

ファージライブラリ法による抗原特異的ブタ単鎖抗体の  
単離および特性解析に関する研究

Study on Isolation and Characterizations of Antigen-Specific  
Porcine Antibodies Using Single Chain Antibody Phage Libraries

鹿児島大学 大学院理工学研究科

博士後期課程 システム情報科学専攻

村岡 純子

## 目次

要旨	1
序論	3
第1章 抗体医薬およびその作製方法	
1-1 小序論	7
1-2 抗体医薬品の種類	9
1-3 抗体医薬品の作製方法	11
1-4 ファージディスプレイ法を用いた抗体作製方法とその有用性	14
1-5 小括	17
1-6 引用文献	18
第2章 ブタ抗体の遺伝子解析	
2-1 小序論	19
2-2 方法	20
2-3 結果および考察	
2-3-1 ブタ抗体配列解析	20
2-3-2 ブタ抗体、ヒト抗体、マウス抗体のアミノ酸配列相同性解析	29
2-3-3 ブタ単鎖抗体ライブラリ作製のためのプライマー設計	31
2-4 小括	33
2-5 引用文献	34
第3章 ファージディスプレイ法を用いたヒト血清アルブミン特異的ブタ単鎖抗体の単離とその特異性評価	
3-1 小序論	35
3-2 材料と方法	
3-2-1 ブタへの免疫及び抗体価評価	36
3-2-2 ブタ単鎖抗体ライブラリの構築	36
3-2-3 ヒト血清アルブミン特異的結合ファージの単離	38
3-2-4 ヒト血清アルブミン特異的結合ファージの結合特異性評価 (ELISA)	40
3-2-5 単鎖抗体の大腸菌での発現	40
3-2-6 Western blotting	41

3-2-7	親和性解析	41
3-3	結果と考察	
3-3-1	ブタ単鎖抗体ライブラリの構築	42
3-3-2	ヒト血清アルブミン特異的結合ファージの単離	42
3-3-3	ヒト血清アルブミン特異的結合ファージの結合特異性評価と 単離クローンの配列解析	44
3-3-4	ブタ由来単鎖(scFv)抗体の大腸菌での発現特性	47
3-3-5	ブタ由来単鎖(scFv)抗体の親和性解析	49
3-4	小括	51
3-5	引用文献	52
第4章	ヒト血清アルブミン特異的ブタ抗体の抗原認識特性評価	
4-1	小序論	53
4-2	材料と方法	
4-2-1	ヒト血清アルブミン抗体特異的ブタ抗体を用いた VH/VL 置換抗体の作製	55
4-2-2	VH/VL 置換抗体の大腸菌発現と精製	55
4-2-3	Western blotting	56
4-2-4	VH/VL 置換抗体の結合特性評価(ELISA)	57
4-2-5	VH/VL 置換抗体の親和性評価(Biacore)	57
4-2-6	VH/VL 置換抗体のアミノ酸解析と構造予測	57
4-3	結果と考察	
4-3-1	ブタ抗体とヒト抗体のアミノ酸配列相同性解析	58
4-3-2	VH/VL 置換抗体の大腸菌発現と精製	60
4-3-3	VH/VL 置換抗体の結合特性評価(ELISA、Biacore)	61
4-3-4	VH/VL 置換抗体のアミノ酸解析と構造予測	65
4-4	小括	72
4-5	引用文献	73
第5章	総括	74
文献リスト・学会報告		76
謝辞		

## 要旨

本研究は、ファージライブラリ法による抗原特異的ブタ単鎖抗体の単離および特性解析に関するものである。具体的には、産業上特に医薬品応用を目指した抗体開発において、有用な抗体を作製するための免疫動物としてのブタの利用可能性を検討することを目標としたものである。抗体を医薬品として応用する際には、抗体をヒト化することが必要である。まずブタ抗体遺伝子解析から、ブタ抗体の重鎖配列（VH3）がヒト抗体重鎖配列と高い相同性を示すことを見出した。そこで、抗体開発手法として広く利用されているファージディスプレイ法を用いて単鎖ブタ抗体ライブラリを構築し、ライブラリからの抗体の単離、さらに単離されたブタ単鎖抗体の特性解析を試みた。

まず行ったブタ抗体遺伝子解析から、ブタ体内で発現している抗体遺伝子は重鎖、軽鎖ともに限られた遺伝子ファミリーのみで構成されている点、またブタ抗体の重鎖配列はヒト抗体の重鎖配列（VH3）と相同性が高い点を見出した。これらのことからブタから単離される抗体が常にヒト抗体（VH3）と相同性が高い可能性があるため、ブタ抗体を用いることで従来よりも抗体のヒト化を容易にすると考えられた。一方で、抗体医薬品開発で多用されるマウス抗体においてもヒト抗体と相同性の高いファミリーは存在するがその例は多くない。以上から、ヒト化抗体の作製容易性については、マウス抗体よりもブタ抗体が大きく優れている可能性が示された。

そこで、ヒト血清アルブミン（HSA）をブタに免疫し、獲得された抗体の遺伝子配列を単鎖抗体（single chain Fv:scFv）構造に再構築し、ファージライブラリを作製した。作製したファージライブラリをバイオパンニングすることで抗原特異的 scFv の単離を試みた結果、9 クローンの単離に成功した。9 クローンの中から 4 クローンを選択し、SPR(Surface Plasmon Resonance Analysis)解析を行った結果、抗 HSA ブタ scFv の Kd 値が約  $10^{-8}$  M であることが示された。

次に獲得された抗原特異的ブタ抗体が有する抗原認識特性を評価するため、ブタ scFv の軽鎖遺伝子（VL）を別のブタ抗体 VL へ置換した。その結果 VL を置換しても抗体の抗原結合能が維持されることが示された。このことからブタ抗体抗原認識に VH が主として寄与することが示唆された。さらに、ブタ VL をヒト VL (anti-Her2, 4D5) に置換した抗体においても抗原結合能は失われず、結合親和性はほぼ維持されることが示された。最後に、立体構造モデリングを用いてブタ抗体（D4）と VL 置換抗体（D4/4D5）の構造予測を行った結果、VL 置換抗体（D4/4D5）の全体構造および VH 鎖と VL 鎖が相互作用する界面領域が安定に保たれていることが確認された。

以上のことから本研究では、結合親和性および結合特異性に優れたブタ抗体を得る手法を開発し、さらにヒト化の手段の一つとして VL ドメインの置換が極めて有効であることを示すと共に、ブタ抗体からヒト化抗体への変換が容易であることを示した。これらの結果

は、医薬品応用を目指した抗体開発において、ブタが有用な免疫動物であることを示唆するものであり、今後の抗体研究・開発において応用が期待される。

## 序論

抗体は、診断・試験試薬として用いられるのみならず、抗体医薬としても用いられており、産業上、非常に重要な生物学的な分子である。抗体は、化合物、ペプチド、タンパク質、細胞、などのような種々の標的を認識することができ、新しい抗体作製に関する開発や研究が世界中で進行している。抗体を得るための最も基本的な方法は、抗原免疫したマウスの脾臓から得られたB細胞とミエローマ細胞との融合によるハイブリドーマ技術<sup>1</sup>である。マウス由来モノクローナル抗体の多くは、この方法により得られる。一方、G.P.Smithにより初めて報告されたファージディスプレイ技術<sup>2</sup>は、親和性結合分子を作製するための強力なツールであり、マウスやマウス以外の動物種由来の抗体を得る方法として、単鎖可変フラグメント (scFv の) および Fab のようなモノクローナル抗体断片を単離するために広く使用されている<sup>3 4 5 6</sup>。この方法において、抗体は、ファージコートタンパク質との融合タンパク質として発現され、ファージ表面上に提示される。抗体提示ファージは、Affinity Selection によって所望の特性を有するファージのみを選択され、その後、ファージ上に表示された抗体に対応する遺伝子を得ることができる。

ブタは長い時間、食肉の供給源であったが、最近では医療研究の分野<sup>7 8</sup>、異種移植への応用<sup>9 10</sup>、ミニブタの生産<sup>11</sup>など実験動物としての価値が見直されている。しかしながら、特に医療研究の分野ではブタの重要性は明らかであるものの、ブタの抗体についての報告は少ない。ブタ抗体の VH 遺伝子を、human、horses (*Equus caballus*)、sheep (*Ovis aries*)、cattle (*Bos taurus*) と比較すると、それらの間でブタはヒト VH3 に最も類似していることがわかっている<sup>12</sup>。また、ブタ抗体遺伝子の発現解析の結果、生体内では限られた遺伝子ファミリーのみ発現していることが示されており<sup>13</sup>、発現していた抗体の80%は5つの VH3 ファミリーであることや、1つの VL $\kappa$  ファミリー (IGKV2) と 2つの VL $\lambda$  ファミリー (IGLV3 and IGLV8) で構成されていることが明らかになっている<sup>14</sup>。ヒトやマウスと比較して、ブタの抗体は小さな抗体遺伝子レパートリーから構成されており、このため、ブタ抗体の免疫学的多様性は、免疫系における Somatic hypermutation (体細胞突然変異) により大きく依存した形で維持されると考えられている<sup>15</sup>。

ブタ抗体が小さな抗体遺伝子ファミリーから構成されていることは、ブタの抗体を開発する上でいくつかの利点を与える。ブタ抗体遺伝子をクローニングする際に必要なプライマー種類が少ないことはコスト面での利点であり、また複数プライマーを用いるマルチプレックス PCR と比較して PCR 反応条件検討が容易であることも予想される。以前の報告で、ブタ scFv 抗体をファージディスプレイ技術により抗体タンパク質を提示した例があり<sup>16</sup>、この場合も少ないプライマー種類を用いて実施されている。また、小さな抗体遺伝子ファミリーからクローニングされるブタ抗体 VH 遺伝子が、常にヒト VH3 遺伝子に近似していることは、クローニングに続いて行われるヒト化などの遺伝子改変の作業がし易く、方法を

確立しやすいと予想される。このような特徴を有するブタ抗体は、抗体研究の材料として有望であると考えられるものの、これまでに特定の抗原に結合するモノクローナル抗体が単離されておらず、詳細な抗体特性は報告されていない。そのため、ブタ抗体の特徴や応用分野についての議論はなく、その利用可能性は未知のままであった。

本研究では、産業上特に医薬品応用を目指した抗体開発において、有用な抗体を作製するための免疫動物として、ブタの利用可能性を検討することを目標としたものである。我々はファージディスプレイ法を用いた単鎖ブタ抗体ライブラリの構築とライブラリからの抗体の単離、さらに単離されたブタ単鎖抗体の結合特性解析を通して、ブタ抗体の利用可能性、特に医薬品分野におけるブタ抗体の応用可能性について検討した。

## 〈引用論文〉

1. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975;256(5517):495-497.
2. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. 1985;228:1315-1317.
3. Knappik a, Ge L, Honegger a, et al. Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol*. 2000;296(1):57-86.
4. Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A, Wyns L, Hamers R, Muyldermans S. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett*. 1997;414:521-526.
5. Ridder R, Schmitz R, Legay F, Gram H. Generation of rabbit monoclonal antibody fragments from a combinatorial phage display library and their production in the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology (N Y)*. 1995;13:255-260.
6. Davies EL, Smith JS, Birkett CR, Manser JM, Anderson-Dear DV, Young JR. Selection of specific phage-display antibodies using libraries derived from chicken immunoglobulin genes. *J Immunol Methods*. 1995;186(1):125-35.
7. Atanasova K, Van Gucht S, Van Reeth K. Anti-TNF-alpha therapy does not ameliorate disease in a model of acute virus-endotoxin mediated respiratory disease in pigs. *Vet Immunol Immunopathol*. 2010;137:12-19.
8. Cheng ML, Zhao SM, Li WZ, et al. Anti-adipocyte scFv-Fc antibody suppresses subcutaneous adipose tissue development and affects lipid metabolism in minipigs. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010;162:687-697.
9. Lai L, Kolber-Simonds D, Park K-W, et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*. 2002;295(5557):1089-92.
10. Wilson CA. Endogenous retroviruses: Porcine endogenous retroviruses and xenotransplantation. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65:3399-3412.
11. Kamimura R, Setoyama K, Yabuki A, Tottori J, Suzuki S. Characteristics and gender differences concerning pulmonary hemodynamics in Clawn miniature pigs. *Exp Anim*. 2007;56:375-378.
12. Almagro JC, Martinez L, Smith SL, Alagon A, Estevez J, Paniagua J. Analysis of the horse VH repertoire and comparison with the human IGHV germline genes, and sheep, cattle and pig VH sequences. *Mol Immunol*. 2006;43:1836-1845.
13. Sun J, Kacsokovics I, Brown WR, Butler JE. Expressed swine VH genes belong to a small VH gene family homologous to human VHIII. *J Immunol*. 1994;153:5618-5627.



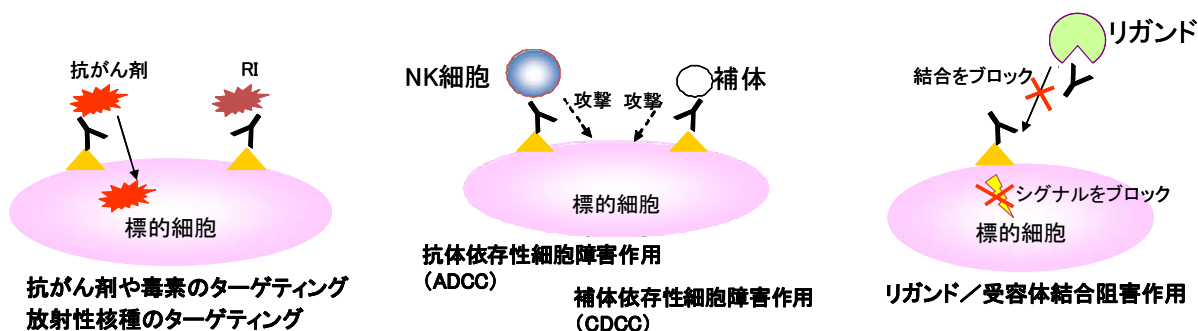
14. Butler JE, Sun J, Wertz N, Sinkora M. Antibody repertoire development in swine. *Dev Comp Immunol.* 2006;30(1-2):199-221.
15. Butler JE, Sun X, Wertz N, et al. Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets XXI. Usage of most VH genes remains constant during fetal and postnatal development. *Mol Immunol.* 2011;49(3):483-94.
16. Li F, Aitken R. Cloning of porcine scFv antibodies by phage display and expression in *Escherichia coli*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004;97(1-2):39-51.

## 第1章 抗体医薬およびその作製方法

### 1-1 小序論

近年、低分子医薬品と並ぶ重要な薬剤として抗体医薬開発が活発に行われている。抗体医薬は、生体の異物認識応答（免疫応答）の主要成分である抗体タンパク質が持つ高い親和性と特異性を利用した医薬品であり、副作用の少ない分子標的医薬として広く利用が進んでいる。抗体医薬は、主に以下の活性により医薬品としての活性を示している<sup>1</sup>。

- ① ターゲティング（抗がん剤や毒素、放射性核種）
- ② ADCC (Antibody-Dependent-Cellular-Cytotoxicity：抗体依存性細胞傷害) 活性
- ③ CDC 活性
- ④ リガンド/受容体結合阻害活性



①ターゲティングとは、抗がん剤や毒素、放射性核種などで修飾した抗体をがん細胞などの標的細胞に結合させることで薬効を得る方法である。抗体は標的細胞へ集中的に薬剤を到達させるキャリアーとして利用され、正常細胞への薬剤作用を減少させることで副作用を抑えられることが期待される。②ADCC 活性とは、標的細胞の抗原に結合した抗体が、マクロファージやNK 細胞といったエフェクター細胞を呼び寄せ、エフェクター細胞から放出される物質により直接的に標的細胞を殺傷する活性のことである。③CDC 活性とは、抗体が標的細胞の抗原に結合すると補体系が活性化し、標的細胞を殺傷する活性のことである。④リガンド/受容体結合阻害作用とは、抗体が細胞やリガンドに結合することで、シグナルを止める活性のことである。がん細胞などの標的細胞には、増殖因子などの刺激で増殖するものがあり、標的細胞の増殖刺激を受ける受容体に抗体が結合することで標的細胞への

増殖刺激を遮断し、増殖を抑制することができる。また、標的細胞上の受容体へシグナルを伝達するために抗体を用いる方法もある。このように抗体医薬は、抗体と抗原が特異的に結合する反応（抗原抗体反応）を利用して、薬剤伝達や免疫反応の起点として働くことで医薬品として機能している。

このように抗体が医薬品として利用されるようになったのは、「マウス抗体遺伝子をヒト型に組み換える、抗体のヒト化技術」の進展が大きく貢献している。医薬品として薬効を実現する抗体は、抗体であればどのようなものでもよいわけではなく、仮にマウス抗体を医薬品としてそのままヒトに使用すれば、ヒト体内で抗マウス抗体の産生により異物として排除されてしまい、薬効を得ることができない。ヒト体内で抗原として認識されず、十分な時間血中に滞留させるためには、抗体医薬はヒト抗体として認識され免疫系から逃れなくてはならない。マウス抗体を医薬品とするためには、「ヒト化技術」によりマウス抗体のタンパク質配列をヒト抗体に似せる必要がある。

以下では、市販の抗体医薬品の種類とヒト化抗体の作製方法、さらにファージディスプレイ法について述べ、抗体開発においてブタを免疫動物として利用することの利点について検討した。

## 1-2 抗体医薬品の種類

現在までに様々な疾患に対する抗体医薬が開発され医薬品として認可されている。Table1 には既承認抗体医薬の一覧を示した<sup>2</sup>。抗体が認識する標的は、疾患に関与する受容体やリガンドである。これらヒト由来標的タンパク質に結合する抗体は、通常、ヒト以外の他動物（多くはマウス）に免疫することで、他動物体内で作られた抗ヒト標的タンパク抗体として得ることができる。しかし、1-1 で記載の通り、そのままヒトに使用すれば、ヒト体内で抗マウス抗体が産生することによって異物として排除されてしまい、薬効を得ることができない。そのため、現在使用されている抗体医薬は主にキメラ抗体、ヒト化抗体の2種が用いられている。キメラ抗体とはマウスの可変領域とヒトの定常領域から構成された抗体であり、ヒト化抗体とはマウスの相補鎖決定領域とヒトの可変領域フレームワークとヒトの定常領域から構成された抗体である。抗体構成に関する詳細は次項以降に記載した。

現在、抗体医薬品開発が盛んに行われている一方で、多大な予算と時間をかけながらも認可まで到達できる抗体医薬品は少ないように思われる。開発が難しい要因は様々ではあるが、一つの要因は、他動物由来抗体の機能を維持しながら、抗体をヒト型に近づけるエンジニアリングの困難さと考えられる。仮に良いマウス抗体が取得できたとしても、ヒト型にするために置換すべきアミノ酸が多ければ、抗体と標的の特異的結合が失われる可能性も高くなり、結果として使用できない抗体となってしまうかもしれない。このような問題が解決できれば、抗体医薬品開発は大きく進展すると期待される。

また一方で、マウス以外の動物（ウサギやヒツジなど）も免疫動物として利用することは可能であるにも関わらず、医薬品としてはマウス抗体が中心を占めている。マウスではモノクローナル抗体を得る方法としてハイブリドーマ法が確立されている点や、マウス抗体からヒト抗体への変換した実績が多く蓄積している点、安全性評価技術やこれまでの臨床実績が存在する点などが、マウス抗体が多く用いられる理由と考えられる。しかしながら、他動物を用いることによる利点が明らかとなり、マウス抗体と同様にヒト化を行える手法が確立できれば、これまでマウス抗体ではヒト化抗体の作製ができなかった抗原に対しても、抗体を作製することができるかもしれず、今後の抗体医薬の可能性を広げる可能性があると考えられる。

名称	商品名	種類	標的	主な適応疾患
<b>抗腫瘍薬</b>				
Rituximab	Rituxan, MabThera	キメラ抗体 IgG1 $\kappa$	CD20	B細胞性非ホジキンリンパ腫
Trastuzumab	Herceptin	ヒト化抗体 IgG1 $\kappa$	HER2	転移性乳がん
Denileukin Diftitox	Ontak	融合タンパク質 IL2 + Diphtheria toxin	IL2R	皮膚T細胞リンパ腫
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg	ヒト化抗体IgG4 $\kappa$ (カリケアマイシン結合)	CD33	急性骨髄性白血球
Alemtuzumab	Campath, MabCampath	ヒト化抗体 IgGa $\kappa$	CD52	B細胞性慢性リンパ性白血病
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin	マウス抗体 IgG1 $\kappa$ (90Y 標識)	CD20	B細胞性非ホジキンリンパ腫
Iodine 131 Tositumomab	Bexxar	マウス抗体 IgG2a $\lambda$ (131I 標識)	CD20	非ホジキンリンパ腫
Cetuximab	Erbix	キメラ抗体 IgG1 $\kappa$	EGFR	頭頸部癌, 結腸・直腸癌
Bevacizumab	Avastin	ヒト化抗体 IgG1	VEGF	結腸・直腸癌
Panitumumab	Vectibix	ヒト化抗体 IgG2 $\kappa$	EGFR	結腸・直腸癌
<b>免疫調節薬</b>				
Muromonab-CD3	Orthoclone OKT3	マウス抗体 IgG2a	CD3	腎移植後の急性拒絶反応
Daclizumab	Zenapax	ヒト化抗体 IgG1 $\kappa$	CD25	腎移植後の急性拒絶反応
Basiliximab	Simulect	キメラ抗体 IgG1 $\kappa$	CD25	腎移植後の急性拒絶反応
Infl iximab	Remicade	キメラ抗体 IgG1 $\kappa$	TNF $\alpha$	関節リウマチ
Etanercept	Enbrel	融合タンパク質 TNF $\alpha$ R + Fc	TNF $\alpha$	関節リウマチ
Adalimumab	Humira	ヒト抗体 IgG1 $\kappa$	TNF $\alpha$	関節リウマチ
Efalizumab	Raptiva	ヒト化抗体 IgG1 $\kappa$	CD11	尋常性乾癬
Omalizumab	Xolair	ヒト化抗体 IgG1 $\kappa$	IgE	喘息
Alefacept	Amevive	融合タンパク質 LFA3 + Fc	CD2	尋常性乾癬
Natalizumab	Tysabri	ヒト化抗体 IgG4 $\kappa$	$\alpha$ 4 integrin	多発性硬化症
Abatacept	Orencia	融合タンパク質 CTLA4 + Fc	CD80/CD86	関節リウマチ
Tocilizumab	Actemra	ヒト化抗体 IgG1 $\kappa$	IL6R	キャッスルマン病
Eculizumab	Soliris	ヒト化抗体 IgG2/4 $\kappa$	C5a	発作性夜間血色素尿症
<b>その他</b>				
Abciximab	ReoPro	キメラ抗体 IgG1 (Fab)	GPIIb/IIIa	心筋虚血
Palivizumab	Synagis	ヒト化抗体 IgG1 $\kappa$	RSV F Protein	RS ウイルス感染
Ranibizumab	Lucentis	ヒト化抗体 IgG1 $\kappa$ (48K フラグメント)	VEGF-A	加齢黄斑変性

Table1 既存抗体医薬品一覧 引用文献2より抜粋

### 1-3 抗体医薬品の作製方法

1970 年代、Kohler, Milstein らによるハイブリドーマ技術の確立<sup>3</sup>によって、単一の抗原認識能を持つモノクローナル抗体の作製が可能になった。モノクローナル抗体の作製方法<sup>4</sup>を Figure1 示す。マウスに抗原を投与すると、マウス体内で抗原に結合する抗体を産生する B 細胞が作られる。この B 細胞をマウスの脾臓や血液などから取り出し、無限に増殖するミエローマ細胞と融合することでハイブリドーマ細胞を得ることができる。ハイブリドーマ細胞は、B 細胞のもつ抗体産生能とミエローマ細胞のもつ増殖能を有していることから、単一の B 細胞から産生される抗体を無限に得ることができる。

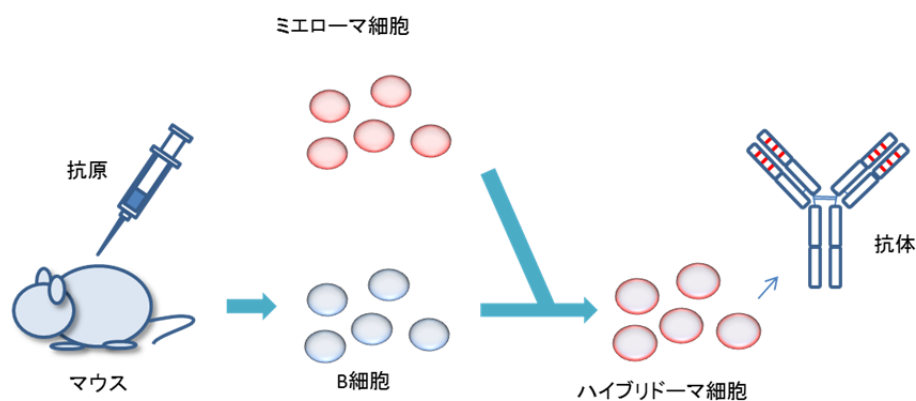


Figure 1 モノクローナル抗体の作製方法

抗原を免疫されたマウスの脾臓や血液から B 細胞を取り出し、ミエローマ細胞と融合することでハイブリドーマ細胞を作製する。ハイブリドーマ細胞から B 細胞で産生される抗体を大量に取得することができる。引用文献 4 より一部抜粋

