

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14486

研究課題名(和文)動物細胞内での細胞内抗体選択法の開発

研究課題名(英文)Development of intrabody selection technology in mammalian cells

研究代表者

長棟 輝行(Nagamune, Teruyuki)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・教授

研究者番号：20124373

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):本研究では次世代抗体医薬品の創製を目指して、動物細胞の細胞質内に発現させた蛋白質抗原に対する細胞内抗体を迅速、かつ直接的に選択することが可能な汎用的新規選択法の開発を行った。抗原と結合することにより増殖シグナルを伝達する人工受容体として、単鎖抗体scFvのナイーブラライブラリーと受容体c-kitの細胞内ドメインを柔軟なG4Sリンカーで連結したキメラ受容体ライブラリーを構築した。このキメラ受容体をモデル抗原である狂犬病ウイルス由来の核蛋白質とともにIL-3依存性の動物細胞Ba/F3内で発現させ、IL-3非存在下の培養条件で増殖してきた細胞から、抗原蛋白質に結合するscFvを取得することに成功した。

研究成果の概要(英文):In this study, for the development of next-generation antibody drug, we developed a novel versatile intrabody selection method, which can select intrabody against antigen protein expressed in the cytosol of mammalian cells rapidly and directly. We constructed a chimeric receptor library, which can transduce growth signal by binding to antigen, by conjugating naive library of single chain antibody scFv and intracellular domain of receptor c-kit through flexible linker G4S. We expressed this chimeric receptor library together with a model antigen, the nucleoprotein of a rabies virus, in IL-3 dependent mammalian cell Ba/F3, and successfully obtained several scFv binders against the antigen protein from proliferated cells under IL-3 deficient culture condition.

研究分野：バイオテクノロジー、細胞工学

キーワード：バイオテクノロジー キメラ受容体 細胞内抗体スクリーニング 細胞内蛋白質間相互作用検出 細胞アレイ

1. 研究開始当初の背景

これまで開発されてきた抗体医薬品は、細胞膜表面や細胞外に存在する抗原を認識し結合する抗体である。このような抗体医薬品の開発について、全世界では44種類の抗体医薬と約400件の抗体を用いた臨床試験が国際的に展開されているが、これらの抗体医薬が標的とする抗原はわずか34種に集中しており、標的抗原の枯渇により抗体医薬の開発は早晚行き詰まらざるを得ないと懸念されている。このような背景のもと、新たな標的抗原ソースとして細胞内蛋白質が注目されている。例えば、ウイルス感染症であれば感染した宿主細胞内でのウイルス複製過程に関わるウイルス由来蛋白質、がんのような情報伝達の異常に基づく疾患であれば細胞内の変異情報伝達蛋白質を標的とした新規な抗体医薬品の開発が期待されている。しかし、細胞内で発現する蛋白質に対する抗体(細胞内抗体: intrabody)を細胞内で直接選択する技術の開発例は極めて少なく、細胞内抗体を細胞内で迅速に、かつ直接選択可能な汎用的な新規選択法の開発が求められていた。

申請者は、これまでに増殖因子受容体のリガンド結合ドメインを抗体可変領域に置換したキメラ受容体の抗原結合依存的な増殖シグナル伝達機能を利用して、抗体可変領域をライブラリー化したキメラ受容体を細胞膜に発現させた動物細胞ライブラリーから、抗原に特異的に結合するキメラ受容体を発現する細胞を選択的に増殖させることにより濃縮・取得する技術を開発してきた。このキメラ受容体を細胞内で発現させることにより、細胞内の還元的かつ分子クラウディング環境下において、細胞内抗原に対する細胞内抗体を細胞の増殖によって直接選択可能な新規スクリーニング技術(図1)の開発が期待できる。

