

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 6月 8日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21686077

研究課題名（和文） キメラ受容体を用いた動物細胞での抗体選択法の開発

研究課題名（英文） Development of antibody screening system in mammalian cells using chimeric receptors

研究代表者

河原 正浩（KAWAHARA MASAHIRO）

東京大学・大学院工学系研究科・講師

研究者番号：50345097

研究成果の概要（和文）：本研究では抗体ライブラリーの中から抗原特異的抗体を動物細胞の増殖活性を指標として迅速且つ簡便に選択する新手法の開発を目指した。これを達成するために、抗体ライブラリーと増殖誘導型受容体との融合蛋白質を動物細胞で発現させ、二量体抗原を標的抗原として用いて培地に加えて培養し、増殖した細胞の抗原結合性および抗原特異性を解析した。その結果、抗原に結合する抗体断片を細胞増殖を指標として取得することに成功した。

研究成果の概要（英文）： In this study, we aimed to develop a novel method to rapidly and easily select antigen-specific antibody from an antibody library based on growth activity of mammalian cells. To achieve this, fusion proteins composed of an antibody library and a growth-inducing receptor were expressed on mammalian cells, and the resultant cells were cultured in the medium containing a dimeric target antigen, followed by analysis of antigen binding and specificity of the selected cells. As a result, antigen-binding antibody fragments were successfully obtained based on the cell growth.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2010年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2011年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
年度			
年度			
総計	20,900,000	6,270,000	27,170,000

研究分野：細胞工学

科研費の分科・細目：プロセス工学 / 生物機能・バイオプロセス

キーワード：抗体、受容体、細胞増殖、ライブラリー選択、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

モノクローナル抗体の開発を契機として、抗体は臨床診断やバイオ医薬品への応用の可能性を秘めた分子として大きな注目を集めるようになった。さらに、遺伝子工学の進展により phage display や ribosome display といった *in vitro* での高親和性抗体分子の選択システムが開発された。ポストゲノム時代を迎

え、DNA チップに続き、多くの分子種をハイスループットに解析可能な抗体マイクロチップの開発が進んでいる。一方、分子標的治療薬としての抗体もキメラ抗体、ヒト型化抗体と進歩を遂げ、臨床応用が実現して次世代のバイオ医薬品として大きな地位を確立しつつある。このように、抗体は創薬開発の知見を得るためのツールとして、および既往の

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。

しかし、既往の方法である動物免疫法では、生体毒性の高い抗原を免疫できない、また phage display などの *in vitro* 選択法では非特異的結合クローンがとれやすく、パンニングサイクルを繰り返す必要があり操作が煩雑といった欠点がある。従って、これらの問題点を解決する新たな抗体選択法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

そこで本研究では、あらゆる抗原に対する抗体を選択可能で、操作が簡便でワンステップで選択可能な新規選択法を提案する。既往の研究で、抗体可変領域一本鎖抗体 (scFv) と、二量体を形成することで増殖シグナルを伝達するサイトカイン受容体とを連結したキメラ受容体を動物細胞で発現させ、二量体もしくは多量体抗原を添加して培養するだけできわめて簡便に scFv 遺伝子導入細胞を特異的に増殖させることに成功した。そこで、本研究ではこの成果を応用して、キメラ受容体の scFv 部分をライブラリー化したキメラ受容体ライブラリーを動物細胞で発現させ、目的抗原結合性抗体断片を抗原添加時の細胞増殖を指標として選択する系の構築を目指す。この方法では、抗原と結合できる抗体遺伝子を持つ細胞のみをワンステップで選択的に増殖させることができるため、*in vitro* 選択法における煩雑なパンニング操作を省くことが可能となる。さらに、得られた細胞クローンからゲノム PCR により抗体遺伝子を回収することができ、選択法において必須ともいえる遺伝子型と表現型との共役も達成できる。

3. 研究の方法

(1) 免疫したマウス脾臓由来ライブラリーからの抗体選択

本研究では標的抗原として二量体蛋白質であるヒト superoxide dismutase 1 (SOD1) を選んだ。まず、SOD1 で免疫したマウス脾臓細胞由来の一本鎖抗体 (scFv) ライブラリーの N 末端側に HA タグを付加したものを細胞外ドメインとし、エリスロポエチン受容体 (EpoR) の膜貫通(TM)ドメイン変異体 (L241G, L242P)、gp130 の細胞内ドメインを連結した抗体ライブラリー/受容体キメラを、EGFP 共発現ベクターに組み込み、IL-3 依存性マウス pro-B 細胞株 Ba/F3 へ導入した。遺伝子導入細胞をマルチウェルプレートに播種し、IL-3 を除去し SOD1 を添加した培地中で培養した。増殖した細胞について、SOD1 結合性 (biotin 化 SOD1, PE 標識ストレプトアビジンで染色) をフローサイトメトリーにより評価した。ま

