

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15268

研究課題名（和文）次世代診断薬の開発を支援する効率的な高親和力変異抗体創製法の確立

研究課題名（英文）Establishment of an efficient method generating high-affinity mutant antibodies for the development of next-generation diagnostic agents

研究代表者

木口 裕貴（Kiguchi, Yuki）

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：40845880

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：免疫測定法の高感度化に必須である高親和力抗体の作製法として、遺伝子レベルで抗体の構造を改変する「抗体工学」が有用である。本法における「枠組み領域（FR）へのアミノ酸挿入」の抗体創製戦略としての可能性を探るべく、本研究ではコルチゾールに対する一本鎖Fvフラグメント（scFv）の最もN末端に位置するVH-FR1にアミノ酸を挿入したライブラリーを作製し、高親和力クローンの探索を行った。その結果、挿入位置を6番目と7番目の間としたライブラリーからは野生型よりも結合定数が30倍以上向上したクローンが複数得られた。また、得られたクローンは、臨床応用可能な性能を有していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体工学の潜在力を最大限に発揮するには、親和力が向上した変異体の出現率が高いライブラリーを構築することが重要である。本研究の成果により、これまで変異の導入部位としては全く顧みられなかったVH-FR1へ少数のアミノ酸を「挿入」する戦略が、従来の「CDR重視かつアミノ酸置換」による変異導入法に代わる新たな試験管内親和性成熟のアプローチとして有用であることが示唆された。この知見は高親和力抗体を迅速に創出する指針として極めて重要であり、抗体機能の理解についても新たな視点を加えられたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Antibody engineering, which modifies the structure of antibodies at the genetic level, is a powerful method for producing high-affinity antibodies that are essential for the establishment of highly sensitive immunoassays. In this study, to explore the potential of “insertion of amino acids into the framework region (FR)” as a strategy for antibody engineering, libraries of amino acids inserted into VH-FR1, the most N-terminal region of the single-chain Fv fragment (scFv) against cortisol, was prepared, and high-affinity clones were explored. The results showed that the libraries with the insertion position between the 6th and 7th amino acid yielded several clones over 30-fold improved affinity compared to the wild-type scFv. The immunoassays using the obtained clones were sensitive enough for clinical application.

研究分野：分析化学

キーワード：抗体工学 枠組み配列 アミノ酸挿入 試験管内親和性成熟 ファージ提示

1. 研究開始当初の背景

免疫測定法は抗原抗体反応を原理とする超微量定量法であり、バイオメディカル研究や臨床検査に不可欠の方法論である。本法において、元来の長所である高い測定感度を担保するためには、測定対象物 (標的抗原) に対して高い親和力、すなわち大きい結合定数 (K_a) を示す抗体が不可欠である。

抗体の作製には一般に目的抗原で動物を過免疫することが必要であり、抗体取得までに相当な時間を要する。一方で、1990年代初頭にその基盤が築かれた「抗体工学」は革命的と言える。遺伝子操作により、*in vitro* の実験系で、動物から得られる天然の抗体を上回る高性能な人工抗体を創製するものである。その一般的な手順は、プロトタイプとなる適切な抗体の H鎖、L鎖の可変部ドメイン (V_H 、 V_L) を連結して「野生型」の一本鎖 Fv フラグメント (single-chain Fv fragment; scFv) を構築し、

遺伝子レベルで多様な変異を導入して変異 scFv のライブラリーを作製したのち、偶然に生成した稀少な改良型クローンを選択・単離するものである (図 1A)。生体内での親和性成熟機構を模倣するため、「試験管内親和性成熟」とも呼ばれる研究領域である。本法の潜在力を最大限に発揮するには、この工程で親和力が向上した変異体の出現率を高めるために質の高いライブラリーを構築することと、この工程でライブラリーに含まれる改良型抗体を確実に発見し単離し得る抗体選択法を用いることが重要である。

