

Title	次世代シーケンサとファージディスプレイ法を組み合わせた高感度抗体スクリーニング手法
Sub Title	A highly sensitive screening method for antibodies via combining next-generation sequencing and phage display method
Author	小川, 隆(Ogawa, Ryu) 宮崎, 誠生(Miyazaki, Nobuo) 清瀬, 紀彦(Kiyose, Norihiko) 赤澤, 陽子(Akazawa, Yoko) 高島, 瑞紀(Takashima, Mizuki) 萩原, 義久(Hagihara, Yoshihisa) 井上, 直和(Inoue, Naokazu) 松田, 知成(Matsuda, Tomonari) 伊東, 祐二(Ito, Yuji) 富田, 勝(Tomita, Masaru)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2015
Jtitle	Keio SFC journal Vol.15, No.1 (2015.) ,p.364- 380
JaLC DOI	10.14991/003.00150001-0364
Abstract	抗体は免疫システムにおいて重要なタンパク質であり, 医薬品分子として期待されている。我々はファージディスプレイライブラリ法のスクリーニング工程に次世代シーケンサを応用し, 検出感度の高い新規抗体探索手法を開発した。結果, 従来手法で得られたクラスターに加え, 新たに二つの抗体クラスターを発見した。従来手法で得られた抗体のパニング後のライブラリ内含有率は9.0%であり, 新たに得られた抗体についてはそれぞれ, 0.2%, 1.1%であった。以上より, 本手法は, 従来手法より高い感度で抗体を検出可能であるといえる。
Notes	特集 世界を救え: SFCバイオの挑戦#研究論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=0402-1501-0364

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese

Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

[研究論文]

次世代シーケンサとファージディスプレイ法 を組み合わせた高感度抗体スクリーニング 手法

A Highly Sensitive Screening Method for Antibodies via Combining Next-generation Sequencing and Phage Display Method

小川 隆

慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科後期博士課程

Ryu Ogawa

Doctoral Program, Graduate School of Media and Governance, Keio University

宮崎 誠生

株式会社アーク・リソース事業推進室室長

Nobuo Miyazaki

General Manager, ARK Resource Co., Ltd.

清瀬 紀彦

鹿児島大学理工学研究科生命科学専攻前期博士課程

Norihiko Kiyose

Master Student, Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University

赤澤 陽子

独立行政法人産業技術総合研究所健康工学研究部門ストレスシグナル研究グループ研究員

Yoko Akazawa

Researcher, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

高島 瑞紀

独立行政法人産業技術総合研究所健康工学研究部門ストレスシグナル研究グループ研究員

Mizuki Takashima

Researcher, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

萩原 義久

独立行政法人産業技術総合研究所健康工学研究部門ストレスシグナル研究グループ
研究グループ長

Yoshihisa Hagihara

Research Group Leader, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

井上 直和

福島県立医科大学大学生情報伝達研究所細胞科学研究部門准教授

Naokazu Inoue

Associate Professor, Department of Cell Science, Institutes for Biomedical Sciences, School of Medicine, Fukushima Medical University

松田 知成

京都大学流域圏総合環境質研究センター准教授

Tomonari Matsuda

Associate Professor, Research Center for Environmental Quality Management, Kyoto University

伊東 祐二

鹿児島大学大学院理工学研究科生命化学専攻教授

Yuji Ito

Professor, Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University

富田 勝

慶應義塾大学環境情報学部教授

Masaru Tomita

Professor, Faculty of Environment and Information Studies, Keio University

Abstract: 抗体は免疫システムにおいて重要なタンパク質であり、医薬品分子として期待されている。我々はファージディスプレイライブラリ法のスクリーニング工程に次世代シーケンサを応用し、検出感度の高い新規抗体探索手法を開発した。結果、従来手法で得られたクラスターに加え、新たに二つの抗体クラスターを発見した。従来手法で得られた抗体のパニング後のライブラリ内含有率は9.0%であり、新たに得られた抗体についてはそれぞれ、0.2%、1.1%であった。以上より、本手法は、従来手法より高い感度で抗体を検出可能であるといえる。

Antibodies are important protein of the immune system and expected as a new medical molecule. We developed highly sensitive antibody detecting method by combining phage display screening method with next-generation sequencing. We newly detected two antibody clusters, and those were not detected with our existing methods. With our existing methods, we gained antibodies with 9% library content rate after the panning process, however we used our new method and found two new antibody clusters only contains 0.2% and 1.1% of library content rate. All above facts support this method have highly sensitive antibody detecting functions than existing methods.

Keywords: 抗体、ファージディスプレイ法、次世代シーケンサ、コンピューテーショナル解析 antibody, phage display, next generation sequencing, computational analysis

1 背景

抗体は免疫システムにおいて重要なタンパク質である。抗体は細菌やウイルスを始めとする病原体に対して選択的に結合する (Edelman and Poulik, 1961)。哺乳動物の抗体は、IgA, IgD, IgE, IgG, IgM という5つのアイソタイプに分けられる。IgG抗体は重鎖、軽鎖それぞれ2分子から構成される4量体

であり、Y字型の構造を形成する。Y字型の構造において二股に分かれた各先端が結合部位となっている。抗体は結合部位により病原体に結合し、その活動を妨げることができる。ヒトの個体は100億種類以上の抗体を持つと推定され、各抗体は特異的に結合する標的を持ち、これを抗原と呼ぶ(Nemazee, 2006)。抗体生産細胞は体細胞超変異とクラススイッチ再構成によりこの膨大な多様性を獲得する(Hozumi and Tonegawa, 1976; Tonegawa, 1983; Market and Papavasiliou, 2003; Li *et al.*, 2004)。

