

令和 5 年 10 月 10 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02924

研究課題名(和文) 培養細胞における「多様化誘導型」抗体ディスプレイシステムの開発

研究課題名(英文) Development of inducibly diversified antibody-expressing cell library that enables antibody phenotypic screening

研究代表者

富塚 一磨 (TOMIZUKA, KAZUMA)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：40444640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、一千万を超える多様な特異性をもつ抗体分子・ペプチドを発現する培養細胞ライブラリ構築、及びそれを用いた表現型スクリーニングによる機能抗体・ペプチド取得技術の開発である。ヒト抗体分子を細胞膜上に高発現する293T細胞において、ヒト重鎖CDR3領域を標的としたゲノム編集の条件最適化を行い、10%以上という高効率で10アミノ酸ランダム化に成功した。この結果より、細胞1億個あたり1千万以上のライブラリサイズが実現可能なことが示された。さらに上記細胞にWnt/カテニンシグナルレポーター系を搭載した後に多様化誘導を行い、同シグナル制御抗体およびペプチドの探索を実施中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類細胞において、ゲノム編集技術による標的蛋白質の10アミノ酸ランダム化が10%以上という高い効率で起こることが示された。すなわち、様々な表現型アッセイ系と本手法の組み合わせにより、これまで難しかった哺乳類細胞を用いた指向性進化研究が可能となると考える。また抗体・ペプチド創薬における表現型スクリーニングを可能とする本システムは、新規医薬候補品の創出に大きく寄与すると期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to create a cultured cell library expressing antibody molecules/peptides with more than 10 million of diverse specificities and to develop a technology to obtain functional antibodies/peptides by phenotypic screening using the library. In 293T cells, which express human antibody molecules on the plasma membrane, we optimized the conditions for genome editing targeting the CDR3 region of the human heavy chain, and succeeded in randomizing 10 amino acids with a high efficiency of more than 10%. This result indicates that a library size of more than 10 million per 100 million cells is feasible. Furthermore, after loading the Wnt / -catenin signal reporter system on the above cell line, diversification is induced, and the search for the signal-regulating antibody and peptide is underway.