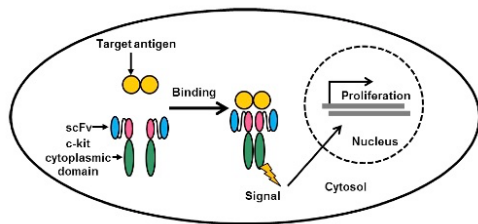


図1 細胞増殖を指標とする scFv-c-kit キメラ受容体を用いた細胞内抗体スクリーニング技術

2. 研究の目的

抗体は創薬開発の知見を得るためのツールとして、また従来の治療法ではなし得なかった難治性疾患治療の特効薬として、産業的にも社会的にもニーズが大きく高まってきている。既存の抗体の選択技術としてはハイブリドーマ法やファージディスプレイ法が挙げられるが、これらの抗体選択法では、抗原をプ

レート表面に固定化し、細胞外の酸化的環境下で抗体を選択する。一方、細胞内蛋白質を創薬標的として、その機能阻害に抗体を応用する際には、細胞内の還元的かつ分子クラウディング環境下で機能を発揮する細胞内抗体が必要となるが、既存の方法によって選択された抗体の多くは分子内のS-S結合が還元され細胞内では一般的に不安定であるため、細胞内抗体として機能する抗体をさらに選択する必要が有る。また、細胞内蛋白質は一般的に分離精製過程やプレート表面への固定化過程で変性し易く、抗原となる細胞内蛋白質の正常な立体構造を維持した状態で抗体選択を行うことには困難を伴う。そこで、本研究では次世代抗体医薬品の創製を目指して、細胞内に発現させた蛋白質抗原に対する細胞内抗体を細胞内で迅速、かつ直接的に選択可能な汎用的な新規選択法の開発を目標とする。

3. 研究の方法

(1) scFv-c-kit キメラ受容体を用いた細胞内抗体のライブラリースクリーニング技術の開発

インターロイキン 3 (IL-3) 依存性マウス細胞株である Ba/F3 細胞に、モデル細胞内抗原として狂犬病ウイルス核蛋白質 (RV-N) を恒常発現させた細胞株を作製した。次に、増殖シグナル伝達型キメラ受容体を用いた細胞内抗体ライブラリースクリーニング技術を開発するために、ヒト合成ナイーブ scFv ライブラリーである Tomlinson I ライブラリーを c-kit 細胞内ドメイン(c-kit ICD)に連結したキメラ受容体(scFv-c-kit)ライブラリー発現レトロウイルスベクターを構築した。作製したライブラリーベクターを抗原発現細胞株に導入し、IL-3 を除去した培地中で選択培養し、キメラ受容体由来の増殖シグナルが伝達されている細胞を選択した。得られた細胞からゲノムを抽出し、scFv 配列を複数同定した。これらの scFv クローンの抗原特異性を検証するために、各 scFv クローンをキメラ受容体発現ベクターに再度組み込み、抗原非発現細胞および発現細胞に導入し、IL-3 を除去した培地での増殖アッセイ、増殖細胞の抽出液中の scFv-c-kit の免疫沈降法による抗原結合性評価を行った(図2)。

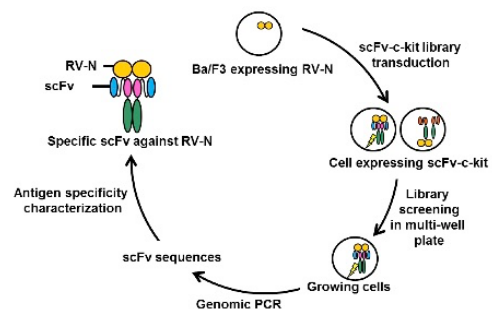


図2 細胞増殖を指標とする細胞内抗原特異的キメラ受容体のライブラリースクリーニング

また、キメラ受容体からの運動性シグナルに基づく Ba/F3 細胞の運動性の亢進を指標に、ハイスループットに細胞内抗体を選択する技術の可能性を検証するために、モデル系としてキメラ受容体の scFv 部分を小分子 AP20187 依存的二量体形成ドメインである FK506 結合蛋白質 FKBP12 の変異体 FKBP_{F36V} に、また c-kit ICD 部分を c-Mpl 細胞内ドメインに置き換えたキメラ受容体 FKBP_{F36V}-c-Mpl を構築した。このキメラ受容体を細胞内に発現する細胞株を光分解性 BAM 基板上に固定化し、IL-3 非存在下、低血清条件下で数時間培養し、その後 AP20187 を添加してキメラ受容体の二量体を形成させ、細胞の運動性を評価した。