抗体選択法については、申請者は従来法より性能に優る clonal array profiling (CAP) 法を開発済みである [1]。一方、ライブラリーの構築については多岐にわたる戦略がとられているが、抗体可変部の相補性決定部 (complementarity-determining region; CDR) を重視し、その構成アミノ酸をランダムに置換するのが主流と言える。抗体は H鎖と L鎖の可変部、すなわち V_H と V_L の両ドメインの間に抗原を捕捉する。これらドメインはいずれも 4つの枠組み領域 (framework region; FR) と 3つの CDR から成るモザイク構造をとり、各部分構造は N末端から、FR1 CDR1 FR2 CDR2 FR3 CDR3 FR4 の順に連なっている (図 1)。CDR はループを形成して抗原の捕捉に直接関与し、FR は CDR を支える β シートの土台を構築する (図 1B)。3つの CDR のなかでも CDR3 は抗体間で配列の変化が最も激しく、抗原への親和力と特異性の発現に大きく関わるものと考えられている。このため、抗体工学の黎明期には CDR3 のアミノ酸をランダム化する報告例が多い。ところが申請者は、最近、副腎皮質ステロイドであるコルチゾール (CS) に対する scFv の親和力改善を図る過程で、 V_H の FR1 へ少数のアミノ酸を「挿入」(置換ではない) することにより、親和力が大幅に改善されること (K_a として最大 31 倍上昇) を見出した [2]。FR1 は抗原との結合には直接関与しないと考えられるため、これまで変異の導入部位としては全く顧みられなかった部位である。この発見から、「アミノ酸挿入による、親和性成熟における FR の潜在力」を調査する必要性を感じ、本研究を開始した。

2. 研究の目的

上記の通り、従来の「CDR 重視かつアミノ酸置換」による変異導入法に代わる新たな試験管内親和性成熟のアプローチの可能性を探るべく、これまで見過ごされてきた FR にアミノ酸を挿入し、実用的な抗体を高確率に創出する FR 内アミノ酸挿入部位を探索することが研究開始当初の目的である。

3. 研究の方法

本研究ではより有用な知見を得るために、あえて試験管内親和性成熟の難度が高い、低分子化合物 (ハプテン) に対する scFv を研究対象とした。具体的には、CS を標的とする scFv を本研究の題材とした。挿入部位は V_H -FR1 内の 2カ所 (ライブラリー A: 6番と7番の間、ライブラリー B: 15番と16番の間) を選択した (図 2)。野生型 scFv 遺伝子を鋳型として、NNS 縮重コドン (20種のアミノ酸がランダムに出現する) が 1-6個挿入された配列を持つプライマーを用いて PCR を行った。得られた変異 scFv 遺伝子ライブラリーをファージミドベクターに組み込んだのち、

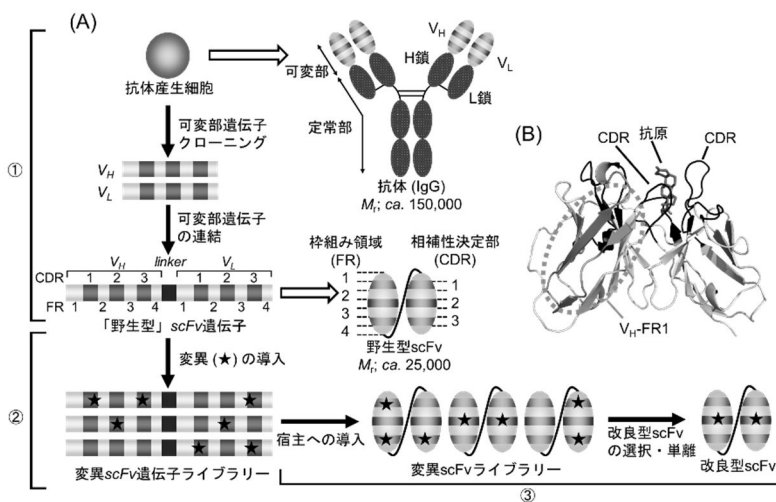


図 1. 試験管内親和性成熟の一般的な手順 (A) と抗原のドッキングモデル (B)

大腸菌に導入した。この形質転換菌ライブラリーを、CAP 法から派生した解離非依存型 CAP 法に付して高親和カクローンの検索を行った。本法は、ジスルフィド結合を介して抗原を固定化したマイクロプレートを用いることで、酸や塩基性条件下でも抗原から解離しないクローンを強制的に回収できるように、元の CAP 法を改良したものである。この方法により選択したファージが提示する scFv をファージから分断した「可溶型」タンパク質へ変換したのち、CS-ウシ血清アルブミン結合体 (CS-BSA) を固定化したプレートを用いる競合 ELISA に付した。また、トリチウム標識 CS を用いる Scatchard 法により K_a を算出した。さらに、得られたクローンに生物発光酵素である Nano luciferase (NLuc) を連結した融合タンパク質を作製し、臨床応用への可能性を検討した。