アルパカ (*Lama pacos*) を含むラクダ科においては4量体から構成される従来型の抗体に加え、2つの重鎖のみから構成される重鎖抗体が確認されている(Hamers-Casterman *et al.*, 1993)。重鎖抗体の抗原結合領域はVHHと呼ばれ、従来型の抗体と比べて長いCDR3領域を特徴としており、単一のドメインから構成される(Mu *et al.*, 1993; Muyldermans *et al.*, 1994; Vu *et al.*, 1997)。

VHH抗体はヒトの重鎖結合ドメインとの類似性が高く、この特性は医薬品としての大きな利点を持つ(Vincke *et al.*, 2009)。VHH抗体は高い溶解性、凝集に対する抵抗性、熱変性に対する可逆性といった、物理的特性を持つため、工業的側面においても優れた分子といえる(Dumoulin *et al.*, 2002; Ewert *et al.*, 2002; Perez *et al.*, 2001; Lauwereys *et al.*, 1998; Dolk *et al.*, 2005)。

さらにはタンパク質工学によって複数のVHH抗体を結合することによって、複数の抗原に対して特異性を持つような高機能抗体を構築することが可能である(Hmila *et al.*, 2010; Garaicoechea *et al.*, 2008; Stone *et al.*, 2007)。また、VHH抗体は工業スケールでの生産という観点においても、細菌、酵母、植物、動物細胞で高い生産性を持つことが報告されている(Harmsen and De Haard, 2007)。

ファージディスプレイライブラリはタンパク質及びペプチドのスクリーニングにおいて強力な手段を提供することが可能である。ファージの外殻タンパク質を、スクリーニング対象のタンパク質及びペプチドを融合させることで、ファージ表面に提示する。表面に提示するタンパク質に多様性を持たせたものがファージディスプレイライブラリである。生体由来あるいは人工合成した多様性のあるDNA配列ライブラリを、ファージライブラリ構築時にファージ外殻タンパクDNA配列に挿入することで、各ファージもしくは複数

のファージごとに表面に提示させることが可能である (Smith, 1985; Scott and Smith, 1990; McCafferty *et al.*, 1990; Marks *et al.*, 1991)。ファージディスプレイライブラリ中から標的に結合する分子を表面に提示したファージのみをスクリーニングする工程はバイオパニングと呼ばれる。抗原を固定したプレート、もしくは表面に抗原を発現した細胞を用意し、ファージディスプレイライブラリと結合する工程、洗浄する工程、洗浄後も結合していたファージを回収する工程により 1 サイクルの選別を行う。このサイクルを一般的には 3 回から 7 回繰り返すことで、目的の抗原に結合するタンパク質を表面に提示したファージを選択することができる。各サイクルの選別後に得られたファージ群を大腸菌に感染させて増幅することで、次のサイクルを行うために十分な量のファージ群を得る。最終サイクルにて選択されたファージを大腸菌へ感染させ、コロニーを形成した上でクローニングすることで、各抗体提示ファージを得ることができ、各抗体の DNA 配列決定も可能になる。上記手法により、これまで Fab 抗体、scFv 抗体、VHH 抗体といったフラグメント抗体が多く単離されてきた (Griffiths *et al.*, 1994; Muraoka *et al.*, 2009; Muyldermans, 2001; Yang *et al.*, 2010)。

一方で、近年、ゲノム DNA 配列の決定や塩基多型の検出といった研究分野において、その検出感度とスループットの急激な性能向上によって革新をもたらした次世代 DNA シーケンサを、生体内の B 細胞抗体遺伝子の多様性解析に応用することは、抗体配列の解析に有用であることが示されてきた (DeKosky *et al.*, 2013; Reddy *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2013)。また、近年ではファージディスプレイライブラリのバイオパニング工程に次世代シーケンサを抗原特異的抗体の同定に応用したという報告がある。しかし、これらの研究は抗体に 3 カ所存在する抗原結合部位の 1 カ所のみを決定するに留まっている (Ravn *et al.*, 2013; Saggy *et al.*, 2012)。抗体は分子間相互作用によって抗原に結合するため立体構造が重要であるが、1 アミノ酸の違いは立体構造を変化させ結合力に影響を与える。また、抗体タンパク質を人工合成あるいは細胞系にて合成するためには、全長のアミノ酸配列が既知である必要がある。従って、抗体を実験ツールまたは医薬品として開発するためには、抗体の全長アミノ酸配列を決定する必要がある。そのため、完全長の抗体配列決定を前提と

した解析が求められている。しかし、通常の抗体における重鎖と軽鎖の DNA 配列の合計長は 1500 塩基対に達する上に、定常領域と変異領域が交互に出現するため、膨大な多様性の各抗体配列を次世代シーケンサの出力データからアセンブリし、高い精度で復元することは難しい。そのため、完全長の抗体を用いた研究はまだ報告されていない。

そこで本研究では、免疫したアルパカの血液から DNA 配列の長さが 500 塩基対程度の長さである VHH 抗体のファージディスプレイライブラリを作成し、バイオパニング工程において、次世代シーケンサによる抗体完全長配列の解析を行い、有望な抗体の同定を行った。モデル抗原として、IZUMO1_{PF} (IZUMO1 putative functional fragment) を用いた。IZUMO1_{PF} は 377 アミノ酸からなる膜貫通型タンパク質であり、本研究では抗原として N 末端ドメイン (Asp5 から Leu113) を用いた。膜タンパクは抗体医薬品のターゲットとして注目されており (Oostru and Macrae, 2014)、本抗原は膜貫通型タンパク細胞外ドメインでありながらも、可溶性があり大腸菌における高い生産効率を持つため、膜タンパクのモデル抗原として適している。IZUMO1_{PF} は卵細胞表面における CD9 と相互作用し、受精において重要な膜タンパクとしても知られている (Primakoff and Myles, 2007)。

