



| | |
|--------------|---|
| Title | 熱力学的、速度論的、構造生物学的な解析手法を組み合わせたIgGとFc γ RIII の相互作用に関する研究 |
| Author(s) | 山口, 祐希 |
| Citation | 大阪大学, 2022, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://doi.org/10.18910/89489 |
| rights | |
| Note | |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名 (山口 祐希)

論文題名

熱力学的、速度論的、構造生物学的な解析手法を組み合わせたIgGとFc γ RIIIの相互作用に関する研究

論文内容の要旨

第1章 序論 免疫グロブリンG (IgG) は、免疫細胞上に存在するFc γ 受容体III (Fc γ RIII) と結合すると、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) などの免疫エフェクター機能を誘導する。ADCCは、がんの治療に対する抗体医薬品の主要な作用機序である。これまで、IgGとFc γ RIIIの相互作用には、IgGのFc領域のみが関与すると考えられてきたが、近年Fab領域もIgG-Fc γ RIIIa相互作用に関与している可能性が示唆されるようになってきた。しかし、FabのIgG-Fc γ RIII相互作用に対する役割やFabとFc γ RIIIの空間的な配置、IgGの糖鎖修飾の違いや抗原の結合がFabとFc γ RIII間の相互作用に与える影響については未だに不明であった。以上の背景から、本博士論文では、IgG-Fc γ RIII相互作用に対するFab領域の役割を、IgGの糖鎖修飾の違いおよび抗原結合の影響も含めて、包括的に理解することを目的とした。

第2章 IgG-Fc γ RIII相互作用の熱力学的および速度論的解析 IgG-Fc γ RIII相互作用におけるFab領域の役割を熱力学的および速度論的な観点から明らかにするため、等温滴定カロリーメトリー法 (ITC) とバイオレイヤー干渉法 (BLI) を用いて解析を行った。解析には、医薬品として使用されているフコース付加の有無が異なるIgG1を使用した。ITCの結果、IgG1はIgG1-Fcと比較してFc γ RIIIaとの結合に伴い、エンタルピーを獲得した一方で、エントロピーを損失することが明らかとなった。BLIの結果、IgG1-Fcと比較するとIgG1の方が、Fc γ RIIIaに対する解離速度定数 (k_{off}) が小さいことが示された。以上より、フコース付加の有無に関わらず、Fab領域はFc γ RIIIに対する結合部位を提供し、解離速度の低下を介してIgG-Fc γ RIII相互作用を安定化させることが明らかになった。また、抗原を飽和させた条件でBLIの測定を行い、抗原の結合がIgG-Fc γ RIII相互作用に与える影響を観察したところ、抗原が結合するとIgG1のFc γ RIIIaに対する k_{off} が減少し、さらにその減少する程度は抗原によって異なることが示された。以上より、抗原の結合によって、Fabによって安定化されたIgGとFc γ RIIIの相互作用が、さらに安定化されることが明らかとなった。

第3章 IgG-Fc γ RIII相互作用の構造生物学的解析 フコース付加の有無がIgG-Fc γ RIII相互作用に与える影響およびFabとFc γ RIIIの空間配置を明らかにするため、水素/重水素交換質量分析 (HDX-MS) とクロスリンク質量分析 (XL-MS) に基づくタンパク質-タンパク質ドッキングを用いて解析を行った。その結果、IgGのフコース付加の有無に関わらず、IgGのFab領域は、CLドメインがFc γ RIIIに近接するような立体配置をとり、CLにはFc γ RIIIを構成する2つのドメイン、D1およびD2に対する結合部位が存在することが明らかとなった。また、Fab領域のCH1ドメインにもFc γ RIIIに対する結合部位が存在し、Fab-Fc γ RIII相互作用には、CL-Fc γ RIII相互作用とCH1-Fc γ RIII相互作用の2つのパターンが存在することが示唆された。さらに、アフコシル化により、Fab-D1相互作用がわずかに減少する一方で、Fc-D2相互作用が増強されることが示唆された。次に、抗原が引き起こすIgGの構造変化がIgG-Fc γ RIII相互作用に与える影響を明らかにするためにHDX-MSを用いて解析を行ったところ、抗原の結合に伴うFabの構造変化の仕方は抗原の種類によって異なるが、構造変化が生じたFabの領域は、FabのFc γ RIIIとの結合部位と同じ領域を含むことが明らかとなった。第2章のBLIの結果を考慮すると、抗原の結合に伴う構造変化はIgG-Fc γ RIII相互作用を安定化する可能性が示された。

