

Title	抗体医薬の最適化のための無細胞ディスプレイ技術の応用
Sub Title	Cell-free display technology for optimization of antibody drugs
Author	土居, 信英(Doi, Nobuhide) 柳川, 弘志(Yanagawa, Hiroshi) 松島, 綱治(Matsushima, Koji) 三隅, 将吾(Misumi, Shogo)
Publisher	
Publication year	2013
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2012.)
Abstract	本研究では、当研究室で開発されたmRNAディスプレイ法を用いて、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)侵入阻害剤の重要な標的となっているCCR5の第2細胞外ループを模倣した環状ペプチドに対して高い親和性を有するヒト化一本鎖抗体の試験管内進化をおこなった。その結果、VL鎖のCDR1に重複した変異をもつ、高親和性変異体が得られた。
Notes	研究種目：基盤研究(B) 研究期間：2010～2012 課題番号：22360351 研究分野：工学 科研費の分科・細目：プロセス工学；生物機能・バイオプロセス
Genre	Research Paper
URL	http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_22360351seika

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：32612
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22360351
 研究課題名（和文） 抗体医薬の最適化のための無細胞ディスプレイ技術の応用
 研究課題名（英文） Cell-free display technology for optimization of antibody drugs

 研究代表者
 土居 信英 (NOBUHIDE DOI)
 慶應義塾大学・理工学部・准教授
 研究者番号：50327673

研究成果の概要（和文）：本研究では、当研究室で開発された mRNA ディスプレイ法を用いて、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）侵入阻害剤の重要な標的となっている CCR5 の第 2 細胞外ループを模倣した環状ペプチドに対して高い親和性を有するヒト化一本鎖抗体の試験管内進化をおこなった。その結果、VL 鎖の CDR1 に重複した変異をもつ、高親和性変異体が得られた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed *in vitro* evolution of a humanized single-chain antibody against a cyclic peptide that mimics the extracellular loop-2 of CCR5, which is a key target of inhibitory drugs for the entry of HIV (Human Immunodeficiency Virus), by using mRNA display developed in our laboratory. Consequently, we obtained higher-affinity mutants with consensus mutations in CDR1 of VL domain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2011年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2012年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学；生物機能・バイオプロセス

キーワード：ウイルス バイオテクノロジー 免疫学 蛋白質 進化

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、従来の低分子医薬と比べて副作用の恐れが少なく、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。しかし、投与量が多く生産コストも高いという問題点があるため、抗体の大量生産技術の改良に加えて、Fab や scFv（一本鎖抗体）などの組み換え抗体への小型化によって生産量を増やしたり、抗体の親和性・安定性の向上により薬効を高めて投薬量を減らすための新しい技術が求められている。

2. 研究の目的

申請者らが独自に開発した試験管内タンパク質進化技術である DNA ディスプレイ法および mRNA ディスプレイ法を応用・発展させることにより、抗体医薬のアミノ酸配列を最適化し、高い親和性・特異性・安定性をもつヒト化抗体を簡便かつ迅速に取得できるシステムを確立することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究で行う抗体医薬の最適化の方法は、以下の①～③のプロセスからなる。

①抗体医薬候補遺伝子の取得および変異抗体ライブラリーの構築

抗体医薬候補遺伝子の配列を元にヒト化抗体に変換した scFv および Fab 抗体遺伝子(図 1) を構築した。この抗体遺伝子に対して、エラー・プローン PCR によりランダム変異を導入し、DNA シャプリングにより変異を組み合わせた多様な変異抗体ライブラリーを作製した。