研究分野：ゲノム工学

キーワード：ゲノム編集 ヒト抗体 相補性決定領域 Wnt/ カテニンシグナル ペプチド医薬 指向性進化 抗体 医薬

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

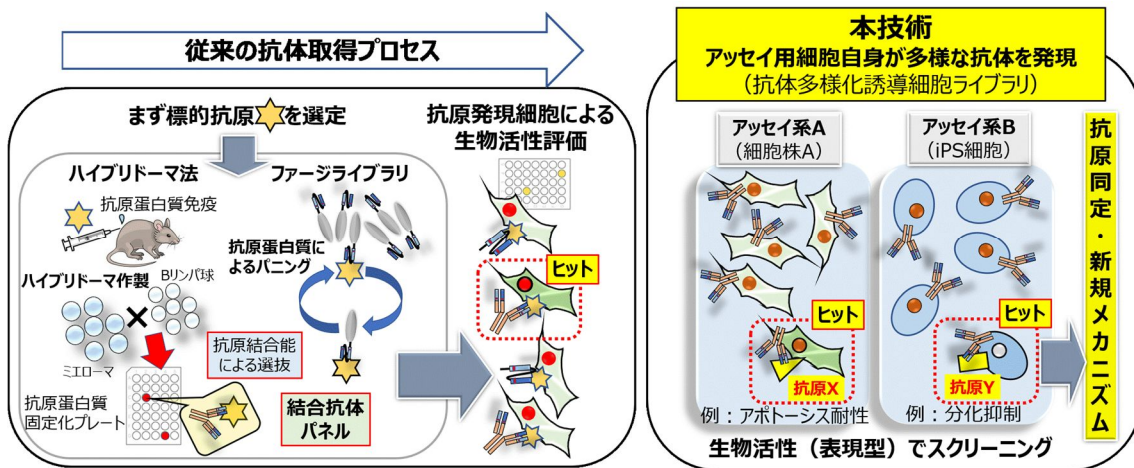
1. 研究開始当初の背景

モノクローナル抗体は、生命科学を支える研究ツールとして広く利用されてきただけでなく、癌や自己免疫疾患をはじめとする様々な疾患領域で臨床応用が進み、既に日米欧で70品目(2018年現在)を超える抗体医薬品が承認されている。一方、標的抗原の枯渇により新規な標的・メカニズムにもとづく抗体医薬品の研究開発が近年鈍化しており、実際、臨床で有効性が示された少数の標的への集中が顕著となっている。こうした状況を打破するため、有用標的の効率的探索法や、従来法では取得困難な、新規な活性や機能を持つ抗体を獲得する技術の開発が待ち望まれているが、抗体創薬のプロセスを根本から変えるような技術開発の事例は少ない現状にある。とりわけ標的抗原の特定を必要とし、表現型スクリーニングが困難という重要なボトルネックについては、未だ有効な解決策がない。標的や仮説に依存しない表現型スクリーニングは、これまで主流だった標的ベースの創薬が困難に直面する中、新規作用機序にもとづく(first-in-class)医薬品創出を可能にする手法として再び注目されている(Moffatら、2017)。

モノクローナル抗体取得においては、ハイブリドーマ法、ファージディスプレイ法いずれの場合でも、標的タンパク質の精製品や強制発現細胞を出発材料とし、結合能により選抜された抗体クローン(数十種~数百種)について生物活性(表現型)を検討するのが一般的である(図1左)。低分子創薬では $10^5 \sim 10^6$ 規模のライブラリーを用いて、標的の特定なしに表現型(セルベース)スクリーニングが行われ成果を挙げているが、抗原結合能で絞り込む前のナイーブな抗体ライブラリーから任意の抗原に結合する抗体を取得するためには $10^7 \sim 10^8$ 以上のライブラリサイズが必要とされるため、低分子同様のアプローチは難しい。ハイブリドーマ上清を 10^7 以上の規模でスクリーニングすることは現実的でなく、また抗体を発現する大腸菌ファージや酵母はそのままでは生物活性評価に使用できない。

一方、実験室内で 10^9 個程度の細胞を培養し、抗体染色などにより解析、分離することは可能である。そこで個々の細胞がそれぞれ異なる特異性を有する抗体分子を発現する細胞ライブラリーを構築し、内因性の機能分子と当該抗体の相互作用の結果、表現型変化を起こした細胞と、それが発現する抗体を同定することができれば、『表現型(生物活性)/機能抗体』を起点として標的分子に迫る、いわゆるフォワードジェネティクスのアプローチが可能になると考えられる(図1右)。

(図1)



前述の通り微生物では、 10^7 を超えるサイズの抗体提示ライブラリーが実現しているものの、抗体を細胞膜上に発現する培養細胞ライブラリー構築(Mammalian display法)については、様々な技術的障壁によりその多様性は $10^5 \sim 10^6$ 程度であり、既存抗体の親和性成熟や、抗原結合性ファージ由来あるいは抗原免疫動物由来のライブラリーの使用にとどまっている(Doernerら、2014)。すなわち 10^7 を超えるサイズの、ナイーブな多様性を有する抗体を発現する培養細胞ライブラリーの構築と、それを用いた表現型スクリーニングについては未だ決定的な手法は確立していない。

2. 研究の目的

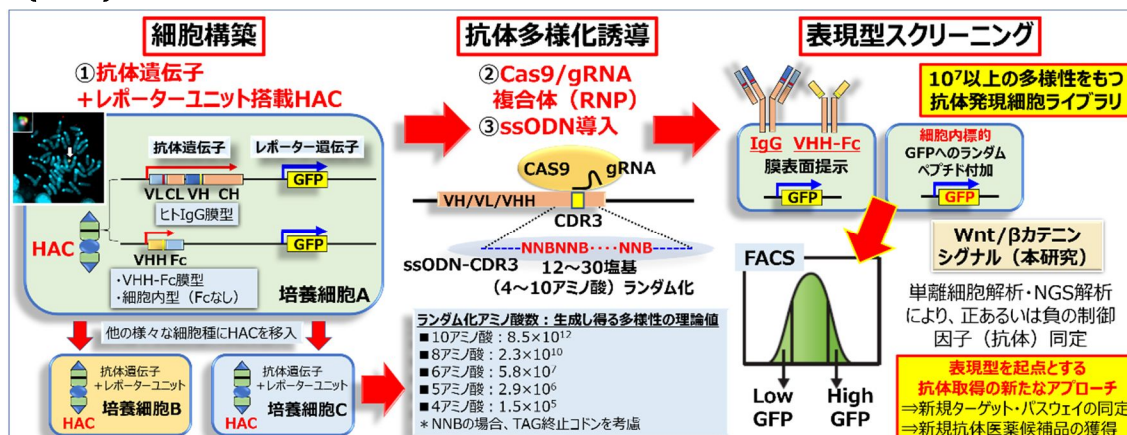
本研究の目的は、 $10^7 \sim 10^8$ の多様な特異性をもつ抗体を発現する培養細胞からなるライブラリー構築と、それを用いた表現型スクリーニングを可能とする画期的なプラットフォーム技術の開発であり、上述した抗体創薬の課題を解決し得るものである。その最大の特徴は、従来のMammalian display法が抗体ライブラリーを細胞の外から導入していたのに対して、細胞自身がもつ抗体発現ユニットの多様化(進化)が誘導されるため、理論上細胞数と同じレベルの多様性が実現可能な点である。これを実現するために、

