

抗体配列生成への複数モードサンプリング生成モデルの適用と配列多様性向上の検討 Application of Multi-mode Sampling Generative Model to Antibody Sequence Generation and Improvement of Sequence Diversity

豊村 崇[†] 木戸 邦彦[†] 松森 正樹[†]
Takashi Toyomura Kunihiko Kido Masaki Matsumori

1. はじめに

世界の医療用医薬品市場は 2020 年に約 7600 億ドルに達し、その内訳は低分子医薬が 54%、つづいて抗体医薬が 21%を占めている[1]。抗体医薬は 2000 年には占有率が 1%であったが、ここ 20 年で売上が大幅に増加し、市場の成長を牽引するモダリティとなっている。しかしながら、抗体医薬を含むバイオ医薬品は低分子医薬品に比べて分子量が大きく構造が複雑なため、基礎研究において候補薬を探索する際に多くの費用や時間を要しており非常に大きな課題となっている。

抗体医薬は 20 種類のアミノ酸が 1,500 個程度連なって構成されるため、取り得る組み合わせは 20 の 1,500 乗という膨大な数になる。したがって、すべての組み合わせを現実的に作製してウェット実験で特性を評価するのは非現実的である。そこで計算機上で配列を生成してインシリコで評価し、有望な配列のみウェット実験で評価する試みがなされている。Saka らは次世代シーケンサで得た配列を使って LSTM (Long Short Term Memory) モデルを構築し、モデルが算出する尤度が抗原結合親和性と相関することを示した[2]。また、Amimeur らはそれぞれ別の GAN (Generative Adversarial Network) で生成した軽鎖と重鎖を組み合わせでアミノ酸配列を生成する手法を提案した[3]。

しかしながら、計算機上であっても 20 の 1,500 乗という組み合わせをすべて評価するには相当のマシンリソースと計算時間を要する。この課題を解決するために、Mason らは Deep Mutational Scanning(以下、DMS)と呼ぶ手法と機械学習の組み合わせを提案している[4]。これは抗体配列において抗原結合親和性に寄与する領域およびアミノ酸の種類をウェット実験で特定し (DMS)、生成する配列の組み合わせをその領域およびアミノ酸の種類に限定することで計算量の削減を狙った手法である。DMS によれば、結合親和性に寄与する領域は重鎖の第 3 相補性決定領域の 10 か所と特定された。計算機上では配列から結合親和性を予測するモデルを CNN (Convolutional Neural Network) で構築しておき、DMS の結果にもとづいて生成した配列を CNN に入力し、結合親和性の高い配列を抽出した。抽出した配列について粘性、溶解性等の特性評価を行った結果、293 個の有望な配列が得られたとしている。

これらの先行研究では、インシリコの段階では主に結合親和性を対象として配列の最適化を行っており、他の特性については考慮していない。しかしながら、候補薬を基礎研究から非臨床試験に進めるには非常に多くの特性の条件をクリアする必要があり、インシリコで結合親和性のみを最適化した配列はウェット実験における特性評価で脱落してしまう可能性が高い。

そこで、本研究はウェット実験の複数の特性評価を同時

にクリアする割合を高めるようなインシリコ配列生成を目的とする。そのためには、ある一つの特性に特化した類似の配列を多数生成するのではなく、その特性を高い水準で満たしながらも多様な配列を生成する必要がある。この目的を達成する手法として、マルコフ連鎖モンテカルロ法 (以下、MCMC) [5]などの生成モデルと比較して、より多くのモードからサンプリングできることを特徴とする Generative Flow Networks (以下、GFlowNets) [6-8]を抗体配列生成に適用する。さらに、GFlowNets を抗体配列生成に適応させる手法を提案し、提案手法で生成した配列をインシリコで評価する。

2. 研究方法

本章では、本研究のベースとした GFlowNets の概要と、GFlowNets を抗体配列生成に適応させる提案手法について述べる。

2.1 GFlowNets の概要

GFlowNets は 2021 年に Bengio らが発表した生成モデルである。MCMC などの生成モデルは報酬関数の局所的な探索を行うが、GFlowNets は報酬関数に比例して多様なモードからサンプリングすることを特徴としている。図 1 は MCMC と GFlowNets のサンプリングの違いを示すイメージである。この手法をバイオロジー配列生成に適用し、ウェット実験と組み合わせたアクティブラーニング基盤が 2022 年に提案されている。



