

免疫チェックポイント PD-1 分子を分解する抗体酵素 H34 クローンの特徴と性質

(大分大¹・鈴鹿医療大²・九州先端研³) ○一三恵美¹・田口博明²・野中玲実¹・宇田泰三³

Features and properties of catalytic antibody, H34, capable of degrading an immune checkpoint PD-1 molecule (¹Research Promotion Institute, Oita University, ²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Suzuka University of Medical Science, ³Nanotechnology Laboratory, ISIT,) ○Emi Hifumi,¹ Hiroaki Taguchi,² Tamami Nonaka,¹ Taizo Uda³

Programmed cell death 1 (PD-1), which was discovered by Honjo *et al.* in 1992, is an immune checkpoint molecule regulating T-cell function. Preventing PD-1 binding to its ligand PD-L1 has emerged as an important tool in immunotherapy. The antibody to PD-1 induces the inhibition of binding of PD-1 with the ligand PD-L1 expressed on cancer cells. The antibody is working as an effective anticancer agent. Here, we report the development of a catalytic antibody H34 clone which could degrade PD-1 molecule and showed a novel function to block PD-1/PD-L1 interaction.

Keywords : Catalytic antibody; Immune checkpoint; PD-1; PD-L1

【目的】免疫チェックポイント PD-1 分子は、T 細胞上に発現し、本庶らが 1992 年に発見して世界的に注目を集めている。PD-1 に対する抗体は、がん細胞上に発現している PD-L1 による PD-1 への結合阻害を惹起し、有効な抗癌剤として使用されている。我々は抗体酵素研究を続ける過程で、PD-1/PD-L1 の相互作用を阻止する機能を有する抗体酵素 H34 クローンを開発したので報告する。

【実験手法】ヒト型抗体酵素バンクはボランティアから抗体遺伝子を取得し、クローニング後、大腸菌 BL21(DE3)pLysS に形質転換し IPTG で発現誘導後、培養上清の可溶性画分を回収し、Ni-NTA (QIAGEN) カラムクロマトにより精製した。酵素活性は、合成基質 FRET-PD-1 が抗体酵素により分解される際の蛍光強度を測定する事と、recombinant PD-1 の分解実験から評価した。

【結果と考察】45 種類のヒト型抗体酵素を screening したところ、Pro95 を欠失している H34 が FRET-PD-1 を分解する特徴的な性質を示した。H34 は FRET-PD-1 を $K_m=3.32 \times 10^{-6} \text{ M}$, $k_{cat}=1.3 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ 、触媒効率 (k_{cat}/K_m) = $1.96 \times 10^3 / \text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ で切断した。切断サイトは Gln¹³² - Ile¹³³ であった。また、recombinant PD-1 に対しても反応時間 24 時間で 2 つの明確な分解断片を与える事を確認した。PD-1 分解活性を有する H34 が PD-1/PD-L1 相互作用を阻害することは ELISA でも確認した。加えて、H34 は 6 時間の反応で PD-1 分子を半分以上分解する事が判明した。この H34 は Pro95 を欠失しているクローンであるが、Pro95 を付与した変異体を作製し、同様な実験を試みたところ、この変異体は全く酵素活性を示さなかった。この事実は Pro95 が抗体の酵素活性の発揮に大きく寄与する事を指摘した先の報告と一致した¹⁾。

1) E. Hifumi *et al.*, *Science Advances*, **6**(13), eaay6441(2020).