

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 20 日現在

機関番号：17701
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2009 ～ 2011
 課題番号：21390032
 研究課題名（和文）：低分子抗体医薬開発に最適化されたヒト抗体ライブラリ構築と選別法の確立
 研究課題名（英文）：Construction of human antibody library and establishment of selection method to develop fragment antibody therapeutics
 研究代表者：伊東 祐二 (ITO YUJI)
 鹿児島大学・大学院理工学研究科・教授
 研究者番号：60223195

研究成果の概要（和文）：

本研究では、T7ファージ提示技術を用いて、ヒト単鎖Fv抗体、ラマVHH抗体ライブラリを構築し、その中から抗原に特異的な抗体の単離手法の確立を行った。特に、VHH抗体ライブラリでは、抗原特異的な抗体の単離に成功したことから、本手法が、抗体の迅速な単離に十分活用できることが分かった。一方、抗体のフォールディングや安定性の問題により非特異的な抗体ファージの濃縮が見られ、今後の解決すべき課題として明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we constructed the libraries of human single-chain Fv antibody and llama VHH antibody using T7 phage display system and established the selection method to isolate the specific phages. Especially, we succeeded in the isolation of the T7 phage clones binding to the antigens from the library, which indicates our library system is useful for a rapid generation of specific antibodies. On the other hand, we found the problematic issues that the non-specific binding phages were enriched by selection process because of folding problems and instability of antibody, which should be solved in the further investigations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
総計	11,400,000	3,420,000	14,820,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学、創薬化学

キーワード：医薬分子機能学

1. 研究開始当初の背景

免疫システムにおいて重要な機能を有する抗体（特にヒトIgG抗体）を医薬品として

用いる抗体医薬の分野が、急速な勢いで発展している。抗体医薬は、その高い分子標的能から、ガン治療のみならず、リウマチなど

の自己免疫疾患、感染症など様々な疾患に対しても、高い有効性を示す医薬として使用されており、現在も多くの抗体医薬が開発中である。我々も、抗体医薬開発の主要な方法の一つであるヒト抗体ファージ提示ライブラリ技術をいち早く取り入れ、種々の治療薬開発へ向けたヒト抗体のデザイン研究を行ってきた。

この抗体医薬の次世代型として注目されているのが低分子抗体である。特にヒト単鎖 Fv 抗体 (scFv) やドメイン抗体 (ヒト VH)、ナノボディ抗体 (ラクダ抗体 VHH) などは、組織への浸潤性が高く、大腸菌での生産が可能で生産コストが極めて低い (完全抗体の約 10分の1程度)。低分子抗体は、Fc 領域を持たず、ADCC (抗体依存性細胞障害) 活性や CDC (補体依存性細胞障害) 活性を持たないが、標的分子への特異的な標的素子、あるいはアンタゴニストとして十分に機能する。

このような利点がある一方で、従来の抗体ファージ提示ライブラリで得られた、あるいは、ハイブリドーマ由来の完全抗体から抗体工学により作製された低分子化抗体は、結合活性、安定性に問題があることから、医薬開発への進展を阻む理由となっている。そのため、安定で高機能性の低分子抗体を創出するための研究が行われているが、未だ、確定的なものはない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新しいファージ提示技術である T7 ファージ提示技術を用いて構築したヒト単鎖 Fv 抗体ライブラリが、高い安定性と結合活性を有する高機能性低分子抗体の創製に適したシステムであることから、この方法を用いた低分子抗体開発システムを構築し、抗体工学による高機能性低分子抗体デザインの戦略を確立することである。

T7 ファージ抗体ライブラリが、高機能性の単鎖 Fv 抗体の単離に適している理由として、以下のものが挙げられる。

- (1) 細胞内の還元的条件でもフォールディングができる早い折りたたみ速度と高い安定性をを持った抗体のみが選択されファージ上に提示される。よって、選別によって得られる単鎖 Fv 抗体は安定で大腸菌内での高い生産性を持つ。
- (2) ライブラリ構築操作が容易で、大きな多様性を持ったライブラリ (10^9 以上) を作製できるため、T7 ライブラリから得られる抗体は、抗原に対する高い親和性を保持する。
- (3) 極めて短時間での選別が可能である (2日程度で目的の抗体クローンの単離が可能)。