た細胞増殖の SOD1 依存性を確認するために、細胞を種々の濃度の SOD1 存在下で培養し、所定の時間経過後に生細胞密度を測定した。

(2) naïve ライブラリーからの抗体選択

naïve なヒト scFv ライブラリー (Tomlinson J) を EpoR TM、gp130 細胞内ドメインに連結した抗体ライブラリー/受容体キメラ (ライブラリーサイズ: 1×10^6) を Ba/F3 細胞膜上に発現させ、 $1 \mu\text{g/ml}$ G93A 変異体 SOD1 で選択を行った。増殖した細胞集団を全て回収し、ゲノム PCR により 2 次ライブラリーを構築した。この scFv ライブラリーを、EpoR TM 変異体 (L241G, L242P)、gp130 細胞内ドメインを用いたキメラ受容体に組み込み (ライブラリーサイズ: 3.7×10^5)、Ba/F3 細胞膜上に発現させ、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ G93A 変異体 SOD1 で選択を行った。増殖した細胞について、G93A 変異体 SOD1 結合性をフローサイトメトリーにより評価した。また細胞増殖の SOD1 依存性を増殖アッセイによって評価した。

4. 研究成果

(1) 免疫したマウス脾臓由来ライブラリーからの抗体選択

まず、抗体ライブラリー/受容体キメラ (ライブラリーサイズ: 5000) を高遺伝子導入率 (84%) で Ba/F3 細胞に導入し、初期細胞密度: 4×10^5 cells/well、SOD1 濃度: 0, 0.01, 0.1, 1, $10 \mu\text{g/ml}$ で選択を行った。選択開始から 10 日目にコロニー数をカウントしたところ、SOD1(-)での増殖も見られたが SOD1(+)でより顕著な細胞増殖が見られた。SOD1(+)で増殖した well の細胞集団について、キメラ受容体表面発現及び SOD1 結合性を評価した結果、計 7 well のうち 2 well (0.1, $10 \mu\text{g/ml}$ SOD1 存在下で増殖した well) の細胞集団では PE 蛍光強度が部分的に高い集団が見られた。そのうち $0.1 \mu\text{g/ml}$ SOD1 存在下で増殖した細胞集団について、更なる解析を行ったところ、SOD1 への結合性が示された (Fig.1A)。また、増殖アッセイを行ったところ、SOD1 濃度依存的な増殖を示した (Fig.1B)。以上のことから、SOD1 結合性クローンの存在が強く示唆された。

そこで、より大きなライブラリーサイズの scFv を用いた実験を行うこと、および細胞選択の段階で scFv クローンの状態になるようにして解析を容易にするために、より大きなライブラリーサイズのライブラリー/受容体キメラ (ライブラリーサイズ: 2.2×10^6) 遺伝子を構築し、低遺伝子導入率 (2%) で Ba/F3 細胞に導入した。これらの細胞を、初期細胞密度: 1.7×10^4 cells/well、SOD1 濃度: 0, 10, $50 \mu\text{g/ml}$ で選択を行った。選択開始から 16 日目にコロニー数をカウントしたところ、SOD1(-)での細胞増殖は見られず、 $50 \mu\text{g/ml}$

SOD1 存在下で顕著な増殖が見られた (Fig.2A)。また、選択したクローンについて SOD1 結合性を評価したところ、PE 蛍光強度の高い集団はほとんど確認できなかったが、これらのクローンについて増殖アッセイを行ったところ、SOD1 濃度依存的な細胞増殖が顕著に確認された (Fig.2B)。

