

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 7 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780304

研究課題名（和文）抗体医薬品開発のためのラクダ一本鎖抗体の新しい試験管内作製法

研究課題名（英文）In vitro production of the Camel heavy chain antibody toward development of alternative antibody medicine

研究代表者

中山 祐二（NAKAYAMA YUJI）

鳥取大学生命機能研究支援センター・助教

研究者番号：40432603

研究成果の概要（和文）：ラクダは重鎖のみからなる一本鎖抗体を持つ。一本鎖抗体は、通常の軽鎖を持つ抗体とは性質が異なり、熱安定性や高い水溶性など、経口薬に近い性質を持つため、抗体医薬への応用が期待される。本研究では、染色体工学を駆使し、ラクダの抗体遺伝子座全体を培養細胞に導入し、さらに遺伝子再編成の誘導を試みたが、ラクダ一本鎖抗体は発現されず、ラクダ特異的な抗体産生制御・組み換え系が異種細胞内では機能しないことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Camels have single-chain antibody consisting of only heavy chains. Comparing with standard H2L2 antibodies, single-chain antibody have many advantageous chemical features toward antibody-medicine development, such as high solubility in water and/or thermo-stability. In this study we employed chromosomal engineering to produce camel heavy chain antibody in cell culture system. We have successfully cloned the camel chromosome containing whole antibody-gene cluster into cultured cells, however, we could not detect any camel heavy chain antibody in vitro, suggesting incompatibility of camel immune system with others in spite of highly sequence similarity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：遺伝子、染色体工学、ラクダ一本鎖抗体

1. 研究開始当初の背景

ラクダ科の動物に認められる重鎖のみで構成される一本鎖抗体は、通常抗体（重鎖・軽鎖の四量体）が認識不可能な酵素活性中心や膜貫通領域など複雑な構造を持つ受容体などにはまり込むように結合するため 1) 阻

害抗体が得やすい、2) アゴニスト、アンタゴニストとなりやすい、3) 低分子で透過性が高い、4) 水溶性が高く安定であるなど、通常抗体にはない特長を持っている。ラクダ一本鎖抗体は、これらの特長のゆえに新しい抗体医薬品開発のモデル（リード）化合物として有用性の高い生物資源であり、抗体医

薬品開発において、ラクダ一本鎖抗体を実験室レベルで作製できるシステムが望まれる。しかし、ラクダの抗体を入手するにあたり、ラクダという大型動物そのものをどう確保・飼育するかが問題となり、研究開発の大きな障害となっている。

2. 研究の目的

研究代表者は、ラクダの抗体遺伝子座を導入した人工染色体をマウス ES 細胞に移入し、キメラマウスを作製することで、ラクダ一本鎖抗体を産生するマウスの開発を試みた (NEDO 平成 18 年度～20 年度、未発表。鳥取大学医学部生命科学科ゲノム医工学分野との共同研究)。この先行研究の一方で近年、ニワトリプレ B 細胞の DT40 細胞中でニワトリ抗体遺伝子の多様性を短期間で増大させ、試験管内でモノクローナル抗体を迅速に得る方法が確立された (ADLib®法)。本研究は、研究代表者が有する染色体工学技術を使い、ラクダ抗体遺伝子座を DT40 細胞内に移入後、ADLib®法を適用し、ラクダ一本鎖モノクローナル抗体の試験管内迅速産生系を確立することを目的とする。この研究成果によって、ラクダ抗体を実験室レベルで取り扱い、抗体医薬品開発に応用可能にしたい。

3. 研究の方法

ラクダ一本鎖抗体の産生に ADLib®法を適用するため、VDJ 組み換えを完了したラクダ抗体遺伝子座を DT40 細胞の中にクローニングする必要があった。本研究では、先行研究を発展させ、以下の二つの方法を試みた。

(1) 先行研究で作成されたキメラマウスの B 細胞を用いて通常のハイブリドーマ法を適用し、搭載しているラクダ抗体遺伝子座において VDJ 組み換えを起こした人工染色体ベクターの回収を行い、DT40 に移入する方法