結果、高い抗原特異性と結合力を持つ抗体の獲得に成功した。また、これらの抗体はライブラリ中の含有率が非常に小さく、従来手法では単離不可能な抗体であった。従来手法で抗体 DNA 配列を決定するためには、コロニー作成によるクローニングが必要であったため、ライブラリから得ることのできる DNA 配列数は数百が現実的であったが、次世代シーケンサの導入により、本研究では 5 万本以上の配列を決定することを可能にし、検出感度を向上させることに成功した。本結果は次世代シーケンサによる完全長配列の解析と、ファージディスプレイライブラリのバイオパニングを組み合わせた手法が、抗体探索における強力な手法になりうることを示している。

2 対象と手法

2.1 手法の概要

従来手法には、増幅バイアスの原因となる大腸菌を用いたファージ増幅プロ

セスと、配列取得効率のボトルネックとなるコロニークローニングプロセスがあった。本研究で提案する手法はこれらのプロセスを次世代シーケンサによる数万本オーダーでの DNA 配列決定とコンピュータ解析に置き換えることで、従来手法の欠点を克服し、最終的に得られる抗体の結合力と多様性を向上することに成功した(図 1)。提案手法は上記で指摘した従来手法で問題となっているプロセス以外の手技をそのまま利用することができる。本研究では従来手法と提案手法を可能な限り公平に比較するため、共通するプロセスには同じ手技を用いて遂行した。

2.2 抗原の調製

IZUMO1_{PFF} 遺伝子のコドン を *Escherichia coli* に最適化し、3' 末端にリンカーと FLAG タグ (GGGGSDYKDDDDK) が結合した遺伝子を合成することで IZUMO1_{PFF}-FLAG を調製した。pAED4 発現ベクターを用いて IZUMO1_{PFF} と IZUMO1_{PFF}-FLAG を *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Agilent Technologies, La Jolla, CA) に導入した (Doering and Matsudaira, 1996)。

従来の方法に従い、抗原は封入体として発現したのち、塩化グアニジニウム溶液によって可溶化、Superdex 75 (GE Healthcare) にて精製し、平衡化バッファーとして 6 M 尿素 10 mM Tris-HCl (pH 8.5) を加え、逆相クロマトグラフィーによって精製した (Inoue *et al.*, 2014)。

2.3 アルパカへの免疫

免疫システムの抗原への応答性を向上させるため、2.6 mM 1-ethyl-3-(3-dimethylamino) propyl carbodiimide (EDC) を用いて KLH (Sigma-Aldrich, MO, USA) と IZUMO1_{PFF} を化学的に結合させた。初回免疫では 3.3 mg の抗原とアジュバンド (Freund complete adjuvant) をエマルジョン状態にし、皮下複数個所に免疫を実施した。免疫 14 日目と 28 日目には 3.3 mg の抗原とアジュバンド (Freund incomplete adjuvant) をエマルジョン状態にし、初回と同様に免疫を行った。免疫反応確認のために各免疫時に血清を採取した。50 ml の血液を免疫 48 日目に採取し、フィコールを用いた密度勾配遠心によって末梢血単核球 (PBMC) を分画した。

