

新規癌細胞増殖シグナルを強力に阻害する抗体の構造基盤解明

～5年相対生存率が低いがんの治療薬開発を目指して～
○准教授 柴田直樹(理学研究科)

Higuchi Laboratory

研究の背景と目的: 早期発見と治療が難しい膵がんや肺がんの患者の6割以上において、異常に発現するタンパク質CKAP4とDickkopf (DKK)は、がん細胞表面で結合すると、がん細胞の増殖を促すシグナルが活性化される(図1)。CKAP4に対する抗体(抗CKAP4抗体)の中には、CKAP4とDKKを含むタンパク質間の結合を防ぎ、がん細胞の増殖を抑えるものがある。本研究では、抗腫瘍効果を持つ4種類の抗CKAP4抗体とCKAP4との複合体について立体構造を明らかにすることによって、これらの抗体がどのようにしてCKAP4とDKKとの結合を防ぐのかを解明することを目的とする。またそれによって、より効果的にがん細胞増殖を抑える抗体を取得するための指針を得ることを目指す。

CKAP4相互作用部位

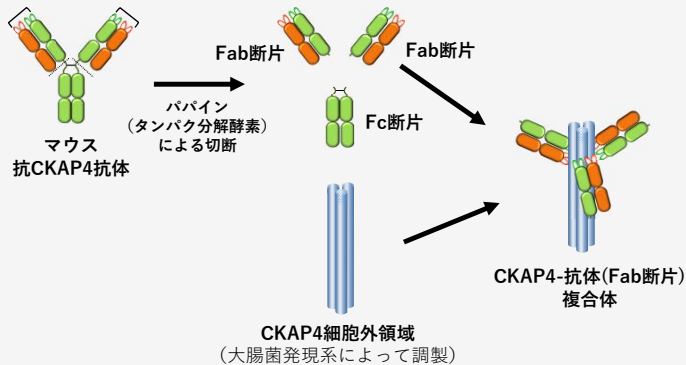


図2. CKAP4-抗体(Fab断片)複合体試料調製方法

抗体には柔軟性の高いリンカー領域があるため、そのままでは構造解析には適さない。パパインを用いて抗体のリンカー領域を切断し、Fab断片(抗原との相互作用を担う部位を含む)とFc断片に分解した。次に、Fab断片とCKAP4を結合させたものを精製し、構造解析用試料とした。

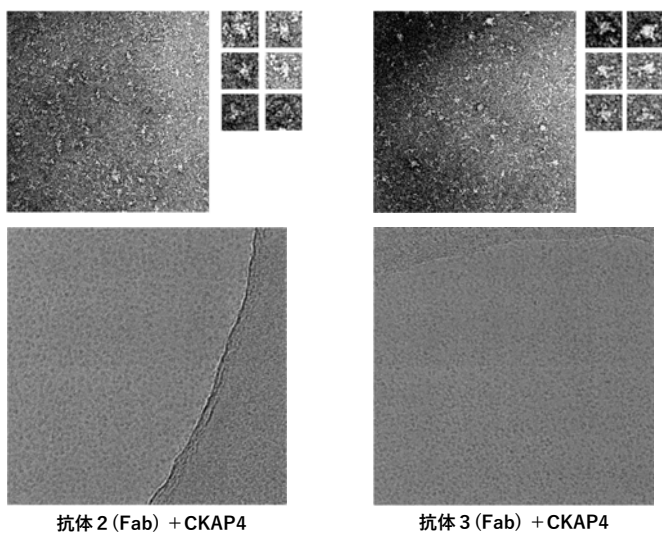


図4. 電子顕微鏡によるCKAP4-抗体(Fab断片)複合体試料像

抗体2及び抗体3についてはFab断片とCKAP4との複合体試料の調製に成功したため、X線結晶構造解析を目指して結晶化を行ったが、結晶は得られなかった。そこで、試料の状態の確認と単粒子解析による構造解析を行うため、電子顕微鏡(Talos Arctica, 大阪大学蛋白研 加藤貴之 教授)による測定を行った。上段:ネガティブ染色(2%酢酸ウラン)法によるTEM像
CKAP4と各Fabの三量体構造を確認することができた。
下段:クライオ電子顕微鏡で撮影された画像
現在、構造解析を試みているところである。

