

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 18 日現在

機関番号：25301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460657

研究課題名(和文)慢性炎症性疾患治療薬の開発を目指した抗ロイコトリエン単鎖抗体に関する基礎研究

研究課題名(英文) Study on anti-leukotriene single-chain antibody aiming to develop medicines for chronic inflammatory diseases

研究代表者

高橋 吉孝 (Takahashi, Yoshitaka)

岡山県立大学・保健福祉学部・教授

研究者番号：10236333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：慢性炎症に伴う組織の線維化において重要な役割を果たす脂質メディエーターであるロイコトリエンC4(LTC4)に対するモノクローナル抗体の一次構造に基づき、組換え体の自在な作成が可能な抗LTC4単鎖抗体の酵母での発現に成功した。本単鎖抗体は、大腸菌で発現したものと比較して発現量とLTへの親和性が大幅に上昇し、元のモノクローナル抗体とともに、マウス肺から調製した線維芽細胞をLTC4あるいはLTD4で刺激した際に起こるコラーゲン遺伝子COL1A1とCOL1A2の発現上昇を抑制した。さらに、X線結晶解析結果に基づいて本単鎖抗体の変異体を網羅的に作成し、LTの結合特異性に関わるアミノ酸の同定に成功した。

研究成果の概要(英文)：Based on the primary structure of heavy and light chains of monoclonal antibody against leukotriene C4, a key lipid mediator in chronic inflammation, we prepared a recombinant single-chain antibody comprising variable regions of these two chains and expressed it in *Pichia pastoris*. The affinity and recovery of the recombinant antibody was dramatically increased as compared with the antibody expressed in *E. coli*. The anti-LTC4 single-chain antibody as well as the original monoclonal antibody suppressed the increase in expression of mRNA for COL1A1 and COL1A2 that was induced by stimulation with LTC4 and LTD4 in fibroblasts prepared from the lung of mice. Furthermore, we exhaustively prepared mutants of the anti-LTC4 single-chain antibody based on the results of X-ray crystallography analysis of the Fab fragment of the original monoclonal antibody, and identified amino acids which determined the LT binding specificity.

研究分野：病態生化学

キーワード：ロイコトリエン 単鎖抗体

### 1. 研究開始当初の背景

ペプチドロイコトリエンは、アラキドン酸から作られる炎症性脂質メディエーターであり、分子内にトリペプチドであるグルタチオンを持つロイコトリエン C<sub>4</sub>、ならびにそこからグルタミン酸とグリシンが順次はずれてできるロイコトリエン D<sub>4</sub>および E<sub>4</sub> となる。これらは、リガンド結合特異性の異なる複数の受容体サブタイプ (CysLT1、CysLT2、CysLTE など) への結合を介して、気管支平滑筋の収縮や血管透過性亢進のような急性炎症だけでなく、慢性炎症に伴う組織の線維化にも関わることが、これまでの国内外の研究で明らかにされている。

申請者らは、ロイコトリエン C<sub>4</sub> の放射免疫測定のために樹立された抗ロイコトリエン C<sub>4</sub> モノクローナル抗体による、ロイコトリエンの特異的認識機構を明らかにすることを目的として、まず抗ロイコトリエン C<sub>4</sub> モノクローナル抗体の H 鎖と L 鎖それぞれの全長 cDNA クローニングを行った。さらに、H 鎖と L 鎖の可変領域 (V<sub>H</sub> と V<sub>L</sub>) を 15 個のアミノ酸からなるリンカーで連結し、定常領域をもたない抗ロイコトリエン C<sub>4</sub> 単鎖抗体として、COS-7 細胞で発現させた。この単鎖抗体は、元の抗ロイコトリエン C<sub>4</sub> モノクローナル抗体に匹敵する高いロイコトリエン C<sub>4</sub> への結合親和性と結合特異性を示し、ロイコトリエン D<sub>4</sub> と 48%、ロイコトリエン E<sub>4</sub> と 17% の交叉性を示した以外のアラキドン酸代謝物とは結合しなかった。

