

Title	京レベル抗体ライブラリーの開発とプロテオミクス解析基盤ツールの作製
Sub Title	Developments of a new antibody library and antibody chips
Author	高柳, 淳(Takayanagi, Atsushi)
Publisher	
Publication year	2015
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2014.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>本研究は以下の2つの関連する項目を実施した。(1) 抗がん活性を有する既得抗体の採用機序解明, (2) 京レベルを有する抗体ライブラリーの作製である。それぞれの成果に分けて記載する。(1) 9種の癌細胞株を用いてEGFRからの細胞内シグナルおよびアポトーシスに対する抗体の作用を調べたところ, 統一的な解釈ができるメカニズムは発見できずさらなる解析が必要である。(2) 数々の創意工夫を導入したベクターを作製し, H鎖L鎖とも10の9乗を超えるレパートリーを有する抗体ライブラリーシステムを構築した。</p> <p>(1) We have analyzed effects on tumor cells of anti-EGF receptor antibodies recognized unique epitopes, which were obtained from our original antibody library. The antibodies induced apoptosis to EGFR-overproduced tumor cells with wild type and several tumorigenic K-RAS mutations. The antibodies inhibited EGF-induced EGFR phosphorylation and Akt phosphorylation. (2) For we have constructed an Fab antibody-displaying phage library with 10¹⁸ repertory which are based on new concept for library-screening system.</p>
Notes	<p>研究種目：基盤研究(C) 研究期間：2012～2014 課題番号：24501343 研究分野：細胞生物学</p>
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_24501343seika

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.

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501343

研究課題名(和文)京レベル抗体ライブラリーの開発とプロテオミクス解析基盤ツールの作製

研究課題名(英文)Developments of A New Antibody Library and Antibody Chips

研究代表者

高柳 淳(Takayanagi, Atsushi)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：80245464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は以下の2つの関連する項目を実施した。(1)抗がん活性を有する既得抗体の採用機序解明、(2)京レベルを有する抗体ライブラリーの作製である。

それぞれの成果に分けて記載する。(1)9種の癌細胞株を用いてEGFRからの細胞内シグナルおよびアポトーシスに対する抗体の作用を調べたところ、統一的な解釈ができるメカニズムは発見できずさらなる解析が必要である。(2)数々の創意工夫を導入したベクターを作製し、H鎖L鎖とも10の9乗を超えるレパートリーを有する抗体ライブラリーシステムを構築した。

研究成果の概要(英文)：(1)We have analyzed effects on tumor cells of anti-EGF receptor antibodies recognized unique epitopes, which were obtained from our original antibody library. The antibodies induced apoptosis to EGFR-overproduced tumor cells with wild type and several tumorigenic K-RAS mutations. The antibodies inhibited EGF-induced EGFR phosphorylation and Akt phosphorylation.

(2)For we have constructed an Fab antibody-displaying phage library with 10⁹ repertory which are based on new concept for library-screening system.

研究分野：細胞生物学

キーワード：EGFレセプター 抗体 ライブラリー

1. 研究開始当初の背景

抗体は、研究のみならず医薬品としても有用なタンパクである。その作製法は動物を免疫する方法と抗体ライブラリーを利用して *in vitro* でスクリーニングする方法がある。

in vitro 法の一つであるファージディスプレイ型抗体ライブラリーは基本原理が報告されてから 20 年近く経ち基本特許は有効期限が切れたが、日本ではさほど普及していない。有用性の高いライブラリーを作製するためには大変な労力が必要であること、安定な供給(ライブラリーの増幅)が難しいこと、特徴を生かしたスクリーニングが必要であることがその理由である。

申請者は、CDR(超可変領域)シャッフリングと Cre-lox 組換えによる VH-VL シャッフリングを組み合わせた方法で、これらの欠点を克服し、ヒト個人が一生涯で生み出すといわれている 10^{12} 以上のレパートリーという世界最高水準の抗体ライブラリーを作製している(欧州特許/日本特許登録 2006)。申請者は効果的なスクリーニング手法である差分法や積算法(下図)を 70 ページに及ぶマニュアルにまとめ共同研究者に配布している。

実際にこれらを用いて動物を免疫する方法では得られなかった糖鎖(2007,2009)、RNA(投稿中)、抗阻害剤酵素複合体(未発表)等に対する抗体を単離している。

さらに、既存のモノクローナル抗体を利用し同一抗原上のエピトープの異なる抗体を効率よくスクリーニングする新規ガイド分子法を開発した(下図右)。この方法によりマウス抗 EGF レセプター抗体を利用して抗がん活性を有するヒト抗 EGF レセプター(EGFR)抗体を 2 種単離している(2011)。また別手法で EGFR を過剰発現するがん細胞株に増殖抑制を起こす抗 IGFR 抗体も単離している(未発表)。