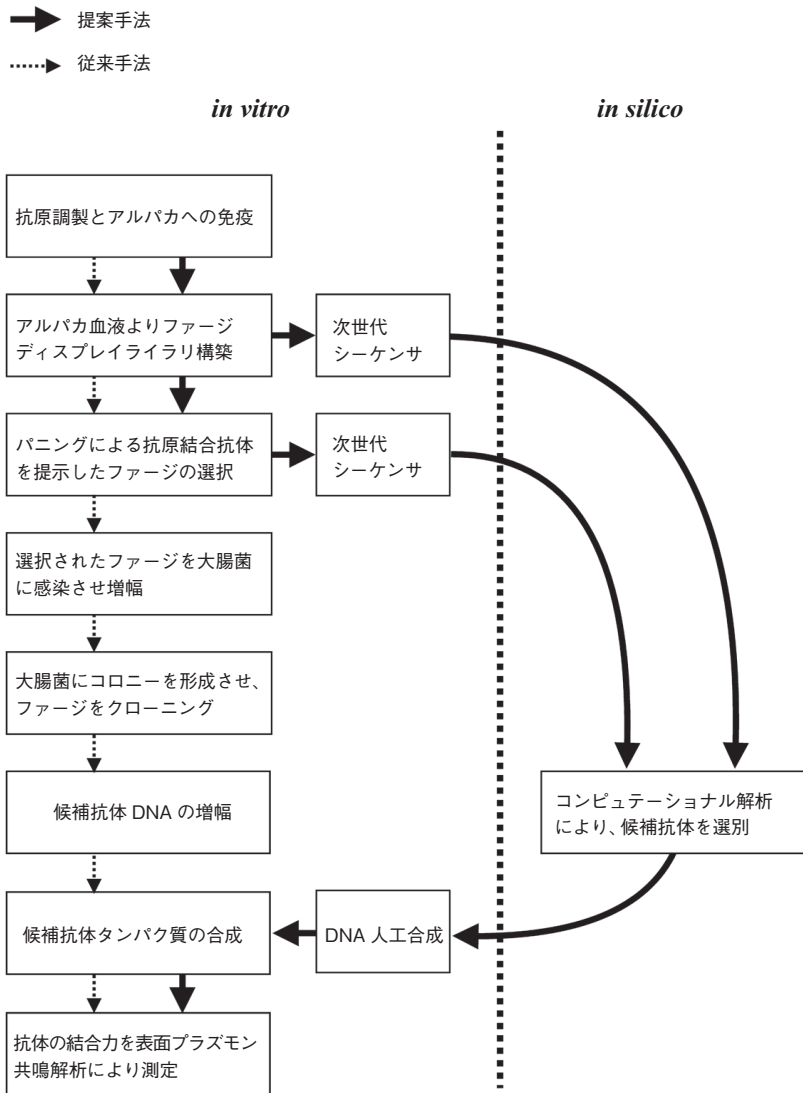


図 1 提案手法と従来手法の概要

提案手法と従来手法のフローチャートによる比較。増幅バイアスが入る大腸菌を用いたプロセスと、配列取得効率のボトルネックであるコロニークローニングプロセスを次世代シーケンサによる DNA 決定とコンピューシヨナル解析に置き換えた。

2.4 アルパカ由来免疫 VHH ファージディスプレイライブラリの構築

Total RNA は破碎した PBMC から RNAiso Plus (TAKARA BIO, Shiga, Japan) を用い、標準のプロトコルを用いて抽出した。cDNA は 5 mg の total RNA から SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) とオリゴ dT20 プライマーを用いて逆転写酵素によって合成した。IgG3 の DNA 断片増幅の 1 段階目の PCR では 5' プライマーとして Al-F1-1 (AGKTGCAGCTCGTGGAGTCNGGNGG) と Al-F1-2 (AGGTGCAGCTC-GTGGAGTCTGGGGG) を用い、3' プライマーとして AllgG3-R1 (TTGTG-GTTTTGGTGTCTTGGG) を用いた。この PCR は 50 μ l reaction mixture with KOD-Plus-Neo DNA polymerase (Toyobo Co.)。98 °C にて 2 分変性処理を行った後、22 回のサイクルにて増幅を行った。各サイクルでは熱変性を 98 °C にて 10 秒、アニーリングを 58 °C にて 30 秒、伸張反応を 68 °C にて 20 秒行った。

5' 末端 と 3' 末端にそれぞれ SfiI と SpeI 制限酵素サイトを加えるため 2 次 PCR に供した。2 次 PCR では Gene Taq DNA polymerase (Nippon Gene Co., Ltd) を用い、プライマーは Al-F1-Sfi (TGCTCCTCGCGCCAGCCG-GCCATGGCTCAGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGGGG) 及び AllgG3-R1-Spe (A TGATGATGTGCACTAGTTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG) を用いた (下線は制限酵素サイトを示す)。94 °C にて 2 分変性処理を行った後、15 回のサイクルにて増幅を行った。各サイクルでは熱変性を 94 °C にて 30 秒、アニーリングを 58 °C にて 30 秒、伸張反応を 72 °C にて 2 分を行った。その後、72 °C にて 5 分伸張反応を行った。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動によって精製し、SfiI と SpeI (New England Biolabs) により末端処理の後、ファージミドベクター pKSTV-02 に導入した。DNA はフェノールクロロホルムによって処理した後、エタノール沈殿により精製し、*E. coli* TG-1 (Lucigen Co.) に対してエレクトロポレーションにより導入した。ライブラリサイズは 2TYAG 1.5 % agar plate (2TY medium (16g Tryptone, 10g Yeast extract, 5g NaCl 1L), 2 % glucose, and 100 μ g/ml ampicillin) 上の形質転換体数から 8.4×10^7 と推定した。

2.5 バイオバニングによる抗体提示ファージのスクリーニング

1 mg IZUMO1_{PPF}-FLAG を 0.1 M NaHCO₃ によって 96 well plate (Maxisorp, Nunc Thermo Fisher Scientific) 上にコートし、PBS containing 0.05 % Tween 20 (PBST) を用いて 5 回洗浄した。PBS と混合した 150 ml のファージディスプレイライブラリ (1.5×10^{11} CFU) を、IZUMO1_{PPF}-FLAG をコートした 96 well plate に添加し、室温下にて 90 分間震盪し、結合反応を行った。PBST によって 5 回洗浄した後、IZUMO1_{PPF}-FLAG に結合した抗体提示ファージを 0.1 M glycine-HCl (pH 2.2, 300 ml) によって抗体抗原間の結合を開裂し、回収した。25 ml of 1 M Tris-HCl (pH 9.1) を加え中和した後、ファージを TG1 に感染させた。このサンプルより、TG1 コロニーを形成し、20 クロンの抗体をクローニングした。これらのクローンを従来手法の候補抗体とした (図 1)。残りのサンプルは、提案手法である次世代シーケンサのプロセスに用いた。

2.6 次世代シーケンサによる配列取得

ファージディスプレイライブラリに含まれる DNA 配列は次世代シーケンサ MiSeq (Illumina) によって解析した。TruSeqTM DNA Sample Preparation v2 (Illumina) を用いてサンプル DNA 10ng からシーケンシングライブラリを調製した。プライマーは AI-F1-4 (GGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGGGG) と AIIgG3-R1-3 (GTGGTTTTTGGTGTCTTGGGTTC) を用いた。シーケンシング反応には MiSeq Reagent Kit v2 (500 cycle) を用いた。CLC Genomics Workbench ver5 (CLC Bio) を用いて Quality score の低い配列のフィルタリング、オーバーラッピングペアの結合処理を行った。

