

令和元年6月14日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19007

研究課題名(和文)抗膜蛋白質抗体の特異性成熟系の構築

研究課題名(英文) Construction of a system to attain affinity maturation of anti-membrane protein antibodies

研究代表者

河原 正浩 (Kawahara, Masahiro)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・准教授

研究者番号：50345097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：膜蛋白質は医療における重要なターゲットであり、膜蛋白質抗原に対する高特異性・高親和性抗体を迅速・簡便かつ確実に取得する系の開発が必要とされている。そこで本研究では、動物細胞膜上に提示させた標的膜蛋白質抗原と結合する特異的抗体を迅速・簡便に選択でき、さらに抗原に対してより高親和性の抗体を簡便に得るための系を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、既往の抗膜蛋白質抗体選択法の問題点を克服した上で、抗体の特異性成熟を合理的に達成可能なユニークな系の開発に成功しており、学術的に意義深い。本研究の手法を用いて、種々の病態関連膜蛋白質に対する抗体が将来的に取得できれば、抗体医薬品としての臨床応用も含めた大きな社会的波及効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Membrane proteins are important targets in medicine. Thus, it is necessary to develop a system to obtain antibodies with high specificity and high affinity against membrane proteins in rapid, easy, and reliable ways. In this study we developed a system to rapidly and easily select specific antibodies against a target membrane protein antigen that is displayed on the mammalian cell surface. This system also allowed easy acquisition of antibodies with higher affinity against a target antigen.

研究分野：細胞工学

キーワード：シグナル伝達 抗体 膜蛋白質 スクリーニング 親和性成熟

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

1. 研究開始当初の背景

膜蛋白質は医療における重要なターゲットであり、膜蛋白質抗原に対する高特異性・高親和性抗体を迅速、簡便かつ確実に取得する系の開発が必要とされている。膜蛋白質は一般的に精製が困難であるため、標的膜蛋白質抗原を発現する動物細胞やバキュロウイルス抗原提示系を用いて、動物免疫法あるいはファージディスプレイ法などの *in vitro* 選択法により抗体選択する手法がこれまでに開発されてきた。しかし、動物免疫法では標的ヒト膜蛋白質が動物内在性蛋白質と相同性が高い場合、十分な免疫原性を持たないことや、*in vitro* 選択法では非特異的抗体が得られやすいという問題点がある。また、上記いずれの既往の選択系においても、選択の結果十分な親和性を持つ抗体が得られる保証はないため、得られた抗体を元にしたライブラリーからさらに高い親和性の抗体を得る必要がある(親和性成熟)。しかし、既往の系では親和性に閾値を設けて、閾値以上の親和性を有する抗体を選択できるような系はほとんど無く、親和性成熟を実現するための合理的な戦略は乏しいのが現状である。

2. 研究の目的

そこで本研究では、動物細胞膜上に提示させた標的膜蛋白質抗原と結合する特異的抗体を *in vitro* で迅速・簡便に選択でき、さらに抗原に対してより高親和性の抗体を簡便に得るための技術開発に挑戦する。

3. 研究の方法

(1) 増殖シグナル伝達型受容体を用いた抗膜蛋白質抗体親和性成熟系の構築

標的膜蛋白質抗原と、二量体形成により増殖シグナルを伝達する受容体を連結した抗原-受容体融合蛋白質をインターロイキン-3 (IL-3) 依存的に増殖する動物細胞株である Ba/F3 細胞に遺伝子導入して細胞表面に発現させる。この細胞に、小分子リガンド AP20187 依存的に二量体を形成する FKBP (F36V 変異体) 蛋白質を遺伝子工学的に融合した抗体断片ライブラリーを分泌発現させる。この時、抗原特異的抗体は、その分泌元の細胞表面の抗原-受容体融合蛋白質に優先的に結合するため、小分子リガンド存在下では抗原-受容体融合蛋白質は二量体化して増殖シグナルを伝達する。従って、IL-3 非存在下かつ小分子リガンド存在下での細胞増殖を指標に抗原特異的抗体発現細胞を選択できる。このとき、小分子リガンドの濃度を変更することにより、二量体化抗体の量を制御できるため、親和性に閾値を設けた抗体選択も可能である。