CRISPR-Cas9による高効率ランダム変異導入技術

導入遺伝子のコピー数、発現の制御が可能なヒト人工染色体 (Human artificial chromosome: HAC) ベクター

という申請者らが開発した 2 つの技術の融合を図る点も重要な要素である。本研究が目指す技術の概略を (図 2) に示す。

(図 2)



抗体遺伝子 + レポーター遺伝子ユニットを搭載した HAC を保持する培養細胞 (図 2 左) に、Cas9 タンパク質 / gRNA 複合体 (RNP) と抗体 CDR3 領域に対応するランダム塩基を含む 1 本鎖オリゴヌクレオチド (ssODN) を導入することで、抗原特異性への寄与が最も大きい CDR3 領域のアミノ酸配列ランダム化を誘導する。例えば、全ての細胞 (効率 100%) で 6 アミノ酸ランダム化が起これば、理論上約 6×10^7 の多様性が生成し得る (図 2 中)。多様化誘導された培養細胞ライブラリから、レポーター遺伝子発現が亢進あるいは低下した細胞を分離・濃縮することで、特定の細胞内シグナル伝達経路を活性化または抑制する機能抗体を同定する表現型スクリーニングが可能となる (図 2 右)。加えて一旦構築された HAC は様々な細胞種に移入することができ、簡便なスクリーニング細胞構築が実現する (図 2 左下)。得られる機能抗体は、表現型と関連する新規メカニズム解明や新規医薬候補品獲得に貢献すると期待される。

CRISPR-Cas9 によるゲノム編集においては、標的部位に DNA の挿入・欠失を起こす非同源末端結合 (NHEJ) に対し、鋳型配列との相同性に依存する正確な相同組換え (HR) の頻度は 1% 未満と低く、HR クローン取得には薬剤等による選択が必要であった。一方提案者 (堀田) は、RNP と ssODN による HR 条件最適化により、34bp の loxP 配列を 40% という驚くべき高頻度でヒト iPS 細胞の Dystrophin 遺伝子座に挿入することに成功しており (Kagita ら, 2021)、この知見を活用することにより 10 アミノ酸程度までのランダム化が、薬剤等による選択なしに高い効率で可能になると考えられた。例えば容易に扱える 10^8 個の細胞をゲノム編集し、 10^7 以上のライブラリサイズを実現するには、遺伝子導入操作における生存率 10% (現状) の場合、全ての生細胞での CDR3 ランダム化 (6 アミノ酸以上) が必要だが、実際には野生型 / NHEJ (Indel) の混在は避けられない。本研究では実現可能な目標として、生存率の改善 (10% 30% 以上) およびランダム化効率改善 (30% 以上) により、 10^8 細胞あたり 10^7 以上のライブラリサイズを実現する条件の決定を目指している。

提案者 (冨塚、香月) が開発を進めてきた HAC ベクターは、宿主染色体とは独立して 1 コピー維持されるため宿主ゲノムを傷つけず、導入遺伝子サイズに制約がないことから、安全に、安定で制御された導入遺伝子発現が可能である。最近では複数遺伝子を効率的に導入する方法も開発され (Yoshimura ら, 2015) また染色体移入効率の改善により、様々な細胞種への導入が可能となっている (Kazuki ら, 2020)。本研究では、HAC のメリットを活かし、多大な労力と時間を要する従来のランダム挿入による細胞構築に代えて、抗体発現ユニットと細胞内シグナル伝達検出用レポーター遺伝子をそれぞれ 1 コピー同時搭載する HAC を構築する (図 2 左)。