2.7 表面プラズモン共鳴シグナルの解析による抗体結合力測定

VHH 抗体は アミンカップリングを用いて CM-5 センサーチップ (GE Healthcare) に固定化した。表面プラズモン共鳴シグナルは 25 °C において Biacore 2000 (GE Healthcare) を用いて HBS buffer 中で測定した。センサーチップは 0.5 M NaCl を含む 10 mM glycine-HCl buffer (pH 2.0) によって洗浄した。K_d 値を求めるために BIA evaluation software を用いてセンサーグラムの解析を行った。

3 結果と議論

3.1 アルパカへの免疫

アルパカへの免疫は IZUMO1_{PFF} の皮下注射を 3 回行うことで実施され、免疫応答による抗体価の上昇を ELISA によって確認した (図 2 A)。アルパカは 3 つのクラスの IgG を産生し、従来型の抗体が IgG1、重鎖抗体は短いヒンジ配列を持つ IgG2 と長いヒンジ配列を持つ IgG3 に分類される。各クラスの抗体は免疫されたアルパカの形質細胞からアフィニティクロマトグラフィによって精製し、ELISA によって抗体価を測定した (図 2 B, C)。IgG3 のみ IgG1 と比較して十分な IZUMO1_{PFF} 抗原に対する抗体価を示した。以上より、

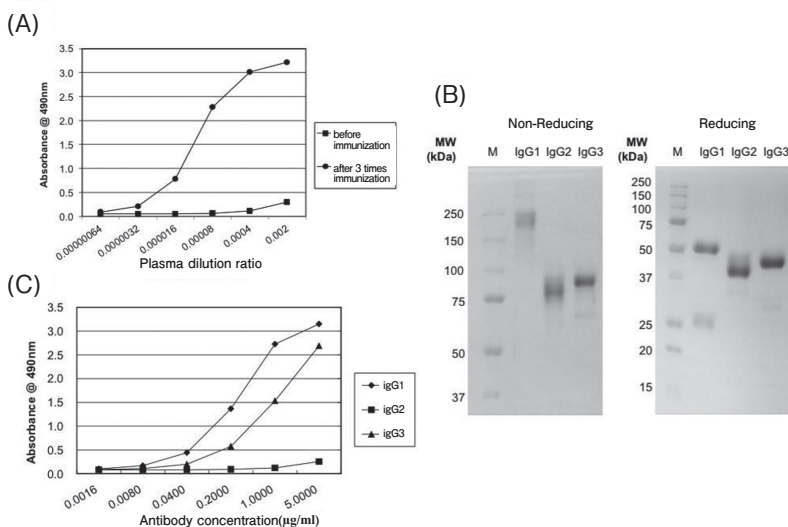


図 2 アルパカへの IZUMO1_{PFF} 免疫における抗体価の測定

(A) 免疫前後における ELISA による IZUMO1_{PFF} 特異的抗体への抗体価測定。抗アルパカ IgG ウサギポリクローナル IgG 抗体を用いた。(B) 3 クラスの抗体に対する SDS-PAGE による解析。各クラスの抗体はアフィニティクロマトグラフィによって分離されたものである。8 % ゲルによる非還元条件化の結果を左、10 % ゲルによる還元条件化の結果を右に示した。従来型抗体の IgG1 は非還元条件化で 4 量体であるため 180 kDa にバンドが見られるが、還元条件化では S-S 結合が開裂することで、重鎖と軽鎖がすべて分離し、50 と 25 kDa にバンドが見られる。一方で IgG2 と IgG3 は重鎖のみから構成される 2 両体であるため、非還元条件化ではそれぞれ 80 と 90 kDa にバンドが確認され、還元条件下ではそれぞれ 40 と 45 kDa にバンドが確認された。(C) ELISA による IZUMO1_{PFF} に対する IgG1, IgG2, IgG3 抗体価測定。

ファージディスプレイライブラリの抗体クラスを IgG3 に定めた。

3.2 従来手法によって得られた VHH 抗体とセレクション増幅率により同定された VHH 抗体の比較

従来手法によってクローニングした抗体はどれも互いに相同性が高く、1 つのクラスターしか得られなかった。これをクラスター 0 と名付けた。

バイオパニング前のサンプルとバイオパニング後のサンプルから次世代シーケンサによって得られた全ての VHH 抗体配列の含有率を比較し、バイオパニング前後における増幅率を算出した。MiSeq によって得られたパニング前と後の DNA 配列総数はそれぞれ 621,532 本、751,048 本であり、CLC Genomics Workbench ver5 によって抗体全長配列としてアセンブルされた DNA 配列数はそれぞれ 65,098 本 (40,662 種類)、80,662 本 (36,401 種類) であった。

クラスター 0 も同定されていたが、次世代シーケンサによってのみ同定された異なるクラスターに属する配列を候補として選び (クラスターリングには ClustalW2 を用いた)、これらをそれぞれクラスター 1, 2, 3 と名付けた (表、図 3)。

これらの抗体の機能を調べるために、クラスター 1, 2, 3 VHH 抗体遺伝子を合成し、ファージ表面に発現させた。ELISA にて IZUMO1_{PFF} への抗原特異性確認を行った結果、クラスター 1, 2 VHH 抗体のみ特異性を示した (図 4 A)。クラスター 0, 1, 2 VHH 抗体遺伝子を大腸菌を用いて発現させ、表面プラズモン共鳴解析によって結合力の測定を行った (図 4 B)。

