

博士論文

(要約)

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

Isolation and Characterization of Antibodies to Disease-Specific Antigens using

Human scFv Phage Antibody Library

2017 年 9 月

鹿児島大学 大学院理工学研究科

博士後期課程 システム情報科学

大川 友里恵

目次

要旨	4
第 1 章 研究背景	3
1-1 抗体	4
1-1-1 抗体の一般的な特徴と構造	4
1-1-2 抗体の利用	5
1-1-3 自己抗体	5
1-2 ファージディスプレイ法	6
1-2-1 ファージディスプレイ法の原理	6
1-2-2 ファージディスプレイ法による抗体選別法	7
1-3 次世代シークエンサー	9
1-3-1 次世代シークエンサーの原理	9
1-3-2 次世代シークエンサーの抗体選別への応用	10
1-4 肝ガン抗原ルテラン	11
1-5 茶のしずく石鹼由来小麦アレルギー	14
第 2 章 ルテラン特異的抗体	15
2-1 目的	16
2-2 材料と方法	17
2-2-1 抗体ファージライブラリの構築	17
2-2-2 ルテラン特異的クローンの単離	22
2-2-3 ルテラン特異的クローンの ELISA による結合評価	24
2-2-4 抗ルテラン抗体の結合ドメインの決定	24
2-2-5 マウス抗ルテラン抗体との競合実験	25
2-2-6 ラミニン $\alpha 5$ 鎖に対するルテランの結合実験	25
2-2-7 細胞表面上のルテランに対する抗ルテラン抗体の結合評価	27
2-2-8 ルテラン発現細胞株の運動阻害実験	27
2-2-9 可溶型 scFv の発現	27
2-2-10 親和性解析	28
2-2-11 エピトープマッピング	29
2-3 結果	32
2-3-1 抗体ファージライブラリの構築	32

2-3-2	ルテランに対するバイオパニング	33
2-3-3	ルテラン特異的クローンの単離	34
2-3-4	ELISA による結合評価及び配列解析	34
2-3-5	ルテラン特異的抗体の機能解析	36
2-3-5-1	抗ルテラン抗体の結合ドメインの決定	36
2-3-5-2	マウス抗ルテラン抗体との競合実験	37
2-3-5-3	ラミニン $\alpha 5$ 鎖に対するルテランの結合阻害実験	38
2-3-5-4	抗ルテラン抗体の細胞表面上のルテランへの結合評価	38
2-3-5-5	ルテラン発現細胞株の運動阻害実験	39
2-3-5-6	可溶型 scFv の発現	40
2-3-5-7	可溶型 scFv の親和性解析	41
2-3-5-8	可溶型 scFv によるルテラン発現細胞株の運動阻害実験	42
2-3-5-9	エピトープマッピング	42
2-4	考察	45
第 3 章	次世代シーケンサーを利用した抗体選別法	47
3-1	目的	48
3-2	材料と方法	49
3-2-1	次世代シーケンサー解析用プライマー	49
3-2-2	ルテラン特異的抗体のバイオパニング	50
3-2-3	次世代シーケンサーによる網羅的解析	50
3-2-4	scFv 遺伝子の再構築	51
3-3	結果	53
3-3-1	解析用サンプルの調製	53
3-3-2	次世代シーケンサー解析結果	55
3-3-3	系統樹解析の比較	56
3-4	考察	57
第 4 章	次世代シーケンサーを利用した グルテン特異的抗体の単離	58
第 5 章	総括	59
引用文献	62
業績目録	66
謝辞	67

要旨

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ならびにこれにより得られた抗体の機能解析について、さらに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。

ファージディスプレイは、バクテリオファージの表面に任意のタンパク質やペプチドを他の分子と相互作用できる形で提示させる技術であり、抗体の抗原認識部位を提示させた抗体ファージディスプレイライブラリは、短期間で抗体の抗原認識部位を選別できるツールとして有用である。

近年、患者由来の抗体ファージライブラリを利用した疾患関連抗原に対する自己抗体の探索が行われ、同定された抗体は疾患の治療や診断および病態解明研究へ応用されることが期待されている。このような背景から、我々は肝ガンを標的とした自己抗体を探索するため、肝ガン患者由来の単鎖 Fv (single chain Fv; scFv) 抗体ファージライブラリを構築した。肝ガン患者由来の抗体ファージライブラリによる肝ガン抗原ルテランに対する 3 回のバイオパニングの結果、ルテラン特異的抗体が濃縮され、単クローン化後、ルテランに特異的な結合能を示すファージ抗体 C7 及び A7 を同定した。ファージ抗体 C7 はルテランの D2 ドメインを認識し、ファージ上に提示した状態でルテラン発現細胞株の運動を阻害した。このファージ抗体 C7 について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。

抗体ファージライブラリからの特異的抗体の選別は、通常バイオパニング後のクローンの結合スクリーニングによって行われるが、スクリーニングに供するクローンの数には限界がある。そこで、より効率的なファージ抗体の単離・同定法の確立を目指した

め、ヒト scFv 抗体ファージライブラリからの抗原特異的抗体の単離に、バイオパニングと次世代シーケンサー（New Generation Sequencing ; NGS）を組み合わせた手法を試みた。

以上の結果は、患者由来の抗体ファージライブラリが疾患特異的な抗体の探索に有用であること、さらにバイオパニングと次世代シーケンサーを組み合わせることにより、抗体ファージライブラリからより迅速に多様な抗体を単離することが可能であることを示している。本研究で確立した患者由来の抗体ライブラリから効率的に疾患関連抗原に対する抗体を効率的に単離する手法は、病気の診断や治療に向けた新しい機能性抗体を探索する有用な手法として期待される。

第 1 章 研究背景

1-1 抗体

1-1-1 抗体の一般的な特徴と構造

抗体（Antibody, Immunoglobulin, Ig）は、抗原を認識する高い特異性と親和性を持つ免疫に関わる糖タンパク質である。抗体は抗原を認識する部分である VH と VL の多様性、なかでも相補性決定領域（Complementarity - Determining Regions, CDR）の多様性により、多種多様な抗原を認識することができる（図 1-1）。

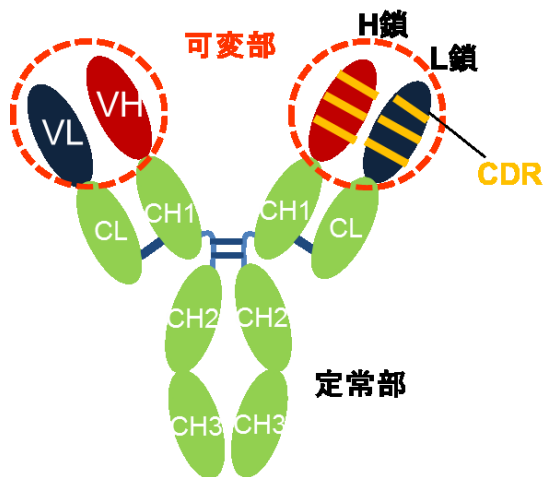


図 1-1 抗体の基本構造

1-1-2 抗体の利用

抗体は、医薬品、診断薬および分析試薬へ応用されており、抗体医薬品は抗体の特異性を利用した分子標的薬で、その実用化は 1970 年代のハイブリドーマ技術の確立によって急速に進展した¹。また、遺伝子組換え技術の発展などにより、改変された抗体による抗体医薬も増加している²。

1-1-3 自己抗体

抗体の多様性は、通常外来の抗原，非自己に対するものであるが，何らかの原因により自己の細胞や組織に攻撃性をもつ自己抗体が産生される場合がある。近年ガンに対する自己抗体がガン患者の体内で生産されているという報告がなされている³⁻⁵。また，自己抗体同定による疾患の原因解明⁶，診断への応用なども報告されている⁷⁻¹⁰。

1-2 ファージディスプレイ法

1-2-1 ファージディスプレイ法の原理

繊維状ファージ M13 は、ファージディスプレイ法を用いた抗体探索に用いられる代表的なファージである。ファージ表面に外来タンパク質を提示するには、コートタンパク質に融合タンパク質として発現提示する方法が一般的に用いられている。

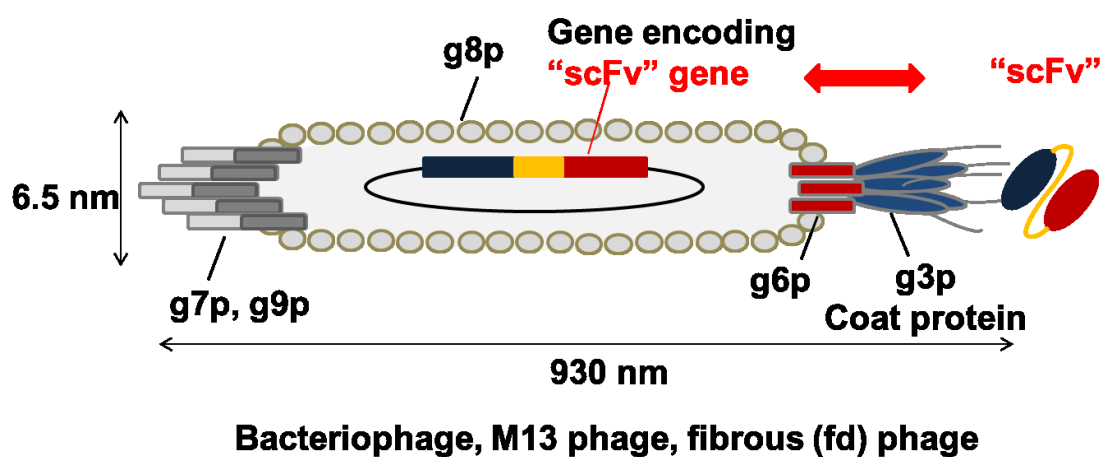


図 1-2 繊維状ファージの構造とファージディスプレイ

g3p の末端に融合タンパク質として外来タンパク質を提示すると同時に、外来タンパク質由来の遺伝子をファージ内に保有している。

1985 年に報告されたファージディスプレイ法は、新規抗体を探索する方法のひとつである¹¹。1990 年に G. Winter らが単鎖 Fv (single chain Fv, scFv) や Fab のファージ表面への提示が可能であることを報告して以来、ヒト抗体の探索技術としても発展してきた^{12,13}。多様な抗体断片を提示するファージ集団である「抗体ファージライブラリ」を用いることで、標的抗原に対して特異的なファージ抗体を獲得することができる(図 1-3)。

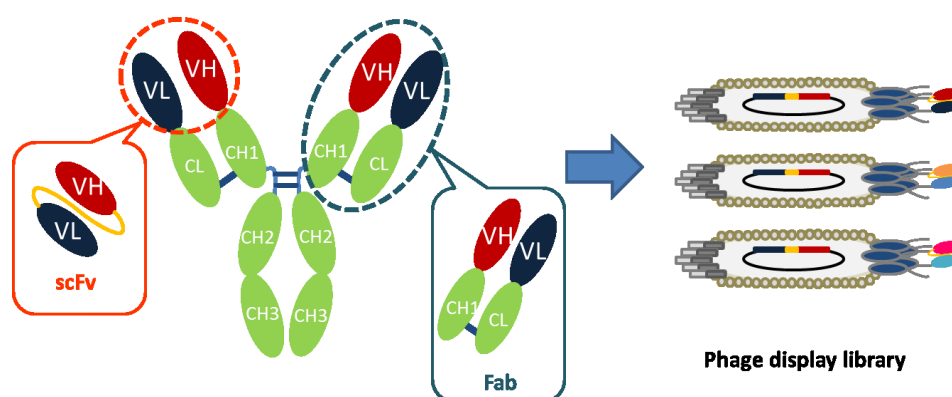


図 1-3 抗体ファージライブラリ

1-2-2 ファージディスプレイ法による抗体選別法

抗原特異的な抗体は、ライブラリを用いたバイオパニングにより単離することができる(図 1-4)。一般的なバイオパニングの手法では、固相化した抗原に対しファージライブラリを反応させ、抗原に結合するファージ抗体群を溶出する。溶出したファージを大腸菌に感染させることで、抗原に結合を示すファージ群を増幅することができる。これを 1 ラウンドとし、条件を変えながらラウンドを繰り返すことにより、より抗原に特異的な抗体を提示したファージ群を濃縮することができる。

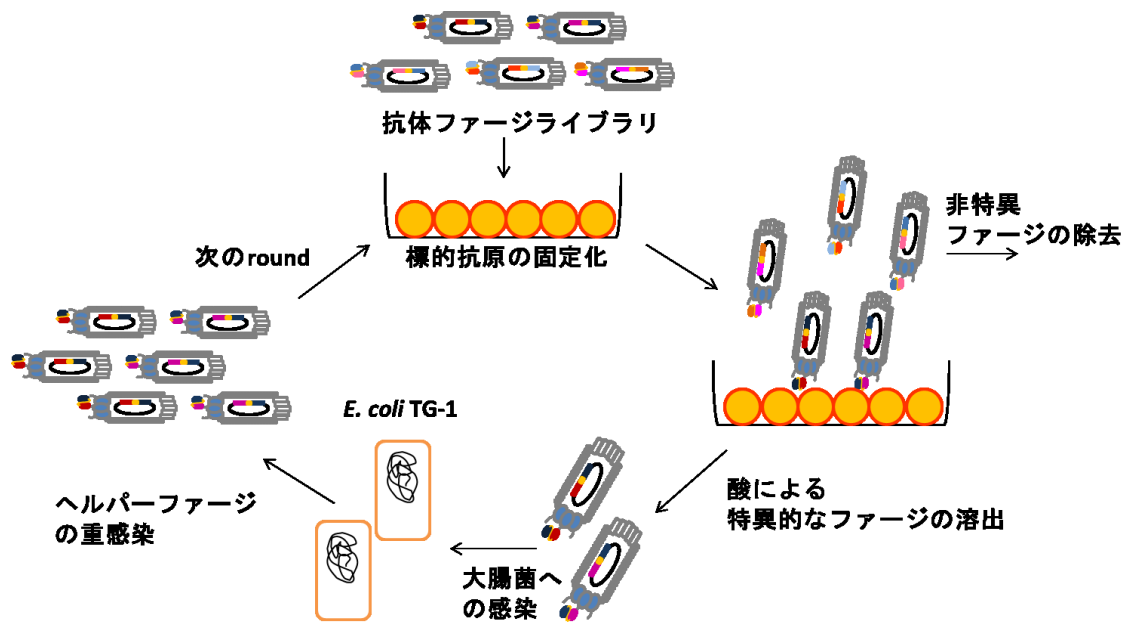


図 1-4 バイオパニングの概略図

1-3 次世代シーケンサー

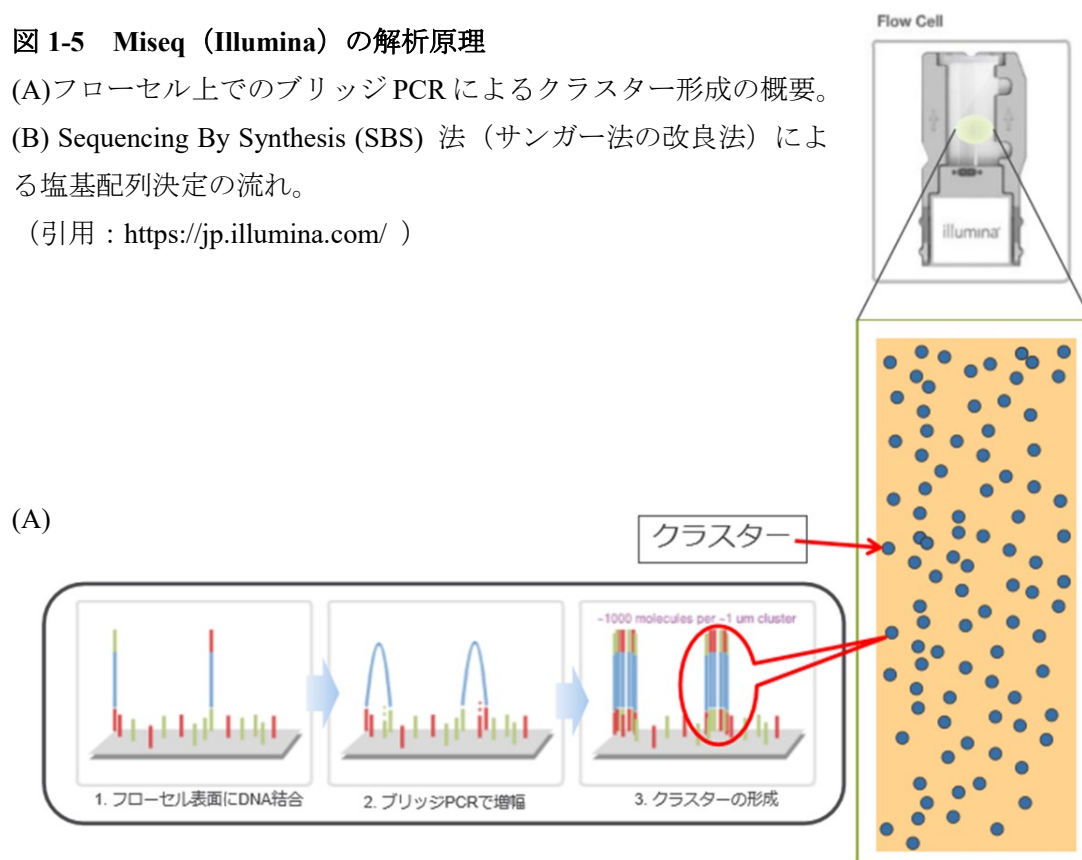
1-3-1 次世代シーケンサーの原理

1990 年からの国際ヒトゲノム計画を受けて、塩基配列解読技術は飛躍的な発展を遂げた。本研究では、Illumina 社のシーケンサーを使用した（図 1-5）。

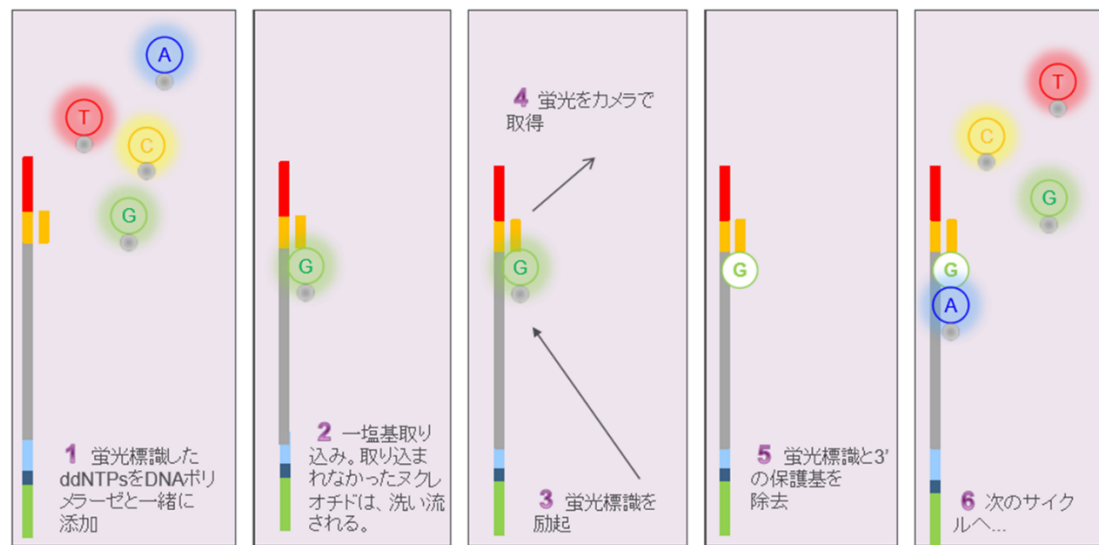
図 1-5 Miseq (Illumina) の解析原理

(A) フローセル上でのブリッジPCRによるクラスター形成の概要。
(B) Sequencing By Synthesis (SBS) 法（サンガー法の改良法）による塩基配列決定の流れ。