(2) 細胞増殖を指標とした細胞内蛋白質間相互作用検出技術の開発

細胞内蛋白質間の相互作用を阻害する細胞内抗体をライブラリースクリーニングするための前段階として、細胞増殖を指標として細胞内蛋白質間の相互作用を高感度検出するためのキメラ受容体を構築した。このような系が構築できれば、細胞内抗体ライブラリーを導入したキメラ受容体発現細胞の増殖抑制効果を指標に、細胞内蛋白質間の相互作用に対する様々な阻害活性を持つ細胞内抗体の取得が期待できる。本研究では、細胞内蛋白質間相互作用のモデル系として、AP20187 依存的二量体形成ドメインである FKBP_{F36V} と c-kit ICD との間にインフルエンザウイルス A 由来の RNA ポリメラーゼのサブユニット A とサブユニット B1 の会合に関わる A サブユニット C 末端ドメイン (267-716) PA_C と B1 サブユニット N 末端フラグメント (1-15 残基) PB1_N を挿入したキメラ受容体をそれぞれ構築した。これらの受容体どちらか一方あるいは両方を Ba/F3 細胞に導入し、IL-3 を含まない RMPI 培地に FKBP_{F36V} の二量体形成を促進する小分子リガンド AP20187 を 0~100nM 加えた条件で 76 時間培養し、細胞増殖量を指標として PA_C と PB1_N との細胞内での相互作用の検出を試みた (図 3)。

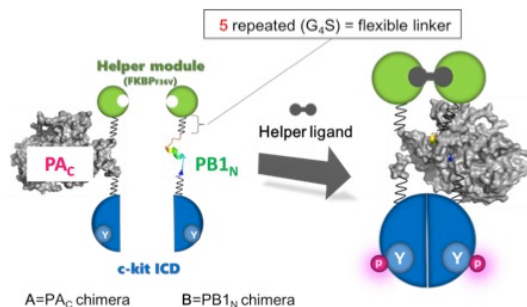


図3 細胞内の蛋白質間 (PA_C-PB1_N) 相互作用検出のためのキメラ受容体 A, B の構成

4. 研究成果

(1) scFv-c-kit キメラ受容体を用いた細胞内抗体のライブラリースクリーニング技術の開発

キメラ受容体ライブラリー発現レトロウイルスベクターを抗原 RV-N 恒常発現 Ba/F3 細胞に導入し、IL-3 を除去した培地中で選択培養し、キメラ受容体由来の増殖シグナルが伝達されている細胞を選択した。得られた細胞からゲノムを抽出し、scFv 配列を複数同定した。これらの scFv クローンの抗原特異性を検証するために、各 scFv クローンをキメラ受容体発現ベクターに再度組み込み、抗原非発現細胞 (Ba/F3) および発現細胞 (Ba/N) に導入し、IL-3 を除去した培地で増殖アッセイを行った。その結果、抗原依存的に増殖誘導するクローン (S#)、抗原の有無にかかわらず増殖誘導する偽陽性クローン (C#)、抗原の有無にかかわらず増殖誘導しないクローン (NF#) の 3 通りのクローン群に大別された (図 4)。

