

学位論文の要旨

氏名

大川 友里恵

学位論文題目

ヒト抗体ファージライブラリを使った疾患特異的抗体の単離と特性解析

本論文は、患者由来のヒト抗体ファージライブラリから疾患特異的な抗体を単離する手法および得られた抗体の機能解析について、また次世代シーケンサーを用いた抗体ファージライブラリからの迅速な抗体選別手法の確立についてまとめたものである。

第1章は、本論文の研究背景について述べた。抗体の有用性並びにファージディスプレイ法、次世代シーケンサーについての概要、並びに本論文で標的とした疾患である肝ガン及び茶のしずく石鹼由来小麦アレルギーについてまとめている。

第2章は、肝ガン抗原ルテラン特異的な抗体の単離と機能解析を行った。肝ガン患者由来の単鎖Fv (scFv) 抗体ファージライブラリを作製し、バイオパニングにより肝ガン抗原ルテランに対する特異的抗体の選別を行った。得られた抗体について、ルテランに対する結合を評価し、抗体C7はルテランのドメイン2を認識すること、ファージ上に提示した状態で、ルテラン過剰発現細胞株の運動を阻害することを明らかにした。このC7についてより詳細なエピトープマッピングを行い、ルテランへの結合に重要なアミノ酸残基を決定した。

第3章は、ヒト抗体ファージライブラリからの迅速な抗体選別法に、次世代シーケンサー技術を導入した解析手法の確立を行った。第2章で述べた肝ガン患者由来の抗体ライブラリーを用い、ガン抗原として用いたルテランに対するバイオパニング前後のファージ群の抗体配列を、次世代シーケンサーにより網羅的に解析し、各配列の出現率を比較

することで抗原特異的な抗体配列の特定を行った。さらに、VH領域のCDR3を標的としたプライマーを用いて、PCRによるscFv遺伝子の再構築を行い、得られたクローンの結合性を評価、並びに第2章で得られたクローンとの比較を行った。

第4章は、茶のしずく石鹼由来小麦アレルギー患者の抗体ファージライブラリからのアレルギー関連抗体の単離について、第3章で用いた手法が有用であるかを検証した。茶のしずく石鹼由来小麦アレルギー患者より、IgE特異的なscFv抗体ファージライブラリを作製し、バイオパニングと次世代シーケンサーを組み合わせた手法で小麦抗原グルテンに対する抗体の単離を試みたところ、グルテン特異的な抗体を単離することに成功した。この結果は、疾患特異的な抗体の単離に、次世代シーケンサーを組み合わせた選別手法が極めて有効であることを示している。

第5章は、肝ガン患者由来の抗体ファージライブラリからのガン抗原ルテランに対する特異的抗体の単離及びその抗体の機能性解析について、また次世代シーケンサーとバイオパニングを組み合わせた手法による迅速な抗体同定手法に関する研究内容をまとめ、総括した。

Summary of Doctoral Dissertation

Title of Doctoral Dissertation:

Isolation and Characterization of Antibodies to Disease-Specific Antigens
using Human scFv Phage Antibody Library

Name: Okawa Yurie

This thesis mainly comprises that isolation and characterization of antibodies from patient-derived human antibody phage library and construction of rapid isolation system from antibody phage library using next generation sequencer, which give useful techniques for design of new antibodies drugs.

Chapter 1 gives background of this study. This chapter summarizes the usefulness of the antibody, the method of phage display, the outline of the next generation sequencer, and information of targeted diseases in this study.

Chapter 2 describes isolation and characterization of liver cancer antigen lutheran-specific antibodies. scFv antibody phage library was constructed from liver cancer patient and used for selection of lutheran-specific antibodies by biopanning. The obtained clone C7 recognized domain 2 of lutheran and C7 phage antibody inhibited migration of lutheran-overexpressed cell line. Epitope mapping of clone C7 identified the amino acid residues which are essential for recognition by C7 phage antibody.

Chapter 3 constructs rapid antibody selection system from human antibody phage library using next generation sequencer. Usefulness of these method is verified by selection of liver cancer-specific antibody. Antibody genes of phages obtained before and after biopanning against lutheran were subjected to high-throughput analysis on next generation sequencer to identify antigen-specific clones. scFv genes were reconstructed from the pooled phage genes using VH-CDR3-targeted DNA primers. As a result, the scFv genes identified by this analysis were found to be specific to lutheran, target antigen.

In Chapter 4, the method using next generation sequencer was applied to identify wheat allergy-related antibodies from antibody phage libraries derived from wheat allergy patients caused by "Cha no Shizuku" soap. Analysis of phages clones before and after biopanning on next generation sequencer revealed the candidates of IgE antibody sequences which are responsible for allergy. Several reconstructed scFv showed the binding activities toward allergy antigen gluten. These results indicates selection method combined with next generation sequencer is very useful for rapid identification of specific antibodies from phage library.

In Chapter 5, the results of this study were overviewed and summarized. Our study demonstrated the usefulness of patient-derived antibody phage display library to isolate disease-related functional antibodies. Furthermore, the combination of biopanning and high throughput sequencing provide rapid identification system of specific antibodies from phage library.