第4章 総括 第2章、第3章の結果からIgGとFc γ RIIIの新規結合モデルを提案した。まず、IgGに抗原が結合するとFc γ RIIIとの結合を促進させるようにIgGの構造が変化する。その後Fc γ RIIIはIgGのFab領域とFc領域の両方に結合し、その際のFab-Fc γ RIII相互作用には、CL-Fc γ RIII相互作用とCH1-Fc γ RIII相互作用の2つのパターンが存在する。Fc γ RIIIがIgGに結合するとCH2からCH3へ構造変化が伝播し、細胞表面で抗原-IgG-Fc γ RIII複合体が形成され、免疫細胞が活性化される。本研究により、IgGのFab領域は糖鎖修飾の違いに関わらず、Fc γ RIIIに対する結合部位を提供し、IgG-Fc γ RIII複合体の形成を安定化させるように働くことが明らかとなった。また、Fab領域は抗原の結合による構造変化を介して、抗原-IgG-Fc γ RIII複合体の安定な形成を促進し、Fc γ RIIIシグナル経路の活性化を調節している可能性が示された。本博士論文で提案する、熱力学的、速度的、構造生物学的な解析によって導かれた新しい結合モデルは、抗原、IgG、Fc γ RIIIの三者の相互作用に関する新しい洞察をもたらし、IgG-Fc γ RIII相互作用の包括的な理解と、より有効性が高い抗体医薬品を開発するための新たな戦略を与えることが期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

| | |
|-----------------|--------------|
| 氏 名 (山 口 祐 希) | |
| | (職) 氏 名 |
| 論文審査担当者 | 主 査 教授 内山 進 |
| | 副 査 教授 大政 健史 |
| | 副 査 教授 栗栖 源嗣 |

論文審査の結果の要旨

免疫グロブリンG (IgG) は生体内でウイルスや細菌などの異物、すなわち抗原を認識し、排除する重要な役割を担っている。IgGが誘導する免疫エフェクター機能のうち、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) は標的細胞を破壊する機能であり、がんの治療を目的とする抗体医薬品の主要な作用機序である。ADCCは、標的細胞を認識したIgGとFc γ 受容体III (Fc γ RIII) が結合し、Fc γ RIIIが架橋されることによって誘導される。IgGとFc γ RIIIの相互作用は、これまでFc領域のみによって行われると考えられてきた。ところが、近年の研究により報告されているFc領域だけではなく、Fab領域もIgG-Fc γ RIII相互作用に関与している可能性が示唆されるようになってきた。ただし、FabのIgG-Fc γ RIII相互作用に対する役割やFabとFc γ RIIIの空間的な配置は不明であり、また、抗体医薬品において重要となるIgGの糖鎖修飾がIgGのFabとFc γ RIIIとの相互作用にどのように関与するかについても全く研究がされてこなかった。以上の背景から、本研究は、IgG-Fc γ RIII相互作用に対するFab領域の役割を、IgGの糖鎖修飾の違いおよび抗原結合の影響も含めて、熱力学および立体構造の観点からの解明を目的とした。

本研究ではまず、IgG-Fc γ RIII相互作用におけるFab領域の役割を熱力学および速度論的な観点から明らかとすることを試みた。解析対象として実際に医薬品として使用されているフコース付加の有無が異なるIgG1を使用した。熱力学および速度論的な解析には、等温滴定カロリーメトリー法 (ITC) とバイオレイヤー干渉法 (BLI) を用いた。ITCの結果、すべてのIgG1はIgG1-Fcと比較して、Fc γ RIIIaとの結合に伴ってエンタルピーを獲得した一方で、エントロピーを損失することが明らかとなった。以上より、Fab領域はFc γ RIIIに対する結合部位を提供することによってエンタルピーを獲得し、IgG-Fc γ RIII相互作用を安定化させることが明らかになった。対応して、BLIではIgG1-Fcと比較するとIgG1の方がFc γ RIIIaに結合した際の解離速度が遅くなっていた。さらに、抗原を飽和させた状態でBLIを行い、抗原の結合によるIgG-Fc γ RIII相互作用の影響を観察したところ、抗原が結合すると、IgG1のFc γ RIIIaに対する解離速度定数が減少し、その減少の程度は抗原によって異なることが明らかとなった。以上より、抗原の結合はFabによって安定化されたIgGとFc γ RIIIの相互作用を、さらに安定化させることが明らかとなった。