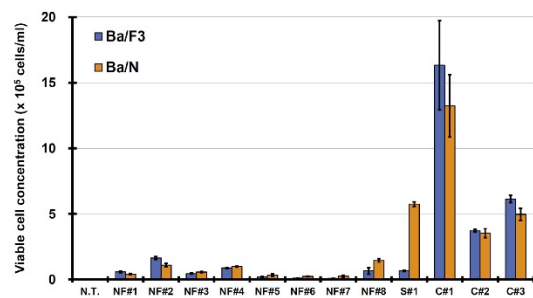


図4 細胞 Ba/F3 と Ba/N に導入した各キメラ受容体クローン増殖促進活性の抗原依存性の比較

免疫沈降法を行った結果、抗原依存的に増殖誘導するクローンのみならず、抗原の有無にかかわらず増殖誘導するクローンも抗原結合性を有していることが分かった (図 5)。

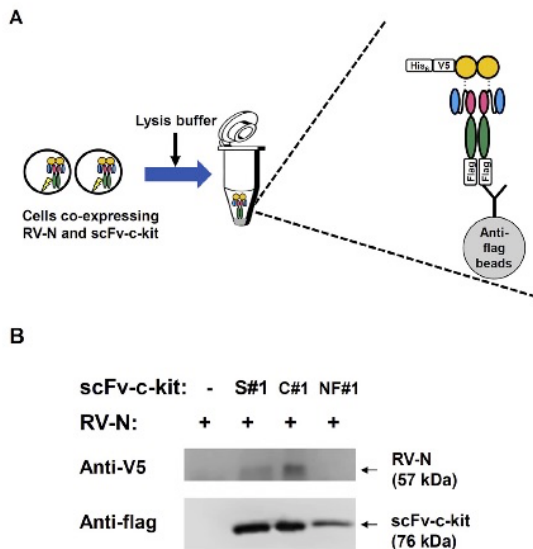


図5 キメラ受容体クローン C#1, S#1 の免疫共沈降法 (A) による抗原結合性の評価 (B)

そこで、キメラ受容体の抗原非特異的な増殖活性を抑え、偽陽性クローンを減少させるために、scFv と c-kit ICD の間にフレキシブルリンカー (G₄S)_n (n=1~3) を挟んだキメラ受容体を構築して評価した。その結果、S#1 ク

ローン、C#1 クローンのいずれの場合でも、 $(G_4S)_1$ のリンカーを導入した キメラ受容体 scFv-F1-c-kit で抗原非依存的な増殖活性が抑えられ、細胞内抗原との相互作用特異的に細胞増殖シグナルが伝達されることが明らかとなった (図6)。

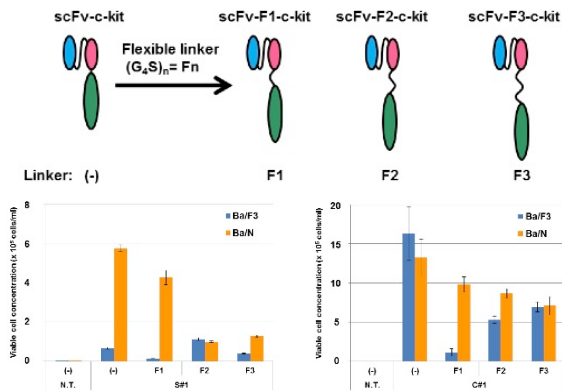


図6 キメラ受容体中のフレキシブルリンカー長が抗原特異的細胞増殖に及ぼす影響

したがって、キメラ受容体 scFv-F1-c-kit ライブラリーを用いることによって、偽陽性クローンの出現を抑制し、細胞内抗原に対する結合活性を有するキメラ受容体の細胞増殖促進効果を指標として、効率的にライブラリースクリーニングできると期待される。

次に、運動性シグナルを伝達することが予想されるキメラ受容体 FKBP_{F36V}-c-Mp1 を発現する Ba/F3 細胞を光分解性 BAM 基板に固定化し、IL-3 非存在下、低血清条件下で数時間培養し、その後に AP20187 を添加してキメラ受容体を二量体形成させ、細胞の運動性を評価した。しかし、細胞の運動性の亢進はほとんど見られなかった。細胞運動性の亢進が見られなかった理由としては、キメラ受容体の AP20187 依存的な二量体形成が起こっていない可能性、二量体形成が起こっていても十分な運動性シグナルを伝達することができる c-Mp1 細胞内ドメイン同士の二量体構造が形成されていない可能性などが考えられる。