図 1 生成モデルによるサンプリングイメージ (左: MCMC、右: GFlowNets)

GFlowNets アクティブラーニング基盤は図 2 に示す構成となっており、以下の要素をもっている。

Dataset :

配列と、各配列に対する評価値の組み合わせが格納される。ここでは評価値は抗原に対する結合親和性スコアである。初期データセットとして、あらかじめウェット実験で評価された配列と結合親和性スコアが格納されている。

Proxy :

配列から結合親和性スコアを予測する機械学習モデルである。Dataset に格納されている配列と結合親和性スコアを用いて、任意の機械学習アルゴリズムで構築される。機械学習アルゴリズムは多層パーセプトロン (Multi Layer Perceptron, 以下、MLP) やランダムフォレストから選択可能であるが、ここでは MLP を用いる。

[†] 株式会社日立製作所 Hitachi, Ltd.

Generator :

Proxy で得られる結合親和性スコアが高くなるような配列を生成する。Proxy が出力する結合親和性スコアを報酬として強化学習により生成モデルを構築する。

Oracle :

配列の結合親和性スコアの真値を与えるもので、理想的にはウェット実験である。GFlowNets の論文では、アクティブラーニングを計算機上で完結させるため配列から結合親和性スコアを予測する機械学習モデル (Protein-BERT) [9]を用いている。

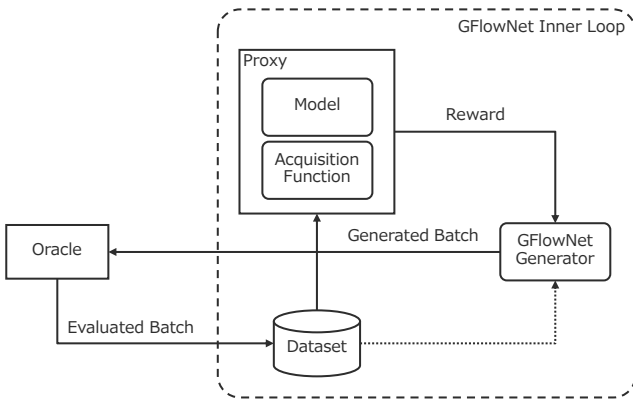


図 2 GFlowNets アクティブラーニング基盤

GFlowNets の処理フローを図 3 に示す。はじめに Dataset から配列と結合親和性スコアを取得し、Proxy を学習する。Generator は Proxy から得られる結合親和性スコアを報酬として、Q 関数を学習する。学習を一定回数繰り返したら、構築した Q 関数をもとに配列を生成する。生成した配列は Oracle に入力され、結合親和性スコアの真値を取得して Dataset に追加する。更新された Dataset の配列と結合親和性スコアを用いて再度 Proxy の学習から一連の処理を一定回数繰り返す。

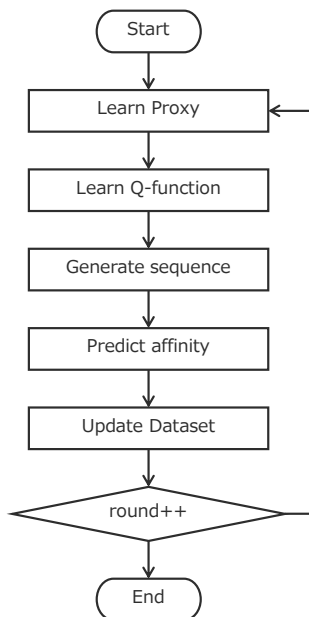


図 3 GFlowNets 処理フロー

GFlowNets の特徴は Q 関数の構築方法にある。Q 関数は MLP で構成され、式(1)の損失関数を用いて学習される。ここで s は状態、 θ は方策パラメータ、 F_{θ} はエッジフローである。エッジフローは強化学習時においてある探索経路をたどる確率値の総和であり、式(1)によってある状態に至るまでの上流側エッジフローとその状態以降の下流側エッジフローが一致するような Q 関数が生成される。一般的な強化学習では一定の割引率に応じた単調な Q 関数を用いるため、最終的な報酬が高い単一の経路に誘導されやすいが、GFlowNets では各状態でより適切な行動価値が得られるため多様なモードからのサンプリングが可能になる。