（引用： <https://jp.illumina.com/> ）



(B)



1-3-2 次世代シーケンサーの抗体選別への応用

近年、次世代シーケンサーを利用して遺伝子配列を網羅的に解析することにより、抗原特異的な抗体やペプチドの単離が試みられている¹⁴⁻¹⁶。その場合、ヒト抗体では VH と VL の組み合わせを特定するなどの工夫が必要となる。

1-4 肝ガン抗原ルテラン

肝ガンは、慢性肝炎や肝硬変を経て発症するガンであり¹⁷，肝ガンに対する自己抗体の同定は，肝ガンの治療や診断に有用である。

これまで，肝ガン細胞は異所性発現したラミニンに囲まれていることが示されている^{18,19}。ラミニンは基底膜の主要成分であり²⁰，正常な肝実質において存在しないが，未分化または分化型の肝ガンにおいて，ラミニン $\alpha 5$ 鎖が異所的に観察される²¹。このような背景から，ラミニン $\alpha 5$ 鎖のレセプターは肝ガン細胞のマーカーとして有用であると考えられる。

ルテラン（Lutheran blood group glycoprotein : Lu）は，ラミニン $\alpha 5$ 鎖に特異的に結合する受容体のひとつである（図 1-6）。ルテランは，免疫グロブリンスーパーファミリーに属しており²²，長年ルテラン血液型の抗原として，さらに鎌状赤血球症の塞栓形成に関与する分子として，研究されてきた²³⁻²⁷。

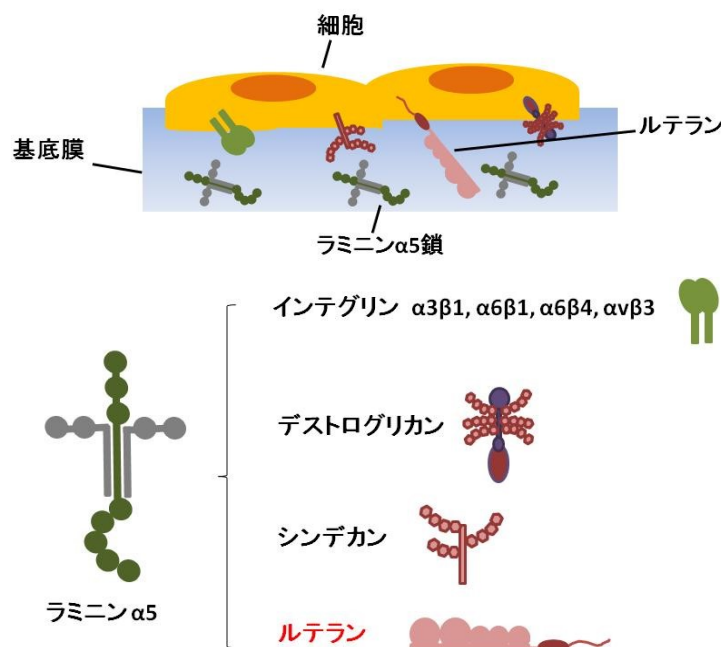


図 1-6 ラミニン $\alpha 5$ 鎖と受容体

ラミニン α 鎖はルテラン以外にもインテグリンやデストログリカン，シンデカン等の受容体と結合し，細胞の接着に関わる。

ルテランは5つの免疫グロブリン様のドメインを持ち、D3ドメインがラミニン $\alpha 5$ 鎖と結合する²⁸ (図1-7)。

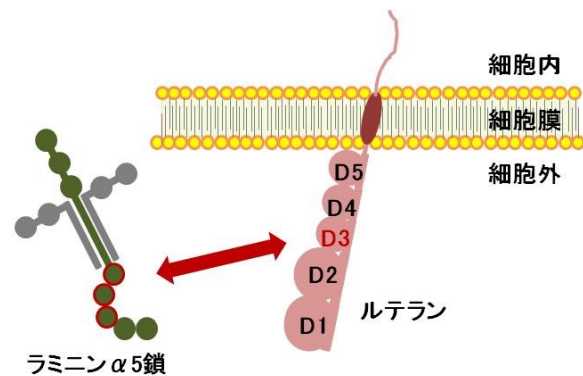


図1-7 ルテランとラミニン $\alpha 5$ 鎖の結合様式

これまでに、ルテランがいくつかのガン細胞表面に過剰発現していることが報告されている²⁹。図1-8に示す様に、ルテランの高発現が肝ガンにおいて観察されている。

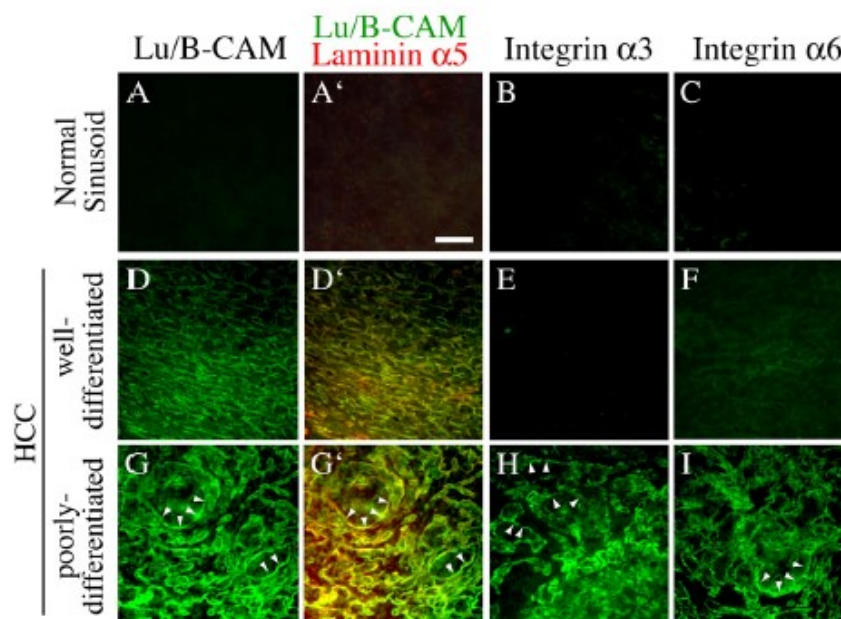


図1-8 肝ガン患者由来の組織染色

上段のパネルは正常な肝シヌソイド，中段のパネルは高分化している肝ガン，下段のパネルは低分化の肝ガンを示しており，ルテランは正常な肝シヌソイドでは観察されないが，肝ガン細胞で高発現している。(引用文献30より引用)

これまでに、ルテランがガンの浸潤および転移に関与する可能性が示されてきた²⁰。
ルテランに対する特異的抗体が単離されれば、肝ガンを初めとするガンの治療や診断への応用が期待される。

1-5 茶のしずく石鹼由来小麦アレルギー

(非公開)

第 2 章 ルテラン特異的抗体

2-1 目的

本研究では、肝ガン患者由来の抗体ファージライブラリを構築し、肝ガンに対する自己抗体の探索を行った。肝ガン抗原ルテランを用い、患者由来または健常者由来の抗体ファージライブラリから、バイオパニングによりルテラン特異的ファージ抗体の単離し、機能解析及び有用性を検討した。

2-2 材料と方法

2-2-1 抗体ファージライブラリの構築

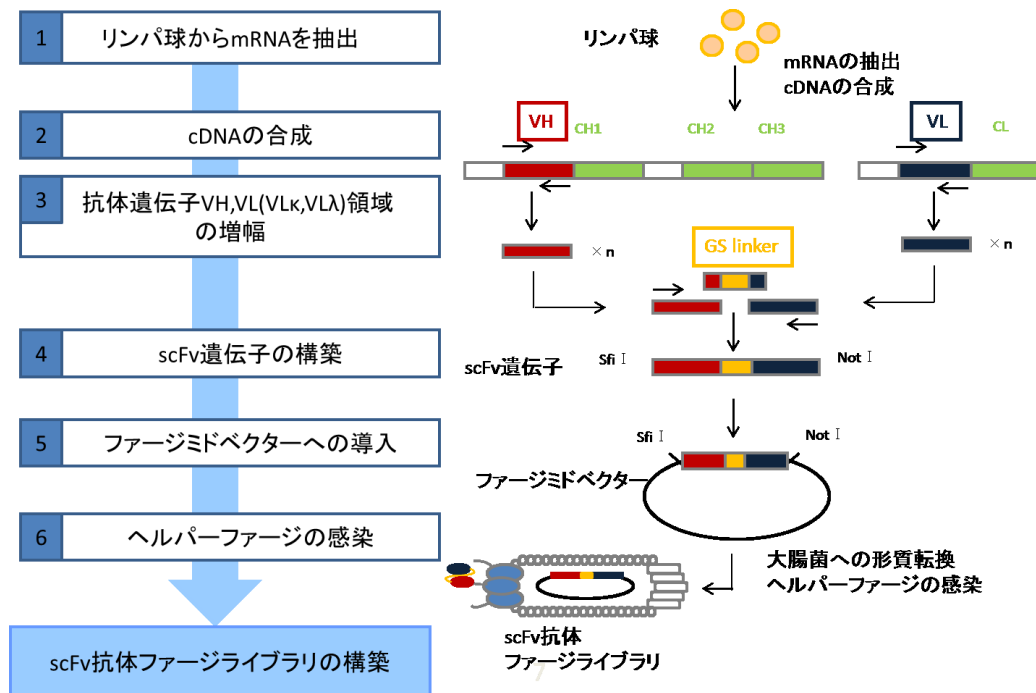


図 2-1-1 scFv 抗体ファージライブラリ構築の概要図

肝ガン患者の組織（5人プール）、血液（4人プール）由来の total RNA は、シンガポール国立ガンセンターNational Cancer Centre Singapore より供与された。

健康者（20人プール）は、鹿児島大学大学院医歯学総合研究科教授・有馬直道 先生のご協力のもと、健康な日本人 20 人から 10 mL の末梢血を採取したものをソースとした。末梢血についてはリンパ球分離溶液 1077（Wako）を用いてリンパ球を回収し、RNAiso Plus（TAKARA）を用いて Total RNA を抽出した。

cDNA は SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR（ThermoFisher Scientific）

の Oligo dT primer を用いて合成した。

VH, VL κ , VL λ を PCR で増幅するためのプライマーは, IMGT (International ImMunoGeneTics information system, <http://www.imgt.org>) データベースを参考に設計した (表 2-1-1, 2-1-2)。まず, Total RNA 量 50 ng 相当の cDNA をテンプレートに 1st PCR を行った。

表 2-1-1 設計したヒト抗体遺伝子増幅用 1st PCR プライマーセット

	No	VH	VL λ	VL κ
F primer	1	IGHV1-2 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTC	IGLV1-36 CAGTCTGTGCTGACTCAGCC	IGKV1-5 GACATCCAGATGACCCAG
	2	IGHV1-3 CAGGTCCAGCTTGTGCAGTC	IGLV1-40 CAGTCTGTGCTGACGCAGCC	IGKV1-6 GCCATCCAGATGACCC
	3	IGHV1-18 CAGGTTCAGCTGGTGCAGTC	IGLV1-41 CAGTCTGTGTTGACGCAGCC	IGKV1-8 GCCATCCGGATGACC
	4	IGHV1-24 CAGGTCCAGCTGGTACAGTC	IGLV2-8 CAGTCTGCCCTGACTCAGCC	IGKV1D-8 GTCATCTGGATGACCCAG
	5	IGHV1-45 CAGATGCAGCTGGTGCAGTC	IGLV2-33 CAATCTGCCCTGACTCAGCC	IGKV1-9 GACATCCAGTTGACCCAG
	6	IGHV1-58 CAAATGCAGCTGGTGCAGTCTG	IGLV3-1 TCCTATGAGCTGACTCAGCCAC	IGKV1-13 GCCATCCAGTTGACCC
	7	IGHV2-26 CAGGTACACCTTGAAGGAGTCTG	IGLV3-10 TCCTATGAGCTGACACAGCCAC	IGKV1D-17 AACATCCAGATGACCCAGTC
	8	IGHV3-7 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTC	IGLV3-19 TCTTCTGAGCTGACTCAGGACC	IGKV1D-42 GACATCCAGATGATCCAGTC
	9	IGHV3-9 GAAGTGCAGCTGGTGGAGTC	IGLV3-21 TCCTATGTGCTGACTCAGCCAC	IGKV2-24 GATATTGTGATGACCCAGAC
	10	IGHV3-11 CAGGTGCAGCTGGTGGAGTC	IGLV3-22 TCCTATGAGCTGACACAGCTACC	IGKV2-28 GATATTGTGATGACTCAGTCTC
	11	IGHV3-16 GAGGTACAACCTGGTGGAGTCTG	IGLV3-25 TCCTATGAGCTGATGCAGCCAC	IGKV2-30 GATGTTGTGATGACTCAGTC
	12	IGHV3-23 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTC	IGLV3-27 TCCTATGAGCTGACACAGCCATC	IGKV3-7 GAAATTGTAATGACACAGTCTCC
	13	IGHV4-4 CAGGTGCAGCTGCAGGAGTC	IGLV3-32 TCCTCTGGGCCAACTCAGG	IGKV3-11 GAAATTGTGTTGACACAGTCTC
	14	IGHV4-30-2 CAGCTGCAGCTGCAGGAG	IGLV5-37 CAGCCTGTGCTGACTCAGC	IGKV3-15 GAAATAGTGTGACGCAGTC
	15	IGHV4-34 CAGGTGCAGCTACAGCAGTG	IGLV6-57 AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTC	IGKV3-20 GAAATTGTGTTGACGCAGTC
R primer	1	IGHJ1*01 TGAGGAGACGGTGACCAGG	IGLJ1*01 TAGGACGGTGACCTTGGTCC	IGKJ1*01 TTTGATTCCACCTTGGTCC
	2	IGHJ2*01 TGAGGAGACAGTGACCAGGG	IGLJ2*01 TAGGACGGTCAGCTTGGTCC	IGKJ2*01 TTTGATCTCCAGCTTGGTCC
	3	IGHJ3*01 TGAAGAGACGGTGACCATTGTCC	IGLJ4*01 TAAATGATCAGCTGGGTTCTCTCC	IGKJ3*01 TTTGATATCCACTTTGGTCCC
	4	IGHJ4*01 TGAGGAGACGGTGACCGTG	IGLJ5*01 TAGGACGGTCAGCTCGGTCC	IGKJ5*01 TTTAATCTCCAGTCGTGTCC
	5	IGHJ4*03 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTC	IGLJ6*01 GAGGACGGTCACCTTGGTG	
	6	IGHJ6*01 CAGGTCCAGCTTGTGCAGTC	IGLJ7*01 GAGGACGGTCAGCTGGGTG	

次に 2nd PCR として、VH, VL の両端に別々の制限酵素サイトの付加を行った。

表 2-1-2 使用したヒト抗体遺伝子増幅用 2nd PCR プライマーセット

	No	VH	VL λ	VL κ
F primer	1	IGHV1-2 TGCTCTCTCGCAGCCAGCGCGCCATGGCTCAGGTGC AGCTGTGTCAGTGC	IGLV1-36 GGTGGCTCTGGGTGCGACGGGATCGCAGTCTG TGCTGATCGACGC	IGKV1-5 GGTGGCTCTGGGTGCGACGGGATCGGACATCC GATGACAGCTCTC
	2	IGHV1-3 TGCTCTCTCGCGCCAGCGCGGCCATGGCTCAGGTGC AGCTTGTGTCAGTGC	IGLV1-40 GGTGGCTCTGGGTGCGACGGGATCGCAGTCTG TGCTGACGACGACC	IGKV1-6 GGTGGCTCTGGGTGCGACGGGATCGGCCATCC GATGACCAAGCTC
	3	IGHV1-18 TGCTCTCTCGCGCCAGCGCGGCCATGGCTCAGGTTC AGCTGGTGTGCACTG	IGLV1-41 GGTGGCTCTGGGTGCGACGGGATCGCAAGTCTG TGTTGACGACGACC	IGKV1-8 GGTGGCTCTGGGTGCGACGGGATCGGCCATCC GATGACCAAGTCTC
	4	IGHV1-24 TGCTCTCTCGCGAGCCAGCGCGCCATGGCTCAGGTCC AGCTGTGTCAGTGC	IGLV1-28 GGTGGCTCTGGGTGCGACGGGATCGCAGTCTG TGCTGATCGACGACC	IGKV1-8-3 GGTGGCTCTGGGTGCGACGGGATCGGTCATCTC GATGACCAAGCTCTC
	5	IGHV1-45 TGCTCTCTCGCGCCAGCGCGGCCATGGCTCAGATGC AGCTGGTGTGCACTG	IGLV2-33 GGTGGCTCTGGGTGCGACGGGATCGCAATCTG CCCTGACTCAGCC	IGKV1-9 GGTGGCTCTGGGTGCGACGGGATCGGACATCC GATGACCAAGTCTC
	6	IGHV1-58 TGCTCTCTCGCGCCAGCGCGGCCATGGCTCAAATGC AGCTGGTGTGCACTGTG	IGLV3-1 GGTGGCTCTGGGTGCGACGGGATCGTCTATAT AGCTGAATCAGCAC	IGKV1-13 GGTGGCTCTGGGTGCGACGGGATCGGCCATCC GTTGACCAAGTCTC
	7	IGHV2-26 TGCTCTCTCGCGAGCCAGCGCGCCATGGCTCAGGTCA CTGTGAAGGAGCTGTG	IGLV10-10 GGTGGCTCTGGGTGCGACGGGATCGTCTATAT AGCTGAATCAGCAC	IGKV1D-1 GGTGGCTCTGGGTGCGACGGGATCGAACATCC GATGACCAAGTCTC
	8	IGHV3-7 TGCTCTCTCGCGCCAGCGCGGCCATGGCTGAGGTGC AGCTGGTGTGGAAGTC	IGLV3-19 GGTGGCTCTGGGTGCGACGGGATCGTCTTCTG AGCTGACTCAGGACC	IGKV1D-4 GGTGGCTCTGGGTGCGACGGGATCGGACATCC GATGACCAAGTCTCTC
	9	IGHV3-9 TGCTCTCTCGCGCCAGCGCGGCCATGGCTGAAGTGC AGCTGGTGTGGAAGTC	IGLV3-21 GGTGGCTCTGGGTGCGACGGGATCGTCTATAT TGCTGACTCAGGCAC	IGKV2-24 GGTGGCTCTGGGTGCGACGGGATCGGATATTC GATGACCAAGACTCCAC
	10	IGHV3-11 TGCTCTCTCGCGAGCCAGCGCGCCATGGCTCAGGTGC AGCTGTGTCAGTGC	IGLV3-22 GGTGGCTCTGGGTGCGACGGGATCGTCTATAT AGCTGAATCAGCAC	IGKV2-28 GGTGGCTCTGGGTGCGACGGGATCGGATATTC GATGACCAAGACTCCAC
	11	IGHV3-16 TGCTCTCTCGCGCCAGCGCGGCCATGGCTGAGGTATC AACTGGTGTGAGTCTG	IGLV3-26 GGTGGCTCTGGGTGCGACGGGATCGTCTATAT AGCTGATGACGACAC	IGKV2-30 GGTGGCTCTGGGTGCGACGGGATCGGATGTTTG GATGACTCAGTCTCAC
R primer	1	IGHV3-23 TGCTCTCTCGCGCCAGCGCGGCCATGGCTGAGGTGC AGCTGGTGTGGAAGTC	IGLV3-27 GGTGGCTCTGGGTGCGACGGGATCGTCTATAT AGCTGACGACGACCATC	IGKV3-7 GGTGGCTCTGGGTGCGACGGGATCGGAAATTC AATGACACAGACTCCACC
	2	IGHV3-23 TGCTCTCTCGCGCCAGCGCGGCCATGGCTCAGGTGC AGCTGTCAGAGTGC	IGLV3-32 GGTGGCTCTGGGTGCGACGGGATCGCTCTGTG GCCAATCTCAGG	IGKV3-11 GGTGGCTCTGGGTGCGACGGGATCGGAAATTC GTTGACACACTCTCAGC
	13	IGHV4-4 TGCTCTCTCGCGCCAGCGCGGCCATGGCTCAGGTCTG AGCTGACGAGGAG	IGLV5-37 GGTGGCTCTGGGTGCGACGGGATCGAGCTGTG GCTGACTCAGC	IGKV3-15 GGTGGCTCTGGGTGCGACGGGATCGGAAATAG GATGACGCAAGTCTCCAG
	14	IGHV4-30-1 TGCTCTCTCGCGCCAGCGCGGCCATGGCTCAGGTGC AGCTACAGCAGGTG	IGLV8-57 GGTGGCTCTGGGTGCGACGGGATCGAATTTTA TGCTGACTCAGGCCCACTC	IGKV3-20 GGTGGCTCTGGGTGCGACGGGATCGGAAATTC GTTGACGCAAGTCTCAG
	1	IGHJ1*01 GCCTCCACCACTCGAGACGGTGACACGGGTG	IGLJ1*01 TGATGATGTGGCGCGCGTAGGACGGTGACCT TGCTCTC	IGKJ1*01 TGATGATGTGGCGCGCGTTTGATTTCCACCTT GTCTCTCTTG
	2	IGHJ2*01 GCCTCCACCACTCGAGACAGTGACCAAGGTGC	IGLJ2*01 TGATGATGTGGCGCGCGTAGGACGGTGACCT TGCTCTC	IGKJ2*01 TGATGATGTGGCGCGCGTTTGATTTCCACCTT GTCTCTC
	3	IGHJ3*01 GCCTCCACCACTCGAGACGGTGACCAATTTGCC	IGLJ4*01 TGATGATGTGGCGCGCGTAAATATGACAGT TGCTCTCTC	IGKJ3*01 TGATGATGTGGCGCGCGTTTGATTTCCACCTT GTCTCCAGGG
	4	IGHJ4*01 GCCTCCACCACTCGAGACGGTGACCAAGGTTC	IGLJ5*01 TGATGATGTGGCGCGCGTAGGACGGTGACCT CGCTCTC	IGKJ4*01 TGATGATGTGGCGCGCGTTTGATTTCCACCTT GTCTCTC
	5	IGHJ4*03 GCCTCCACCACTCGAGACGGTGACCAAGGTTC	IGLJ6*01 TGATGATGTGGCGCGCGTAGGACGGTGACCT TGCTCTC	IGKJ5*01 TGATGATGTGGCGCGCGTTTAAATTTCCAGTGC GTCTCTCTTG
	6	IGHJ6*01 GCCTCCACCACTCGAGACGGTGACCGTGTCTC	IGLJ7*01 TGATGATGTGGCGCGCGTAGGACGGTGACCT TGCTCTC	

