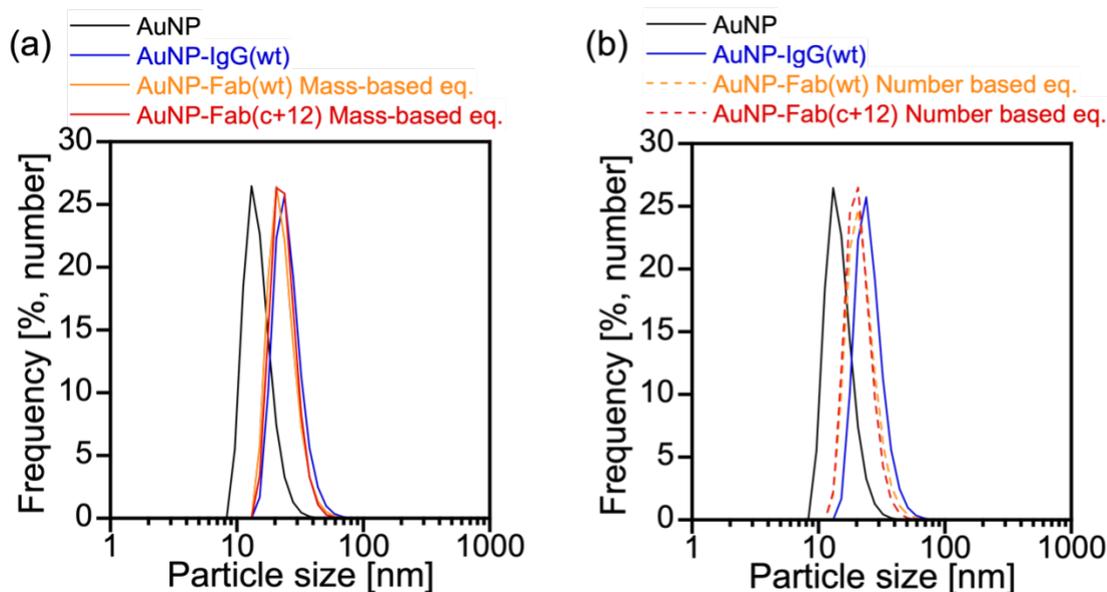


Fig. V. 未修飾 AuNP と抗体修飾 AuNP の DLS 測定結果.

(a) IgG に対して質量基準で同量の Fab 修飾条件, (b) IgG に対して個数基準で同量の Fab 修飾条件.

Table I. 未修飾 AuNP と抗体修飾 AuNP の UV-Vis 測定におけるピーク波長および DLS 測定における粒子力学的径.

| Particle name | UV-Vis | DLS |
|----------------------------------|---------------------|----------------------------|
| | SPR wavelength [nm] | Hydrodynamic diameter [nm] |
| AuNP | 521.3 | 14.2 |
| AuNP-IgG (wt) | 522.0 | 25.5 |
| AuNP-Fab (wt) Mass-based eq. | 522.0 | 22.5 |
| AuNP-Fab (c+12) Mass-based eq. | 521.2 | 22.8 |
| AuNP-Fab (wt) Number-based eq. | 520.8 | 23.6 |
| AuNP-Fab (c+12) Number-based eq. | 521.4 | 19.9 |

さらに作製した未修飾 AuNP と抗体修飾 AuNP を僅かな凝集であっても評価可能な手法である遠心 FFF を用いて評価した (Fig. VI)。遠心 FFF からの溶出時間は粒子の質量に基づくため、シミュレーションによって推算することが可能である [12]。未修飾