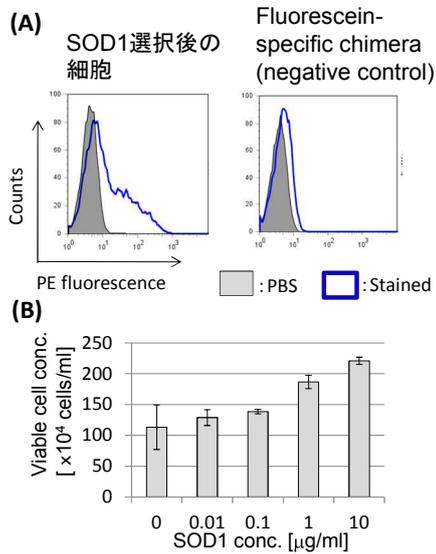


Fig. 1 マウス脾臓由来ライブラリー (高遺伝子導入率) からの抗体選択結果 (A) SOD1 結合性評価 (B) 増殖アッセイ結果

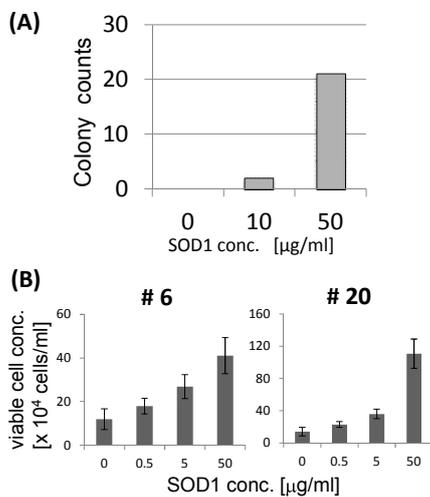


Fig. 2 マウス脾臓由来ライブラリー (低遺伝子導入率) からの抗体選択結果 (A) 選択後のコロニー数 (B) 得られたクローンの増殖アッセイ結果

(2) naïve ライブラリーからの抗体選択

続いて、抗原で感作されていない naïve な抗体ライブラリーからも抗原結合性抗体断

片が本手法で選択できるかを検証するために、人工 scFv ライブラリーをキメラ受容体に組み込んだライブラリーを Ba/F3 細胞で発現させ、G93A 変異体 SOD1 を標的抗原として加えて選択を行った。その結果、25 個の細胞クローンが増殖した。また、結合性評価を行った 17 クローン中 5 クローンで結合性が示唆された (Fig.3)。さらにこれらのクローンについて配列を確認したところ、#11 と #25 は同一配列であり、#4 と #11、25 は類似した配列であることがわかった。以上のことから、免疫していない naïve な抗体ライブラリーからも抗体を選択可能であることが示された。

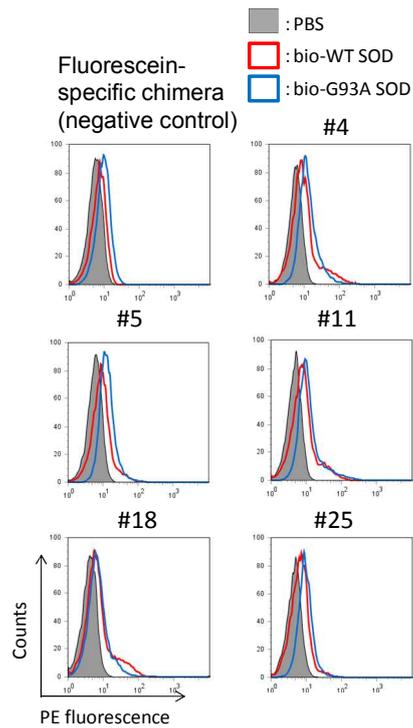


Fig. 3 naïve ライブラリーから選択された抗体の SOD1 結合性評価

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 8 件)

1. Kaneko, E., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T. "Growth control of genetically modified cells using an antibody/c-Kit chimera." *J. Biosci. Bioeng.* **113**, 641-646, 2012. doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.12.005
2. Kawahara, M., Chen, J., Sogo, T., Teng, J., Otsu, M., Onodera, M., Nakauchi, H., Ueda, H. and Nagamune, T. "Growth promotion of genetically modified hematopoietic progenitors using an antibody/c-Mpl

- chimera." *Cytokine* **55**, 402-408, 2011. doi: 10.1016/j.cyto.2011.05.024
3. Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T. "Engineering cytokine receptors to control cellular functions." *Biochem. Eng. J.* **48**, 283-294, 2010. doi: 10.1016/j.bej.2009.09.010
 4. Sogo, T., Kawahara, M., Ueda, H., Otsu, M., Onodera, M., Nakauchi, H. and Nagamune, T. "T cell growth control using hapten-specific antibody/interleukin-2 receptor chimera." *Cytokine* **46**, 127-136, 2009. doi: 10.1016/j.cyto.2008.12.020
 5. Liu, W., Kawahara, M., Ueda, H. and Nagamune, T. "The influence of domain structures on the signal transduction of chimeric receptors derived from the erythropoietin receptor." *J. Biochem.* **145**, 575-584, 2009. doi: 10.1093/jb/mvp013
 6. Tanaka, K., Kawahara, M., Ueda, H. and Nagamune, T. "Selection and growth regulation of genetically modified cells with hapten-specific antibody/receptor tyrosine kinase chimera." *Biotechnol. Prog.* **25**, 1138-1145, 2009. doi: 10.1002/btpr.185
- 他 2 件