VH, VL を GS linker でつなげるため Overlapping PCR を行った。Overlapping PCR に用いたプライマーと GS linker の情報について図 2-1-2 にまとめた。構築した scFv 遺伝子はゲル抽出により精製した。

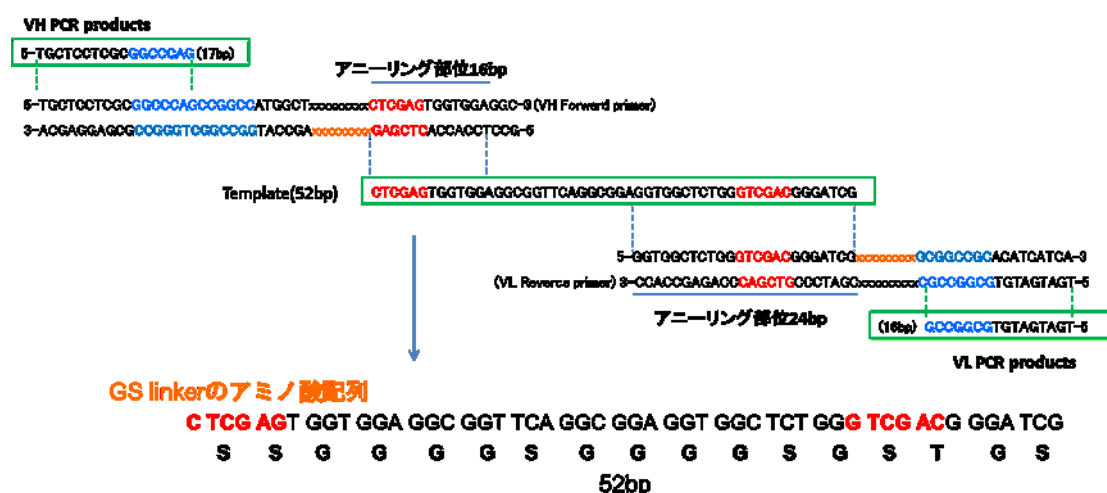


図 2-1-2 Overlapping PCR に用いたプライマーと GS linker

本研究では、ファージミドベクターとして pKSTV02 (H7/pTV) に Ocher stop codon 領域を導入したものを使用した³⁰ (図 2-1-3)。

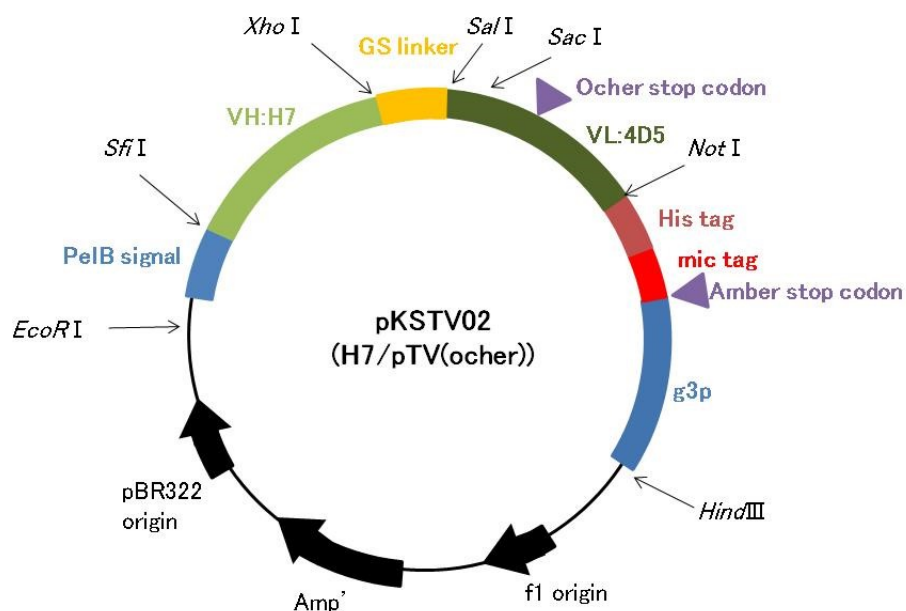


図 2-1-3 pKSTV02 (H7/pTV (ocher)) のベクターマップ

図 2-1-4 に示すように 2 回の制限酵素処理とライゲーションを組み合わせた手法を用いた (図 2-1-4)。最終的に得たライゲーション産物を精製後、*Escherichia coli* TG-1 electrocompetent cells (Lucigen) に形質転換し、プレート上に撒いた後のコロニーをカウントすることによって、ライブラリのダイバシティ (多様性) を算出した。

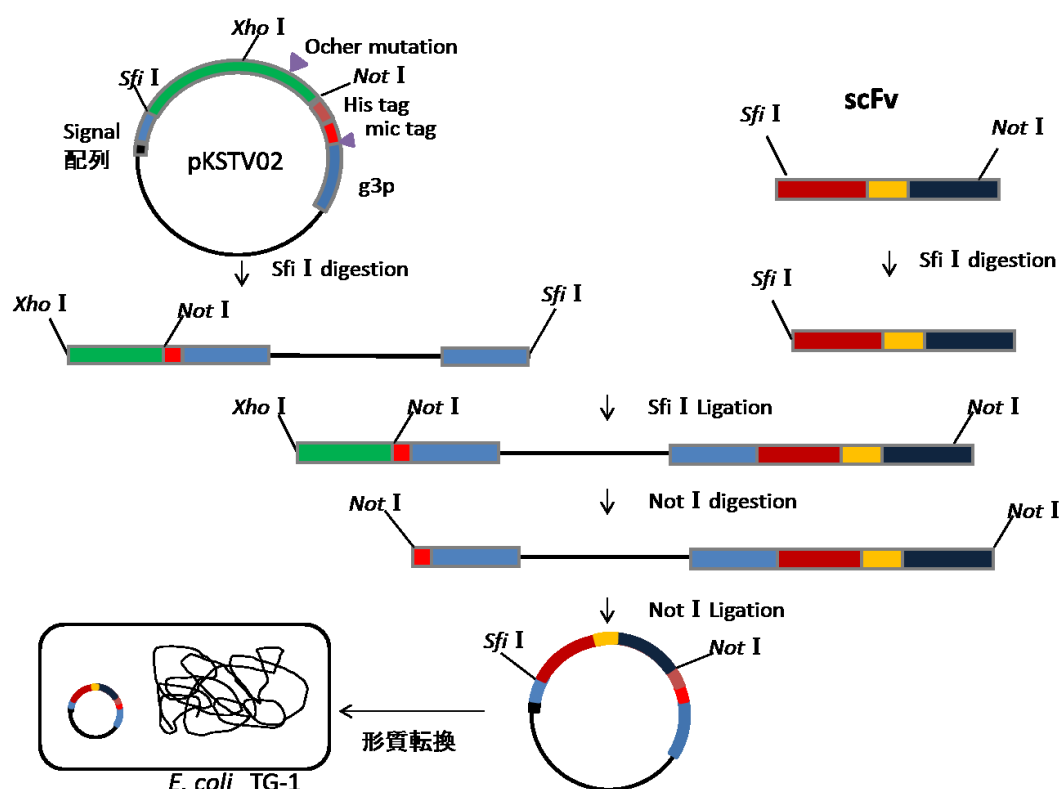


図 2-1-4 制限酵素処理・ライゲーションから形質転換までの概略図
制限酵素処理を 2 段階に分けて行うことによりライゲーション効率を改善した。

形質転換後の大腸菌は、長型の 2TYAG プレート（2% glucose, 100 μ g/mL ampicillin を含む 2TY agar （1.6% tryptone, 1% yeast extract, 86 mM NaCl, 1.5% agar））に播き，37°C，オーバーナイト（O/N）で培養した。プレートから回収した大腸菌を再度増殖させ，M13K07 helper phage （ThermoFisher Scientific）を MOI=10 で感染させた。遠心分離後，2TYAK （100 μ g/mL ampicillin, 50 μ g/mL kanamycin を含んだ 2TY medium）でペレットを懸濁し，37°C，O/N で培養した。遠心分離して上清を回収し，0.2 容量の 2.5 M NaCl / 20% （w/v） polyethylene glycol 6000 （PEG 6000）と混合した。静置後，遠心分離で回収し，1 mL の phosphate-buffered saline （PBS）で溶解したものをバイオパニングに使用した。

2-2-2 ルテラン特異的クローンの単離

ELISA plate に 200 μL のルテラン-His (0.5 $\mu\text{g/mL}$) /0.1 M NaHCO_3 (pH8.3) を 4°C, O/N で固定化した。ブロッキングは 0.5% BSA を用いた。ウェルはブロッキング後のみ 0.5% BSA で、その他は 0.1% Tween-20 を含んだ PBS (PBST) で洗浄した。1.0 $\times 10^{10}$ (cfu) のファージを 0.5% BSA のみを固定化したウェル (3 ラウンドでは IgA を固定化したウェル) に加え 30 分 2 回反応させたのち、ルテラン-His を固定化したウェルに移し、1 時間、室温で反応させた。PBST で 5 回洗浄した後、300 μL の Glycine-HCl (pH2.0) で溶出し、25.2 μL の Tris-HCl (pH 9.1) で中和した。溶出したファージは *E. coli* TG-1 に感染させ、2TYAG プレートに播き、30°C, O/N で培養した。回収した O/N culture を 2TYAG medium で再度増殖させ、M13KO7 helper phage を MOI=5 で加え感染させた。遠心分離後、2TYAK でペレットを溶解し、37°C, O/N で培養した。その後、回収した上清に 0.2 容量の 2.5 M NaCl / 20% (w/v) polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) を混合することで、得られたファージを次のラウンドに用いた。1, 2 ラウンドでは 0.5% BSA を、3 ラウンドでは 5% Skim milk をブロッキング溶液として用いた。ルテラン-His は 1 ラウンドで 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 2 ラウンドと 3 ラウンドでは 0.25 $\mu\text{g/mL}$ を使用し、標的抗原へのファージ反応後の洗浄は、1 ラウンドごとに 5 回ずつ回数を増加させた。

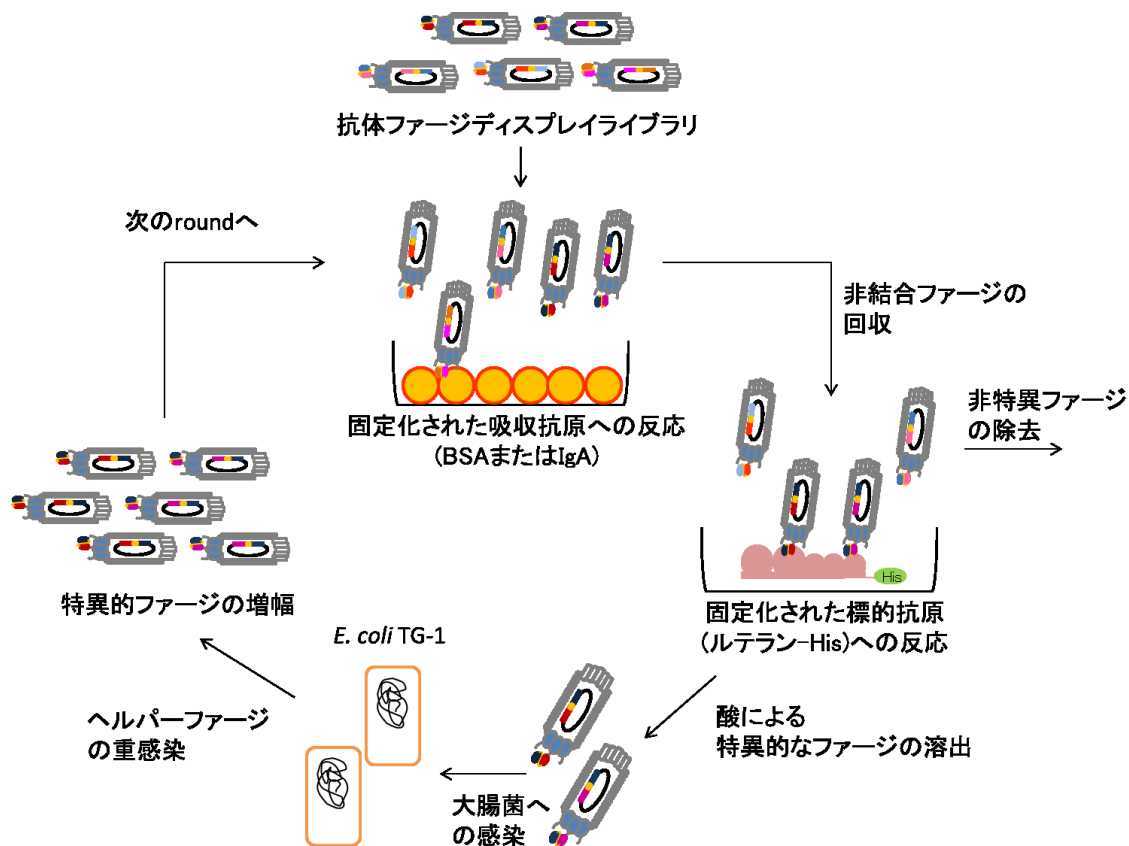


図 2-1-5 ルテランに対するバイオパニングの概要図

ルテランに対する濃縮が確認された肝ガン患者血液由来のライブラリ 3 ラウンドのファージ群を大腸菌に感染させ、コロニーを形成させた。無作為にピックアップし、1 mL の 2TYAG で 37°C, O/N で培養後、3 mL の 2TYAG に O/N culture を一部混合し、1.5 時間培養後に MOI=5 で M13KO7 helper phage を感染させた。遠心分離後、ペレットを 3 mL の 2TYAK で溶解し、37°C, O/N で増幅後遠心し、回収した上清に対して 0.2 容量の 2.5 M NaCl / 20% (w/v) polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) を混合することで、単クローンファージを獲得した。

2-2-3 ルテラン特異的クローンの ELISA による結合評価

ELISA plate に 0.1 M NaHCO₃ (pH 8.3) で希釈した抗原 (1 µg/mL) を 4°C, O/N もしくは 2 時間、室温で固定化した。ブロッキング溶液は 0.5% BSA を用いた。ファージ約 1×10^9 (cfu) を各ウェルに加え、1 時間、室温で反応させた。検出抗体としては、ビオチン化 Anti-Filamentous Phages M13 fd F1 antibody [B62-FE2] (Abcam) と Streptavidin-HRP コンジュゲート (Vector) を 1/4000 希釈で溶解し、プレインキュベートしたものを用いた。検出抗体の反応を 1 時間、室温で行った後、TMB solution (CALBIOCHEM) で検出を行い、1 N HCl で検出を停止した。吸光度はマイクロプレートリーダー (Bio-Rad) で測定した。

2-2-4 抗ルテラン抗体の結合ドメインの決定

抗体の結合ドメインの決定には、ルテランの組換えタンパク質シリーズを用いた。組換えタンパク質の作製には Human IgG₁ Fc 発現ベクターを用いた³¹。変異型ルテランをコードした cDNA は ThermoFisher Scientific と ATCC から購入したヒトまたはマウスルテランの完全長 cDNA を元に PCR によって作製し、Human IgG₁ Fc 発現ベクターにクローニングした^{28,32}。Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientific) を用いて、発現ベクターを HEK293 細胞に導入し、Zeocin (ThermoFisher Scientific) でクローンを選択した。選択された細胞を 10% FBS を含む DMEM (Wako) でコンフルエントになるまで培養し、さらに無血清の DMEM で 4 日間培養した。培養液を回収し、遠心分離後、80% 飽和アンモニウム塩によって沈殿させた。この沈殿を回収し、PBS (-) に対して透析を行った。精製には 30 倍に濃縮された培養液を用いた。組換えタンパク質は、Protein A sepharose (GE Health Care Bio-Science) を用いて精製され、溶出画分は PBS (-) で透析した。精製した組換えタンパク質は還元条件下で SDS-PAGE を行い確認した。