このように作製されるモノクローナル抗体は、単一の抗原への特異的な認識能を有していることから分子標的医薬品として期待されるが、マウス抗体のままではヒトの免疫系により異物として認識されてしまい排除されてしまう。そこで、遺伝子工学的手法を用いて、マウス抗体の抗原認識部位を保存したまま、ヒトが異物として認識しないヒト抗体にできる限り近づける取り組みが必要となる。

Figure2 に抗体の構造を示す。抗体は分子量約 150kDa からなる Y 字型の 4 本鎖構造 (2 つの重鎖と 2 つの軽鎖) を基本骨格としている。軽鎖には、 $\kappa$  鎖と  $\lambda$  鎖の 2 種類がある。抗原認識能を有する可変領域とそれ以外の定常領域からなる。重鎖の可変領域を VH 領域といい、軽鎖の可変領域を VL 領域という。また、重鎖の定常領域を CH 領域といい、軽鎖の可変領域を CL 領域という。定常領域は、補体や各種細胞との相互作用により、生物学的活

性に関与する領域である。可変領域のうち、抗原と作用する部分は相補性決定領域 (complementarity-determining region: CDR) といい、可変領域のそれ以外の領域をフレームワーク領域 (framework region: FR) という。軽鎖と重鎖の可変領域にはそれぞれ3つの CDR (CDR1~CDR3) と、3つの CDR を取り囲む4つの FR (FR1~FR4) が存在する。

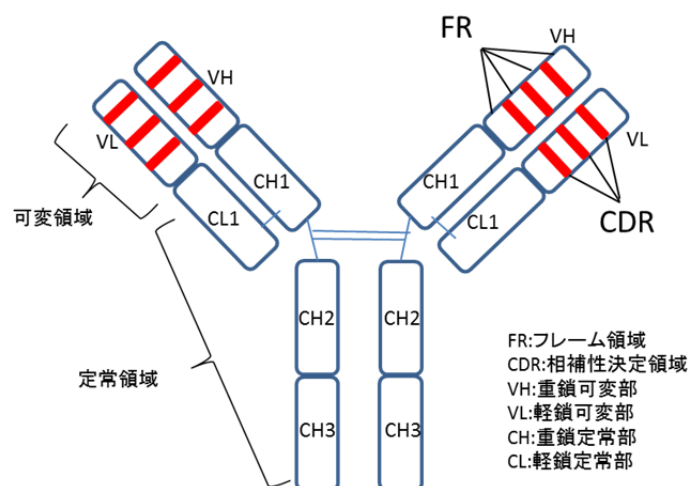
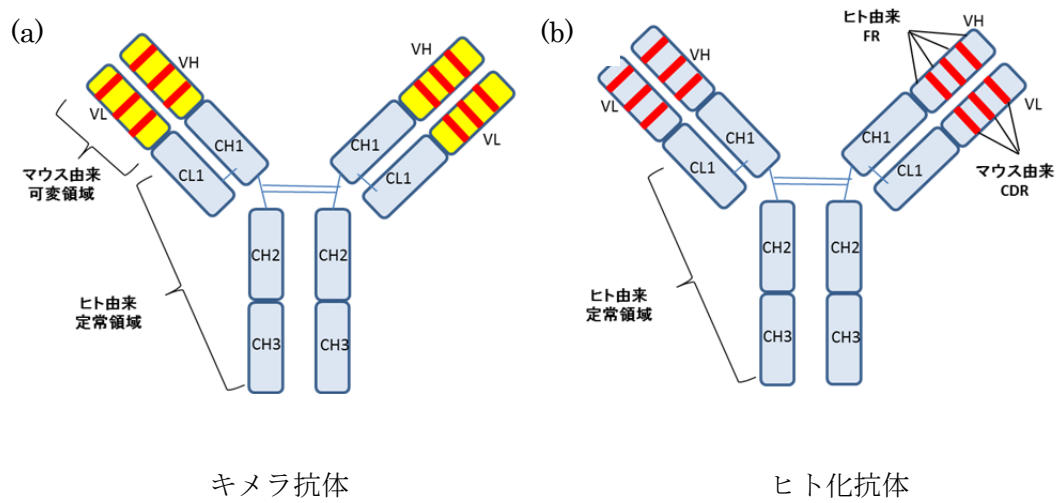


Figure 2 抗体構造

軽鎖 (L 鎖) および重鎖 (H 鎖) から成り、さらに可変領域 (VL および VH) と定常領域 (CL および CH) から構成される。可変領域は抗原結合部位 (CDR) およびフレーム領域 (FR) からなる。

マウス抗体のヒト化は、遺伝子組み換えによりマウス抗体の定常領域をヒト抗体遺伝子に置き換えることで行われる。可変領域がマウス抗体遺伝子であり、定常領域がヒト抗体遺伝子からなる抗体はキメラ抗体と呼ばれる。また CDR 領域をマウス抗体遺伝子とし、FR 領域と定常領域をすべてヒト抗体遺伝子としたものはヒト化抗体と呼ばれる。しかしながら、このようなキメラ抗体やヒト化抗体であってもマウス抗体由来の遺伝子配列が残った状態であるため、ヒト体内での免疫応答が起こる可能性がある。そこで、マウス由来の遺伝子をまったく持たないヒト抗体の作製も試みられている。



**Figure3 キメラ抗体とヒト化抗体の構造**

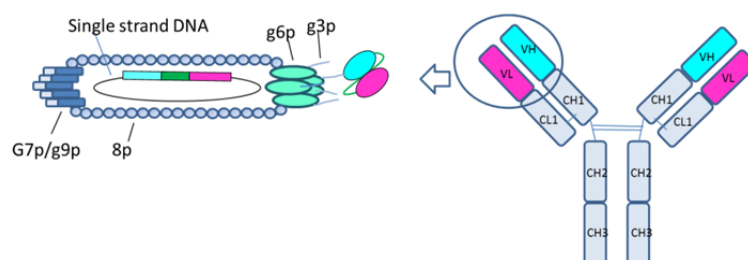
特定の抗原に結合する可変領域 (VL および VH) がマウス由来で定常領域がヒト由来の構造を有するキメラ抗体 (a) と特定の抗原に結合する CDR 領域がマウス由来でその他の領域がヒト由来の構造を有するヒト化抗体 (b)



#### 1-4 ファージディスプレイ法を用いた抗体作製方法とその有用性

ファージディスプレイ技術は、1985年に G. Smith によって報告されたのを発端に<sup>5</sup>、目的の機能を有するペプチドや抗体を単離する方法として発達した。

ファージディスプレイ技術は、ファージ外殻を構成するコート蛋白質と抗体など目的蛋白質を、融合蛋白質として発現することにより、ファージの表面に目的蛋白質をディスプレイする方法である。バイオパニングにより望む性質を有するファージを容易に選択した後、対応する遺伝子を得ることができる。ファージディスプレイ法でよく用いられる繊維状ファージ(Figure4)は、環状の一本鎖ゲノムDNAを約2700分子のg8pが覆った直径6.5nm、長さ930nmの筒状の形状をしている。ファージDNAには、5つの構造タンパク質(g3p、g6p、g7p、g8p、g9p)、ファージDNAの複製に関与する3つのタンパク質(g2p、g5p、g10p)、ファージ粒子の構築と分泌に関与する3つのタンパク質(g1p、g4p、g11p)の計11のタンパク質分子がコードされている。ファージ分子は、G7pとg9pが一方の末端に、g7pとg9pがもう一方の末端に位置した構造をとっている。ファージ増殖の際に溶菌は伴わない<sup>6</sup>。

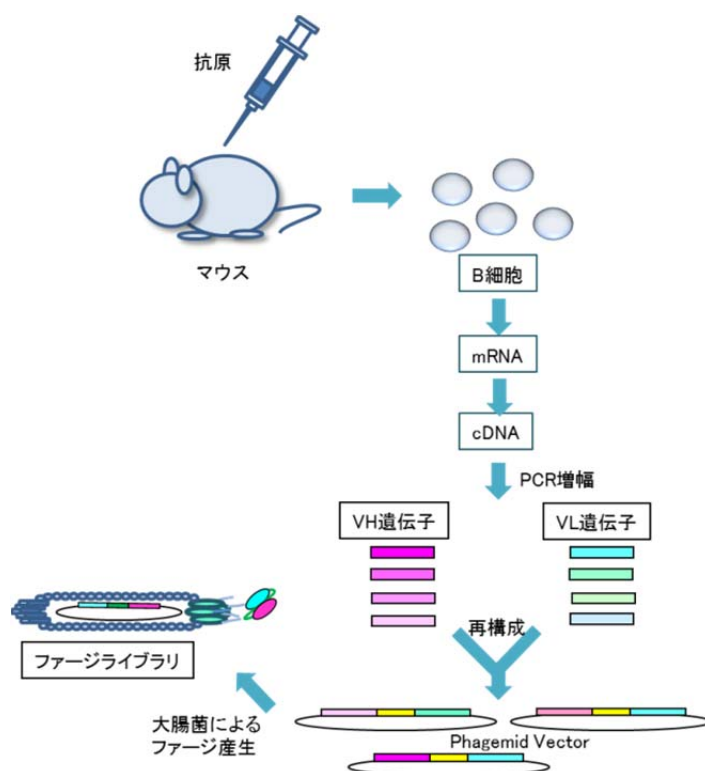


**Figure4** scFv 提示 M13 ファージ

抗体の VL および VH をリンカーで結合した単鎖抗体 (scFv) の遺伝子を有するファージミドベクターを M13 ファージに導入することで、コート蛋白質 (g3p) と共に scFv を提示させる。

ファージディスプレイでは、ファージ表面の構造タンパク質と外来蛋白質を融合蛋白質として発現することで、ファージ外殻に目的蛋白質を提示する。もっともよく用いられているのは、コート蛋白質として g3p (gene 3 protein) あるいは g8p (gene 8 protein) を用い、それらの N 末端に融合タンパク質として、発現提示させる方法である。ファージディスプレイ法は、大腸菌を宿主とするため、抗体全体を発現することはできない。しかし、医薬品分野でもよく研究されている Fab (抗体の CH2, CH3 領域を除く領域) や scFv (VH と VL をリンカーで連結した単鎖抗体, single chain Fv) のような、より小さな抗体 fragments<sup>7</sup> を提示することができる。

抗体ライブラリを作製する方法の一例として、免疫ライブラリの作製について述べる。Figure5 のように、免疫動物から抗体を産生する B 細胞を回収し、B 細胞中の mRNA を抽出し、cDNA とする。抗体遺伝子の望む領域、この場合は VH と VL の遺伝子断片を PCR にて増幅する。増幅した遺伝子断片を連結し再構成することで、VH と VL から成る scFv 遺伝子とし、これをファージミドベクターへ導入する。この時 VH と VL の組み合わせはランダムとなるため、多種の抗体遺伝子が構築されることになる。そのため、再構築したファージミドベクターを大腸菌に形質転換し、さらにファージを産生させると多種の抗体遺伝子を持つファージ群が得られる。



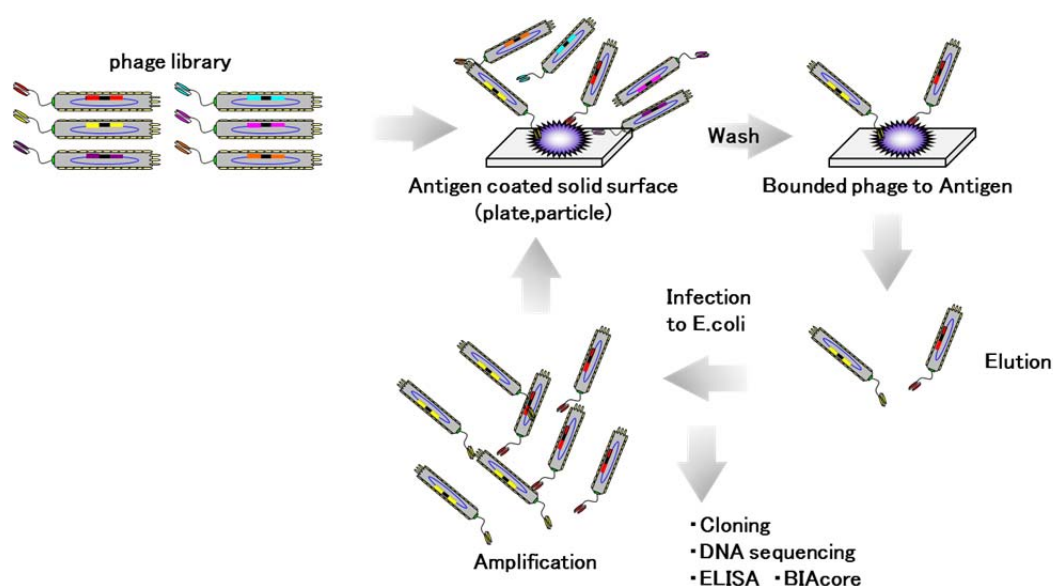
**Figure5 免疫ライブラリの作製方法**

抗原を免疫動物（マウス）に免疫し得られた B 細胞から遺伝子工学的に抗体の遺伝子配列を取得し、ファージミドベクターへ再構成する。ファージに取り込むことでファージ上に免疫で獲得された scFv が提示されたファージライブラリが構築できる。（scFv 提示ファージの例）

ファージライブラリは、多様な抗体提示し、対応する抗体遺伝子を含むファージ群である。ファージライブラリから抗原に特異的な結合を示すファージクローンを単離するには、バイオパニング (Figure6) が一般に用いられる。固相上に固定化した抗原に抗体提示ファージを結合させ、結合したファージのみを回収し、大腸菌を用いて再増幅させ、再

度固相化抗原に供するという一連のサイクルを 2~3 回繰り返す方法である。この方法を用いることで、サイクルを増すごとにファージ群に占める抗原結合ファージの比率が増幅していき、抗原特異的結合をする抗体提示ファージと抗体遺伝子をコードする DNA を得ることができる。

ファージディスプレイ法の特徴は、抗体 DNA と抗体遺伝子情報があれば、どのような動物種からでもモノクローナル抗体を得ることが出来る点にある。ハイブリドーマ法が使用できる動物はマウスの他にはほとんどないため、例えばウサギやニワトリ、ラクダ由来の抗体からファージライブラリを作製した報告がなされている<sup>8 9 10</sup>。ブタを免疫動物とした場合にも、同様に抗体を得る方法としてファージディスプレイ法が適用できると考えられる。



**Figure6 バイオパンニング**

基板などに固定化された抗原とファージライブラリを反応させる。反応後、洗浄することで未結合のファージ群を取り除き、結合したファージのみ回収する。大腸菌に感染させた後、増幅し、必要であればさらに抗原との反応、洗浄を繰り返す。結合したファージを遺伝子解析やクローニング、ELISA などで解析する。

## 1-5 小括

マウスはハイブリドーマ法が確立していることからモノクローナル抗体を作製しやすく、そのため抗体医薬品の材料として多用されている。しかしながら、医薬品として体内で作用させる抗体の性質上、遺伝子工学的にヒト化することが必要となる。マウス抗体からの抗体医薬品開発が盛んに行われている一方で、多大な予算と時間をかけながらも認可まで到達できる抗体医薬品は少ないように思われる。開発が難しい要因の一つは、マウス由来抗体の機能を維持しながら、抗体をヒト型に近づけるヒト化の困難さと考えられる。仮に標的との親和性が良いマウス抗体が取得できたとしても、ヒト型にするために置換すべきアミノ酸が多ければ、抗体と標的の特異的結合が失われる可能性も高くなり、結果として使用できない抗体となってしまうかもしれない。マウス以外の動物由来の抗体医薬はほとんど報告されていないが、マウス抗体と同様にヒト化を行える手法が確立できれば、マウス抗体では失敗に終わったヒト化抗体が成功する可能性もあり、今後の抗体医薬の可能性をさらに広げることができるかもしれない。

本研究では、マウス以外の動物種としてブタに注目し、抗体の特性評価およびヒト化に向けたエンジニアリングについての検証を行うことを目指した。本研究を進めるにあたり、ブタのモノクローナル抗体を得る方法としては、マウスのようにハイブリドーマ法を用いることができないため、ファージディスプレイ法が有効である。この方法では、ブタ抗体遺伝子情報さえあれば、比較的容易にモノクローナル抗体を得ることができると考えられる。

## 1-6 引用文献

1. 関根 進. 抗体医薬の現状と課題. 科学技術動向. 2009. Available at:  
[http://www.nistep.go.jp/achiev/ftx/jpn/stfc/stt103j/0910\\_03\\_featurearticles/0910fa01/200910\\_fa01.html](http://www.nistep.go.jp/achiev/ftx/jpn/stfc/stt103j/0910_03_featurearticles/0910fa01/200910_fa01.html).
2. 川西 徹. 抗体医薬の現状と展望. *Folia Pharmacol Jpn.* 2008;131:102-108.
3. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975;256(5517):495-497.
4. 協和発酵キリン株式会社. 抗体医薬品～最先端の治療薬～. Available at:  
<http://www.kyowa-kirin.co.jp/antibody/index.html>.
5. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* 1985;228:1315-1317.
6. 橋口 周平, 伊東 祐二, 田中 孝一, 松木園美穂, 村岡 賢, 杉村 和久. ファージディスプレイと Beyond antibody: ～抗体様分子による分子標的～. 生化学. 2010;82(8):710-726.
7. Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol.* 2005;23:1126-1136.
8. Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A, Wyns L, Hamers R, Muyldermans S. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett.* 1997;414:521-526.
9. Ridder R, Schmitz R, Legay F, Gram H. Generation of rabbit monoclonal antibody fragments from a combinatorial phage display library and their production in the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology (N Y).* 1995;13:255-260.
10. Davies EL, Smith JS, Birkett CR, Manser JM, Anderson-Dear DV, Young JR. Selection of specific phage-display antibodies using libraries derived from chicken immunoglobulin genes. *J Immunol Methods.* 1995;186(1):125-35.

## 第2章 ブタ抗体の遺伝子解析

### 2-1 小序論

ブタは長い時間、食肉の供給源であったが、最近では医療研究の分野などで実験動物としての価値が見直されている。しかしながら、ブタ抗体についての報告は少ないのが現状である。ブタ抗体の VH 遺伝子を、human、horses (*Equus caballus*)、sheep (*Ovis aries*)、cattle (*Bos taurus*) と比較すると、それらの間でブタはヒト VH3 に最も類似していることが示されていること<sup>1</sup>、ブタの抗体の発現解析の結果では、限られた遺伝子ファミリーのみ発現していること<sup>2</sup>、発現した抗体の 80% は 5 つの VH3 ファミリーであることや、1 つの VL $\kappa$  ファミリー (IGKV2) と 2 つの VL $\lambda$  ファミリー (IGLV3、IGLV8) で構成されている<sup>3</sup> ことがすでに明らかになっている。しなしながら、モノクローナル抗体を得るための免疫動物としては議論されてこなかった。以前の報告で、ファージディスプレイ法を使用してブタ scFv 抗体を生成した例があるが<sup>4</sup>、特定の抗原に結合するモノクローナル抗体を詳細に調べるには至っておらず、ブタを免疫動物として利用する可能性やブタ抗体の特徴は未知のままであった。

そこで本章では、現在までに明らかとなっているブタ抗体遺伝子レパートリー情報を元に遺伝子解析を行い、ヒトやマウスと比較した場合のブタ抗体遺伝子の特徴を検討した。また、得られた遺伝子情報からブタ抗体ファージライブラリ構築に必要なプライマー配列の設計を行った。

## 2-2 方法

IMGT (International ImMunoGeneTics information system, <http://www.imgt.org>) から、登録されているヒト抗体、マウス抗体、ブタ抗体の遺伝子情報を抽出し、塩基配列およびアミノ酸配列を調べた。また、これら遺伝子の IGHV 遺伝子のアミノ酸配列から CDR 領域を除いたフレーム領域 (FR1, FR2, FR3) の相同性を解析し、系統樹を作製した。系統樹は NJ 法を用いた。

## 2-3 結果および考察

### 2-3-1 ブタ抗体配列解析

IMGT に登録されているブタ抗体の遺伝子の内、Pseudogene と OPF (open reading frame) を除く、Functional な遺伝子名を Table2 に記載した。IGHV 遺伝子数は Pseudogene を除くと 5 種類に過ぎず、少数の遺伝子種類から構成されていた。中でも重鎖 V 領域の遺伝子は単一のサブグループ IGHV1 のみであった。ヒト遺伝子が IGHV1~7 のサブグループから成ることと比較すると、ブタ抗体遺伝子のレパートリーは非常に少なく、大きな特徴と考えられる。また、VL $\kappa$  遺伝子の軽鎖 V 領域は 2 つのサブグループ IGKV1 と IGKV2 のみであり、J 領域は 5 つであった。VL $\lambda$  遺伝子の軽鎖 V 領域は 4 つのサブグループ IGLV2、IGLV3、IGLV5、IGLV8 からなり、J 領域は 3 つであった。このような遺伝子情報から、ブタ抗体はごく限られた抗体遺伝子で病原体など多くの外敵に対する免疫応答を担っていることがわかる。

IGHV	IGHD	IGHJ	IGKV	IGKJ	IGLV	IGLJ
IGHV1S1	IGHD1	IGHJ1	IGKV1-7	IGKJ1	IGLV2-6	IGLJ2
IGHV1S2	IGHD2		IGKV1-9	IGKJ2	IGLV3-2	IGLJ3
IGHV1S4			IGKV1-11	IGKJ3	IGLV3-3	IGLJ4
IGHV1S5			IGKV1D-11	IGKJ4	IGLV3-4	
IGHV1S6			IGKV1-14	IGKJ5	IGLV3-5	
			IGKV2-6		IGLV5-14	
			IGKV2-8		IGLV8-10	
			IGKV2-10		IGLV8-13	
			IGKV2-12		IGLV8-18	
			IGKV2D-12		IGLV8-19	
			IGKV2-13			

Table2 ブタ IG の機能遺伝子名

IMGT に登録されているブタ抗体の遺伝子の内、Pseudogene と OPF (open reading frame) を除く、Functional な遺伝子名。

5つのIGHV1遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列をFigure7-1に示した。CDR領域を除けば、塩基配列、アミノ酸配列ともに、IGHV内での配列相同性は高いことが確認された。5'側の30bpのみに注目すると、1番目の塩基が、IGHV1S1、IGHV1S2、IGHV1S4、IGHV1S5ではGの箇所がIGHV1S6ではCであるという違いしかなかった。IGHJ遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列をFigure7-2に示した。

また、IGKV遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列をFigure8-1、Figure8-2に示した。CDR領域を除けば、塩基配列、アミノ酸配列ともに、IGHV内での配列相同性は高いことが確認された。IGKV遺伝子にはIGKV1とIGKV2が存在し、5'側の30bpのみに注目すると、6番目の塩基、7番目の塩基、8番目の塩基、10番目の塩基、19番目の塩基、20番目、25番目の塩基、26番目の塩基、30番目の塩基に違いが見られるが、アミノ酸配列は全体によく似ていた。また、IGKJ遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列をFigure8-3に示した。3'末端側を比較すると、アミノ酸配列の相違は少ないものの、3'側の20bpに注目すると塩基配列では9箇所で見られた。

IGLJ遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列をFigure9-1、Figure9-2に示した。また、IGKJ遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列をFigure9-3に示した。軽鎖 $\kappa$ 遺伝子と比べると配列にバリエーションがあり、5'側の30bpに注目すると4つのサブグループIGLV2、IGLV3、IGLV5、IGLV8毎の塩基配列はほぼ一致しているものの、全体では配列の相同性は低い。IGKJ遺伝子の3'側の20bpに注目すると塩基配列では4箇所で見られるのみであった。

重鎖遺伝子と比較すると、軽鎖遺伝子の方が配列にバリエーションがあるが、それもわずかであった。ブタ抗体遺伝子を増幅するためのプライマーの種類は多くはないと考えられる。