(2) 死シグナル伝達型受容体を用いた抗膜蛋白質抗体親和性成熟系の構築

抗原-死誘導型受容体融合蛋白質と、抗原特異的抗体クローンをを用いた小分子リガンド依存的二量体化抗体を細胞に遺伝子導入して共発現させる。得られた細胞に、使った抗体クローンの抗原親和性に影響する部分の配列をランダム化した抗体ライブラリーを遊離の状態ですらに共発現させる。この細胞に小分子リガンドを添加して培養すると、抗原-受容体融合蛋白質が活性化されて細胞は死滅するが、抗体ライブラリーの中に、元の抗体クローンより親和性の高い抗体があれば、その抗体は二量体化抗体よりも優先的に抗原に結合するので、抗原-受容体融合蛋白質の二量体化を阻害し、細胞死を阻害して生存する。

4 . 研究成果

(1) 増殖シグナル伝達型受容体を用いた抗膜蛋白質抗体親和性成熟系の構築

標的膜蛋白質抗原として ErbB2、二量体形成により増殖シグナルを伝達する受容体として IL-6 受容体のシグナル伝達サブユニット gp130 を用いて抗原側の融合蛋白質を構築した。一方、二量体化抗体側は、既知の抗 ErbB2 一本鎖抗体クローン ML3-9 と FKBP (F36V 変異体) を用いて融合蛋白質を構築した。構築した融合蛋白質遺伝子をそれぞれ別の抗生物質耐性マーカーを持つレトロウイルスベクターに組み込み、Ba/F3 細胞に導入した。抗生物質選択後の細胞に対してウエスタンブロッティングを行った結果、双方の融合蛋白質の発現が確認できた。増殖アッセイを行った結果、リガンド AP20187 依存的に細胞が増殖することが確認できた。また、ML3-9 ($K_d = 1.0 \text{ nM}$) よりも低アフィニティーのクローン C6.5 ($K_d = 16 \text{ nM}$) を用いて同様に細胞を作製し、ML3-9-FKBP (F36V 変異体) 発現細胞 : C6.5-FKBP (F36V 変異体) 発現細胞 = 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000 の比率となるように混ぜたのち、AP20187 存在下で培養したところ、いずれの比率で混ぜた場合でも ML3-9-Fk 発現細胞が濃縮された。以上より、本法では抗体の親和性成熟に応用可能であることが示唆された。

(2) 死シグナル伝達型受容体を用いた抗膜蛋白質抗体親和性成熟系の構築

増殖シグナル伝達型受容体を用いた系 (1) に加えて、増殖とは逆の細胞死シグナルを利用した競合選択系も開発した。標的膜蛋白質抗原として ErbB2、細胞死シグナルを伝達する受容体として Fas を用いて抗原側の融合蛋白質を構築した。一方、二量体化抗体側は、既知の抗 ErbB2 一本鎖抗体クローン ML3-9 と FKBP (F36V 変異体) を用いて融合蛋白質を構築した。これらを Ba/F3 細胞で発現させた後、ML3-9 の抗原結合部位の配列をランダム化した抗体ライブラリーを遊離の状態ですらに共発現させた。これらの細胞に AP20187 を添加して培養した結果、生存した細胞群が得られた。この細胞群から得られた scFv クローンについて、動物細胞発現系で scFv タンパクを発現・精製し、表面プラズモン共鳴法により抗原親和性を測定した結果、ML3-9 よりも解離が起きにくく高い親和性で結合する scFv クローンが複数得られた。これらの scFv クローンのエピトープを水素-重水素交換質量分析法により検証した結果、いずれも元クローン ML3-9 のエピトープと同一であることが分かった。以上より、本法では特定のエピトープに結合する抗体の親和性成熟が可能であることが示された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Eguchi, A., Nakakido, M., Nagatoishi, S., Kuroda, D., Tsumoto, K., Nagamune, T., Kawahara, M. "An epitope-directed antibody affinity maturation system utilizing mammalian cell survival as readout." *Biotechnol. Bioeng.* (2019), doi: 10.1002/bit.26965. (査読有)
2. Nguyen, T. D., Nagamune, T., Kawahara, M. "A suicide switch directly eliminates intracellular scFv oligomers in the cytoplasm of mammalian cells." *Biotechnol. J.* **14**, 1800350 (2019), doi: 10.1002/biot.201800350. (査読有)
3. Ishizuka, S., Lai, C. Y., Otsu, M., Nakauchi, H., Nagamune, T., Kawahara, M., "Designing Motif-Engineered Receptors To Elucidate Signaling Molecules Important for Proliferation of Hematopoietic Stem Cells." *ACS Synth. Biol.* **7**, 1709-1714 (2018), doi: 10.1021/acssynbio.8b00163.