$$\mathcal{L}_{FM}(s; \theta) = \left(\log \frac{\sum_{s' \in \text{Parent}(s)} F_{\theta}(s' \rightarrow s)}{\sum_{s'' \in \text{Child}(s)} F_{\theta}(s \rightarrow s'')} \right)^2 \quad (1)$$

GFlowNets の Q 関数学習時には、アミノ酸を先頭から 1 つずつ選択して探索用配列を生成し報酬を計算するロールアウトを行う。このとき、アミノ酸はその時点で学習されている Q 関数を用いて選択されるため、高い報酬が得られやすい配列を効率よく生成できるという長所がある反面、未知の配列に高い報酬をもつものがある場合に見逃してしまう可能性がある。これを防ぐために、GFlowNets では Q 関数に基づいて選択したアミノ酸を一定確率で変更する機能 (突然変異) を備えている。突然変異をする場合には一様分布の確率密度関数を用いて変異後のアミノ酸をランダムに選択する。

2.2 GFlowNets の抗体配列生成への適応

2.2.1 突然変異の改良

前項で述べたように GFlowNets ではアミノ酸を一定確率で突然変異させることで幅広い空間を探索できるようにしている。しかしながら、アミノ酸の種類は抗体配列全体の特性に影響を与えるものであり、配列中の一か所を特性が大きく異なるアミノ酸に突然変異させただけで抗体配列全体の特性が大きく変化してしまう。したがって、GFlowNets のように変異後のアミノ酸をランダムに選択した場合に、Q 関数が示す価値から大きく乖離した別の配列を無駄に生成してしまい、学習効率が低下する課題がある。

そこで、本研究では突然変異させる場合に突然変異前のアミノ酸と特性の近いものを変異後のアミノ酸として選択する手法を提案する。アミノ酸の特性としては、Eisenberg らの手法[10]による疎水性インデックスを用いる。疎水性は水に溶解しにくい度合いを示す性質で、溶解性、凝集、結合親和性など様々な評価項目に影響を与える重要な要素であるため、これを採用した。Eisenberg の疎水性インデックスでは、アルギニン (R) が最小値 -1.76、イソロイシン (I) が最大値 0.73 をとる。提案手法では、突然変異前のアミノ酸に疎水性インデックスが近いアミノ酸ほど発生頻度が高くなる確率密度関数を生成し、この確率密度関数に従って変異後のアミノ酸を選択する。図 4 は変異前のアミノ酸がチロシン (Y) のときに生成する確率密度関数と、変異前のアミノ酸がトレオニン (T) のときに生成する確率密度関数を示している。この提案手法により、Q 関数が示す報酬から乖離し過ぎない範囲で未知の配列を探索でき、

GFlowNets よりもさらに多様な配列を生成できると考えられる。

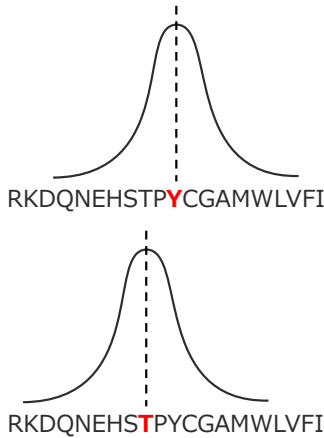


図 4 確率密度関数 (上: チロシンから突然変異する場合、下: トレオニンから突然変異する場合)

2.2.2 報酬への複数評価項目組み込み

GFlowNets では結合親和性スコアのみを報酬として配列を生成し、ウェット実験の様々な評価項目クリアは配列の多様性でカバーする方針であった。この改良として、ウェット実験の評価項目も報酬に組み込み、様々な評価項目を同時にクリアする配列をあらかじめ生成する手法を提案する。