結合ドメインを決定するために構築した組換えルテランのシリーズを以下に示す (図 2-1-6)。

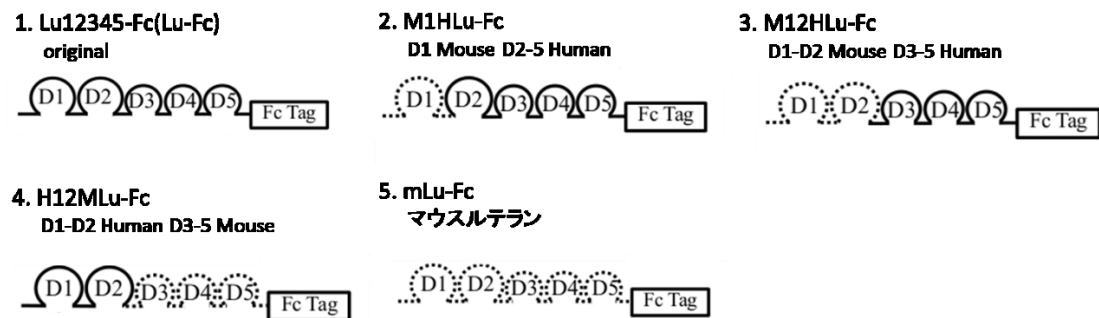


図 2-1-6 ドメイン決定のための組換えルテランのシリーズ

ドメイン決定のため、ELISA で結合性を評価した。組換えルテランを固定化したウェルに対し、ファージ抗体もしくは可溶型 scFv を添加し、反応をビオチン化 Anti-Filamentous Phages M13 fd F1 antibody [B62-FE2] (Abcam) と Streptavidin-HRP コンジュゲート (VECTOR) を 1/4000 希釈で溶解しプレインキュベートしたもの、もしくは Anti-His-tag-Biotin monoclonal antibody (MBL) と Streptavidin-HRP コンジュゲート (VEC) を 1/4000 希釈で溶解しプレインキュベートしたものを用いて検出した。

2-2-5 マウス抗ルテラン抗体との競合実験

マウス抗ルテラン抗体 (mAb87207, R&D Systems) 0, 50, 100 ng とルテラン特異的ファージ抗体を混合し、ルテラン-His を固定化したウェルに加えた。検出抗体としては、ビオチン化 Anti-Filamentous Phages M13 fd F1 antibody [B62-FE2] (Abcam) と Streptavidin-HRP コンジュゲート (VEC) を 1/4000 希釈で溶解しプレインキュベートしたものを用いた。

2-2-6 ラミニン $\alpha 5$ 鎖に対するルテランの結合実験

10-12 週齢の C57BL/6J 雄マウス (日本チャールスリバー) 腎臓を用いて凍結切片を

作製した。組織切片に 10% NGS (Normal Goat Serum, Millipore) を含む 1% BSA/PBS (-) を添加しブロッキングした。その切片に、1 または 3 $\mu\text{g/mL}$ のルテラン-Fc と 10 mg/mL の抗体または $5\sim 12\times 10^{11}$ (cfu/mL) のファージ抗体を混合した溶液を添加しインキュベーションし、結合したルテラン-Fc を Alexa488 で標識された anti-human IgG antibody (ThermoFisher Scientific) で検出した。ラミニン $\alpha 5$ 鎖は Anti-laminin $\alpha 5$ 鎖ポリクローナル抗体を用い、Alexa594 で標識された Anti-rabbit IgG antibody (ThermoFisher Scientific) で検出した。数回洗浄後、組織切片を封入し、染色を Biozero (Keyence) を用いて観察した。結合した組換えタンパクとラミニン $\alpha 5$ の蛍光強度は、BZ-analyzer (Keyence) を用いて測定した。

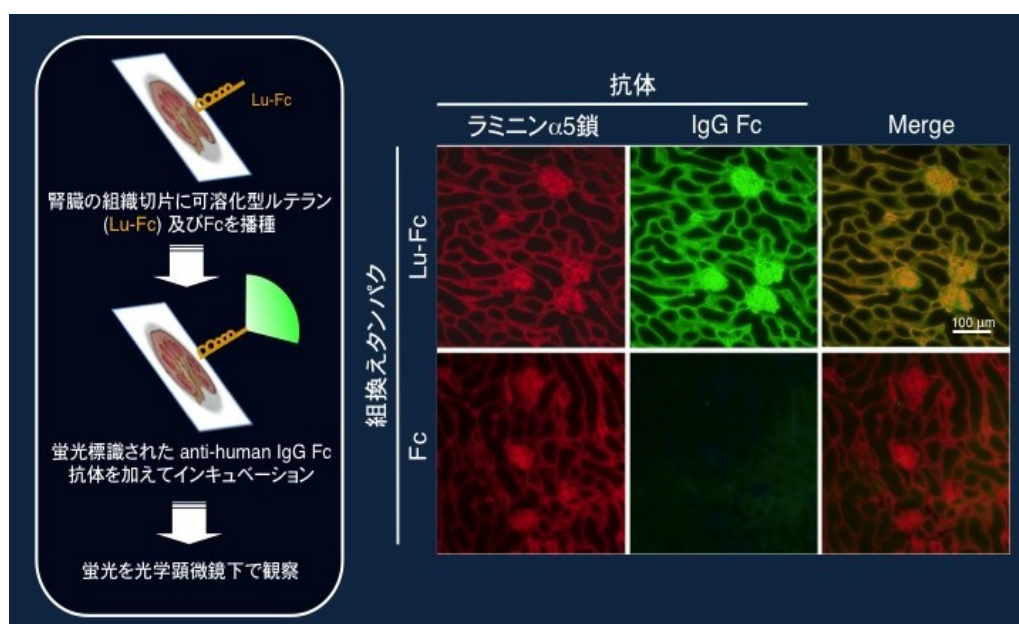


図 2-1-7 組織上におけるラミニン $\alpha 5$ 鎖とルテランの結合実験
(引用：東京薬科大学大学院薬学研究科 2009 年度 三輪隆博 修士学位論文)

この実験の概要を、図 2-1-7 に示している。ラミニン $\alpha 5$ 鎖は Alexa594 により赤色の蛍光として、そこに結合したルテラン-Fc は Alexa488 により緑色の蛍光として観察される。

2-2-7 細胞表面上のルテランに対する抗ルテラン抗体の結合評価

フローサイトメトリーによる結合評価を行うため、細胞を 0.1% BSA と 1 mM EDTA を含む PBS で懸濁し、その細胞懸濁液にファージ抗体を混合して反応させた。細胞を洗浄後、ビオチン化 anti-Filamentous Phage M13 fd F1 antibody (Abcam) と反応し、結合した抗体を Alexa488-labeled streptavidin (ThermoFisher Scientific) で検出した。

2-2-8 ルテラン発現細胞株の運動阻害実験

無血清の DMEM に懸濁した A549 細胞は、ラミニン-511 (0.8 nM) を固定化した 35-mm dishes (Nunc) に播種した。2 時間後、細胞運動を Biozero (Keyence) でモニタリングした。細胞運動は、BZ-Viewer と BZ-Analyzer (Keyence) を用いて 10 分間隔で撮影した。細胞核の位置を 8 時間追跡し、速度を $\mu\text{m}/\text{時間}$ で Image-J を用いて算出した。

2-2-9 可溶型 scFv の発現

ルテラン特異的な scFv を提示したファージを *E. coli* HB2151 に感染させ、コロニーを形成させた。3 mL の 2TYAG にコロニーをピックアップし、O/N culture 300 μL を 3 mL の 2TYAG に加え、OD600=0.6~0.8 まで増幅した。遠心後に上清を除去し、3 mL の 2TYAI (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicillin と 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を含む) でペレットを懸濁し、37°C, O/N で発現させた。150 μL の 1 mM EDTA/PBS でペレットを懸濁し、氷上 10 分静置後遠心し、上清を回収してこれを periplasm 画分とした。

得られた可溶型 scFv の特異性評価の基本的な条件は 2-2-3 項で述べた条件と同様である。検出抗体として、Anti-His-tag-Biotin monoclonal antibody (MBL) と Streptavidin-HRP コンジュゲート (VEC) を 1/4000 希釈で溶解しプレインキュベートしたものを用いた。scFv の発現は SDS-PAGE で確認した。

2-2-10 親和性解析

親和性解析には、Biacore T200 system (GE Healthcare) を用いた。Running buffer として HBS-EP buffer (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Tween-20) を用い、25°C、流速 50 μ L/分で行った。ルテラン-Fc をアミノカップリングで CM5 sensor chip (GE) に 500 response units (RU) で固定化した。scFv は HBS-EP buffer を用いて異なる濃度で希釈し、低濃度のものから 2 分反応させた。

2-2-11 エピトープマッピング

エピトープマッピングに用いた組換えルテランは、2-2-4 項に述べた方法を用いて作製した。詳細なエピトープマッピングに用いた組換えルテランについて図 2-1-8 及び図 2-1-9 にまとめた。

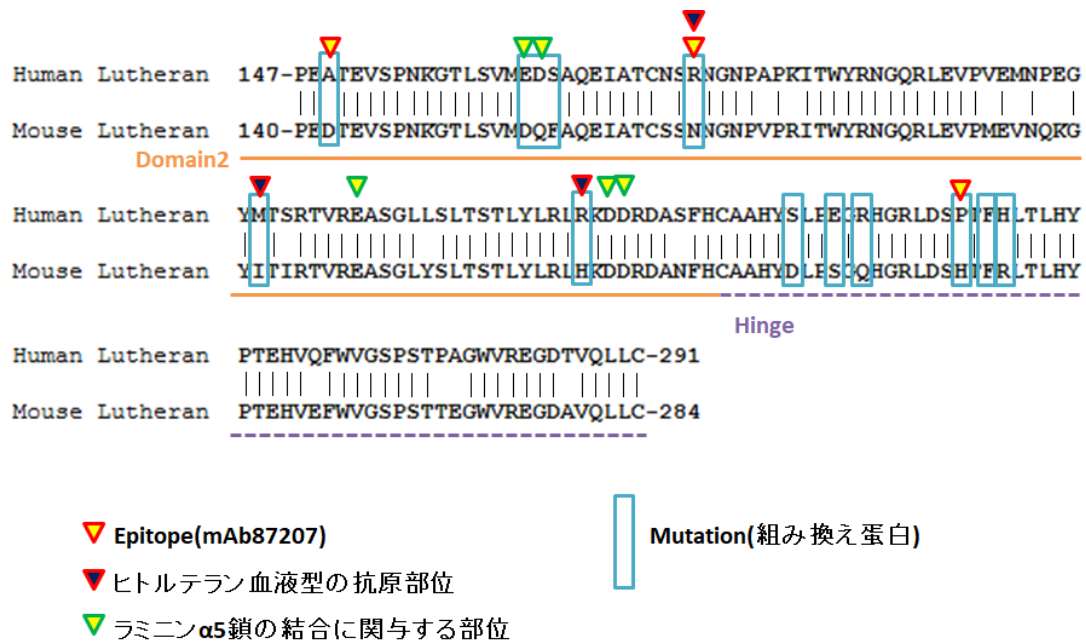
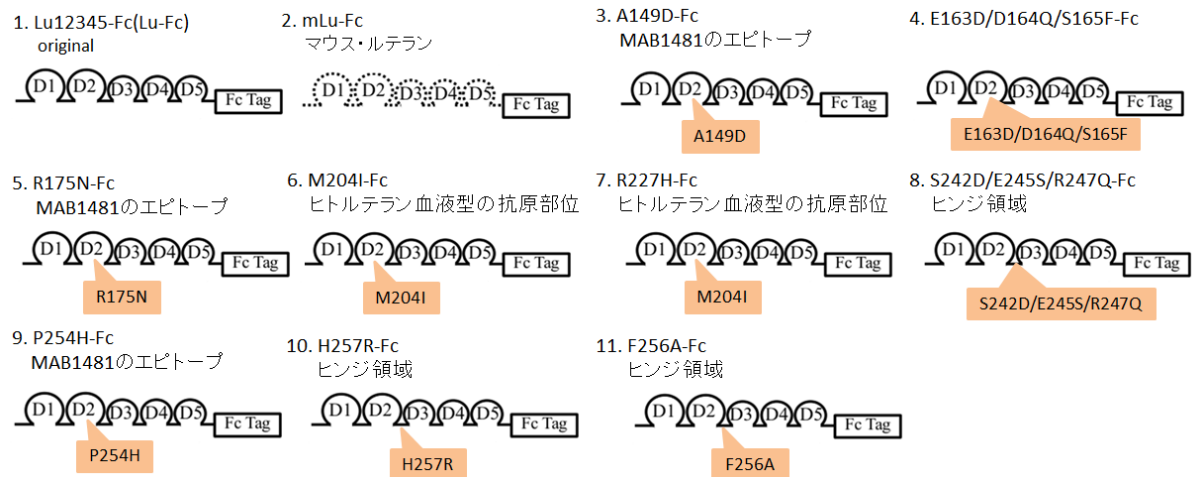


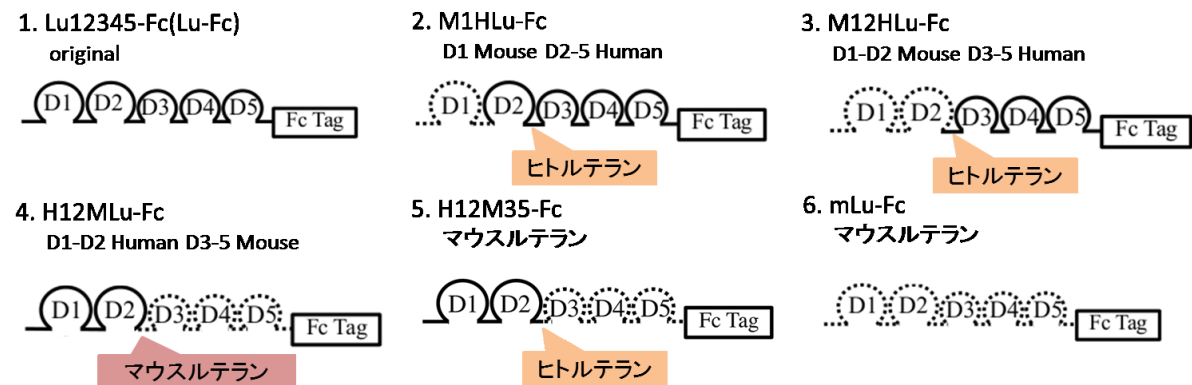
図 2-1-8 組換えルテランの変異マップ

ヒトルテランとマウスルテランで異なるアミノ酸、ヒトルテランの抗原部位、マウス抗ルテラン抗体のエピトープ及び、ラミニン $\alpha 5$ 鎖との結合に関与する部位を標的に変異を加えたものを用いた。

(A)



(B)



(C)

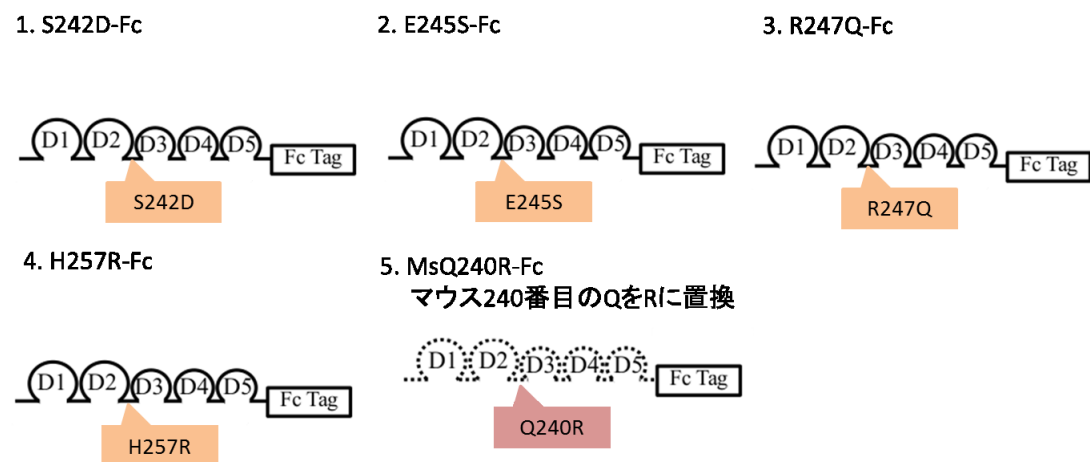
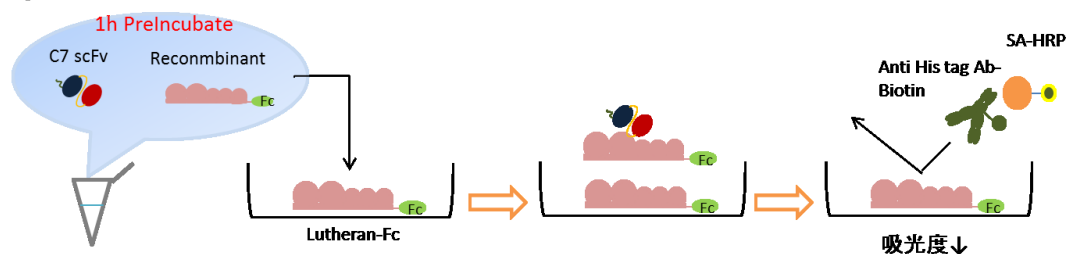


図 2-1-9 エピトープマッピングのための組換えルテランのシリーズ

(A)図 2-1-8 に記載したアミノ酸残基を標的とした組換えルテランのシリーズ。(B) Ala²³⁸-His²⁵⁷ をマウスルテランの配列に置換した組換えルテランのシリーズ。(C)結合に重要な残基を決定するための組換えルテランのシリーズ。

組換えルテランのシリーズを用いた抗ルテラン抗体の評価には、吸収 ELISA の方法を用いた(図 2-1-10)。

① scFvと組換えタンパク質が結合する場合



② scFvと組換えタンパク質が結合しない場合

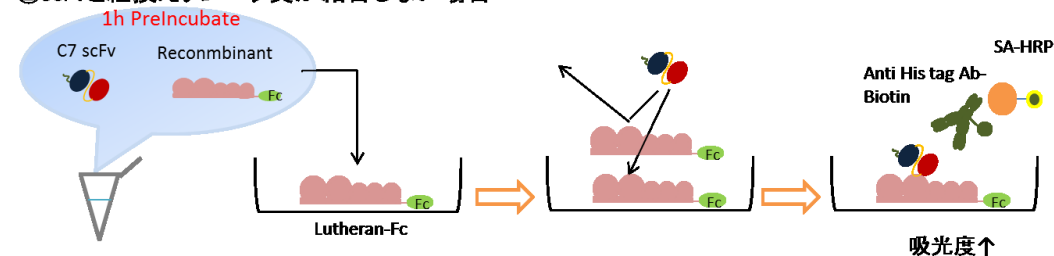


図 2-1-10 吸収 ELISA の実験系

scFv 30 ng (約 0.9 pmol) を組換えタンパク質 2.7 pmol と混合し、1 時間プレインキュベート後、その溶液を固定化したルテラン-Fc のウェルに加えた。検出は Anti-His-tag-Biotin monoclonal antibody (MBL) と Streptavidin-HRP コンジュゲート (VEC) を 1/4000 希釈で溶解しプレインキュベートしたものを用いた。