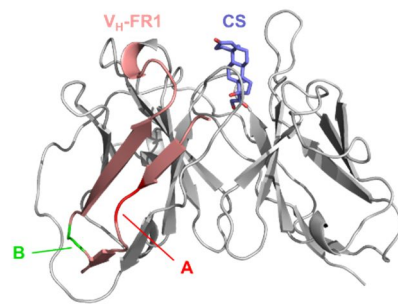


図 2. アミノ酸挿入部位

4. 研究成果

(1)ライブラリーの作製と解離非依存型 CAP 法による選択

ライブラリーA は既報 [2] と同様に作製した。ライブラリーB は挿入部位が V_H -FR1 の中間に位置するため同様の手法は適用できなかった。解決策として、N 末端から 23 番目までのアミノ酸をコードする遺伝子断片を増幅し、それをメガプライマーとして PCR を行った。アミノ酸挿入の数は、A は 1-3 個または 6 個、B は 6 個とした。各ライブラリーを大腸菌 XL1-Blue に導入したところ、それぞれ $<1 \times 10^7$ の形質転換菌が得られた。そのうちそれぞれ 4700 種を解離非依存型 CAP 法に付したところ、野生型 scFv (K_a ; $3.6 \times 10^8 M^{-1}$) から 30 倍以上 K_a が改善した変異体が A からは計 6 種得られた。一方で B から高親和カクローンは得られなかった (図 3)。

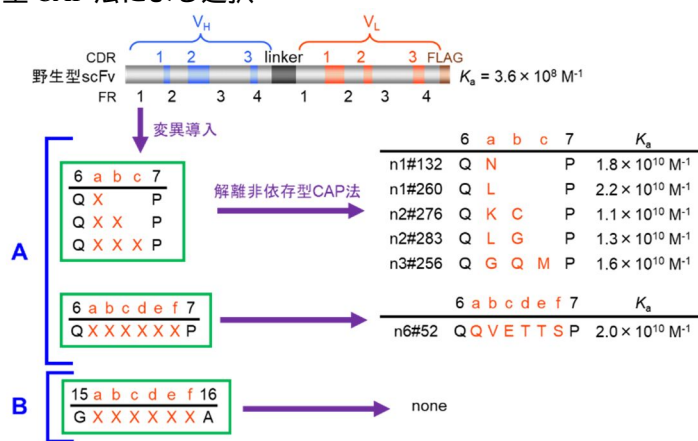


図 3. 得られたクローンの一次構造と K_a

(2)得られた変異体を用いる ELISA

得られた変異体の中で K_a が $2 \times 10^{10} M^{-1}$ を上回った 2 種 (n1#260, n6#52) について、抗原固定化プレートを用いる競合 ELISA を行った。すなわち CS-BSA を固定化したマイクロプレートに、変異 scFv および遊離の CS を加え 4 で 2 時間反応させた。洗浄後、残存する scFv をペルオキシダーゼ標識抗 FLAG 抗体を用いて補足し、固相上の酵素活性を *o*-フェニレンジアミンを色原体として、比色法により測定した。その結果、両者とも野生型 scFv よりも 60 倍以上 (50% 阻害値の比較による) 高感度な検量線が得られた (図 4)。

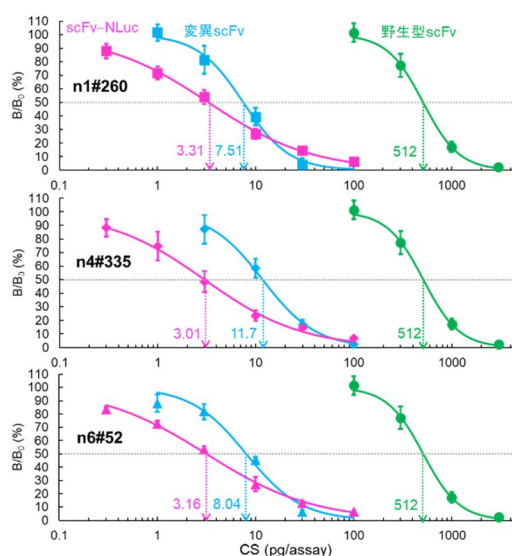


図 4. 得られた変異体を用いる競合 ELISA の検量線

(3)NLuc 融合タンパク質の作製とコントロール血清の測定

上記の 2 種に加えて、既に得られていた n4#335 (6 番と 7 番の間に 4 個挿入, K_a ; $2.0 \times 10^{10} M^{-1}$) と NLuc とを遺伝子レベルで連結し、scFv-NLuc 融合タンパク質を作製したのち、競合 ELISA に付した。CS-BSA 固定化プレートに、scFv-NLuc および遊離の CS を加えて反応させた。洗浄後、基質としてフリマジンを追加して、発光強度を測定した。その結果、いずれも野生型 scFv を用いる比色 ELISA よりも 150 倍以上高感度な検量線が得られた (図 4)。本法をコントロール血清中の CS 測定に応用したところ、3 種の scFv-NLuc 融合タンパク質のいずれを用いた場合でも良好な希釈直線性が得られた (図 5)。