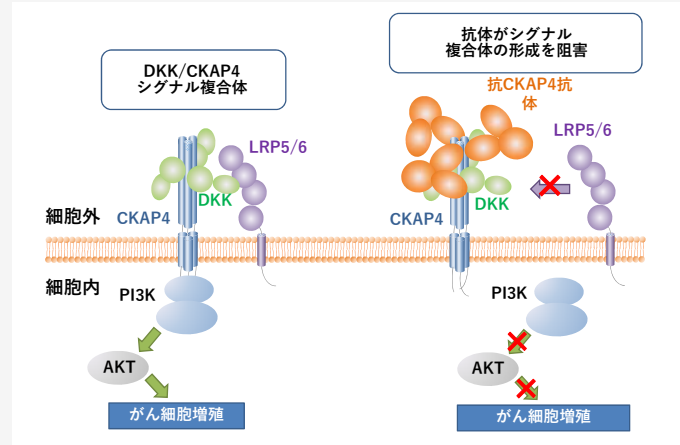


図1. 抗体によるDKK-CKAP4シグナル阻害

(左) CKAP4, DKK, LRP5/6が結合(複合体が形成)すると、がん細胞増殖シグナルが活性化される。
(右) 抗CKAP4抗体は複合体の形成を防ぐことで、がん細胞増殖シグナルを抑制する。

Sada, R. *et al.* (2019) Dynamic palmitoylation controls the microdomain localization of the DKK1 receptors CKAP4 and LRP6. *Sci. Signal.*, **12**, eaat9519.
Kimura, *et al.* (2016) CKAP4 is a Dickkopf1 receptor and is involved in tumor progression. *J. Clin. Invest.*, **126**, 2689-2705.

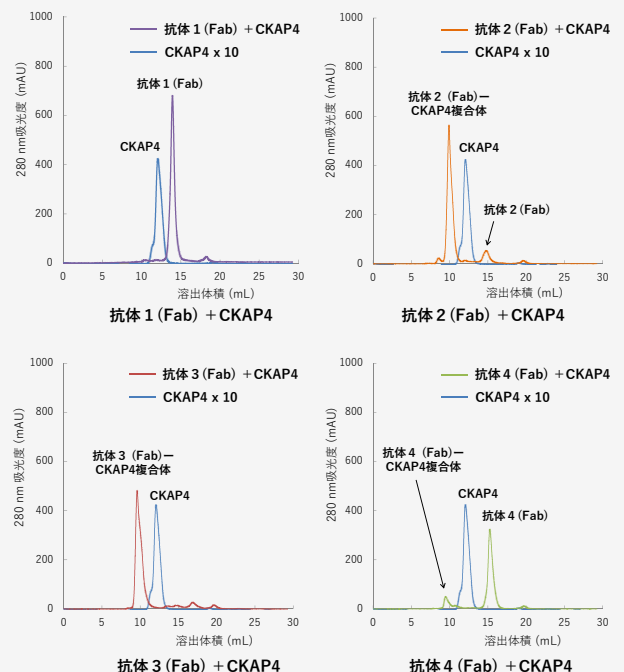


図3. ゲルろ過クロマトグラフィーによるDKK-CKAP4複合体の精製

抗体1～4のFab断片とCKAP4を1:1のモル比で混合した後、ゲルろ過クロマトグラフィーによって、複合体形成の確認と精製を行った。また、比較のため、CKAP4単独でゲルろ過クロマトグラフィーを行った結果(吸光係数がFab断片に比べて小さいため10倍して表示)を重ねている。

抗体1: ほぼ全てのFab断片が単独で溶出され、複合体はほとんど形成していなかった。

抗体2及び抗体3: CKAP4との複合体がメインピークとして得られた。

抗体4: CKAP4との複合体のピークはわずかに見られたが、大部分がFab断片単独として溶出された。