レポーター遺伝子による表現型スクリーニングの標的としては、Wnt/βカテニンシグナルを選択した。発生や形態形成だけでなく、細胞の増殖・分化・再生、さらには癌を含む様々な疾病の発症や進展において重要な役割を果たしている本シグナル系は、創薬標的としても注目を集めている。一方提案者 (冨塚) が世界に先駆けて見出した、腸管上皮増殖促進作用を有する本シグナル系活性化因子 R-spondin (Kim ら, 2005) を含め、本シグナル関連因子の多くは組換え体大量調製が困難なため、臨床応用の試みは進んでいない。よって、例えば本シグナルの作働性あるいは阻害抗体が取得できれば医薬品候補として有望と考えられる。加えて多種類のリガンド、受容体、細胞内因子が関わる複雑な制御機構はその多くが未解明のままであり、本研究で取得される機能抗体の活用による研究進展への期待も大きい。最近、CRISPR-Cas9 による網羅的遺伝子破壊と、本研究と類似のレポーター系を組み合わせ、Wnt/βカテニンシグナル関連遺伝子の同定に成功したとの報告がなされたが (Zeng ら, 2018; Wan ら, 2021) 多様化抗体を用いたスクリーニングは例が無く、本研究のアプローチは独自性が高い。さらにレポーター系の交換により他

の様々なシグナル系への展開も可能な汎用性がある。

3. 研究の方法

基盤技術確立 (多様化誘導細胞ライブラリー構築、担当: 富塚、堀田、香月)

- 293T 細胞で、ヒト IgG 膜型、および VHH-Fc 膜型 cDNA 発現カセットを 1 コピー搭載した HAC を構築し、細胞膜における抗体発現を確認する。続いて CRISPR-Cas9 RNP と ssODN による重鎖 CDR3 領域のアミノ酸 (6~10 アミノ酸) ランダム化条件を最適化し、 10^7 以上の CDR3 多様性を実現する (6~10 アミノ酸ランダム化効率 30% 以上、エレクトロポレーション後の生存率 30% 以上)。また細胞内標的に対する制御因子同定のため、EGFP を足場蛋白質として、上記と同様の方法によるランダムペプチド付加について検討する。ランダム化-indel-野生型の比率は PCR 産物のクローン解析等により決定する。

有用性実証 1 (結合抗体取得、担当: 富塚)

- 多様化誘導したヒト IgG 膜型、VHH-Fc 膜型抗体発現細胞を蛍光標識抗原 (ヒト EpCAM 細胞外ドメインを含む複数種を検討) と結合させ、セルソーターを用いて結合抗体発現細胞を濃縮・単離する。単離された細胞が発現する抗原結合抗体の可変領域配列を決定し、組換え抗体の調製および抗原結合能の確認を行う。

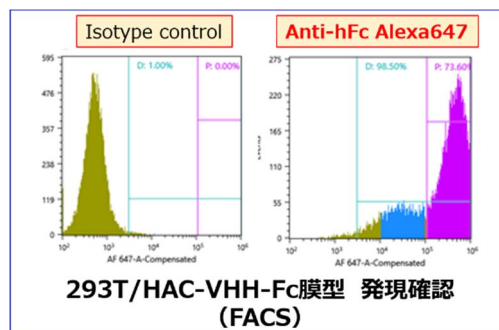
有用性実証 2 (機能抗体取得、担当: 富塚、堀田、香月)

- 293T 細胞で、Wnt/ カテニンシグナルレポーター遺伝子 (TOP-EGFP) 搭載 HAC を構築し、動作確認を行う。樹立された細胞について、レポーター遺伝子である EGFP へのランダムペプチド付加を行い、レポーター発現が亢進した細胞を濃縮・単離する。単離された細胞が発現する機能抗体の可変領域配列を決定し Wnt/ カテニンシグナルを活性化する機能分子を同定する