(2) V(D)J 組み換えの起きていないラクダ抗体遺伝子座を含む自然のラクダ染色体を直接 DT40 細胞へ導入し、RAG 遺伝子を強制発現することによって人工的に VDJ 組み換えを試みる。

いずれかの方法によって ADLib®法が適用できれば、産生されたラクダ一本鎖抗体については、既存の抗体医薬品との機能的な比較検討を行う。

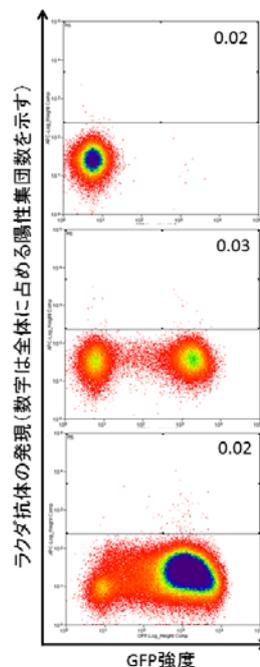
4. 研究成果

本研究では、「V(D)J 組み換えを完了したラクダ抗体遺伝子座を DT40 細胞の中にクロー

ニングすること」ができなかった。

(1) 人工染色体上のラクダ抗体遺伝子座はキメラマウス個体内で V(D)J 組み換えを起こしラクダ重鎖を発現したことは生化学的解析から明らかとなった。しかし、その産生細胞である B 細胞をフローサイトメトリー解析ではほとんど検出することができなかった。さらに詳細に調べてみると、キメラマウスでは B 細胞の分化・発生が著しく障害されていることが骨髄細胞のフローサイトメトリー解析によって明らかとなったため、通常のハイブリドーマ法によって V(D)J 組み換えが起きている未熟な B 細胞の回収を試みたが、数が少なかったためにハイブリドーマは得られなかった。今現在、申請者は人工染色体を改良して新たなキメラ作成を開始しており、V(D)J 組み換えを起こしたラクダ抗体遺伝子座を保持する人工染色体の取得を目指している。

(2) ラクダ抗体遺伝子座を含むラクダの自然染色体を FISH 法により同定し、微小核融合法により DT40 細胞に導入することに成功した。このラクダ染色体上では V(D)J 組み換えが起きていないので、V(D)J 組み換えを起こす RAG 遺伝子の導入を検討した。その際に RAG による組み換えが起きていることを間接的にモニターできるように、RAG の認識配列と GFP 遺伝子を含むプラスミドベクターを予めニワトリ細胞に導入した。この系では、GFP 発現があれば、少なくとも導入したコンストラクト内では RAG による組み換えが起



ていることを示す。この細胞を用いて、GFP 発現と共にラクダ抗体の発現をフローサイトメトリーにより調べたが、ラクダ抗体発現細胞

胞はほとんど検出できなかった。【前項図：フローサイトメトリーでの解析例。横軸にGFPの強度、縦軸にラクダ抗体の細胞膜上での発現をプロットしたもの。わずかであるが、ラクダ抗体に反応する細胞が検出された。しかし一方で、GFPを発現していない細胞からもラクダ抗体に反応する細胞が検出された。(図の中段の左部分など)】さらに、これらのわずかな細胞集団を分取して生化学的な解析をしたが、ラクダ抗体を発現していなかった。

NEDOの先行研究も含めて、本研究の結果から、技術面よりも、ラクダの抗体遺伝子発現制御システムが、少なくともマウスやニワトリの細胞内では機能することが難しいことが示唆された。過去の染色体工学を用いた報告から異種抗体産生系を構築するには、抗体遺伝子の配置、抗体の構造、組み換え配列の相同性などが成功を左右することが示唆されており、DNA配列や遺伝子構造的にはマウス、ヒトとラクダは類似している。今後、本研究の目的であるラクダ抗体の実験室レベルでの取り扱いを可能にするためには、より基礎的・免疫学的なラクダ抗体遺伝子の研究が必要であると考えられる。

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 Yamaguchi S, Kazuki Y, Nakayama Y, Nanba E, Oshimura M, Ohbayashi T. A method for producing transgenic cells using a multi-integrase system on a human artificial chromosome vector, PLoS One, 6: e17267, 2011, 査読有