[学会発表] (計 28 件)

1. 高須賀 仁・河原正浩・グエン トゥイズオン・加来 義浩・井上 智・上田 宏・長棟 輝行 “増殖誘導型キメラ受容体を用いたイントラボディー選択法の開発” 化学工学会 第 77 年会、工学院大学、2012.3.16
2. 寺西 佑理・河原正浩・藤原 範子・上田 宏・鈴木 敬一郎・長棟 輝行 “細胞増殖活性を指標とした抗体選択法” 化学工学会 第 77 年会、工学院大学、2012.3.16
3. 吉田 理恵・河原正浩・上田 宏・長棟 輝行 “抗体ライブラリー選択を指向したキメラ受容体構造の最適化” 化学工学会 第 77 年会、工学院大学、2012.3.16
4. 戸根 悠一郎・河原正浩・上田 宏・長棟 輝行 “キメラ受容体を用いた細胞の自殺スイッチの開発” 化学工学会 第 77 年会、工学院大学、2012.3.16
5. 中林秀人・河原正浩・大津真・小野寺雅史・中内啓光・上田宏・長棟輝行 “抗体/受容体キメラを用いた胚性幹細胞の効率的分化法の開発” 化学工学会 第 77 年会、工学院大学、2012.3.16
6. 李 松熹・河原正浩・加来 義浩・井上 智・上田 宏・長棟 輝行 “キメラ受容体を用いた抗狂犬病ウイルス P 蛋白質抗体の細胞内選択” 化学工学会 第 77 年会、工学院大学、2012.3.16
7. 高須賀 仁, 鈴木菜央, 河原正浩, 加来義浩, 井上智, 上田宏, 長棟輝行 “キメラ受容体を用いた intrabody 選択法の開発” 第 63 回日本生物工学会大会、東京農工大学、2011.9.26
8. 中林秀人・河原正浩・大津真・小野寺雅史・中内啓光・上田宏・長棟輝行 “抗体/受容体キメラによる胚性幹細胞の運命制御” 化学工学会 第 43 回秋季大会、名古屋工業大学、2011.9.14
9. Masahiro Kawahara, Jianhong Chen, Takahiro Sogo, Jinying Teng, Makoto Otsu, Masafumi Onodera, Hiromitsu Nakauchi, Hiroshi Ueda, Teruyuki Nagamune “Receptor for expansion of genetically modified hematopoietic stem cells” Asian Congress on Biotechnology (ACB-2011), Shanghai, 2011.5.13
10. 小川 健一郎, 河原正浩, 長棟 輝行 “キメラ受容体を用いたタンパク質間相互作用検出法の開発” 化学工学会第 76 年会、東京農工大学、2011 年 3 月 22 日
11. 戸根悠一郎, 林隼, 川口大地, 河原正浩, 上田宏, 長棟輝行 “フルオレセイン応答性キメラ受容体を用いた細胞死誘導法の開発” 化学工学会第 76 年会、東京農工大学、2011 年 3 月 22 日
12. 寺西佑理, 劉文海, 河原正浩, 藤原範子, 上田宏, 鈴木敬一郎, 長棟輝行 “キメラ受容体を用いた新規抗体選択法の開発” BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会)、2010.12.7-12.8
13. Jianhong Chen, Jinying Teng, Takahiro Sogo, Masahiro Kawahara, Makoto Otsu, Masafumi Onodera, Hiromitsu Nakauchi, Hiroshi Ueda, and Teruyuki Nagamune “Expansion of genetically modified hematopoietic stem cells using a fluorescein-responsive chimeric thrombopoietin receptor” BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会)、神戸国際会議場、2010.12.7
14. 高須賀 仁, 鈴木 菜央, 河原正浩, 加来義浩, 井上 智, 上田 宏, 長棟 輝行 “哺乳動物細胞の増殖を指標とした細胞内抗体選択法の開発” BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会)、2010.12.7
15. 戸根悠一郎, 林隼, 川口大地, 河原正浩, 上田宏, 長棟輝行 “抗体/受容体キメラを用いた細胞死誘導スイッチの開発” BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会)、神戸国際会議場、2010.12.7