AuNP では単峰なピークが 29 min 付近に確認されたのに対して、IgG 修飾 AuNP では二峰性のピーク（メインピーク: 29 min, サブピーク: 35 min）が確認された。メインピークは単量体の粒子、サブピークは二量体の粒子に相当することが明らかになり、IgG 修飾 AuNP には二量体・三量体のような僅かな凝集が含まれていたことが示された。質量基準で IgG と同量修飾した Fab 修飾 AuNP においても、二峰性のピークが確認されたが、IgG 修飾 AuNP と比較して Fab (wt)修飾 AuNP はサブピークのピーク強度が小さく、Fab (c+12) 修飾 AuNP はさらに小さいことが確認された (Fig. VIa)。これにより、Fab 修飾 AuNP にも僅かな凝集が混在しており、その混在比率は IgG (wt)修飾 AuNP、Fab (wt)修飾 AuNP、Fab (c+12) 修飾 AuNP の順に大きいことが示唆された。我々の先行研究において、このような僅かな凝集であっても細胞取り込み等の医療応用の結果に影響を与えることを報告しており [1]、僅かな凝集の最も少ない Fab (c+12) 修飾 AuNP が最も医療応用に適していると考えられる。また、さらなる単分散な抗体修飾ナノ粒子の作製に向けて、抗体のサイズや表面電荷の適切な選択が求められることが示唆された。

一方、個数基準で IgG と同量修飾した Fab (wt)修飾 AuNP において (Fig. VIb)、質量基準で IgG と同量修飾した条件 (Fig. VIa) よりもピーク強度が小さいことが確認され、僅かな凝集の量が少ないことが示唆された。しかしながら、Fab (c+12)修飾 AuNP においては、いずれの修飾条件においてもピーク強度は同程度であることが確認され、僅かな凝集の量に差がないことが示唆された。この結果からは、僅かな凝集と抗体修飾量との明確な因果関係は認められなかったが、抗体修飾量の定量などの詳細な解析を行うことで、凝集発生メカニズムの解明・制御が期待される。

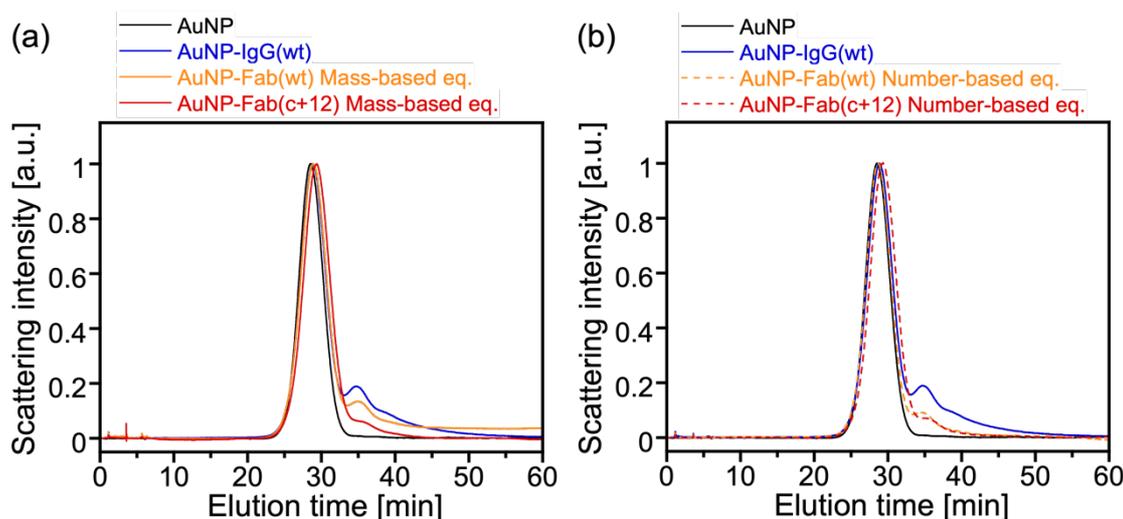


Fig. VI. 未修飾 AuNP と IgG (wt), Fab (wt, c+12)修飾 AuNP の遠心 FFF 測定結果.

(a) IgG に対して質量基準で同量の Fab 修飾条件, (b) IgG に対して個数基準で同量の Fab 修飾条件.