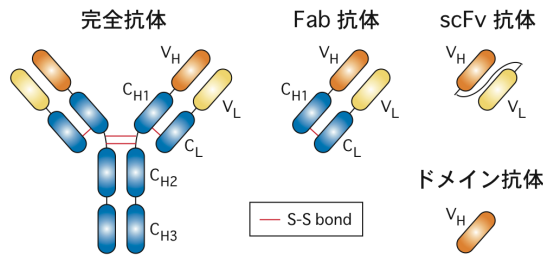


図 1 抗体および組み換え抗体の構造

②無細胞ディスプレイ技術を用いた抗体の試験管内進化による親和性の向上

下記の 2 つのディスプレイ技術を用いて、①で作製した変異抗体ライブラリーの中から、目的の抗原に特異的に結合する組み換え抗体の試験管内進化を行なった。

図 2 に示すように、mRNA ディスプレイ法 (*Nucleic Acids Res.* **34**, e127, 2006) では、mRNA の 3'末端に PEG スペーサーを介してピュロマイシンを連結し、それを鋳型として無細胞翻訳反応を行うことにより、scFv 抗体 (表現型) と mRNA (遺伝子型) をリボソーム上で対応づける。この対応づけ分子ライブラリーをビーズに固定した抗原と結合させ洗浄後、ビーズに残った抗体の遺伝子 mRNA を逆転写 PCR により増幅し、この進化サイクルを繰り返す。最終的に最適化された抗体遺伝子の塩基配列を解読し、機能向上に寄与した変異を同定することができる。

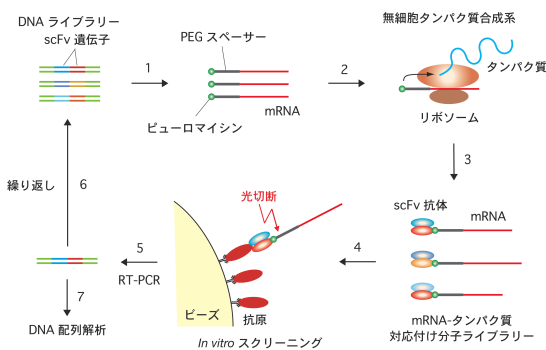


図 2 mRNA ディスプレイ法による scFv 抗体の試験管内進化の原理

また、図 3 に示すように、DNA ディスプレイ法 (*Nucleic Acids Res.* **37**, e147, 2009) では、無細胞転写翻訳系を含むエマルジョン中のマイクロカプセル (逆相ミセル) の中で、Fab 抗体 (表現型) をアビジンとの融合タンパク質として合成させ、それをコードする予めビオチン化した DNA (遺伝子型) と連結させる。この対応づけ分子ライブラリーを抗原と結合させ洗浄後、結合したままの抗体の遺伝子 DNA を PCR により増幅し、この進化サイクルを繰り返す。最終的に最適化された抗体遺伝子の塩基配列を解読し、機能向上に寄与した変異を同定することができる。

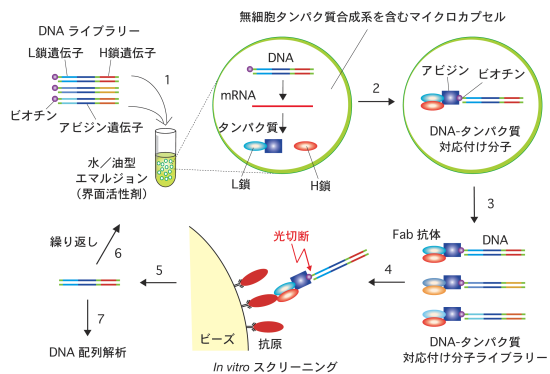


図 3 DNA ディスプレイ法による Fab 抗体の試験管内進化の原理

ここでは、ビオチン化抗原をアビジンビーズに固定し、遊離抗原の存在下で長時間洗浄することで、抗原から解離しにくい scFv を選択する『Off-rate 選択』(*Nucleic Acids Res.* **34**, e127, 2006) を行なった。

③得られた変異抗体の大量調製および特性評価

上記スクリーニングにより得られた組み換え抗体について、CHO 細胞などの培養細胞または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、ウェスタンブロットティング、表面プラズモン共鳴法などの手法を用いて、抗体の親和性などの特性評価を行なった。

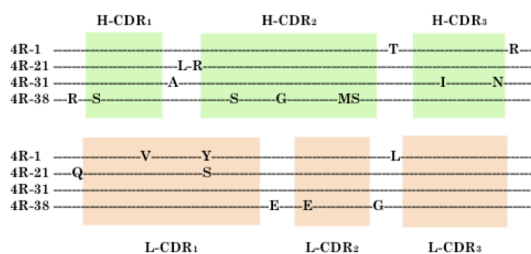
4. 研究成果

まず、mRNA ディスプレイ法を用いて、HIV の侵入を阻害する抗 CCR5 一本鎖抗体の試験管内進化を行なった。HIV は粒子表面の糖タンパク質 gp120 が宿主細胞の受容体 CD4 および補受容体 CCR5 および CXCR4 に結合することで感染することから CCR5 および CXCR4 は HIV 侵入阻害剤の重要な標的となっている。これまでに連携研究者である熊本大の三隅らは、CCR5 の第 2 細胞外ループを模倣したペプチドに対するマウス抗体を作

