

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25289298

研究課題名(和文) 無細胞ディスプレイ技術による次世代低分子抗体医薬の開発

研究課題名(英文) Cell-free display technologies for development of next-generation therapeutic antibody fragments

研究代表者

土居 信英 (DOI, NOBUHIDE)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号：50327673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、以前に当研究室で開発された無細胞ディスプレイ技術を応用・発展させることにより、高いエフェクター機能や二重特異性などの新たな機能を付与した次世代低分子抗体医薬を簡便かつ迅速に開発できるシステムを確立することを目指し、以下の成果を得た。(1) 従来のmRNAディスプレイ法を用いて、新規のFc受容体結合ペプチドを同定した。(2) 無細胞翻訳系としてPUREシステムを用いたmRNAディスプレイ法を確立し、抗GPCRヒト一本鎖抗体の試験管内選択に成功した。(3) 共有結合型DNAディスプレイ法を確立し、耐熱性Fab抗体の試験管内進化と二重特異性Diabody抗体の試験管内選択に応用した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have modified cell-free display technologies previously developed in our laboratory and applied them to efficient and rapid selection of next-generation therapeutic antibody fragments with novel function such as high effector function and bispecificity. We obtained following results. (1) We selected a novel Fc receptor-binding peptide using conventional mRNA display. (2) We improved mRNA display of antibody fragments based on PURE system as a cell-free protein synthesis system and successfully applied it to in vitro selection of a novel humanized scFv against GPCR. (3) We established covalent bicistronic DNA display and applied it to directed evolution of Fab fragments with high thermostability and in vitro selection of bispecific diabodies.

研究分野：工学

キーワード：蛋白質 進化 バイオテクノロジー がん 免疫学

### 1. 研究開始当初の背景

標的分子に対して高い特異性と親和性をもつ抗体医薬は、低分子医薬と比べて副作用が少なく治療効果が高い究極の分子標的薬として注目されているが、投与量が多く生産コストも高いという医療経済性の問題がある。そこで、Fab や scFv などの組み換え抗体 (図 1) への小型化によって生産量を増やしたり、抗体の薬効を高めて投与量を減らす試みがなされている。特に、次世代の抗体医薬として、抗体依存性細胞障害 (ADCC) 活性などのエフェクター機能を増強したり、複数の抗原に対する二重特異性を付与できる効率的な技術が求められている (Nat. Rev. Immunol. 10, 301-316, 2010; Nat. Biotechnol. 29, 245, 2011)。

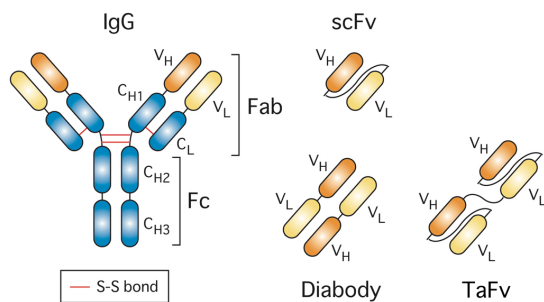


図 1 抗体および組み換え抗体の構造

### 2. 研究の目的

これまでに申請者らは、タンパク質とそれをコードする DNA または mRNA を連結した『表現型と遺伝子型の対応づけ分子』のライブラリーを試験管内で構築できる DNA ディスプレイ法および mRNA ディスプレイ法を開発し (Nucleic Acids Res. 31, e78, 2003; Nucleic Acids Res. 31, e118, 2003)、高親和性の scFv や Fab の試験管内進化に応用してきた (Nucleic Acids Res. 34, e127, 2006; Nucleic Acids Res. 37, e64, 2009; Nucleic Acids Res. 37, e147, 2009)。これらの方法を用いると、多様な変異をもつ抗体やペプチドの対応づけ分子ライブラリーの中から、様々な選択圧の下で抗原に結合する特定の変異抗体を選択した後、核酸部分を PCR で増幅できる。これにより選択と変異・増幅を繰り返すダーウィン進化を試験管内で実現することが可能となる。

