

博士論文

ケモカイン、MCP-1 特異的なヒト抗体エンジニアリング
(Antibody Engineering for Human Antibody specific to MCP-1)

鹿児島大学大学院 理工学研究科
博士後期課程 物質生産工学専攻

2008 年 3 月

吉永 圭介

目次

要旨	p 1.
----	------

第1章 MCP-1

1-1 ケモカイン	p 4.
1-2 MCP-1	p 5.
1-3 MCP-1 と疾患	p 7.

第2章 scFv ファージディスプレイライブラリー

2-1 抗体医薬	p 8.
2-2 ファージディスプレイテクノロジー	p 10.
2-3 scFv ファージディスプレイライブラリーの作製	p 12.

第3章 MCP-1 へ結合するscFv の単離および機能解析

3-1 目的	p 15.
3-2 材料と方法	p 15.
3-2-1 ヒトMCP-1 に結合する抗体ファージの単離	p 15.

3-2-2 scFv 抗体の発現解析	p 18.
3-2-3可溶性scFv の精製とゲルろ過クロマトグラフィー解析	p 18.
3-2-4 ELISA (phage)	p 19.
3-2-5 ELISA (scFv)	p 19.
3-2-6 scFv 抗体の遺伝子配列解析	p 20.
3-2-7 表面プラズモン解析	p 20.
3-2-8 MCP-1 による遊走の阻害実験	p 21.
3-2-9 MC32 scFv の立体構造モデリング	p 21.
3-3 実験結果	p 22.
3-3-1 ヒトMCP-1 に結合する抗体ファージの単離	p 22.
3-3-2 scFv 抗体の発現解析	p 22.
3-3-3可溶性scFv の精製とゲルろ過クロマトグラフィー解析	p 24.
3-3-4 ELISA (scFv)	p 24.
3-3-5 scFv 抗体の遺伝子配列解析	p 24.
3-3-6 表面プラズモン解析	p 28.
3-3-7 MCP-1 による遊走の阻害実験	p 28.

第4章 MC32 IgG form の作製および解析

4-1 目的	p 33.
4-2 材料と方法	p 33.

4-2-1 MC8 およびMC32 のIgG form の調製	p 33.
4-3 実験結果	p 36.
4-3-1 MC8 およびMC32 のIgG form の調製	p 36.

第5章 MC32 L chain shuffling library の作製およびL鎖変換体の単離、解析

5-1 目的	p 38.
5-2 材料と方法	p 38.
5-2-1 MC32 L chain shuffling library の作製	p 38.
5-2-2 MC32 VL 変異体の単離（パンニング）	p 39.
5-2-3 ELISA (phage)	p 41.
5-2-4 表面プラズモン解析	p 42.
5-2-5 MC32 VL 変異体の遺伝子配列解析	p 42.
5-2-6 MC32 VL 変異体の遊走阻害活性	p 43.
5-3 実験結果	p 43.
5-3-1 MC32 L chain shuffling library の作製	p 43.
5-3-2 MC32 VL 変異体ファージの単離（パンニング）	p 44.
5-3-3 表面プラズモン解析	p 44.

5-3-4 MC32 VL 変異体の遺伝子配列解析 p 47.

5-3-5 MC32 VL 変異体の遊走阻害活性 p 47.

第6章 総括および展望 p 49.

引用文献 p 51.

謝辞 p 55.

要旨

本論文は、MCP-1 を標的とした抗体分子の開発およびその機能解析、抗体エンジニアリングを行い、それについてまとめたものである。本論文は以下の6章から成り立っている。

第1章では、MCP-1 と炎症性免疫疾患との関連性を示し、MCP-1 をターゲットとした治療法開発の戦略について述べた。MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1) は、単球などの免疫系の細胞の遊走を誘導するケモカインである。近年、その過剰発現が様々な炎症性免疫疾患に関与していることが報告され、これらの疾患を治療するための非常に有効な標的分子となる。

第2章では、ヒトscFv 抗体ファージライブラリーについて述べた。1980 年にKoller とMilstein によって動物免疫を基盤としたハイブリドーマ技術を用いたモノクローナル抗体作製法が確立されてから4半世紀を経て、抗体医薬は、癌、アレルギー、感染症などの疾患領域における新たな医薬品として今日注目を集めている。その背景には、実用化における最大の障害、マウス由来モノクローナル抗体のヒトにおける免疫原性の解決に向けた近年の目覚ましい技術革新がある。その技術として、ヒト抗体遺伝子群をマウスに移入したトランスクロモマウスおよびヒト抗体ファージディスプレイライブラリーが報告されてい

る。本研究では、20名の健常人由来の末梢血単核球をもとに構築されたヒト scFv 抗体ファージライブラリーを用いている。

第3章では、ヒトscFv 抗体ファージライブラリーから、MCP-1 に依存した炎症疾患の治療に応用できるヒト抗体の単離を試みた。そのため、ヒトMCP-1 に特異的に結合するヒト抗体のスクリーニングを行った。ヒトMCP-1 タンパクをターゲットとして抗体ファージライブラリーから選別を行い、7種類のヒト MCP-1 特異的ヒト抗体分子を単離した。さらに、これらの抗体の性状について解析した。7つの抗体についてそのアミノ酸配列を解読したところ、VH1 領域のgermline が7つのクローンのすべてで一致していた。このことから、これらの抗体のMCP-1 への結合にはおもにこの領域が関与していると考えられた。

さらに、これらの抗体がMCP-1 による細胞の遊走を阻害するかどうかを検討した。MC8 とMC32 の2つの抗体において、細胞株THP-1 の遊走を濃度依存的に阻害することがわかった。

第4章では、MC8 およびMC32 抗体がMCP-1 による細胞遊走を阻害できることがわかったので、両者のIgG 型抗体を作製しその活性を調べた。本研究が作製したMC8 およびMC32 IgG 抗体は完全なヒト抗体分子であるので、早期に臨床への応用が可能であり、MCP-1 依存性の炎症疾患の治療薬として利用されることが期待される。

第5章では、MC32 抗体の親和性向上を試み、その戦略について記載した。この抗体のMCP-1 への結合にはおもにVH が寄与していると考えられたため、

VL をさまざまなレパートリーに置き換えたMC32 VL shuffling ライブラリーを構築した。

MC32 VL shuffling ライブラリーから、MC32 変異体を単離しその活性を比較した。いくつかの変異体において親和性の向上がみられた。また、親和性の向上にともなって細胞の遊走阻害活性も強くなっていた。

第6章は、以上の結果を総括し、MCP-1 依存型炎症疾患の制御法開発における展望および残された課題について述べた。

第1章 MCP-1

1-1 ケモカイン

ケモカインは白血球やリンパ球の遊走を誘導し、急性あるいは慢性の炎症性疾患における病態形成プロセスに重要な役割を果たしている。ケモカインはまずCXC ケモカインのプロトタイプであるIL-8 が1987 年に発見され、続いてCC ケモカインのプロトタイプであるMCP-1 が発見された。そして、これらの分子が分子ファミリーを形成することが明らかになり、構造上の特徴がよい指標とされて次々と新たなケモカインが発見された。

ケモカイン分子は8~14 kDa 程度の分泌タンパク質で、一般に塩基性、ヘパリン結合性である。ケモカインには保存された4つのシステイン残基が存在し、1番目と3番目および2番目と4番目の間でジスルフィド結合を形成する。N末端側にある2アミノ酸の形成するモチーフにより、CXC とCC の2つのメジャーなサブファミリーに分類される。CXC 型では1番目と2番目の2つのシステイン間に他のアミノ酸1個が介在し、CC 型では2つのシステインは連続している。さらに1番目のシステインの欠損したC ケモカインサブファミリーや、2つのシステイン間に3つのアミノ酸の介在するCX3C ケモカインサブファミリーの分子種も存在する。

ケモカインは互いによく似た立体構造を示す。短いN 末端領域は自由な構造をしており、シグナル伝達に重要な部分である。2 個のジスルフィド結合によって形成されるコア部分は3 つのアンチパラレル β シートより成り、レセプターへの高親和性結合に重要である。C 末端領域は α ヘリックスを形成し、細胞膜や細胞外基質に存在するヘパラン硫酸との結合に関与し、この性質はケモカインの自由拡散を防ぎ、濃度勾配を形成するために必要であると考えられる。

1-2 MCP-1

MCP-1 はmonocyte Chemotactic protein 1 の略で、ケモカインの統一名称ではCCL2 (CC-chemokine Ligand 2) と呼ばれる。

MCP-1は1989 年に、単球走化性因子としてグリオーマ細胞株および単球性白血病細胞株からクローニングされた。その後、IL-8 (CXCL8) と並ぶケモカインのプロトタイプとして、慢性炎症を中心に抗体を用いた研究や遺伝子欠損マウスを用いた解析が進んでいる。炎症性ケモカインであるMCP-1 はそのレセプターであるCCR2 に結合し、シグナルを送ることにより細胞の炎症部位への遊走を誘導する。

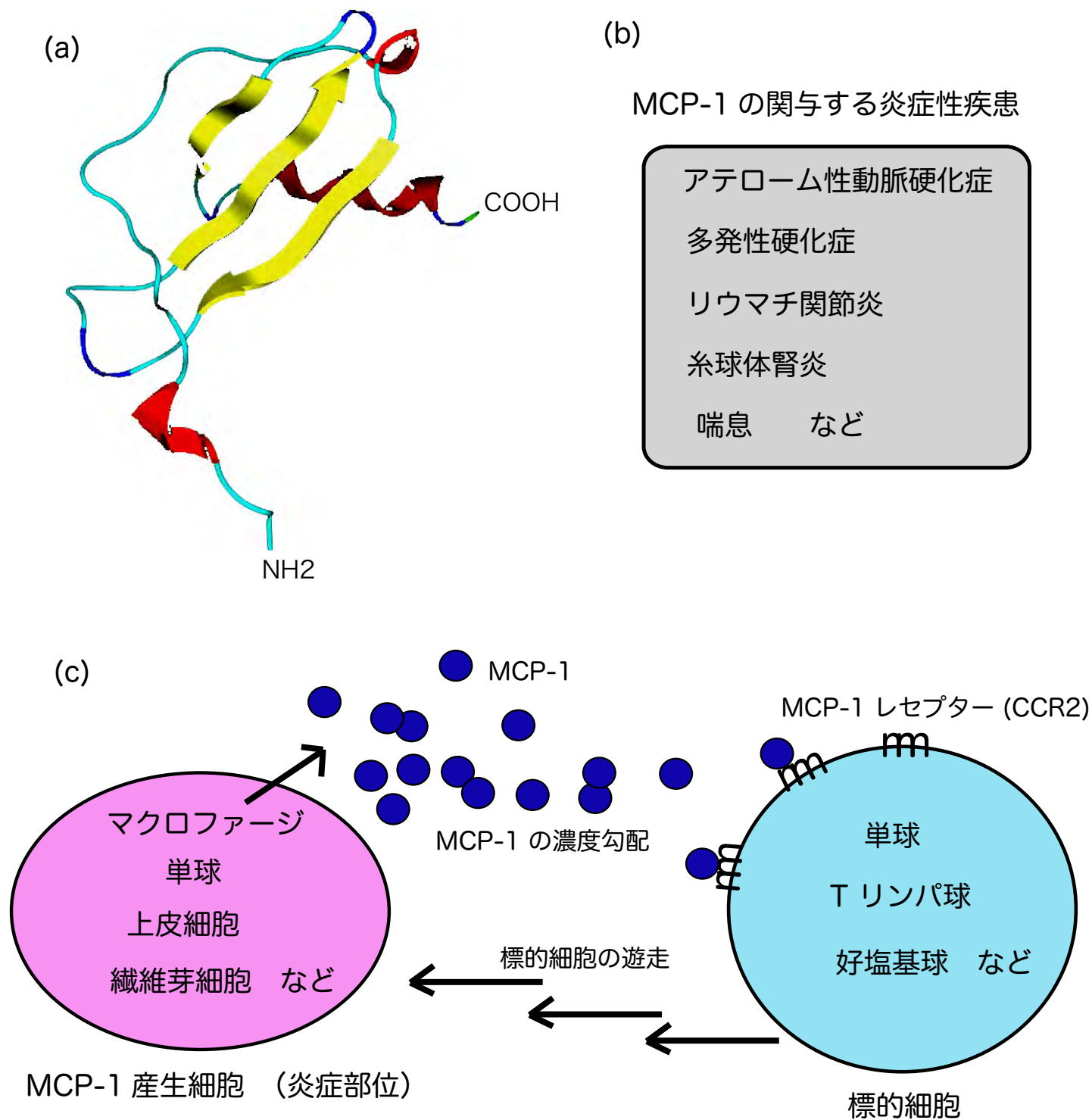


図 1-1. ケモカイン MCP-1

(a) hMCP-1 の立体構造 (PDB ID=1DOL) hMCP-1 の X 線結晶解析により得られた立体構造を示す。他の CC ケモカインと同様の構造をしている。