クラスター 1, 2 VHH 抗体は IZUMO1_{PFF} への高い結合力を示し、それぞれの KD 値は 6.8 nM, 13.6 nM であった。一方、クラスター 3 VHH 抗体は結合

表 抗体配列 cluster1, 2, 3 の増幅率

配列名	パニング前の配列含有率 (%)	パニング後の配列含有率 (%)	増幅率 (倍)
クラスター 0	0.198	8.952	45.2
クラスター 1	0.0015	0.2	135
クラスター 2	0.018	1.09	60
クラスター 3	0.67	3.3	4.9

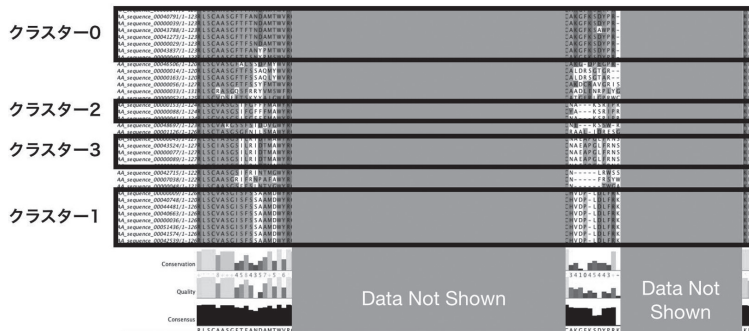


図3 増幅率が上位100位に入る抗体配列のクラスタリング (一部)

パニング前後のライブラリに含まれる抗体アミノ酸配列のうち、増幅率が最も高かった100本のアミノ酸配列をClustalW2にてクラスタリングし、一部を示した。

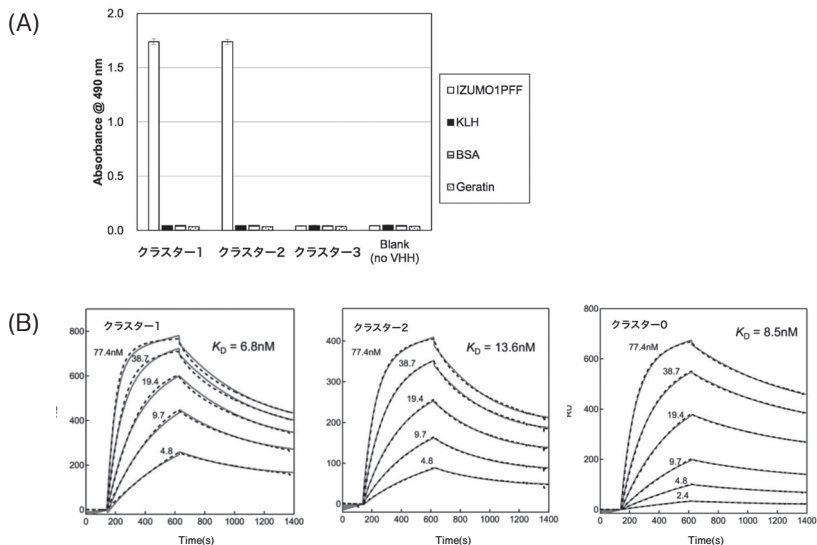


図4 次世代シーケンサ解析によって選択された抗体の機能解析

(A) ELISAによる抗体提示ファージクローンの抗原特異性解析。(B) 表面プラズモン共鳴解析による結合力測定。左、中央と右はそれぞれクラスター1, 2, 0 VHH抗体のセンサーグラムを示す。センサーチップに固定化されたVHH抗体に対して、異なる濃度のIZUMO1_{PFF}を反応させて測定を行った。

を示さなかった。これらの結果は増幅率に基づいたクラスター 1, 2 VHH 抗体の選択の成功を支持している。

クラスター 3 VHH 抗体のみが特異性と結合力を示さなかった理由を考えることは、抗体選択基準の選定に重要な意味を持つ。クラスター 3 VHH 抗体配列のバイオパニング前含有率は 0.67 %、バイオパニング後含有率は 3.3 % であった。含有率はクラスター 1, 2 VHH 抗体よりも大きく、増幅率は他の VHH 抗体よりも小さいものであった。これより、バイオパニング前後における増幅率の大きさを基準に抗体選択を行うことは有効であると考えられる。

従来手法で得られた唯一の抗体クラスターに属する配列のクラスター 0 の含有率は 8.952 % であった。クラスター 1, 2 VHH 抗体はライブラリ内における含有率が低く、従来手法では検出できなかったが、高い特異性と結合力を持っていたことが確認された。それぞれのバイオパニング前含有率は 0.0015 %, 0.018 % であった。これはクラスター 1, 2 VHH 抗体がアルパカの体内における免疫システムではごくわずかししか発現されていないことを意味する。この現象の説明として、アルパカの免疫システムにとってこれらの抗体は不要であった、必要であったが発現に向いていなかった、そもそも少量で十分であった、などが考えられる。このように生体内における含有率が低い抗体は、機能性が高かったとしても獲得することは難しい。次世代シーケンサとファージディスプレイ法を組み合わせた抗体選択手法は、これまで見逃してしまっていた高い機能を持つ抗体を検出可能であることが示された。本手法は抗体医薬品の開発に貢献することが期待される。

4 結論

本論文において次世代シーケンサとファージディスプレイライブラリを組み合わせた抗体スクリーニング手法を提案し、IZUMO1_{PF} をモデル抗原とし、アルパカ VHH 抗体ライブラリを用いて検証を行った。結果、従来手法では 1 クラスターの抗体しか得られなかったが、本手法では従来手法で得られたクラスターに加え、新たに二つの抗体クラスターを発見した。従来手法で得られた抗体のパニング後のライブラリ内含有率は 8.952 % であり、新たに得られた抗体についてはそれぞれ、0.2 %, 1.09 % であった。これらは全て K_D 値 15 nM