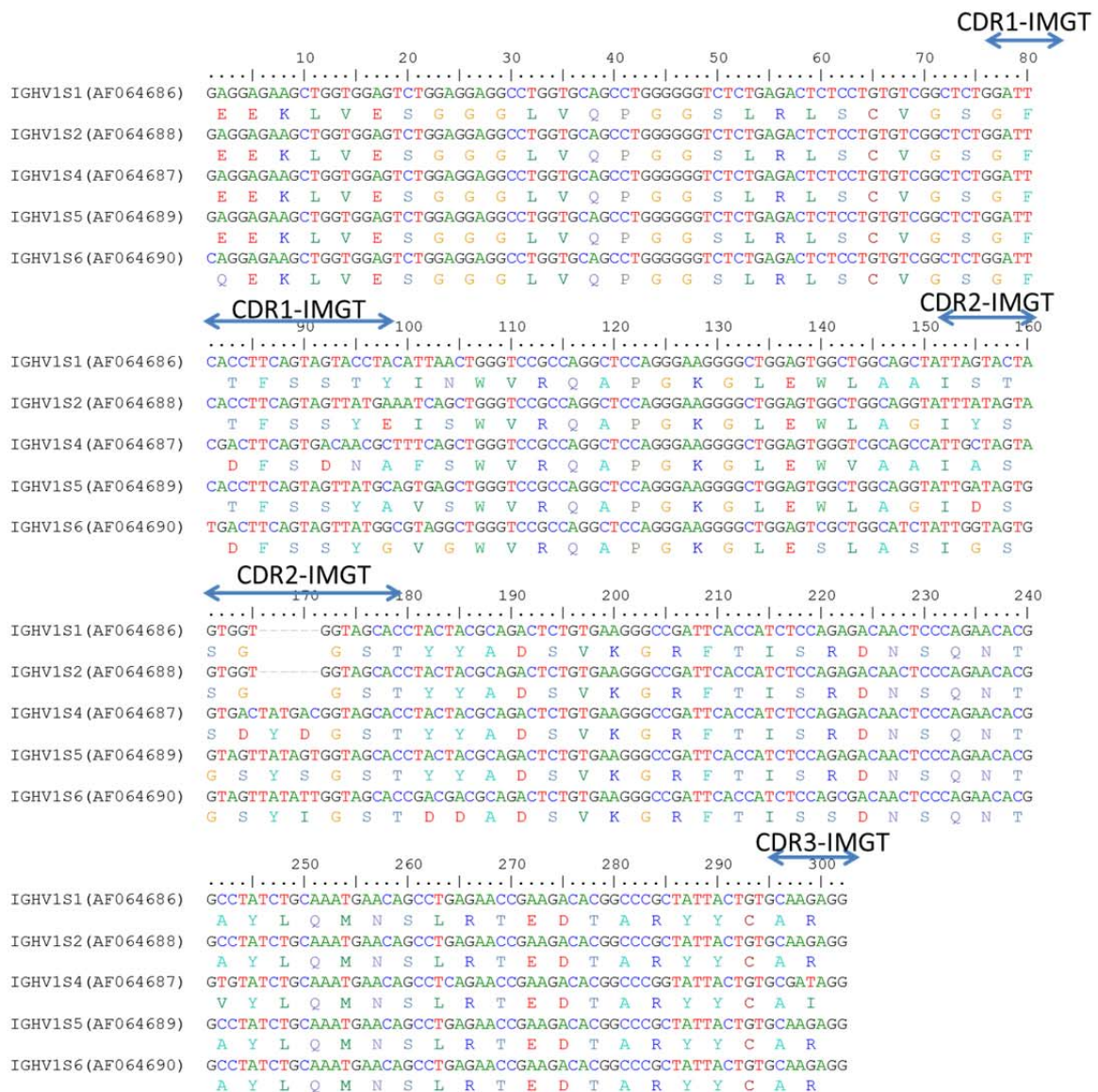


Figure7-1 Porcine IGHV1 配列

5つの IGHV1 遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列。CDR 領域は IMGT database 記載の領域とした。

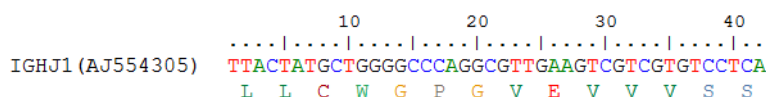


Figure7-2 Porcine IGHJ1 配列

IGHJ 遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列の比較。



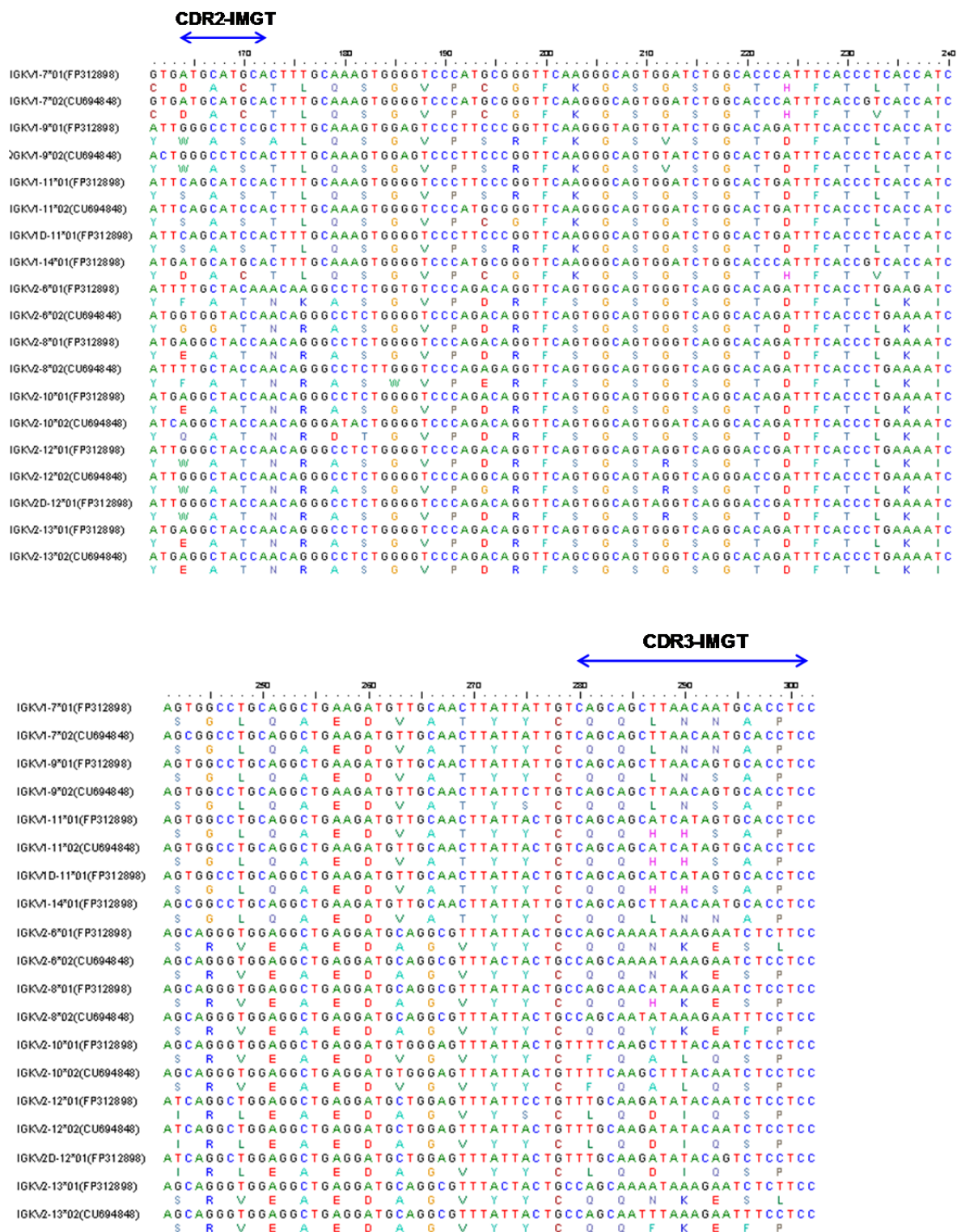


Figure8-2 Porcine IGKV 配列

IGKV 遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列。CDR は IMGT database 規定の領域で記載した。

	10	20	30
IGKJ1*01(GU942438)	- - - A C G T T C G G C C A A G G A C C A A G C T G G A A C T C A A A		
	T F G Q G T K L E L K		
IGKJ2*01(GU942438)	T A T G G T T T C G G C G C G G G G A C C A A G C T G G A G C T C A A A		
	Y G F G A G T K L E L K		
IGKJ2*02(FP312898)	A A T G G T T T C G G C G C G G G G A C C A A G C T G G A G C T C A A A		
	N G F G A G T K L E L K		
IGKJ3*01(FP312898)	T T C A C T T T T G G C T C G G G G A C C A A A G T G G A G C C C A A A		
	F T F G S G T K V E P K		
IGKJ4*01(GU942438)	G T T G T G T T C G G T A G C G G G A C C A A G C T G G A A A T C A A A		
	V V F G S G T K L E I K		
IGKJ4*02(FP312898)	G T T G T G T T C G G T A G C G G G A C T A A G C T G G A A A T C A A A		
	V V F G S G T K L E I K		
IGKJ5*01(GU942438)	A T C A C C T T T G G T G A A G G G A C A T C C G T G G A G A T T G A A		
	I T F G E G T S V E I E		

Figure8-3 Porcine IGKJ 配列

IGKJ 遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列。



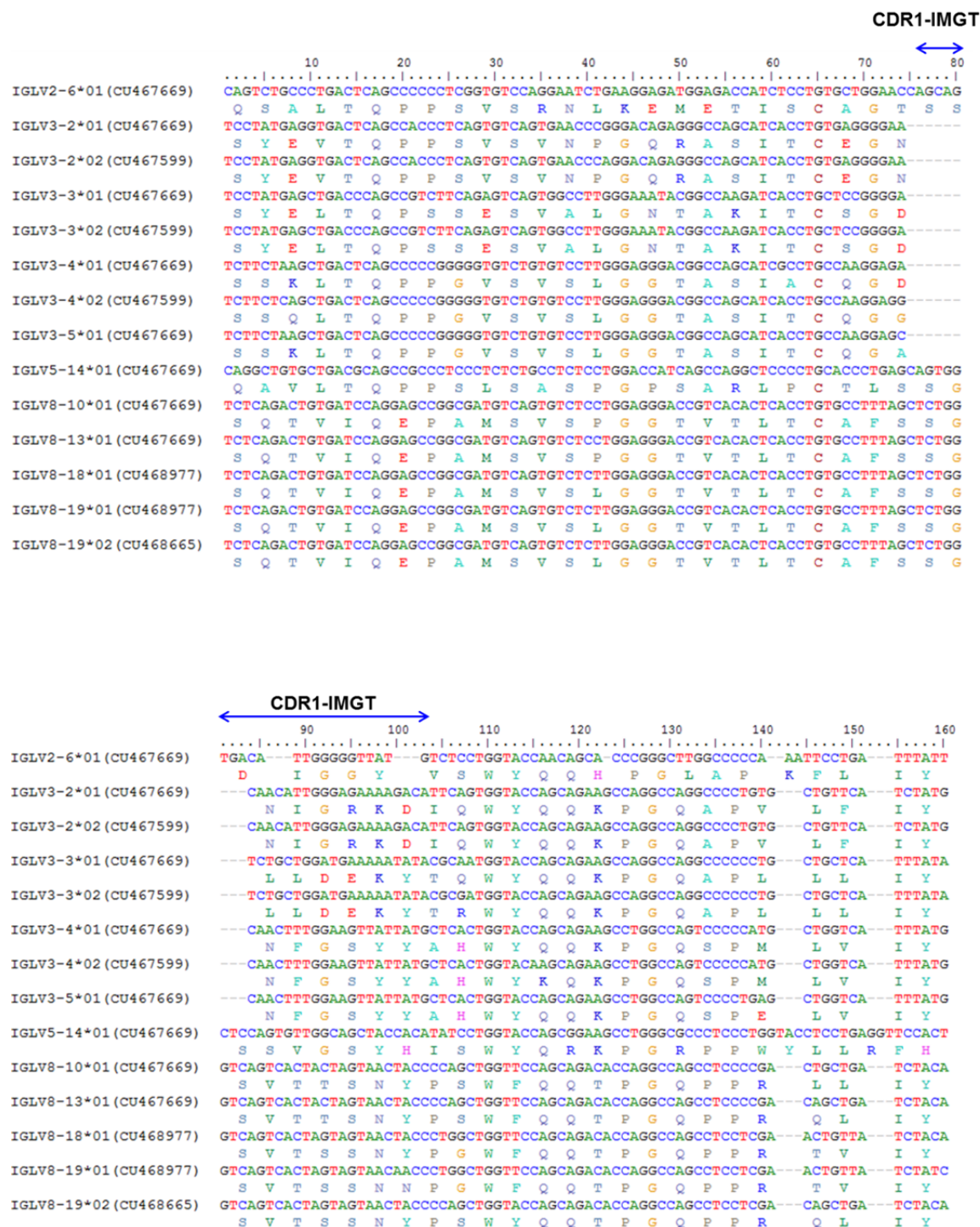


Figure9-1 Porcine IGLV 配列

IGLJ 遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列。CDR は IMGT database 記載の領域とした。

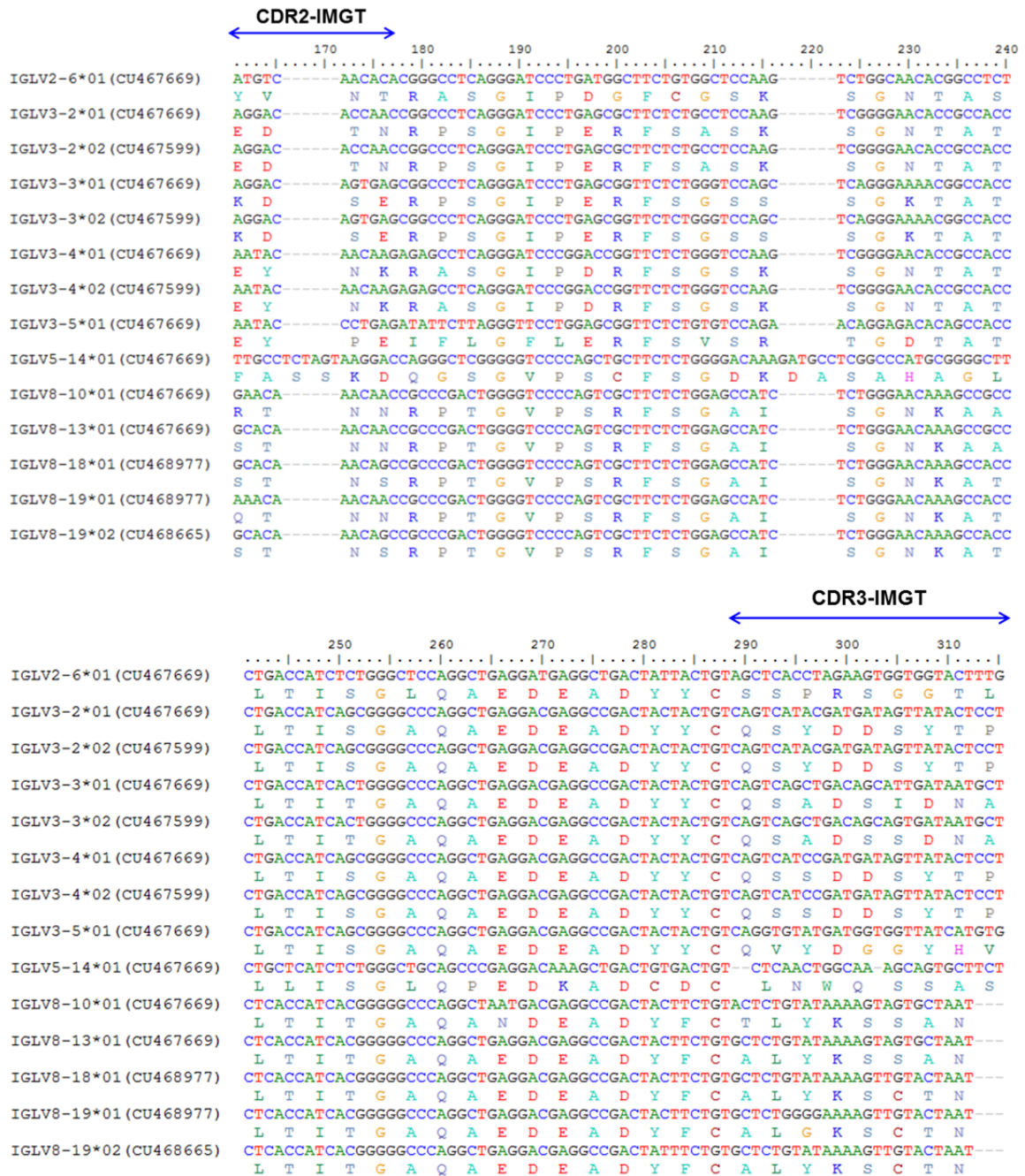


Figure9-1 Porcine IGLV 配列

IGLJ 遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列。CDR は IMGT database 記載の領域とした。

	10	20	30
IGLJ2*01 (CU467669)	.... .... .... .... .... .... ....		
	AATATTTCGGCGGTGGGACCCATCTGACCGTCCTC		
	N I F G G G T H L T V L		
IGLJ2*02 (CU467599)	AATATTTCGGCGGAGGGACCCATCTGACCGTCCTC		
	N I F G G G T H L T V L		
IGLJ3*01 (CU467669)	GTTCCCTTCGGCGGTGGGACCCATCTGACCGTCCTC		
	V P F G G G T H L T V L		
IGLJ4*01 (CU467599)	GATAGGTTCGGCCGAGGGACCCGTCTAAGTGTCTC		
	D R F G R G T R L S V L		

Figure9-3 Porcine IGLJ 配列

IGKJ 遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列。

### 2-3-2 ブタ抗体、ヒト抗体、マウス抗体のアミノ酸配列相同性解析

ブタ抗体、ヒト抗体、マウス抗体の IGHV 配列相同性をもとに作製した系統樹を Figure10 に示す。系統樹は NJ 法とした。IMGT (<http://www.imgt.org>) に登録されているブタ抗体の V 領域 (IGHV1、全 5 配列)、ヒト抗体の V 領域 (IGHV1, IGHV2, IGHV3, IGHV4, IGHV5, IGHV6, IGHV7、全 68 配列)、マウス抗体の V 領域 (IGHV1, IGHV2, IGHV3, IGHV4, IGHV5, IGHV6, IGHV7, IGHV8, IGHV9, IGHV10, IGHV11, IGHV12, IGHV13, IGHV14, IGHV15, IGHV16、全 174 配列) のアミノ酸配列を抽出し、CDR 領域を除くフレーム領域 (FR1, FR2, FR3) の相同性を解析した。Figure10 内において、マウス抗体を青、ヒト抗体をピンク、ブタ抗体を緑で表示した。

マウス抗体とヒト抗体は系統樹内を広く分布しており、両者の距離が近いサブファミリーの組み合わせもあれば、遠い組み合わせも存在した。マウス抗体の中でも IGHV5、IGHV7、IGHV10、IGHV16 がヒト抗体 IGHV3 と相同性が高いが、マウス抗体はサブファミリーが多いため、IGHV5、IGHV7、IGHV10、IGHV16 のように一部はヒト抗体と近似しているものの、遠い系統を示すものも多数存在していることが確認された。このことから、マウス抗体の場合は、抗体遺伝子と類似したヒト抗体遺伝子があるかどうかを検討し、近似しているヒト抗体遺伝子に合わせてヒト化を検討しなくてはならず、この点に課題があると考えられる。

一方、Figure10 の系統樹によるとブタ抗体はヒト抗体 IGHV3 の近傍に位置しており、IGHV3 との相同性が高いことが確認された。抗体遺伝子レパトリーの少ないブタから作製される抗体の重鎖 V 領域は、常にヒト抗体 IGHV3 と近似していることを示している。このことは遺伝子工学的なアプローチによりブタ抗体をヒト化する場合には、ヒト抗体 IGHV3 に近づけることのみを考慮すればよいことを示唆している。ブタと同様に抗体遺伝子レパトリーが少ない動物種としてはニワトリ、ウサギ、ウシが挙げられる<sup>5</sup>。中でも、ウシ抗体は重鎖 V 領域がヒト抗体 IGHV3 と近似していることがわかっている<sup>6</sup>。しかしながら、個体の大きさを考えると免疫動物としての取り扱いには問題があり、使用には適さないように思われる。ブタ抗体は遺伝子レパトリーが少なく、その遺伝子配列はヒト抗体 IGHV3 との相同性が高いという両方の特徴を持ち、さらにブタは比較的扱いが容易な個体の大きさである。これらのことは、ヒト化抗体の開発において、ブタが良い材料源になりうることを示唆する。



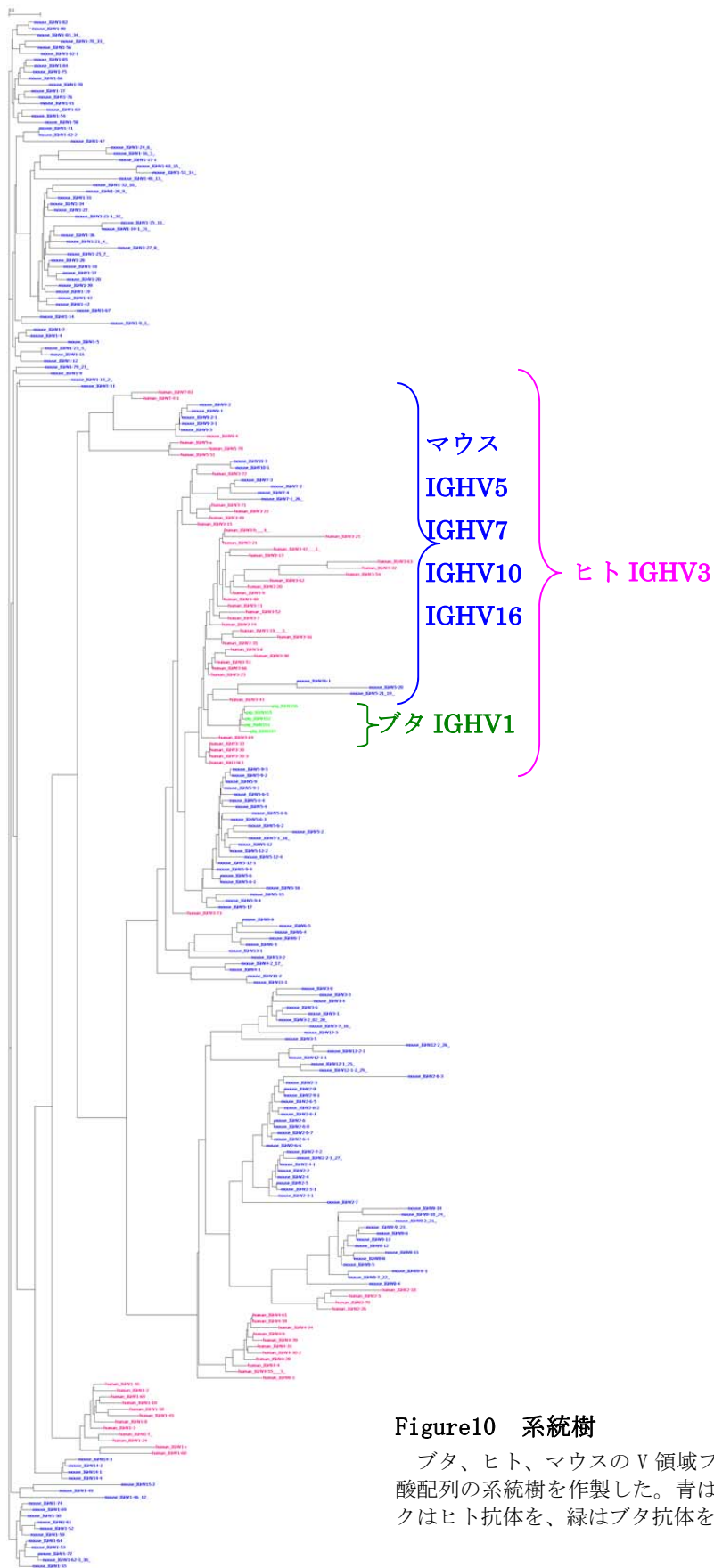


Figure10 系統樹

ブタ、ヒト、マウスのV領域フレームワークアミノ酸配列の系統樹を作製した。青はマウス抗体を、ピンクはヒト抗体を、緑はブタ抗体を示している。

### 2-3-3 ブタ単鎖抗体ライブラリ作製のためのプライマー設計

2-3-1, 2-3-2で述べたブタ抗体遺伝子情報をもとにして、ブタ単鎖抗体ライブラリ作製のためのプライマー設計を行った。 $V_H$  遺伝子は、Figure7-1で示した IGHV1 の 5' 塩基配列をカバーするよう配列を決定した  $VH-B$  プライマーと、Figure7-2で示した IGHJ1 の 3' 塩基配列から成る  $VH-F$  プライマーとした。 $V_L \kappa$  遺伝子は、プライマー設計時に IMGT のデータベースに Figure8で示した  $V_L \kappa$  遺伝子情報が存在しなかったため、既報<sup>4</sup>を参考に、Gene bank 情報から AF334738、AF334739、AF334740、AF334741、AF334742 を抽出し、これら遺伝子の  $V$  領域を増幅するプライマーとして決定した。 $V_L \lambda$  遺伝子は、ブタ抗体 cDNA (accession number: NM\_001243319) を解析することで決定した。