2-3 結果

2-3-1 抗体ファージライブラリの構築

肝ガン患者由来の組織，血液プールより抽出した Total RNA ならびに，健常者の末梢血プール由来の Total RNA をソースとした。健常者末梢血由来の Total RNA の抽出は濃度測定と，アガロースゲル電気泳動のバンドパターンにより確認した（図 2-2-1）。

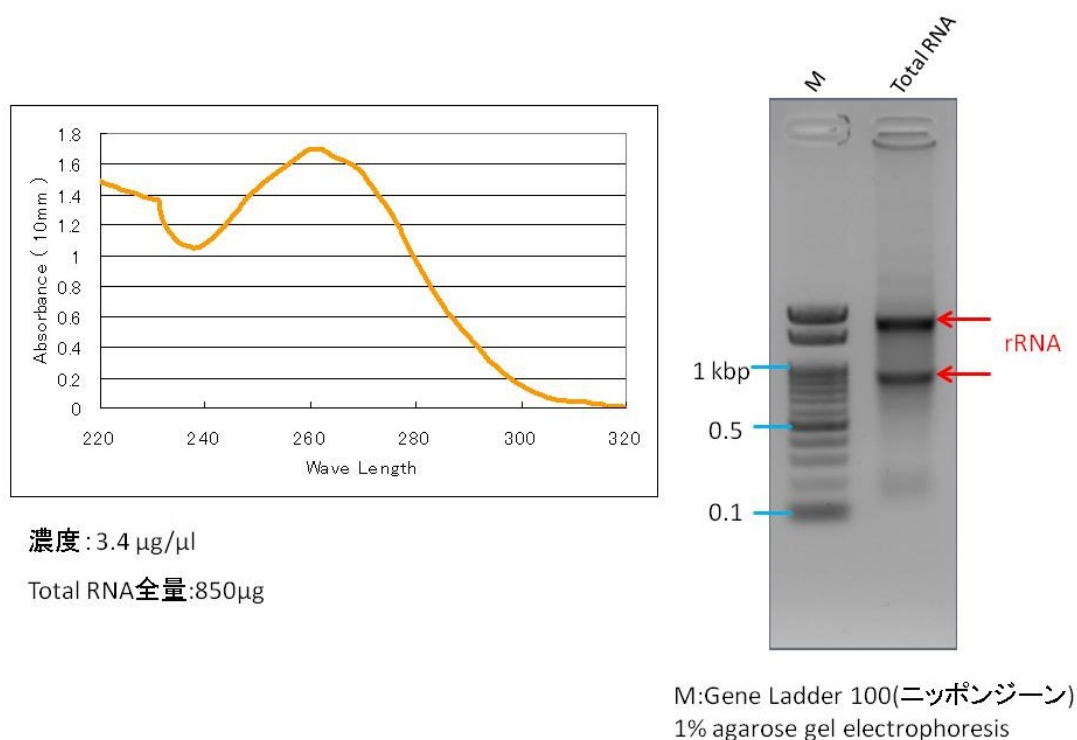


図 2-2-1 健常者 20 人プール末梢血より単離した Total RNA

次に，VH，VL κ ，VL λ の遺伝子を増幅後，Overlapping PCR により scFv 遺伝子を構築し，抗体ファージライブラリを作製した。ライブラリの多様性は，肝ガン患者組織由来ライブラリで 3.61×10^8 ，肝ガン患者血液由来ライブラリで 1.85×10^8 ，健常者由来ライブラリで 2.09×10^8 であった。

2-3-2 ルテランに対するバイオパニング

組換えルテラン-His に対して、バイオパニングを行った。3 ラウンドのバイオパニング後 ELISA を行ったところ、肝ガン患者血液由来ライブラリでのみ、ルテラン特異的ファージの濃縮が見られた (図 2-2-2)。Sol-Lu は可溶型ルテランを示す。

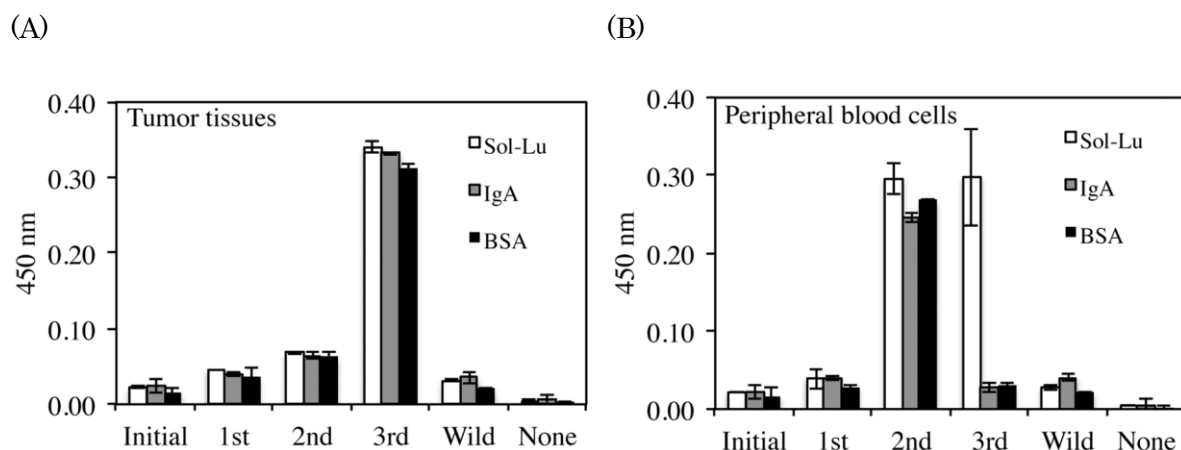


図 2-2-2 ルテランに対するバイオパニング後の ELISA

(A)肝ガン患者組織由来ライブラリ, (B)肝ガン患者血液由来ライブラリのルテランに対するバイオパニング後の ELISA の結果。

2-3-3 ルテラン特異的クローンの単離

ルテランに結合するファージ群から 48 クローンをピックアップし特異性を確認したところ、38 クローンがルテラン特異的であった（図 2-2-3）。

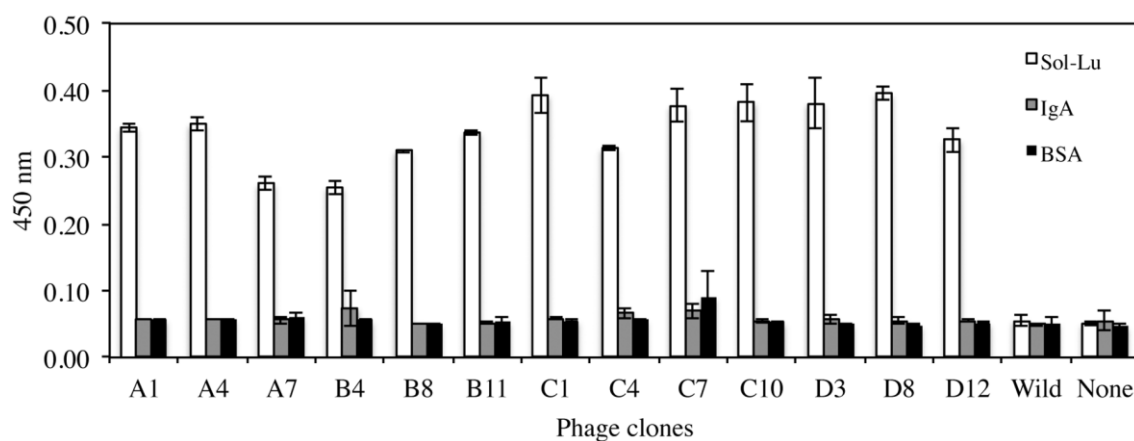


図 2-2-3 肝ガン患者血液由来ライブラリ由来の単クローンによる ELISA

2-3-4 ELISA による結合評価及び配列解析

12 クローンについて DNA 配列解析を行い、得られた塩基配列をもとに scFv のアミノ酸配列を決定したところ、大きく 2 つの配列に分類することができた（図 2-2-4）。

(A)

		V _H -FR1	V _H -CDR1	V _H -FR2	V _H -CDR2	V _H -FR3	
A1	1	QVQLVQSGAEVRRPGSSVRISCR	TSGGTFNNY	ALSWVRQAPGQGLEWMGGIIPIVGTAVYAEKFEDSVTVTADESASTAYMEVRSLSRSED	TAVY	94	
A4	1	QVQLVQSGAEVRRPGSSVRISCR	TSGGTFNNY	ALSWVRQAPGQGLEWMGGIIPIVGTAVYAEKFEDSVTVTADESASTAYMEVRSLSRSED	TAVY	94	
B8	1	QVQLVQSGAEVRRPGSSVRISCR	TSGGTFNNY	ALSWVRQAPGQGLEWMGGIIPIVGTAVYAEKFEDSVTVTADESASTAYMEVRSLSRSED	TAVY	94	
B11	1	QVQLVQSGAEVRRPGSSVRISCR	TSGGTFNNY	ALSWVRQAPGQGLEWMGGIIPIVGTAVYAEKFEDSVTVTADESASTAYMEVRSLSRSED	TAVY	94	
C1	1	QVQLVQSGAEVRRPGSSVRISCR	TSGGTFNNY	ALSWVRQAPGQGLEWMGGIIPIVGTAVYAEKFEDSVTVTADESASTAYMEVRSLSRSED	TAVY	94	
C7	1	QVQLVQSGAEVRRPGSSVRISCR	TSGGTFNNY	ALSWVRQAPGQGLEWMGGIIPIVGTAVYAEKFEDSVTVTADESASTAYMEVRSLSRSED	TAVY	94	
C10	1	QVQLVQSGAEVRRPGSSVRISCR	TSGGTFNNY	ALSWVRQAPGQGLEWMGGIIPIVGTAVYAEKFEDSVTVTADESASTAYMEVRSLSRSED	TAVY	94	
D3	1	QVQLVQSGAEVRRPGSSVRISCR	TSGGTFNNY	ALSWVRQAPGQGLEWMGGIIPIVGTAVYAEKFEDSVTVTADESASTAYMEVRSLSRSED	TAVY	94	
D8	1	QVQLVQSGAEVRRPGSSVRISCR	TSGGTFNNY	ALSWVRQAPGQGLEWMGGIIPIVGTAVYAEKFEDSVTVTADESASTAYMEVRSLSRSED	TAVY	94	

		V _H -CDR3	V _H -FR4	GS linker	V _L -FR1	V _L -CDR1	V _L -FR2	
A1	95	YCATGEKFSVPWF	GDLPLHHWGQ	TLVTVSSGGGGSGGGSGSGTGSQSVLTQPPSVSGAPGQ	RVTISCTGSS	SNIGAPYD	VHWHYQQVPGTAPKL	18
A4	95	YCATGEKFSVPWF	GDLPLHHWGQ	TLVTVSSGGGGSGGGSGSGTGSQSVLTQPPSVSGAPGQ	RVTISCTGSS	SNIGAPYD	VHWHYQQVPGTAPKL	18
B8	95	YCATGEKFSVPWF	GDLPLHHWGQ	TLVTVSSGGGGSGGGSGSGTGSQSVLTQPPSVSGAPGQ	RVTISCTGSS	SNIGAPYD	VHWHYQQVPGTAPKL	18
B11	95	YCATGEKFSVPWF	GDLPLHHWGQ	TLVTVSSGGGGSGGGSGSGTGSQSVLTQPPSVSGAPGQ	RVTISCTGSS	SNIGAPYD	VHWHYQQVPGTAPKL	18
C1	95	YCATGEKFSVPWF	GDLPLHHWGQ	TLVTVSSGGGGSGGGSGSGTGSQSVLTQPPSVSGAPGQ	RVTISCTGSS	SNIGAPYD	VHWHYQQVPGTAPKL	18
C7	95	YCATGEKFSVPWF	GDLPLHHWGQ	TLVTVSSGGGGSGGGSGSGTGSQSVLTQPPSVSGAPGQ	RVTISCTGSS	SNIGAPYD	VHWHYQQVPGTAPKL	18
C10	95	YCATGEKFSVPWF	GDLPLHHWGQ	TLVTVSSGGGGSGGGSGSGTGSQSVLTQPPSVSGAPGQ	RVTISCTGSS	SNIGAPYD	VHWHYQQVPGTAPKL	18
D3	95	YCATGEKFSVPWF	GDLPLHHWGQ	TLVTVSSGGGGSGGGSGSGTGSQSVLTQPPSVSGAPGQ	RVTISCTGSS	SNIGAPYD	VHWHYQQVPGTAPKL	18
D8	95	YCATGEKFSVPWF	GDLPLHHWGQ	TLVTVSSGGGGSGGGSGSGTGSQSVLTQPPSVSGAPGQ	RVTISCTGSS	SNIGAPYD	VHWHYQQVPGTAPKL	18

		V _L -CDR2	V _L -FR3	V _L -CDR3	V _L -FR4	
A1	189	LIYGNTNRPS	VPDRFSGSKSGTSASLAITGLQADDEADYYCQSYDRSLGGSIFGGG	TKLTVLAAAH	HHHHH	260
A4	189	LIYGNTNRPS	VPDRFSGSKSGTSASLAITGLQADDEADYYCQSYDRSLGGSIFGGG	TKLTVLAAAH	HHHHH	260
B8	189	LIYGNTNRPS	VPDRFSGSKSGTSASLAITGLQADDEADYYCQSYDRSLGGSIFGGG	TKLTVLAAAH	HHHHH	260
B11	189	LIYGNTNRPS	VPDRFSGSKSGTSASLAITGLQADDEADYYCQSYDRSLGGSIFGGG	TKLTVLAAAH	HHHHH	260
C1	189	LIYGNTNRPS	VPDRFSGSKSGTSASLAITGLQADDEADYYCQSYDRSLGGSIFGGG	TKLTVLAAAH	HHHHH	260
C7	189	LIYGNTNRPS	VPDRFSGSKSGTSASLAITGLQADDEADYYCQSYDRSLGGSIFGGG	TKLTVLAAAH	HHHHH	260
C10	189	LIYGNTNRPS	VPDRFSGSKSGTSASLAITGLQADDEADYYCQSYDRSLGGSIFGGG	TKLTVLAAAH	HHHHH	260
D3	189	LIYGNTNRPS	VPDRFSGSKSGTSASLAITGLQADDEADYYCQSYDRSLGGSIFGGG	TKLTVLAAAH	HHHHH	260
D8	189	LIYGNTNRPS	VPDRFSGSKSGTSASLAITGLQADDEADYYCQSYDRSLGGSIFGGG	TKLTVLAAAH	HHHHH	260

(B)

		V _H -FR1		V _H -CDR1		V _H -FR2		V _H -CDR2		V _H -FR3		
A7	1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG		FTFSSYSMNWVRQAPGKGL		EWVSSI		SSSSSYIYYADSVKGRFTISR		DNAKNSLYLQMDSLRAEDTAVY		94
B4	1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG		FTFSSYSMNWVRQAPGKGL		EWVSSI		SSSSSYIYYADSVKGRFTISR		DNAKNSLYLQMDSLRAEDTAVY		94
C4	1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG		FTFSSYSMNWVRQAPGKGL		EWVSSI		SSSSSYIYYADSVKGRFTISR		DNAKNSLYLQMDSLRAEDTAVY		94
D12	1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG		FTFSSYSMNWVRQAPGKGL		EWVSSI		SSSSSYIYYADSVKGRFTISR		DNAKNSLYLQMDSLRAEDTAVY		94

		V _H -CDR3		V _H -FR4		GS linker		V _L -FR1		
A7	95	YCARSSSGSGWYGDHWGQ		GTLVTVSSGGGGSGGGSG		SGTGSQSVLTQPPSVS		AAAAHHHHHH		155
B4	95	YCARSSSGSGWYGDHWGQ		GTLVTVSSGGGGSGGGSG		SGTGSQSVLTQPPSVS		AAAAHHHHHH		155
C4	95	YCARSSSGSGWYGDHWGQ		GTLVTVSSGGGGSGGGSG		SGTGSQSVLTQPPSVS		AAAAHHHHHH		155
D12	95	YCARSSSGSGWYGDHWGQ		GTLVTVSSGGGGSGGGSG		SGTGSQSVLTQPPSVS		AAAAHHHHHH		155

図 2-2-4 ルテラン特異的抗体の配列解析結果

(A) scFv の構造を持つクローンの配列と (B) VH と GS linker のみの短い配列。

今回単離されたクローンの germline 配列の情報について表 2-2-1 にまとめた。

表 2-2-1 ルテラン特異的抗体の germline 配列の比較

Clone No.	% of clone	VH germline	VL germline
A1, A4, C1, C7, D8	8/12	V:Homsap IGHV1-69*01 F J:Homsap IGHJ4*02 F	V:Homsap IGLV1-40*01 F J:Homsap IGLJ2*01 F or Homsap IGLJ3*01 F or Homsap IGLJ3*02 F
A7	4/12	V:Homsap IGHV3-21*02 F J:Homsap IGHJ4*02 F	V:Homsap IGLV1-51*01 F or Homsap IGLV1-51*02 F

2-3-5 ルテラン特異的抗体の機能解析

2-3-5-1 抗ルテラン抗体の結合ドメインの決定

図 2-1-6 の組換えルテランのシリーズを用いて ELISA を行った。その結果、同じ germline 配列由来であった 5 つのクローンは D2 ドメインを、VH と GS linker のみの短い配列であったクローンは D5 ドメインを認識していた (図 2-2-5)。

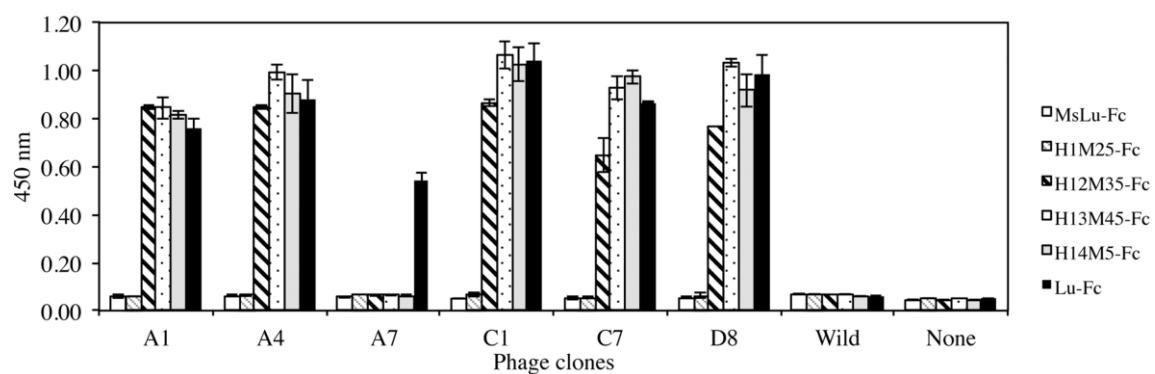


図 2-2-5 ルテラン結合ドメイン決定のための ELISA

2-3-5-2 マウス抗ルテラン抗体との競合実験

マウスの抗ルテラン抗体 (mAb87207) は、ルテランの D2 ドメインを認識し、ラミニン $\alpha 5$ 鎖の結合を立体的に阻害して細胞の運動能を抑制する³¹ (図 2-2-6)。