本研究では、これらの技術をさらに発展させることで、エフェクター機能の増強や二重特異性などの新たな機能を付与した次世代低分子抗体医薬の開発システムを構築することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) Fc 受容体結合ペプチドの試験管内選択

まず、Fc 受容体として FcγRI、FcγRIIa および FcγRIIIa の細胞外ドメインを CHO 細胞で大量発現し、ビーズに固定した。次に、mRNA ディスプレイ法 (図 2) により、ランダムペプチド (表現型) とそれをコードする mRNA (遺

伝子型) をリボソーム上で共有結合した連結分子のライブラリーを作製し、ビーズに固定した Fc 受容体と結合させ、洗浄後、ビーズに残ったペプチドの遺伝子 mRNA を逆転写 PCR により増幅し、このサイクルを繰り返した。最終的に濃縮された遺伝子の塩基配列を解読し、Fc 受容体結合ペプチド配列を同定した。得られた候補ペプチドを eGFP に融合したタンパク質を大腸菌で大量発現し、His タグなどのアフィニティー・タグを利用して精製した。その後、表面プラズモン共鳴法などの手法を用いて、Fc 受容体に対する親和性を評価した。

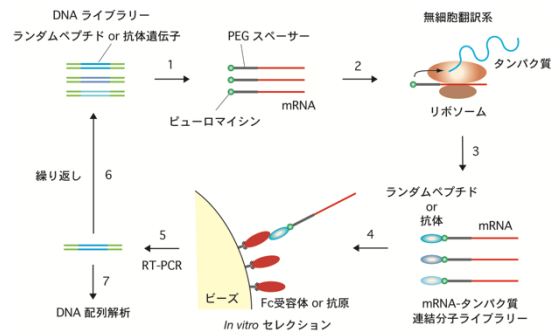


図 2 mRNA ディスプレイ法による試験管内選択の原理

#### (2) 二重特異性抗体の試験管内進化

2 種類の抗体遺伝子を組み合わせたタンデム scFv や Diabody (図 1) の試験管内選択をそれぞれ mRNA ディスプレイ法 (図 2) や DNA ディスプレイ法 (図 3) を用いて行う前に、まず、これらの手法の改良を行なった。従来の mRNA ディスプレイ法では小麦胚芽由来の無細胞翻訳系を利用していたが、本研究では大腸菌由来再構成型 PURE システムを mRNA ディスプレイ法に初めて適用した。また、従来の DNA ディスプレイ法ではストレプトアビジンとビオチンとの非共有結合を介してタンパク質と DNA を連結してきたが、本研究では、O<sup>6</sup>-アルキルグアニン DNA アルキルトランスフェラーゼ (AGT) とベンジルグアニン (BG) との共有結合を利用して連結する方法について検討した (図 3)。

二重特異性抗体の最初のモデル抗原として、フルオレセインとインスリンを選択し、それぞれの抗体遺伝子を組み合わせた様々なフォーマットの二重特異性抗体遺伝子を作製し、PURE システムで発現した抗体の結合活性を ELISA により調べた。その後、フォーマットに適したディスプレイ法を選択し、標的とする 2 種類の抗原を個別に固定した 2 種類のビーズを段階的に用いて、両者に結合する抗体の試験管内選択実験を行なった。

また、本研究で改良した手法の用途拡大として、PURE mRNA ディスプレイ法による G タンパク質共役型受容体 (GPCR) に対する scFv の試験管内選択、および、共有結合型 Bicistronic DNA ディスプレイ法による超耐熱性抗体の試験管内進化についても検討した。

得られた各種の低分子抗体について、大腸

菌における大量発現を行い、His タグや FLAG などのアフィニティー・タグを利用して精製した。その後、ELISA、ウェスタンブロッティング、免疫染色、表面プラズモン共鳴法 (SPR) などの手法を用いて、抗体の親和性・特異性・安定性などの特性評価を行なった。