本研究では、上記に基づく高機能性の低分子抗体の単離における T7 ファージ抗体ライブラリの有用性を示すために、①ヒト単鎖 Fv 抗体の機能的提示法の確立と、②単鎖 Fv ヒト合成抗体ライブラリの構築と評価、さらに③ラマ由来の VHH 合成抗体ライブラリとその評価を行った。

3. 研究の方法

ヒト単鎖 Fv (scFv) 及び合成ラマ VHH 提示 T7 ファージライブラリの構築 PCRにより EcoR I 及び HindIII の制限酵素サイトを付加した合成ヒト scFv ライブラリ DNA 並びに合成ラマ VHH ライブラリ DNA を調製した。各 PCR 産物を精製後、制限酵素 (EcoR I と HindIII) 処理を行い、ゲルカット精製を行った後、T7Select10-3b ベクター (Novagen) に T4DNA Ligase を用いて連結した。連結産物を T7Select packaging extracts (Novagen) と穏やかに混合し、22°C で 2.5 時間反応させファージ粒子の形成を行った。この反応液を 100ml の大腸菌 SHuffle T7 5403 株に加え、30°C で溶菌が確認されるまで培養した。その後、500mM NaCl と 0.5mM PMSF を加え、遠心後、上清を回収した。回収した上清に 50% ポリエチレングリコールを 0.2 容積分加え、4°C で一晚、沈降反応を行った。遠心後、上清を捨て、残ったファージペレットを PBS で溶解し、最終的に 10% のグリセロール溶液中に -80°C で保存を行った。

バイオパンニング 96 穴マイクロタイタープレートに、0.1M NaHCO₃ (pH8.0) 溶液中に溶解した HSA あるいは、RNaseA (1 μ g/200 μ l/well) を 4°C で一晚固定化し、PBS に溶解したブロック剤 (0.25% BSA あるいは、0.5% gelatin) を用いて 3 時間室温でブロッキングを行った。PBST (0.1% Tween) で洗浄を行った後、BSA あるいは、HSA で吸収処理したファージライブラリ (1 $\times 10^{10}$ pfu /200 μ l/well) を加え、室温で 1 時間反応を行った。PBST (1% Tween) による洗浄により標的抗原に結合しないファージを除去後、大腸菌 SHuffle T7 5403 を加え、37°C で 10 分反応させ結合ファージを感染させた。大腸菌を回収し、さらに 5ml の大腸菌 SHuffle T7 5403 を加え 30°C で溶菌が確認されるまで培養した。その後、500mM NaCl、0.5mM PMSF を加え遠心後、上清を回収した。回収した上清に 50% ポリエチレングリコールを 0.2 容積分加え 4°C で一晚、沈降反応を行った。遠心後、上清を捨て、残ったファージペレットを PBS で溶解し、そのファージを次のラウンドに用いた。同様の操作を、3 または 4 回繰り返し行った。

ELISA 96 穴マイクロタイタープレートに、0.1M NaHCO₃ (pH8.0) 溶液中に溶解した HER2、または RNaseA、Herceptin、ヒト血清アルブ

ミン(HSA) (50ng/50 μ l/well)、0.5%ゼラチン、0.25%BSAを4°Cで一晩固定化し、PBSに溶解したブロック剤(0.25%BSAあるいは、0.5% gelatin)を用いて3時間室温でブロッキングを行った。PBST(0.1%Tween)で2回洗浄を行った後、ファージ溶液(5 \times 10⁹/50 μ l/well)を加え、室温で1時間反応を行った。PBSTで5回洗浄後、一次抗体(マウス抗T7tail fiber抗体または、ビオチン化抗T7 tag抗体)を加え室温で一時間反応を行った。PBSTによる洗浄後、二次抗体(HRP結合ヤギ抗マウスIgG抗体(Novagen)あるいは、HRP結合ストレプトアビジン)を室温で1時間反応させた。洗浄後、TMB溶液を用いた呈色反応によりファージと抗原との結合を定量化した。検出は、450nmの吸光度をマイクロプレートリーダー(680XR, BioRad)を用いて測定することで行った。

