

令和 2 年 6 月 27 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K06923

研究課題名（和文）次世代抗体医薬（HF-RabMab）の開発・製造プラットフォームの構築

研究課題名（英文）Development of next-generation antibody（HF-RabMab）

研究代表者

熊田 陽一（Kumada, Yoichi）

京都工芸繊維大学・分子化学系・准教授

研究者番号：70452373

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、特異性・親和性の強いウサギ由来モノクローナル抗体（RabMab）のスクリーニング技術、生産技術、ならびにCDR-Grafting技術を確立することで、RabMabの医薬品ならびに検査薬への利用可能性を考察した。ファージディスプレイ技術を用いることで、ある程度の範囲で特異抗体の取得に成功した。さらに、組み換え大腸菌、昆虫細胞ならびに動物細胞培養によってRabMabおよびそのフラグメントを生産できることを確認した。最後に、RabMabのCDR領域をある程度の範囲でグラフトングすることに成功し、RabMabの高い有用性を確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、抗原特異性ならびに親和性に定評のあるウサギモノクローナル抗体（RabMab）の単離技術、生産技術、特異性変換技術を確立することに成功した。その結果、あらゆる抗原に対するRabMabを自在に単離、生産することが可能となった。本研究成果は、医薬品開発や検査薬開発の迅速化・効率化に大きく貢献できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we demonstrated screening, production and CDR-grafting of a novel rabbit monoclonal antibody (RabMab), and also investigated a possibility of RabMab to use as a biologics. Antigen-specific RabMab clones were efficiently isolated by phage display system, and then, they were successfully produced in recombinant *E. coli*, insect and animal cells with different fragment styles. CDR-grafting of RabMab was also possible. Thus we could confirm that RabMab has a great potential and usefulness to use in clinical trials.

研究分野：生物化学工学

キーワード：scFv RabMab CDR-grafting production

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者が先般開発したRabMabスクリーニングシステム(特願2015-219765)をベースにモデル抗原に対し、高い結合親和性を有するRabMab遺伝子を高効率に獲得可能なシステムを開発する。本手法は、リポソームを固定化担体として用いるバイオパニングと、SPRセンサによる解離速度定数解析を網羅的に実施することで、高効率に結合親和性の高い抗体遺伝子を特定するものであり、多くの治療用ターゲット抗原に対して利用可能である。本研究では、モデル抗原に対して $K_D = 1 \text{ nM}$ 以下で結合するRabMab遺伝子をそれぞれ10種類以上獲得することを目標とする。さらに、従来の抗体と血中における抗原特異性・親和性を比較し、本スクリーニングシステムが治療用抗体の単離に有効であることを実証する。次に、得られたRabMabの抗原認識ドメイン(Fvドメイン)に存在する超可変領域(CDR)のアミノ酸配列をCDRグラフティング法によってヒト抗体のフレーム配列内に移植したヒト化RabMabを設計する。Borrasら(J.B.C., 285, 9054-9066 (2010))はウサギscFvのCDRグラフティングに成功しており、本報文を基に、RabMabの抗原認識特性と安定なフレーム配列を有するRabMabの作成技術を確立する。RabMabの作成前後で抗原特異性・親和性・血中安定性の変化がないことをSPRセンサにより確認する。得られた全てのRabMabについて検討し、本技術の高い汎用性を実証する。

2. 研究の目的

本研究では、次世代抗体医薬「HF-RabMab」の開発・製造プラットフォームの構築を目的とする。HF-RabMabは、ウサギモノクローナル抗体(RabMab)由来の高い抗原結合親和性、血中安定性を継承するとともに、改変Fcの導入によって従来よりも高いエフェクター機能が付与されている。さらに、RabMabは、微生物による大量生産が可能である。本研究では、RabMab遺伝子の単離、CDRグラフティングによる高機能RabMabの調製、改変Fcの導入によるRabMabの創生、生産宿主の最適化、精密流加培養システムを利用した大量生産、以上5項目に関する技術開発を行い、RabMabの開発・製造プラットフォームを確立する。

3. 研究の方法

本研究では、医薬ならびに検査薬に利用可能な高機能ウサギ抗体RabMabの単離技術、生産技術ならびにCDRグラフティング技術について検討を行った。以下に、それらの方法を述べる。

1) 単離技術

RabMabの単離は、主にファージディスプレイ技術を利用した。抗原免疫を行ったウサギの脾臓からTotal RNAを抽出し、RT-PCRによりcDNAを得た。ウサギVHおよびVL特異プライマーを用いてこれらの遺伝子を増幅後、ファージミドベクターにクローニングした。本ベクターで大腸菌を形質転換し、ヘルパーファージの多重感染によってファージライブラリを得た。さらに、抗原結合多重膜リポソームを用いてバイオパニングを行い、抗原特異的ファージを獲得した。さらに、ファージ粒子内のDNA配列を解析することでRabMabのアミノ酸配列を決定した。抗原結合活性、固定後の活性変化を評価し、単離されたRabMabのキャラクタリゼーションを行った。

2) 生産技術

多様なRabMabの生産系を確保するために、組換え大腸菌、昆虫細胞-バキュロウイルス系、ならびに哺乳動物細胞HEK293Tを検討した。特に、組み換え大腸菌においては、ファージディスプレイ法によって単離されたRabMab-scFvがフラスコ培養ならびにジャーフェンターを用いる流加培養によって大量生産可能かを検証した。さらに、scFv-FcならびにWhole Abの生産に

においては、昆虫細胞-バキュロウイルス系ならびに哺乳動物細胞培養系が適応可能かを検証した。いずれの細胞も、無血清培地を用い、培養上清中への分泌発現を検討した。さらに、これらの発現フォーマットにおいて、VHH や Tim-Fc などへの応用が可能かも合わせて検討した。

3) CDR グラフティング技術

RabMab の特異性変換ならびにフレームの交換が可能かを検証するために CDR グラフティング技術について検討した。IMGT データベースを利用して単離した Fv のナンバリングを行い、この中から CDR の配列を抽出した。抽出後の CDR 配列を別の RabMab scFv のフレーム配列内に挿入した新しい RabMab scFv 遺伝子を全合成し、組み換え大腸菌を用いて発現を行った。Ni-NTA カラムで RabMab scFv を精製した後、これらの抗原結合活性を評価した。

4. 研究成果

異なる宿主ベクター系における RabMab 生産系の構築

本研究では、遺伝子組換え大腸菌、昆虫細胞ならびに哺乳動物細胞を用いて、多様な RabMab や Fc 融合タンパク質を高効率に生産する技術について検討した。まず、遺伝子組換え大腸菌を宿主として、全長抗体 (aglycosylated antibody) の生産を試みた。in clonal antibody および E-clonal antibody のデザインと発現を文献を参考に検討したが、可用性画分にはほとんど発現することはなく、また、低濃度かつ低収率であることから分離・精製も困難であった。一方で、ウサギ単鎖抗体 (RabMab scFv)、VHH ならびに一部の L 鎖についてはジャーファーマンターを用いて大量生産が可能であった。特に、単鎖抗体は、2 ~ 3 g/L と高生産が可能であったが、材料親和性ペプチドタグを導入した場合、上清中の単鎖抗体濃度はほぼ 0 g/L となった。

より複雑な融合タンパク質の発現宿主として、昆虫細胞-バキュロウイルス系と HEK293T 細胞の系を検討した。目的タンパク質を T 細胞受容体 (T-cell receptor) の V ドメインとムチン、Fc 領域からなる融合タンパク質とし、これを発現可能であるか検討した。その結果、昆虫細胞-バキュロウイルス系においては、発現した目的タンパク質は可溶化することはなかったのに対し、一方で、HEK293T を発現細胞として用いる場合、当該融合タンパク質の培地中への分泌発現が可能であった。さらに、C 末端側に材料親和性ペプチドタグを融合した系や、ビオチン修飾サイト (Avi-tag) を導入した際においても、哺乳動物細胞を用いることで発現量が改善できることが明らかとなった。以上のことから、RabMab の生産宿主としては哺乳動物細胞を用いることが推奨された。

昆虫細胞-バキュロウイルス系を用いる RabMab の調製と C 末端タグによる高機能化

次に、ウサギモノクローナル抗体をベースにした Rab-Mab の抗体医薬への利用を目的とし、本抗体のファージディスプレイによるスクリーニング、乖離速度定数による選別、さらには、目的用途に応じた単離技術の開発を行った。特に、昨年度獲得した RabMab scFv の内、固定化状態の優れたクローンを選別し、本 scFv の C 末端部にウサギ Fc 領域を融合した組換え scFv-Fc を調製した。本 scFv-Fc を pFastBac Dual ベクター内に導入後、昆虫細胞 sf9 をトランスフェクションするためのバクミドを Bac-to-Bac システムにより調製した。得られたバクミドを昆虫細胞 sf9 に導入し、組換えバキュロウイルスを調製した。昆虫細胞-バキュロウイルス系により scFv-Fc の生産を試みたところ、培養上清中に scFv-Fc の発現が確認された。scFv-Fc の抗原結合活性について、ELISA 法、ならびに SPR 法によって確認を行ったところ、scFv と比較してより高い抗原結合活性が確認された。これは、scFv-Fc の固相化抗原に対する Avidity 効果による

ものと考えられる。

さらに、s c Fv-Fc の C 末端部にビオチン化タグ (Avi-tag) を融合した s c Fv-Fc-Avi-tag を同様の方法で発現することにも成功した。ビオチンリガーゼ (BirA) と s c Fv-Fc-Avi-tag を昆虫細胞内で共発現することで、s c Fv-Fc の C 末端部にビオチンを部位特異的に導入することに成功した。ストレプトアビジンを固定化したポリスチレンプレートを利用して、ビオチン化 s c Fv-Fc-Avi-tag の固相化状態における抗原結合活性を比較したところ大幅な活性の向上が確認され、s c Fv-Fc が PS 基板上において均一な配向性を有していることが示唆された。

Frame 配列の網羅的な獲得と CDR グラフティングによる獲得 RabMab の多様化

最後に、ウサギモノクローナル抗体 (RabMab) 由来の高い抗原結合親和性を継承するための RabMab 遺伝子の単離技術ならびに、CDR グラフティングについて検討を行った。

5 種類の抗原タンパク質に対する免疫抗体ライブラリを用いて、独自のバイオパニングによるスクリーニング実験を行った結果、2 ~ 3 ラウンドのバイオパニング操作後に高効率に RabMab 遺伝子を獲得することに成功した。

さらに、これら RabMab を scFv として抗原に結合させた際の親和定数は、 $10^8 \sim 10^{11} \text{ M}^{-1}$ と非常に高く、良質な RabMab を短期間に単離可能であることが明らかとなった。

また、RabMab の Fv 内において、Complementary Determining Region (CDR) を同定するとともに、これらを移植可能な CDR-grafting 技術の確立に成功した。以上の結果より、高機能な RabMab の開発が可能である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小林 巧, 新 裕太, 片山 淳子, 的場 一隆, 堀内 淳一, 熊田 陽一
2. 発表標題 エクソソームのアフィニティ分離が可能な単鎖抗体固定化担体の開発
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoichi Kumada, Jun-chi Horiuchi
2. 発表標題 Super-Secretory Expression of Recombinant Antibody Fragments by Fed-Batch Culture with PID-Control Feeding System
3. 学会等名 PEPTALK 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoichi Kumada, Jun-ichi Horiuchi
2. 発表標題 Immobilization and Orientation Control of Anti-CRP ScFv on a Surface of Polystyrene Latex Beads and Its Application to Latex-Turbidimetric Assay
3. 学会等名 AIChE 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoichi Kumada, Jun-ichi Horiuchi
2. 発表標題 Super Secretory Production of Recombinant Antibody Fragments by Precisely Controlled Fed-Batch Culture of E. coli
3. 学会等名 Peptalk 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----