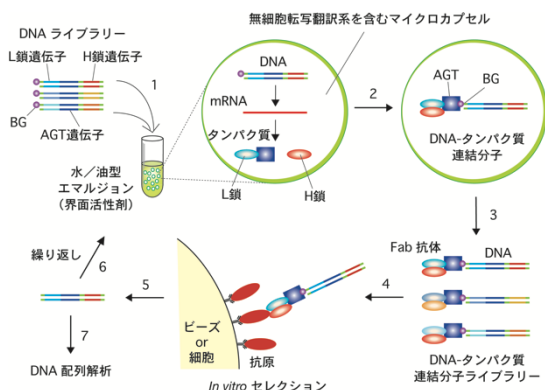


図3 DNA ディスプレイ法による試験管内選択の原理

#### 4. 研究成果

(1) Fc 受容体結合ペプチドの試験管内選択  
まず、FcγRIIIa および FcγRIIIa の細胞外ドメイン (以下 ecFcγRIIIa および ecFcγRIIIa) に対して、ストレプトアビジンビーズに固定するためのビオチン様タグを融合したベイトタンパク質を CHO-S 細胞を用いて発現・精製した。発現量は ecFcγRIIIa の方が多かったが、どちらも IgG との結合活性を有することを ELISA により確認した。

次に、IgG1 の Fc 領域において FcγRIIIa との相互作用部位である LLGGPS の 6 アミノ酸残基を固定し (図 4)、その前後に 3 および 9 アミノ酸残基のランダム配列を付加したライブラリーを設計した。このライブラリーを用いて ecFcγRIIIa に対する 5 ラウンドのセレクションを行った結果、複数のクローン間で部分的に類似した配列が見られた。そこで、いくつかのクローンを選んで結合検証を行ったが、結合は確認できなかった。そこで、16 アミノ酸残基のランダムペプチドライブラリー (R16 ライブラリー) を調製し、ecFcγRIIIa に対して再度 5 ラウンドのセレクションを行った。その結果、3 種類の重複した配列を得たが、そのうちの 2 種類はストレプトアビジンに結合した。これは ecFcγRIIIa の濃度が低く、ビーズ表面のストレプトアビジンが露出していたためであると考えられる。

一方、先行研究において同定されていた FcγRIIIa 結合ペプチド C1 (*J. Biol. Chem.* 284, 1126-1135, 2009) について、ランダムに変異を導入したライブラリーを設計し、試験管内選択による最適化を試みたが、親和性の向上につながる変異の蓄積は見られなかった。そこで、ecFcγRIIIa に対しても R16 ライブラリーを用いて 5 ラウンドのセレクションを行った。その結果、4 種類の重複した配列が得られた。

得られた候補ペプチドを eGFP に融合した

タンパク質を大腸菌で大量発現し、His タグを利用して精製した。その後、SPR により親和性を評価したところ、新規の ecFcγRIIIa 結合ペプチドを同定することができた。また、その結合の解離定数は 3.9 μM であった。

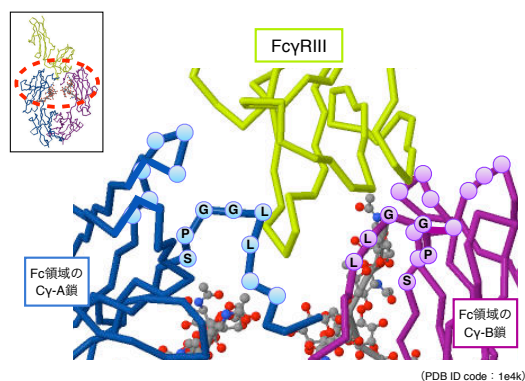


図4 IgG1-FcγRIII 複合体の立体構造

#### (2) 二重特異性抗体の試験管内進化

二重特異性抗体のフォーマット (図 1) としては、一本鎖のタンデム scFv や二本鎖の Diabody などが知られている。これらの効率的な試験管内選択に向けて、まず、mRNA ディスプレイ法および DNA ディスプレイ法の改良を行った。