(b) MCP-1 の関与する炎症性疾患 モデル動物を用いた実験などで様々な炎症性疾患において MCP-1 が関与していることが示されており、治療の標的分子となりうる。

(c) hMCP-1 のはたらき MCP-1 は炎症部位においてマクロファージなどにより産生される。MCP-1 レセプターを発現した単球などの細胞は MCP-1 の濃度勾配にしたがって遊走し、炎症部位へと移動し炎症をひきおこすことになる。

MCP-1 により遊走する細胞として 単球、T リンパ球、およびNK 細胞が知られている（図 1-1）。

1-3 MCP-1 と疾患

MCP-1 は喘息、糸球体腎炎、リウマチ関節炎、アテローム性動脈硬化症、多発性硬化症などのいろいろな急性および慢性の炎症疾患に関与していることがわかっている。またこれらの炎症は単球の浸潤によって特徴付けられる。また、MCP-1 はマクロファージの腫瘍部位への蓄積にも関与している。これらの症状において、単球の浸潤は疾患の進行における初期の重要なイベントである。よって、MCP-1 の細胞遊走活性の阻害は、これらの疾患の治療において有効な手段であると考えられる。いくつかの動物モデルにおいて、MCP-1 中和抗体またはMCP-1 阻害剤によるMCP-1 の阻害が炎症を軽減させ非常に有効であることが示されている。

第2章 scFv ファージディスプレイライブラリー

2-1 抗体医薬

現在、いくつかの抗体医薬が癌や自己免疫疾患の治療において実用されている（図2-1a）。抗体は、生体内の免疫システムの異物排除に関わる重要な分子であり、無限ともいえる外来異物に対応できる多様性と抗原に対する高い特異性を有する分子である。抗体が、分子標的医薬として注目を浴びたのは、1980年にKoller とMilstein によって動物免疫を基盤としたハイブリドーマ技術を用いたモノクローナル抗体作製法が確立されたのが始まりである。しかしながら、ハイブリドーマ技術により作製された抗体を用いた臨床試験の結果は、いくつかの問題があった。その原因は、マウス由来のモノクローナル抗体のヒト免疫系における免疫原性であり、ヒトに投与されたモノクローナル抗体は、惹起された免疫応答により速やかに体内から排除され、またアナフィラキシーのおそれから複数回投与は困難であった。

1980年代に遺伝子工学技術の進歩により、マウスモノクローナル抗体のヒトにおける免疫原性を減少させるあらたな技術が誕生した。それは、抗原特異性と生物活性を保持したまま、マウスモノクローナル抗体遺伝子をヒト抗体の配列に近づける「キメラ抗体」、「ヒト型化抗体」作製法である（図2-1b）。しかしながら、これらの抗体においてもマウス由来のアミノ酸配列は依然として残されており、

(a)

名称（商品名）	種類	標的分子	使用
Rituximab（Rituxan®）	キメラ	CD20	B リンパ腫、リウマチ など
Cetuximab（Erbix®）	キメラ	EGFR	大腸癌、頭部頸癌 など
Infliximab（Remicade®）	キメラ	TNF- α	リウマチ など
Trastuzumab（Herceptin®）	ヒト型化	HER2	乳癌 など
Bevacizumab（Avastin®）	ヒト型化	VEGF	大腸癌、非小細胞肺癌 など

(b)

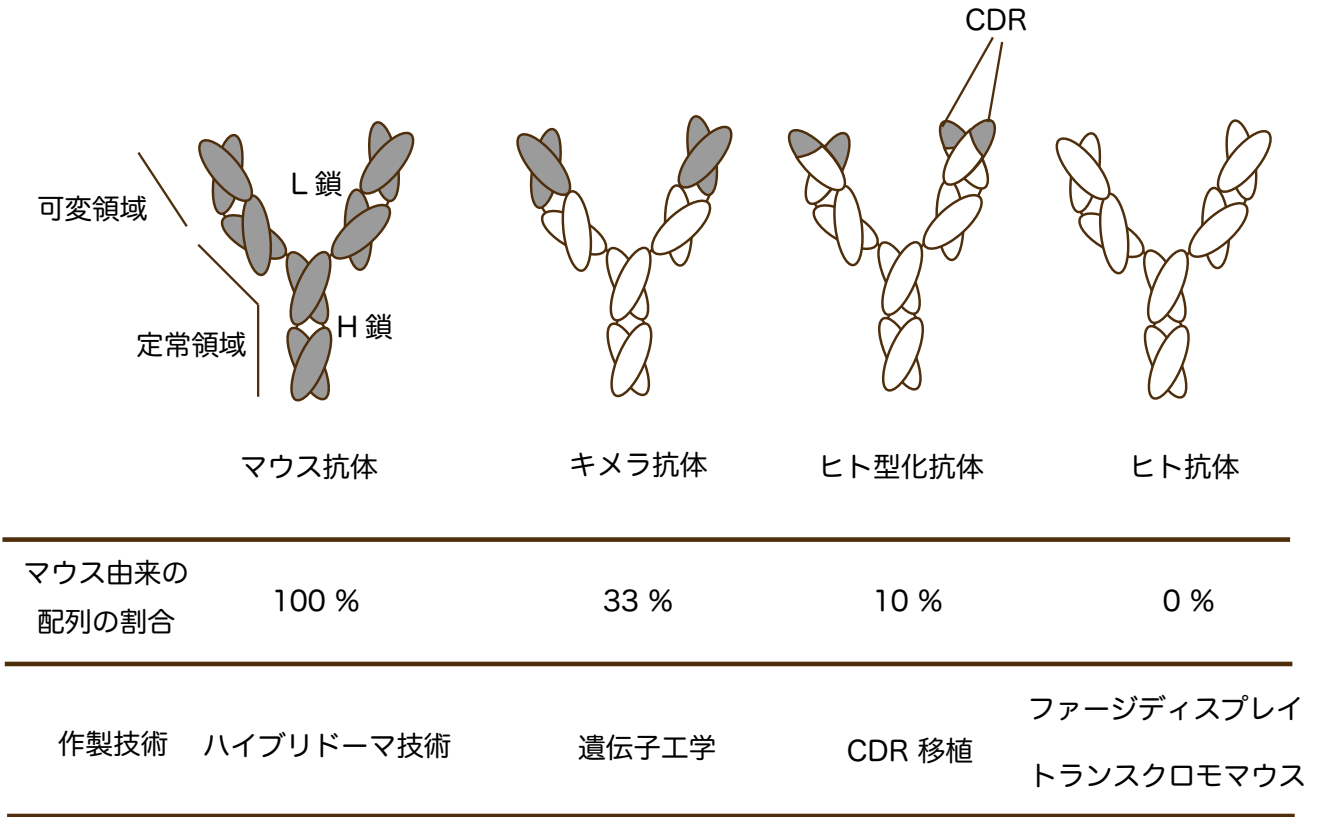


図 2-1. 抗体医薬開発の進展

(a) 現在用いられている抗体医薬

現在、数種類の抗体医薬がおもに癌や自己免疫疾患の治療において用いられている。

(b) 抗体の構造と抗体医薬開発の進展

抗体は分子によって配列の異なる可変領域と、配列の保存された定常領域とから構成されている。可変領域は抗原への結合に関わり、一方で定常領域は免疫学的エフェクター機能に関与している。可変領域のなかでも CDR (complementarity determining region: 相補性決定領域) は抗原との接触部位であり抗体分子間での配列の変化が大きい。

マウスモノクローナル抗体の可変領域とヒト抗体の定常領域を組み合わせたものがキメラ抗体、ヒト抗体にマウスモノクローナル抗体の CDR を移植したものがヒト型化抗体である。これらの抗体は一部ながらマウス由来の配列を含むため、治療への使用において免疫原性の問題が考えられる。

投与した患者にHACA (human anti-chimera antibody)、HAHA (human anti-humanaized antibody) が出現する場合があった。

しかしながら、今日、抗体医薬品はさまざまな疾患領域における次世代型バイオ医薬品として注目を集めている。その背景として抗体の免疫原性の解決に向けた近年の目覚ましい技術進歩がある。その新たな抗体作製技術は、100% ヒト由来の配列からモノクローナル抗体を作製する方法であり、ヒト抗体遺伝子をマウスに移植したトランスクロモマウスと、ヒト抗体ファージディスプレイライブラリーがこれまでに報告されている。

2-2 ファージディスプレイテクノロジー

ファージディスプレイは、1985 年にG. Smith が繊維状バクテリオファージの表面にランダムペプチドの提示が可能であることをScience 誌に報告したのを発端に、現在では目的の機能を持ったポリペプチドを迅速に単離する方法として発展しており、有用な生理活性ペプチドやあらたな機能を持つタンパク質の創製、完全ヒト抗体の作製などさまざまな分野で応用されている。

繊維状ファージであるM13 は環状の一本鎖ゲノムDNA をもち、そのまわりに5つのコートタンパク質(g3p, g6p, g7p, g8p, g9p) が会合した細長い筒状の構造をしており、大腸菌に感染して増殖するウイルスである(図2-2)。ファージディスプレイは、ファージコートタンパクに外来ポリペプチドを融合させて発現させる

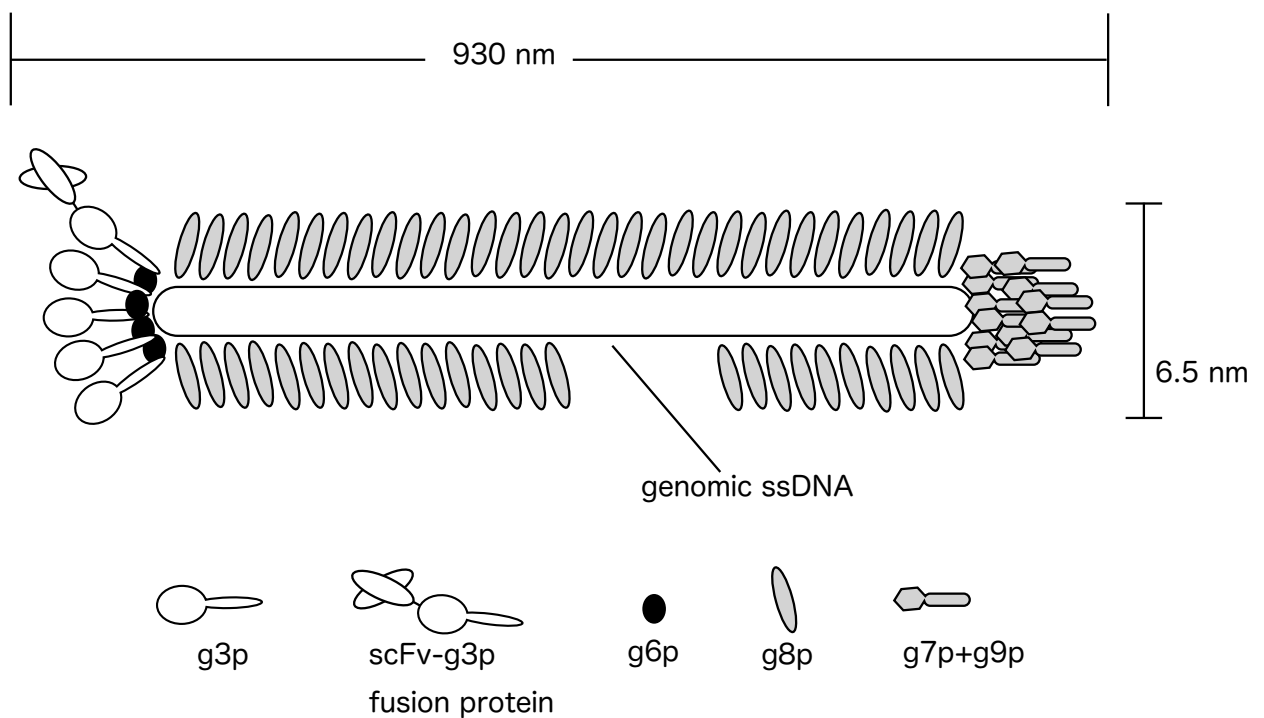


図 2-2. M13 ファージの構造

繊維状バクテリオファージ M13 は、直径が約 6.5 nm 長さが約 930 nm の大きさを持ち、その分子量は約 16.3 MDa で約 87 % がタンパク質で構成されている。ゲノムは一本鎖の DNA からなり、そのまわりをコートタンパクが円筒状に包んでいる。円筒は主に g8p タンパクからなり約 3,000 分子ある。ファージの片方の末端には g7p および g9p タンパクが結合している。他方の末端には g3p および g6p タンパクが結合している。なかでも g3p タンパクはファージが大腸菌に感染する際に重要な分子で、1つのファージ上に 5 分子存在する。g3p の一部を scFv-g3p 融合タンパクに置き換えることで scFv をファージ上に提示することが可能である。