Table3 には、設計した全てのプライマー配列を示した。Table3 (A) はブタ抗体 cDNA から  $V_H$  遺伝子と  $V_L$  遺伝子の DNA を増幅するためのプライマー配列である。ブタ抗体遺伝子を増幅するプライマーペアは、 $V_H$  遺伝子を増幅する 1 ペアと、 $V_L \kappa$  遺伝子を増幅する 3 ペア、 $V_L \lambda$  遺伝子を増幅する 1 ペアのみとした。このようにプライマーペアは種類が少ないことはブタ抗体遺伝子からライブラリを作製する際に、PCR 条件検討を容易なものとすると考えられる。

Table3 (B) は、(A) で増幅した  $V_H$  遺伝子と  $V_L$  遺伝子の末端に制限酵素サイトを付加するためのプライマー配列であり、Table3 (C) は  $V_H$  遺伝子と  $V_L$  遺伝子の間で両者を連結するリンカー配列である。これらを用いた抗体遺伝子増幅方法に関しては、次章で詳細に記載する。

(A)

Primer name	Primer sequence
VH-B	5' - GAGGWAAGCTGGTGGAGTCYGG - 3'
VH-F	5' - ACGACGACTTCAACGCCTGG - 3'
VL $\kappa$ -B1	5' - GCCATYGTGCTGACCCAGASTCC - 3'
VL $\kappa$ -B2	5' - GAGCTCGTSATGACCCAGTCTCC - 3'
VL $\kappa$ -B3	5' - GAGCTGCGTGATACACAGTCTCC - 3'
VL $\kappa$ -F	5' - TTTGAKYTCCAGCTTGGTCCC - 3'
VL $\lambda$ -B	5' - GATTCTCAGACTGTGATCCAGGAG - 3'
V $\lambda$ -F	5' - GAGGACGGTCAGATGGGTCC - 3'

(B)

Primer name	Primer sequence
VH-B-Sfi	5' - TGCTCCTCGC <i>GGCCCAGCCGGCC</i> ATGGCTGAGGWAAGCTGGTGGAGTCYG - 3'
VH-F-Xho	5' - GCCTCCACCA <i>CTCGAG</i> ACGACGACTTCAACGCCTGG - 3'
VL $\kappa$ -B1-Sal	5' - GGTGGCTCTGG <i>GTCTGA</i> CGGATCGGCCATYGTGCTGACCCAGASTCC - 3'
VL $\kappa$ -B2a-Sal	5' - GGTGGCTCTGG <i>GTCTGA</i> CGGATCGGAGCTCGTCATGACCCAGTCTCC - 3'
VL $\kappa$ -B2b-Sal	5' - GGTGGCTCTGG <i>GTCTGA</i> CGGATCGGAGCTCGTGATGACCCAGTCTCC - 3'
VL $\kappa$ -B3-Sal	5' - GGTGGCTCTGG <i>GTCTGA</i> CGGATCGGAGCTGCGTGATACACAGTCTCC - 3'
V <sub>L</sub> $\kappa$ -F-Not	5' - GATGATGT <i>GCGGCCG</i> CTTTGAKYTCCAGCTTGGTCCC - 3'
V <sub>L</sub> $\lambda$ -B-Sal	5' - GGTGGCTCTGG <i>GTCTGA</i> CGGATCGGATTCTCAGACTGTGATCCAGGAG - 3'
V <sub>L</sub> $\lambda$ -F-Not	5' - TGATGATGT <i>GCGGCCG</i> CGAGGACGGTCAGATGGGTCC - 3'

(C)

Primer name	Primer sequence
GS linker	5' - <i>CTCGAG</i> TGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGG <i>GTCTGA</i> CGGATCG - 3'

Table 3 ファージライブラリ構築のためのオリゴヌクレオチドプライマー配列

(A)はブタ抗体 cDNA から V<sub>H</sub> 遺伝子と V<sub>L</sub> 遺伝子の DNA を増幅するためのプライマー配列(first PCR 用プライマー)、(B)は、(A)で増幅した V<sub>H</sub> 遺伝子と V<sub>L</sub> 遺伝子の末端に制限酵素サイトを付加するためのプライマー配列(second PCR 用プライマー)である。また、(C)は V<sub>H</sub> 遺伝子と V<sub>L</sub> 遺伝子の間で両者を連結するリンカー配列(GS linker DNA)である。制限酵素認識サイトは斜体で表記した。

## 2-4 小括

IMGT に登録されているブタ抗体遺伝子を解析することで重鎖、軽鎖ともに限られた遺伝子ファミリーのみで構成されていることを確認した。特に重鎖 V 領域の遺伝子は単一のサブグループ IGHV1 のみであり、軽鎖に関しても 2 種類の  $\kappa$  鎖 (IGVK1, IGVK2) のみであった。 $\kappa$  鎖については IGVK1, IGVK2 が主として発現していると以前より報告されている。<sup>23</sup>

次に、ブタ抗体、ヒト抗体、マウス抗体の IGHV 配列相同性をもとに系統樹解析を行った結果から、マウス抗体とヒト抗体の系統樹は広い範囲に分布しており、両者の距離が近いサブファミリーの組み合わせもあれば、遠い組み合わせもあることを示した。マウス抗体では、IGHV5、IGHV7、IGHV10、IGHV16 でヒト抗体 IGHV3 と相同性の高いことが確認されたが、マウス抗体のサブファミリーが多いため、一部はヒト抗体と近似しているファミリーが存在しているが、遠い系統のものも多数存在していた。一方で、ブタ抗体はヒト抗体 IGHV3 の近傍に位置しており、IGHV3 との相同性が高いことが示された。このことは限られた遺伝子ファミリーで構成されたブタから単離される抗体が常にヒト抗体 (VH3) と相同性が高いことを示している。

さらに、IMGT から得られた IGHV1, IGVK1, IGVK2 の配列情報を元にブタ単鎖抗体ライブラリ作製のためのプライマー設計を行った。本章により設計したプライマーを用いることで、少ないプライマーペアかつ PCR 条件により、ブタ体内で発現しているほとんどの抗体遺伝子を増幅できると考えられる。

以上のことから、抗体を医薬品として応用するためブタ抗体をヒト化する場合には、ヒト抗体 IGHV3 に近づけることのみを考慮すればよいことがわかった。また、抗体医薬品開発で多用されるマウス抗体においてもヒト抗体と相同性の高いファミリーは存在するが一部であり、マウス抗体よりもブタ抗体の方がヒト化抗体の作製が容易である可能性が示唆された。

## 2-5 参考文献

1. Almagro JC, Martinez L, Smith SL, Alagon A, Estevez J, Paniagua J. Analysis of the horse VH repertoire and comparison with the human IGHV germline genes, and sheep, cattle and pig VH sequences. *Mol Immunol.* 2006;43:1836-1845.
2. Sun J, Kacs Kovics I, Brown WR, Butler JE. Expressed swine VH genes belong to a small VH gene family homologous to human VHIII. *J Immunol.* 1994;153:5618-5627.
3. Butler JE, Sun J, Wertz N, Sinkora M. Antibody repertoire development in swine. *Dev Comp Immunol.* 2006;30(1-2):199-221.
4. Li F, Aitken R. Cloning of porcine scFv antibodies by phage display and expression in *Escherichia coli*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004;97(1-2):39-51.
5. Parvari R, Avivi A, Lentner F, et al. Chicken immunoglobulin gamma-heavy chains: limited VH gene repertoire, combinatorial diversification by D gene segments and evolution of the heavy chain locus. *EMBO J.* 1988;7:739-744.
6. Sinclair MC, Gilchrist J, Aitken R. Bovine IgG repertoire is dominated by a single diversified VH gene family. *J Immunol.* 1997;159:3883-3889.

### 第 3 章 フェージディスプレイ法を用いたヒト血清アルブミン特異的ブタ単鎖抗体の単離とその特異性評価

#### 3-1 小序論

モノクローナル抗体を得る方法として、免疫動物がマウスであればハイブリドーマ法を用いることができるが、免疫動物がブタの場合には同様の方法は確立されていない。また、抗原特異的結合能を有するブタ抗体の特性についてはこれまで解析されていないため、ブタ抗体の特性を示すことは非常に価値のある報告となる。そこで本章では、ブタ抗体を得る手法の確立を目指し、第 2 章において設計したプライマー配列を用いて構築したフェージライブラリから抗体単離する条件を検証した。

まず、ブタ血液に由来する B 細胞の mRNA から、遺伝子工学的に抗体遺伝子の  $V_H$  遺伝子と  $V_L$  遺伝子を抽出し、*in vitro* で  $V_H$  遺伝子と  $V_L$  遺伝子を再構成することで、 $V_H$  と  $V_L$  がリンカーで連結された scFv(single chain Fv)抗体遺伝子を作製した。次に、この scFv 遺伝子がコードする scFv タンパク質をフェージ表面に提示させた scFv 提示フェージライブラリを作製し、目的抗原との結合能を有するフェージのみを選択することで、抗体遺伝子の単離を試みた。さらにブタ抗体の特性を詳細に検討するために、単離されたブタ scFv の大腸菌での発現特性や親和性解析などを行い、望む抗体が単離されているかを検討した。

## 3-2 材料と方法

### 3-2-1 ブタへの免疫及び抗体価評価

雑種ブタに対し、12 mg ヒト血清アルブミン (Human Serum Albumin:HSA) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) と Freund's complete adjuvant (Difco, NJ, USA) の混合液を筋肉注射により免疫した。1 回目免疫から 2 週間後、12 mg HSA と incomplete Freund's adjuvant (Difco) の混合液を、同様に 2 回目免疫した。免疫後採取した血清を用いて、ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 評価を行うことで十分な抗体価があることを確認した(Figure11)。その後、200mL の血液サンプルから B 細胞を含む末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cells:PBMC) を  $6.3 \times 10^8$  cells を回収した。回収には Ficoll-1077 (Wako Chemicals, Osaka, Japan) を用いた Ficoll 密度勾配分離法を用いた。

全ての免疫操作はアークリソース株式会社 (Kumamoto, Japan) へ依頼して実施した。

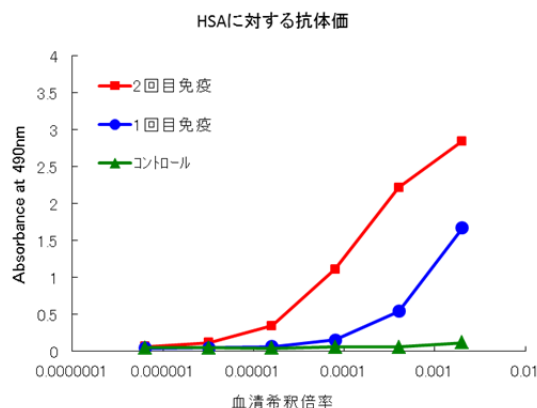


Figure11 抗体価

免疫後採取した血清を用いて、ELISA を行った。固相化した HSA に対して結合した血清中のブタ抗体を HRP 修飾抗ブタ抗体にて検出した。

### 3-2-2 ブタ単鎖抗体ライブラリの構築

単鎖抗体ライブラリ構築スキームを Figure12 に示す。PBMC からの Total RNA 抽出には RNAiso plus (Takara Bio Inc. Shiga, Japan) を用いた。抽出操作は試薬プロトコルに従って実施した。First strand cDNA は Prime Script II (Takara Bio Inc.) を用い、oligo dT primer にて試薬プロトコルに従って行った。

重鎖と軽鎖の PCR 増幅は Taq polymerase と Table3 に記載のプライマーを用いて行い、3 ステップ (first PCR, second PCR, third PCR) で行った。first PCR では、KOD-plus neo (Toyobo Co., Ltd, Osaka, Japan) と first PCR primers (Table3 (A)) を用いて、重鎖 DNA 断片と軽鎖 DNA 断片を増幅した。PCR 溶液は 50uL とし、PCR ステップは、94° C 2 min の変性過程の後、98° C 10 sec、55° C 30 sec、68° C 15 sec のサイクルを 25 回繰り返した。

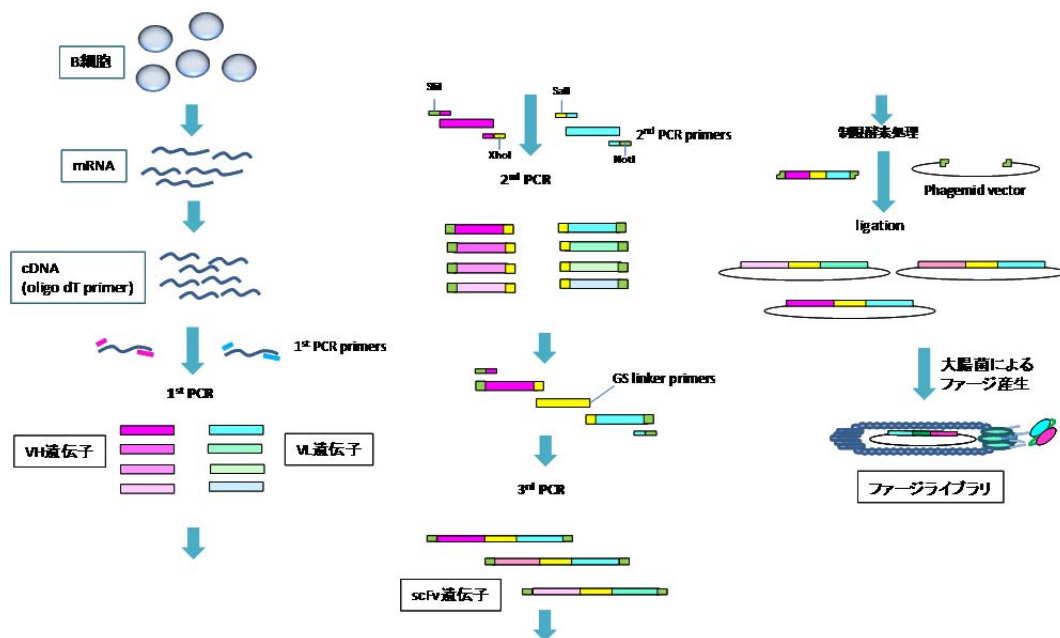


Figure 12 ファージライブラリの構築

ブタへ抗原を免疫したのち、B 細胞を獲得し遺伝子工学的に抗体の VL および VH を PCR により増幅する。さらに PCR により制限酵素サイトおよび GS リンカーを付与した後、ファージミドベクターへ導入する。これらファージミドベクターを形質転換した大腸菌によるファージ産生によりファージライブラリを構築する。

second PCR は、first PCR で得られた DNA 断片に制限酵素サイトを付加するために実施した。重鎖の 5' 末端には *Sfi*I サイトを、3' 末端には *Xho*I サイトを付加し、軽鎖の 5' 末端には *Sal*I サイトを、3' 末端には *Not*I サイトを付加した。first PCR 産物である重鎖断片と軽鎖断片にそれぞれ対応する second PCR プライマー (Table3 (B)) を混合し PCR にて増幅した。その他の second PCR の条件は、first PCR と同条件を用いた。

third PCR は GS linker を介して重鎖と軽鎖を連結する overlap PCR である。GS linker primer (Table3 (C)) は重鎖 3' 末端と軽鎖 5' 末端の相同配列を含んでいる。PCR は、Gene taq (Nippon Gene Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用い、GS linker プライマーと second PCR プライマーとして用いた VH-B-*Sfi*I と VL-*F*-*Not*I または VL-*F*-*Not*I を用いて、scFv gene 全体を増幅した。PCR ステップは、94° C 2 min の変性過程の後、94° C 30 sec、60° C 30 sec、72° C 30 sec のサイクルを 20 回繰り返す、72° C 5 min の最終伸長反応を行った。Third PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により分離し、その後精製した。このように



して、scFv 遺伝子をコードする DNA 断片を得た。

得られた scFv の DNA 断片を制限酵素 *Sfi*I (New England Biolabs., Beverly, MA, USA) と及び *Not*I (New England Biolabs.) で消化し、ラボによって構築した線状化ファージミドベクター pKSTV-01 (Figure13) と連結した。pKSTV-01 は pTV118N に基づいて構築した<sup>1</sup>。scFv の遺伝子断片を含むベクターは、次いで蒸留水に溶解し、フェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿により精製した。精製した DNA は、大腸菌 TG-1 株 (Lucigen Co., Madison, WI, USA) にエレクトロポレーションし、形質転換した。ライブラリの多様性は、形質転換された大腸菌 TG-1 株の数をカウントすることによって決定した。

次に、公知法を用いて<sup>2</sup>、形質転換された大腸菌 TG-1 株から scFv を提示したファージライブラリを調整した。ファージミドベクターで形質転換された大腸菌 TG-1 株を 2% グルコースおよび 100  $\mu$ g/ml/ml のアンピシリンを含む 2TY 培地で対数増殖期まで培養し、その後 M13K07 ヘルパーファージ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を加え、振盪せずに 37°C で 30 分間インキュベートすることで大腸菌にファージを感染させた。感染した大腸菌を遠心分離後、ペレットを 100  $\mu$ g の/ml のアンピシリンおよび 50  $\mu$ g の/ml のカナマイシンを含む 2TY に懸濁し、振盪しながら 30°C で一晩増殖させた。翌日、大腸菌を遠心分離で除き、上清に 5 分の 1 の容量の PEG 溶液 (2.5 M NaCl、20% (w/v) polyethylene glycol 6000) を添加し、よく攪拌した後、4°C で 6 時間インキュベートした。その後、沈殿したファージを遠心分離によって集め、1ml の PBS (phosphate buffered saline, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) に再度溶解した。この溶解液をさらに残渣を除去するために遠心分離した。得られた上清を scFv 提示ファージライブラリとして用いた。

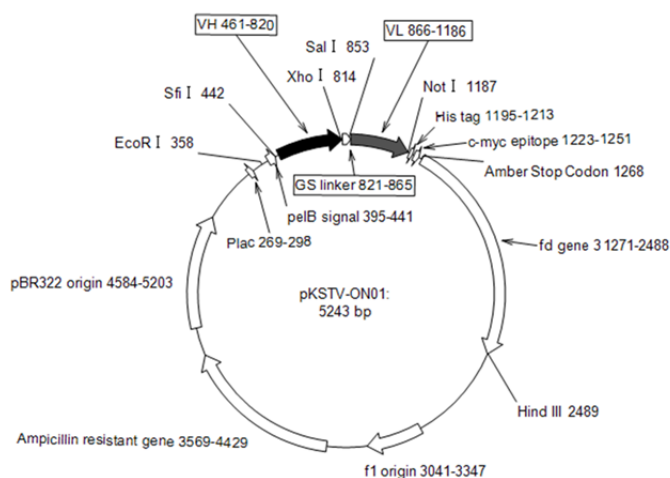


Figure13 ファージミドベクター pKSTV-01 の遺伝子マップ

pelB signal の下流に制限酵素サイト *Sfi*I、*Not*I を有し、さらに下流には His-tag および c-myc を有する。

### 3-2-3 ヒト血清アルブミン特異的結合ファージの単離

ELISA プレート (Nalge Nunc International, New York, NY, USA) のウェルを 100  $\mu$ l の HSA 溶液 (20  $\mu$ g/mL HSA を含む 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.3)) で、4°C 一晩固定化した。ウェルを

PBS で洗浄した後、PBS に溶解した 0.5%のゼラチンで、2 時間室温でブロッキングを行った。HSA 固定化とブロッキングを行ったウェルを PBST (0.1%Tween-20 を含む PBS) で 3 回洗浄した。その後、 $0.5 \times 10^{11}$  colony forming units (cfu) のファージと 0.5%ゼラチン、PBS を含むファージ溶液をウェルに添加し、振盪しながら室温で 1 時間インキュベートした。その後、ウェルを PBST で 10 回洗浄した。ウェルに結合したファージを、10 分間、 $300 \mu\text{l}$  の 0.1 M Glycine-HCl buffer (pH 2.2) で溶出、回収し、 $26 \mu\text{l}$  の 1 M Tris-HCl buffer (pH 9.1) で最終 pH7.0 になるように中和した。この溶出したファージを対数増殖期まで培養した TG-1 に感染し、パニング 2 ラウンド目のための scFv 提示ファージライブラリを調整した。2 ラウンド目では、 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$  の HSA 溶液をコートしたウェルを用い、0.5%ゼラチンの代わりに 1%スキムミルクを含むファージ溶液を用いた他は、1 ラウンド目と同様の方法を用いた。第 2 ラウンドでウェルに結合したファージを同様に溶出した後、対数増殖期まで培養した TG-1 に感染させ、2TYAG プレート (2TYAG プレート:2TY 培地、1.5%寒天、2%グルコースおよび  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  のアンピシリンを含む培養プレート) に塗布した。これを  $30^\circ\text{C}$  で一晩、大腸菌コロニーを培養した。

その後、パニング溶出ファージから得られた個々のファージクローンを分析した。 $30^\circ\text{C}$  で一晩培養して成長した大腸菌コロニーを、 $1\text{ml}$  の 2TYAG 培地 (2TY 培地、2%グルコースおよび  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  のアンピシリンを含む培地) にピックアップし、さらに  $30^\circ\text{C}$  で一晩培養した。各培養液を 2TYAG 培地で 1:100 に希釈し、対数増殖期になるまで成長させた。この大腸菌培養液にファージ M13K07 を添加し、 $37^\circ\text{C}$  で振とうすることなく 30 分間維持することでファージを感染させた。遠心分離後、上清を除去し、ペレットを  $100 \mu\text{g} / \text{ml}$  のアンピシリンおよび  $50 \mu\text{g} / \text{ml}$  のカナマイシンを含む 2TY 培地に再度懸濁した。この懸濁液を  $30^\circ\text{C}$  で一晩培養した。ELISA サンプルは一晩培養液を遠心分離して得た上清を用いた。

ELISA プレート (Nalge Nunc International) のウェルに  $50 \mu\text{L}$  の HSA 溶液 ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  HSA を含む 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$  (pH 8.3)) を添加し、 $4^\circ\text{C}$  で一晩固定化した。その後、ELISA プレートを PBS で洗浄し、0.5%ゼラチンを含む PBS で室温 2 時間ブロッキングを行った。ELISA プレートを PBST で 3 回洗浄した後、 $25 \mu\text{L}$  の 1%ゼラチン溶液 (PBS で溶解) と  $25 \mu\text{l}$  の ELISA サンプルを ELISA プレートに添加し、全量  $50 \mu\text{l}$  とした。ELISA プレートを振盪しながら 1 時間室温でインキュベートし、次いで PBST で 5 回洗浄した。その後、 $50 \mu\text{l}$  の抗体溶液 (conjugate of anti-M13 antibody with horseradish peroxidase (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA)) を、0.5%ゼラチンを含む PBS で 1:5000 に希釈して ELISA プレートに添加した。この ELISA プレートを振盪しながら 1 時間室温でインキュベートした後、PBST で 5 回洗浄した。検出には、 $50 \mu\text{l}$  の 3,3',5,5' - tetramethylbenzidine (One-step Ultra, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) を基質として用いた。5 分間の酵素反応後、反応を  $\text{H}_2\text{SO}_4$  の添加によって停止させた。 $450\text{nm}$  の吸光度をマイクロプレートリーダー (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) を用いて測定した。

#### 3-2-4 ヒト血清アルブミン特異的結合ファージの結合特異性評価 (ELISA)

3-2-3に記載のファージクローン分析と同様の方法で行った。ファージに感染した大腸菌 TG-1 株のコロニーを、1ml の 2TYAG 培地にピックアップし、30℃で一晩培養した。各培養液を 2TYAG 培地で 1:100 に希釈し、対数増殖期になるまで成長させた。この大腸菌培養液にファージ M13K07 を添加し、37℃で振とうすることなく 30 分間維持することでファージを感染させた。遠心分離後、上清を除去し、ペレットを 100  $\mu$ g/ml のアンピシリンおよび 50  $\mu$ g/ml のカナマイシンを含む 2TY 培地に再度懸濁した。この懸濁液を 30℃で一晩培養した。ELISA サンプルは一晩培養液を遠心分離して得た上清を用いた。

ELISA プレート (Nalge Nunc International) のウェルに 50  $\mu$ L のヒト血清アルブミン (HSA) 溶液 (1  $\mu$ g/ml HSA を含む 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.3))、またはブタアルブミン (PSA) 溶液、卵白アルブミン (CEWA) 溶液、ヒトリゾチーム (HL) 溶液、卵白リゾチーム (CEWL) 溶液 (いずれも 1  $\mu$ g/ml を含む 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.3)) を添加し、4℃で一晩固定化した。その後、ELISA プレートを PBS で洗浄し、0.5%ゼラチンを含む PBS で室温 2 時間ブロッキングを行った。この ELISA プレートを PBST で 3 回洗浄した後、25  $\mu$ L の 1%ゼラチン溶液 (PBS で溶解) と 25  $\mu$ L の ELISA サンプルを ELISA プレートに添加し、全量 50  $\mu$ L とした。その後、3-2-3 と同様の方法で ELISA 測定を行った。