一方で申請者らは理化学研究所との共同研究で、抗ロイコトリエン C<sub>4</sub> モノクローナル抗体のアポ体ならびに各ロイコトリエンとの結合体について、2.2Å 以下の分解能で X 線結晶解析を行い、ロイコトリエン分子内のグルタチオンを構成するアミノ酸との水素結合に関わる抗体上のアミノ酸、ならびに脂肪酸骨格の入り込む抗体上の疎水性ポケットを構成するアミノ酸を特定した。

これらの研究成果から申請者は、組換え体の自在な作成が可能な抗ロイコトリエン C<sub>4</sub> 単鎖抗体を利用した、慢性炎症に伴う組織の線維化に対する抗体創薬を着想し、これまでに抗ロイコトリエン C<sub>4</sub> モノクローナル抗体がロイコトリエンの CysLT1 受容体への結合を阻害することを、*in vitro* ならびに *in vivo* 実験系で証明した。

これらの研究成果から申請者は、組換え体の自在な作成が可能な抗ロイコトリエン C<sub>4</sub> 単鎖抗体を利用した、慢性炎症に伴う組織の線維化に対する抗体創薬を着想し、これまでに抗ロイコトリエン C<sub>4</sub> モノクローナル抗体がロイコトリエンの CysLT1 受容体への結合を阻害することを、*in vitro* ならびに *in vivo* 実験系で証明した。またこの結果から、ロイコトリエン受容体と抗ロイコトリエン C<sub>4</sub> モノクローナル抗体との間で、リガンド認識部位の構造に類似性があるのではないかと考え、実際にロイコトリエン受容体に対する拮

抗薬の中に、抗ロイコトリエン C<sub>4</sub> モノクローナル抗体と結合するものを見出した。

### 2. 研究の目的

抗ロイコトリエン C<sub>4</sub> モノクローナル抗体によるロイコトリエンの特異的認識機構を明らかにし、ロイコトリエンが関わる肺線維症をはじめとする慢性炎症性疾患に対する抗体治療薬開発へ展開するための基盤を提供するとともに、ロイコトリエン受容体によるリガンド認識機構の解明につなげることを目的とした。具体的には、X 線結晶解析による構造情報に基づいて網羅的に作成した、単鎖抗体変異体の解析により、ロイコトリエンの特異的認識に関わる抗体上のアミノ酸を解明するとともに、ロイコトリエン受容体へのロイコトリエンの結合を効率的に阻害する単鎖抗体変異体を作成し、肺線維症への有効性を証明することを目的として実施した。

### 3. 研究の方法

(1) 抗ロイコトリエン抗体のメタノール活性化酵母 *Pichia pastoris* による発現

抗ロイコトリエン C<sub>4</sub> モノクローナル抗体の H 鎖と L 鎖の可変領域 (V<sub>H</sub> と V<sub>L</sub>) を 15 個のアミノ酸からなるリンカーで連結し、一本鎖とした抗ロイコトリエン C<sub>4</sub> 単鎖抗体の cDNA の 5' 側に分泌タグをつけ、3' 側に抗体で特異的に標識できるよう 8 つのアミノ酸からなる FLAG タグと、Ni-NTA カラムでの精製を可能にするための 6×His の cDNA をそれぞれ付加した。これを *Pichia* の発現ベクターである pPIC9K に組み込み、*Pichia* に導入してメタノール存在下で、酵母菌を 20 度 120 時間振とう培養した。培養液中に分泌された単鎖抗体は Ni-NTA アガロースを用いて精製した。