提案手法では、式(2)で示すように結合親和性スコアとウェット実験の評価スコアの重み付き加算を報酬とする。ウェット実験の評価スコアは Mason らの研究[4]と同じく粘性、溶解性とした。ここで $R(x)$ は最終的な報酬、 $R_i(x)$ はそれぞれの評価項目に対応した報酬、 w_i は各報酬の重みである。

$$R(x) = w_1 R_1(x) + w_2 R_2(x) + \dots \quad (2)$$

粘性は電荷や疎水性などさらに細かい要素で評価される。Sharma らの研究[11]によれば、可変フラグメントの電荷対称性パラメータ (FvCSP) が増加すると粘性が低下するとされている。また、Mason らによれば、薬物クリアランスの観点から最適な可変フラグメントの正味電荷 (FabNetCharge) は 0 から 6.2、CDRL1+CDRL3+CDRH3 疎水性指数和 (HISum) は 4 以下とされている。これをもとに図 5 に示す報酬関数を設計した。

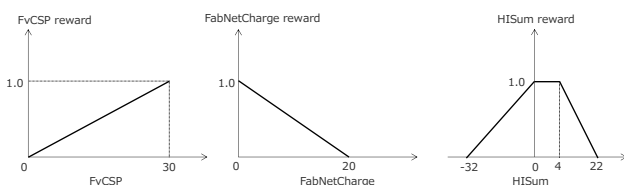


図 5 粘性に関する報酬関数

溶解性は Sormanni らの研究で提案されている CamSol 法 [12-14] にもとづいて報酬関数を設計した。Mason らは CamSol 法による溶解性スコアが -1 未満は溶解性が低く、溶解性スコアが 1 以上は溶解性が高いとしているため、報酬関数は Figure 6 に示す形状とした。

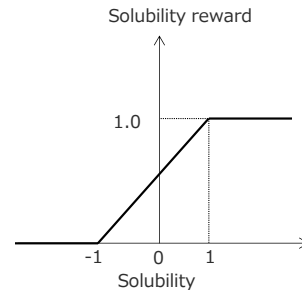


図 6 溶解度に関する報酬関数

2.3 評価方法

提案手法の効果を示すために、もともとの GFlowNets、突然変異方式の改良のみ (提案手法 1)、ウェット実験評価項目の組み込み (提案手法 2)、突然変異方式の改良とウェット実験評価項目の組み込みの両適用 (提案手法 3) でそれぞれ配列を生成し、生成配列に対してインシリコスクリーニングを行った。GFlowNets アクティブラーニング基盤の実行環境は公開コード[15]を使用し、初期データセットには Mason らが公開している CDRL3 配列と結合親和性のデータ[16]を用いた。いずれも 1 ラウンドごとの生成配列数を 1,024 個とし、アクティブラーニングを 10 ラウンド繰り返すことで 10,240 個の配列を得た。提案手法 2 と提案手法 3 における各報酬の重みは実験的に調整し、結合親和性 : FvCSP : FabNetCharge : HISum : 溶解性 = 7:0.5:0.5:0.5:1.5 とした。重みの組み合わせを変えながら複数パターンを比較した結果、結合親和性をもっとも重視した上で溶解性に包含される特性である FvCSP、FabNetCharge、HISum は小さめにしたときが最適であることを確認した。

また、GFlowNets との比較のために、二種類の方式で配列を用意してインシリコスクリーニングを適用した。一つは Mason らの研究を追試して生成した約 900 万個の配列である。もう一つは、ランダムに選択したアミノ酸を 10 個連結した配列を 10,240 個用意した。

以上 6 方式についてインシリコスクリーニングをクリアした配列の割合を算出し、比較した。インシリコスクリーニングの評価項目は Mason らの研究に倣って結合親和性、FvCSP、FabNetCharge、HISum、溶解性とし、スクリーニング条件も Mason らの研究と同様に表 1 のように設定した。

表 1 スクリーニング条件

スクリーニング項目	条件
結合親和性	≥ 0.75
FvCSP	≥ 6.61
FabNetCharge	≤ 6.2
HISum	≥ 0 かつ ≤ 4
溶解性	≥ 0.5