#### 3-2-5 単鎖抗体の大腸菌での発現

scFv 遺伝子を有するファージクローンを大腸菌 HB2151 に感染させ、2TYAG プレート上で 30℃一晩培養した。大腸菌コロニーをピックアップし 2TYAG 培地に懸濁し、30℃で一晩培養した。この培養液を 2TYAG 培地で 1:100 に希釈し、600nm の吸光度が 0.5 に到達するまで培養した。遠心後、上清を除きペレットを 100  $\mu$ g/ml ampicillin と 1 mM IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) を含む 2TY 培地で懸濁し、30℃で 6 時間培養した。

培養液を遠心分離後、上清を上清画分として回収した。さらに大腸菌のペリプラズム画分は浸透圧ショック法<sup>3</sup>を用いて調整した。培養液遠心分離後のペレットを spheroplasting buffer (4℃, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 20% (w/v) sucrose) で懸濁し、10 分間氷上で維持した。懸濁液を 20,000 $\times$ g、15 分間遠心し、再度ペレットを回収した。次いで、このペレットを水 (4℃) 中に懸濁し、10 分間氷上で維持した。懸濁液を 20,000 $\times$ g、15 分間遠心し、上清をペリプラズム画分として回収した。次いで、残ったペレットを PBS に懸濁し、SONIFIER 450 (Branson, CT, USA) を用いて 5 分間超音波処理した。15 分間、20,000 $\times$ g で遠心分離後、上清を細胞質画分として回収した。

### 3-2-6 Western blotting

3-2-5 記載の方法にて、上清画分、ペリプラズム画分および細胞質画分を、scFv タンパク質を発現する大腸菌から調製した。これらの画分を sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (12% TGX gel, Biorad) で分離し、semidry membrane transfer system (GE Healthcare) を用いて polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Hybond-P, GE Healthcare) に転写した。転写した PVDF 膜を 5% スキムミルクを含む PBS でブロッキングし、scFv 抗体を anti-Myc-Tag HRP-Direct (Medical and Biological Laboratories Co., Ltd., Nagoya, Japan) と ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) にて検出した。発光は、Image Quant 350 (GE Healthcare) にて 5 分間露光し検出した。分子量マーカーは可視光で検出し、発光検出のデータと統合した。

### 3-2-7 親和性解析

scFv を発現した大腸菌 HB2151 株のペリプラズム画分を浸透圧ショック法により回収した。次いで、scFv 抗体を HisTALON™ Superflow™ Cartridges (Takara Bio.) を用いたアフィニティークロマトグラフィーによってペリプラズム画分から精製した。精製した scFv を PBS で透析し、分析に使用した。結合親和性は Biacore T100 system (GE Healthcare) を用いて分析した。CM5 チップ上にアミノカップリング反応により、HSA を 251.7RU 固定化した。緩衝液は、HBS-EP (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA and 0.005% (v/v) Surfactant P20) を用い、流速は 50  $\mu$ l/min、分析温度は 25°C とした。精製した scFv を HBS-EP 緩衝液で希釈し、様々な濃度に調製した。結合応答および解離応答は 2 分で測定した。scFv 固定化チップは個々の測定毎に glycine buffer (pH 2.0) を 15 秒流すことにより再生した。結合速度定数は、Biacore T100 (GE Healthcare) システムの評価ソフトウェアである Evaluation software を用い、1:1 結合モデルにより計算した。

### 3-3 結果と考察

#### 3-3-1 ブタ単鎖抗体ライブラリの構築

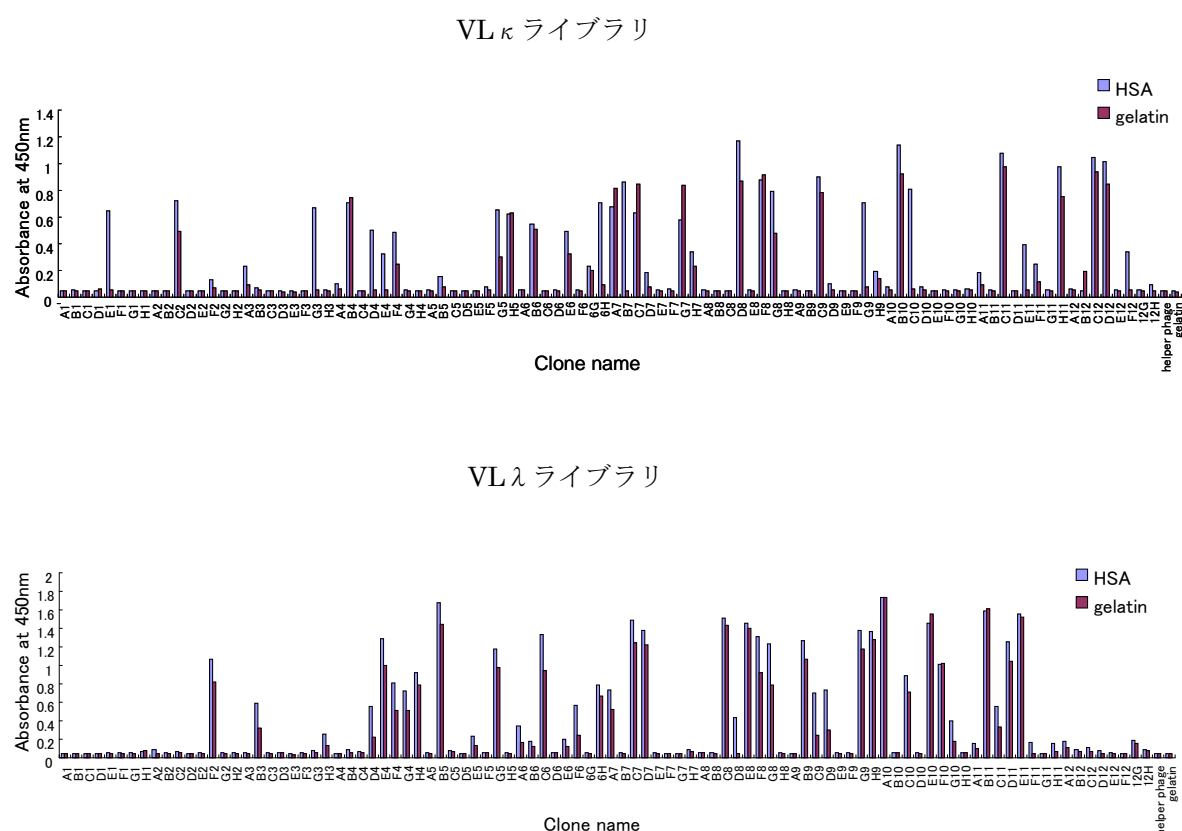
ブタモノクローナル抗体を得るために、HSA を抗原として免疫したブタの血液 B 細胞から scFv 提示ファージライブラリを構築した。免疫したブタの末梢血単核細胞 (PBMC) から抽出した Total RNA からオリゴ dT プライマーを用いた RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) にて cDNA を調製した。first PCR では、プライマー (Table3 (A)) を用いて、重鎖 (VH) および軽鎖 (VL) の可変領域を cDNA から増幅した。VH および VL 遺伝子を増幅した後、second PCR において、制限酵素サイトを first PCR 産物に付加した。third PCR において、GS リンカープライマーと VH 遺伝子及び VL 遺伝子を連結して、scFv 遺伝子を生成し、scFv 遺伝子をファージミドベクター (Figure13) に連結した。ライブラリの多様性は、ファージミドベクターを形質転換された大腸菌 TG-1 株の数をカウントすることによって、VL  $\kappa$  では  $1.4 \times 10^7$ 、VL  $\lambda$  では  $1.5 \times 10^7$  であると決定された。

#### 3-3-2 ヒト血清アルブミン特異的結合ファージの単離

構築したファージライブラリを用いて HSA に対するバイオパニングを行った。バイオパニングを 2 ラウンド実施した。各ラウンドで、ウェルに添加するファージ数は  $1 \times 10^{10}$  cfu とした。1 回目のラウンドの後に溶出されたファージ数は、VL  $\kappa$  ライブラリ、VL  $\lambda$  ライブラリ共に  $2 \times 10^6$  cfu であった。2 ラウンドの後に溶出されたファージ数は、VL  $\kappa$  ライブラリで  $3 \times 10^3$  cfu、VL  $\lambda$  ライブラリで  $1 \times 10^4$  cfu であった。2 ラウンド後に溶出されたファージ数は、1 ラウンド目よりも減少する結果となった。通常、バイオパニングでは、ラウンドを重ねる毎に抗原に対して結合能を示すクローンが濃縮されてくるため、溶出ファージ数は増加する<sup>4</sup>。しかし、今回のパニングではラウンド毎に抗原と反応させる条件を一部変更した。変更点は、抗原とファージを相互作用させる際に、1 ラウンド目ではゼラチンとファージを混合したのに対し、2 ラウンド目では、スキムミルクとファージを混合した点である。ファージライブラリの中には、通常、scFv を提示したファージだけではなく、PCR 段階で発生した scFv 以外の遺伝子から生成されるタンパクを提示したファージ、何も提示していないファージなど様々なファージが含まれている。抗原と結合するという機能を有していない他のファージが固相化した HSA やブロッッキング剤、あるいは固相面に非特異的に結合してしまうと、目的とする抗原と結合する機能を有する scFv 提示ファージを選別することが困難となってしまう。この問題を解決するために、バイオパニング時には非特異的な結合をするファージの結合を減少させる目的でファージ溶液に様々なタンパク質を混合した。1 ラウンド目よりも 2 ラウンド目の溶出ファージ数が少ないのは、非特異的な結合

をするファージが各ラウンドで徐々に除かれている結果と考えられる。一方で、抗原と特異的に結合するファージは溶出ファージ中で増加していると予想し、2 ラウンド目の後、VL $\kappa$  ライブラリと VL $\lambda$  ライブラリから各 96 ファージをクローニングし、ELISA を用いたスクリーニングを実施した。

HSA とブロッキング剤であるゼラチンのみをコートした ELISA ウェルを用いて ELISA を行った結果を Figure14 に示す。VL $\kappa$  では 10 クローン、VL $\lambda$  では 3 クローンが HSA への特異的結合を示した。このことから、非特異的結合をするクローンを極力除くための上記条件を導入したことで、特異的なクローンの増幅がスクリーニング時に十分起こっていたと考えられる。一方で、VL $\kappa$  ライブラリと VL $\lambda$  ライブラリ共に、HSA にもゼラチンにも結合するクローンが多く見受けられた。このことは、今回のバイオパニングの過程では、非特異的に結合しているファージが多く混在したままであったことを示すと考えられる。バイオパニングの条件設定には課題が残るものの、本研究で用いたブタ scFv 抗体ライブラリ構築方法を用いて、抗原特異的な抗体を採取できることが確認できた。



**Figure 14 ヒト血清アルブミン特異的結合ファージのスクリーニング**

2 ラウンド目の VL $\kappa$  ライブラリと VL $\lambda$  ライブラリから各 96 ファージをクローニングし、ELISA 測定を行った。固定化抗原はヒト血清アルブミン(HSA)とブロッキング剤であるゼラチン(gelatin)を用い、HRP 修飾抗 M13 抗体を用いて検出を行った。

### 3-3-3 ヒト血清アルブミン特異的結合ファージの結合特異性評価と単離クローンの配列解析

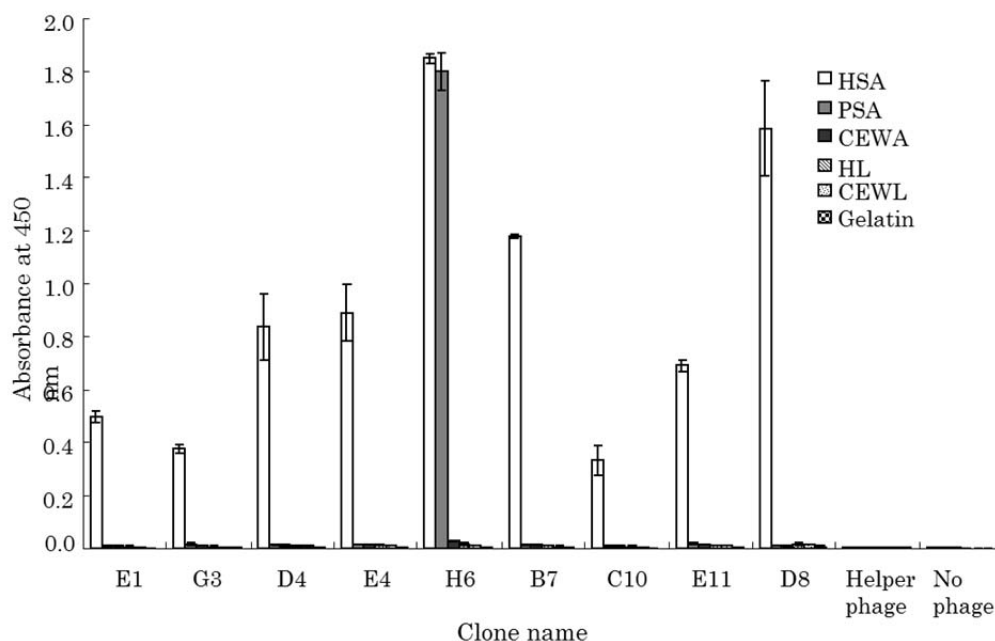
Figure14 で特異的結合を示したファージクローンの DNA 配列分析の結果、単離されたクローンの scFv 配列は 9 種類、すなわち D4、E4、E11、H6、E1、G3、B7、C10 および D8 が存在した。

ELISA 評価を用いてこれら scFv 提示ファージの結合特異性検証した結果を Figure15 に示す。ブタ血清アルブミン(PSA)、卵白アルブミン(CEWA)、ヒトリゾチーム(HL)、卵白リゾチーム(CEWL)およびゼラチン (Gelatin) との交差性を確認した結果、9 クローンのうち 8 クローンは HSA と特異的に結合していることが示された。一方で、非常に興味深いことに、残る 1 クローン (H6) は HSA 以外のブタ血清アルブミン (PSA) に対する交差反応性を示した。通常、自己抗体は体内で排除されると考えられるため、ブタ体内に存在するタンパク質に対して結合能を有する H6 が得られたことは興味深いことである。このような抗体が得られた原因としてファージディスプレイ法による抗体選択過程にあると考えられる。1 つは、ライブラリ構築の過程である。ライブラリを構築する際には、VH 遺伝子と VL 遺伝子をそれぞれ増幅し、両者をランダムに繋ぎ合わせて scFv 遺伝子を構築する。この時、本来ブタ体内には存在しなかった VH 遺伝子と VL 遺伝子の組み合わせが発生し、これが自己抗体の性質を有していた可能性が考えられる。もう一つは、バイオパニングの過程である。バイオパニングでは、抗原への結合力を唯一の指標として、結合力の高い抗体遺伝子を提示したファージが増幅される。ブタ体内に極わずかに存在していた自己抗体 (ファージライブラリにも極わずかに存在していた scFv ファージ) が増幅され、単離された可能性が考えられる。

単離された 9 種類の scFv のアミノ酸配列を Figure16 にまとめた。7 クローン (D4、E4、E11、E1、G3、B7、C10) の VH は非常に類似しており、相補性決定領域 (CDR) は同一であった。IMGT-V/Quest (<http://www.imgt.org/>) を用い、各ブタ抗体の VH ドメインのサブファミリーを検索した結果、D8 は IGHV1S2 (accession number: AF064688) に属し、それ以外は IGHV1S1 (accession number: AF064686) であることが示された。JH 遺伝子は IGHJ1 (accession number: AJ554305) が共通で使用されていたが、D8 ではアミノ酸変異 (VH-FR4 中の Gly が Ala に変異) が観察された。一方、scFv の VL ドメイン間の配列類似性は VH と比較して低く、D8 は、VL  $\lambda$  鎖を有しており、他の 8 つのクローンは VL  $\kappa$  鎖を有した。IMGT-V/Quest (<http://www.imgt.org/>) を用いたサブファミリー検索の結果、D8 は IGLV8-10 に属しており、J 遺伝子は IGLJ2 であった。また、D4 は IGKV1-11 or IGKV1D-11、E4 と E11 と E1 と B7 と C10 は IGKV1-11、G3 は IGKV1-9、H6 は IGKV2-10 or IGKV2-8 に属していた。J 遺伝子は IGKJ2 が共通して使用されていたが、E1、G3、B7 ではアミノ酸変異が観察された (VH-FR4 中の Ile が Leu に変異)。以上のことから、プライマーセットは少ないながらも、VH と VL の組み合わせがバラエティに富んだクローンを獲得できることが示された。ま

た、D8 と H6 を除いた 7 クローンについては VH が非常に類似していることから、結合作用機序に関する VH の重要性が示された。

さらに、IMGT-V/Quest (<http://www.imgt.org/>) を用い、各ブタ抗体の VH ドメインと相同性の高いヒト抗体サブファミリーを検索した結果、単離されたブタ抗体は全てヒト抗体 IGHV3-23 と相同性が高いことが確認された。



**Figure 15 単離されたファージクローンの Phage ELISA**

スクリーニングされたファージクローンの ELISA 測定を行った。固定化抗原はヒト血清アルブミン(HSA)、ブタ血清アルブミン(PSA)、卵白アルブミン(CEWA)、ヒトリゾチーム(HL)、卵白リゾチーム(CEWL)を用い、HRP 修飾抗 M13 抗体を用いて検出を行った。なお、ゼラチン (Gelatin) はブロッキング剤である。‘Helper phage’ はヘルパーファージを添加したウェルを示し、‘No phage’ はファージ溶液を加えていないウェルを示す。エラーバーは同一サンプルを N=3 にて測定した標準偏差を示す。



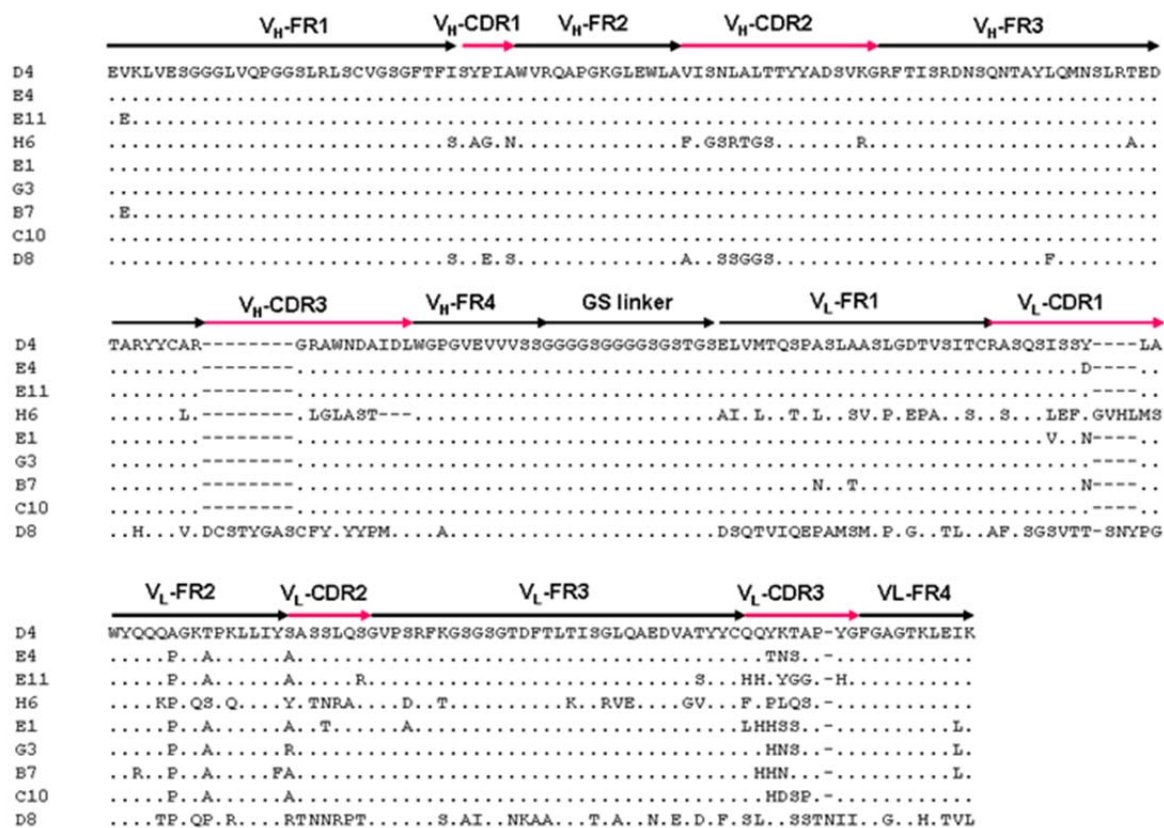
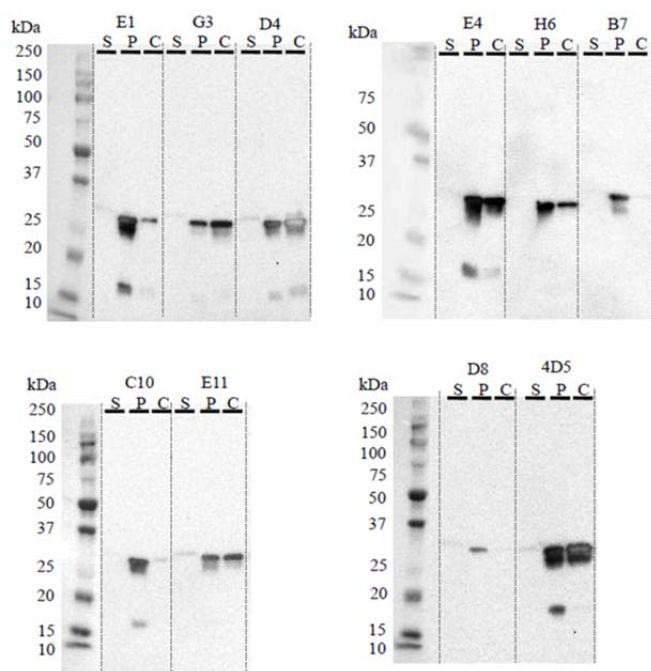


Figure 16 抗ヒト血清アルブミン scFv のアミノ酸配列

ライブラリから単離された scFv のアミノ酸配列を D4 に合わせて記載した。ドットは D4 と同一のアミノ酸を示し、バレーは欠損を示す。CDR 領域は既報<sup>5</sup>を参考に決定した。

### 3-3-4 ブタ由来単鎖 (scFv) 抗体の大腸菌での発現特性

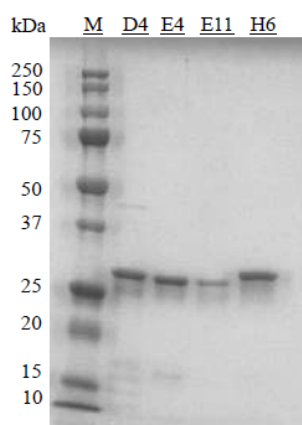
次に、個々のブタ由来 scFv 抗体クローンを大腸菌による発現が可能かを検討した。それぞれの scFv 遺伝子を担持するファージミドベクターで形質転換された大腸菌 HB2151 株を使用して、IPTG の誘導により scFv を発現した。大腸菌培養液を回収し、3つのフラクション（上清画分、ペリプラズム画分、細胞質画分）を調整した。これらの各画分をウェスタンブロッティングによって分析した。比較として、発現を最適化されたフレームシーケンスを持つヒト化抗体である 4D5（抗 HER2 抗体、鹿児島大学伊東研究室所有）の scFv の遺伝子を含むファージミドベクターを用意し、同様に 3つのフラクションを調整し分析を行った。結果を Figure17 に示す。E1、G3、D4、E4、H6 及び E11 の各 scFv はペリプラズム画分および細胞質画分の両方で発現していた。B7 と D8 は、ペリプラズム画分中だけにのみ存在し、低レベルで発現していた。4D5 は、ペリプラズム画分および細胞質画分の両方で発現していた。ペリプラズム画分において、B7、C10、D8、E11、G3 と H6 の scFv は 4D5 よりも低いレベルで発現していたが、D4、E1 と E4 は 4D5 と同様の発現をしていた。



**Figure 17 scFv のウェスタンブロッティング分析**

E1, G3, D4, E4, H6, B7, C10, E11 and D8 ブタ scFv を大腸菌 HB2151 で蛋白質発現した。上清画分(S)、ペリプラズム画分(P)、細胞質画分(C)を回収し、SDS-PAGE で分離を行った。SDS-PAGE を行ったタンパクを PVDF 膜に転写し、抗 myc-tag 抗体にて検出を行った。