(2) 単鎖抗体変異体の作成

変異導入単鎖抗体の発現プラスミドは PCR を利用した Higuchi らの方法により作製し、DNA シーケンシングにより配列を確認した。

(3) 抗体の抗原結合親和性と特異性の酵素免疫測定法

LTC<sub>4</sub> への結合親和性は、抗 LTC<sub>4</sub> モノクローナル抗体を 96-ウェルプレートにコーティングし、そこに精製した野生型単鎖抗体あるいは変異導入単鎖抗体とアセチルコリンエステラーゼ標識 LTC<sub>4</sub> 抗原 (Tracer) を加えて、コーティングされている抗体と競合させた。アセチルコリンエステラーゼの基質である Ellman 's reagent を加え、415 nm の吸光度 (B) を測定した。抗 LTC<sub>4</sub> モノクローナル抗体をコーティングしたプレートに Tracer のみを加えて反応させたときの 415 nm の吸光度 (B<sub>0</sub>) を測定して B/B<sub>0</sub> を求めることにより、各種単鎖抗体の LTC<sub>4</sub> 抗原に対する結合親和性を調べた。また、LT 結合特異性については、抗 LTC<sub>4</sub> 単鎖抗体を、抗 FLAG 抗体でコーティ

ングした 96-ウェルプレートに結合させ、Tracer と標準抗原 (LTB<sub>4</sub>、LTC<sub>4</sub>、LTD<sub>4</sub>、LTE<sub>4</sub>) を加えて競合させた。Ellman's reagent を加えて、415 nm の吸光度 (B) を測定した。抗 LTC<sub>4</sub> 単鎖抗体を結合させたプレートに Tracer のみを加えて反応させたときの 415 nm の吸光度 (B<sub>0</sub>) を測定して B/B<sub>0</sub> を求めることにより、各種単鎖抗体の各種標準抗原に対する結合特異性を調べた。

#### (4) 抗体によるコラーゲン産生の抑制

マウス肺から調製した線維芽細胞を各濃度の抗体存在下で LTC<sub>4</sub> あるいは LTD<sub>4</sub> で刺激し、30 分後に total RNA を回収し、Type コラーゲンの遺伝子である COL1A1 および COL1A2 の mRNA 量を、real time PCR で測定した。

#### 4. 研究成果

単鎖抗体発現系として大腸菌を用いた場合は、短時間で変異体の作製から発現までを行うことができるため、変異体の網羅的な検討には適していたが、発現量が少ないこと、また元のモノクローナル抗体と比較して LTC<sub>4</sub> との結合親和性が大きく低下することが問題であった。そこで、メタノール資化酵母である *Pichia pastoris* を用いた発現系を構築した結果、培養上清 1 L あたり約 3.1 mg の精製抗 LTC<sub>4</sub> 単鎖抗体が得ることができ、発現量の上昇を図ることができた。また、この抗 LTC<sub>4</sub> 単鎖抗体は、抗 LTC<sub>4</sub> モノクローナル抗体と比較してタンパク重量当たりほぼ同じ結合活性を示し、抗原結合親和性の上昇も図ることができた。結合親和性の上昇の理由として、翻訳後の修飾が考えられたが、単鎖抗体は PAS 染色で染色されず、糖鎖修飾の可能性は否定された。このことから、大腸菌の発現系では糖鎖修飾が行われない以外の何らかの理由で正しい立体構造が構築されていないと考えられた。さらに、単鎖抗体において、LTC<sub>4</sub> に最も高い親和性で結合し、LTD<sub>4</sub> と LTE<sub>4</sub> にも部分的に結合したが、LTB<sub>4</sub> にはほとんど結合しないという、抗 LTC<sub>4</sub> モノクローナル抗体と同様の LT への結合特異性が確認された。