3. 結果

3.1 評価項目ごとのスクリーニング結果

各方式で生成した配列に対して、インシリコスクリーニングで各評価項目をクリアした割合を図 7 に示す。FvCSP と HISum については方式ごとに大きな差はみられず 90% 以上の配列がクリアする結果となった。一方、結合親和性、FabNetCharge、溶解性については方式によってクリアした割合に大きな差異が生じた。

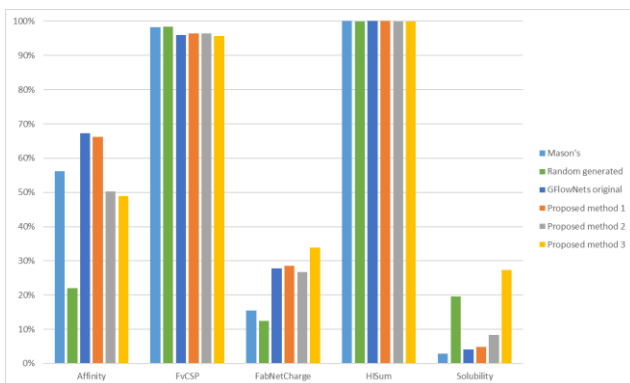


図 7 評価項目ごとのスクリーニング結果

3.2 最終的なスクリーニング結果

各方式について、インシリコスクリーニングの評価項目をすべてクリアした配列の割合を図 8 に示す。Mason らの研究の追試とランダム生成でインシリコスクリーニングをクリアした割合は 0.4% 以下にとどまった。もともとの GFlowNets は Mason らの研究やランダム生成をわずかに上回って 0.47% となり、提案手法 1 や提案手法 2 では一定程度の改善が見られた。突然変異方式の改良とウェット評価項目の組み込みを両適用した提案手法 3 ではクリアした割合が 3.99% となり、Mason らの研究に対して 10 倍程度の改善となった。

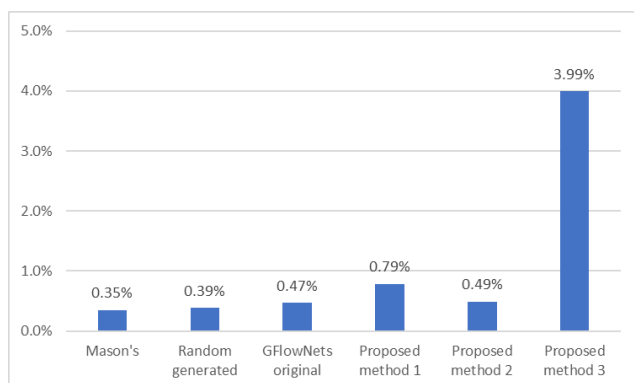


図 8 最終的なスクリーニング結果

4. 考察

4.1 評価項目ごとのスクリーニング結果について

本節では、インシリコスクリーニングの各評価項目について検討する。

結合親和性については、Mason らの研究の追試、もともとの GFlowNets、提案手法 1 の 3 方式が比較的高いクリア割合を示した。いずれも結合親和性に特化した最適化を行っているため、妥当な結果といえる。一方、提案手法 2 と提案手法 3 は他の特性ともバランスをとって最適化しているため、前述の 3 方式よりもクリア割合が若干低下した。ランダム生成は、他と比較して極端に低いクリア割合となったが、結合親和性に対する最適化をまったく行っていないため、やむを得ない結果である。

FabNetCharge のクリア割合は Mason らの研究の追試とランダム生成が低く、GFlowNets をベースとした 4 方式が比較的高い結果となった。GFlowNets の特徴である複数モードサンプリングにより、結合親和性が高い多様な配列を生成できた効果と考えられる。