ことでファージ表面に提示させる方法である。ファージに提示されている外来ポリペプチドのアミノ酸配列はファージゲノムの塩基配列解読により容易に同定できることから、タンパクの配列と機能との関連を迅速に調べることができ、さらにファージゲノムに組込まれている外来ポリペプチド遺伝子に変異を導入するだけで外来遺伝子の変異体をファージ表面に提示でき、より目的に沿った分子の単離が可能である。ファージへのディスプレイ方法として、ほぼすべてのコートタンパクに提示が可能であるが、おもにg3p, g8p への提示システムが用いられている。1つのファージに5分子存在するg3p に提示した場合、分子量50 kDa 程度のポリペプチドを融合タンパクとして発現できるが、一方、g8p を提示に用いた場合は約3,000 分子の提示ができるが、融合できるポリペプチドは5-6 アミノ酸程度までである。

2-3 scFv ファージディスプレイライブラリーの作製

健康人20名の末梢血単核球よりtotal RNA を抽出し、イムノグロブリンの γ 、 μ 、 κ 、 λ の定常領域に特異的なプライマーを用いて、抗体のH鎖とL鎖のcDNA を合成した(図2-3)。これらのcDNA から、抗体の遺伝子ファミリー特異的なプライマー群をもちいて抗体の可変領域(VH, VL) 遺伝子をPCRで増幅した。その後、VH 遺伝子とVL 遺伝子とを、(GGGGS)₃ のアミノ酸配列をコードするリンカーDNA で連結してscFv 遺伝子を合成した。

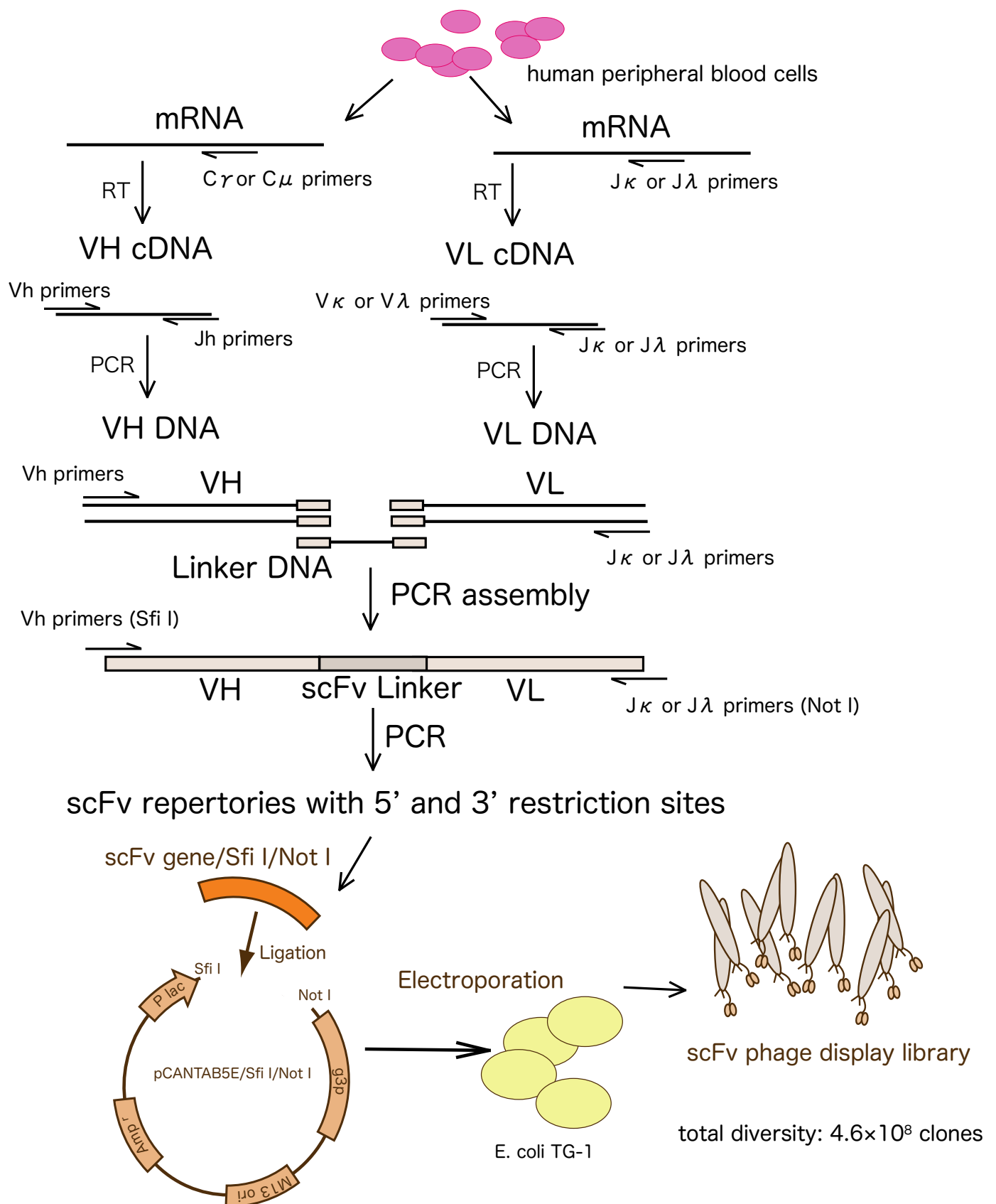


図 2-3. ヒト scFv 抗体ファージライブラリーの構築

ヒト末梢血単核球由来の cDNA より抗体の VH および VL 遺伝子レパートリーを特異的プライマー群を用いた PCR によりそれぞれ増幅した。VH、リンカーペプチドをコードするリンカー DNA 断片、VL とを PCR assembly により連結し scFv 遺伝子を作製した。繊維状ファージに提示するため scFv 遺伝子をファージミドベクターに組み込み大腸菌へと形質転換をおこなった。このときの形質転換体の数をもとにしてライブラリーの多様性 (diversity) を決定した。

形質転換体にヘルパーファージを重感染させることにより、scFv を提示したファージライブラリーを作製した。

合成されたscFv 遺伝子はSfi I およびNot I の制限酵素サイトを用いてファージミドベクターpCANTAB5E で組込んだ。scFv 遺伝子を組込んだベクターを大腸菌に形質転換させ、ヘルパーファージ（M13KO7 ） の重感染により、scFv を提示したscFv ファージディスプレイライブラリーを調製した。

第3章 MCP-1 へ結合するscFv の単離

3-1 目的

MCP-1 は様々な炎症性免疫疾患に関与しており、その阻害がそれらの疾患の治療に有効であると考えられる。よって本研究では、MCP-1 の機能を阻害するヒト抗体を単離することを目的として、ヒトscFv ファージライブラリーからヒトMCP-1 に特異的に結合する抗体の単離を行った。抗体をMCP-1 依存的炎症疾患の治療に用いるためには、抗体がMCP-1 に結合するだけでなく、MCP-1 の生理的機能である細胞の遊走を阻害することが必要である。そのため、MCP-1 依存的遊走をする細胞株THP-1 を用いて、得られた抗体がその遊走を阻害するかどうかについて調べた。単離される抗体は完全なヒト抗体であるので早期に臨床への応用が可能であると考えられる。

3-2 材料と方法

3-2-1 ヒトMCP-1 に結合する抗体ファージの単離（パンニング）

ヒトscFv ファージライブラリーから、ヒトMCP-1 特異的な抗体ファージクローンを単離するため、ヒトMCP-1 に対するパンニングを行った（図3-1）。

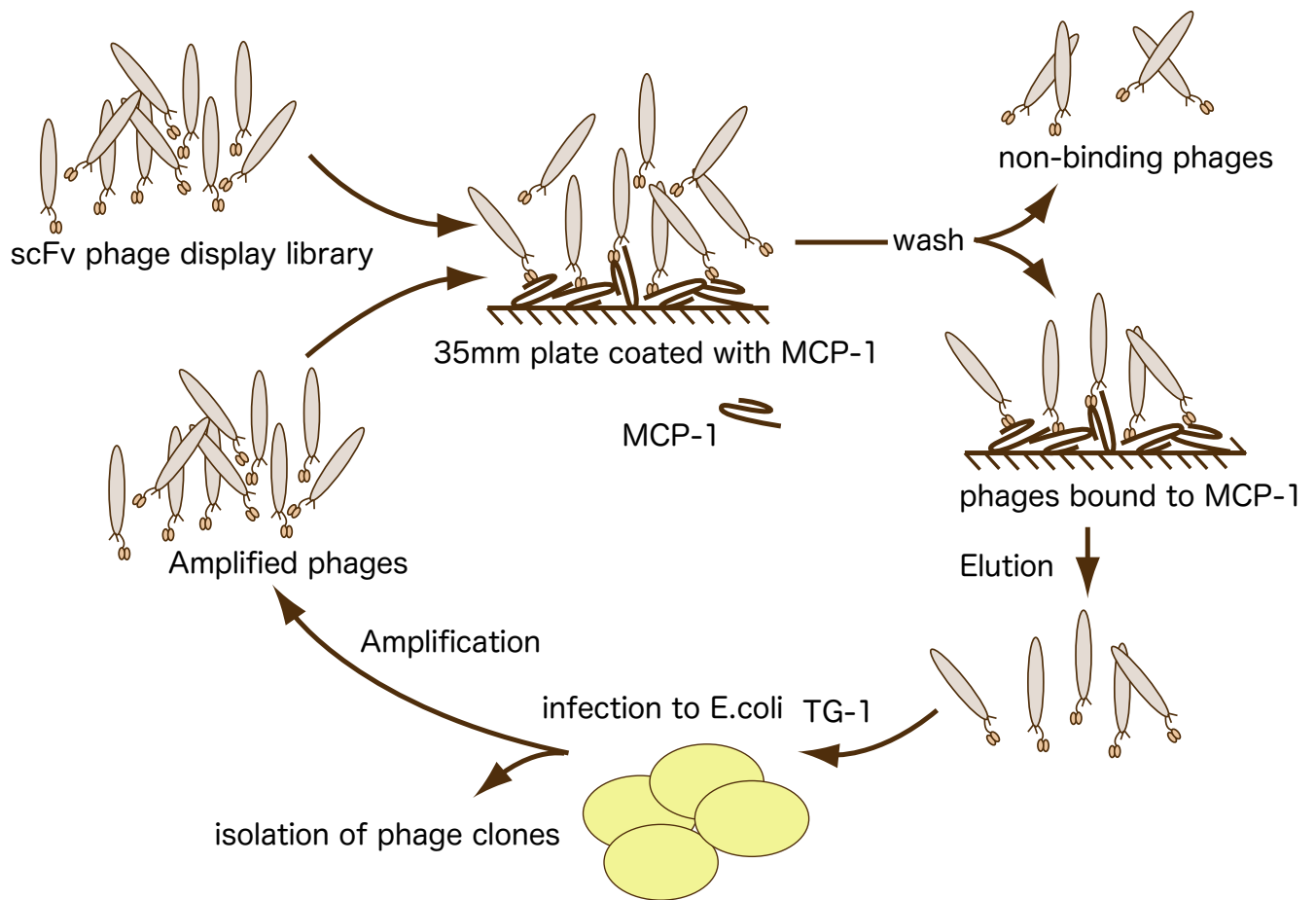


図 3-1. MCP-1 に結合する抗体ファージの単離（パンニング）

hMCP-1 を固定化したプレートと scFv ファージライブラリーとを反応させた。結合しなかったファージを洗浄により取り除いた。MCP-1 に結合したファージは酸により溶出して回収した。回収したファージは大腸菌へ感染させ増幅をおこない次のラウンドの選別に用いた。3 ラウンドのパンニングをおこなったあとファージをクローン化した。