これまで scFv の試験管内進化に利用されてきた mRNA ディスプレイ法 (*Nucleic Acids Res.* 34, e127, 2006) では小麦胚芽由来の無細胞翻訳系を利用していたが、より RNase が少なく、S-S 結合を含む抗体の合成に適した PURE システムを mRNA ディスプレイ法に適用した。これまで PURE システムは短いペプチドの mRNA ディスプレイには適用可能であったが、それよりも大きなタンパク質では、mRNA とタンパク質の連結効率が著しく低かった。そこで、PURE システムを用いた mRNA ディスプレイ法により、scFv のタンパク質・mRNA 連結分子形成効率が向上する配列の試験管内選択を 6 ラウンドおこなった結果、scFv の開始コドン周辺の変異により mRNA の 2 次構造が形成しにくくなることで翻訳量が向上し (図 5)、また、翻訳量に比例して連結分子形成効率も向上することを見出した (*J. Biochem.* 159, 519-526, 2016)。

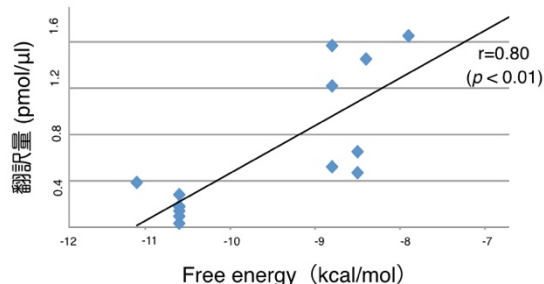


図5 scFv mRNA 2 次構造と翻訳量との相関

そこで、この PURE mRNA ディスプレイ



法の応用例として、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) に対する低分子抗体の試験管内選択をおこなった。まず、開始コドン周辺の mRNA を不安定化する変異を導入することで翻訳量および連結分子形成効率を向上させたヒト一本鎖抗体ライブラリーおよびヒトドメイン抗体ライブラリーを作製し、GPCR の細胞外ループのアゴニストが結合する部分のペプチドをベイトとして4ラウンドの試験管内選択をおこない、陽性クローン 4R\_17 を取得した。この scFv の解離定数は 10 nM 程度の値を示した。大腸菌で大量発現・精製した scFv 4R\_17 を用いた免疫染色により、4R\_17 が当該 GPCR 発現ヒト培養細胞に特異的に結合することを確認できた (図 6)。

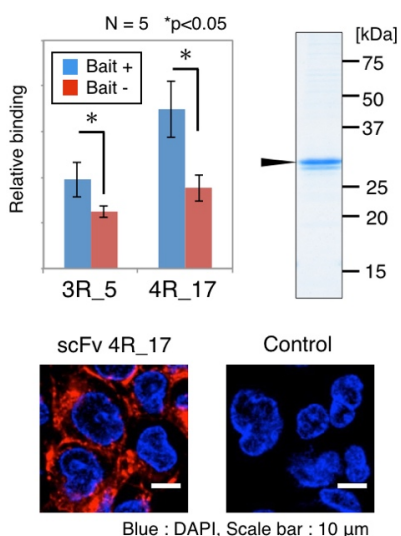


図 6 抗 GPCR scFv の結合活性

一方、従来の Fab などの二本鎖抗体の Bicistronic DNA ディスプレイ (*Nucleic Acids Res.* 37, e64, 2009) ではストレプトアビジンとビオチンとの非共有結合を介してタンパク質と DNA を連結していたため、親和性向上のための off-rate 選択に必要な長期間の洗浄や、安定性向上のための熱処理などを選択圧とすることが困難であるという制限があった。そこで本研究では、共有結合を利用して連結する方法について検討し、Diabody と同じ二量体である Fab 抗体の試験管内進化系を確立した。

実際に、共有結合型 Bicistronic DNA ディスプレイ法の応用例として、耐熱性 Fab 抗体の試験管内進化をおこなった。Fab を形成する 2 つの遺伝子をコードする DNA にランダム変異を導入したライブラリーから、68°C 10 分の熱処理を選択圧として 4 ラウンドの試験管内進化をおこない、70°C の熱処理後も抗原への結合活性を有する変異体 A48 を取得した。さらに、この変異体にランダム変異を導入し、77°C 10 分の熱処理を選択圧として 3 ラウンドの試験管内進化をおこない、80°C の熱処理後も抗原への結合活性を有する変異体 A56 を取得した (図 7)。