② Rozanaliza R, Osaki T, Tsuka T, Imagawa T, Minami S, Nakayama Y, Okamoto Y, Photodynamic Hyperthermal therapy with Indocyanine Green (ICG) induces apoptosis and cell cycle arrest in B16F10 murine melanoma cells. Journal of veterinary medical science, article ID: 11-0464, Dec. 2011 査読有

③ Li Y, Matsumori H, Nakayama Y, Osaki M, Kojima H, Kurimasa A, Ito H, Mori S, Katoh M, Oshimura M, Inoue T. SIRT2 downregulation in HeLa can induce p53 accumulation via p38 MAPK activation-dependent p300 decrease, eventually leading to apoptosis. Genes Cells. 16:34-45, 2011, 査読有

④ Inoue T, Nakayama Y, Yamada H, Li YC, Yamaguchi S, Osaki M, Kurimasa A, Hiratsuka M, Katoh M, Oshimura M. SIRT2 downregulation confers resistance to microtubule inhibitors by prolonging chronic mitotic arrest. Cell Cycle. 8:1279-1291, 2009, 査読有

[学会発表] (計8件)

① 荻野由加利、松森はるか、押村光雄、中山祐二、井上敏昭、複数の遺伝子搭載が可能な人工染色体ベクターの構築、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月14日(ポスター発表)および15日(口頭発表)、パシフィコ横浜(横浜市)

② 李艶沢、末松知久、中山祐二、押村光雄、井上敏昭、がん治療の新たな標的分子としてのSIRT2、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月15日(口頭発表)および16日(ポスター発表)、パシフィコ横浜(横浜市)

③ 荻野由加利、中山祐二、難波栄二、未分化性細胞を用いた脆弱X症候群に見られるCGGトリプレットリピートの伸長メカニズムの解析、第56回日本人類遺伝学会大会・第11回東アジア人類遺伝学会2011年11月11日(ポスター発表)、幕張メッセ

④ 瀬古朋美、山口繁幸、吉村祐貴、中山祐二、加藤基伸、大林徹也、押村光雄、久郷裕之、特定染色体領域に集積する機能分子複合体の解析、第56回日本人類遺伝学会大会・第11回東アジア人類遺伝学会2011年11月11日(ポスター発表)、幕張メッセ

⑤ 中山祐二、瀬古朋美、砂村直洋、荻野由加利、加藤基伸、難波栄二、押村光雄、久郷裕之 Construction of in vitro model system to understand molecular mechanism of CGG repeat expansion in Fragile X syndrome、第12回国際人類遺伝学会(ICHG)2011年10月12日(ポスター発表)、Montrial Convention Center(カナダ、モントリオール)

⑥ 瀬古朋美、山口繁幸、吉村祐貴、中山祐二、加藤基伸、大林徹也、押村光雄、久郷裕之 A Novel proteomics approach for identification of protein-RNA complex associated with specific gene loci using a human artificial chromosome、第12回国際人類遺伝学会(ICHG)2011年10月12日

スター発表)、Montrial Convention Center
(カナダ、モントリオール)

⑦ 中山祐二、人工染色体の応用から再生医療まで- 鳥取大学における幹細胞アプリケーション- 第21回日本サイトメトリー学会学術集会、(株)ベックマンコールターランチョンセミナー (招待講演)、2011年6月26日

⑧ Katoh M, Kazuki Y, Takahashi H, Kazuki K, Kajitani N, Takiguchi M, Nakayama Y, Nakamura T, Inoue T, Oshimura M, Chromosome transfer via microcell fusion utilizing fusogenic envelope proteins of Measles virus、第33回日本分子生物学会第83回日本生化学会合同大会2010年12月10日、神戸ポートピアアイランド (神戸市)

[その他]
ホームページ等

鳥取大学生命機能研究支援センター
<http://grcl.med.tottori-u.ac.jp/Seimei/>

鳥取大学医学部生命科学科ゲノム医工学分野
<http://www.med.tottori-u.ac.jp/genome/309/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山祐二 (NAKAYAMA YUJI)
生命機能研究支援センター・助教
研究者番号：22780304