4. 研究成果

(1) ランダム化標的ヒト抗体/VHH 抗体 cDNA の HAC 搭載、膜発現

完全ヒト抗体ランダム化標的として、ヒトにおいて最も使用頻度の高い VK/JK/VH/DH/JH セグメントを組み合わせ、ヒト 鎖定常領域 (CK)、ヒト IgG1 定常領域 (IgG1)、PDGF 受容体膜結合領域 (PDGF-TM) と連結したバイシストロニック cDNA (hIgKH: VK3-20/JK1/T2A/VH3-23/DH6-13/JH4/hIgG1/PDGF-TM) を設計した。また hIgKH より DH 領域を除いたものを hIgKH DH とした。さらに一本鎖抗体ランダム化標的として VHH-hIgFc (Universal-VHH (Saerens ら、2005)/hIgG1-Fc/GPI アンカー配列) を設計した。これら cDNA を CAG プロモーター下流に配置したヒト人工染色体 (HAC) 搭載用ベクター (Kazuki ら、2011) を構築し、21HAC2 (Kazuki ら、2011) を保持する 293T 細胞に、Cre/LoxP システムを用いて 1 コピー挿入した。21HAC2 上への発現ベクター挿入により HAT 耐性となった細胞コロニーのプールについて、抗ヒト IgG1-Fc を用いた FACS 解析を実施し、導入 cDNA の細胞膜上における発現を解析した。VHH-hIgFc ベクター導入の結果を図 3 に示すが、1 コピー導入にもかかわらず高い発現が達成されている。hIgKH、hIgKH DH についても同様に高発現細胞を容易に得ることができたため、これら細胞プールを以降のランダム化実験に用いた。



(図 3)

(2) 挿入型ゲノム編集によるヒト抗体重鎖 CDR3 領域/VHH 抗体 CDR3 領域のアミノ酸ランダム化

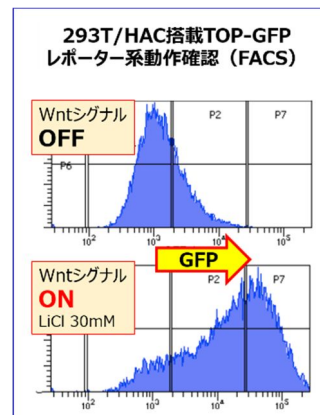
Kagita ら (2021) は、CRISPR-Cas9 RNP と ssODN による HR 条件最適化により、34bp の loxP 配列を 40% という驚くべき高頻度でヒト iPS 細胞の Dystrophin 遺伝子座に挿入することに成功した。この知見を活用し、(1) で取得された各 293T 細胞プールにおいて、ヒト抗体重鎖あるいは VHH の CDR3 領域を標的として、ランダムな 18 塩基 (N18)、24 塩基 (N24) あるいは 30 塩基 (N30) を含む ssODN を用いた挿入型ゲノム編集を試みた。その結果、hIgKH (N30): 2%、hIgKH DH (N18): 29%、hIgKH DH (N30): 37%、VHH-hIgFc (N18): 8%、VHH-hIgFc (N24): 21%、VHH-hIgFc (N30): 5% の効率でランダム化が検出された。標的配列や挿入ランダム塩基数により違いはあるが、目標としていた約 30% のランダム化効率を実現可能であることが示された。

(3) HAC 搭載 EGFP の C 末端部位へのランダムペプチド挿入

細胞内標的に対する制御分子獲得のため、293T 細胞が保持する HAC に cDNA 発現カセットが搭載されている EGFP を足場蛋白質として、ランダムペプチド付加することを検討した。Abedi ら (1998) がペプチド提示のための挿入部位として好適であるとした、ループ 6、ループ 7 に加えて C 末端部位を標的として、(2) と同様の方法でランダムな 30 塩基 (N30) を含む ssODN を用いた挿入型ゲノム編集を試みた。その結果、ループ 6: 2%、ループ 7: 0%、C 末端: 8% の効率でランダム化が検出された。(2) の抗体標的の結果と比較して効率は低いものの、C 末端部位への挿入効率が最も高かったため、以後の実験ではこの条件を用いた。

(4) Wnt/ カテニンシグナル GFP レポーターカセットの HAC への搭載

Wnt/ カテニンシグナルレポーター遺伝子 (TOP-EGFP) カセットを含むヒト人工染色体 (HAC) 搭載用ベクターを構築し、21HAC2 を保持する 293T 細胞に、Cre/LoxP システムを用いて 1 コピー挿入した。21HAC2 上への発現ベクター挿入により HAT 耐性となった細胞コロニーのプールに、Wnt シグナル活性化剤である LiCl を添加し、GFP 強陽性となる細胞を分取した。得られた細胞プールを拡大培養した後、あらためて LiCl を添加したところ、GFP シグナルの明確なシフトが観察された (図 4)。すなわち、21HAC2 上に 1 コピー搭載された TOP-EGFP カセットは、想定通りに動作することが示された。