4. 研究成果

ヒト単鎖Fv抗体の機能的提示法の確立

既に、我々は、M13ファージ系を使ったヒト末梢血リンパ球由来ヒト抗体ライブラリを構築し、種々の抗原に対する抗体の単離に成功しているが、T7ファージ上への抗体の提示については、検討がほとんどなされていない。そこで、M13ファージから得られている2種類の単鎖Fvクローン、4D5:HER2抗原に対して特異的な単鎖Fv、並びにG1:HSA抗原に対して特異的な単鎖Fvを用いて、T7ファージ上への機能的な提示を試みた。

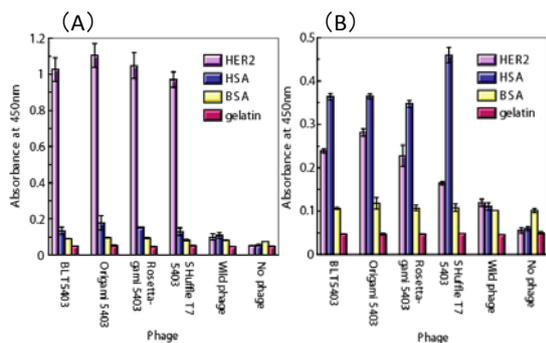


図1 T7ファージ上に提示されたヒト単鎖Fv抗体の抗原に対する結合活性の比較(A: HER2抗原に対して特異的な4D5単鎖Fvクローン、B: HSA抗原に対して特異的なG1単鎖Fvクローン)

図1に示したように、4D5クローンについては、使用可能な、いずれの大腸菌ホストを使ってもHER2に対する特異的な結合がみられた。しかし、G1クローンについては、HSA

特異的であるはずにも関わらず、BSAやHER2に対する非特異的な結合がみられた。このことは、T7ファージでは、4D5の様なファージディンクや安定性の高い単鎖Fvは、機能的な提示が可能であるが、G1の様なナイーブライブラリから得られたファージディンクや安定性が比較的低いクローンの場合は、非特異的な結合を示すことが分かった。実際に、Shuffle大腸菌を使って、中低温(30度)でT7ファージに提示させた場合、特異性が回復した(図1B)。

これらの結果とは別に、ヒトの末梢血由来の単鎖Fv抗体遺伝子(ナイーブ抗体遺伝子)を使って、T7ファージライブラリを作製した(多様性は3.2 \times 10⁸)。このライブラリを使って、種々の抗原に対するバイオパニングによる特異的な抗体ファージの単離を試みた。行った5種類の抗原に対し、特異的な抗体ファージが得られたものは1種類のみであり、4種は非特異的な結合を示すクローンであった。以上の結果から、ナイーブ抗体遺伝子を使ったT7ファージライブラリの検討を中断し、安定なフレームを持つ4D5由来の合成抗体ファージライブラリの検討を行うこととした。

単鎖Fvヒト合成抗体ライブラリの構築と評価

乳がん抗原HER2に対して特異的な結合を示す4D5単鎖Fvは、安定で発言も良好な単鎖Fv抗体として知られている。これを鋳型とし、VH領域の3つのCDRに人工的に多様性を導入することで、抗体ライブラリを作製した。すなわち、CDR-H1, H2は、Kabat databaseに登録されている天然のヒト抗体のアミノ酸組成頻度のデータに基づき、天然のヒト抗体の多様性に近づくように設計した。また、抗原との結合に最も大きく影響するとされるCDR-H3は、20種類すべてのアミノ酸をコードし、かつストップコドンが入りにくいようにコドンのオリゴヌクレオチドの混合比率を調整しデザインした。構築したVHライブラリの概要を図2に示す。

合成ヒトscFvライブラリのデザイン

```

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFINI X11X12X13X14 IHWVRQAPGKGLWEVA
X21X22PX23X24GX25TX26YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVY
YCSRX31X32X33X34X35X36X37AMDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDI
QMTQSPSSLSASVGRDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPKGAPKLLIYSASFLYSGVP
SRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQGHYITPPTFGGGTKVEIK
  
```

CDR-H1		CDR-H2		CDR-H3	
Position	Encode a.a.	Position	Encode a.a.	Position	Encode a.a.
X11	S.T.N.R	X21	All 19 a.a except Cys	X31-X37	Xaa
X12	S.N.G.T.D	X22	S.Y.N.K.L.R.D.T		Xaa: any of 20 amino acid, plus a stop codon (TAG)
X13	Y.S.N.G.F.A	X23	S.D.Y.G.H.N.T		
X14	A.Y.W.G.S.D.T	X24	G.S.D.N.K.F.T		
		X25	S.T.N.D.Y.E.G		
		X26	Y.N.D.R.S.L.T		

図2 抗HER2単鎖Fv抗体4D5のフレームをベースにしたVH合成抗体ライブラリの概要

この VH 遺伝子ライブラリと、4D5 由来の VL 遺伝子を連結した単鎖 Fv 抗体ライブラリを T7 ベクターに導入し、 2.7×10^7 のサイズのライブラリを構築した。このライブラリを用いて、HSA をモデル抗原としてパンニングによる特異的抗体ファージの濃縮を試みた結果を図 3 に示す。

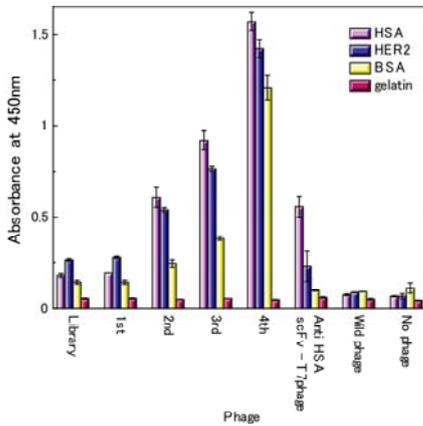


図 3 4D5 のフレームをベースにした合成単鎖 Fv ライブラリを使った、HSA に対するバイオパニング (各バイオパニング後のファージの結合特性を ELISA で評価した)

この場合も、標的分子 HSA に結合するファージが増えてくるように見えたが、これらのファージは、同時に、HER2 や BSA にも結合する非特異的なファージであった。

この原因を考察した結果、安定なフレームを使った合成抗体ライブラリでも、CDR の違いにより安定性などが変化することで、このような非特異的結合ファージの濃縮が起こりやすいことが考えられた。そこで、さらに、安定性やフォールディング効率が高いとされる VHH 抗体のライブラリを T7 ファージ提示系で検討することとした。

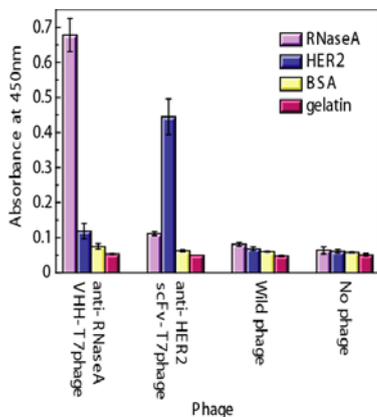
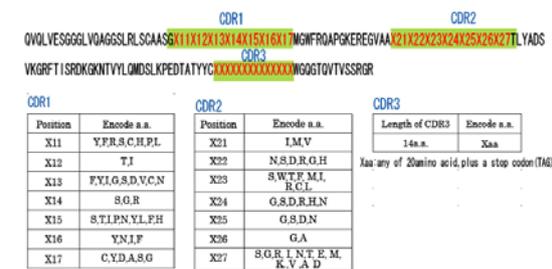


図 4 抗 RNaseA-VHH (cAb-RN05) を提示した T7 ファージの ELISA による結合特異性

ラマ由来の VHH 合成抗体ライブラリとその評価 まず、VHH 抗体が機能的に T7 ファージ上に提示できるかどうかを、抗 RNaseA VHH ラマ抗体 (cAb-RN05) を提示する T7 ファージを作製し、ELISA による結合特異性の評価を行った結果を図 4 に示す。抗 RNaseA-VHH 抗体ファージは、抗原に特異的に結合していることから、この VHH の機能的な T7 ファージ上への提示が可能であることが分かった。

そこで、この抗 RNaseA-VHH 抗体のフレームをベースに合成抗体ライブラリを作製した。合成抗体ライブラリの概要を図 5 に示す。



する結合が減少したことから、クローン化し、ELISA によるスクリーニングを行った。その結果、最終的に、A9 と A14 という RNase に対して特異的な結合活性を示すクローンの単離に成功した。このクローンの結合特異性を ELISA で示した結果を、図 7 に示す。

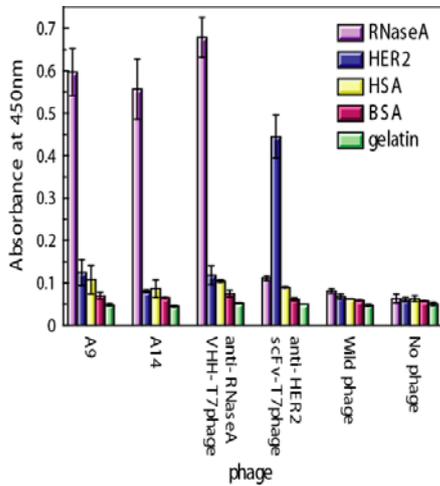


図 7 RNase に対するパンニングによって得られた 2 つのクローンの ELISA による結合特異性

明らかにこの 2 つのクローンは、RNase のみに結合活性を示しており、このことは、T7 ファージによって構築された VHH 合成ライブラリから、抗原特異的な抗体ファージの単離が可能であること示している。これらの 2 つのクローンの CDR のアミノ酸配列を解析した結果を、表 1 に示す。

表 1 RNase 特異的な A9 ならびに A14 抗体ファージクローンの CDR のアミノ酸配列

	CDR1	CDR2	CDR3
template VHH	GYAYTYIY	MDSGGGGT	AAGGYELRDRTYGQ
A9	GFIFGPNY	VGIGSGET	AAAYFNSYCCAGAY
A14	GSII GFYD	VGWRDGS	AAGGYELRDRTYGQ

VHH ライブラリにおいてランダム化した CDR の配列は、得られた 2 つのクローンにおいて、元の鋳型として利用した cAb-RN05 クローンの配列とは、CDR1, 2 については明らかに異なっていた。一方、CDR3 については、A14 と cAb-RN05 は共通の配列を有していたが、A9 については、異なる配列を示した。

以上、述べてきたように、T7 ファージ提示法を用いた、ヒト単鎖 Fv 並びにラマ VHH 抗体の機能的な提示と、ラマ VHH 合成抗体ライブラリからの抗原 (RNase) 特異的な抗体ファージの取得に成功した。本研究により、従来の M13 ファージとともに、T7 ファージも抗体ライブラリ用の提示技術として利用可能

であることが示された。一方で、T7 ファージ提示には、フォールディング能や安定性の低い抗体は、機能的な提示に困難を伴うこと、そのような分子を含む抗体ライブラリでは、非特異的な抗体ファージの濃縮が起こりやすいことが問題点としてあげられた。今後、このような問題を解決しながら、迅速で効率的な抗体取得法の開発を確立していきたい。

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 10 件)

- ① Tanaka, K., Nishimura, M., Yamaguchi, Y., Hashiguchi, S., Takiguchi, S., Yamaguchi, M., Tahara, H., Gotanda, T., Abe, R., Ito, Y., Sugimura, K. A mimotope peptide of A β 42 fibrillation inhibitory activity induces anti-Abeta42 conformer antibody response by a displayed form on an M13 phage in mice, *Journal of neuroimmunology*, 査読有, 236, 27-38 (2011).
DOI: 10.1016/j.jneuroim.2011.04.010
- ② Yang, J., Yoshida, R., Kariya, Y., Zhang, X., Hashiguchi, S., Nakashima, T., Suda, Y., Takada, A., Ito, Y., Sugimura, K. Characterization of human single-chain antibodies against highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses: mimotope and neutralizing activity. *Journal of biochemistry*, 査読有, 148, 507-515 (2010)
DOI:10.1093/jb/mvq084
- ③ Nunoya, J., Nakashima, T., Kawana-Tachikawa, A., Kiyotani, K., Ito, Y., Sugimura, K., Iwamoto, A. Short communication: generation of recombinant monoclonal antibodies against an immunodominant HLA-A*2402-restricted HIV type 1 CTL epitope, 査読有, *AIDS research and human retroviruses* 25, 897-904 (2009).
DOI: 10.1089=aid.2009.0036
- ④ Muraoka, S., Ito, Y., Kamimura, M., Baba, M., Arima, N., Suda, Y., Hashiguchi, S., Torikai, M.,