操作は、35 mm プラスチックディッシュにヒトMCP-1 を5 μ g/ml 0.1M NaHCO₃ pH 8.6 を1 ml 加え、4 $^{\circ}$ C 12 時間静置してディッシュ上にMCP-1 をコートした。その後、5 ml の0.5 % ゼラチン/PBS で90 min ブロックした。このディッシュにヒトscFv ファージライブラリーのうちV γ -V κ 、V μ -V κ ライブラリーの混合物(κ ライブラリー) またはV γ -V λ 、V μ -V λ ライブラリーの混合物 (λ ライブラリー) をそれぞれ5 \times 10¹¹ TU 加え、室温で60 分反応させた。その後、結合しなかったファージを除去するため、PBST (0.1 % Tween-20/PBS) で10 回洗浄した。結合したファージを回収するため1 ml の0.1 M Glycine-HCl (pH 2.2) を加え5 分後にファージを含む溶液を回収し、ただちに100 μ l の1M Tris-HCl (pH 9.1) を加え中和した。回収したファージ溶液を対数増殖期の大腸菌TG-1 株の溶液に加え、37 $^{\circ}$ Cで30 分静置して感染させた。その後、培地を2TYAG に換えて16 時間培養してグリセロールストックした。また、回収したファージ溶液の一部を段階希釈したのち大腸菌TG-1 に感染後、2TYAG プレートに播くことで回収されたファージのタイターを計測した。

ファージの感染したTG-1 を対数増殖期まで37 $^{\circ}$ Cで培養し、ヘルパーファージ(M13KO7) を重感染させ、培地を2TYAK に置き換え30 $^{\circ}$ Cで12 時間培養し、scFv を提示したファージを産生させた。培養液から遠心分離で大腸菌を取り除いた上清に0.1 volume のPEG/NaCl 溶液を加え4 $^{\circ}$ C で4 時間冷やしたのち、遠心分離でファージを回収した。この回収したファージは2 ラウンド目のパンニングに用いた。

2 ラウンド目のパンニングではブロックを5% スキムミルク/PBS で行い、3 ラウンド目は1% BSA/PBS で行った。また、より結合の強いクローンを単離するため、パンニングに用いたMCP-1 は2 ラウンド目では3 μ g、3 ラウンド目では1 μ g と減らしていった。

3 ラウンドのパンニング後、回収したファージはクローン化され、各クローンのファージ溶液についてMCP-1 特異的結合活性をELISA 法で解析した。

3-2-2 scFv 抗体の発現解析

ELISA でMCP-1 に特異的に結合したファージクローンを大腸菌HB2151 株に感染させ、1 mM IPTG によりscFv 発現を誘導した。16 時間の培養後、培養上清画分とペリプラズム画分を回収した。各画分を12.5 % ゲルで SDS-PAGE を行い、PVDF メンブレンに転写をおこないウエスタンブロッティングをおこなった。scFv はHRP 標識された抗E tag 抗体を用いて検出した。

3-2-3 可溶性scFv の精製とゲルろ過クロマトグラフィー解析

可溶性scFv は、発現の多くみられたペリプラズム画分より、抗E tag アフィニティーカラムを用いて精製した。精製されたscFv は、10/300 GL Superdex75 カラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより解析された。

3-2-4 ELISA (phage)

ELISA プレートにヒトMCP-1 (80 ng/40 μ l/well)、BSA, ゼラチン、スキムミルク、HSA およびヒトMIP-1 α をコートした。ブロッキング溶液をウェルに加え2時間ブロッキングした後、ウェルをPBST で3回洗浄した。その後、各ファージクローンを加え室温で1時間反応させた。その後、PBST で3回洗浄後、ビオチン化された抗g8p 抗体を加え1時間反応させた。PBST で3回洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識されたストレプトアビジンを加え、1時間反応させた。PBST で3回洗浄後、基質としてp-nitrophenylphosphate 溶液を加え405 nm における吸光度を測定した。

3-2-5 ELISA (scFv)

ELISA プレートにヒトMCP-1 (80 ng/40 μ l/well)、BSA, ゼラチン、スキムミルク、HSA およびヒトMIP-1 α をコートした。ブロッキング溶液をウェルに加え2時間ブロッキングした後、ウェルをPBST で3回洗浄した。その後、各クローンのscFvを加え室温で1時間反応させた。その後、PBST で3回洗浄後、抗E tag抗体を加え1時間反応させた。PBST で3回洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識された抗マウスIgG 抗体を加え、1時間反応させた。PBST で3回洗浄後、基質としてp-nitrophenylphosphate 溶液を加え405 nm における吸光度を測定した。

3-2-6 scFv 抗体の遺伝子配列解析

scFv 抗体のDNA 配列は上流からはpCANTAB5-S1 プライマー (5'-caacgtgaaaaaattattattcgc-3') を、下流からはpCANTAB5-S6 プライマー (5'-gtaaataaattttctgtatgagg-3') をもちいてDye terminator 法によって決定した。伸長反応の条件は、96 °C 10 秒、50 °C 5 秒、60 °C 4 分のサイクルを25 回行った。20 μ l の反応産物をエタノール沈殿によりペレットにし、脱ホルムアミドに溶解後、ABI PRISM 3100 Genetic analyzer により解析をおこなった。さらに抗体の塩基配列をIMGT/V-QUEST データベースにより解析し、抗体の超可変領域 (CDR-1, 2, 3)、フレームワーク (FR-1-FR4), および抗体遺伝子のgermline が決定された。

3-2-7 表面プラズモン解析

得られたscFv のhMCP-1 に対する結合アフィニティを調べるため、BIAcore X-100 を用いたSPR 解析を行った。ヒトMCP-1 をPBS 中で、EDC-NHS により活性化されたセンサーチップCM5 に10 μ l/min の流速で流し込み、アミンカップリングによってセンサーチップ上にMCP-1 を固定化した。その後、センサーチップ上の未反応の官能基を1M エタノールアミン 溶液で不活性化した。抗体のアフィニティ解析はすべて25 °C PBS 中、流速30 μ l/min で行い、各サイクルの後にチップは0.1M Glycine -HCl (pH 2.1) で30 sec で再生させた。得られた各抗体濃度のセンサーグラム BIAcore X100 Evaluation software の

1:1 binding model を用いて解析し、会合速度定数(k_{on})、解離速度定数(k_{off}) を算出した。解離定数(K_d) は k_{off}/k_{on} によって得られた。

3-2-8 MCP-1 による遊走の阻害実験

遊走阻害実験は、MCP-1 により遊走するヒトTHP-1 細胞株を用いておこなった。MCP-1 (最終濃度 2.2 nM) をscFv 抗体と37 °C30 分反応させ、48 ウェルマイクロチャンパーの下ウェルに加えた。下のウェルと上のウェルを8 μ m の穴のあるフィルターで仕切り、上のウェルにTHP-1 細胞(3.75×10^5 cells/well)を加えた。5 % CO₂ インキュベーターで37 °C2 時間置いた後、フィルターを回収し、フィルター上面の透過していない細胞を拭き取った。フィルターをパラホルムアルデヒド溶液で固定し、透過した細胞をディフクイック染色液で染色した。顕微鏡下で遊走した細胞を計測した。

3-2-9 MC32 scFv の立体構造モデリング

MC32 scFv のアミノ酸配列をもとに、立体構造モデリングソフト MOE (菱化システム) を用いてPDB データベースからのホモロジーモデリングでMC32 scFv の立体構造モデルを構築した。モデリングではMC32 scFv と相溶性が高い

抗体 (PDB ID: 1F3R, 1LMK, 2GKI, 1NQB) の立体構造を鋳型としてモデル構造を構築し、構造計算によりモデルの最適化をおこなった。

3-3 実験結果

3-3-1 ヒトMCP-1 に結合する抗体ファージの単離 (パンニング)

ヒトscFv 抗体ファージライブラリーから、3ラウンドのパンニングをおこないヒトMCP-1 に結合活性を有するscFv 抗体ファージの単離を試みた。

V_{γ} - V_{κ} 、 V_{μ} - V_{κ} ライブラリーの混合物(κ ライブラリー)から144 クローン調製し、ELISA によりヒトMCP-1 への結合活性を調べたところ、3クローン

(MC8, MC32, MC62) においてMCP-1 特異的結合がみられた (図3-2)。

一方、 V_{γ} - V_{λ} 、 V_{μ} - V_{λ} ライブラリーの混合物(λ ライブラリー)から90 クローンについて解析したところ、4クローン (Ap20, Ap68, ApM2, ApM9) においてMCP-1 特異的結合がみられた (図3-2)。

3-3-2 scFv 抗体の発現解析

MCP-1 特異的結合活性を有するファージクローンを大腸菌HB2151 株に感染させ、IPTG でscFv 発現の誘導を行った。その後、培養上清画分またはペリプラズム画分におけるscFv の発現を、抗E tag 抗体を用いたウエスタンブロッティング

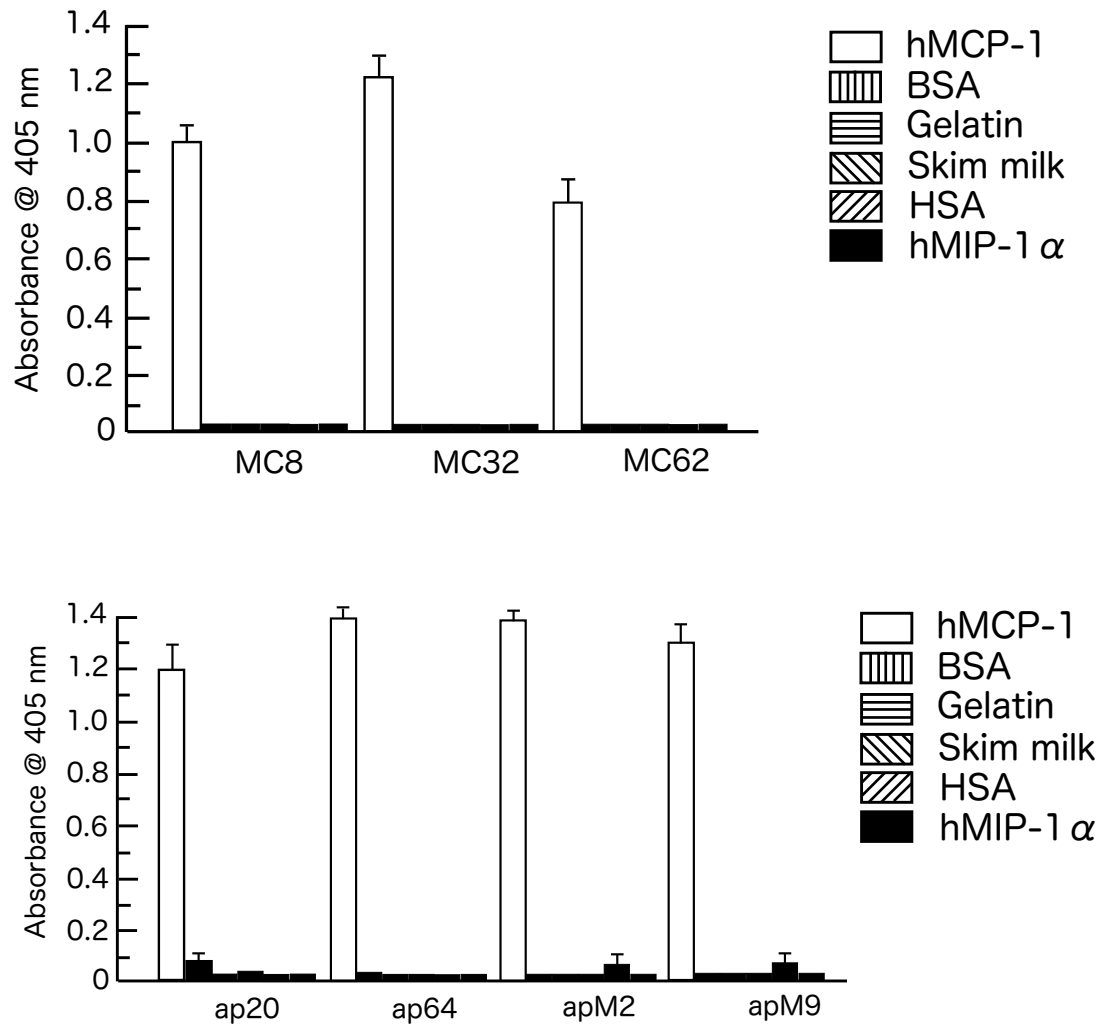


図 3-2. 単離された scFv ファージの MCP-1 特異的結合活性

パンニングによって得られたファージクローンについて、ELISA 法によって hMCP-1 への結合活性を調べた。7 クローンにおいて hMCP-1 特異的な結合活性がみられた。