以下の結合力と抗原特異性を持っていた。以上より、本手法は、ファージディスプレイライブラリ中もしくはパニング後の含有率が低いがために、高い結合力を持つ抗体であるにも関わらず従来手法では検出することができなかった抗体を同定することが可能であるといえる。

5 展望

VHH 抗体の新薬認可の前例は無いものの、Caplacizumab は臨床試験フェイズ II をクリアし、2015 年に臨床試験フェイズ III が開始された。これは、VHH 抗体を体内に投与することの安全性を示すものである。薬効に関してはフェイズ III の結果を待つ必要があるが、上記の結果を受け VHH 抗体開発の需要は高まるだろう。とはいえ、従来抗体は周辺リサーチツールが充実しており、少なくとも5年間は抗体医薬品の主役となりつづける事が予想される。従って、VHH 抗体によって検証された本手法を、従来型 Fab 抗体に応用することには意義がある。この場合においても DNA 配列決定の難易度は高くなるものの、Fab 抗体全長、少なくとも重鎖と軽鎖的可変領域をペアで配列決定する必要がある。抗体の立体構造においては、重鎖と軽鎖における可変領域の組み合わせが極めて重要であり、これらから一部の情報が欠けるだけでも抗体設計には致命的であるためである。今後は、本手法を発展させ、次世代シーケンサをバイオパニングに 応用する手法を、抗体医薬品の主軸である Fab 抗体に応用し、獲得難易度の高い抗体をスクリーニングしていくことで、科学と医療に貢献していきたい。

謝辞

東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻の津本浩平教授との議論は本研究において大変有意義なものでありました。ここにお礼申し上げます。

参考文献

DeKosky, B.J., Ippolito, G.C., Deschner, R.P., Lavinder, J.J., Wine, Y., Rawlings, B. M., Varadarajan, N., Giesecke, C., Dorner, T., Andrews, S.F., Wilson, P.C., Hunicke-Smith, S.P., Willson, C.G., Ellington, A.D. and Georgiou, G., “High-throughput

- sequencing of the paired human immunoglobulin heavy and light chain repertoire." *Nat. Biotechnol.*, 31, 2013, pp.166-169.
- Doering, D.S. and Matsudaira, P., "Cysteine scanning mutagenesis at 40 of 76 positions in villin headpiece maps the F-actin binding site and structural features of the domain." *Biochemistry*, 35, 1996, pp.12677-12685.
- Dolk, E., van der Vaart, M., Lutje Hulsik, D., Vriend, G., de Haard, H., Spinelli, S., Cambillau, C., Frenken, L. and Verrips, T., "Isolation of llama antibody fragments for prevention of dandruff by phage display in shampoo." *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 2005, pp.442-450.
- Dumoulin, M., Conrath, K., Van Meirhaeghe, A., Meersman, F., Heremans, K., Frenken, L.G., Muyldermans, S., Wyns, L. and Matagne, A., "Single-domain antibody fragments with high conformational stability." *Protein Sci.*, 11, 2002, pp.500-515.
- Edelman, G.M. and Poulik, M.D., "Studies on structural units of the gamma-globulins." *J. Exp. Med.*, 113, 1961, pp.861-884.
- Ewert, S., Cambillau, C., Conrath, K. and Pluckthun, A., "Biophysical properties of camelid V(HH) domains compared to those of human V(H)3 domains." *Biochemistry*, 41, 2002, pp.3628-3636.
- Garaicoechea, L., Olichon, A., Marcoppido, G., Wigdorovitz, A., Mozgovoij, M., Saif, L., Surrey, T. and Parreno, V., "Llama-derived single-chain antibody fragments directed to rotavirus VP6 protein possess broad neutralizing activity in vitro and confer protection against diarrhea in mice." *J. Virol.*, 82, 2008, pp.9753-9764.
- Griffiths, A.D., Williams, S.C., Hartley, O., Tomlinson, I.M., Waterhouse, P., Crosby, W.L., Kontermann, R.E., Jones, P.T., Low, N.M., Allison, T.J. *et al.*, "Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires." *EMBO J.*, 13, 1994, pp.3245-3260.
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E.B., Bendahman, N. and Hamers, R., "Naturally occurring antibodies devoid of light chains." *Nature*, 363, 1993, pp.446-448.
- Harmsen, M.M. and De Haard, H.J., "Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments." *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 77, 2007, pp.13-22.
- Hmila, I., Saerens, D., Ben Abderrazek, R., Vincke, C., Abidi, N., Benlasfar, Z., Govaert, J., El Ayeb, M., Bouhaouala-Zahar, B. and Muyldermans, S., "A bispecific nanobody to provide full protection against lethal scorpion envenoming." *FASEB J.*, 24, 2010, pp.3479-3489.
- Hozumi, N. and Tonegawa, S., "Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73, 1976, pp.3628-3632.
- Inoue, N., Hamada, D., Kamikubo, H., Hirata, K., Kataoka, M., Yamamoto, M., Ikawa, M., Okabe, M. and Hagihara, Y., "Functional and structural study of 1 mouse sperm protein, IZUMO1, by using molecular dissection." Development in press, 2014.
- Lauwereys, M., Arbabi Ghahroudi, M., Desmyter, A., Kinne, J., Holzer, W., De Genst, E., Wyns, L. and Muyldermans, S., "Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies." *EMBO J.*, 17, 1998, pp.3512-3520.
- Li, Z., Woo, C.J., Iglesias-Ussel, M.D., Ronai, D. and Scharff, M.D., "The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination." *Genes Dev.*, 18, 2004, pp.1-11.
-