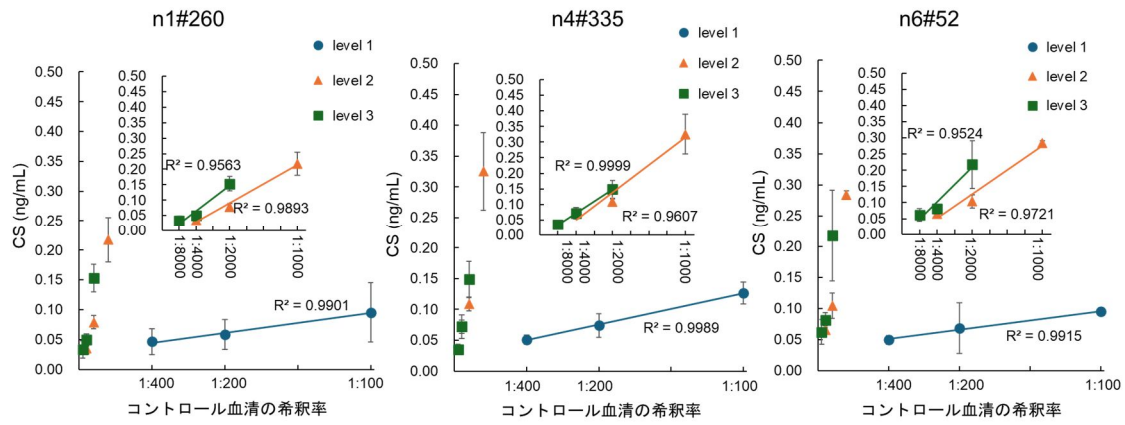


図5. 得られた変異体を用いる ELISA によるコントロール血清の測定

(4) 考察

本研究では、CS に対する scFv について V_H -FR1 内にアミノ酸を挿入したライブラリーを作製し、高親和力変異体を探索した結果、ライブラリーA (6番と7番の間) では実用に耐える変異 scFv の獲得に成功しているが、ライブラリーB (15番と16番の間) では高親和力抗体が得られなかった。B の挿入位置はβシートの折り返し部分に位置し、A よりも抗原結合部位から離れている (図2)。以上のことから、抗原結合部位により近く位置する FR へのアミノ酸挿入により、効率よく実用的な高親和力抗体を創出できる可能性が示唆された。

引用文献

- [1] Kiguchi Y., et al., *Sci. Rep.*, **10**, 14103 (2020).
- [2] Kiguchi Y., et al., *Sci. Rep.*, **11**, 8201 (2021).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yuki Kiguchi, Izumi Morita, Akari Tsuruno, Norihiro Kobayashi	4. 巻 45
2. 論文標題 Retrieving dissociation-resistant antibody mutants: an efficient strategy for developing immunoassays with improved sensitivities	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1432-1437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00454	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Izumi Morita, Yuki Kiguchi, Saya Nakamura, Ayano Yoshida, Haruna Kubo, Momo Ishida, Hiroyuki Oyama, Norihiro Kobayashi	4. 巻 45
2. 論文標題 More than 370-fold increase in antibody affinity to estradiol-17 by exploring substitutions in the VH-CDR3	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 851-855
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00187	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kiguchi Yuki, Morita Izumi, Yamaki Kouya, Takegami Shigehiko, Kobayashi Norihiro	4. 巻 46
2. 論文標題 Framework-Directed Amino-Acid Insertions Generated over 55-Fold Affinity-Matured Antibody Fragments That Enabled Sensitive Luminescent Immunoassays of Cortisol	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1661 ~ 1665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b23-00656	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木口 裕貴
2. 発表標題 免疫測定法の高感度化に資する高親和力変異抗体探索システムの開発と応用
3. 学会等名 日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木口 裕貴, 森田 いずみ, 鶴野 朱里, 小林 典裕
2. 発表標題 解離非依存型CAP法による高親和力抗コルチゾールscFvの創製
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森田 いずみ, 木口 裕貴, 久保 晴菜, 石田 もも, 大山 浩之, 小林 典裕
2. 発表標題 CAP法を活かしたVH-CDR3を変異標的とする高親和力抗エストラジオール-17 抗体フラグメントの創製
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 木口 裕貴, 森田 いずみ, 武上 茂彦, 小林 典裕
2. 発表標題 解離非依存型 CAP 法により取得した高親和力変異 scFv を用いるコルチゾールの高感度生物発光 ELISA
3. 学会等名 日本抗体学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------