製し、HIV 感染阻害活性を持つことを示したが、本研究では、このマウス抗体遺伝子を元に、高い特異性と親和性を有するヒト一本鎖抗体への試験管内進化実験を行った。

まず、抗 CCR5 マウス抗体遺伝子の CDR を除く領域をヒト型に置換したヒト化一本鎖抗体を作製し、CCR5 の第 2 細胞外ループを模倣したペプチドに対する結合活性を維持していることを ELISA 法により確認した。そこで、ランダム変異を導入した変異ライブラリーの mRNA ディスプレイ法による試験管内選択を 4 ラウンド行った後、配列解析を行ったところ、抗原結合部位である CDR に変異がある変異体が 4 つ得られた。4 つの変異体 (4R-1, 4R-21, 4R-31 および 4R-38) が、CCR5 模倣ペプチドに対して特異的に結合するかどうかを ELISA 法により確認した結果、4R-31 が野生型よりも高い結合活性を有することが示唆された (図 4)。

(A)



(B)

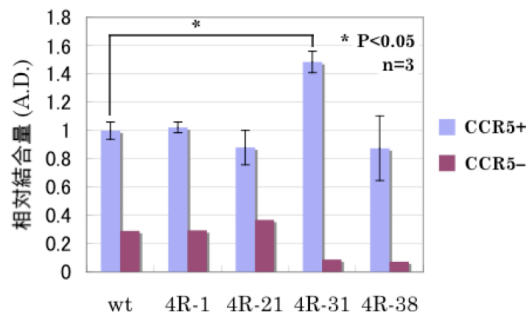


図 4 抗 CCR5 一本鎖抗体の試験管内進化(1)

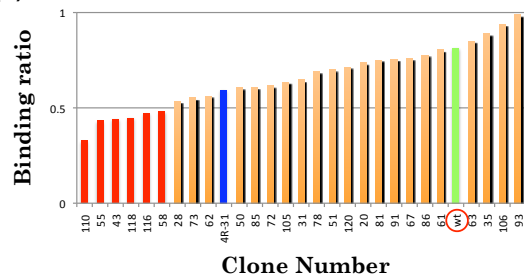
しかし、上記の実験では、高親和性変異体の候補が 1 つしか得られなかった。親和性と HIV 感染阻害活性に高い相関があるかどうか分からないので、できるだけ多くの高親和性抗体を取得して HIV 感染阻害活性を評価したい。そこで、高活性の変異体をより多く含むことが期待できる「中立的浮動ライブラリー」を作成し、新たに mRNA ディスプレイ法による試験管内進化を行なった。

まず、野生型のヒト化抗 CCR5 模倣ペプチド一本鎖抗体の遺伝子を元にして 1 遺伝子あたり約 2~3 アミノ酸のランダム変異を導入した変異体ライブラリーを構築し、mRNA ディスプレイ法を用いてマイルドな条件で

CCR5 模倣ペプチドに対する結合セレクションを行い、結合能を失わせる不利な変異を除去するというプロセスを 4 ラウンド繰り返し、1 遺伝子あたり約 10 アミノ酸の中立変異を蓄積させた「中立的浮動ライブラリー」を作成した。

この中立的浮動ライブラリーを用いて mRNA ディスプレイ法による 4 ラウンドの Off-rate セレクションを行った後、競合阻害 ELISA によって野生型よりも解離しにくいクローンをスクリーニングしたところ 23 クローンが得られた (図 5A)。その中でも結合力が特に強かった 6 クローンの配列を比較すると、L 鎖の CDR1 に多く変異がみられ、2 つの重複した変異がみられた (図 5B; 赤字)。そこで、この重複した変異のみをもつ scFv を作成し、競合阻害 ELISA を行ったところ、同程度の結合活性の向上がみられたことから、これらの変異が結合活性の向上に寄与していることが示された。

(A)



(B)

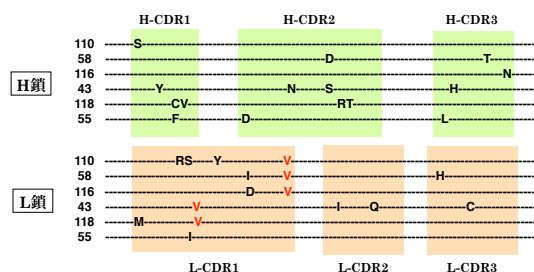


図 5 抗 CCR5 一本鎖抗体の試験管内進化(2)