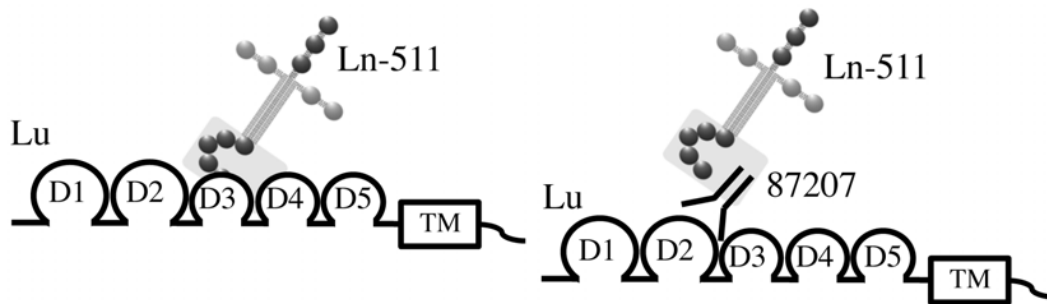


図 2-2-6 マウス抗ルテラン抗体 (mAb87207) の結合様式

mAb87207 は、ルテランの D2 ドメインを認識し、D3 ドメインと結合するラミニン $\alpha 5$ 鎖の結合を立体的に阻害する。(引用文献 32 より引用)

マウスの抗ルテラン抗体と単離したファージ抗体との競合 ELISA を行ったところ、クローン A7 以外の抗体はマウス抗ルテラン抗体と競合することが明らかとなった (図 2-2-7)。

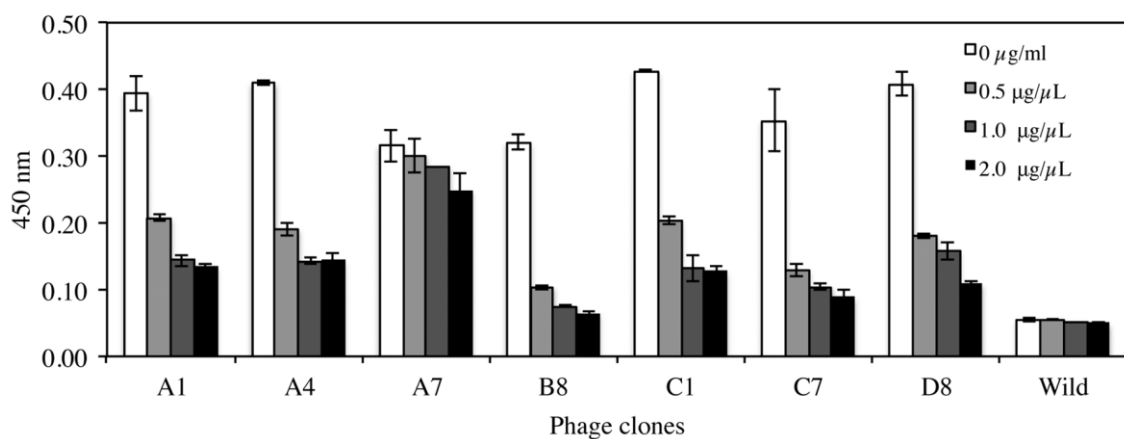


図 2-2-7 マウス抗ルテラン抗体とファージ抗体クローンとの競合 ELISA

2-3-5-3 ラミニン $\alpha 5$ 鎖に対するルテランの結合阻害実験

単離したクローン A7, C7 が, ルテランとラミニン $\alpha 5$ 鎖との結合を阻害できるかを検討するため, マウス腎臓組織切片を利用したルテラン結合実験を行った。その結果, 単離された抗ルテラン A7, C7 ファージ抗体もルテラン-Fc のラミニン $\alpha 5$ 鎖への結合を阻害した (図 2-2-8)。

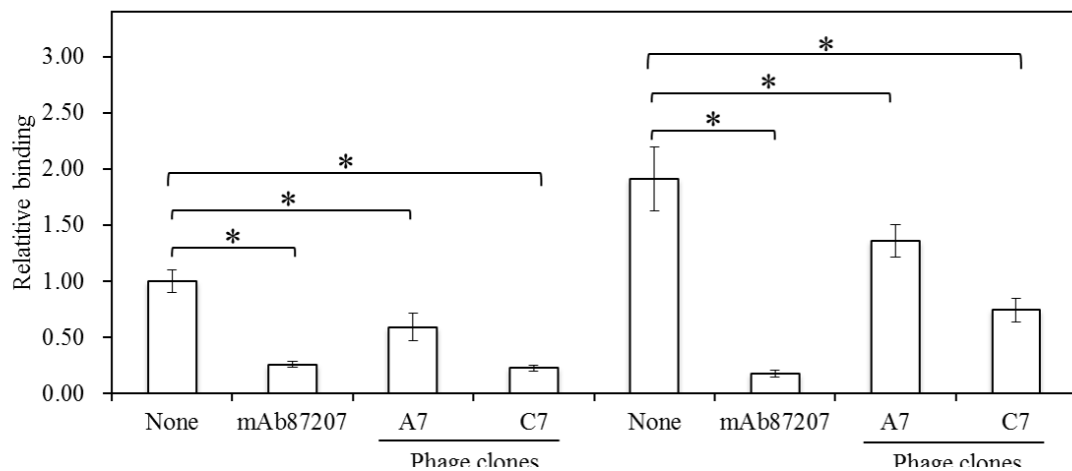


図 2-2-8 ルテランとラミニン $\alpha 5$ 鎖の結合阻害実験

ルテラン-Fc (1 μ g/ml) のみを加えた時の蛍光値を 1.00 とし, 各抗体を加えた際の蛍光の強度を相対的に示している。*, $P < 0.05$ by t test

2-3-5-4 抗ルテラン抗体の細胞表面上のルテランへの結合評価

ヒト線維芽細胞株 HT1080 にルテランを過剰発現させた細胞を用いて, ファージ抗体の結合能を FACS により解析した結果, C7 ファージ抗体で有意なヒストグラムのシフトが観察できた (図 2-2-9)。

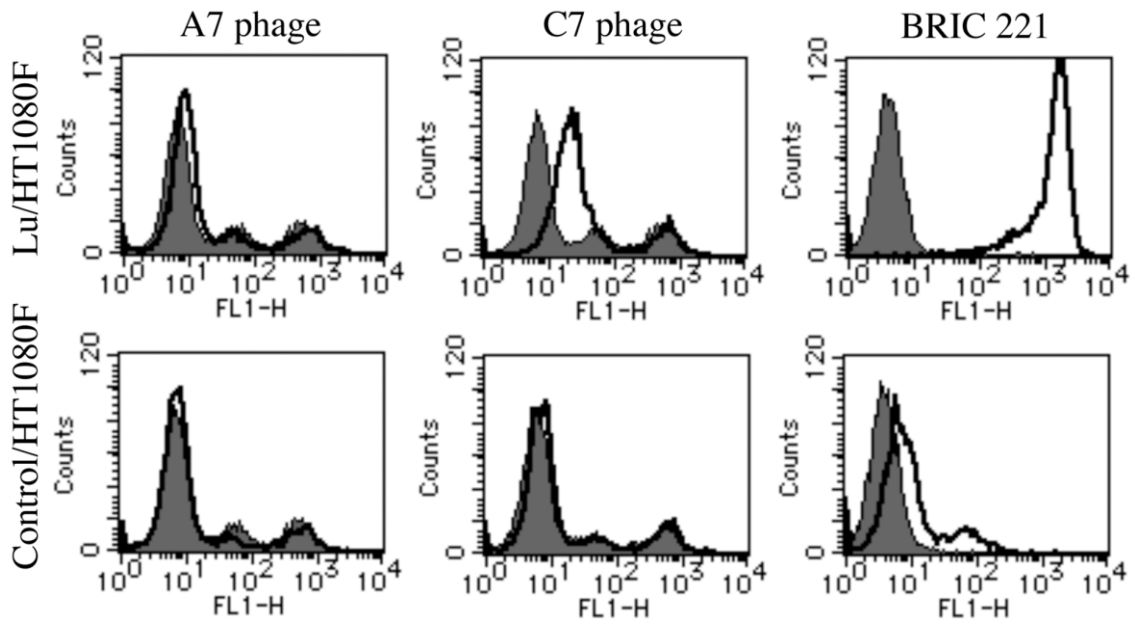


図 2-2-9 ルテラン過剰発現細胞株への結合評価

2-3-5-5 ルテラン発現細胞株の運動阻害実験

ルテランを発現している肺ガン細胞株 A549 に対してファージ抗体を添加し、運動阻害活性を検討した結果、C7 ファージ抗体は有意に運動を阻害する一方で、A7 ファージ抗体は運動阻害活性を示さなかった。(図 2-2-10)

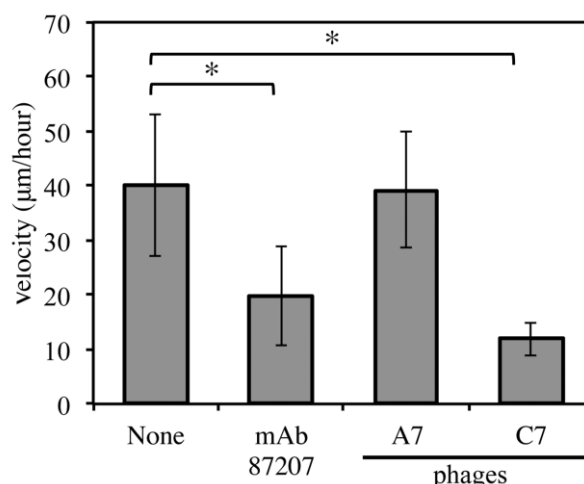


図 2-2-10 ルテラン過剰発現細胞株の運動阻害活性

の細胞核の位置を追跡することによって細胞の運動を定量した。縦軸は細胞核の移動量を示している。*, $P < 0.01$ by t test

2-3-5-6 可溶型 scFv の発現

scFv での評価を行うため、*E. coli* HB2151 の Periplasm 画分より精製した C7 scFv を SDS-PAGE で確認したところ、予想される分子量にバンドが観察された。さらに、ELISA により C7 scFv のルテランに対する結合性が示された（図 2-2-11）。

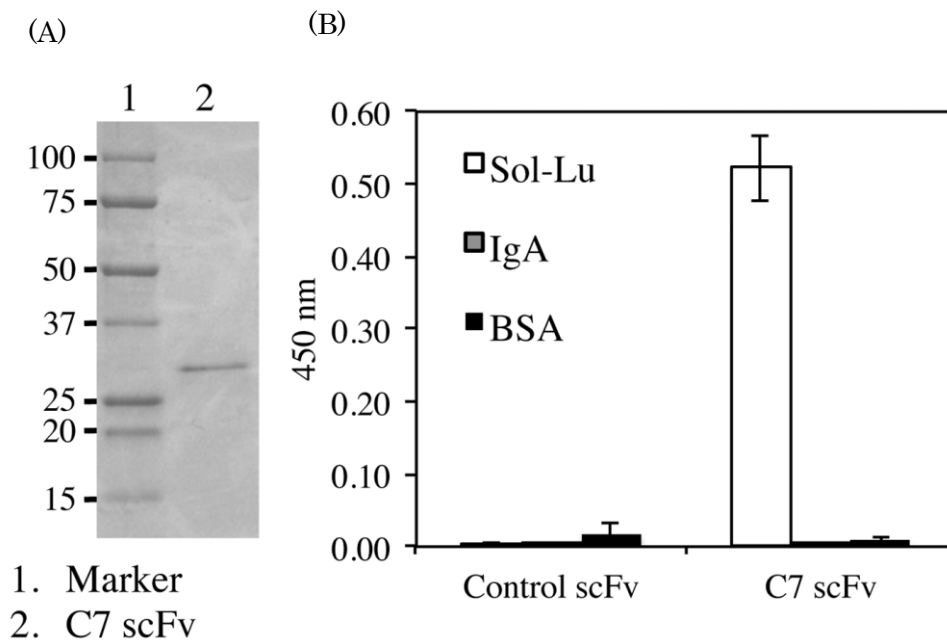


図 2-2-11 C7 scFv の発現とルテランへの結合確認

(A) 大腸菌で発現させ精製した C7 scFv の SDS-PAGE の結果

(B) 精製した C7 scFv による ELISA

2-3-5-7 可溶型 scFv の親和性解析

BIAcore T200 を用いた SPR 解析を行った結果、可溶型 C7 scFv の KD 値は約 37 nM であった (図 2-2-12)。

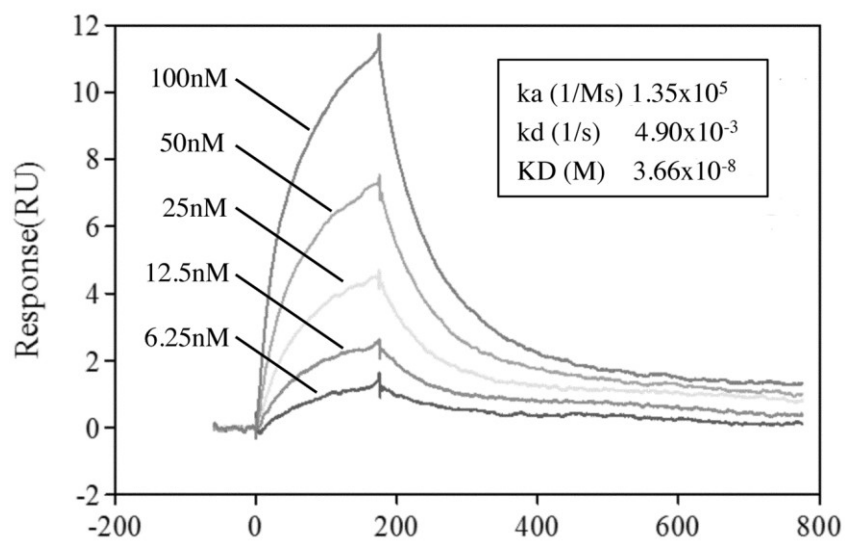


図 2-2-12 C7 scFv の親和性解析

2-3-5-8 可溶型 scFv によるルテラン発現細胞株の運動阻害実験

可溶型 C7 scFv を用いて、ルテラン発現細胞株の運動阻害を評価した結果、C7 scFv では運動阻害活性は確認されなかった (図 2-2-13)。

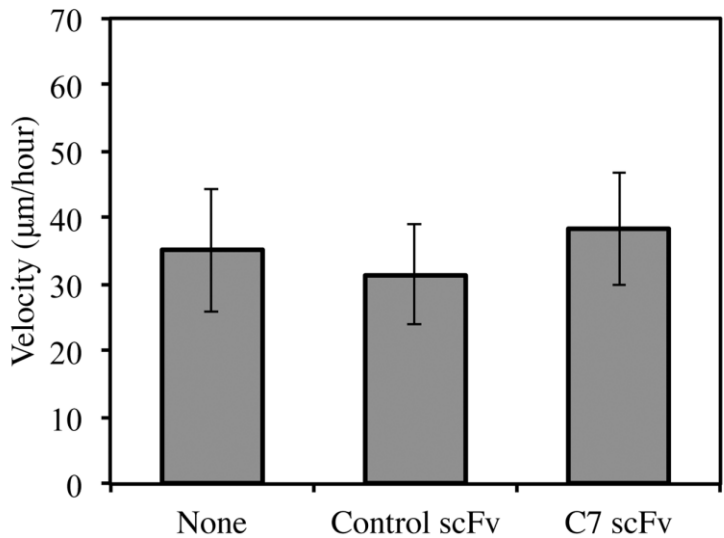


図 2-2-13 可溶型 scFv のルテラン過剰発現細胞株の運動阻害活性

2-3-5-9 エピトープマッピング

C7 の詳細なエピトープマッピングを行った。図 2-1-9 (A) に示した組換えルテランと C7 scFv との結合活性を吸収 ELISA によって比較した。その結果、C7 scFv の結合活性が減少した変異体は S242D/E245S/R247Q-Fc のみであった (図 2-2-14)。

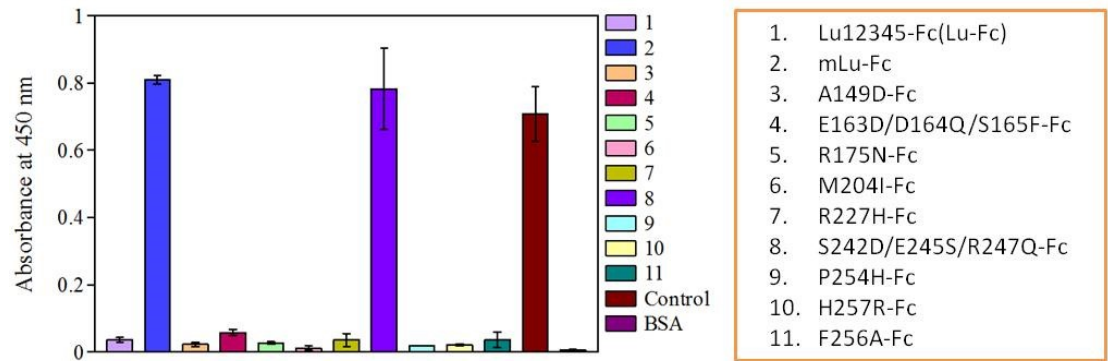


図 2-2-14 C7 scFv のエピトープマッピング-1

次に、図 2-1-9 (B) に示されるヒトルテランとマウスルテランのドメインを組み合わせた組換えルテランのシリーズを用いて吸収 ELISA を行った。その結果、C7 ファージ抗体のルテランへの結合には、ヒトルテランの D2 から D3 ドメイン間のヒンジ領域が必要であることが示された (図 2-2-15)。

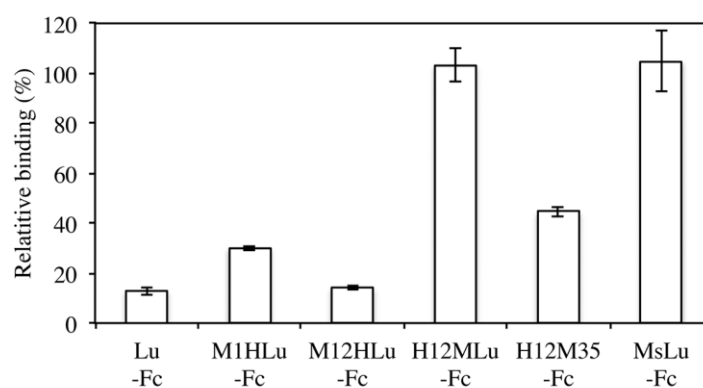


図 2-2-15 C7 scFv のエピトープマッピング-2

Ala²³⁸-His²⁵⁷ がマウスルテランの配列に置換されていた場合 (H12MLu-Fc), D2 ドメインの存在の有無にかかわらず結合能が失われた。

さらに、図 2-1-9 (C) の組換えタンパク質を用いて吸収 ELISA を行ったところ、結合に重要な残基は 247 番目の Arg であることが明らかとなった (図 2-2-16)。