次にファージ ELISA とウェスタンブロットの結果に基づいて、結合特異性が高く、ペリプラズム画分での発現量の高かった 4 つの scFv クローン (D4、E4、H6、E11) を選択した。それぞれのクローンを大腸菌 HB2151 で発現し、ペリプラズム画分を集めた後、タンパク質を His タグトラップカラムで精製した。精製した scFv を SDS-PAGE で確認したところ、主要なバンドは約 27 kDa に観察された。これは scFv のアミノ酸配列から算出した分子量とほぼ同一であった (Figure18)。また、スミアバンドが 25kDa の下に観察され、精製中に scFv の分解が部分的に発生する可能性が示唆された。E4 または D4 の scFv タンパク質回収量は 500mL の大腸菌培養液から約 200  $\mu$ g であった。E11 は約 50  $\mu$ g であり、H6 は約 5  $\mu$ g であった。scFv クローンによる差があるものの、続く解析のために十分な量の scFv タンパク質を水溶性画分から回収することができた。これらブタ由来の scFv 抗体を用いて、親和性解析を実施した。



**Figure 18 精製 scFv の SDS-PAGE 分析**

大腸菌 HB2151 株にて 4 種の scFvs (D4、E4、E11、H6) を発現し、ペリプラズム画分を回収した。His タグを有する scFv 蛋白質を HisTALON superflow cartridge にて精製した後、SDS-PAGE (TGX 12% gel) にて分離を行い、Coomassie Brilliant Blue にて染色を行った。各レーンには 0.2-1  $\mu$ g のサンプルを添加した。M は分子量マーカーを示す。

### 3-3-5 ブタ由来 scFv 抗体の親和性解析

Biacore T100 system によって scFv の結合親和性を分析した。HSA を固定化した CM5 チップ上に scFv を送液し、得られた応答曲線を Figure 19 に示した。Biacore response(RU)は CM5 チップ上の HSA 固定化レーンで得られた応答から、カップリングのみを行ったブランクレーンの応答を差し引いた数値を示した。4つの scFv クローン全てで、抗原抗体反応と思われる結合と解離を示す応答曲線が得られた。

次に、Figure19 から、1:1 結合モデルを用いて反応速度定数( $k_a$ ,  $k_d$ )および解離平衡定数 ( $K_D$ ) を算出した。算出した反応速度定数( $k_a$ ,  $k_d$ )および解離平衡定数 ( $K_D$ ) を Table4 に示した。 $K_D$ は、 $0.9 \times 10^{-8}$  M から  $2.0 \times 10^{-8}$  M の間の数値を示し、取得した scFv 抗体が報告された他の種からの scFv に匹敵する親和性を持っていたことが示された<sup>6,7</sup>。

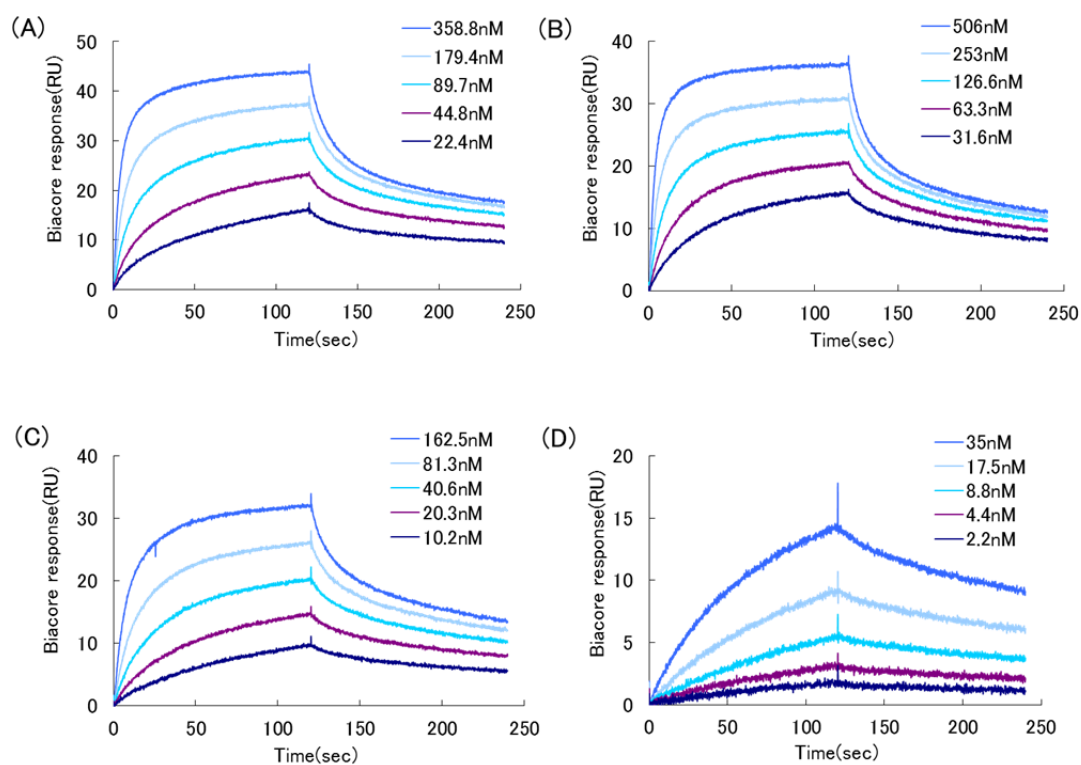


Figure 19 Biacore を用いた scFv の親和性解析

4つの scFv の結合親和性を Biacore T100 にて測定した。得られた応答曲線は(A) D4、(B) E4、(C) E11、(D) H6 である。グラフ内のデータラベルは HSA 固定化 CM5 チップ上に添加した各 scFv の濃度を示す。

Clone name	$k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	$K_D$ (M)
D4	$3.2 \times 10^5$	$5.7 \times 10^{-3}$	$1.80 \times 10^{-8}$
E11	$4.6 \times 10^5$	$5.9 \times 10^{-3}$	$1.30 \times 10^{-8}$
E4	$3.4 \times 10^5$	$7.0 \times 10^{-3}$	$2.10 \times 10^{-8}$
H6	$3.7 \times 10^5$	$3.5 \times 10^{-3}$	$0.94 \times 10^{-8}$

**Table 4** scFv の親和性解析

scFv の速度定数を Biacore T-100 にて分析した。HSA を固定した CM5 センサーチップを用いて得られた応答曲線 (Figure19) から、Biacore evaluation software にて 1:1 binding model を用いて算出した。

### 3-4 小括

本章では、HSA 免疫ブタからの scFv ファージライブラリの作製、および HSA に対するバイオパニングによるブタ抗体の単離、さらに大腸菌によりブタ由来 scFv 抗体の発現とその親和性解析を行った。

ファージライブラリからは HSA に結合する能力を有する 9 つのブタ由来 scFv 抗体が同定された。このことは、設計したプライマーの実効性を確認し、ブタ抗体を得る手段としてのファージライブラリ法の有用性を示す結果であったと考えられる。そして、これらクローンのうち 7 クローンは (D4、E4、E11、H6、E1、G3、B7、C10)、同一の CDR、共通の VH シーケンスを持っていた。このことは、VH ドメインがこれら scFv における抗原結合における主要な役割を果たすことを示唆すると考えられる。さらに、ブタ抗体と相同性の高いヒト抗体の VH 領域のシーケンスを検索した結果、単離された全てのブタ抗体はヒト抗体 IGHV3-23 と相同性が高いことが確認された。このことは既報と一致する結果であった<sup>8</sup>。

以上を鑑みると、これまで抗原特異的結合能を有するブタ抗体の特性については解析されてこなかったが、本章において単離されたブタ抗体は、高い親和性および低い交差反応性を示すとともに、大腸菌内で可溶性画分として組換え生産できることが確認された。さらに、単離されたブタ抗体はヒト抗体 IGHV3-23 と相同性が高いことが確認されたことで、ブタ抗体がマウス抗体と同様に抗体医薬への応用展開が可能であることを示唆する結果と考えられる。

### 3-5 引用文献

1. Takano E, Maki M, Hatanaka M, et al. Evidence for the repetitive domain structure of pig calpastatin as demonstrated by cloning of complementary DNA. *FEBS Lett.* 1986;208:199-202.
2. Clackson T, Lowman HB. *Phage display: a practical approach*. Oxford University Press, U. S. A. ; 2004.
3. 三本木 至宏. 大腸菌ペリプラズム抽出液の回収. 蛋白質科学会アーカイブ. 2008. Available at: [http://www.pssj.jp/archives/Protocol/Expression/perip\\_01/perip\\_01\\_01.html](http://www.pssj.jp/archives/Protocol/Expression/perip_01/perip_01_01.html).
4. Yamashita T, Utoguchi N, Suzuki R, et al. [Development of anti-tumor blood vessel antibodies by phage display method]. *Yakugaku Zasshi*. 2010;130(4):479-485.
5. Li F, Aitken R. Cloning of porcine scFv antibodies by phage display and expression in *Escherichia coli*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2004;97(1-2):39-51.
6. Maeda M, Ito Y, Hatanaka T, et al. Regulation of T cell response by blocking the ICOS signal with the B7RP-1-specific small antibody fragment isolated from human antibody phage library. *MAbs*. 2009;1(5):453-61.
7. Hamasaki T, Hashiguchi S, Ito Y, et al. Human anti-human IL-18 antibody recognizing the IL-18-binding site 3 with IL-18 signaling blocking activity. *J Biochem*. 2005;138:433-442.
8. Sun J, Kacs Kovics I, Brown WR, Butler JE. Expressed swine VH genes belong to a small VH gene family homologous to human VHIII. *J Immunol*. 1994;153:5618-5627.

## 第4章 ヒト血清アルブミン特異的ブタ抗体の抗原認識特性評価

### 4-1 小序論

抗体医薬開発において、抗体のヒト化は抗原性を低減するために必要不可欠な工程であり、現在、キメラ抗体（マウスの可変領域とヒトの定常領域から構成された抗体）、ヒト化抗体（マウスの相補鎖決定領域（CDR）とヒトの可変領域フレームワーク（FR）とヒトの定常領域から構成された抗体）の2種が医薬品として使用されている。キメラ抗体はマウス抗体遺伝子に由来するアミノ酸配列が比較的多く残った抗体であり、これに起因する抗原性が問題となる。そのため、抗原認識に関わる CDR 以外のアミノ酸を全てヒト型アミノ酸に置換したヒト化抗体が作製されているが、ヒト化抗体の作製には技術的な手間が多く、困難な場合もある。キメラ抗体よりもヒト抗体に近い抗体として、マウス軽鎖可変領域（VL）とヒト VL を置換して、マウス重鎖可変領域（VH）とヒト軽鎖可変領域（VL）からなる抗体も考えられる。このマウス VH とヒト VL からなる抗体は比較的作製が容易であり、実際に作製された例もあるが、作製された抗体はオリジナルのマウス抗体よりも結合力の低下を引き起こすことが報告されている<sup>1</sup>。さらに同報告では、CDR-grafting によりマウスの CDR とヒト FR とを連結したヒト化抗体も、オリジナル抗体よりも結合力が低下することを示している。仮に抗体の抗原性が低下しても、結合力が低下しては抗体医薬品としての価値はほとんどなくなってしまう。単純な異種抗体鎖の置換や、CDR-grafting によって、元のマウス抗体が持っていた抗体機能を維持することは容易ではない。

ヒト VL 遺伝子との置換や CDR-grafting によって抗体の結合力が低下した原因は、抗体遺伝子の置換によって、抗原を認識していたマウス抗体 CDR の立体構造が崩れたことによると考えられる。抗体 CDR 領域は、CDR や FR の中のいくつかのアミノ酸残基により構成されるカノニカル構造と呼ばれる限定的な構造を取っており<sup>2,3</sup>、このカノニカル構造が崩れないような遺伝子変換を行うことで抗体の結合能が維持されると期待される。実際に、CDR-grafting によりマウス抗体 CDR 以外を全てヒト由来遺伝子に置換する際に、カノニカル構造の維持に重要なアミノ酸残基を変異導入することによって、抗体結合力が維持されることが報告されている<sup>4,5</sup>。また、より結合活性の高い抗体を得るために、ヒト化抗体のカノニカル構造に関わる残基位置に、マウス抗体型とヒト化抗体型の両方が含まれるようなライブラリを作製し、望む抗体をスクリーニングするといった試みもなされており<sup>6</sup>、結合力の高いヒト化抗体を得るための様々な試みが行われている。

マウス抗体からヒト化抗体を作製する試みが多く報告されている一方で、ブタと同様に抗体遺伝子レパートリーが少ない動物種として知られる、ニワトリ抗体やウサギ抗体<sup>7,8</sup>といったマウス抗体以外の抗体からヒト化抗体を作製する研究も行われている。例えば、ニワトリ抗体 CDR 以外とヒト抗体 FR からなるヒト化抗体の、立体構造の維持に重要なアミノ酸残基部分をライブラリ化し、高親和な抗体をスクリーニングした報告<sup>9</sup>や、ニワトリ抗体



のキメラ抗体と、CDR-grafting によりニワトリ抗体 CDR 以外を全てヒト由来遺伝子に置換すると同時に立体構造の維持に重要なアミノ酸残基を変異導入したヒト化抗体が、オリジナルのニワトリ抗体と同様の結合活性を有していたという報告がされている<sup>10</sup>。また、ウサギ抗体の CDR-grafting によってヒト化抗体を作製する場合も、構造の維持に重要なアミノ酸残基を残すことで活性や構造安定性が保持されることが報告されている<sup>11</sup>。ニワトリ抗体やウサギ抗体の場合も、マウス抗体と同様に、元の抗体の構造を維持することが抗体結合力の維持に重要である。ブタ抗体の場合も同様であると考えられる。また、ニワトリ抗体やウサギ抗体は遺伝子レパートリーが少ないため、一旦ヒト化の方法を確立できれば、同種の抗体に適用しやすく、作業工程を単純化しやすいという特徴を有する。これはブタ抗体においても同様に期待される点と考えられる。

本研究は、ブタ抗体の抗体医薬への応用可能性を検証することを目的とした。本章ではモデル抗体として、第3章で単離したブタ抗体 D4 を用い、D4 抗体の抗原との結合ドメインの検証を行うと共に、ブタ抗体からヒト抗体への変換プロセスについて検討を行った。

## 4-2 材料と方法

### 4-2-1 ヒト血清アルブミン抗体特異的ブタ抗体を用いた VH/VL 置換抗体の作製

第3章で単離されたブタ抗体クローンから D4、H6 の2種類を選択した。さらにヒト化抗体として 4D5 抗体を選択し、これらの VL 遺伝子の置換を行った。作製する遺伝子は、D4 の VH 遺伝子 (D4.VH) と H6、4D5 の VL 遺伝子 (H6.VL、4D5.VL) を組合せた2種類とした (Figure 20)。

まず D4 遺伝子を含むファージミドベクターを制限酵素 *SalI* (New England Biolabs) と及び *NotI* (New England Biolabs.) で消化し、1%アガロースゲルを用いた電気泳動と精製を行い、線状化ベクターを得た。H6 遺伝子、4D5 遺伝子を含むファージミドベクターを同様に制限酵素で消化し、精製することで、*SalI* と *NotI* で消化された VL 遺伝子を得た。得られたベクターと VL 遺伝子を連結することで、D4 の  $V_H$  遺伝子 (D4.VH) と H6 の  $V_L$  遺伝子 (H6.VL) からなる scFv (D4/H6) 遺伝子、D4.VH と 4D5 の  $V_L$  遺伝子 (4D5.VL) からなる scFv (D4/4D5) 遺伝子をそれぞれ含むファージミドベクターを構築した。これら scFv の遺伝子断片を含むベクターは、次いで蒸留水に溶解し、フェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿により精製した。精製した DNA は、大腸菌 HB2151 株にヒートショック法によりそれぞれ形質転換した。形質転換された大腸菌 HB2151 株は 2TYAG プレート (2TYAG プレート:2TY 培地、1.5%寒天、2%グルコースおよび 100  $\mu$ g/ml/ ml のアンピシリンを含む培養プレート) にて 30°Cで一晩培養し、シングルコロニーを得た。

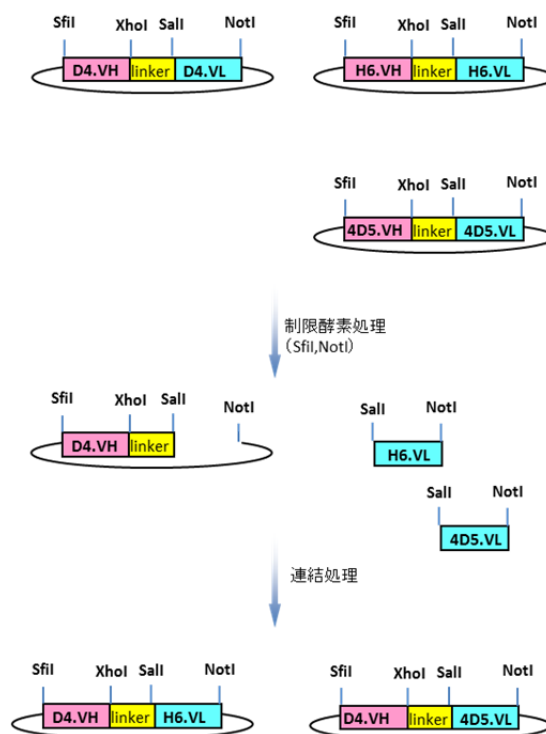


Figure20 scFv 遺伝子の構築

### 4-2-2 VH/VL 置換抗体の大腸菌発現と精製

形質転換された HB2151 株シングルコロニーを 2TYAG 培地 (2TY 培地、2%グルコースおよび 100  $\mu$ g/ml/ ml のアンピシリンを含む培地) に懸濁し、30°Cで一晩培養した。この培養液を 2TYAG 培地で 1:100 に希釈し、600nm の吸光度が 0.5 に到達するまで培養した。培養液

を遠心後、上清を除きペレットを 100  $\mu$ g/ml ampicillin と 1 mM IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside)を含む 2TY 培地で懸濁し、30℃で 6 時間培養した。

培養液を遠心分離後、上清を上清画分として回収した。大腸菌のペリプラズム画分は浸透圧ショック法<sup>12</sup>を用いて調整した。培養液遠心後のペレットを spheroplasting buffer (4° C, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 20% (w/v) sucrose)で懸濁し、10 分間氷上で維持した。ペレットは、20,000 $\times$ g、15 分間遠心することで回収した。次いで、ペレットを水 (4℃) 中に懸濁し、10 分間氷上で維持した。ペレットを 20,000 $\times$ g、15 分間遠心し、上清をペリプラズム画分として回収した。次いで、ペレットを PBS (phosphate buffered saline, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4)に懸濁し、SONIFIER 450 (Branson)を用いて 5 分間超音波処理した。15 分間、20,000 $\times$ g で遠心分離後、上清を細胞質画分として回収した。これら上清画分、ペリプラズム画分、細胞質画分をウェスタンブロットティングのサンプルとした。

また、scFv の精製は、形質転換された HB2151 株のペリプラズム画分を浸透圧ショック法により回収した後、scFv 抗体を HisTALON™ Superflow™ Cartridges (Takara Bio.)を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。アフィニティークロマトグラフィーによって精製した scFv を PBS で透析した後に、ELISA に使用した。さらに、この scFv を、ゲルろ過クロマトグラフィーで分離精製した後に、Biacore を用いた親和性解析に用いた。ゲルろ過カラムは TSKgel G2000swxl(TOSO)を用い、0.01M phosphate buffered saline(WAKO)、流速 1mL/min にて scFv の分離を行い、単量体の scFv のみを回収した。scFv の濃度は、Coomassie(Bradford) Protein Assay Kit(Thermo Scientific)を用い、既知濃度の BSA を対照として測定した。

#### 4-2-3 Western blotting

4-2-2 で得た未精製の上清画分、ペリプラズム画分および細胞質画分を sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (5-20% PAGEL gel, ATTO) で分離し、semidry membrane transfer system (GE Healthcare)を用いて polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Hybond-P, GE Healthcare)に転写した。転写した PVDF 膜を 5%スキムミルクを含む PBS でブロッキングし、scFv 抗体を anti-Myc-Tag HRP-Direct (Medical and Biological Laboratories Co., Ltd.)と ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare)にて検出した。発光は、Image Quant 350 (GE Healthcare)にて 5 分間露光し検出した。

#### 4-2-4 VH/VL 置換抗体の結合特性評価(ELISA)

ELISA プレート(Nalge Nunc International)のウェルに 50  $\mu$ L のヒト血清アルブミン(HSA)溶液、またはウシ血清アルブミン(BSA)溶液、ブタアルブミン(PSA)溶液、卵白アルブミン(CEWA)溶液を添加し、4℃で一晩固定化した。各溶液は 1  $\mu$ g/ml となるように 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.3)で溶解して調整した。その後、ELISA プレートを PBS で洗浄し、0.5%ゼラチンを含む PBS でブロッキングを行った。ELISA プレートを PBST で 3 回洗浄した後、精製した scFv をそれぞれ ELISA プレートに添加した。ELISA プレートを振盪しながら 1 時間室温でインキュベートし、次いで PBST で 5 回洗浄した。その後、anti-6xHis tag antibody (HRP) (abcam)を 0.5%ゼラチンで希釈し、50  $\mu$ L を ELISA プレートに添加した。ELISA プレートを振盪しながら 1 時間室温でインキュベートした後、PBST で 5 回洗浄した。検出には、50  $\mu$ L の 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine を基質として用い、酵素反応後、反応を HCl の添加によって停止させた。450nm の吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定した。

#### 4-2-5 VH/VL 置換抗体の親和性評価(Biacore)

Biacore3000 を用い、CM5 チップ上にアミノカップリング反応により、HSA を 349.6RU 固定化した。緩衝液は、HBS-EP (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA and 0.005% (v/v) Surfactant P20)を用い、流速は 50  $\mu$ L/min、分析温度は 25℃とした。精製した 4 種類の scFv (D4/D4, D4/H6, D4/4D5) を HBS-EP 緩衝液で希釈し、20nM~1.25nM となるように濃度を調製した。結合応答および解離応答は 2 分で測定した。scFv 固定化チップは個々の測定毎に glycine buffer (pH 2.0)を 15 秒流すことにより再生した。結合速度定数を Biacore 3000 (GE Healthcare)システムの評価ソフトウェアを用い、1:1 結合モデルにより計算した。

#### 4-2-6 VH/VL 置換抗体のアミノ酸解析と構造予測

MOE 2012.10 (株式会社菱化システム)Antibody Modeler を用いて、scFv 抗体の構造モデリングを行った。D4、H6、4D5 のアミノ酸配列を用いて、ヒト抗体かつ、抗原がタンパク質である抗体リストの中からアミノ酸配列が類似した構造をテンプレートとして抽出し、エネルギー最小化計算後の立体構造を予測構造として、検討に使用した。テンプレートには PDF No. ;3DVN を用いた。

### 4-3 結果

#### 4-3-1 ブタ抗体とヒト抗体のアミノ酸配列の相同性解析

ブタ抗体 D4 のヒト化を行うため、まず IMGT-V/Quest (<http://www.imgt.org/>) を用い、ブタ抗体 D4 のアミノ酸配列に類似したヒト抗体 germline を検索した。その結果、VL については IGKV1-27\*01 と IGKJ\*01 が、VH については IGHV3-23\*01、IGHJ3\*01 が選択された。これらアミノ酸配列を Figure 21 に示す。D4 配列上部の数字は、Kabat number であり、下線は CDR 領域を示す。ヒト抗体配列 (IGKV1-27\*01/IGKJ\*01、IGHV3-23\*01/IGHJ3\*01) は FR 領域のみ記載した。FR のアミノ酸を比較すると、D4 とヒト抗体のアミノ酸の一致は VH で 83%、VL で 84% となり、非常に高い相同性を示した。相違アミノ酸の数は VL で 13 個、VH で 11 個であった。Figure21 内の\*は、カノニカル構造に関与するアミノ酸であるが<sup>3</sup>、\*で示したアミノ酸についても、D4 とヒト抗体ではほとんどが一致しており、相違していたアミノ酸は VL の 2 番目の L と、VH の 94 番目の R のみであった。マウス抗体やニワトリ抗体では FR 領域のアミノ酸の一致が 70%~80% であり、FR 領域での相違アミノ酸の数も VL と VH それぞれで 20 個以上存在する<sup>6,9,10</sup>。この相違アミノ酸が抗体鎖の置換や CDR-grafting によって結合能が低下する原因と予想される。ブタ抗体からヒト化抗体へ変換する場合には、FR における相違アミノ酸が少ないため、抗体鎖の置換や CDR-grafting を行っても抗体活性の低下は起きにくく、ヒト化が容易である可能性が考えられた。このことを検討するため、ブタ抗体 D4 の VL ドメインをヒト抗体 VL ドメインに置換した抗体 (VH/VL 置換抗体) を作製し、評価を行うこととした。