Nakashima, T., Sugimura, K. Effective induction of cell death on adult T-cell leukaemia cells by HLA-DRbeta-specific small antibody fragment isolated from human antibody phage library. Journal of biochemistry, 査読有, 145, 799-810 (2009)

DOI:10.1093/jb/mvp039

- ⑤ Maeda, M., Ito, Y., Hatanaka, T., Hashiguchi, S., Torikai, M., Nakashima, T., Sugimura, K., Regulation of T cell response by blocking the ICOS signal with the B7RP-1-specific small antibody fragment isolated from human antibody phage library. MAbs, 査読有, 1, 453-461 (2009).
<http://www.landesbioscience.com/journals/mabs/9633>

〔学会発表〕(計 32 件)

- ① 伊東祐二, フェージディスプレイ技術による機能性ペプチド・抗体のデザインと応用, 第 11 回化学・材料研究セミナー, 2012 年 1 月 7 日 (福岡)
- ② 塚本翔悟, 畠中孝彰, 有馬一成, 伊東祐二, T7 フェージディスプレイによる抗体ライブラリの構築と評価, 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 21 日 (京都)
- ③ 伊東祐二, T7 フェージライブラリを用いたヒト抗体結合ペプチドのデザインと評価, 第 4 回生体分子科学シンポジウム, (第 2 回ケミカルバイオロジー研究所シンポジウム), 2011 年 3 月 4 日 (大阪)
- ④ 伊東祐二, T フェージ提示法による機能性抗体とペプチドのデザイン, 大阪大学蛋白質研究所セミナー「バクテリオファージ研究の可能性と課題」, 2010 年 9 月 10 日 (大阪)
- ⑤ 塚本翔悟, 畠中孝彰, 有馬一成, 伊東祐二, 高機能性低分子化抗体の単離を目指した T7 フェージによる抗体ライブラリの構築, 平成 22 年度日本生化学会九州支部例会, 2010 年 5 月 22 日 (鹿児島)

〔図書〕(計 1 件)

- ① 橋口 周平、伊東祐二、田中孝一、松木

園美穂、村岡賢、杉村和久, フェージディスプレイ Beyond antibody:~抗体様分子による分子標的~, 生化学, 82 (8) 710-726 (2010).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称: IgG 結合性ペプチド及びそれによる IgG の検出および精製方法

発明者: 伊東祐二

権利者: 鹿児島大学、大塚化学 (株)

種類: 特許

番号: 特願 2011-182539

出願年月日: 2010 年 8 月 24 日

国内外の別: 国内

名称: IgA 結合性ペプチド及びそれによる IgA の精製

発明者: 伊東祐二、伊東治、大藪慎二、石飛宏幸

権利者: 鹿児島大学、大塚化学 (株)

種類: 特許

番号: 特願 2011-262871

出願年月日: 2011 年 11 月 30 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 件)

名称: IgG 結合性ペプチド

発明者: 伊東祐二

権利者: 鹿児島大学

種類: 特許

番号: 特許第 4963390 号

取得年月日: 平成 24 年 3 月 23 日

国内外の別: 国内 (現在各国移行)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊東 祐二 (ITO YUJI)

鹿児島大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号: 60223195

(2) 研究分担者

有馬 直道 (ARIMA NAOMICHI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 30175997

黒木 良太 (KUROKI RYOTA)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・ユニット長

研究者番号: 30391246