溶解性は他の特性と比較して全体的にクリア割合が低い傾向となったが、その中でもランダム生成と提案手法 3 のクリア割合が突出して高かった。提案手法 3 は、突然変異の改良と報酬関数への複数評価項目組み込みの組み合わせが効果的なサンプリングに寄与したと考えられる。提案手法 2 では同様に溶解性を 15% の重みで報酬関数に組み込んだにもかかわらず、溶解性のクリア割合に 3 倍超の差異が生じているため、突然変異の改良と報酬関数への複数評価項目組み込みが相乗効果を生んでいる可能性がある。ランダム生成のクリア割合は一見高いようにみえるが、結合親和性や FabNetCharge のクリア割合と同程度であり、特定の特性に最適化していないがゆえにどの特性も均等にクリアする多様な配列になったと考えられる。

4.2 各評価項目の同時最適化の難易度について

本節では、GFlowNets をベースとした 4 方式において、各評価項目の同時最適化の難易度を確認する。図 9 は、ある 4 つの評価項目を同時にクリアした配列について、残り 1 つの評価項目の分布を示したものである。例えば、1 段目は FvCSP、FabNetCharge、HISum、溶解性を同時にクリアした配列について、結合親和性の分布をプロットしている。図中の赤線はスクリーニング条件を示しており、1 段目においては赤線より上側が結合親和性をクリアしていることを示す。

1 段目によると、結合親和性をクリアする配列はごく一部であり、他の 4 つの評価項目との同時最適化が難しいことが見てとれる。提案手法 2 は報酬関数に複数評価項目を組み込んでいるにもかかわらず、結合親和性のみを報酬関数としたもともとの GFlowNets や提案手法 2 よりもクリア割合が小さい。提案手法 2 の結合親和性の分布が提案手法 1 よりも広いことから、複数評価項目を平均的に満たすが、高い水準で満たす配列が少ないことを示唆している。同様の傾向は提案手法 2 の FabNetCharge (3 段目) においても見られ、提案手法 2 では同時最適化に限界があると考えられる。

一方、提案手法 3 の結合親和性は提案手法 1 と同様の分布を示しており、複数評価項目を同時に最適化しながら高い水準の結合親和性を持つ配列を生成している。溶解性 (5 段目) についても、他の 3 つの方式の分布がスクリーニング条件である 0.5 から乖離しているのに対し、提案手法 3 の分布は 0.5 に近い位置にある。以上のことから、提案手法 3 は、複数評価項目を高い水準で同時最適化できる手法であると考えられる。

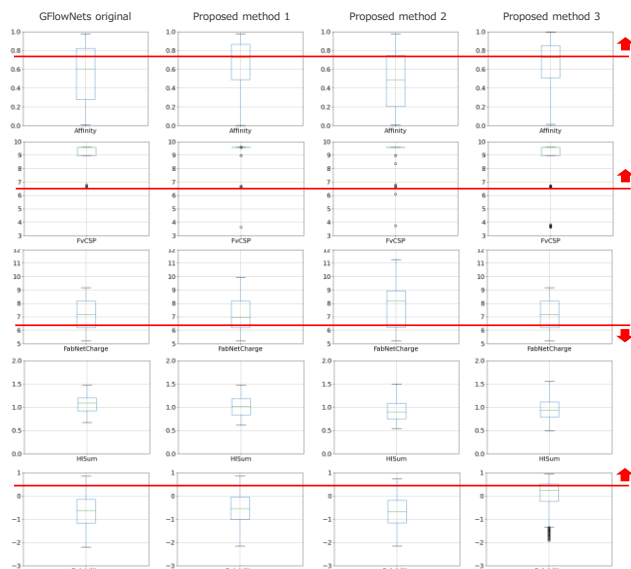


図 9 他の 4 つの評価項目を同時にクリアした配列の残り 1 つの評価項目の分布 (1 段目: 結合親和性、2 段目: FvCSP、3 段目: FabNetCharge、4 段目: HISum、5 段目: 溶解性)

5. おわりに

本報告では、ウェット実験による特性評価のクリア割合を向上するインシリコ配列生成を目的に、複数モードサンプリングを特徴とする生成モデル GFlowNets を抗体配列に適用する検討を行った。さらに、GFlowNets を抗体配列により適応させるため、突然変異の改良と報酬関数への複数評価項目組み込みを提案した。突然変異の改良については、一様分布の確率密度関数を用いて変異後のアミノ酸を選択すると特性が大きく異なる配列が生成されるという課題に対し、変異前のアミノ酸に疎水性インデックスに近いアミノ酸ほど発生頻度が高くなる確率密度関数を用いた。また、強化学習の報酬として結合親和性だけでなく粘性や溶解性の評価値を重み付き加算で組み込むこととした。これら提案手法で生成した配列を結合親和性、粘性、溶解性について評価した結果、3.99%の配列が評価をクリアすることを確認し、従来手法のクリア割合 0.35%を 10 倍上回った。

本報告でインシリコスクリーニングに用いた評価項目は、実際の抗体医薬開発で評価される項目の一部である。提案手法を用いて特性評価をクリアする配列数が 10 倍になれば、その分だけさらに他の特性評価を通過できる可能性が高まるため、効果は非常に大きい。抗体をはじめとするバイオ医薬の基礎研究においては候補薬生成の効率化が課題であり、インシリコでの配列生成によりウェット実験の回

数を削減し、費用や時間の効率化に寄与するものと考えられる。

今後の検討課題としては、Mason らの研究でインシリコスクリーニングに用いられている免疫原性について特性評価を行うことが挙げられる。免疫原性は体内に入った抗体を異物と認識し排除する生体反応で、実際の抗体医薬開発において候補薬が乗り越えるべき大きな障壁となっており、Mason らの研究でも多くの生成配列がこの評価段階で脱落している。免疫原性の評価環境を構築し、提案手法で生成した配列が免疫原性をどの程度クリアできるか検証する必要がある。

また、インシリコスクリーニングはウェット実験を完全に再現するものではなく、インシリコスクリーニングをクリアした配列がウェット実験では脱落することが起こりうる。提案手法で生成した配列がウェット実験による特性評価でも同等のクリア割合を実現可能か検証することも今後の課題である。

参考文献

- [1] 長野哲雄、“次世代医薬とバイオ医療”、東京化学同人(2022).
- [2] Saka, K.、“Antibody design using LSTM based deep generative model from phage display library for affinity maturation”、Sci Rep、Vol.11、No.1 (2021).
- [3] Amieur, T.、“Designing Feature-Controlled Humanoid Antibody Discovery Libraries Using Generative Adversarial Networks”、bioRxiv (2020).
- [4] Mason, D.M.、“Deep learning enables therapeutic antibody optimization in mammalian cells by deciphering high-dimensional protein sequence space”、bioRxiv (2019).
- [5] Zhang, D.、“Generative Flow Networks for Discrete Probabilistic Modeling”、arXiv (2022).
- [6] Jain, M.、“Biological Sequence Design with GFlowNets”、arXiv (2022).
- [7] Bengio, Y.、“GFlowNet Foundations”、arXiv (2021).
- [8] Bengio, E.、“Flow Network based Generative Models for Non-Iterative Diverse Candidate Generation”、arXiv (2021).
- [9] Brandes, N.、“ProteinBERT: a universal deep-learning model of protein sequence and function. Bioinformatics”、Bioinformatics、Vol.38、No.8 (2022).
- [10] Eisenberg, D.、“Amino acid scale: Normalized consensus hydrophobicity scale”、J Mol Biol、Vol.179 (1984).
- [11] Sharma, V.K.、“In silico selection of therapeutic antibodies for development: Viscosity, clearance, and chemical stability”、Proceedings of the National Academy of Sciences、Vol.111、No.52 (2014).
- [12] Sormanni, P.、“The CamSol Method of Rational Design of Protein Mutants with Enhanced Solubility”、Journal of Molecular Biology、Vol.427、No.2 (2015).
- [13] Sormanni, P.、“Rapid and accurate in silico solubility screening of a monoclonal antibody library”、Scientific Reports、Vol.7、No.1 (2017).
- [14] Wolf Pérez、“In vitro and in silico assessment of the developability of a designed monoclonal antibody library”、mAbs、Vol.11、No.2 (2019).
- [15] <https://github.com/MJ10/BioSeq-GFN-AL>
- [16] https://github.com/dahjan/DMS_opt