Figure21 内には、ヒト化抗体 4D5 の配列を記載した。4D5 は、D4 に類似したヒト抗体 (IGKV1-27\*01/IGKJ\*01、IGHV3-23\*01/IGHJ3\*01) とほぼ同一の遺伝子ファミリーからなっていることから、作製する VH/VL 置換抗体の VL 遺伝子材料として適していると考えられた。そこで、ブタ抗体 D4 の VL をヒト化抗体 4D5 の VL で置換した D4/4D5 抗体を作製し、抗体鎖の置換によってブタ抗体の抗原認識がどのような影響を受けるかを検討した。また、ブタ抗体のヒト化を検証するに先立ち、まずブタ抗体 D4 とブタ抗体 H6 の VL 置換を行った D4/H6 抗体を作製し、ブタ抗体の主な抗原認識ドメインを確認した。

D4  
 E L V M T Q T S P A S L L A A S L G D T V S I T C R A S Q S I S S Y L A W Y Q Q Q A  
 I G K V 1-27\*01/ I G K J 2\*01  
 D I Q M T Q T S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V N T A V A W Y Q Q K P

D4  
 G K T P K L L I Y S A S S L Q S G V P S R F K G S G S G T D F T L T I S G L Q A  
 I G K V 1-27\*01/ I G K J 2\*01  
 G K V P K L L I Y G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P

D4  
 E D V A T Y Y C Q Q Y K T A P Y G F G A G T K L E I K  
 I G K V 1-27\*01/ I G K J 2\*01  
 E D V A T Y Y C F G Q G T K L E I K

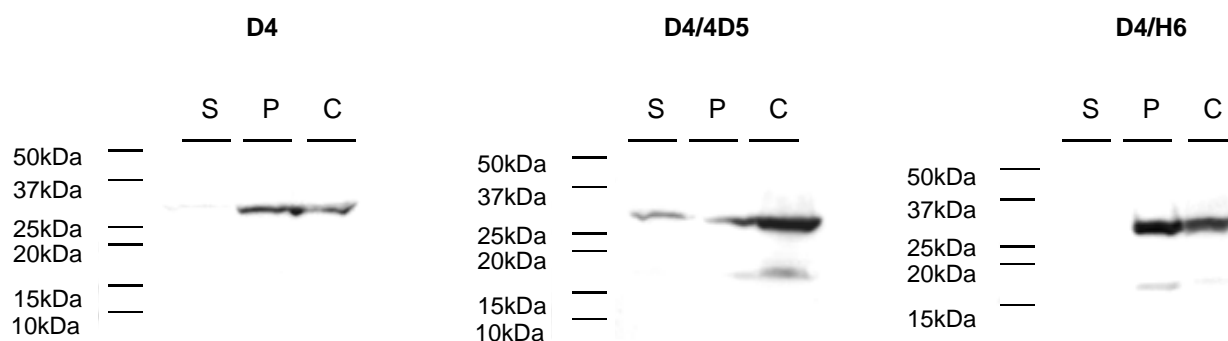
D4  
 E D F A T Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V E I K

D4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40		
	E	V	K	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	V	G	S	G	F	T	F	I	<u>S</u>	<u>Y</u>	<u>P</u>	<u>I</u>	<u>A</u>		W	V	R	Q	A	
IGHV3-23*01/ IGHJ3*01	E	V	Q	L	L	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S							W	V	R	Q	A	
4D5		E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	N	I	K	D	T	Y	I	H	W	V	R	Q	A	
																*																	*									
D4	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	<sup>52</sup> <sub>A</sub>	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	
	P	G	K	G	L	E	W	L	A	<u>V</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>V</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	R	F	T	I	S	R	D	N	S	Q	N	T	A	Y	L	
IGHV3-23*01/ IGHJ3*01	P	G	K	G	L	E	W	V	S																		R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	
4D5	P	G	K	G	L	E	W	V	A	R	I	Y	P	T	N	G	Y	T	R	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	
																		*																								
D4	81	82	<sup>82</sup> <sub>A</sub>	<sup>82</sup> <sub>B</sub>	<sup>82</sup> <sub>C</sub>	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>W</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>I</u>	-	<u>D</u>	<u>L</u>	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113		
	Q	M	N	S	L	R	T	E	D	T	A	R	Y	Y	C	A	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>W</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>I</u>	-	<u>D</u>	<u>L</u>	W	G	P	G	V	E	V	V	V	S	S			
IGHV3-23*01/ IGHJ3*01	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K												W	G	Q	G	T	M	V	T	V	S	S			
4D5	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	S	R	W	G	G	D	G	F	Y	A	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S			

ブタ抗体 (D4)、D4 に類似したヒト抗体 (IGKV1-27\*01/IGKJ\*01、IGHV3-23\*01/IGHJ3\*01)、ヒト化抗体 4D5 の VL ドメインおよび VH ドメインのアミノ酸配列を比較した。D4 配列上部の数字は、Kabat number であり、下線は CDR 領域、一は欠損を示す。\*は、カノニカル構造に關与する残基を示し、ブタ抗体とヒト抗体間の相違残基を太字で表記した。

#### 4-3-2 VH/VL 置換抗体の大腸菌発現と精製

D4/H6 抗体と D4/4D5 抗体の 2 種の VH/VL 置換抗体遺伝子を作製し、大腸菌 HB2151 株にてタンパク質の発現を行った。大腸菌 HB2151 株から調整した上清画分、ペリプラズム画分、細胞質画分に目的とする scFv タンパク質が発現していることをウェスタンブロッティングにて解析した結果を Figure 22 に示す。Figure 中、S は上清画分、P はペリプラズム画分、C は細胞質画分を示す。作製した抗体はペリプラズム画分、細胞質画分での発現が確認された。抗体のバンドは 27kDa 付近にあり、これはアミノ酸配列から予想される分子量と一致していることから、構築した VH/VL 置換抗体が大腸菌で発現していると考えられた。Figure22 の結果は、Figure17 で示したブタ抗体、ヒト化抗体 4D5 の大腸菌での発現傾向と類似しており、VL 置換によって大腸菌発現に関係する性質は変化していないことが示された。



**Figure 22** ウェスタンブロッティング分析

D4 抗体、D4/4D5 抗体(VH;ブタ抗体 D4、VL;ヒト化抗体 4D5 からなる scFv 抗体)、D4/H6 抗体(VH;ブタ抗体 D4、VL;ブタ抗体 H6 からなる scFv 抗体)を大腸菌 HB2151 で蛋白質発現した。上清画分(S)、ペリプラズム画分(P)、細胞質画分(C)を回収し、SDS-PAGE で分離を行った。SDS-PAGE を行ったタンパクを PVDF 膜に転写し、抗 myc-tag 抗体にて検出を行った。

#### 4-3-3 VH/VL 置換抗体の結合特性評価(ELISA、Biacore)

ELISA を用いてこれら VH/VL 置換抗体の結合特異性を検証した結果を Figure 23 に示す。抗原として、ヒト血清アルブミン(HSA)、牛血清アルブミン(BSA)、ブタ血清アルブミン(PSA)、卵白アルブミン(CEWA)を用いた。Gelatin は ELISA に用いたブロッキング剤である。ブタ抗体 D4 抗体と D4/H6 抗体、D4/4D5 抗体は全て、HSA に特異的に結合することが示された。

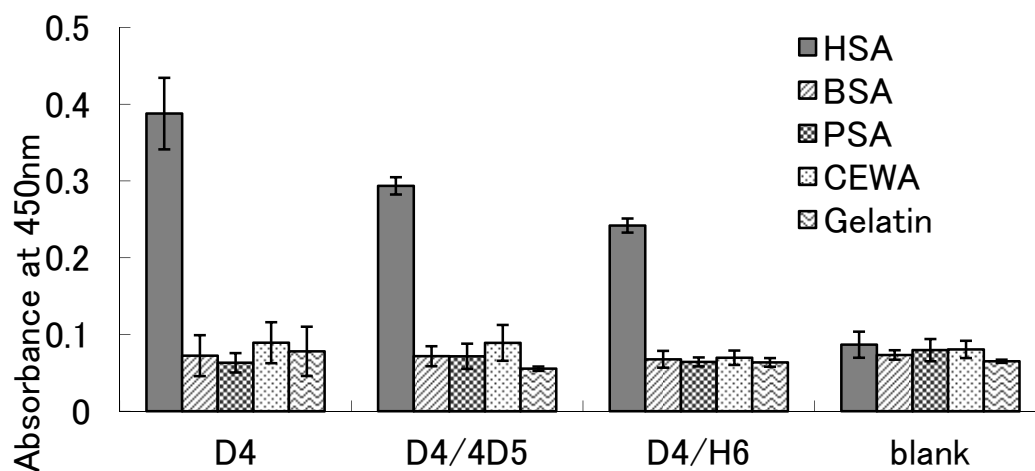
また、作製した VL 置換抗体の親和性解析を、Biacore3000 を用いて実施し、得られたセンサグラムを Figure24 に示す。Biacore response(RU)は CM5 チップ上の HSA 固定化レーンで得られた応答から、カップリングのみを行ったブランクレーンの応答を差し引いた数値を示した。また、測定で得られたセンサグラムから、反応速度定数の算出の障害となる緩衝液の切り替え等で発生するノイズ成分は除いている。Figure24 から、置換抗体全てで、抗原抗体反応と思われる結合と解離を示すセンサグラムが得られた。また、センサグラムから算出した反応速度定数( $k_a$ ,  $k_d$ )および解離平衡定数 ( $K_D$ ) を Table5 に示した。D4/H6 抗体の  $K_D$  は、オリジナルの D4 抗体よりも約 1/3 程度下がっており、D4/4D5 抗体は約 1/2 程度下がってはいたものの、オリジナルの D4 抗体の高い親和性を保持していることが確認された。また、Table5 の  $K_D$  は、第 3 章の Table4 で示した数値よりも一桁近く小さい数値を示した。この原因は、ここで使用した scFv が、第 3 章で用いた scFv よりも精製度が高いため、結合速度が向上したことに起因すると考えられる。

第 3 章で記載の通り、ブタ抗体 D4 遺伝子は IGHV1 と IGKV1 から構成され、ブタ抗体 H6 遺伝子は IGHV1 と IGKV2 から構成されている。また Figure15 の結果から、ブタ抗体 H6 は HSA 以外にも PSA とも結合しており、D4 抗体と H6 抗体は、HSA 上の異なる抗原認識部位を認識していると考えられる。Figure23 において、D4 抗体と D4/H6 抗体は、共に HSA 特異的な結合を示し、H6 抗体特有の PSA への結合能は消失していた。このことから、抗原認識において H6 抗体の VL よりも、D4 抗体の VH が主として結合に寄与しており、ブタ抗体の主な抗原認識ドメインは VH であると考えられた。

Figure23 において、ヒト抗体 VL との置換体である D4/4D5 抗体も、オリジナルの D4 抗体と同様の HSA 特異的な結合を示した。ブタ抗体とヒト抗体のアミノ酸配列が類似していることから、VL 鎖を置換してもブタ抗体 D4 の立体構造が維持されていると考えられる。この結果は、抗体の VL ドメインを置換するという簡単な作業のみで、ブタ抗体の半分を容易にヒト化できる可能性を示している。

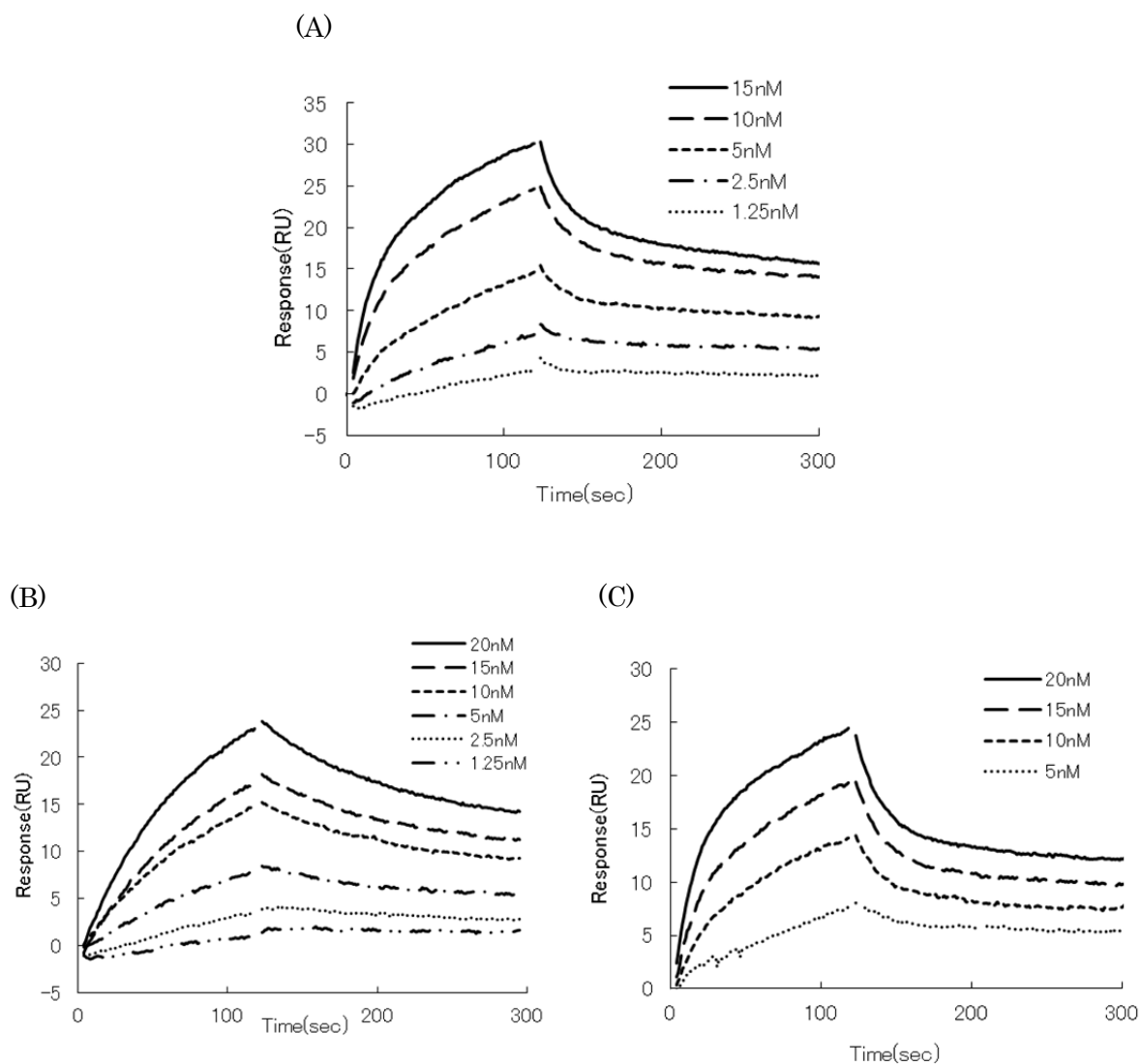
しかしながら、D4/H6 抗体の  $K_D$  は、オリジナルの D4 抗体よりも下がっており、D4/4D5 抗体の  $K_D$  も、オリジナルの D4 抗体よりも 1/2 程度下がっていた。次項では VH/VL 置換抗体のアミノ酸解析と構造予測を行い、原因について検討を行った。





**Figure 23 VL 置換 scFv 抗体の結合活性**

D4 抗体および、VL ドメインを置換して作製した VH/VL 置換抗体 (D4/4D5、D4/H6) の結合活性を ELISA にて測定した。固定化抗原はヒト血清アルブミン (HSA)、ウシ血清アルブミン (BSA)、ブタ血清アルブミン (PSA)、卵白アルブミン (CEWA) を用い、HRP 修飾抗 His 抗体を用いて検出を行った。Gelatin はブロッキング剤である。Blank は抗体を加えていないウェルを示す。エラーバーは同一サンプルを N=3 にて測定した標準偏差を示す。



**Figure 24 Biacore を用いた VL 置換 scFv 抗体の親和性解析**

D4 抗体および、VL ドメインを置換して作製した VH/VL 置換抗体 (D4/4D5、D4/H6) の結合親和性を Biacore 3000 にて測定した。得られた応答曲線は (A) D4 scFv, (B) D4/H6 scFv, (C) D4/4D5 scFv である。グラフ内のデータラベルは HSA 固定化 CM5 チップ上に添加した各 scFv の濃度を示す。

Clone name	$k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	$K_D$ (M)
D4	$1.1 \times 10^6$	$2.2 \times 10^{-3}$	$1.9 \times 10^{-9}$
D4/H6	$5.3 \times 10^5$	$2.9 \times 10^{-3}$	$5.5 \times 10^{-9}$
D4/4D5	$6.6 \times 10^5$	$1.9 \times 10^{-3}$	$2.9 \times 10^{-9}$

**Table 5 VL 置換 scFv 抗体の親和性解析**

scFv の速度定数を Biacore 3000 にて分析した。HSA を固定した CM5 センサーチップを用いて得られた応答曲線 (Figure24) から、Biacore evaluation software にて 1:1 binding model を用いて算出した。

#### 4-3-4 VH/VL 置換抗体のアミノ酸解析と構造予測

4-3-3において、ブタ抗体 D4 遺伝子と、ブタ抗体 H6 遺伝子の VL を置換した D4/H6 抗体が HSA 特異的な結合を示し、抗原認識において、H6 抗体の VL よりも D4 抗体の VH が主として結合に寄与していることを示した。このことからブタ抗体の主な抗原認識ドメインは VH であると考えられるが、一方で、VL も scFv 抗体を構成する重要なドメインである。実際に、VL ドメインを置換した D4/H6 抗体の  $K_D$  は、オリジナルの D4 抗体よりも下がっていた。 $K_D$  が低下する原因の一つは、VL を置換したことで、抗原結合に関与する CDR 領域の相互作用が減ったことにあると考えられる。しかし、D4/H6 抗体は D4/4D5 抗体よりも  $K_D$  の下がり幅が大きいことから、他の要因も存在すると考えられる。そこで、D4 抗体の VL ドメインと D4/H6 抗体の VL ドメインのアミノ酸配列比較、および構造モデリングを行い、親和性低下の原因について考察を行った。

D4 抗体と D4/H6 抗体の VL ドメインのアミノ酸配列を比較した結果を Figure 25(A) に示す。配列上部の数字は Kabat number、桃色は CDR 領域を示し、\*はカノニカル構造に関わる残基を示した。赤で示した残基は、VH/VL 間に多く占められる残基であり、緑色で示した部分は、Fv 界面で高く保存されており強く相互作用を持つ残基である<sup>13</sup>。CDR 領域以外のカノニカル構造に関与すると考えられる残基は、D4 抗体と D4/H6 抗体でほぼ一致しており、2 番目の Leu(D4 抗体)→Ile(D4/H6 抗体)のみであった。VH/VL 間に多く占められる残基、Fv 界面で高く保存されており強く相互作用を持つ残基では、39 番目の Gln(D4 抗体)→Lys(D4/H6 抗体)、43 番目の Thr(D4 抗体)→Ser(D4/H6 抗体)、45 番目の Lys(D4 抗体)→Gln(D4/H6 抗体)において違いがみられた。

Figure25(B)には、D4 抗体と D4/H6 抗体の構造モデルを重ね合わせた図を示した。MOE 2012.10、Antibody Modeler を用いたモデリングの結果、オリジナルの D4 抗体と D4/H6 抗体の両方で、抗体可変領域特有の  $\beta$  シート構造と VH と VL の 2 つのドメインが相互作用したダイマー構造が得られた。オリジナルとは異なる VL 鎖に置換した D4/H6 抗体においても、構造が破綻することなく、水中で立体構造をとっていると考えられる。また、D4 抗体と D4/H6 抗体の構造骨格はほとんど一致していた。

Figure25(C)には、D4 抗体と D4/H6 抗体のモデル構造の表面電荷を示した。正電荷は青、負電荷は赤で示した。Figure25(C)の右図には、D4 抗体および D4/H6 抗体の 39 番目、43 番目、45 番目のアミノ酸側鎖を黄色で示した。抗体全体の表面電荷には大きな違いは見られないものの、中心部 (VH と VL の界面) における電荷分布は D4/H6 抗体において、正電荷の分布 (図内、青) がわずかに弱くなっていた。電荷の変化がある箇所は、39 番目、43 番目、45 番目のアミノ酸近傍であった。

VL 置換によって D4/H6 抗体の VH/VL 間の相互作用が多少変化してはいるものの、D4 抗体と D4/H6 抗体の構造骨格がほとんど一致していることや、大腸菌での発現傾向に変化が見られず (4-3-2 に記載) 蛋白質としての構造安定性が保持されていると期待されるこ

とから、VL 置換（IGKV1 と IGKV2 の置換）に伴う抗体構造の変化が D4/H6 抗体の  $K_D$  低下の原因ではないと考えられる。他の構造上の違いは、Figure25 (B) から、D4/H6 抗体の VL ドメインの CDR 1 ループが D4 抗体の VL ドメインの CDR1 ループと比較して長いことである。VL を置換したことで、抗原結合に関与する CDR 領域の相互作用が減ったことに加え、VL ドメインの CDR ループ 1 が VH ドメインと抗原間の立体障害となり、結合力低下を引き起こしたのかもしれない。

#### VL domain

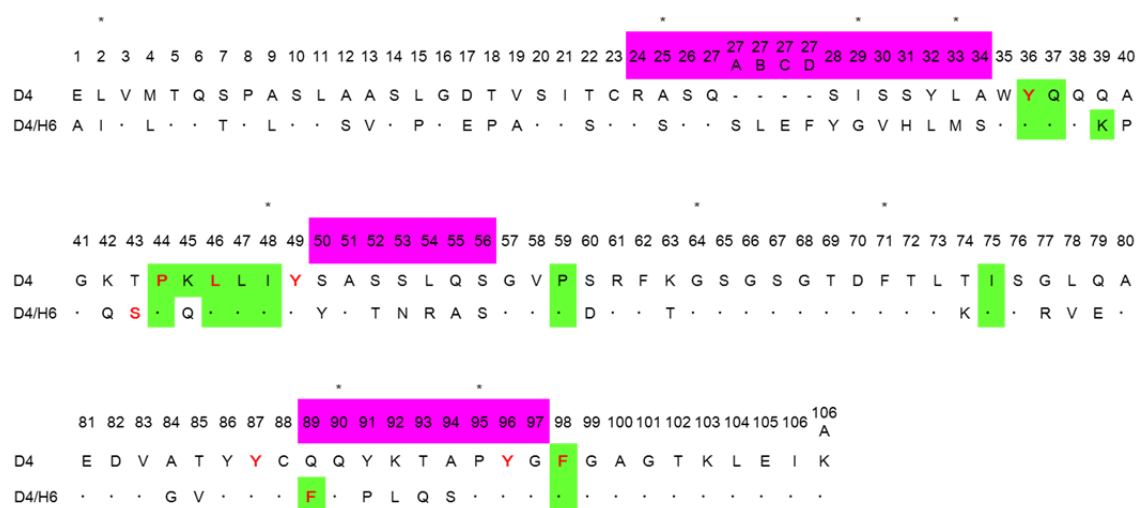
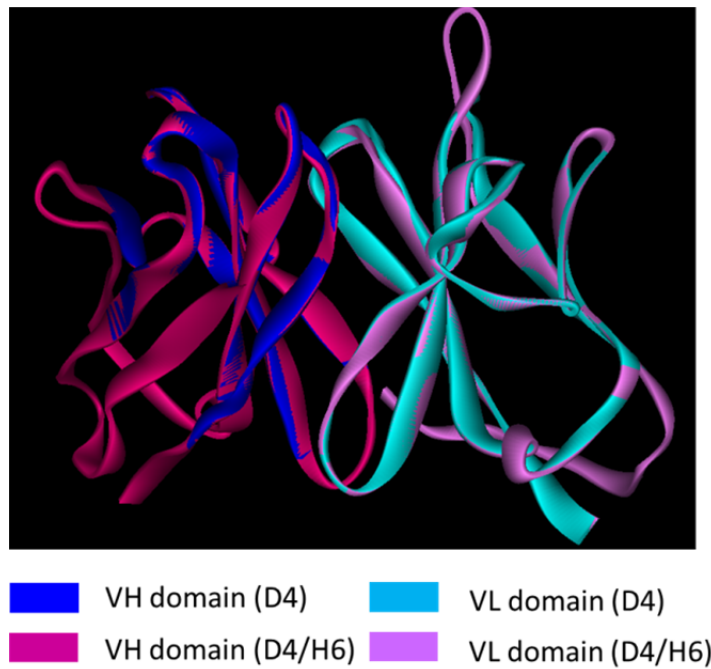