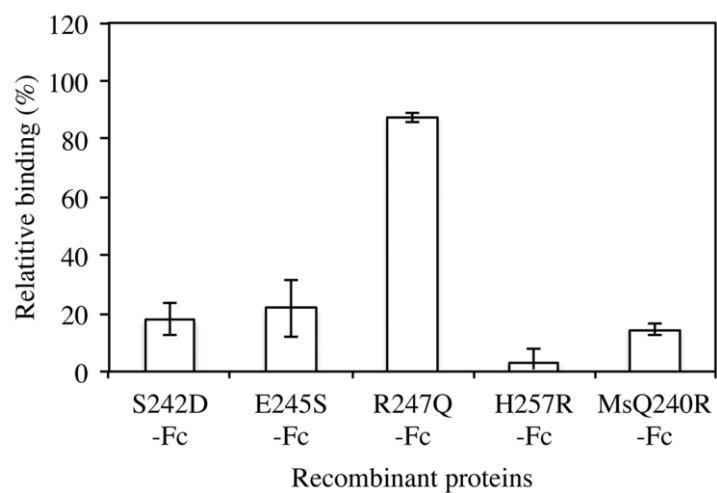


図 2-2-16 C7 scFv のエピトープマッピング-3

2-4 考察

肝ガン患者由来の抗体ライブラリから、疾患関連抗原に対する自己抗体を探索することを目的とし、肝ガン患者組織、血液、及び健常者の血液由来ライブラリを構築した。今回肝ガン患者由来のライブラリからのみ肝ガン抗原ルテランに対して高い特異性を持つ抗体が単離されたことは、患者体内で自己抗体が産生されていた可能性を示唆している。

単離されたクローンのうち、A7 はルテランの D5 ドメインを、C7 はルテランの D2 ドメインを認識することが分かった。ELISA により、C7 はマウス抗ルテラン抗体 (mAb87207) と競合することが示され、ルテランが過剰発現している細胞株において、細胞運動の阻害活性を示したが、これはファージ抗体のみでの活性であり、可溶型 scFv では活性が失われた。可溶型 scFv はルテランに対する結合活性を示したため、この抗体は可溶型 scFv で結合活性は示すが、ルテランとラミニン $\alpha 5$ 鎖の結合を直接的に阻害することはできないことが示された。

より詳細なエピトープマッピングを行い、この現象について検証した結果、C7 scFv のルテランへの結合に重要な残基 247 番目の Arg は、PDB のルテラン D2, D3 ドメインの立体構造 (PDB:2PET) から、D2 及び D3 ドメイン間のループ構造の先端の残基であることが分かった (図 2-2-20)。

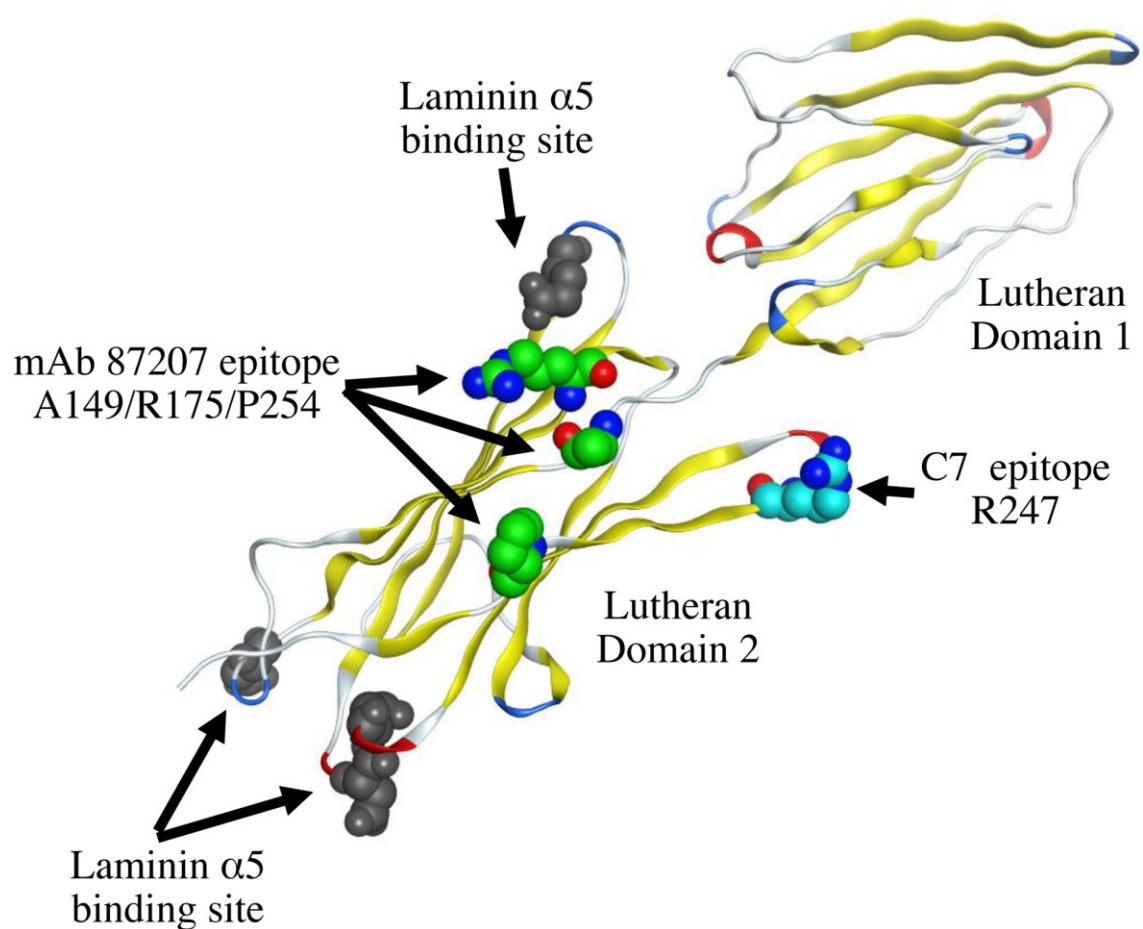


図 2-2-20 エピトープマッピングにより同定されたルテラン上の抗体結合エピトープ

ラミニン $\alpha 5$ 鎖との結合面は、247番目の Arg からは離れていたため、C7 scFv がルテランとラミニン $\alpha 5$ 鎖との結合を阻害することができなかったと考えられた。一方で、ファージ抗体においては阻害効果が示されたのは、ファージ粒子の大きさによるものと考えられた。

今回構築した患者由来のライブラリは、ガン細胞マーカーに対する自己抗体の探索ソースとして有益なライブラリであると言える。また、今回単離された抗ルテラン抗体 C7 は、ガンや鎌状赤血球病における血管閉塞に対する治療薬や診断薬の候補として有用である。

第 3 章 次世代シーケンサーを利用した抗体選別法

3-1 目的

抗体ファージライブラリからの特異的な抗体の探索には通常バイオパニングが用いられているが、スクリーニングのステップやクローニングが煩雑で、クローンの数にも限りがあるなど、問題点が挙げられている。

近年、次世代シーケンサーを利用して遺伝子配列を網羅的に解析することにより、抗原特異的な抗体やペプチドの単離が試みられている¹⁴⁻¹⁶。そこで、ルテランに対する肝ガン患者血液由来ライブラリのバイオパニングをモデルとし、バイオパニングと次世代シーケンサーによる VH 配列の網羅的配列解析を組み合わせた手法により、多様な抗体を迅速に選別する手法の確立を目指した。

3-2 材料と方法

3-2-1 次世代シーケンサー解析用プライマー

次世代シーケンサーMiseq (Illumina) での標的領域の遺伝子 (DNA Insert) 配列解析を行うために必要な解析用の配列の概要を図 3-1-1 に示した。

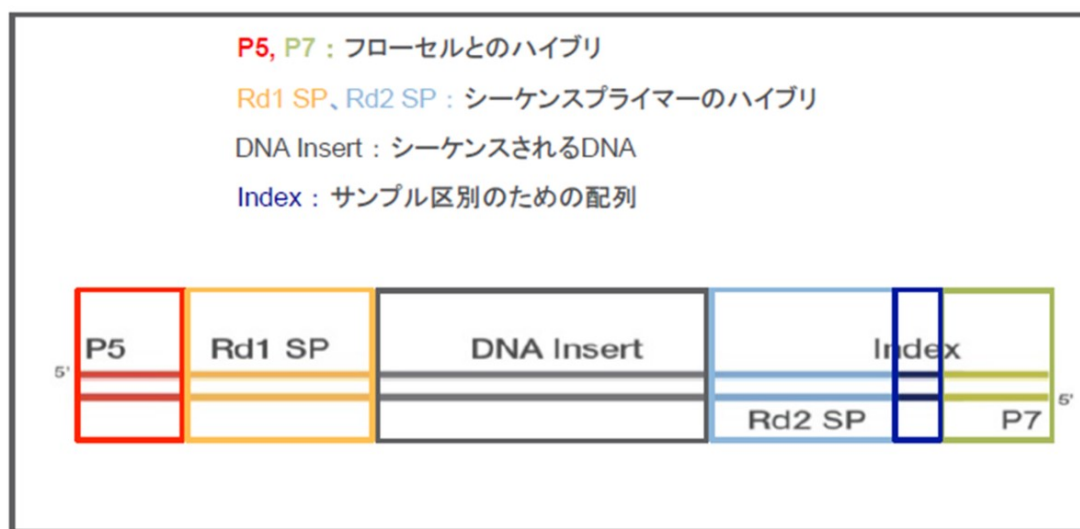


図 3-1-1 次世代シーケンサーのために必要な配列付加の概要

解析のため、P5, P7 配列, Rd1 SP, Rd2 SP 配列, Index 配列を標的の DNA 配列の両端に上記のように付加する必要がある。(引用 : <https://jp.illumina.com/>)

バイオパニング前後のファージ群由来のファージミドライブラリをテンプレートとして、VH 配列 (DNA Insert) を解読するための、解析用プライマーの設計を行った (図 3-1-2)。

〈1st PCR primer〉
 Forward (scFv annealing)
 5'- TGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCGG-3'

 VH Forward annealing

Reverse(scFv annealing, linker)
 5'- GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCA-3'

 Linker VH Reverse annealing

〈2nd PCR primer〉
 Forward
 5'- AATGATACGGCGACCGACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT

 P5 Linker
 TGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCGG-3'

 VH Forward annealing

Reverse(P7, Index127, linker annealing)
 5'- CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGCTTTTCGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC-3'

 P7 Index Linker annealing

図 3-1-2 次世代シーケンサー解析のためのプライマー

バイオパニング前後のファージミドライブラリをテンプレートとし、1st PCR プライマーのセットで標的遺伝子領域を増幅後、P5 及び P7 配列と Index 配列を含む 2nd PCR プライマーを使って PCR を行った。

3-2-2 ルテラン特異的抗体のバイオパニング

肝ガン患者血液由来ライブラリからのルテラン特異的抗体の各バイオパニング前後で溶出したファージ群を感染させた大腸菌より、Plasmid DNA Extraction System (VIOGENE) を用いてプラスミド DNA を抽出し、次世代シーケンサー解析の PCR 用のテンプレートとして用いた。

3-2-3 次世代シーケンサーによる網羅的解析

1st PCR は、テンプレート DNA は 50 ng を用い、アニーリング温度 58°C、伸長温度 72°C、サイクル条件は 12 サイクルで行った。2nd PCR には、1st PCR の PCR 産物を 10 ng をテンプレートとして用い、反応は、アニーリング温度 58°C、サイクル条件 10 サ

イクルで行った。精製した PCR 産物を、MiSeq Reagent Kit v2 による次世代シーケンサーの PCR 反応に用いた。配列決定データは、CLC Genomics Workbench ver5 (CLC Bio) software により処理した。低品質の配列決定データを排除後、取得した 5'及び 3'側から解析したそれぞれのリード配列をマージした。VH 配列の出現率は、Usearch 8.0 clustering software をベースとしたプログラムを用いて評価し、バイオパニング前後での各配列の出現頻度の変化を増幅率として算出した。

3-2-4 scFv 遺伝子の再構築

選別されたクローンについてルテランへの結合性を評価するため、scFv 遺伝子の再構築を行った。各クラスター由来の VH 配列の CDR3 を元に、表 3-1-1 に示すようにプライマーを設計した。

表 3-1-1 scFv 遺伝子再構築のためのプライマーセット

No.	Forward primer	Reverse primer
1	CAGTGGCTGGTACGGCG	CGCCGTACCAGCCACTG
2	CACCATGGTTCGGAGACTTACC	GGTAAGTCTCCGAACCATGGTG
3	GATAGTAGTGGTTATTACAGGTTTGAC	GTCAAACCTGTAATAACCACTACTATC

scFv 遺伝子再構築の流れについて、図 3-1-3 に示した。VH 配列の CDR3 配列を標的としたプライマーを用い VH 及び VL 配列を増幅後、Overlapping PCR によって連結させることにより scFv 遺伝子を構築し、目的の scFv を提示したファージ抗体を得た (図 3-1-3)。

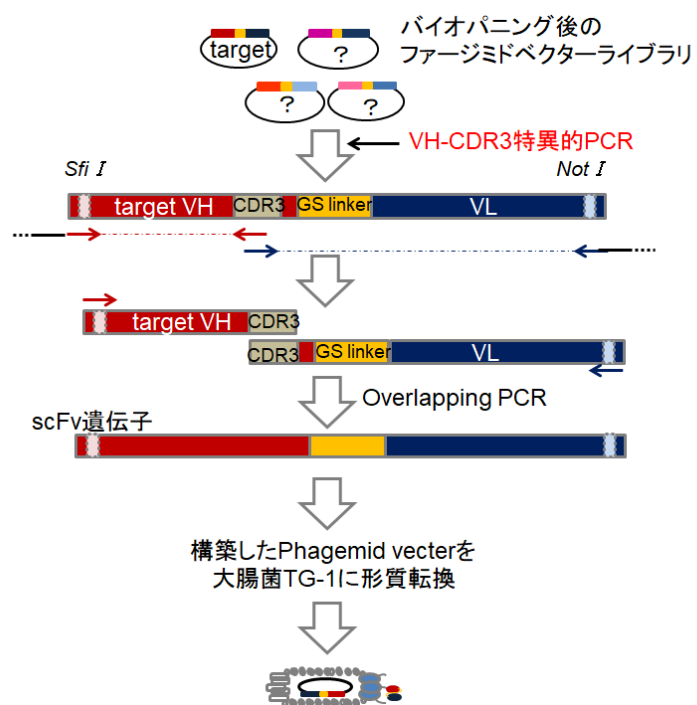


図 3-1-3 scFv 遺伝子再構築の流れ

3-3 結果

3-3-1 解析用サンプルの調製

ルテランに対する 3 ラウンドのバイオパニング前後のファージが感染した大腸菌より、プラスミド DNA を抽出しこれをサンプルとした。VH 配列の次世代シーケンサー解析を実施するためのプライマー設計の概要を図 3-2-1 に示す。

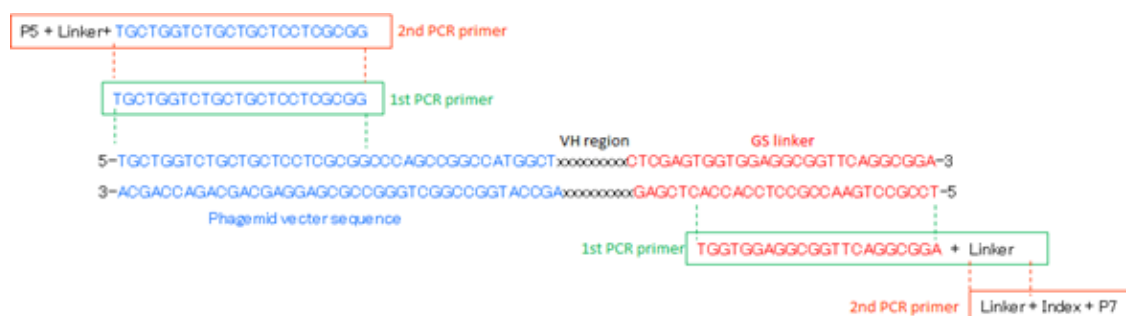
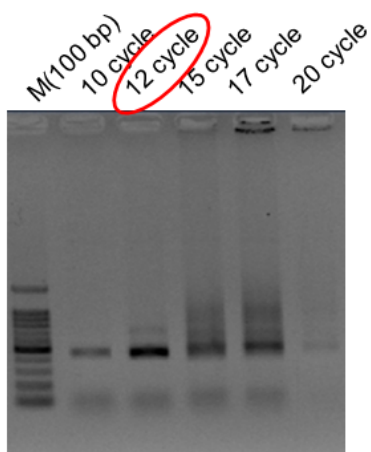


図 3-2-1 次世代シーケンサー用のプライマー設計の概略図

これらのプライマーを用いた PCR の条件検討を行い、1st PCR では 12 サイクル、2nd PCR ではテンプレート量 10 ng、10 サイクルを選択し、次世代シーケンサー解析のテンプレートを調製した（図 3-2-2）。

(A)



(B)

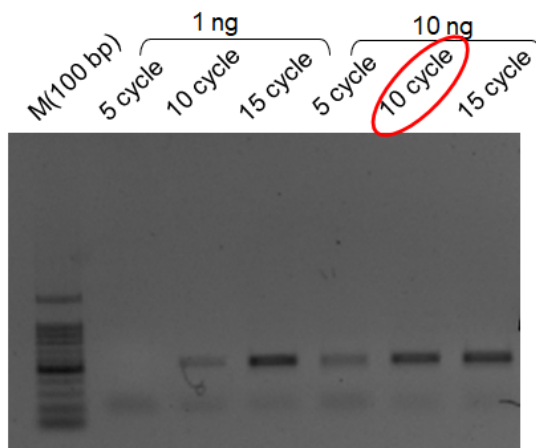


図 3-2-2 次世代シーケンサー用のプライマーの条件検討

(A)1st PCR プライマーの条件検討の結果、12 サイクルに決定した。(B)2nd PCR プライマーの条件検討の結果、テンプレート量 10 ng, 10 サイクルに決定した。

ルテランに対するバイオパニング前後のファージミドライブラリを用い、PCR を行って次世代シーケンサー用の配列を付加した。PCR 産物はカラムにより精製し、次世代シーケンサー解析に用いた。

3-3-2 次世代シーケンサー解析結果

ルテランに対する各バイオパニング後のサンプルについて、Miseq (Illumina) で解析した結果を、表 3-2-1 に示す。

表 3-2-1 次世代シーケンサーによる解析結果

	0 round	1 round	2 round	3 round
Total number of sequences read	507255	265938	512819	164760
Number of merged sequences	166390	80315	74961	57344
Extracted sequences on USEARCH	164413(100 %)	79434(100 %)	73970(100 %)	56713(100 %)
Number of unique sequences	146461(89 %)	71591(90 %)	55133(75 %)	26192(46 %)
Highest frequency	546(0.33 %)	227(0.29 %)	1040(1.41 %)	4421(7.80 %)
Single occurrence sequences	140343(85 %)	68098(86 %)	50589(68 %)	23219(41 %)

3-3-3 系統樹解析の比較

次世代シーケンサーで解析して得た各ラウンド後の配列の存在率を比較し、バイオパニング前と後での存在率を増幅率として表した。増幅率が上位 50 位に含まれる配列について、遺伝子情報ソフトウェア Genetyx を用い系統樹解析を行った（図 3-2-3）。