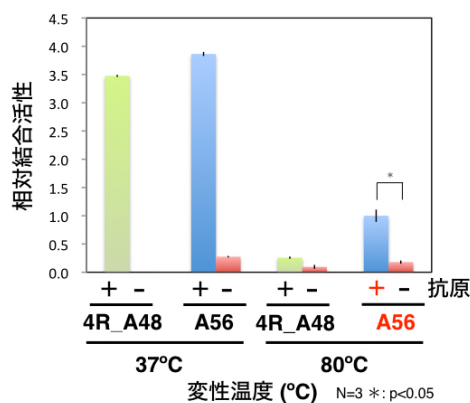


図 7 耐熱性変異抗体の結合活性

PURE mRNA ディスプレイ法および共有結合型 Bicistronic DNA ディスプレイ法を確立できたので、二重特異性抗体の試験管内進化に向けて、まず、モデルとなる 2 種類の抗原に対する抗体遺伝子を組み合わせさせた Diabody (Db) 型およびタンデム scFv (TaFv) 型のフォーマットの二重特異性抗体を作製し、それらの機能を確認したところ、Diabody 型では結合能が維持されていたが、タンデム scFv 型では結合が確認できなかった (図 8)。

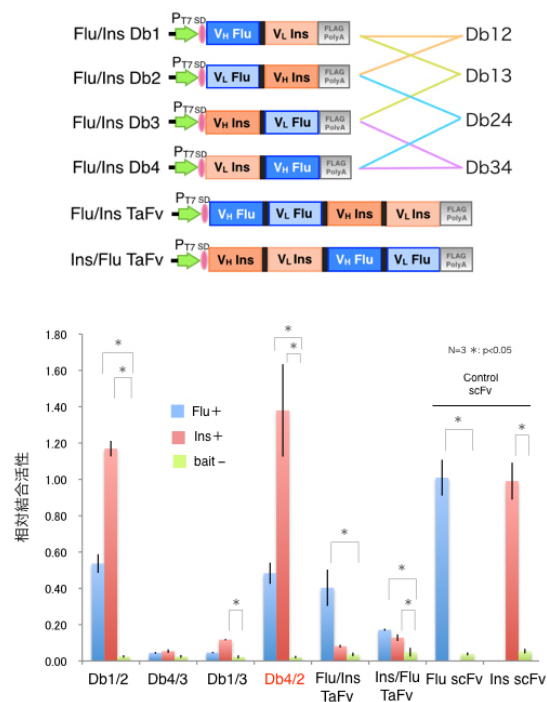


図 8 二重特異性抗体の結合活性

そこで、本研究で確立した共有結合型 Bicistronic DNA ディスプレイ法を用いて Diabody の試験管内選択を行うこととした。実際に、モデル抗原を用いた Diabody 遺伝子の試験管内選択の条件検討を行い、二量体を安定化させるために二量体間にジスルフィド結合を導入した S-S 型 Diabody を作製することで、目的遺伝子が濃縮される条件を決定することができた。