16. 藤 晋イン, 河原正浩, 大津 真, 小野寺 雅史, 中内 啓光, 上田 宏, 長棟 輝行 “フルオレセイン応答性キメラ受容体を用いた造血幹細胞の増幅” 第 62 回日本生物工学会大会、宮崎シーガイア、2010.10.28
17. 河原正浩, 上田 宏, 長棟 輝行 “受容体のエンジニアリングによる細胞運命制御” 化学工学会第 42 回秋季大会、同志社大学、2010.9.6
18. 十河 孝浩, 河原正浩, 上田 宏, 大津 真, 小野寺 雅史, 中内 啓光, 長棟 輝行 “フルオレセイン応答性キメラ受容体を用いた T 細胞の増殖制御” 化学工学会第 75 年会、2010 年 3 月 19 日、鹿児島大学
19. Masahiro Kawahara, Yusuke Shimo, Azusa Hitomi, Yuki Mochida, Takahiro Sogo, Hiroshi Ueda, Teruyuki Nagamune “Fluorescein-responsive migration of mammalian cells equipped with an antibody/receptor chimera” APBioChEC'09、2009 年 11 月 26 日、神戸国際会議場
20. Takahiro Sogo, Masahiro Kawahara, Hiroshi Ueda, Makoto Otsu, Masafumi Onodera, Hiromitsu Nakauchi, Teruyuki Nagamune “Growth promotion of mouse T cells using a fluorescein-responsive chimeric interleukin-2 receptor” 第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 24 日、神戸国際会議場
21. 河原正浩, 下茂 佑輔, 人見 梓, 持田 祐希, 十河 孝浩, 上田 宏, 長棟 輝行 “抗体/受容体キメラを用いた細胞運動制御” 第 61 回日本生物工学会大会、2009 年 9 月 24 日、名古屋大学東山キャンパス
22. 劉 文海, 河原正浩, 上田 宏, 長棟 輝行 “抗体-エリスロポエチン受容体キメラのシグナル伝達におけるドメイン構造の影響” 化学工学会第 41 回秋季大会、2009 年 9 月 18 日、広島大学東広島キャンパス
23. 陳 建宏, 十河 孝浩, 河原正浩, 上田 宏, 大津 真, 小野寺 雅史, 中内啓光, 長棟 輝行 “抗体-サイトカイン受容体キメラによる遺伝子導入造血幹細胞の増幅法” 化学工学会第 41 回秋季大会、2009 年 9 月 17 日、広島大学東広島キャンパス
24. 林隼, 河原正浩, 上田宏, 長棟輝行 “キメラ受容体と遺伝子組換え酵素を用いた抗体選択・生産一貫系の基礎的検討” 日本動物細胞工学会 2009 年度大会 (JAACT 2009)、つくば国際会議場、2009/7/25

他 4 件

[図書] (計 5 件)

1. Kawahara, M., Inoue, T., Ren, X., Sogo, T., Yamada, H., Katoh, M., Ueda, H., Oshimura, M. and Nagamune, T. "Growth control of mammalian cells via a human artificial chromosome harboring a chimeric receptor." *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects* (Kamihira, M. et al., Ed.), **16**, Springer, 276-281, 2010.
2. Liu, W., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T. "The characteristic of chimeric receptors based on erythropoietin receptor." *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects* (Kamihira, M. et al., Ed.), **16**, Springer, 290-295, 2010.
3. Liu, W., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T. "Construction of a fluorescein-responsive chimeric receptor with strict ligand dependency and analysis of the role of erythropoietin receptor domains in signal transduction." *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects* (Ikura, K. et al., Ed.), **15**, Springer, 187-193, 2009.
4. Tanaka, K., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T. "Promoting non-hematopoietic cell proliferation by chimeric receptors." *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects* (Ikura, K. et al., Ed.), **15**, Springer, 87-93, 2009.
5. Sogo, T., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T. "Selective expansion of genetically modified T cells using a chimeric IL-2 receptor for cancer therapy." *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects* (Ikura, K. et al., Ed.), **15**, Springer, 11-18, 2009.

6. 研究組織

(1)研究代表者

河原 正浩 (KAWAHARA MASAHIRO)
 東京大学・大学院工学系研究科・講師
 研究者番号：50345097

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし