

令和元年6月17日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09838

研究課題名(和文) T細胞リンパ腫の細胞膜レセプターを標的とする新規抗体療法の開発

研究課題名(英文) Establish the new method for making antibody binding to cell membrane receptor in T cell lymphoma

研究代表者

渡部 敦 (WATANABE, ATSUSHI)

秋田大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80567157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、皮膚悪性リンパ腫で発現が亢進している細胞膜レセプターCCR6に対する抗体を作成する手法の開発を目的とした。抗原認識部(Fab)を有するファージライブラリをCCR6発現させた細胞で選別し、ELISA法で特異的な結合力を持つ10種類のFab配列を同定した。細胞を用いた標的抗原では目的としないファージの混入が避けられなかったが、CCR6非発現細胞による除去を繰り返し行う事で効率的な選別が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞膜に対する抗体選別は標的に目的以外の分子が多数含まれるため、期待しない部分へ結合する候補をいかに取り除くかが課題であった。本研究で用いた手法により、CCR6のみならず他の細胞膜レセプターに対する抗体作成へ応用が可能であり、近年注目される抗体治療の開発に寄与できると考える。免疫という生体が本来有している強力なツールである抗体治療は、腫瘍選択的な抗腫瘍薬として治療効果の向上と、副作用の軽減につながる可能性を有しており、本研究はその基礎部分に貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：This study aims to establish the new methods for phage library selection with whole cells.

CCR6 is one of the cell membrane receptors highly expressed in the cutaneous lymphoma cells. Phage display library selection was performed with whole cells selection and ELISA. 10 candidate clones were detected. We considered that negative selection with no-expressed cells was effective to remove contaminated phages which bound to unexpected part of the cell membrane.

研究分野：血液内科

キーワード：抗体作成 ファージライブラリ 悪性リンパ腫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗体はヒトの体内における最高の免疫防御機構であるとともに、その抗原結合能力から生命現象をタンパク質レベルで解析するための重要なツールとして、研究および診断領域において幅広く活用されている。近年では、悪性腫瘍の治療薬として幾つかのモノクローナル抗体製剤が開発され、大きな治療効果をあげ生命予後の改善に寄与している。しかし、それらの対象となる疾患は未だ限られており、多くの癌腫において新規の抗体治療薬の開発が待ち望まれている。抗体の選別には設備、費用、時間がかかるため、効率的な手法の確立が良質の抗体作成には不可欠である。ファージディスプレイライブラリを用いた新規抗体の作成技術は、McCafferty らにより初めて報告され(Nature 348,p552-554,1990)、従来の動物細胞やハイブリドーマを用いた場合よりも効率的にヒトモノクローナル抗体を同定できる手法として注目されている。この手法において、良質な抗体クローンの選別はライブラリクローンのサイズ(多様性)に依存するが、Raffi らにより抗原認識部位である抗体フラグメント(Fab)を発現するM13 ファージミドに、Kunkel 法を用いた塩基配列変異を用いることで、ヒトが本来有していると言われている抗体多様性の 10E8 クロウンを大きく上回るサイズのライブラリ作成法が可能となった(Nature protocols 2,1368-1386,2007)。本研究では、サスカチュワン大学において作成された 10E10 の多様性を持つファージディスプレイライブラリの提供を受け、細胞膜レセプターに対する抗体の作成を行う事をめざした。細胞表面レセプターは細胞内シグナルの開始部位にあたり、G 蛋白受容体をはじめとする様々な受容体が細胞の生理機能活性に大きな役割を果たしている。とくに悪性腫瘍においては過剰発現や変異を持ち活性化した Her2 や EGFR などの受容体が治療の標的として注目されている。血液腫瘍においては CD20 や CCR4 に対する抗体製剤が製品化され、一部の B 細胞リンパ腫と HTLV-I 関連のリンパ系腫瘍が対象となっているが、T 細胞性リンパ腫などその他多数のリンパ腫では有効な標的レセプターの報告はなく抗体の作成には繋がっていない。本研究者は皮膚 T 細胞リンパ腫の表面に腫瘍特異的に CCR6 の発現が亢進している事を既報で見出しており(Ikeda et al. Oncotarget p13563-13574, 2016)、抗体治療の標的になり得ると考えた。

2. 研究の目的

抗原認識部位である抗体フラグメント(Fab)を発現したファージライブラリを用いて、腫瘍細胞に特異的に発現している細胞膜レセプターに対して強い結合力を持つファージを選別し、そのファージが有する Fab 領域のアミノ酸配列を DNA シーケンスから同定するものである。得られた配列を、抗体作成用ベクタープラスミドに挿入しモノクローナル抗体の作成につなげる。生体内で抗腫瘍活性を発揮するためには、細胞膜レセプターの立体構造を認識する抗体である必要があり、セレクションに用いる標的抗原の選定と効率的なファージ選別手法の確立を目標とした。

3. 研究の方法

1) 標的抗原 CCR6 発現 HEK293FT 細胞の調整

標的となる細胞膜レセプターCCR6 をウイルス様粒子(VLP) および HEK293FT 細胞に発現させ標的抗原として使用した。CCR6 の配列は皮膚 T 細胞リンパ腫細胞株(Myla 株)より RNA を抽出後 cDNA を作成し pcDNA3.3 ベクターにクローニングした。PEI を用いて HEK293FT 細胞に導入し 24 時間経過後に trypsin を用いて培養容器より剥離し、培養液に浮遊状態に調整しセレクションおよび ELISA に用いた。

2) ファージライブラリの調整

Fab を発現したファージディスプレイライブラリは、サスカチュワン大学から提供を受けた。抗原認識領域(CDR) L3 および H3 領域の多様性を有し、10E10 の多様性を持つファージライブラリを各ラウンドに 1x10E12 ファージを使用した。ライブラリのデザインを (Fig.1) に示す。

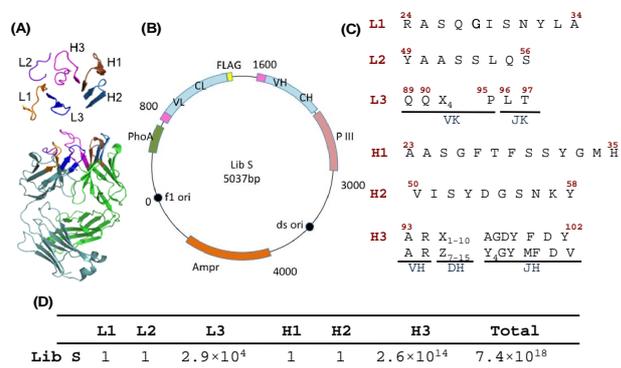


Fig.1 Library Design

(A) Fabの立体構造 (B) Phagemidのベクターマップ

(C) 可変領域のアミノ酸配列 (D) ライブラリの有する多様性

3) セレクションの方法

CCR6 発現 VLP を標的としたセレクションは in-solution 法 (Verheesen et al. Methods. Mol. Biol, p81-104, 2012) を改変して行った。CCR6 発現 HEK293FT 細胞を標的としたセレクションは (Ridgway et al. Cancer res. P2718-2723, 1999) を改変し浮遊細胞状態で行った。セレクションは 15ml チューブの中でファージとともに回転数 10 / 分とし、反応後は細胞を遠心し沈殿させ新しいチューブに移動させ浮遊させた。各ラウンド終了後にファージ力価の確認とファージの回収と培養を行い、計 3 ラウンドのセレクションを行った。

4) direct phage-ELISA による最終セレクション

3 ラウンドのセレクション後のファージから single clone を回収し、それぞれからファージを生成しファージプラスミドの回収を行った。96 プレートに CCR6 発現 HEK293FT 細胞と正常 HEK293FT 細胞を 1 対で準備し single clone から生成されたファージをそれぞれ反応させ AntiM13 抗体を用いた ELISA 法でファージの結合力の確認を行った。得られた ELISA から CCR6 発現 HEK293FT 細胞に特異的に結合する clone を同定し、それぞれ CDR-L3, CDR-H3 領域の DNA 配列の解析し該当するアミノ酸配列を同定した。

4. 研究成果

本研究開始時に用いた VLP を標的としたファージセレクションでは、CCR6 に特異的な結合を示すファージを同定する事ができなかった。これは目的とする細胞膜レセプター部分以外の細胞膜成分へのファージ結合が多いためと考えられた。CCR6 を発現しない VLP によるネガティブセレクションを加える事で不要なファージの除去を試みたが、VLP の固定と回収が難しく十分なセレクションが行えなかった。そこで CCR6 を HEK293FT 細胞に発現させ標的とする、細胞ベースのセレクションに方法を変更した。

チューブ内で正常の HEK293FT 細胞による複数回の十分なネガティブセレクションと CCR6 発現 HEK293FT 細胞によるポジティブセレクションを 1 ラウンドとし計 3 ラウンド行った。回収されたファージ力価からはラウンド 3 においても相当数のファージがネガティブセレクションで除去されており、絞り込みが不十分である事が推測された。(Fig.2)

3 ラウンド後に回収されたファージをそれぞれ培養し、direct Phage-ELISA を行った。372 の個別のファージのうち、CCR6 発現細胞に強い結合力を示しコントロール細胞への結合を認めない 28 クローンを選別し、強い結合を示した上位 10 クローンの DNA 配列を同定した (Fig.3)。うち 2 クローンでは H3 領域で同じ配列を示しており、CCR6 に特異的な配列の可能性があると考えられた。これらのアミノ酸配列を持つ Fab フラグメントを生成し CCR6 への結合力を確認する予定である。

本研究の成果として、細胞を用いたセレクション手法の確立が挙げられる。標的分子が不純物を含まなければセレクションは容易であるが、標的が細胞膜レセプターの場合は、その立体構造を保持する必要があるため、標的以外の細胞膜成分が含まれてしまい不要なファージの混入が多くなってしまふ。今回、チューブ内で浮遊細胞を用いたセレクションを行った事で、簡単な操作で十分なネガティブセレクションが可能となり、チューブを交換することで容器部分に対する非特異的な結合ファージも除去する事が出来たと考える。

本研究の最終目標である抗腫瘍効果を持つ抗 CCR6 抗体の作成に向けて、今回得られた 10 クローンの配列から Fab フラグメントを作成し、抗体候補の選別を行う予定である。T 細胞リンパ腫は現在まで有効な治療法が確立されておらず、新規抗体の開発は治療戦略に大きな影響を与えることが期待される。さらに本研究で確立された手法が CCR6 のみならず他の細胞膜レセプターに対する抗体作成に応用可能であると考えられる。今後も本研究は継続し最終的な抗体作成までつなげていきたい。

5. 主な発表論文等

現在、上記結果をまとめ学会発表する準備を進めている。

[雑誌論文](計 0 件)

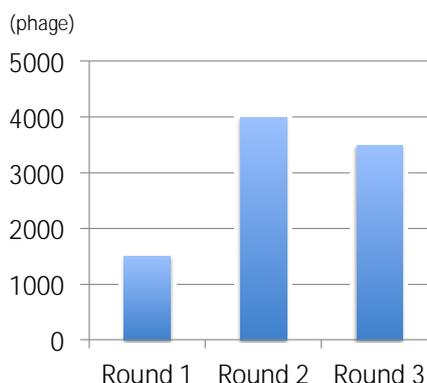


Fig2. Harvested Phage particles

	L3	H3
Phage1	AYYSHAGPI	SG (6アミノ酸)
Phage2	FGAPF	RT (10アミノ酸)
Phage3	VYGSVPF	---
Phage4	SSYSLI	YY (6アミノ酸)
Phage5	AAVWVHPF	TV (13アミノ酸)
Phage6	SPYPI	SS (10アミノ酸)
Phage7	YYYPYLF	TV (7アミノ酸)
Phage8	YYVWPI	TV (13アミノ酸)
Phage9	YYPFSFSLI	PS (9アミノ酸)
Phage10	AGAPF	YY (9アミノ酸)

Fig3. 10クローンの変領域 CDR-L3, H3の配列

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕 なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：田川 博之

ローマ字氏名：TAGAWA HIROYUKI

所属研究機関名：秋田大学

部局名：医学系研究科

職名：非常勤講師

研究者番号(8桁)：30373492

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。