グで調べた（図3-3a）。その結果、7クローンすべてにおいてペリプラスム画分での発現がみられ、培養上清画分ではほとんど検出されなかった。

3-3-3 可溶性scFv の精製とゲルろ過クロマトグラフィー解析

7クローンについて、ペリプラスム画分より抗E tag アフィニティカラムを用いてscFv 抗体を精製した。精製したscFv 抗体をゲルろ過クロマトグラフィーで解析したところ、モノマーとダイマーのピークがみられ、いずれのクローンにおいてもダイマーの方が多かった（図3-3b）。以後の解析には、モノマーの画分を分画したものをを用いた。

3-3-4 ELISA (scFv)

精製したscFv 抗体のMCP-1 への結合特異性をELISA により調べたところ、7クローンすべてにおいてファージに提示されていたときと同じく、MCP-1 特異的結合がみられた（図3-4a）。また、抗体濃度依存的な結合活性がみられた（図3-3b）。

3-3-5 scFv 抗体の遺伝子配列解析

得られた7クローンについてscFv の遺伝子配列を解析した（図3-5 a, b）。VH およびVL のgermline をVBASE データベースをもとに解析したところ、すべ

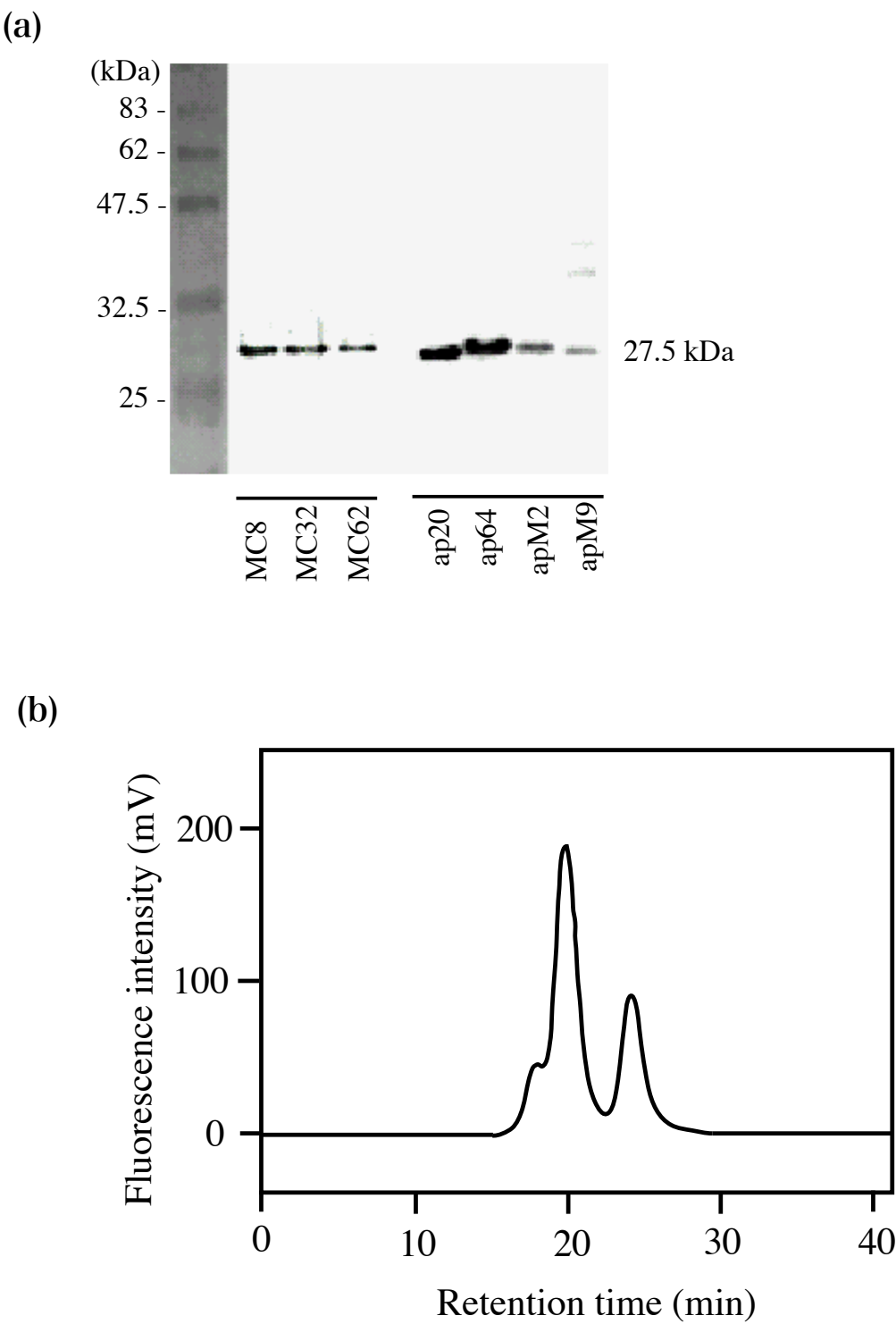


図 3-3. scFv 抗体の性状解析

hMCP-1 特異的結合活性を有したクローンから可溶性 scFv を精製し、その性状を解析した。

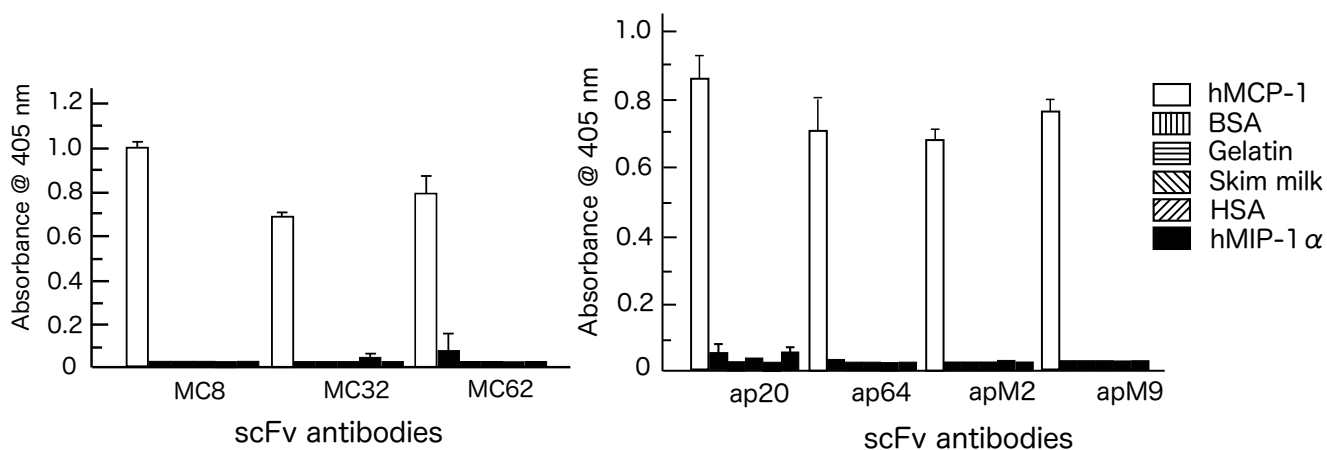
(a) scFv 抗体のウエスタンブロッティング解析

7 クローンとも約 27.5 kDa の単一のバンドとして検出された。

(b) scFv 抗体のゲルろ過クロマトグラフィー

ゲルろ過カラムを用いて HPLC で解析したところ、MC32 scFv は二量体と一量体の 2 つのピークがみられ二量体の方が多かった。一量体のみを分画し今後の解析に用いた。

(a)



(b)

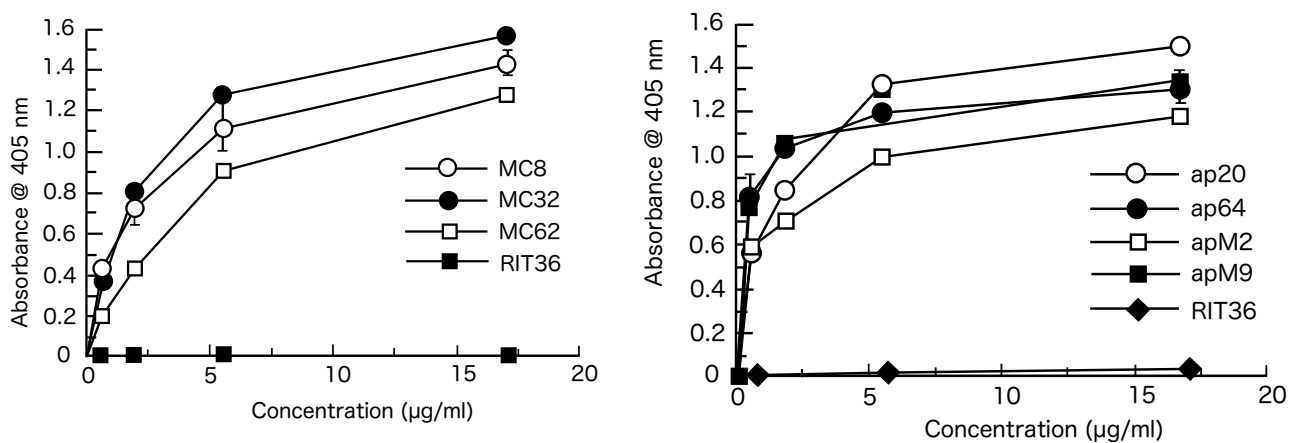


図 3-4. 精製した scFv 抗体の MCP-1 特異的結合活性

(a) 7 クローンより精製した scFv 抗体について、ELISA 法により hMCP-1 特異的を調べた。7 クローンすべてで scFv レベルでの MCP-1 特異的結合活性がみられた。

(b) scFv の濃度依存的結合活性 コントロール scFv (RIT36) においては結合活性はみられなかった。

(a) VH sequences of scFv clones

	FR1	CDR1	FR2	CDR2
MC8	QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKKASGGTFS	SYAIS	WVRQAPGQGLEWMG	GFDPEDEGETIYAQKFQG
MC32	QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKKASGGTFS	SYAIS	WVRQAPGQGLEWMG	GFDPEDEGETIYAQKFQG
MC62	not determined			
ap20	QVQLVQSGAEVKKSGASVKVSKVSGHTLT	DLSMH	WVRQAPGAGLEWMG	GFDAEEGGAVYAQKFQG
ap64	EVQLVESGAEVKKPGASVKVSKVSGYTTL	ELSMH	WVRQAPGKGLEWMG	GFDPEDEGETIYAQKFQG
apM2	EVQLVESAAEVKKPGESLKVSKVSGYTTL	ELSMH	WVRQAPGKGLEWMG	GFDPEDEGETIYAQKFQG
apM9	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKVSGHTLT	ELSLH	WVRQAPGKGLEWMG	GFDPEDEGETIYAQKFQG

	FR3	CDR3	FR4
MC8	RVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCAT	DLGGGDYYYGMDV	WGQGT'TVTVSS
MC32	RVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCAT	DLGGGDYYYGMDV	WGPGT'TVTVSS
MC62	not determined		
ap20	RVTMTEDTSTDTAYLELSSLRPEDTALNYCAS	DLSSS-WYDIFDI	WGQGS'LVTVSS
ap64	RVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCAT	DGFS-----GYDS	WGQGT'LVTVSS
apM2	RVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTPVYYCAT	AERG--YSYGLDY	WGQGT'LVTVSS
apM9	RVTVTEDTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCAT	ADTTWDGYA'FDV	WGQGT'LVTVS-