次に、フコース付加の有無および抗原の結合の影響を含めIgG-Fc γ RIII相互作用について構造生物学的な観点から明らかとすることを試みた。まず、フコース付加の有無がIgG-Fc γ RIIIの結合様式に影響するかを調べるために、フコース付加の有無が異なるIgG1を用いて水素/重水素交換質量分析 (HDX-MS) とクロスリンク質量分析 (XL-MS) に基づくタンパク質-タンパク質ドッキングを行った。さらにIgG1に抗原が結合した状態でのHDX-MSを行うことで、抗原が引き起こすIgGの構造変化がIgG-Fc γ RIII相互作用に与える影響を解析した。XL-MSとHDX-MSの結果から、IgGのFab領域のCLドメインがFc γ RIIIに近接しており、Fc γ RIIIのD1およびD2と特異的に相互作用していることが明らかとなった。また、先行研究でCH1ドメインとFc γ RIIIの相互作用が報告されていること、HDX-MSの結果においてFc γ RIIIaの存在下でCH1ドメインに重水素交換率が優位に低下した領域が見られたことから、Fab領域のCH1ドメインにもFc γ RIIIに対する結合部位が存在することが明らかとなった。したがってFab-Fc γ RIII相互作用にはCL-Fc γ RIII相互作用とCH1-Fc γ RIII相互作用の2つのパターンが存在していることが明らかになった。さらに、これらの相

相互作用は、IgGのフコシル付加の有無に関わらず本質的には同じであるが、Fc-D2相互作用はアフコシル化によって増強される一方で、Fabの寄与はわずかに減少することが示された。また、抗原の結合に伴うFabの構造変化の仕方は抗原の種類によって異なるものの、構造変化が生じたFabの領域はFabのFc γ RIIIとの結合部位と同じであることが示された。抗原の結合がIgGのFc γ RIIIからの解離を遅くするように寄与することを考慮すると、抗原の結合に伴ってFab領域にはIgGとFc γ RIIIの複合体の形成を安定化させる働きをする構造変化が生じていることが明らかとなった。

最後に、本研究で得られた情報に基づいて新規結合モデルを提案した。まず、IgGに抗原が結合するとFc γ RIIIとの結合を促進させるようにIgGの構造が変化する。その後Fc γ RIIIはIgGのFab領域とFc領域の両方に結合し、その際のFab-Fc γ RIII相互作用には、CL-Fc γ RIII相互作用とCH1-Fc γ RIII相互作用の2パターンが存在する。Fc γ RIIIがIgGに結合するとCH2からCH3へ構造変化が伝播し、その後細胞表面で抗原-IgG-Fc γ RIII複合体が形成することによってFc γ RIIIが架橋され、免疫細胞が活性化される。本研究により、Fab領域は糖鎖修飾の違いに関わらず、Fc γ RIIIとの相互作用部位を提供し、Fab-Fc γ RIII相互作用はIgG-Fc γ RIII複合体の形成を安定化させることが明らかとなり、Fabは抗原の結合による構造変化を介して、抗原-IgG-Fc γ RIII複合体の安定な形成を促進し、Fc γ RIIIシグナル経路の活性化を調節していることが明らかとなった。

本研究で提案した、熱力学的、速度的、構造生物学的なデータから導かれた新しい結合モデルは、IgG-Fc γ RIII相互作用に関する新しい洞察をもたらし、IgG-Fc γ RIII相互作用の包括的な理解と、より有効性と安全性が高い抗体医薬品を開発するための新たな戦略を与えると期待され、よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。