HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Molecular recognition mechanism of novel KIR2DS1 specific monoclonal antibodies [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	蒋, 欣欣
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第14218号
Issue Date	2020-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/79399
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Jiang_Xinxin_review.pdf, 審査の要旨



Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文　審　査　の　要　旨

博士の専攻分野の名称　博士（薬科学）氏　名　　蒋　欣欣

審査担当者	主　査	教　授	前仲　勝実
	副　査	教　授	松田　正
	副　査	教　授	木原　章雄
	副　査	特任准教授	前田　直良

学　位　論　文　題　名

Molecular recognition mechanism of novel KIR2DS1 specific monoclonal antibodies
（新規ＫＩＲ２ＤＳ１特異的モノクローナル抗体の分子認識機構の解析）

博士学位論文審査等の結果について（報告）

ナチュラルキラー（NK）細胞は、がん、感染症、移植時拒絶反応、自己免疫疾患などで重要な役割を果たす。ＮＫ細胞の活性化は、抑制型と活性型とがファミリーを形成するペア型受容体によって制御される。ペア型受容体の一つである KIR (killer cell immunoglobulin-like receptor)ファミリーは１０種類程度のメンバーから成り、抑制型メンバーと活性型メンバーとの配列相同性が非常に高く、メンバー特異的な抗体は数少ない。近年、免疫チェックポイント阻害薬が、がんの治療薬として有効であることが明らかとなり、KIR を標的とした新規がん免疫療法の開発も進められている。しかし、広範な KIR のアンタゴニスト抗体（リリルマブ）は、その特異性の低さから効果は限定的であった。著者は、所属研究室にて作製した 3 種の新規活性化 KIR2DS1 特異的抗体について、NK 細胞活性化制御を目的とした特異性の高い分子標的薬への応用に向けて、Ｘ線結晶構造解析と分子間相互作用解析により KIR2DS1 認識機構を理解することを目的として研究を遂行した。本論文ではその研究成果が述べられている。

本論文では、研究背景および実験方法を述べた後、まず KIR2DS1 の構造解析についての成果が述べられている。活性型 KIR2DS1 受容体は抑制型 KIR2DL1 受容体と同じ自己リガンド HLA-C を認識するため配列相同性が非常に高く、細胞外領域で異なるアミノ酸残基は 6 か所のみであった。これまでに、KIR2DL1 の立体構造は報告されているものの、KIR2DS1 の構造は明らかになっていなかったため、筆者はまず高純度の KIR2DS1 組換え蛋白質を調製し、X 線結晶構造解析により分解能 3.92 Å での構造決定に成功した。側鎖構造を決定するには分解能が不十分であったが、主鎖構造を他の KIR2D 分子と比較したところ、高度に保存された V 字型の構造であった。変異体解析により 3 種の KIR2DS1 特異的抗体結合に寄与していることが示唆されている T154、N163 周辺の KIR2DS1 主鎖構造も KIR2DL1 と比較して明確な構造の違いは認められず、抗体は構造的エピトープではなく、異なるアミノ酸残基の側鎖を直接認識している可能性が示唆された。

次に、3種の抗KIR2DS1抗体（1C7、3E11、5B12）と抗原KIR2DS1の結合様式を表面プラズモン共鳴法により詳細に解析した。ビオチン化KIR2DS1 をチップに固定化し、アナライトとして抗体を添加して速度論的解析を実施した結果、全ての抗体がnMオーダーの親和性を示したが、1C7抗体が最も解離が遅く、親和性が高い結合様式を示すことが明らかとなった。1C7 抗体とKIR2DS1との結合親和性は2価結合の場合、みかけの解離定数（K_d）= 2.5-3.3 nM、1価結合の場合 K_d = 0.61 μMであった。次に、抗体－KIR2DS1相互作用の特性を理解するため、表面プラズモン共鳴法による3種抗体のFab断片とKIR2DS1結合の熱力学的解析を行った結果、1C7と5B12抗体はエンタルピー駆動的にKIR2DS1と結合する一方、3E11抗体はエントロピー駆動的に結合することが明らかとなった。5B12と3E11のCDR配列を比較すると、重鎖CDR3以外は完全に一致しており、重鎖CDR3内のアミノ酸の違いがCDR領域の構造柔軟性に差を生じ、異なる結合様式を示したと予想された。

最後に、最も解離が遅く、強い結合親和性を示した1C7抗体について、Fab断片のX線結晶構造解析に成功した。一部CDR領域は、電子密度図に現れないフレキシブル構造であることがわかった。抗原抗体結合において、フレキシブルなCDR構造が特異性の高い結合に重要な役割を担う場合は多く、1C7抗体においても、この領域がKIR2DS1との結合に寄与している可能性が示唆された。熱力学的特徴と合わせて考察すると、1C7抗体では、特異性の高い典型的なCDRのフレキシブル領域が、KIR2DS1結合により固定化されるとエントロピー損失になる一方、ファンデルワールス相互作用や水素結合、塩結合（塩橋）による発熱反応となり、エンタルピー駆動型となることが予想された。これは抗原－抗体結合に特徴的な結合様式であり、1C7抗体-KIR2DS1結合はCDRフレキシブル領域の構造変化を伴う特異性の高い結合である可能性が示唆された。

これを要するに，著者は，KIR2DS1の立体構造および新規KIR2DS1抗体のKIR2DS1認識における特徴を明らかとし、1C7抗体が基礎研究ツールとして、さらに分子標的抗体医薬品としての応用に向けて3種類の抗体の中で最も適していることを示した。今後、NK細胞上の活性化KIR2DS1受容体を介するシグナル解析、KIR2DS1発現プロファイル解析、KIR2DS1を介した免疫制御法開発に対して多大に貢献するものである。

よって著者は，北海道大学博士（薬科学）の学位を授与される資格あるものと認める。