得られた scFv の複数のクローンを CHO 細胞や大腸菌で大量発現させたところ、発現しないクローンが多くみられたことから、二本鎖の Fab 断片に組み換えて発現させる系を構築した。その結果、培地中に 20 mg/L 程度の Fab を分泌させることができた。

進化実験と大量発現の際の抗体のフォーマットが異なると、親和性をせっかく向上させても最終的に反映されない恐れがある。そこで、エマルジョン PCR と mRNA ディスプレイ法を組み合わせた Fab の新しい試験管内選択手法を開発し、実際に Fab の試験管内進化を行い、親和性の向上した Fab を選択することができた。

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 6 件)

①Sumida, T., Yanagawa, H., Doi, N.: *In vitro* selection of Fab fragments by mRNA display and gene-linking emulsion PCR. *J. Nucleic Acids*, **2012**, 371379 (2012) 査読有

②Doi, N., Yamakawa, N., Matsumoto, H., Yamamoto, Y., Nagano, T., Matsumura, N., Horisawa, K., Yanagawa, H.: DNA display selection of peptide ligands for a full-length human G protein-coupled receptor on CHO-K1 cells. *PLoS ONE*, **7**, e30084 (2012) 査読有

③Shiheido, H., Takashima, H., Doi, N., Yanagawa, H.: mRNA display selection of an optimized MDM2-binding peptide that potently inhibits MDM2-p53 interaction. *PLoS ONE*, **6**, e17898 (2011) 査読有

④ Tanaka, J., Yanagawa, H., Doi, N.: Comparison of the frequency of functional SH3 domains with different limited sets of amino acids using mRNA display. *PLoS ONE*, **6**, e18034 (2011) 査読有

⑤ Tanaka, J., Doi, N., Takashima, H., Yanagawa, H.: Comparative characterization of random-sequence proteins consisting of 5, 12 and 20 kinds of amino acids. *Protein Sci.*, **19**, 786-795 (2010) 査読有

⑥Matsumura, N., Tsuji, T., Sumida, T., Kokubo, M., Onimaru, M., Doi, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Yanagawa, H.: mRNA display selection of a high-affinity, Bel-XL-specific binding peptide. *FASEB J.*, **24**, 2201-2210 (2010) 査読有

[学会発表] (計 6 件)

①田島典子, 佐久間裕子, 清水孝恒, 佐谷秀行, 土居信英, 柳川弘志: *In vitro* virus (IVV) 法を用いた人工癌幹細胞の接着を阻害する一本鎖抗体の選択. 第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡, 2012. 12)

②佐藤亮太, 土居信英, 三隅将吾, 庄司省三, 松島綱治, 横地祥司, 柳川弘志: 高親和性抗 CCR5 一本鎖抗体の中立的浮動による試験管

内進化. 第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜, 2011. 12)

③梅澤洋貴, 田島典子, 佐久間裕子, 竹中悠馬, 松本佳宣, 土居信英, 永野修, 佐谷秀行, 柳川弘志: CD44 と xCT の相互作用を阻害する抗 CD44v 一本鎖抗体の試験管内選択. 第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜, 2011. 12)

④Sumida, T., Yanagawa, H., Doi, N.: *In vitro* display methods for heterodimeric proteins using *in vitro* compartmentalization. Pacificchem 2010 (Honolulu, 2010. 12)

⑤Tanaka, J., Yanagawa, H., Doi, N.: *In vitro* selection of functional SH3 domains with reduced amino-acid alphabets. Pacificchem 2010 (Honolulu, 2010. 12)

⑥佐藤亮太, 土居信英, 三隅将吾, 松島綱治, 横地祥司, 柳川弘志: HIV の侵入を阻害する抗 CCR5 一本鎖抗体の試験管内進化. 第 33 回日本分子生物学会年会 (神戸, 2010. 12)

[図書] (計 2 件)

①土居信英: 「次世代医薬開発に向けた抗体工学の最前線」シーエムシー出版, pp.66-73 (2012)

②柳川弘志, 土居信英: 「現代生物科学入門 9: 合成生物学」岩波書店, pp.1-34 (2010)

[その他]

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/biomoleng12/home>

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

三隅 将吾 (MISUMI SHOGO)
熊本大学・医学薬学研究部・准教授
研究者番号: 40264311