(査読有)

4. Saka, K., Lai, C. Y., Nojima, M., Kawahara, M., Otsu, M., Nakauchi, H., Nagamune, T. "Dissection of signaling events downstream of the c-Mpl receptor in murine hematopoietic stem cells via motif-engineered chimeric receptors." *Stem Cell Rev. Rep.* **14**, 101–109 (2018), doi: 10.1007/s12015-017-9768-7. (査読有)
5. Izuta, S., Yamaguchi, S., Misawa, R., Yamahira, S., Tan, M., Kawahara, M., Suzuki, T., Takagi, T., Sato, K., Nakamura, M., Nagamune, T., Okamoto, A. "Microfluidic preparation of anchored cell membrane sheets for in vitro analyses and manipulation of the cytoplasmic face." *Sci. Rep.* **7**, 14962 (2017), doi: 10.1038/s41598-017-14737-7. (査読有)
6. Nakabayashi, H., Kawahara, M., Nagamune, T. "Cell-surface expression levels are important for fine-tuning the performance of receptor tyrosine kinase-based signalobodies." *Biotechnol. J.* **12** (2017), doi: 10.1002/biot.201700441. (査読有)
7. Kashima, D., Kawade, R., Nagamune, T., Kawahara, M. "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. (査読有)
8. Nguyen, T. D., Takasuka, H., Kaku, Y., Inoue, S., Nagamune, T., Kawahara, M. "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. (査読有)
9. 河原正浩 "細胞応答シグナルの自在な制御を可能にする受容体改変技術" *化学工学* **82**(5), 287 (2018). (査読無)
10. 河原正浩 "キメラ受容体による細胞運命制御系の構築とライブラリー選択への応用" *生物工学会誌* **95**, 127–135 (2017). (査読無)

[学会発表] (計 2 4 件)

1. Masahiro Kawahara "A receptor-engineering approach for arbitrarily controlling cell fates." The University of Tokyo-Tsinghua University Joint Symposium 2018 基調講演, 2018.7.24, Hongo Campus, The University of Tokyo.
2. 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, 2017.12.11-15, Manchester Grand Hyatt San Diego, San Diego, CA, USA
3. Akihiro Eguchi, Teruyuki Nagamune, Masahiro Kawahara "Development of an Epitope selective Antibody Selection System Using a Cell Survival as a Readout" YABEC2017, 2017.10.19, Jin Jiang International Hotel Xi'an, Xi'an city, China
4. Tatphon Kongkrontong, Teruyuki Nagamune, Masahiro Kawahara "Synthetic Control of Mammalian Cell Signaling by Engineering Receptor Tyrosine Kinases" Asian Congress on Biotechnology 2017 (ACB-2017), 2017.7.24-25, Khon Kaen, Thailand.
5. Masahiro Kawahara "Manipulating intracellular signal transduction with artificial proteins" 第 17 回日本蛋白質科学会年会 ワークショップ「Bottom-up design of functional artificial proteins in vitro and in vivo」招待講演, 2017.6.20, 仙台国際センター.
6. Masahiro Kawahara "Engineering cytokine receptors for applications in regenerative medicine and drug discovery" 2017 KSBB (The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering) Spring

Meeting and International Symposium 招待講演, 2017.4.7, Hwabaek International Convention Center, Gyeongju, Korea.