4. 総括

4.1. 本研究のまとめ

本研究では、cetuximab 抗体をモデルとし、サイズや表面電荷の抗体を修飾した金ナノ粒子の凝集評価を行った。Fab 定常領域正電荷変異体のデザインには、Rosetta 計算を用いた。抗体のサイズの影響として、IgG よりも Fab の方が金ナノ粒子の僅かな凝集の混在割合が低いことが確認された。また、抗体の表面電荷の影響として、Fab (wt) よりも Fab (c+12) の方が僅かな凝集の混在割合が低いことも示唆された。

本研究においては、実際の抗体修飾量の定量ができていないため、現時点では各抗体間の比較が難しい。しかしながら、抗体のサイズや表面電荷の違いによって、同様の操作で抗体修飾した際に AuNP の凝集発生機序に変化が生じていることが強く示唆されており、抗体改変によるそのメカニズム解明及び制御が期待される研究シーズとなった。

4.2. 今後の展望

本研究では、抗体修飾量を飽和させるため、AuNP に対して過剰量の抗体を混合している。しかし、Fab (c+12) 抗体を IgG に対して質量基準、または個数基準で同量修飾した結果、凝集の量に差がないことが示唆されており、修飾効率が向上している可能性が考えられる (Fig. VI)。今後は詳細な解析のため、抗体修飾量の定量と抗体修飾効率の変化を解析する。また、修飾した抗体の活性も明らかになっていない。今後は活性評価やさらなる電荷改変デザインを行うことで、凝集発生メカニズムの解明および抑制に加えて配向性の制御が期待される。

謝辞

本研究の遂行にあたり、指導教員である工学系研究科 津本浩平教授、太田誠一准教授には多大なご支援・ご指導を賜りましたことを深く感謝申し上げます。また、副指導教員である工学系研究科 高井まどか教授、柳田剛教授には本研究の提案にご快諾、またご助言いただきましたことを厚く御礼申し上げます。工学系研究科 長門石曉准教授には多くのご助言をいただきましたこと深く感謝申し上げます。最後に、本融合研究の機会のご提供いただき、また研究費のご支援を賜りました MERIT-WINGS プログラムに感謝申し上げます。

参考文献

1. Tsuchiya, H., N. Nakamura, and S. Ohta, *Centrifugal Field-Flow Fractionation Enables Detection of Slight Aggregation of Nanoparticles That Impacts Their Biomedical Applications*.

- Anal Chem, 2024. **96**(15): p. 5976-5984.
2. Lawrence, M.S., K.J. Phillips, and D.R. Liu, *Supercharging proteins can impart unusual resilience*. J Am Chem Soc, 2007. **129**(33): p. 10110-2.
 3. Miklos, A.E., et al., *Structure-based design of supercharged, highly thermoresistant antibodies*. Chem Biol, 2012. **19**(4): p. 449-55.
 4. Alford, R.F., et al., *The Rosetta All-Atom Energy Function for Macromolecular Modeling and Design*. J Chem Theory Comput, 2017. **13**(6): p. 3031-3048.
 5. Kasahara, K., et al., *Anion solvation enhanced by positive supercharging mutations preserves thermal stability of an antibody in a wide pH range*. Biochem Biophys Res Commun, 2021. **563**: p. 54-59.
 6. Sali, A. and T.L. Blundell, *Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints*. J Mol Biol, 1993. **234**(3): p. 779-815.
 7. Dolinsky, T.J., et al., *PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Web Server issue): p. W665-7.
 8. Jurrus, E., et al., *Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite*. Protein Sci, 2018. **27**(1): p. 112-128.
 9. Pettersen, E.F., et al., *UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis*. J Comput Chem, 2004. **25**(13): p. 1605-12.
 10. Dai, Q., C. Walkey, and W.C. Chan, *Polyethylene glycol backfilling mitigates the negative impact of the protein corona on nanoparticle cell targeting*. Angew Chem Int Ed Engl, 2014. **53**(20): p. 5093-6.
 11. Chithrani, B.D., A.A. Ghazani, and W.C. Chan, *Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells*. Nano Lett, 2006. **6**(4): p. 662-8.
 12. Williams, P.S. and J.C. Giddings, *Power programmed field-flow fractionation: a new program form for improved uniformity of fractionating power*. Anal Chem, 1987. **59**(17): p. 2038-44.