(2) 細胞増殖を指標とした細胞内蛋白質間相互作用検出技術の開発

細胞内蛋白質間相互作用検出系のモデルとして、インフルエンザ A の RNA ポリメラーゼサブユニット由来のフラグメント PA_C 及び PB1_N の細胞内での相互作用の検出を試みた。PA_C を含むキメラ受容体 A 及び PB1_N を含むキメラ受容体 B を共発現した細胞 (A+B) において、小分子リガンド AP20187 濃度 (0~100 nM) 依存的な有意な細胞増殖が確認された。また AP20187 を添加しない場合においても細胞増殖が確認された。この増殖活性は PA_C と PB1_N の相互作用のみに起因するキメラ受容体 A、B の二量体形成によるものと考えられる。その一方で、それぞれのキメラ受容体を単独で導入した細胞 (A または B) では、AP20187 の添加の有無に関わらず、いずれの細胞でも増

殖は全く見られなかった (図7)。

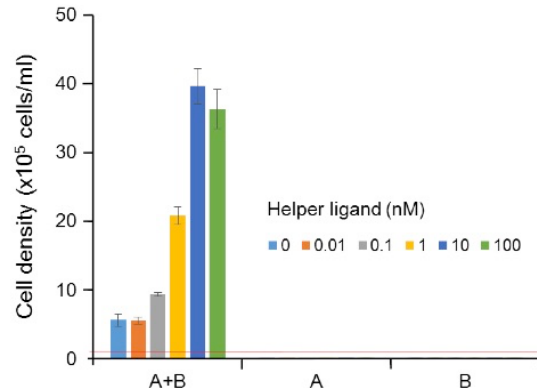


図7 リガンド AP20187 濃度がキメラ受容体導入細胞の増殖能に及ぼす影響

表面プラズモン共鳴法を用いた分子間相互作用解析結果では PA_C と PB1_N の相互作用の解離定数は 43 nM であり、極めて親和性が高いことが報告されている。そのため、この AP20187 非存在下の細胞増殖能は PA_C と PB1_N の相互作用の解離定数が極めて小さく、親和性が高いことを反映していると考えられる。さらに AP20187 の FKBP_{F36V} に対する解離定数値である 0.09nM の近傍の AP20187 濃度 (0.1 nM) から細胞増殖の促進効果が見られることから、AP20187 濃度依存的に FKBP_{F36V} が二量体を形成し、キメラ受容体中の PA_C と PB1_N の相互作用様式が分子間相互作用から、FKBP_{F36V} を介して二量体形成したキメラ受容体 A-B の分子内相互作用に変化していると推察される。すなわち、分子内相互作用の場合には、分子間相互作用の場合と比べて PA_C に対する PB1_N の見かけ上の濃度が増加するために、細胞内の PA_C と PB1_N の複合体量が増加し、強い増殖シグナルが伝達された可能性がある。したがって、本技術を用いれば、AP20187 濃度によって細胞内蛋白質間相互作用の検出感を調整することが可能であり、極めて弱い相互作用から強い相互作用まで、広いダイナミックレンジで細胞内蛋白質間相互作用を検出することができる。このようなキメラ受容体を発現する細胞に細胞内抗体ライブラリーを共発現させ、増殖抑制効果を指標に、細胞内蛋白質間の相互作用に対して様々な阻害活性を持つ細胞内抗体の取得も期待できる。

さらに、キメラ受容体の PA_C と PB1_N の部分を抗原蛋白質と細胞内抗体ライブラリーに置き換えたキメラ受容体を細胞内で発現させ、AP20187 濃度を低濃度から高濃度まで種々に変化させた条件で培養することにより、増殖細胞から抗原蛋白質に対して高い親和性を持つ細胞内抗体から低い親和性を持つ細胞内抗体まで、種々の親和性を持つ細胞内抗体を選択できる可能性がある。