(b) VL sequences of scFv clones

	FR1	CDR1	FR2	CDR2
MC8	DIQLTQSPSTLSASVGDRTATISC	RSSQ--SINTY---LH	WYQQKPGEAPKLLIY	AASTLQS
MC32	DIQLTQSPSTLSASVGDRTATISC	RSSQ--SINTY---LH	WYQQKPGEAPKLLIY	AASTLQS
MC62	DIVMTQSPPLSLPVTLGQPASISC	RSSQSLVYSDGNTYLN	WFQQRPGQSPRRLIY	KVSNRDS
ap20	QPVLTQPP-SVSVAPGKTATITC	ERSN--IGRKS---VH	WYQQKPGQAPVLVIT	NDNGRPS
ap64	SSELTQDP-AVSIVLGQTVRITC	QGDS--LRSYY---AT	WYQQKPGQAPVLVIY	GKNNRPS
apM2	SYVLTQPP-SVSVVPGETASISC	RGDN--IGSKD---VQ	WYQQKPGQAPVLVIY	DDEVVRPS
apM9	QSVLTQPP-SASGTPGQRTVITC	SGSNSNIGSNT---VN	WYQQLPGTAPKLLIY	SNNQRPS

	FR3	CDR3	FR4
MC8	GVPSRFSGSGSGTDFTLTITTLQPEDFATYYC	QQS---FTTPLT	FGGGTKVEIKR
MC32	GVPSRFSGSGSGTDFTLTITTLQPEDFATYYC	QQS---FTTPLT	FGGGTKVEIKR
MC62	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	TQS---IQLPLT	FGGGTKVEIKR
ap20	GIPERFSGSNSGNAATLTISRVEAGDEADYYC	QVWDYSSDHRVQ	FGGGTQLTVLG
ap64	GIPDRFSSSTSGNTASLTITGAQAEDADYYC	NSRDSSGNH-VL	FGGGTKLTVLG
apM2	GTPERFSGSNSGNTATLTISGVEAGDEADYYC	QVWDSSSDH-YV	FGTGTQLTVLG
apM9	GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEADADYYC	AAWDDRMTGTIV	FGTGTKLTVLG

(c) gene usage of scFv clones

clone No.	Heavy chain.			Light chain.	
	V	D	J	V	J
MC8	IGHV1-24*01	IGHD3-16*01	IGHJ6*02	IGKV1-39*01	IGKJ4*01
MC32	IGHV1-24*01	IGHD3-16*01	IGHJ6*02	IGKV1-39*01	IGKJ4*01
MC62	N.D.	N.D.	N.D.	IGKV2-30*01	IGKJ4*01
ap20	IGHV1-24*01	IGHD6-13*01	IGHJ3*02	IGKV3-21*01	IGKJ3*01
ap64	IGHV1-24*01	IGHD1-14*01/inv	IGHJ5*02	IGKV3-19*01	IGKJ3*01
apM2	IGHV1-24*01	IGHD5-18*01	IGHJ4*02	IGKV3-21*01	IGKJ1*01
apM9	IGHV1-24*01	IGHD5-24*01	IGHJ3*01	IGKV1-44*01	IGKJ1*01

図 3-5. MCP-1 特異的 scFv のアミノ酸配列 (a, VH, b, VL) と遺伝子 usage

hMCP-1 特異的結合活性がみられた 7 クローンについて scFv 遺伝子の塩基配列を解読した。塩基配列よりアミノ酸配列を決定した。(a) VH, (b) VL (c) 塩基配列をもとに VH および VL の germline gene を解析した。7 クローンすべてで V1 germline が同一であった。VL germline は比較的多様であった。このことから ,MCP-1 特異的結合活性においておもに VH の寄与していることが示唆される。

てのクローンのVH1 gene family がIGHV1-24*01 と同一であった(図3-5c)。その他の領域はクローンによって違っていた。VH1 のgermline が共通ということから、これらのクローンの結合活性にはおもにVH 領域が寄与しているものと考えられる。また、MC8 とMC32 は配列が非常に似ており、1 アミノ酸残基 (MC8 Q, MC32 P) が異なるだけであった。

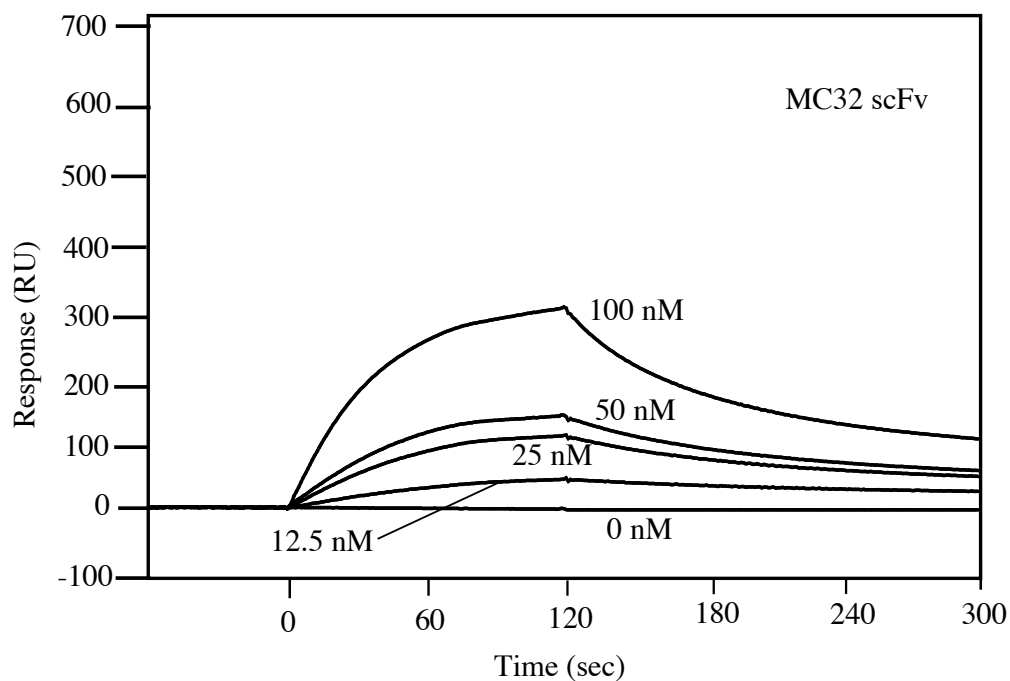
3-3-6 表面プラズモン解析

表面プラズモン解析を行ったところ、MCP-1 への結合がみられ、図3-6a に示すようなセンサーグラムを示した。また、このセンサーグラムよりhMCP-1 に対する結合親和性を計算した(図3-6b)。

3-3-7 MCP-1 による遊走の阻害実験

MCP-1 によって遊走する細胞株THP-1 を用いて、各scFv クローンの遊走阻害活性を調べた(図3-7)。MC 8 およびMC32 では濃度依存的な遊走阻害活性がみられたが(図3-8 a, b)、その他のクローンについては遊走阻害活性はみられなかった(図3-8 c)。

(a)



(b)

clone No.	k_{on} (sec ⁻¹ M ⁻¹)	k_{off} (sec ⁻¹)	K_d (k_{off}/k_{on})(M)
MC32	9.3×10^5	2.0×10^{-2}	2.1×10^{-8}
MC62	1.0×10^4	2.1×10^{-2}	2.1×10^{-7}
ap20	7.6×10^4	5.6×10^{-3}	7.4×10^{-8}
ap64	2.3×10^4	1.8×10^{-3}	7.8×10^{-8}
apM2	1.0×10^5	8.9×10^{-3}	8.5×10^{-8}

図 3-6. MCP-1 特異的 scFv のアフィニティ解析

(a) MC32 scFv の BIACORE センサーグラム

hMCP-1 を固定化したセンサーチップを用いて、BIACORE により scFv の結合を測定した。濃度依存的レスポンスがみられた。

(b) 各 scFv の結合親和性

BIACORE センサーグラムより、会合速度定数 k_{on} 、解離速度定数 k_{off} および解離定数 K_d の値を求めた。

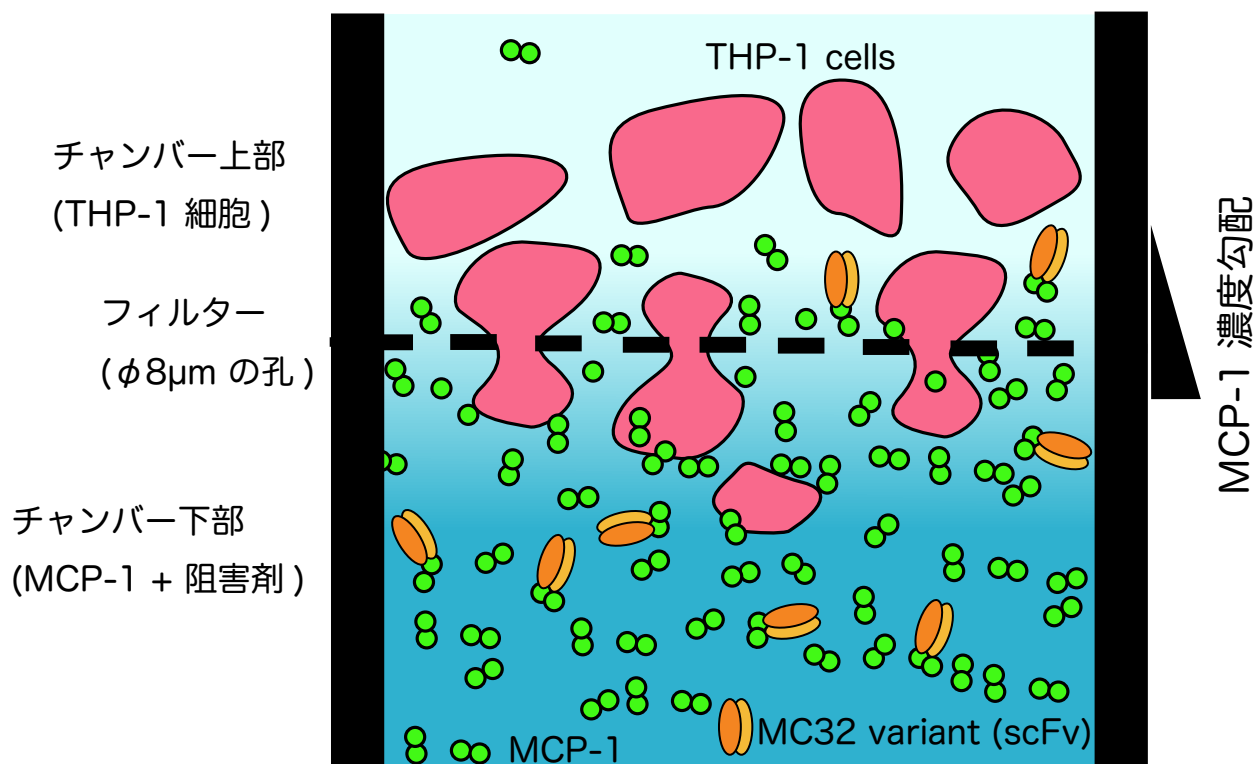


図 3-7. 細胞遊走阻害試験

MCP-1 による細胞遊走活性を調べるため、細胞遊走試験をおこなった。

この試験では、フィルターで上下に仕切られたチャンバーを用いており、下のチャンバーに遊走活性を調べたい物質 (MCP-1) を入れ、上のチャンバーには遊走細胞として細胞株 THP-1 を加える。

チャンバーの上下を仕切っているフィルターには $8\mu\text{m}$ の孔が無数に開いており、そこから下部の MCP-1 が上へと漏れだし MCP-1 の濃度勾配を形成する。上の THP-1 細胞はこの濃度勾配にしたがって遊走をおこない、フィルターの孔を通過して下のチャンバーへと移動する。一定時間後フィルターを回収しフィルターを通過している細胞を固定・染色し計数して細胞遊走活性を調べた。