次に、マウス肺線維芽細胞を LTC<sub>4</sub> あるいは LTD<sub>4</sub> で刺激したときに起こるコラーゲン産生の上昇が、抗 LTC<sub>4</sub> モノクローナル抗体あるいは抗 LTC<sub>4</sub> 単鎖抗体によって抑制されるかどうかについて検討した。1 nM の LTC<sub>4</sub> による mRNA レベルの上昇は、COL1A1 は 1 nM 以上、COL1A2 は 0.1 nM 以上の抗 LTC<sub>4</sub> モノクローナル抗体で有意に抑制された。一方 1 nM の LTD<sub>4</sub> による COL1A1、COL1A2 の上昇は、いずれも 10 nM 以上の抗 LTC<sub>4</sub> モノクローナル抗体で有意に抑制された (p<0.05)。また、1 nM の LTC<sub>4</sub> による COL1A1、COL1A2 の mRNA レベルの上昇は、いずれも 1 nM 以上の抗 LTC<sub>4</sub> 単鎖抗体により有意に抑制され、1 nM の LTD<sub>4</sub> によるこれらの遺伝子の発現は、いずれも 100 nM の抗 LTC<sub>4</sub> 単鎖抗体により有意に抑制された (図 1、図 2)。

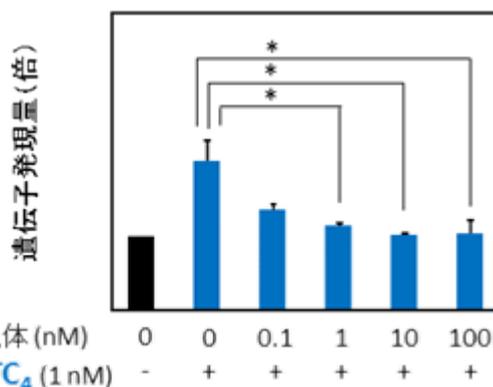


図 1 マウス肺線維芽細胞における LTC<sub>4</sub> による COL1A1 遺伝子発現上昇の抗 LTC<sub>4</sub> 単鎖抗体による抑制 (\*p<0.05)

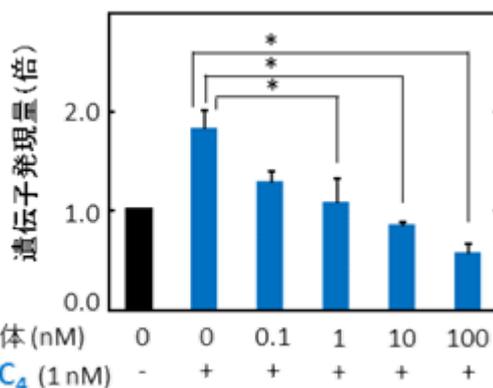


図 2 マウス肺線維芽細胞における LTC<sub>4</sub> による COL1A2 遺伝子発現上昇の抗 LTC<sub>4</sub> 単鎖抗体による抑制 (\*p<0.05)

次に、抗 LTC<sub>4</sub> モノクローナル抗体の抗原との結合に關与するアミノ酸を同定するため、X 線結晶構造解析の結果に基づき、抗体の L 鎖の可変領域 (V<sub>L</sub>) 上のアミノ酸を変異させた変異体を網羅的に作成した。変異型単鎖抗体の LTC<sub>4</sub> に対する結合親和性を酵素免疫測定法により確認したところ、V<sub>L</sub> 上の 54 番目のチロシン (Y) をトリプトファン (W) に変異させた変異体 Y54 (L) W において、LTE<sub>4</sub> への親和性が上昇することを見出した。構造モデルを用いた解析により、トリプトファン (W) と LTE<sub>4</sub> との間に、新たな水素結合が形成された可能性が示唆された。さらに、V<sub>L</sub> 上の 35 番目のアスパラギン (N) をグルタミン (Q) あるいはチロシン (Y) に置換した変異体 N35 (L) Q、N35 (L) Y においても、LTE<sub>4</sub> への結合親和性が上昇していることが明らかになった。そこで、Y54 (L) W に、先に作成した 2 つの 35 番目のアスパラギン変異体のうちの一つを加えたダブルミュータント N35 (L) Q/Y54 (L) W の LT への親和性と結合特異性を EIA を用いて検討した。このダブルミュータント N35 (L) Q/Y54 (L) W は LTC<sub>4</sub> との親和性はあまり変化していなかったが、LTE<sub>4</sub> への親和性は、LTD<sub>4</sub> への親和性を大きく上回った。このことから、LTE<sub>4</sub> の分子内で 35 番目のアスパラギン (N) が置き換えられた