このように、本研究で開発した細胞内蛋白質間相互作用検出技術は、細胞内抗体の選択技術にも応用可能な有望な基盤技術である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Daiki Kashima, Raiji Kawade, Teruyuki Nagamune, Masahiro Kawahara, “A chemically inducible helper module for detecting protein-protein interactions with tunable sensitivity based on KIPPIS”, *Anal. Chem.*, **89**, 4824-4830 (2017).

doi: 10.1021/acs.analchem.6b04063 (査読あり)

2. Thuy Duong Nguyen, Hitoshi Takasuka, Yoshihiro Kaku, Satoshi Inoue, Teruyuki Nagamune, Masahiro Kawahara, “Engineering a growth sensor to select intracellular antibodies in the cytosol of mammalian cells”, *J. Biosci. Bioeng.*, **124**, 125-132 (2017).

doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.02.017 (査読あり)

3. Tomohiro Miura, Teruyuki Nagamune, Masahiro Kawahara, “Ligand-inducible dimeric antibody for selecting antibodies against a membrane protein based on mammalian cell proliferation”, *Biotechnol. Bioeng.*, **113**, 1113-1123 (2016).

doi: 10.1002/bit.25858 (査読あり)

4. Songhee Lee, Yoshihiro Kaku, Satoshi Inoue, Teruyuki Nagamune, Masahiro Kawahara, “Growth signalobody selects functional intrabodies in the mammalian cytoplasm”, *Biotechnol. J.*, **11**, 565-573 (2016).

doi: 10.1002/biot.201500364 (査読あり)

[学会発表] (計 20 件)

1. Daiki Kashima, Raiji Kawade, Teruyuki Nagamune, Masahiro Kawahara, “A novel cell-based intracellular protein-protein interaction detection platform (KIPPIS) for intrabody screening”, *Antibody Engineering & Therapeutics 2017*, 2017.12.12, San Diego (U.S.A.)

2. 鹿島大揮, 河出来時, 長棟輝行, 河原正造, “細胞増殖を指標とした細胞内タンパク質間相互作用検出系 (KIPPIS) の構築と阻害剤探索への展開”, 生命科学系学会合同年次大会(第40回日本分子生物学会年会 第90回日本生化学会大会), 2017.12.8, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

3. 江口晃弘, 長棟輝行, 河原正造, “狙った結合部位上における抗体親和性成熟系の開発”, 生命科学系学会合同年次大会(第40回日本分子生物学会年会 第90回日本生化学会大会), 2017.12.8, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

4. 垣内洋祐, 長棟輝行, 河原正造, “キメ

ラ受容体の細胞内局在最適化による高感度タンパク質間相互作用検出系の確立”, “狙った結合部位上における抗体親和性成熟系の開発”, 生命科学系学会合同年次大会(第40回日本分子生物学会年会 第90回日本生化学会大会), 2017.12.6, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

5. コンクローン トーン タットポーン, 長棟輝行, 河原正造, “On-target シグナル伝達分子の特異的活性化を目的としたデザイナー受容体の開発”, 生命科学系学会合同年次大会(第40回日本分子生物学会年会 第90回日本生化学会大会), 2017.12.6, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

6. 河原正造, グエン トゥイズオン, 李松熹, 高須賀 仁, 長棟輝行, “受容体の分子改変による細胞内抗体選別法の開発”, 化学工学会第49回秋季大会, 2017.9.22, 名古屋大学東山キャンパス(愛知県・名古屋市)

7. Tatphon Kongrongtong, Teruyuki Nagamune, Masahiro Kawahara, “Synthetic Control of Mammalian Cell Signaling by Engineering Receptor Tyrosine Kinase”, *The 13th Asian Congress on Biotechnology*, 2017.7.25, Kohn Kaen (Thailand)

8. 鹿島大揮, 河出来時, 河原正造, 長棟輝行, “細胞内タンパク質間相互作用検出系の構築と阻害剤探索への展開”, 生物学若手研究者の集い-夏のセミナー2017, 2017.7.3, ツネイシしまなみビレッジ(広島県・福山市)

9. Thuy Duong Nguyen, Teruyuki Nagamune, Masahiro Kawahara, “Developing a suicide switch for improving quality of scFv libraries”, *Antibody Engineering & Therapeutics 2016*, 2016.12.13, San Diego (U.S.A.)