このように *in vitro* で抗体をスクリーニングするファージディスプレイ型抗体ライブラリーは優れた性能を有している。

我々のライブラリーは VH(重鎖可変領域)・VL(軽鎖可変領域)それぞれ 10^7 以上のレパートリーを組み合わせると 10^{12} 種類以上の完全な抗体遺伝子を創製し、かつ独特の洗浄液など様々な工夫を凝らし改良したスクリー

ニング法を採用している。

しかし、高親和性抗体、または特異抗体そのものが得られない抗原が存在する。言い換えれば世界中で使われているファージディスプレイ型抗体ライブラリーは未だ不十分な性能しか有していないことになる。特異抗体が得られない理由として、生体内のような適応的な分子進化(体細胞突然変異)がないため、非結合性の VL(あるいは VH)との組み合わせによって有効な VH(VL)レパートリーが無駄になっていると考えている。

2. 研究の目的

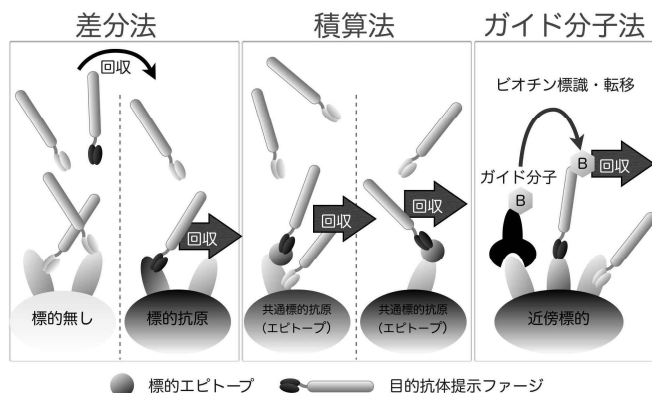
本研究では 3 つの目標を設定した。

(1) 抗 EGFR 抗体および抗 IGFR 抗体、その他の抗がん活性を有する既得抗体の作用機序を調べることである。

本研究で用いる抗 EGFR 抗体は既存の抗体医薬で効果がない細胞(KRAS 変異をもつ癌細胞)にも増殖抑制効果があることから、細胞内シグナルの遮断様式は異なると予想される。EGFR は FAK からのシグナルを仲介することから、EGF 非依存的なシグナルが関与している可能性もありその分子基盤は興味深い。抗体ライブラリーを用いなければ単離できなかった特別な作用を有する抗体である可能性もある。また、EGFR 依存的な増殖を示すがん細胞に対して弱い増殖抑制効果を示す抗 IGFR 抗体が単離されたことから、IGFR 依存的な生存シグナルもある一定の役割を担っていることを示している。これは抗 EGFR・抗 IGFR 薬剤の併用療法の根拠にもなり、分子標的医薬の効能を高める知見になりうる。

(2) 抗体が単離出来なかった癌マーカーを含む有用抗原に対して新たな抗体を得るため、「1. 研究開始当初の背景」で述べた欠点を克服し現状を遥かに超える京レベル(10^{16})以上のレパートリーを有する抗体ライブラリーシステムを完成させる。具体的には現在のライブラリー作製技術を発展させた方法を採用する。すなわち抗原結合に関与しない「ダミー-VL」と組み合わせた VH 抗体ライブラリーで一次スクリーニングを行い、得られた VH サブライブラリーに VL ライブラリーを組み合わせ、新たな完全抗体ライブラリー(二次抗体ライブラリー)に組換える(図)。このような操作を行えば、実質上

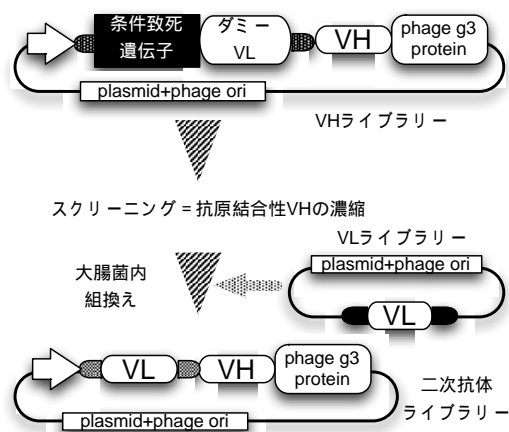
京レベルのレパートリーを使い尽くすことになる。また従来では IgG 型抗体を得るには抗体遺伝子を取り出しベクターを入れ替える必要があり面倒であった。本研究で作製するライブラリー発現ベクターは申請者が開発した大腸菌・培養細胞両用の改変プロモーターおよび分泌シグナル配列を利用するため入れ替えの必要はなく、組換え IgG 抗体の調製に関しても利便性が著しく向上していることも特徴である。これを用いて抗体が得られなかった複数の癌マーカー候補(糖鎖抗