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 Nagumo, Y., Fujiwara, K., Horisawa, K., Yanagawa, H., Doi, N.: PURE mRNA display for *in vitro* selection of single-chain antibodies. *J. Biochem.* **159**, 519-526 (2016) 査読有
- ② Niikura, K., Horisawa, K., Doi, N.: Endosomal escape efficiency of fusogenic B18 and B55 peptides fused with anti-EGFR single chain Fv as estimated by nuclear translocation. *J. Biochem.* **159**, 123-132 (2016) 査読有
- ③ Niikura, K., Horisawa, K., Doi, N.: A fusogenic peptide from a sea urchin fertilization protein promotes intracellular delivery of biomacromolecules by facilitating endosomal escape. *J. Control. Release*, **212**, 85-93 (2015) 査読有
- ④ Nagata, T., Shirakawa, K., Kobayashi, N., Shiheido, H., Tabata, N., Sakuma-Yonemura, Y., Horisawa, K., Katahira, M., Doi, N., Yanagawa, H.: Structural basis for inhibition of the MDM2:p53 interaction by an optimized MDM2-binding peptide selected with mRNA display. *PLoS ONE*, **9**, e109163 (2014) 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① 中山真尚, 小宮尚子, 藤原慶, 堀澤健一, 土居信英: 共有結合型 DNA ディスプレイ法による二重特異性抗体の試験管内進化. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会. 2015 年 12 月 3 日. 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)
- ② 海野佑樹, 南雲優, 藤原慶, 堀澤健一, 柳川弘志, 角田慎一, 向洋平, 堤康央, 土居信英: PURE mRNA ディスプレイ法による低分子抗体の試験管内選択. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会. 2015 年 12 月 1 日. 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)
- ③ 須藤慧, 新倉啓介, 藤原慶, 土居信英: ヒト由来膜融合促進ペプチドによる生体高分子の細胞内送達. 第 31 回日本 DDS 学会学術集会. 2015 年 7 月 2 日. 京王プラザホテル (東京都・新宿区)

- ④ 南雲優, 水原真実子, 藤原慶, 堀澤健一, 柳川弘志, 土居信英: PURE mRNA ディスプレイ法を用いた翻訳停止ペプチド配列の試験管内選択. 第 37 回日本分子生物学会年会. 2014 年 11 月 27 日. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- ⑤ 新倉啓介, 藤原慶, 堀澤健一, 土居信英: 膜融合促進ペプチド B18 および B55 による生体高分子の細胞内送達. 第 37 回日本分子生物学会年会. 2014 年 11 月 26 日. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- ⑥ 小宮尚子, 住田壮, 藤原慶, 堀澤健一, 柳川弘志, 土居信英: 共有結合型バイシストロン性 DNA ディスプレイ法による抗体 Fab 断片の試験管内進化. 第 37 回日本分子生物学会年会. 2014 年 11 月 25 日. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- ⑦ 新倉啓介, 堀澤健一, 土居信英: Bindin 由来膜融合促進ペプチドを用いた膜透過抗体および膜透過促進抗体の構築. 第 30 回日本 DDS 学会学術集会. 2014 年 7 月 30 日. 慶應義塾大学薬学部 (東京都・港区)
- ⑧ 新倉啓介, 堀澤健一, 土居信英: 配偶子認識蛋白質 Bindin に存在する B18 ペプチドおよび Core ドメインは細胞膜の透過性を向上させる. 第 36 回日本分子生物学会年会. 2013 年 12 月 4 日. 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

- ⑨ Nagumo, Y., Mihara, M., Horisawa, K., Yanagawa, H., Doi, N.: PURE mRNA display for *in vitro* selection of scFv antibodies. 8th Asian Biophysics Association Symposium. 2013. 5. 28. Ramada plaza Jeju hotel (Jeju-do, Korea)

[図書] (計 1 件)

- ① 土居信英, 柳川弘志: 進化分子工学による新規タンパク質の創出とプロテオミクスへの応用。「進化分子工学 ~高速分子進化によるタンパク質・核酸の開発~」(伏見譲編) NTS 出版, pp. 275-286 (2013)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 融合タンパク質又は複合タンパク質, 細胞内送達用担体, 部分ペプチド, 細胞膜透過促進剤, DNA, 及びベクター  
発明者: 須藤慧, 新倉啓介, 土居信英  
権利者: 学校法人慶應義塾  
種類: 特許権  
番号: 2015-118432  
出願年月日: 2015 年 6 月 11 日  
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/biomoleng12/research/antibody>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

土居 信英 (DOI NOBUHIDE)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号：50327673

### (2) 研究分担者

柳川 弘志 (YANAGAWA HIROSHI)

慶應義塾大学・理工学部・訪問教授

研究者番号：40327672

### (3) 連携研究者

松島 綱治 (MATSUSHIMA KOJI)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50222427