10. 鹿島大揮, 河出来時, 長棟輝行, 河原正造, “細胞内タンパク質間相互作用検出系のホモ二量体化ヘルパーモジュールを利用した高感度化”, 「細胞を創る」研究会 9.0, 2016.11.21, 早稲田大学西早稲田キャンパス(東京都・新宿区)

11. Akihiro Eguchi, Teruyuki Nagamune, Masahiro Kawahara, “Development of an Epitope-selective Antibody Selection System using a cell death signal”, *The 29th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology*, 2016.11.12, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

12. Daiki Kashima, Raiji Kawade, Teruyuki Nagamune, Masahiro Kawahara, “Highly sensitive detection of intracellular protein - protein interactions by fusing

chemically inducible homo-dimeric module”, The 29th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, 2016.11.11, 神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）

13. Masahiro Kawahara, Satoru Mabe, Teruyuki Nagamune, “KIPPIS: Probing intracellular protein-protein interactions with mammalian cell growth”, The 22nd Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community, 2016.10.28, フェニックスシーガイヤリゾート（宮崎県・宮崎市）

14. Kongkrongtong Tatphon, 長棟輝行, 河原正浩, “シグナル伝達分子の特異的活性化を目的とした新規受容体の開発”, 第 68 回日本生物工学会大会, 2016. 9. 30, 富山国際会議場（富山県・富山市）

15. 江口晃弘, 長棟輝行, 河原正浩, “細胞死シグナルを利用したタンパク質間相互作用阻害分子選択法の開発”, 第 68 回日本生物工学会大会, 2016. 9. 30, 富山国際会議場（富山県・富山市）

16. 鹿島大揮, 河出来時, 長棟輝行, 河原正浩, “ホモ二量体化モジュールの導入による細胞内タンパク質間相互作用検出の高感度化”, 第 68 回日本生物工学会大会, 2016. 9. 30, 富山国際会議場（富山県・富山市）

17. Thuy Duong Nguyen, Yoshihiro Kaku, Satoshi Inoue, Teruyuki Nagamune, Masahiro Kawahara, “Engineering a growth sensor to detect antigen-antibody interactions in mammalian cells”, 2016 Synthetic Biology: Engineering, Evolution and Design (SEED), 2016.7.19, Chicago (U.S.A.)

18. Kongkrongtong Tatphon, 長棟輝行, 河原正浩, “シグナル伝達分子の特異的活性化を目的とする新たなシグナルスキヤフォールドの開発”, 2016 年度生物工学若手研究者の集い（若手会）夏のセミナー, 2016. 7. 16, ホテルコンチネンタル府中（東京都・府中市）

19. 垣内洋祐, 長棟輝行, 河原正浩, “細胞内局在制御による高感度タンパク質間相互作用解析”, 2016 年度生物工学若手研究者の集い（若手会）夏のセミナー, 2016. 7. 16, ホテルコンチネンタル府中（東京都・府中市）

20. 鹿島大揮, 長棟輝行, 河原正浩, “哺乳類細胞質内を反応場とした細胞内抗体選択プラットフォームの開発”, 2016 年度生物工学若手研究者の集い（若手会）夏のセミナー, 2016. 7. 16, ホテルコンチネンタル府中（東京都・府中市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長棟 輝行 (NAGAMUNE, Teruyuki)
東京大学・大学院工学系研究科・教授
研究者番号：20124373

(3) 連携研究者

河原 正浩 (KAWAHARA, Masahiro)
東京大学・大学院工学系研究科・准教授
研究者番号：50345097