グルタミン (Q) が新たに形成する水素結合は、Y54 (L) W において新たに形成された水素結合とは LTE<sub>4</sub> 上の異なる原子との間で形成されていることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Aoyama-Sasabe S, Fukushima M, Xin X, Taniguchi A, Nakai Y, Mitsui R, Takahashi Y, Tsuji H, Yabe D, Yasuda K, Kurose T, Inagaki N, Seino Y, Insulin secretory defect and insulin resistance in isolated impaired fasting glucose and isolated impaired glucose tolerance. *J Diabetes Res.* in press (2016)

Takahashi Y, Otsuki A, Mori Y, Kawakami Y, Ito H., Inhibition of leukocyte-type 12-lipoxygenase by guava tea leaves prevents development of atherosclerosis. *Food Chem.* 186:2-5 (2015)

Suzuki-Yamamoto T, Tanaka S, Tsukayama I, Takafuji M, Hanada T, Arakawa T, Kawakami Y, Kimoto M, Takahashi Y, *Dioscorea japonica* extract down-regulates prostaglandin E2 synthetic pathway and induces apoptosis in lung cancer cells. *J Clin Biochem Nutr.* 55(3):162-167 (2014)

Kawakami Y, Hirano S, Kinoshita M, Otsuki A, Suzuki-Yamamoto T; Suzuki M, Kimoto M, Sasabe S, Fukushima M, Kishimoto K, Izumi T, Oga T, Narumiya S, Sugahara M, Miyano M, Yamamoto S, Takahashi Y, Neutralization of leukotriene C4 and D4 activity by monoclonal and single-chain antibodies. *Biochim Biophys Acta.* 1840(6): 1625-1633 (2014)

Ito H, Otsuki A, Mori H, Li P, Kinoshita M, Kawakami Y, Tsuji H, Fang DZ, Takahashi Y, Two new monoterpene glycosides from qing shan lu shui tea with inhibitory effects on leukocyte-type 12-lipoxygenase activity. *Molecules.* 18(4): 4257-4266 (2013)

Okamura H, Fujiwara H, Umehara S, Okamura S, Todo M, Furutani A, Yoneda M, Shiozaki A, Komatsu S, Kubota T, Ichikawa D, Okamoto K, Ochiai T, Sakakura C, Takahashi Y, Yoshimoto T, Otsuji E, COX-2 overexpression Induced by gene transfer reduces sensitivity of TE13 esophageal carcinoma cells to 5-fluorouracil and cisplatin. *Anticancer Res.* 33(2): 537-542 (2013)

〔学会発表〕(計43件)

川上祐生, 森香子, 岡本憲典, 大河内脩史, 金山友紀, 金子由季, 神崎圭太, 山本登志子, 木本眞順美, 山下広美, 伊東秀之, 高橋吉孝, ナツメグに含まれる 5-リポキシゲナーゼ阻害成分の探索, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016.3, 札幌

川上祐生, 森香子, 岡本憲典, 大河内脩史, 金山友紀, 金子由季, 神崎圭太, 山本登志子, 木本眞順美, 山下広美, 伊東秀之, 高橋吉孝, *Myristica fragrans* 成分による 5-リポキシゲナーゼ阻害効果, 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, 2015.12, 神戸

高橋吉孝, 抗ロイコトリエン抗体の肺線維症治療薬としての応用を目指した研究, 川崎医科大学学術集会, 2015.8, 岡山

Yoshitaka Takahashi, Akemi Otsuki, Yoshiko Mori, Shuji Okochi, Yuki Kawakami, Ding Zhi Fang, and Hideyuki Ito, Leukocyte-type 12-lipoxygenase, a target for prevention of atherosclerosis, ISPMF 2015, 2015.6, Shanghai