遊走試験において下のチャンバーに MCP-1 阻害剤として scFv を加え、細胞遊走に及ぼす影響を調べることで遊走阻害実験を行った。

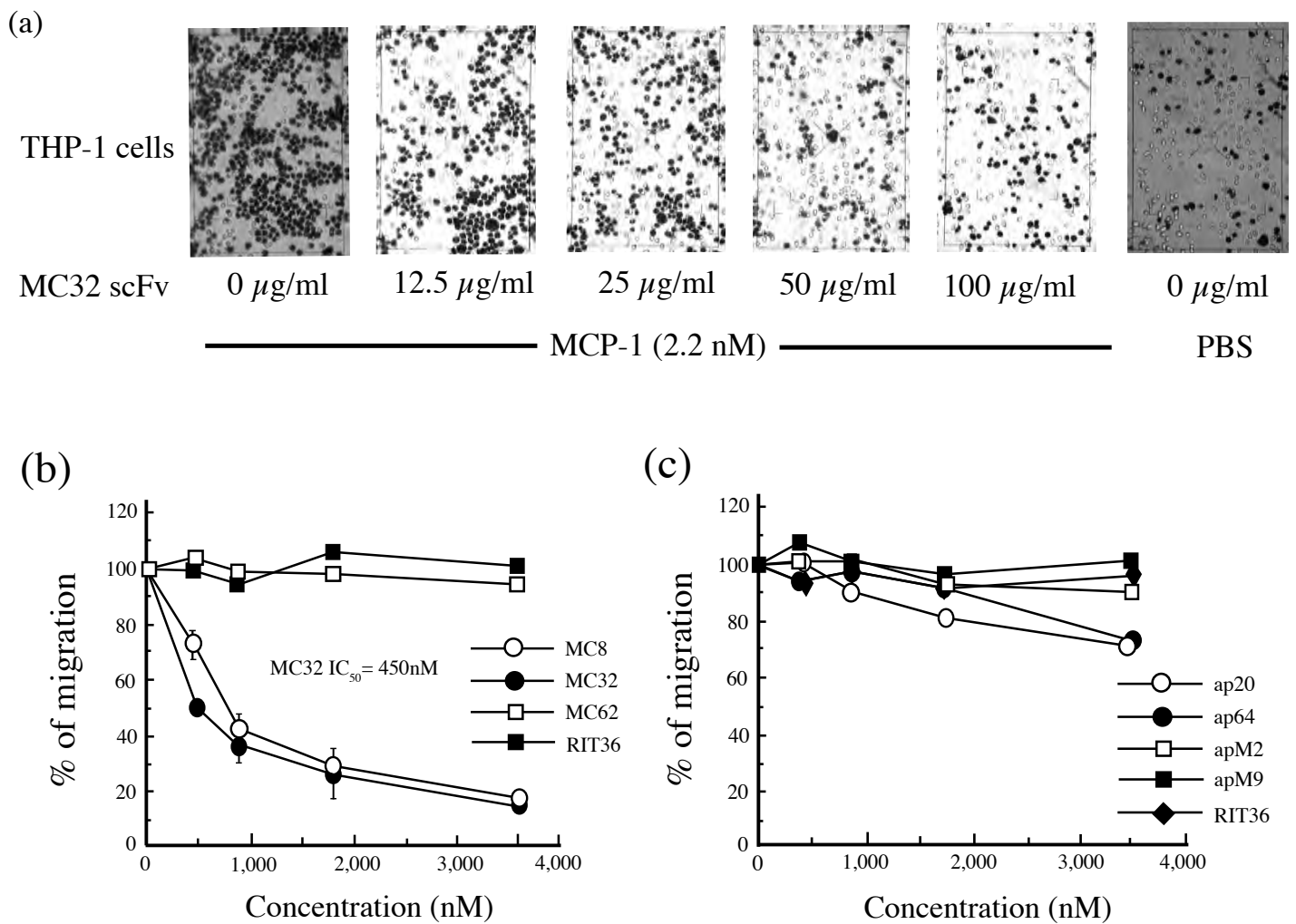


図 3-8. scFv 抗体の細胞遊走阻害活性

精製した scFv を用いて、MCP-1 依存的細胞遊走に及ぼす影響を調べることで遊走阻害実験を行った。

(a) 遊走阻害実験 (MC32) のフィルター写真 MC32 scFv の濃度に依存して遊走する細胞の数が減少している。(黒：染色した細胞、白：フィルターの孔)

(b) 各 scFv クローンの遊走阻害活性 7 クローンの scFv について細胞遊走阻害試験をおこなったところ 2 クローン (MC8, MC32) において濃度依存的な遊走阻害活性がみられた。阻害曲線から MC32 scFv の IC_{50} を求めたところ 450 nM であった。

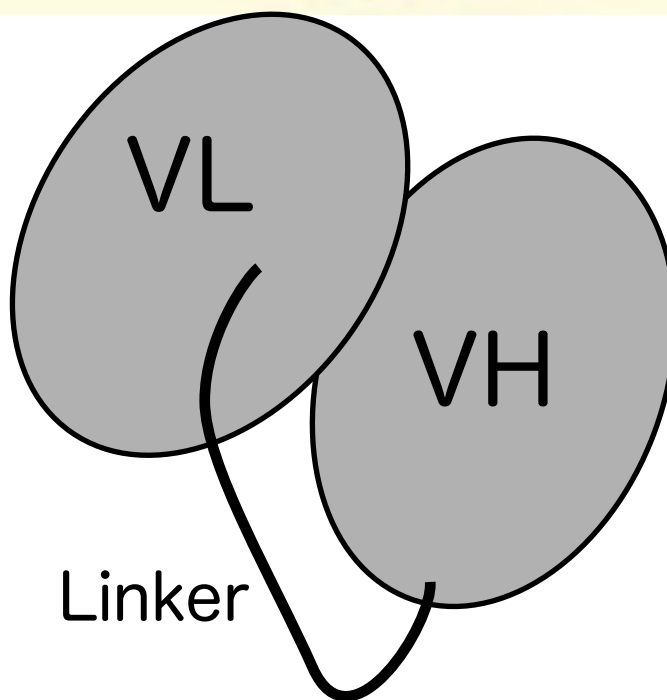
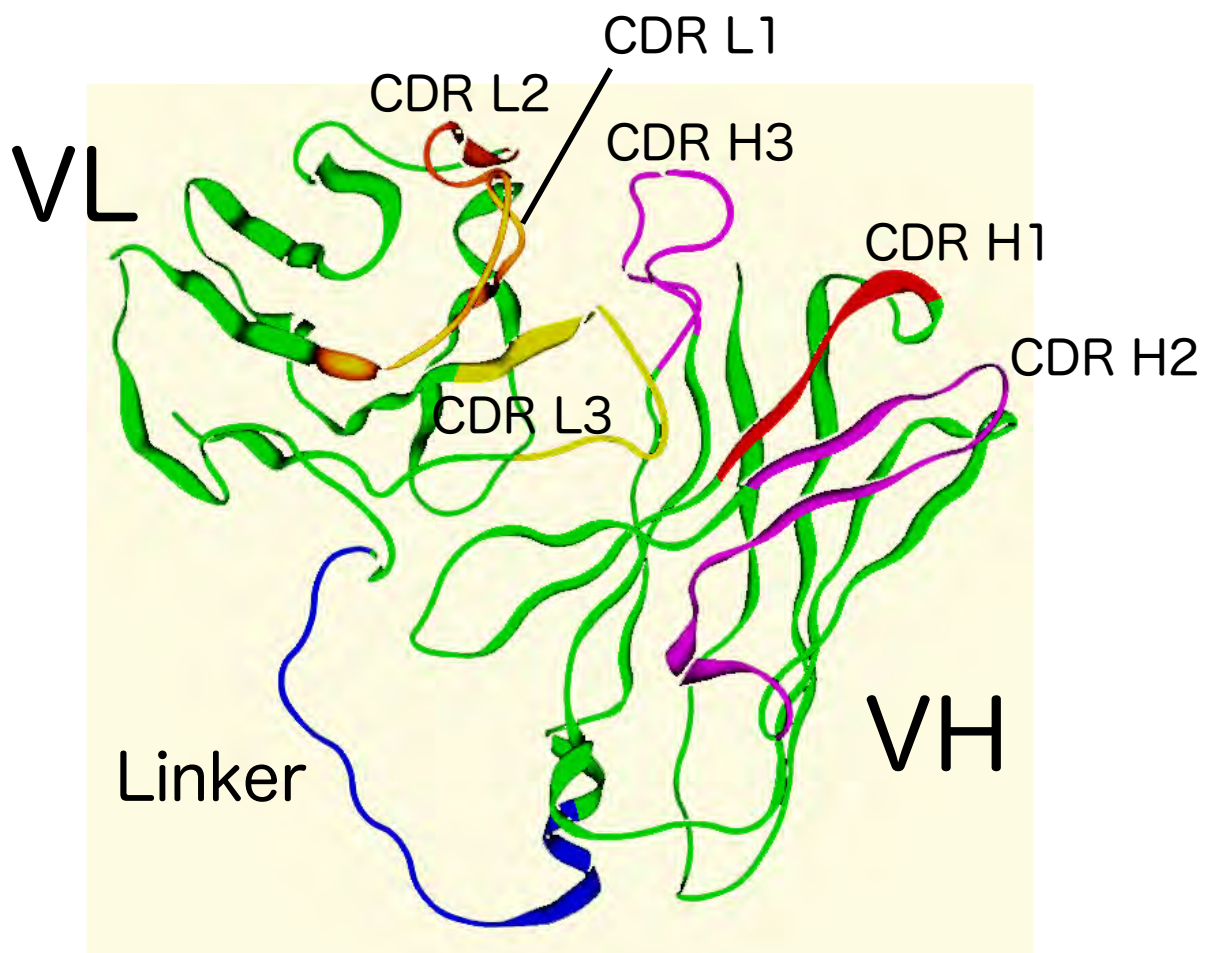


図 3-9. MC32 scFv の立体構造モデル

MC32 scFv のアミノ酸配列をもとに、立体構造モデリングソフト MOE（菱化システム）を用いて PDB データベースからのホモロジーモデリングで MC32 scFv の立体構造モデルを構築した（鋳型に用いた抗体の立体構造 PDB ID: 1F3R, 1LMK, 2GKI, 1NQB）。CDR およびリンカー配列は色分けしてある。下には全体の構造がわかりやすいように模式図を示す。

第4章 MC8 およびMC32 のIgG form の作製および解析

4-1 目的

MC8 およびMC32 scFv 抗体はMCP-1 に特異的に結合し、MCP-1 による細胞の遊走を阻害する抗体であることが明らかとなった。本研究では、MC8 およびMC32 のIgG form (図4-1) を作製し、そのアフィニティ、細胞遊走阻害活性を調べた。

4-2 材料と方法

4-2-1 MC8 およびMC32 のIgG form の調製

pMC8/CANTAB5E またはpMC32/CANTAB5E ファージミドベクターより、VH, VL 特異的なプライマーを用いてPCR を行い、MC8 およびMC32 のVH とVL 遺伝子をそれぞれ増幅した(図4-2)。IgG1 のH鎖の定常領域が組み込まれたPCAG-H ベクターにVH 遺伝子を組み込み、C κ 領域の組み込まれたPCAG-L にVL 遺伝子を組み込み、MC8 およびMC32 のIgG 遺伝子を構築した。得られたH鎖とL鎖のベクターを動物細胞株CHO 細胞にコトランスフェクションし、IgG を発現させた。48 時間培養した培養上清を回収し、プロテインA アフィニティカラムでIgG を精製した。

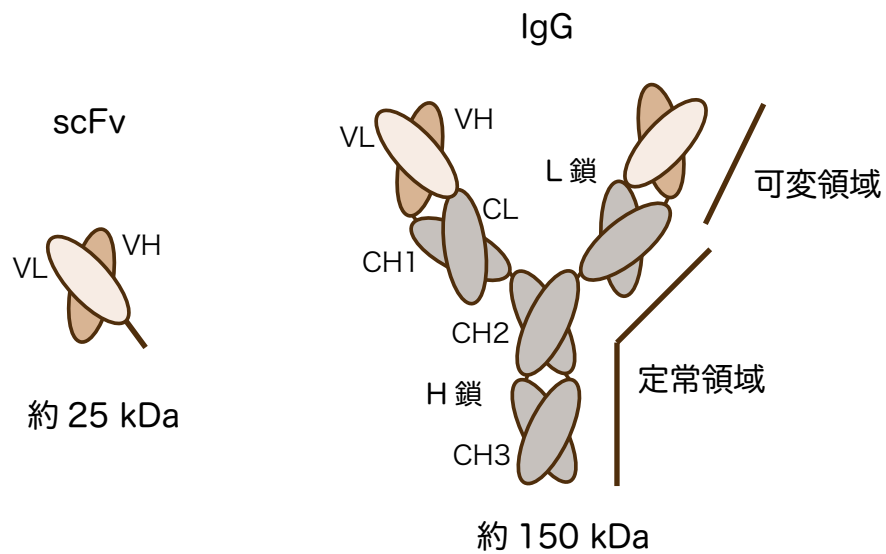


図 4-1. scFv, IgG 抗体の分子構造

scFv 抗体は、抗原との結合に参与する可変領域のみをとった分子である。小型化することにより、ファージ上への提示、大腸菌での発現を容易にしているが、定常領域を持たないため免疫学的エフェクター機能を有しない、構造が不安定、血中半減期が短いなどの欠点がある。そのため、抗体医薬として用いる場合は IgG 完全抗体の形に変換することが必要である。