原が多い)に対してスクリーニングを行う。

最後に (3)抗体アレイを用いた革新的なスクリーニングシステムを構築するための条件検討を行う。なお、この目標は病気療養のため全く実施出来なかった。

ランダムペプチド・ピースライブラリーを抗原として上記抗体ライブラリーをスクリーニングし、最終的に 4 アミノ酸ペプチド (20⁴種類 = 16 万種)に結合する抗体を整列化した抗体アレイを作製し、抗体スクリーニングに利用する。また抗体アレイのアドレスに対応したペプチド配列はデータベース(PDB)化する。この抗体アレイは、抗体プロテオミクスの新たな研究手法として新発見のツールとなると考えている。さらに抗原の生物種に依存しないため、波及効果は高い。これにより可能となる 4 つの革新的 (抗体)スクリーニング手法を挙げる。(i)既知タンパクのアミノ酸配列から PDB を参照し対応抗体を迅速に選抜。目的タンパクが結合した抗体アレイから目的抗体を迅速に選抜。(ii)未知タンパクの結合パターンからそれに含まれる 4 アミノ酸配列を PDB で解析しゲノムデータベースと照合することによる遺伝子配列 (全アミノ酸配列)の同定。(iii)結合パターンの差から正常タンパクと異常タンパクのアミノ酸の変異部位を同定。(iv)異常部位と正常など複数のタンパク抽出液の結合パターンの差から、変化のある抗体 (=検出ツール)を同定。また、PDB と照合することにより抗原が同定できる可能性もある。すでに現在のライブラリーを用いた 3 アミノ酸ペプチド (GlyGly-X-X-Pro-X-GlyGly : 8000 種)に対する抗体アレイ作製のための予備的条件検討はほぼ終わりつつあるため、本研究ではより精密な結果が得られる 4 アミノ酸ペプチドおよび新ライブラリーに適應させていく。



3. 研究の方法

病気療養のため実施出来ていない項目が多いため、当初の予定を記載する。

(1)抗がん活性を有する既得抗体の作用機序解明

抗腫瘍活性を有する抗 EGFR 抗体 2 種の EGFR 上の結合部位は判明しており、上市されている抗 EGFR 抗体とは異なるドメインに結合す

る。この相違が K-RAS 変異を克服する機構を解明する。

(i)抗体により遮断される細胞内シグナルの解析:組換え IgG 抗体を大量に調製し、各種がん細胞株の培養液に添加する。主に各種リン酸化特異的抗体等を用いたウェスタンブロット等により、細胞内シグナルを解析し、どの経路が遮断されているか上市されている抗 EGFR 抗体と比較を行い調べる。複数の経路が見つかれば siRNA による knockdown 実験によりその遮断効果を詳細に検討する。また、K-RAS の変異の効果調べるため、数多くのがん細胞株を利用するだけでなく、野生型 K-RAS を有する細胞には変異型遺伝子を導入し、その効果を比較する。

(ii)耐性株による細胞内シグナルの解析:これら抗体の添加量を徐々に増加させることにより耐性株を単離する。どの細胞シグナルが変化しているかウェスタンブロット・マイクロアレイを用いた発現解析等により解析する。細胞死を回避する経路が判明すれば、阻害剤・siRNA などでそのシグナル遮断し、耐性が克服されるか否か検討する。この経路は新たな分子標的になり得る。

(2)京レベル (10¹⁶)以上のレパートリーを有する抗体ライブラリーシステムの作製
既存技術の応用であり、慎重な操作は要求されるが実現困難な技術的課題はない。

(i) VH・VL サプライブラリーの作製:抗体の可変領域には、体細胞突然変異が集中する超可変領域 (CDR) 3 つとそれらをつなぐ骨格部分から構成されている。CDR1 と 2 の領域は骨格部分と連結された形でゲノムに多数コードされているが、抗体遺伝子の再編成時に CDR3 の部分はランダムな配列が連結される。そのため CDR3 配列は多様であるが、ループ構造を形成する必要があるため完全なランダム配列ではなく人工的に作製するのは難しい。そのため複数人由来の末梢血・脾臓・扁桃腺 cDNA を鋳型にした変異導入 PCR 法でアミノ酸配列および鎖長の変異に富んだ CDR3 配列を増幅し、骨格部分に連結する。CDR1・2 を含む骨格部分も、これまでのスクリーニング過程で頻出した特定のサブクラスを利用し全合成し、体細胞突然変異で観察される複数アミノ酸をコードした全合成 CDR1・2 領域を組み込む。これにより、配列多様性と大腸菌発現系に適した骨格配列を両立させ、スクリーニング・バイアスを最小限にする (図)。軽鎖は、鎖鎖両方作製する。これらの手法により、生体内で産生される抗体遺伝子のレパートリーを凌駕する抗体遺伝子を創成する。現在作製中の独自ベクターを用い、複数回のライブラリー作製で養ったノウハウを総動員して、それぞれ 108 以上のレパートリーを有する高品質な VH・VL サプライブラリーを作製する。dam-VL 遺伝子は CDR すべてのアミノ酸をグリシン等に置き換えて抗原結合能を失わせたものとする。