7. 河原 正浩、石塚周太、坂晃一郎 “モチーフ改変受容体を用いた造血幹細胞増殖シグナルの解明” 化学工学会第 84 年会、2019.3.13、芝浦工業大学豊洲キャンパス。
8. 河原 正浩 “ゲノム編集ツールを用いた細胞運命変換系の構築” 化学工学会第 50 回秋季大会 バイオ部会シンポジウム 「ゲノム編集の最前線 -メディカル関連分野で化学工学はどう関わるか? -」、2018.9.18、鹿児島大学郡元キャンパス。
9. 河原 正浩 “受容体ライブラリーによる機能性細胞の創製” 第 70 回日本生物工学会大会 シンポジウム 「工学が見出すエッセンス細胞培養 ~動物細胞培養の根本に工学はどう立ち向かうか~」招待講演、2018.9.7、関西大学千里山キャンパス。
10. 河原 正浩、鹿島 大揮、景岡 美穂、間部 悟、長棟 輝行 “増殖を指標とした動物細胞内蛋白質間相互作用スクリーニング法” 化学工学会第 83 年会、2018.3.14、関西大学千里山キャンパス。
11. 河原 正浩、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択法の開発” 化学工学会第 49 回秋季大会 バイオ部会シンポジウム 「新機能タンパク質・ペプチド分子創製技術の新展開」、名古屋大学東山キャンパス、2017.9.22。
12. 河原 正浩 “細胞内シグナル伝達の合成生物学” 第 7 回合成生物学シンポジウム、招待講演、2017.8.3、神戸大学百年記念館六甲ホール。
13. コンクローン トーン タットポーン、長棟 輝行、河原 正浩 “光感受性受容体を利用した標的シグナル伝達分子の光応答的活性化” 第 91 回日本生化学会大会、2018.9.26、国立京都国際会館
14. 梅根 輝来人、河原 正浩 “受容体モチーフライブラリーのスクリーニングによる効率的な細胞増殖誘導の実現” 第 70 回日本生物工学会大会、2018.9.7、関西大学千里山キャンパス
15. 江口 晃弘、長棟 輝行、河原 正浩 “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 (ConBio2017)、2017.12.8-9、神戸ポートアイランド
16. 鹿島 大揮、河出 来時、長棟 輝行、河原 正浩 “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 (ConBio2017)、2017.12.8-9、神戸ポートアイランド
17. 梅根 輝来人、長棟 輝行、河原 正浩 “モチーフのフェノタイプスクリーニングによる細胞運命制御受容体の効率的な開発” 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、2017.12.7、神戸ポートアイランド
18. Kongkrongtong Tatphon、長棟 輝行、河原 正浩 “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 (ConBio2017)、2017.12.6、神戸ポートアイランド
19. 垣内 洋祐、長棟 輝行、河原 正浩 “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” 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、2017.12.6、神戸ポートアイランド
20. 鹿島 大揮、河出 来時、長棟 輝行、河原 正浩 “細胞内タンパク質間相互作用に対する阻害剤探索を指向した新規スクリーニングプラットフォーム KIPPIS の開発” 第 8 回スクリーニング学研究会、2017.10.25、タワーホール船堀

21. コンクローン トーン タットポーン, 長棟輝行, 河原正造 “シグナル伝達を自在に制御できる人工細胞創製への挑戦” 「細胞を創る」研究会 10.0、2017.10.19-20、京都教育文化センター
22. 江口 晃弘、長棟 輝行、河原 正造 “細胞生存を指標としたエピトープ選択的抗体選択法の開発”第 69 回日本生物工学会大会, 2017.9.13、早稲田大学西早稲田キャンパス
23. 梅根 輝来人、長棟 輝行、河原 正造 “効率的な細胞運命制御を指向したチロシンモチーフのスクリーニング” 第 69 回日本生物工学会大会, 2017.9.13、早稲田大学西早稲田キャンパス
24. 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構築と阻害剤探索への展開” 生物工学若手研究者の集い(若手会)夏のセミナー2017、2017.7.22、ツネイシしまなみビレッジ

〔図書〕(計 1 件)

1. Kawahara, M. "Chemical reaction engineering methodologies for biomedical imaging analysis." *Biomedical Engineering Challenges: A Chemical Engineering Insight* (Piemonte, V. et al., Ed.), Wiley, Chapter 7, 119–144 (2018), doi: 10.1002/9781119296034.ch7.

6 . 研究組織

※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。