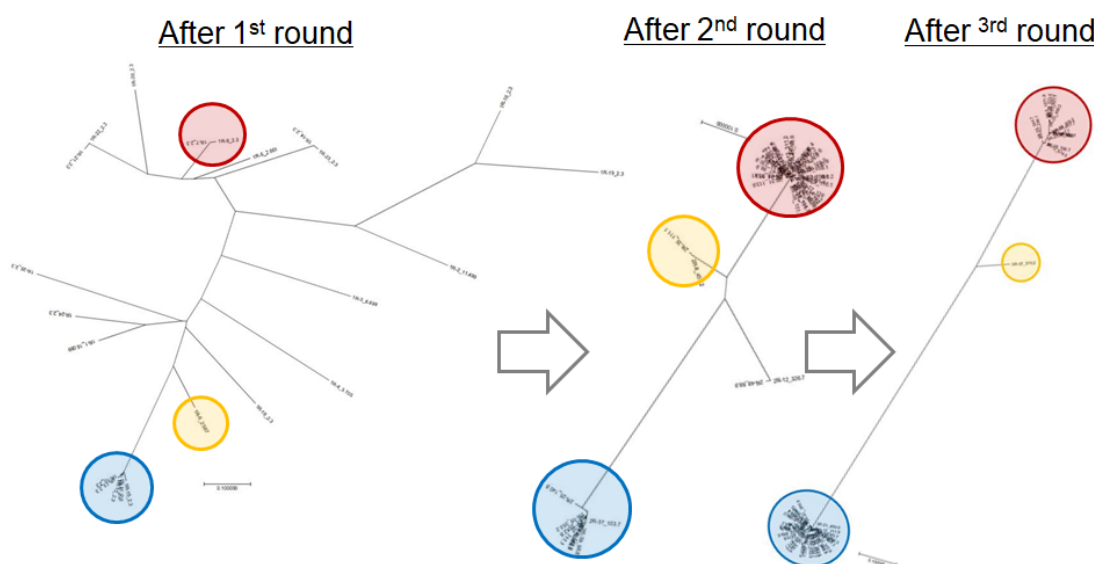


図 3-2-3 各ラウンド後の増幅率上位 50 位の配列による系統樹解析

3 ラウンドで集約された 3 つのクラスターは 1, 2 ラウンド後の増幅率上位 50 位のクラスターの中にも含まれている。

3 つのクラスターのうち 2 つのクラスターについては、第 2 章で単離された抗ルテラン抗体、C7（クラスター赤）と A7（クラスター青）の VH 配列を含んでいた。

3-4 考察

本章では、肝ガン患者由来の抗体ファージライブラリからのルテラン特異的抗体の探索をモデルとし、バイオパニングと次世代シーケンサーによる網羅的配列解析を組み合わせた手法による抗体ファージライブラリからのヒト抗体の選別方法について検証した。その結果、バイオパニング前後での出現頻度の変化（増幅率）を比較することにより、ルテラン特異的な3つのクローンを同定することができた。また、次世代シーケンサーで得られる情報がVH配列のみであることから、VHのCDR3を標的にしたPCRによって、scFv遺伝子を構築する手法を確立することができた。

バイオパニング前後の系統樹の比較によると、3ラウンドで濃縮してきたクローンは、1ラウンド後にすでに増幅率上位 50 位に含まれていた。このことから、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を用いることにより、より少ないラウンドでの抗体の選別が可能となることが示された。

以上のことより、今回構築したヒト抗体ファージライブラリからのバイオパニングと次世代シーケンシングによる抗体選別方法は、より迅速で多様な抗体の選別に有用であることが示された。

第 4 章 次世代シーケンサーを利用した
グルテン特異的抗体の単離
(非公開)

第 5 章 総括

本研究では、疾患関連抗原に特異的な抗体の単離における患者由来の抗体ファージライブラリの有用性を明らかにするため、肝ガン患者由来の抗体ライブラリを構築し、そこから肝ガン抗原ルテランに対する特異的なファージ抗体の単離を試みた。肝ガン患者由来の抗体ライブラリからのみ、ルテランに対する抗体が単離されたことは、ガン患者がガンに対する自己抗体を産生していることを示唆している。

バイオパニングにより得られた2種類のルテラン特異的なファージ抗体について、構造および機能解析を行ったところ、クローン A7 は配列解析の結果、VH と GS linker のみの短い配列を有しており、ファージ上に提示させた状態でのみルテランに対する結合活性を示した。クローン C7 は完全な scFv 配列を有しており、ルテランの D2 ドメインを認識した。C7 ファージ抗体は、ルテランとラミニン $\alpha 5$ 鎖の結合阻害活性を示したが、可溶型 scFv では阻害活性を示さなかった。これは、ファージ粒子のかさ高さによる立体的な阻害活性であったと考えられる。C7 についての詳細なエピトープマッピングの結果、得られた抗体の結合に必要な残基とルテランがラミニン $\alpha 5$ 鎖と結合するときに重要な残基の位置は離れていたことから、C7 の可溶型 scFv ではルテランとラミニン $\alpha 5$ 鎖の結合を阻害できないという結果を理解することができた。

バイオパニングによる従来の抗体ファージライブラリからの特異的な抗体の探索方法は、そのクローニング、スクリーニングステップの煩雑性とスクリーニングできる数が限定されることによる問題が指摘されている。本研究では、ルテラン特異的な抗体の単離をモデルとして、バイオパニングと次世代シーケンサーによる網羅的な配列解析を組み合わせた手法によるヒト抗体探索法の構築を行った。特異的な抗体の選別には、バイオパニング前後での出現頻度の変化を増幅率として算出し評価に用いた。次世代シーケンサーを用いることにより、通常のバイオパニングでは拾えなかったクローンについても評価することができ、この手法が抗体ファージライブラリを用いた新たなヒト抗体探索法として有用であることが示された。

以上のことより、ヒト抗体の探索においては、疾患の治療や診断への応用、疾患の病

態解明研究への応用が可能な抗体を獲得するためのツールとして、患者由来の抗体ファージライブラリが有用であることが示された。さらに、バイオパニングと次世代シーケンサーによる網羅的配列解析を組み合わせた手法は、抗体探索を行う上で、迅速に多様な抗体を得るためのシステムとして有益であることが示された。

引用文献

1. Milstein, C., The hybridoma revolution: an offshoot of basic research. *Bioessays* **1999**, *21* (11), 966-973.
2. Satoh, M.; Shitara, K.; Hanai, N., The current stream and prospect of glycoscience application - Therapeutic antibodies. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* **2006**, *18*(100), 129-136.
3. Pavoni, E.; Monteriu, G.; Santapaola, D.; Petronzelli, F.; Anastasi, A. M.; Pelliccia, A.; D'Alessio, V.; De Santis, R.; Minenkova, O., Tumor-infiltrating B lymphocytes as an efficient source of highly specific immunoglobulins recognizing tumor cells. *Bmc Biotechnology* **2007**, *7*.
4. Heo, C. K.; Woo, M. K.; Yu, D. Y.; Lee, J. Y.; Yoo, J. S.; Yoo, H. S.; Ko, J. H.; Kim, J. M.; Choi, J. Y.; Kim, I. G.; Paik, S. G.; Cho, E. W., Identification of autoantibody against fatty acid synthase in hepatocellular carcinoma mouse model and its application to diagnosis of HCC. *International Journal of Oncology* **2010**, *36* (6), 1453-1459.
5. Dai, L.; Tsay, J. C.; Li, J.; Yie, T. A.; Munger, J. S.; Pass, H.; Rom, W. N.; Zhang, Y.; Tan, E. M.; Zhang, J. Y., Autoantibodies against tumor-associated antigens in the early detection of lung cancer. *Lung Cancer* **2016**, *99*, 172-9.
6. Yamamoto, S.; Ouchi, Y.; Nakatsuka, D.; Tahara, T.; Mizuno, K.; Tajima, S.; Onoe, H.; Yoshikawa, E.; Tsukada, H.; Iwase, M.; Yamaguti, K.; Kuratsune, H.; Watanabe, Y., Reduction of [11C](+)-3-MPB binding in brain of chronic fatigue syndrome with serum autoantibody against muscarinic cholinergic receptor. *PLoS One* **2012**, *7*(12), e51515.
7. Ramirez, A. B.; Loch, C. M.; Zhang, Y. Z.; Liu, Y.; Wang, X. H.; Wayner, E. A.; Sargent, J. E.; Sibani, S.; Hainsworth, E.; Mendoza, E. A.; Eugene, R.; LaBaer, J.; Urban, N. D.; McIntosh, M. W.; Lampe, P. D., Use of a Single-Chain Antibody Library for Ovarian Cancer Biomarker Discovery. *Molecular & Cellular Proteomics* **2010**, *9* (7), 1449-1460.
8. Tan, H. T.; Low, J.; Lim, S. G.; Chung, M. C. M., Serum autoantibodies as biomarkers for early cancer detection. *Febs Journal* **2009**, *276* (23), 6880-6904.
9. Ran, Y. L.; Hu, H.; Zhou, Z.; Yu, L.; Sun, L. X.; Pan, J.; Liu, J.; Yang, Z. H., Profiling tumor-associated autoantibodies for the detection of colon cancer. *Clinical Cancer Research* **2008**, *14* (9), 2696-2700.
10. Zhong, L.; Ge, K.; Zu, J. C.; Zhao, L. H.; Shen, W. K.; Wang, J. F.; Zhang, X. G.; Gao, X.; Hu, W. P.; Yen, Y.; Kernstine, K. H., Autoantibodies as potential biomarkers for breast cancer. *Breast Cancer Research* **2008**, *10* (3).

11. Smith, G. P., FILAMENTOUS FUSION PHAGE - NOVEL EXPRESSION VECTORS THAT DISPLAY CLONED ANTIGENS ON THE VIRION SURFACE. *Science* **1985**, *228* (4705), 1315-1317.
12. de Haard, H. J.; van Neer, N.; Reurs, A.; Hufton, S. E.; Roovers, R. C.; Henderikx, P.; de Bruine, A. P.; Arends, J. W.; Hoogenboom, H. R., A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274* (26), 18218-18230.
13. Marks, J. D.; Hoogenboom, H. R.; Bonnert, T. P.; McCafferty, J.; Griffiths, A. D.; Winter, G., By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* **1991**, *222* (3), 581-97.
14. Reddy, S. T.; Ge, X.; Miklos, A. E.; Hughes, R. A.; Kang, S. H.; Hoi, K. H.; Chrysostomou, C.; Hunicke-Smith, S. P.; Iverson, B. L.; Tucker, P. W.; Ellington, A. D.; Georgiou, G., Monoclonal antibodies isolated without screening by analyzing the variable-gene repertoire of plasma cells. *Nat Biotechnol* **2010**, *28* (9), 965-9.
15. 't Hoen, P. A.; Jirka, S. M.; Ten Broeke, B. R.; Schultes, E. A.; Aguilera, B.; Pang, K. H.; Heemskerk, H.; Aartsma-Rus, A.; van Ommen, G. J.; den Dunnen, J. T., Phage display screening without repetitious selection rounds. *Anal Biochem* **2012**, *421* (2), 622-31.
16. Miyazaki, N.; Kiyose, N.; Akazawa, Y.; Takashima, M.; Hagihara, Y.; Inoue, N.; Matsuda, T.; Ogawa, R.; Inoue, S.; Ito, Y., Isolation and characterization of antigen-specific alpaca (*Lama pacos*) VHH antibodies by biopanning followed by high-throughput sequencing. *J Biochem* **2015**, *158* (3), 205-15.
17. Ajayi, A. O., Hepatocellular carcinoma: Risk factors, pattern of presentation and outcome in a tertiary health facility. *International Journal of Medicine and Medical Sciences* **2009**, *1*, 084-087.
18. Patarroyo, M.; Tryggvason, K.; Virtanen, I., Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. *Semin Cancer Biol* **2002**, *12* (3), 197-207.
19. Yang, J. D.; Nakamura, I.; Roberts, L. R., The tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma: current status and therapeutic targets. *Semin Cancer Biol* **2011**, *21* (1), 35-43.
20. Kikkawa, Y.; Ogawa, T.; Sudo, R.; Yamada, Y.; Katagiri, F.; Hozumi, K.; Nomizu, M.; Miner, J. H., Lutheran/Basal Cell Adhesion Molecule promotes tumor cell migration by modulating integrin-mediated cell attachment to laminin-511. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 30990-31001.
21. Kikkawa, Y.; Sudo, R.; Kon, J.; Mizuguchi, T.; Nomizu, M.; Hirata, K.; Mitaka, T., Laminin alpha 5 mediates ectopic adhesion of hepatocellular carcinoma through integrins and/or Lutheran/basal cell adhesion molecule. *Exp Cell Res* **2008**, *314* (14), 2579-90.

22. Parsons, S. F.; Mallinson, G.; Holmes, C. H.; Houlihan, J. M.; Simpson, K. L.; Mawby, W. J.; Spurr, N. K.; Warne, D.; Barclay, A. N.; Anstee, D. J., The Lutheran blood group glycoprotein, another member of the immunoglobulin superfamily, is widely expressed in human tissues and is developmentally regulated in human liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1995**, *92* (12), 5496-5500.
23. Rahuel, C.; Le Van Kim, C.; Mattei, M. G.; Cartron, J. P.; Colin, Y., A unique gene encodes spliceforms of the B-cell adhesion molecule cell surface glycoprotein of epithelial cancer and of the Lutheran blood group glycoprotein. *Blood* **1996**, *88*, 1865-1872.
24. El Nemer, W.; Rahuel, C.; Colin, Y.; Gane, P.; Cartron, J. P.; Le Van Kim, C., Organization of the human LU gene and molecular basis of the Lu(a)/Lu(b) blood group polymorphism. *Blood* **1997**, *89* (12), 4608-16.
25. Udani, M.; Zen, Q.; Cottman, M.; Leonard, N.; Jefferson, S.; Daymont, C.; Truskey, G.; Telen, M. J., Basal cell adhesion molecule/lutheran protein. The receptor critical for sickle cell adhesion to laminin. *J Clin Invest* **1998**, *101* (11), 2550-8.
26. Lee, S. P.; Cunningham, M. L.; Hines, P. C.; Joneckis, C. C.; Orringer, E. P.; Parise, L. V., Sickle cell adhesion to laminin: potential role for the alpha5 chain. *Blood* **1998**, *92*, 2951-2958.
27. Zen, Q.; Cottman, M.; Truskey, G.; Fraser, R.; Telen, M. J., Critical factors in basal cell adhesion molecule/lutheran-mediated adhesion to laminin. *J Biol Chem* **1999**, *274* (2), 728-34.
28. Mankelow, T. J.; Burton, N.; Stefansdottir, F. O.; Spring, F. A.; Parsons, S. F.; Pedersen, J. S.; Oliveira, C. L.; Lammie, D.; Wess, T.; Mohandas, N.; Chasis, J. A.; Brady, R. L.; Anstee, D. J., The Laminin 511/521-binding site on the Lutheran blood group glycoprotein is located at the flexible junction of Ig domains 2 and 3. *Blood* **2007**, *110* (9), 3398-406.
29. Kikkawa, Y.; Sudo, R.; Kon, J.; Mizuuchi, T.; Nomizu, M.; Hirata, K.; Mitaka, T., Laminin alpha 5 mediates ectopic adhesion of hepatocellular carcinoma through integrins and/or Lutheran/basal cell adhesion molecule. *Experimental Cell Research* **2008**, *314* (14), 2579-2590.
30. Muraoka, J.; Ozawa, T.; Enomoto, Y.; Kiyose, N.; Imamura, A.; Arima, K.; Nakayama, H.; Ito, Y., Selection and characterization of human serum albumin-specific porcine scFv antibodies using a phage display library. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother* **2014**, *33* (1), 42-8.
31. Kikkawa, Y.; Miwa, T.; Tohara, Y.; Hamakubo, T.; Nomizu, M., An Antibody to the Lutheran Glycoprotein (Lu) Recognizing the LU4 Blood Type Variant Inhibits Cell Adhesion to Laminin alpha 5. *Plos One* **2011**, *6* (8).
32. Kikkawa, Y.; Moulson, C. L.; Virtanen, I.; Miner, J. H., Identification of the binding site

- for the Lutheran blood group glycoprotein on laminin alpha 5 through expression of chimeric laminin chains in vivo. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277 (47), 44864-44869.
33. Fukutomi, Y.; Taniguchi, M.; Nakamura, H.; Akiyama, K., Epidemiological link between wheat allergy and exposure to hydrolyzed wheat protein in facial soap. *Allergy* **2014**, 69 (10), 1405-11.
34. Lu, D.; Shen, J.; Vil, M. D.; Zhang, H.; Jimenez, X.; Bohlen, P.; Witte, L.; Zhu, Z., Tailoring in vitro selection for a picomolar affinity human antibody directed against vascular endothelial growth factor receptor 2 for enhanced neutralizing activity. *J Biol Chem* **2003**, 278 (44), 43496-507.
35. Brockmann, E. C.; Akter, S.; Savukoski, T.; Huovinen, T.; Lehmusvuori, A.; Leivo, J.; Saavalainen, O.; Azhayev, A.; Lövgren, T.; Hellman, J.; Lamminmäki, U., Synthetic single-framework antibody library integrated with rapid affinity maturation by VL shuffling. *Protein Eng Des Sel* **2011**, 24 (9), 691-700.

業績目録

発表論文

[筆頭]

“An Anti-Human Lutheran Glycoprotein Phage Antibody Inhibits Cell Migration on Laminin511: Epitope Mapping of the Antibody”, Yurie Enomoto-Okawa, Yuka Maeda, Nozomi Harashima, Yumika Sugawara, Fumihiko Katagiri, Kentaro Hozumi, Kam Man Hui, Motoyoshi Nomizu, Yuji Ito, Yamato Kikkawa, *PLOS ONE*, 2017, 12(1), pp. e0167860.

[非筆頭]

“Selection and Characterization of Human Serum Albumin-specific Porcine scFv Antibodies Using a Phage Display Library”, Muraoka Junko, Ozawa Takuya, Enomoto Yurie, Kiyose Norihiko, Imamura Ayana, Arima Kazunari, Nakayama Hiroshi, and Ito Yuji, *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*, 2014, 33(1), 42-8.

国際学会報告 2 演題

国内学会報告 9 演題

出版物 1 本

謝辞

本研究は、鹿児島大学大学院、理工学研究科システム情報科学専攻、有機化学講座（伊東研究室）で行われ、私が本研究室に在籍した5年間の成果になります。

御懇意なご指導とご鞭撻を賜りました主指導教官の伊東祐二教授に深く感謝致します。また、副査としてご指導頂きました内海俊樹教授、橋本雅仁教授、九町健一准教授へこの場を借りて心より感謝申し上げます。さらに、ルテラン特異的な抗体の単離及び機能性解析においてご協力いただいた東京薬科大学の吉川大和准教授及び病態生化学教室の皆様、次世代シーケンサーのデータ取得・解析にご協力いただいた京都大学の松田知成准教授、伊東研究室の加藤由貴子さま、サンプルをご提供いただきましたNational Cancer Centre（Singapore）のKam Man Hui 先生、国立医薬品食品衛生研究所の手島玲子先生、安達玲子先生、国立病院機構相模原病院臨床研究センターの福富有馬先生、鹿児島大学大学院医歯学総合研究科の有馬直道教授に深く感謝申し上げます。