(図 4)

(5) ランダムペプチド付加 EGFP 発現細胞ライブラリを用いた Wnt シグナル活性化因子のスクリーニング

(4) で作製した TOP-EGFP カセットを含む 21HAC2 を保持する 293T 細胞において、(3) で示した方法で、EGFP (C 末端部位) を標的としたゲノム編集によるランダムペプチド (10 アミノ酸) 付加を実施した。ゲノム編集後の細胞プールについて、Wnt シグナル活性化剤処理を行わずに FACS 解析を実施し、EGFP 強陽性細胞を分取した。得られた細胞プールよりゲノム DNA を調製し、EGFP の C 末端部位へのランダム配列挿入解析を実施したところ、特定の アミノ酸配列 (10 アミノ酸) 2 種が複数クローンで検出された。これらのペプチドが付加された EGFP は、Wnt シグナル活性化能を持つ可能性があり、その機能性について検討中である。

(総括)

- ・ CRISPR-Cas9 RNP を用いた挿入型ゲノム編集によって、HAC に搭載した 1 コピーの抗体重鎖 cDNA_CDR3 領域のアミノ酸ランダム化 (最大 10 アミノ酸 : 30 塩基) が可能であった。
- ・ 最も高いランダム化効率、hIgKH DH (N30) における 37% であり、目標としていた 30% 以上の効率を達成できた。一方で標的配列、挿入ランダム塩基数等によりランダム化効率のバラツキが大きいため、gRNA の設計など、最適化の余地は大きいと考えられる。
- ・ 細胞内標的に対する制御因子同定のため、EGFP を足場蛋白質として C 末端部位にランダムペプチドを約 8% の効率で挿入することに成功した。
- ・ HAC 搭載 Wnt/ カテニンシグナルレポーター遺伝子 (TOP-EGFP) カセットを保持する 293T 細胞を構築した。この細胞において、レポーター遺伝子である EGFP の C 末端部位に 10 アミノ酸のランダムペプチド挿入を行ったところ、特定の アミノ酸配列が付加された EGFP が Wnt シグナル活性化能を持つことを示唆する結果を得た。
- ・ 本研究では、研究計画のうち有用性実証 2 を優先して実施したため、有用性実証 1 については抗 EpCAM モデル抗体と標識 EpCAM 抗原の結合評価系構築まで完了したものの、実際のライブラリスクリーニングは期間内に実施できなかった。
- ・ 以上の結果より、CRISPR-Cas9 RNP を用いた挿入型ゲノム編集による、抗体 CDR 領域のアミノ酸ランダム化、および細胞内足場蛋白質へのランダムペプチド付加のための基盤が構築された。30% 以上のランダム化効率が達成されたことから、10⁸ 細胞あたり 10⁷ 以上のライブラリサイズは実現可能と考えられる。今後、本手法と Wnt/ カテニンシグナルを含む様々なシグナル伝達系のレポーターアッセイを組み合わせて、細胞表面、細胞内で当該シグナルを制御する新規分子の同定を進めていく。

以上

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋本七海、笹川航、宇野愛海、里深博幸、香月康宏、堀田秋津、富塚一磨
2. 発表標題 染色体工学技術応用（13）：抗体の表現型スクリーニングを可能にする、多様化誘導型抗体発現細胞ライブラリの開発
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 円子 大夢、奥山 優希、橋本 七海、宇野 愛海、石津 由紀、香月 康宏、堀田 秋津、富塚 一磨
2. 発表標題 染色体工学技術応用（14）：機能ペプチドの表現型スクリーニングを行う多様化誘導型発現細胞ライブラリの開発
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>次世代バイオ医薬創成のための人工進化システム https://www.ls.toyaku.ac.jp/~lcb-7/lesson.html</p>
--

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
研究分担者	堀田 秋津 (HOTTA AKITSU) (50578002)	京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点講師 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	香月 康宏 (KAZUKI YASUHIRO) (90403401)	鳥取大学・医学部・准教授 (15101)	

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