- Market, E. and Papavasiliou, F.N., "V(D)J recombination and the evolution of the adaptive immune system." *PLoS Biol.*, 1, 2003, pp.24-27.
- Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Bonnert, T.P., McCafferty, J., Griffiths, A.D. and Winter, G., "By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage." *J. Mol. Biol.*, 5, 1991, pp.581-597.
- McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. and Chiswell, D.J., "Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains." *Nature*, 348, 1990, p.p. 552-554.
- Muraoka, S., Ito, Y., Kamimura, M., Baba, M., Arima, N., Suda, Y., Hashiguchi, S., Torikai, M., Nakashima, T. and Sugimura, K., "Effective induction of cell death on adult T-cell leukaemia cells by HLA-DRbeta-specific small antibody fragment isolated from human antibody phage library." *J. Biochem.*, 145, 2009, pp.799-810.
- Muyldermans, S., "Single domain camel antibodies: current status." *Journal of biotechnology*, 74, 2001, pp.277-302.
- Muyldermans, S., Atarhouch, T., Saldanha, J., Barbosa, J.A. and Hamers, R., "Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains." *Protein Eng.*, 7, 1994, pp.1129-1135.
- Nemazee, D., "Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance." *Nat. Rev. Immunol.*, 6, 2006, pp.728-740.
- Oostra, D.R. and Macrae, E.R., "Role of trastuzumab emtansine in the treatment of HER2-positive breast cancer." *Breast Cancer*, 6, 2014, pp.103-113.
- Perez, J.M., Renisio, J.G., Prompers, J.J., van Platerink, C.J., Cambillau, C., Darbon, H. and Frenken, L.G., "Thermal unfolding of a llama antibody fragment: a two-state reversible process." *Biochemistry*, 40, 2001, pp.74-83.
- Primakoff, P. and Myles, D.G., "Cell-cell membrane fusion during mammalian fertilization." *FEBS Lett.*, 581, 2007, pp.2174-2180.
- Ravn, U., Didelot, G., Venet, S., Ng, K.T., Gueneau, F., Rousseau, F., Calloud, S., Kosco-Vilbois, M. and Fischer, N., "Deep sequencing of phage display libraries to support antibody discovery." *Methods*, 60, 2013, pp.99-110.
- Reddy, S.T., Ge, X., Miklos, A.E., Hughes, R.A., Kang, S.H., Hoi, K.H., Chrysostomou, C., Hunnicke-Smith, S.P., Iverson, B.L., Tucker, P.W., Ellington, A.D. and Georgiou, G., "Monoclonal antibodies isolated without screening by analyzing the variable-gene repertoire of plasma cells." *Nat. Biotechnol.*, 28, 2010, pp.965-969.
- Saggy, I., Wine, Y., Shefet-Carasso, L., Nahary, L., Georgiou, G. and Benhar, I., "Antibody isolation from immunized animals: comparison of phage display and antibody discovery via V gene repertoire mining." *Protein Eng. Des. Sel.*, 25, 2012, pp.539-549.
- Scott, J.K. and Smith, G.P., "Searching for peptide ligands with an epitope library." *Science*, 249, 1990, pp.386-390.
- Smith, G.P., "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface." *Science*, 228, 1985, pp.1315-1317.
- Stone, E., Hirama, T., Tanha, J., Tong-Sevinc, H., Li, S., MacKenzie, C.R. and Zhang, J., "The assembly of single domain antibodies into bispecific decavalent molecules." *J. Immunol. Methods*, 318, 2007, pp.88-94.
- Tonegawa, S., "Somatic generation of antibody diversity." *Nature*, 302, 1983, pp.575-581.
- Vincke, C., Loris, R., Saerens, D., Martinez-Rodriguez, S., Muyldermans, S. and Conrath, K., "General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and iden-

- tification of a universal humanized nanobody scaffold." *J. Biol. Chem.* 284, 2009, pp. 3273-3284.
- Vu, K.B., Ghahroudi, M.A., Wyns, L. and Muyldermans, S., "Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies." *Mol. Immunol.*, 34, 1997, pp.1121-1131.
- Wu, T.T., Johnson, G. and Kabat, E.A., "Length distribution of CDRH3 in antibodies." *Proteins*, 16, 1993, pp.1-7.
- Yang, J., Yoshida, R., Kariya, Y., Zhang, X., Hashiguchi, S., Nakashima, T., Suda, Y., Takada, A., Ito, Y. and Sugimura, K., "Characterization of human single-chain antibodies against highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses: mimotope and neutralizing activity." *J. Biochem.*, 148, 2010, pp.507-515.
- Zhu, J., Ofek, G., Yang, Y., Zhang, B., Louder, M.K., Lu, G., McKee, K., Pancera, M., Skinner, J., Zhang, Z., Parks, R., Eudailey, J., Lloyd, K.E., Blinn, J., Alam, S.M., Haynes, B.F., Simek, M., Burton, D.R., Koff, W.C., Program, N.C.S., Mullikin, J. C., Mascola, J.R., Shapiro, L. and Kwong, P.D., "Mining the antibodyome for HIV-1-neutralizing antibodies with next-generation sequencing and phylogenetic pairing of heavy/light chains." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110, 2013, pp.6470-6475.

{受付日 2015. 2. 26}
{採録日 2015. 6. 30}