Figure 25 (A) VL ドメインの配列比較

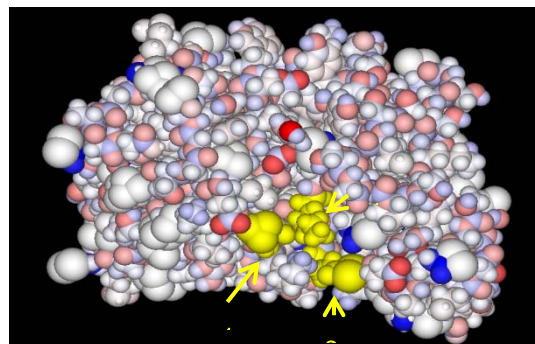
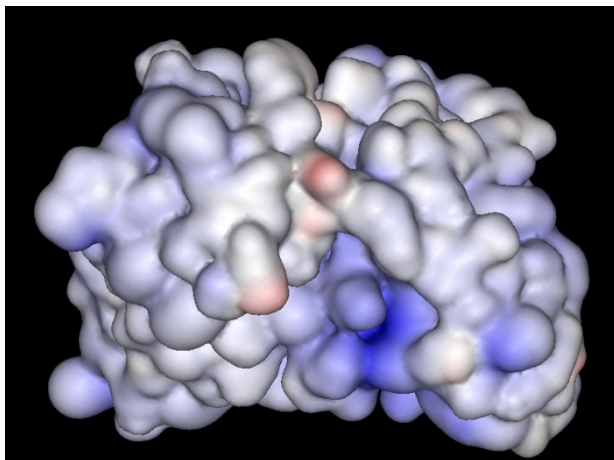
D4/H6 抗体と D4 抗体の VL ドメインのアミノ酸配列を示した。配列上部の数字は Kabat number、桃色は CDR 領域を示し、\*はカノニカル構造に関わる残基を示した。赤で示した残基は、VH/VL 間に多く占められる残基であり、緑色で示した部分は、Fv 界面で高く保存されており強く相互作用を持つ残基である<sup>13</sup>。



**Figure 25 (B) D4 scFv と D4/H6 scFv の構造モデル**

D4 抗体、D4/H6 抗体の構造モデルを重ね合わせて示した。構造モデルは MOE 2012.10 (株式会社菱化システム)Antibody Modeler を使い、テンプレートには PDB No. 3DVN を用いて作製した。上部が CDR を形成するループ構造である。

### D4 抗体



### D4/H6 抗体

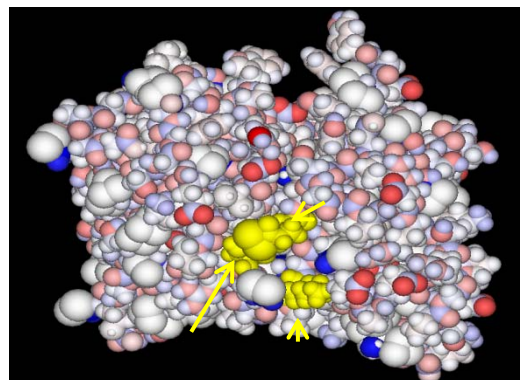
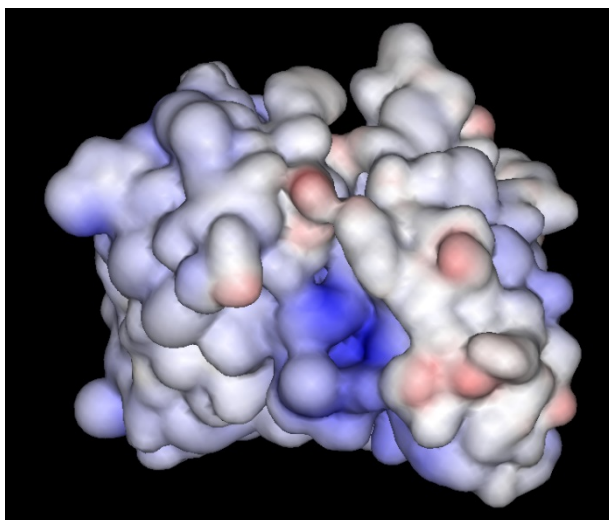


Figure 25 (C) D4 scFv と D4/H6 scFv の構造モデル

左図は D4 抗体と D4/H6 抗体のモデル構造の表面電荷を示した。正電荷は青、負電荷は赤で示した。右図には、D4 抗体および D4/H6 抗体の 39 番目、43 番目、45 番目のアミノ酸側鎖を矢印と黄色で示した。

次に、同様に D4 抗体と D4/4D5 抗体について検討した。D4 抗体と D4/4D5 抗体のアミノ酸配列を比較した結果を Figure 26(A) に示す。配列上部の数字は Kabat number、桃色は CDR 領域を示し、\* はカノニカル構造に関わる残基を示した。赤で示した残基は、VH/VL 間に多く占められる残基であり、緑色で示した部分は、Fv 界面で高く保存されており強く相互作用を持つ残基である<sup>13</sup>。CDR 領域を除く、カノニカル構造に関与すると考えられる残基は、D4 抗体と D4/4D5 抗体でほぼ一致しており、2 番目の Leu(D4 抗体)→Ile(D4/H6 抗体)のみであった。VH/VL 間に多く占められる残基、Fv 界面で高く保存されており強く相互作用を持つ残基は、全て一致していた。

Figure26(B) には、D4 抗体と D4/4D5 抗体の構造モデルを重ね合わせた図を示した。モデリングの結果、抗体可変領域特有の  $\beta$  シート構造と VH と VL の 2 つのドメインが相互作用したダイマー構造が得られた。オリジナルとは異なる VL 鎖に置換した D4/4D5 抗体においても、構造が破綻することなく、水中で立体構造をとっていると考えられた。また、D4 抗体と D4/4D5 抗体の構造骨格はほぼ一致していた。D4 抗体の VL ドメインをヒト化抗体 4D5 の VL ドメインと交換しても、VH と VL 界面における相互作用にほとんど変化はなく、D4 本来の構造を維持していると考えられる。Figure26(C) には、D4 抗体と D4/4D5 抗体のモデル構造の表面電荷を示した。D4 抗体と D4/4D5 抗体の表面電荷も似通っており、大きな違いは見られなかった。

D4/4D5 抗体が異種動物種由来の VH と VL から構成されているにも関わらず、オリジナルの D4 抗体と同じ構造を保ち、比較的高い結合力を維持しているという結果は、ブタ抗体とヒト抗体間で抗体鎖の置換や CDR-grafting を行っても抗体活性の低下は起きにくいという予想を裏付ける結果であった。 $K_D$  は、オリジナル抗体 D4 よりも 1/2 程度に下がっていたが、この  $K_D$  低下は D4/4D5 の VL ドメインの CDR 領域が HSA との結合に関与しない配列であり、抗原結合に関与する CDR 領域の相互作用が減ったことが大きな理由であると考えられる。VL の CDR を D4 由来の配列に置換することで、低下した結合力は D4 本来の結合力に回復すると考えられるが、ブタ抗体とヒト抗体間では、カノニカル構造に関与する残基や VH/VL 間の残基が一致しているため、CDR 置換に伴う抗体構造の変化は少ないと予想される。また、ブタ抗体 VH ドメインについても、ブタ抗体とヒト抗体間ではフレームワーク (FR) 領域の相同性が高く、さらにカノニカル構造に関与すると考えられる残基がほぼ一致している (Figure21)。VH ドメインにおいても、CDR や FR の置換に伴う抗体構造の変化を小さく抑え、結合力を高く保ったまま、ヒト型アミノ酸配列への変更が行えると期待される。



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40		
D4	E	L	V	M	T	Q	S	P	A	S	L	A	A	S	L	G	D	T	V	S	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	S	S	Y	L	A	W	Y	Q	Q	Q	A		
D4/4D5	D	I	Q	.	.	.	.	.	S	.	.	S	.	.	V	.	.	R	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	V	N	T	A	V	.	.	.	.	.	K	P

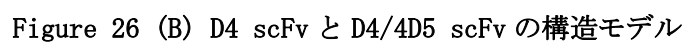
  

	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
D4	G	K	T	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	S	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	K	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	G	L	Q	A
D4/4D5	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	F	.	Y	.	.	.	.	.	S	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	P		

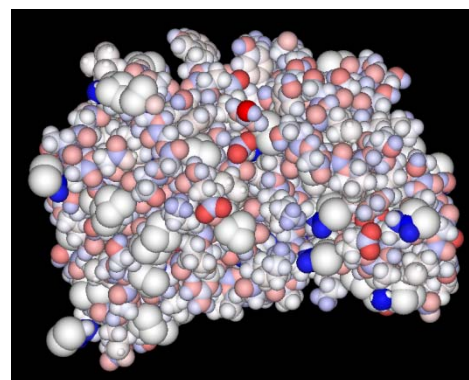
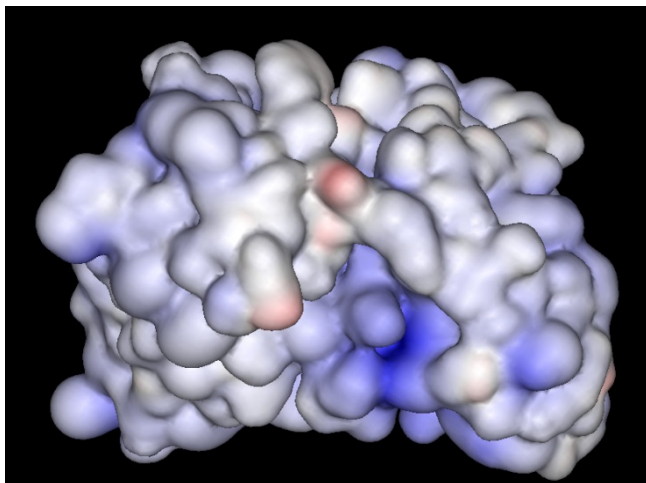
	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	106A
D4	E	D	V	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	T	A	P	Y	G	F	G	A	G	T	K	L	E	I	K
D4/4D5	.	.	F	.	.	.	.	.	.	.	H	Y	.	T	.	P	T	.	.	Q	.	.	.	V	.	.	.

D4/4D5 抗体と D4 抗体の VL ドメインのアミノ酸配列を示した。配列上部の数字は Kabat number、桃色は CDR 領域を示し、\*はカノニカル構造に関わる残基を示した。赤で示した残基は、VH/VL 間に多く占められる残基であり、緑色で示した部分は、Fv 界面で高く保存されており強く相互作用を持つ残基である<sup>13</sup>。



70

D4 抗体



D4/4D5 抗体

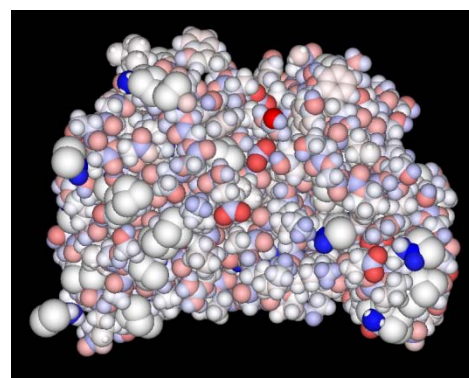
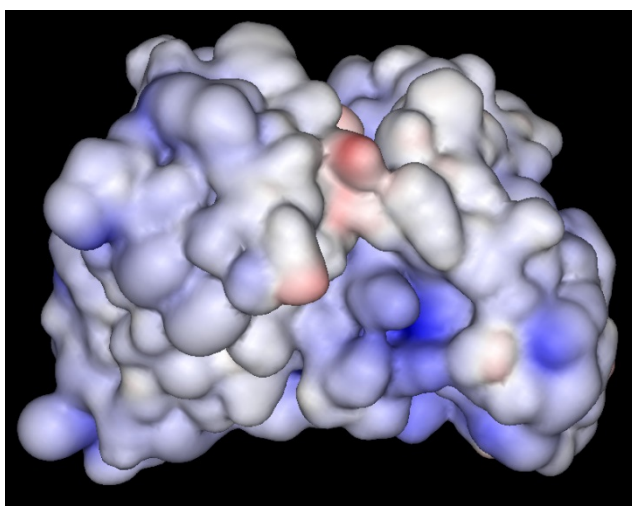


Figure 26 (C) D4 scFv と D4/4D5 scFv の構造モデル

左図は D4 抗体と D4/4D5 抗体のモデル構造の表面電荷を示した。正電荷は青、負電荷は赤で示した。

右図には、D4 抗体および D4/4D5 抗体のアミノ酸側鎖を示した。

#### 4-4 小括

本章では、第3章で単離したブタ抗体 D4 を用い、D4 抗体の抗原との結合ドメインの検証を行うと共に、ブタ抗体からヒト化抗体への変換プロセスについて検討を行った。

まず、ブタ抗体 D4 とブタ抗体 H6 の VL 置換を行った D4/H6 抗体を作製し、ELISA を用いてこれら VH/VL 置換抗体の結合特異性を検証した。結果、D4/H6 抗体はオリジナル D4 と同様に HSA 特異的な結合を示し、H6 抗体特有の PSA への結合能は消失していた。このことから、抗原認識において H6 抗体の VL よりも、D4 抗体の VH が主として結合に寄与しており、ブタ抗体の主な抗原認識ドメインは VH であると考えられた。また、D4/H6 抗体の親和性解析の結果、D4/H6 抗体の  $K_D$  は、オリジナルの D4 抗体よりも 1/3 程度に下がっていた。構造モデリングから、この親和性の低下は D4/H6 抗体の VL ドメインの CDR 1 ループが VH ドメインと抗原間の立体障害となり、結合力低下を引き起こしたと考えられた。

次にブタ抗体からヒト化抗体への変換プロセスについて検討を行った。ブタ抗体 D4 に最も似たヒト抗体 (IGKV1-27\*01/IGKJ\*01、IGHV3-23\*01/IGHJ3\*01) のアミノ酸配列は VH で 83%、VL で 84% の非常に高い相同性を示していた。特に抗体のカノニカル構造に關与するアミノ酸や scFv 構造 (VH と VL の界面構造) に關与するアミノ酸の相同性が高い。そのため、ブタ抗体をヒト化抗体へ変換する場合に、抗体鎖の置換や CDR-grafting を行っても抗体活性の低下は起きにくく、ヒト化が容易である可能性が考えられた。そこで、ブタ抗体 D4 の VL ドメインをヒト化抗体 4D5 の VL で置換した D4/4D5 抗体を作製し、抗体鎖の置換によってブタ抗体の抗原認識がどのような影響を受けるかを検討した。結果、ヒト抗体 VL との置換体である D4/4D5 抗体も、オリジナルの D4 抗体と同様の HSA 特異的な結合を示した。ブタ抗体とヒト抗体のアミノ酸配列が類似している事から、VL 鎖を置換してもブタ抗体 D4 のカノニカル構造が維持されると考えられる。D4/4D5 抗体の  $K_D$  は、オリジナルの D4 抗体よりも 1/2 程度下がっていたが、ブタ抗体とヒト抗体間ではカノニカル構造に關与する残基や VH/VL 間の残基が一致しているため、少ない立体構造変化で VL の CDR を D4 由来の CDR 配列に変更することができ、D4 本来の結合力を回復できると期待される。また、ブタ抗体 VH ドメインについても、ブタ抗体とヒト抗体間ではフレームワーク (FR) 領域の相同性が高く、さらにカノニカル構造に關与すると考えられる残基がほぼ一致していた (Figure21)。そのため、CDR や FR の置換に伴う抗体構造の変化を小さく抑え、結合力を高く保ったまま、ヒト型アミノ酸配列へ変更できる可能性が示唆される。

以上の結果は、ブタ抗体のヒト化方法として、ヒト抗体 VL ドメインの置換という簡単な作業が有効であることを示した。ブタ抗体をさらにヒト化抗体へ変換する場合には、VL ドメインの CDR 置換、ブタ抗体 VH ドメインの FR 置換などの手法が必要であるが、ブタ抗体の場合にはこれらの抗体鎖の置換や CDR-grafting を行っても結合力の低下は起きにくい可能性が高いと考えられる。

#### 4－5 引用文献

1. Pavlinkova G, Colcher D, Booth BJ, Goel A, Wittel U a, Batra SK. Effects of humanization and gene shuffling on immunogenicity and antigen binding of anti-TAG-72 single-chain Fvs. *Int J Cancer*. 2001;94(5):717-26.
2. Chothia C, Lesk AM. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol*. 1987;196:901-917.
3. Cyrus Chothia, Arthur M. Lesk, Anna Tramontano, et al. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature*. 1989;342:877-883.
4. Carter P, Presta L, Gorman CM, et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(10):4285-9.
5. Queen C, Schneider WP, Selick HE, et al. A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(24):10029-33.
6. Wu H, Nie Y, Huse WD, Watkins JD. Humanization of a murine monoclonal antibody by simultaneous optimization of framework and CDR residues. *J Mol Biol*. 1999;294(1):151-62.
7. Butler JE, Sun J, Kacskovics I, Brown WR, Navarro P. The VH and CH immunoglobulin genes of swine: implications for repertoire development. *Vet Immunol Immunopathol*. 1996;54(1-4):7-17.
8. Parvari R, Avivi A, Lentner F, et al. Chicken immunoglobulin gamma-heavy chains: limited VH gene repertoire, combinatorial diversification by D gene segments and evolution of the heavy chain locus. *EMBO J*. 1988;7:739-744.
9. Nishibori N, Horiuchi H, Furusawa S, Matsuda H. Humanization of chicken monoclonal antibody using phage-display system. *Mol Immunol*. 2006;43(6):634-42.
10. Tsurushita N, Park M, Pakabunto K, et al. Humanization of a chicken anti-IL-12 monoclonal antibody. *J Immunol Methods*. 2004;295(1-2):9-19.
11. Borrás L, Gunde T, Tietz J, et al. Generic approach for the generation of stable humanized single-chain Fv fragments from rabbit monoclonal antibodies. *J Biol Chem*. 2010;285:9054-9066.
12. 三本木 至宏. 大腸菌ペリプラズム抽出液の回収. 蛋白質科学会アーカイブ. 2008.
13. Wang N, Smith WF, Miller BR, et al. Conserved amino acid networks involved in antibody variable domain interactions. *Proteins Struct Funct Bioinforma*. 2009;76:99-114.

## 第5章 総括

本研究は、産業上特に医薬品応用を目指した抗体開発において、有用な抗体を作製するための免疫動物として、ブタの利用可能性を検討することを目標としたものである。抗体開発手法として広く利用されているファージディスプレイ法を用いた単鎖ブタ抗体ライブラリの構築とライブラリからの抗体の単離、さらに単離されたブタ単鎖抗体の特性解析を試みた結果について記載した。

第1章では、抗体医薬品の特徴と機能について記載した。抗体医薬品としては、主として使用されているマウス抗体と比較して、他動物由来の抗体、具体的にはブタ由来の抗体を使用するメリットについて考察を行った。マウスはハイブリドーマ法が確立していることからモノクローナル抗体を作製しやすく、そのため抗体医薬品の材料として使用しやすいが、医薬品として体内で作用させる抗体の性質上、遺伝子工学的にヒト化することが必要となる。抗体医薬品開発が盛んに行われている一方で、多大な予算と時間をかけながらも認可まで到達できる抗体医薬品は少ないように思われる。開発が難しい要因の一つは、マウス由来抗体の機能を維持しながら、抗体をヒト型に近づけるヒト化の困難さと考えられる。仮に標的との親和性が良いマウス抗体が取得できたとしても、ヒト型にするために置換すべきアミノ酸が多ければ、抗体と標的の特異的結合が失われる可能性も高くなり、結果として使用できない抗体となってしまう恐れがある。そこで、マウス以外の動物由来の抗体医薬はほとんどないが、マウス抗体と同様にヒト化を行える手法が確立できれば、マウス抗体では失敗に終わったヒト化抗体が成功する可能性も生まれ、今後の抗体医薬の可能性をさらに広げることができるそこで、マウス以外の動物種としてブタを用いる利点について述べた。

第2章では、ブタ抗体遺伝子解析を行った結果について記載した。ブタ体内で発現している抗体遺伝子は重鎖、軽鎖ともに限られた遺伝子ファミリーのみで構成されている点、またブタ抗体の重鎖配列はヒト抗体の重鎖配列(VH3)と相同性が高い点を示した。限られた遺伝子ファミリーで構成されたブタから単離される抗体が常にヒト抗体(VH3)と相同性が高いことを示した。ブタ抗体を用いることで従来よりも抗体のヒト化を容易にする可能性について記載した。

第3章ではファージディスプレイ法を用いたヒト血清アルブミン特異的ブタ単鎖抗体の単離とその特異性評価について記載した。ヒト血清アルブミン(HSA)に対する免疫ブタ単鎖抗体(single chain Fv:scFv)ライブラリを作製し、バイオパンニングにより抗原特異的 scFv の単離を試み、9 クローンの中 4 クロンの選択し、SPR(Surface Plasmon Resonance Analysis)解析を行った結果、抗 HSA ブタ scFv の  $K_d$  値は約  $10^{-8}$  M であり、強い結合親和性を有する抗体を取得できることを実証した。

第4章では、HSA 特異的ブタ抗体の抗原認識特性評価について記載した。ブタ抗体抗原認識には VH が主として寄与していることを示し、さらに、ブタ VL とヒト VL(anti-Her2, 4D5

抗体)を交換した D4/4D5 抗体においても抗原結合能は失われず、結合親和性はほぼ維持されることを示した。これにより、ヒト抗体 VL ドメインの移植という簡単な作業でブタ抗体をヒト化できる可能性を示した。ブタ抗体のさらなるヒト化を目指す場合には、VL ドメインの CDR 置換、ブタ抗体 VH ドメインの FR 置換などの手法も考えられるが、ブタ抗体の場合にはこれらの抗体鎖の置換や CDR-grafting を行っても結合力の低下は起きにくい可能性を論じた。

本研究では、結合親和性および結合特異性に優れたブタ抗体を得る手法を開発し、さらにブタ抗体からヒト化抗体への変換が容易であることを示した。これらの結果は、医薬品応用を目指した抗体開発において、ブタが有用な免疫動物であることを示唆するものである。

## 文献リスト

### 主論文

Muraoka J, Ozawa T, Enomoto Y, et al. 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.

### 参考論文

若井(村岡) 純子, 伊東祐二, 非抗体スカフォールドプロテインバインダー, 新機能抗体開発ハンドブック～次世代抗体創製から産業への展開まで～(株式会社エヌ・ティー・エス) pp. 184-189 (2012)

## 学会報告

村岡(若井) 純子, 小澤 拓矢, 野元 花愛, 有馬 一成, 伊東 祐二, フェージディスプレイによるブタ抗体ライブラリの構築と評価 Selection and characterization of antigen-specific porcine antibodies by phage display library, 第85回 日本生化学会大会, 3P-813 (2012)

村岡(若井) 純子, 小澤 拓矢, 野元 花愛, 有馬 一成, 伊東 祐二, ヒト化抗体の取得を目指したブタ抗体フェージライブラリの開発 Development of porcine antibody phage library to design the humanized antibodies, 日本薬学会 第133年会, 29pA-135 (2013)

## 謝辞

本研究を進めるにあたり多くの方々に御世話になりました。まずは、ここに深く感謝の意を表します。

本研究は、鹿児島大学大学院理工学研究科システム科学専攻（伊東研究室）にて行われた研究であり、本論文は私が本研究室に在籍した平成22年10月から平成25年9月の研究成果をまとめたものです。研究活動全般にわたり格別なる御指導と御高配を賜りました鹿児島大学大学院理工学研究科教授 伊東祐二先生には、甚大なる謝意を表します。

私が博士論文をまとめることができたのは、先生のお人柄の良さのみならず、研究者としての考え方を私に示してくださり、壁に当たった時、研究方針が定まらぬ時に辛抱強く議論にお付き合い頂いたからに他なりません。伊東研究室での経験を糧に、今後も研究者として、また企業人として、人の役に立つ仕事をしていきたいと思います。

貴重な御教示を賜りました鹿児島大学大学院理工学研究科教授 内海俊樹先生、ならびに鹿児島大学大学院理工学研究科准教授 橋本雅仁先生、有馬一成先生に心より感謝申し上げます。ご多忙な先生方からご指導やご助言を賜ることができたおかげで、研究に対する姿勢、実験の精密さ、および成果に対する洞察が改善され、本論文の完成度が高まりました。本当にありがとうございました。

研究活動においては、パナソニック株式会社 R&D本部 デバイスソリューションセンター ライフマテリアルグループ グループマネージャー 吉岡俊彦様、恩師 中山浩様には、大切な業務があるにもかかわらずこのような機会を与えていただき、さらに多大なる御支援を頂戴しました。大変感謝しております。

学生生活においては、伊東研究室の多数の同級生たち、後輩たちとの出会いに恵まれました。笑いの絶えない温かな環境で共に過ごすことができ、皆様には感謝しております。いつか将来、思い出話ができる日を楽しみにしております。ありがとうございました。



最後になりましたが、博士課程に進学する機会を与えてくださり、ありとあらゆる場面で私を温かく見守り続けてくれた両親および家族に深く感謝いたします。

ここに重ねて厚く謝意を表し、謝辞といたします。

平成25 年6月

村岡 純子