(ii)モデル抗原を用いた抗体スクリーニン

グ：モデル抗原としてピオチン、ペプチド・糖鎖付加ペプチド・リン酸化ペプチドを利用しダミー-VLを有する VH サプライブラリーをスクリーニング(パンニング)を2回行う。抗原結合性ファージが濃縮された VH サプライブラリー(大腸菌)にファージ型 VL サプライブラリーを感染させ大腸菌内で組換えを起こさせ、VL・VH 完全抗体提示型ライブラリーに変換する。これを用いて、さらにスクリーニング(パンニング)を2~3回行いクローン化する。抗原結合性クローンを ELSA 法で同定し、さらに BIACORE 等で抗原親和性を測定する。

4. 研究成果

個人的な理由ではあるが、左大腿骨悪性腫瘍の化学療法・手術からの復帰に時間がかかり十分な成果が得られず大変申し訳ない。現在も松葉杖が必要な状態ではあるが、職場のご厚意もあり遅れを取り戻すべく努力している。

(1)抗体により遮断される細胞内シグナルの解析

組換え抗 EGFR 抗体に関して、レンチウイルスによる多重感染により抗体産生細胞を樹立し、数 mg の抗体が調製出来た。これを用いて数種の癌細胞株に暴露し抗腫瘍効果を検討した。その結果、EGFR 高発現癌細胞株 A431 (子宮頸がん)、NA (舌がん)、および中程度発現細胞株 A549 (肺がん)、SK-OV3 (子宮がん)、Caki-2 (腎がん)、HCT-116 (大腸がん)には殺細胞効果を示した。これらの細胞株では抗体による EGFR リン酸化および Akt リン酸化阻害が観察された。Caki-1 低度発現細胞株 MDA-MB231 (乳がん)、HT-29 (大腸がん)および中程度発現細胞株 Caki-1 (腎がん)には、効果がみられなかった。Caki-1 は EGFR リン酸化の阻害効果がなかったため EGF に寄らない EGFR 活性化の機構が存在する可能性が示唆された。A549 および HT-116 細胞には K-RAS 遺伝子にそれぞれ G12S・G13D 変異を有していた。また、A431 細胞に対して、2種の抗体を混合して暴露したが、殺細胞効果の相乗的・相加的影響はみられなかった。

K-RAS 遺伝子(WT および腫瘍性変異 G12V, G12C, G12D, G13D, Q61H, K117N, A146T)を発現する組換えレンチウイルスを調製し、組換え抗 EGFR 抗体に感受性細胞に導入し、薬剤耐性を指標にして K-RAS 変異遺伝子発現細胞を得た。これらが組換え抗 EGFR 抗体に対して感受性を示すか否か検討中である。

本抗体は上市されている抗 EGFR 抗体と異なるエピトープを認識する。また EGFR は様々な因子と相互作用しシグナルを伝える分子である。そのため、詳細な解析が進めば、新しい作用機序が見つかり、適応疾患が拡大される可能性もあるだろう。

(2)京レベル(10^{16})以上のレパートリーを有する抗体ライブラリーシステムの作製

VH・VL それぞれ 10 の 9 乗レベルの scFv ラ

イブラリーを作製しライブラリーに含まれるクローンを約 50 個ほどの配列を解析したところ、欠失クローンが約 40%含まれることが判明した。そのため、超可変領域の組み込み方法からライブラリー作製用ベクターまで大幅な再設計を行った。これまでの経験で scFv 抗体から IgG 型に変換した際に親和性が低下するクローンが複数存在したため、新規ライブラリーはその問題が生じない Fab 抗体提示型ファージライブラリーとして設計した。現在 H・L 鎖それぞれ 10 の 9 乗レベルのレパートリーを有するライブラリーが完成しているため、スクリーニング実験を開始している。

通常 10 の 10 乗レベルの抗体ライブラリーから得られた抗体は、しばしば親和性が低いため親和性向上操作が必要であると指摘されている。このライブラリーは他を圧倒するレパートリーでこの欠点を克服し、in vitro でのスクリーニングの利点を最大限発揮する真の抗体ライブラリーになり得ると考えている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 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

高柳 淳 (Takayanagi, Atsushi)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：80245464