高橋吉孝, 川上祐生, 山本登志子, 大河内脩二, 肺線維症に対する抗体治療薬の開発を目指した基礎研究, OPU フォーラム 2015, 岡山

Yuki Kawakami, Yoshiko Mori, Kensuke Okamoto, Shuji Okochi, Toshiko Suzuki-Yamamoto, Masumi Kimoto, Hiromi Yamashita, Hideyuki Ito, Yoshitaka Takahashi, Inhibitory effect of nutmeg extract on 5-lipoxygenase activity, ACN2015, 2015.5, Yokohama

川上祐生, 大槻朱美, 木下麻衣, 森香子, 山本登志子, 辻英明, 伊東秀之, FANG Ding Zhi, 高橋吉孝, ヒドロペルオキシ基を持つ新規モノテルペン配糖体による白血球型 12-リポキシゲナーゼの阻害, 日本過酸化脂質・抗酸化物質学会 第 22 回年会, 2014.8, 仙台

高橋吉孝, 炎症性疾患に対する抗体治療薬開発を目指した基礎研究, OPU フォーラム 2014, 2014.5, 岡山

Yoshitaka Takahashi, Single-chain antibody that neutralizes effects of cysteinyl leukotrienes, The First International Workshop of Okayama Prefectural University with Nanchang University, 2014.3, Okayama

Yoshitaka Takahashi, Single-chain

Antibody That Neutralizes Effects of Cysteinyl Leukotrienes, Symposium on Advances of Biomaterials and Regenerative Medicine, 2013.11, Taipei

Yuki Kawakami, Akemi Otsuki, Yoshiko Mori, Hideyuki Ito, Toshiko Suzuki-Yamamoto, Hideaki Tsuji, Ding Zhi Fang, Yoshitaka Takahashi, Inhibitory effect of Qing Shan Lu Shui Tea on leukocyte-type 12-lipoxygenase activity, ISNFF 2013, 2013.11, Taipei

木下麻衣, 勝原加奈子, 川上祐生, 菅原光明, 堀哲哉, 齊野廣道, 宮野雅司, 山本尚三, 高橋吉孝, 部位特異的変異体を用いた抗ロイコトリエン C4 単鎖抗体の抗原結合に關与するアミノ酸の同定, 第 86 回日本生化学会, 2013.9, 横浜

川上祐生, 大槻朱美, 森香子, 伊東秀之, 山本登志子, 辻英明, Fang Ding Zhi, 高橋吉孝, 新規モノテルペン配糖体による白血球型 12-リポキシゲナーゼ阻害, 日本油化学会第 52 回年会, 2013.9, 仙台

木下麻衣, 大槻朱美, 森香子, 勝原加奈子, 川上祐生, 山本登志子, 高橋吉孝, ロイコトリエン単鎖抗体を利用した炎症性疾患治療薬の開発を目指した研究, おかやまバイオアクティブ研究会第 42 回シンポジウム, 2013.6, 岡山

高橋吉孝, 川上祐生, 山本登志子, 福島光夫, 抗ロイコトリエン単鎖抗体を利用した抗体創薬に向けての基礎研究, 岡山県立大学 OPU フォーラム 2013, 2013.5, 岡山

ほか 28 件

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋吉孝 (TAKAHASHI, Yoshitaka)

岡山県立大学・保健福祉学部・教授

研究者番号: 10236333

### (2) 研究分担者

川上祐生 (KAWAKAMI, Yuki)

岡山県立大学・保健福祉学部・助教

研究者番号: 30453202

### (3) 連携研究者

宮野 雅司 (MIYANO, Masashi)

青山学院大学・理工学部・教授

研究者番号: 80332287

藤 博幸 (TOH, Hiroyuki)

独立行政法人産業技術総合研究所・生命情報工学センター・副研究センター長

研究者番号: 70192656