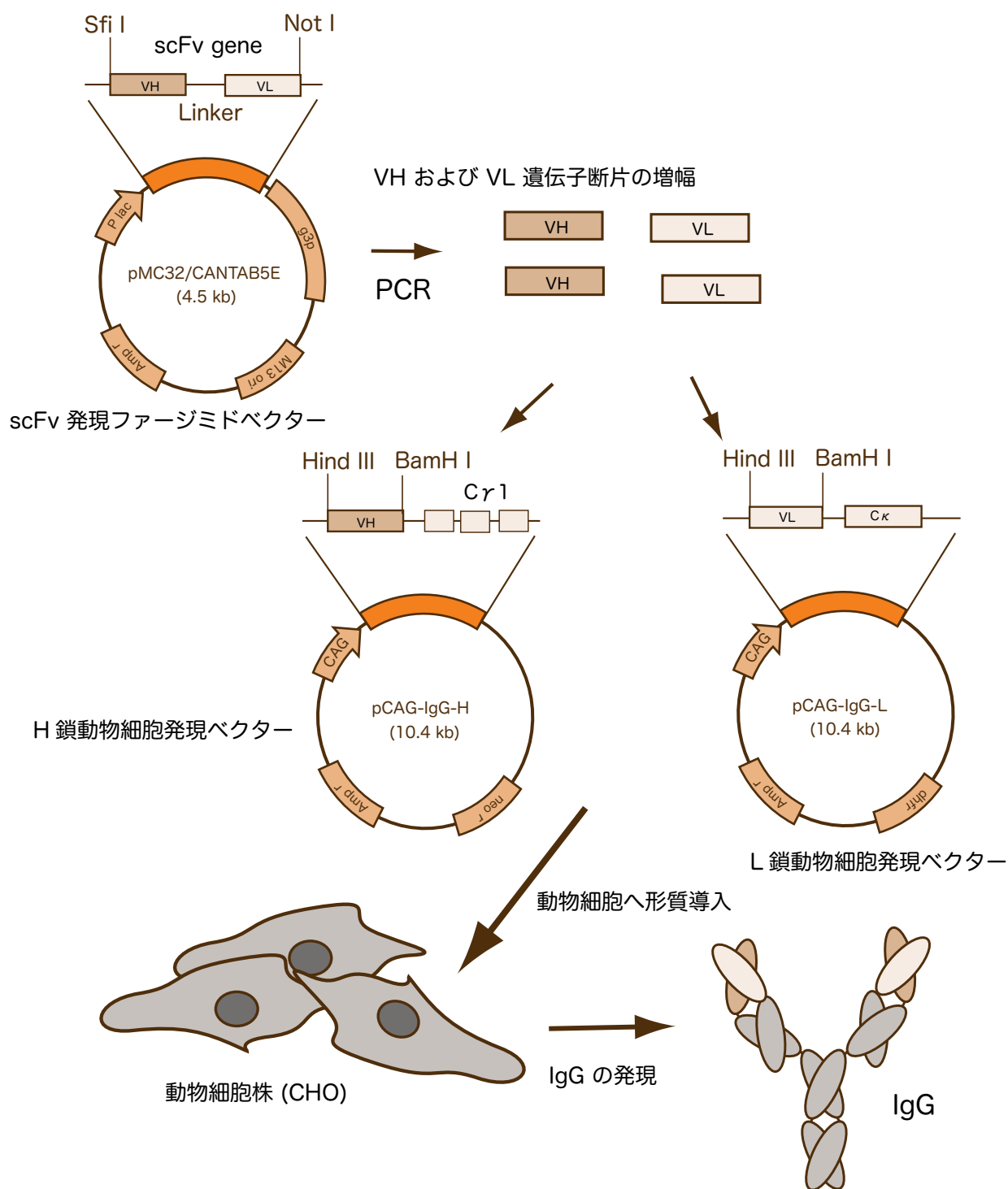


図 4-2. IgG の発現ベクター作製と CHO 細胞による発現

scFv ファージミドベクターより、VH, VL 遺伝子断片を増幅した。VH 遺伝子断片を H 鎖動物細胞発現用ベクターの C γ 遺伝子上流に組み込み、VL 遺伝子断片は L 鎖動物細胞発現用ベクターの C κ 遺伝子上流へ組込んだ。構築した H 鎖および L 鎖動物細胞発現用ベクターを動物細胞株の CHO 細胞へ導入し IgG 抗体を発現させた。IgG は培養上清から回収し精製した。

IgG 抗体は2価であるので、アフィニティ解析の際はBIAcore X100 Evaluation software の Bivalent analyte model を用いて k_{on1} および k_{off1} より解離定数 K_d を算出した。

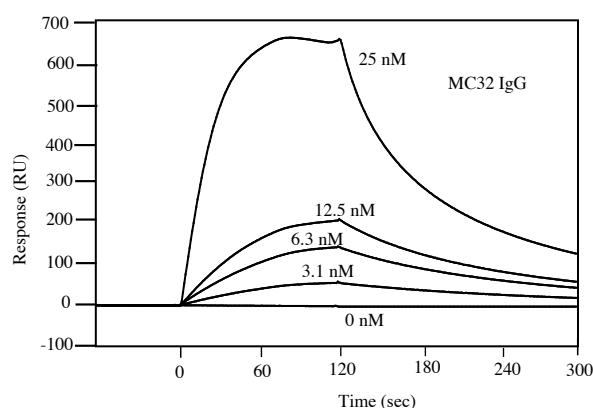
4-3 実験結果

4-3-1 MC8 およびMC32 のIgG form の調製

MC8 およびMC32 のIgG 抗体は、ヒトMCP-1 への結合活性を維持していた。また、細胞の遊走を阻害する活性もみられた。MC32 IgG 型抗体はscFv に比べ、アフィニティの変化はほとんどみられず（図4-3 a, b）、遊走阻害活性はIC50 において2.5 倍の向上がみられた（図3-3 c）。遊走阻害活性の向上は2 価になったことによる効果であると考えられる。

IgG 型抗体では、血中での半減期増加、定常領域による免疫学的エフェクター機能の付加などの利点が考えられる。また、完全なヒトの分子であるので早期に臨床への応用が可能であり、MCP-1 依存型炎症性疾患の治療薬として利用されることが期待される。

(a)



(b)

clone No.	k_{on} ($\text{sec}^{-1}\text{M}^{-1}$)	k_{off} (sec^{-1})	K_d (k_{off}/k_{on}) (M)
MC32 scFv	9.3×10^5	2.0×10^{-2}	2.1×10^{-8}
MC32 IgG	6.5×10^5	1.1×10^{-2}	1.7×10^{-8}

(c)

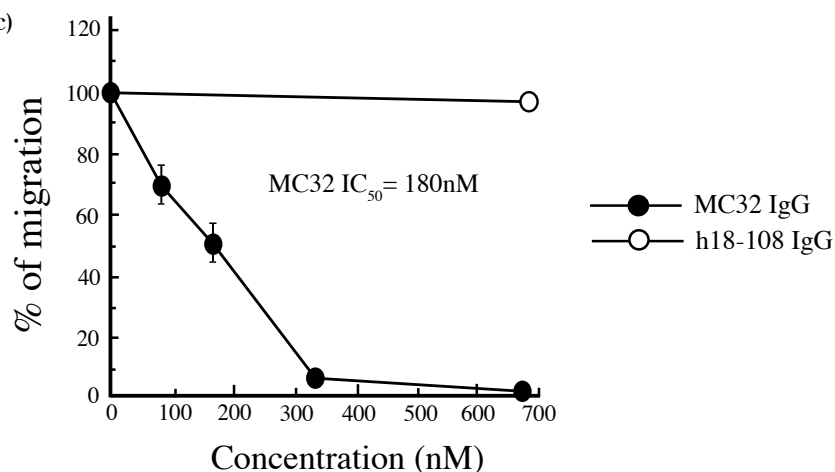


図 4-3. MC32 IgG のアフィニティー解析および遊走阻害活性

(a) MC32 IgG の BIAcore センサーグラム 構築した MC32 IgG 抗体の MCP-1 への親和性 hMCP-1 を固定化したセンサーチップを用いた BIAcore で解析した。濃度依存的なレスポンスがみられ、MC32 は IgG にしても結合活性を保持していた。

(b) MC32 IgG の結合親和性 BIAcore センサーグラムより MC32 IgG の会合速度定数 k_{on} , 解離速度定数 k_{off} , 解離定数 K_d の値を算出した。IgG 抗体は 2 価であるため、Bivalent analyte model を用いた計算をおこない、 k_{on1} , k_{off1} を用いて K_d の値を算出した。IgG の親和性は scFv と比較してほとんど変化がみられなかった。

(c) MC32 IgG の細胞遊走阻害活性 MC32 IgG を用いて細胞遊走阻害試験をおこなったところ、濃度依存的に MCP-1 依存的細胞遊走を阻害した。コントロール IgG (h18-108) では阻害活性はみられなかった。阻害曲線より IC_{50} を求めたところ約 180 nM で、scFv に比べ 2.5 倍の増強がみられた。

第5章 MC32 L chain shuffling library の作製

およびL鎖変換体の単離、解析

5-1 目的

MC32 においてMCP-1 への特異的結合活性および細胞の遊走阻害活性がみられた。また、7クローンの遺伝子配列解析より、VH1 のgermline が共通であり、MCP-1 への結合活性はおもにVH の寄与であることが考えられた。これらのことより、MC32 の親和性向上を試みるためMC32 のVL をさまざまなVL レパートリーに置き換えたMC32 VL shuffling Library を作製した。scFv 抗体分子の半分であるVL を置き換えるこの方法は、分子の性状が大きく変わる可能性があり、また置き換えられたVL も完全にヒト由来なので免疫原性の問題がないという利点がある。

MC32 VL shuffling ライブラリーより、MCP-1 を用いてパンニングを行いMCP-1 特異的なMC32 L鎖変異体を単離する。単離した変異体クローンについて、アフィニティ、遊走阻害活性、および遺伝子配列をしらべその関連性を明らかにする。

5-2 実験方法

5-2-1 MC32 L chain shuffling library の作製

MC32 VH 遺伝子はpMC32/CANTAB5E ベクターより、MC32 VH 特異的プライマーを用いてPCR により増幅した（図5-1）。VL 遺伝子のレパートリーは、20名の健常人の末梢血単核球由来のcDNA よりVL 特異的プライマーを用いてPCR で増幅した。その後、MC32 VH とVL のレパートリーを (GGGGS)₃ をコードするリンカーDNA により連結し、Sfi I およびNot I の制限酵素サイトを用いてpCANTAB5E ファージミドベクターに組込んだ。調製したライブラリーベクターを形質転換した大腸菌にヘルパーファージ(M13KO7)を重感染させ、MC32 VL shuffling ファージライブラリーを調製した。

5-2-2 MC32 VL 変異体の単離（パンニング）

MC32 VL shuffling ライブラリーから、ヒトMCP-1 特異的なMC32 VL 変異体を単離するため、ヒトMCP-1 に対するパンニングを行った。操作は、35 mm プラスチックディッシュにヒトMCP-1 を1 μ g/ml 0.1M NaHCO₃ pH 8.6 を1 ml 加え、4℃ 12 時間静置してディッシュ上にMCP-1 をコートした。その後、5 ml の0.5 % ゼラチン/PBS で90 min ブロックした。このディッシュにMC32 VL shuffling ライブラリーを5 $\times 10^{12}$ TU 加え、室温で60 分反応させた。その後、結合しなかったファージを除去するため、PBST (0.1 % Tween-20/PBS) で10 回洗浄した。結合したファージを回収するため1 ml の0.1 M Glycine-HCl (pH 2.2)

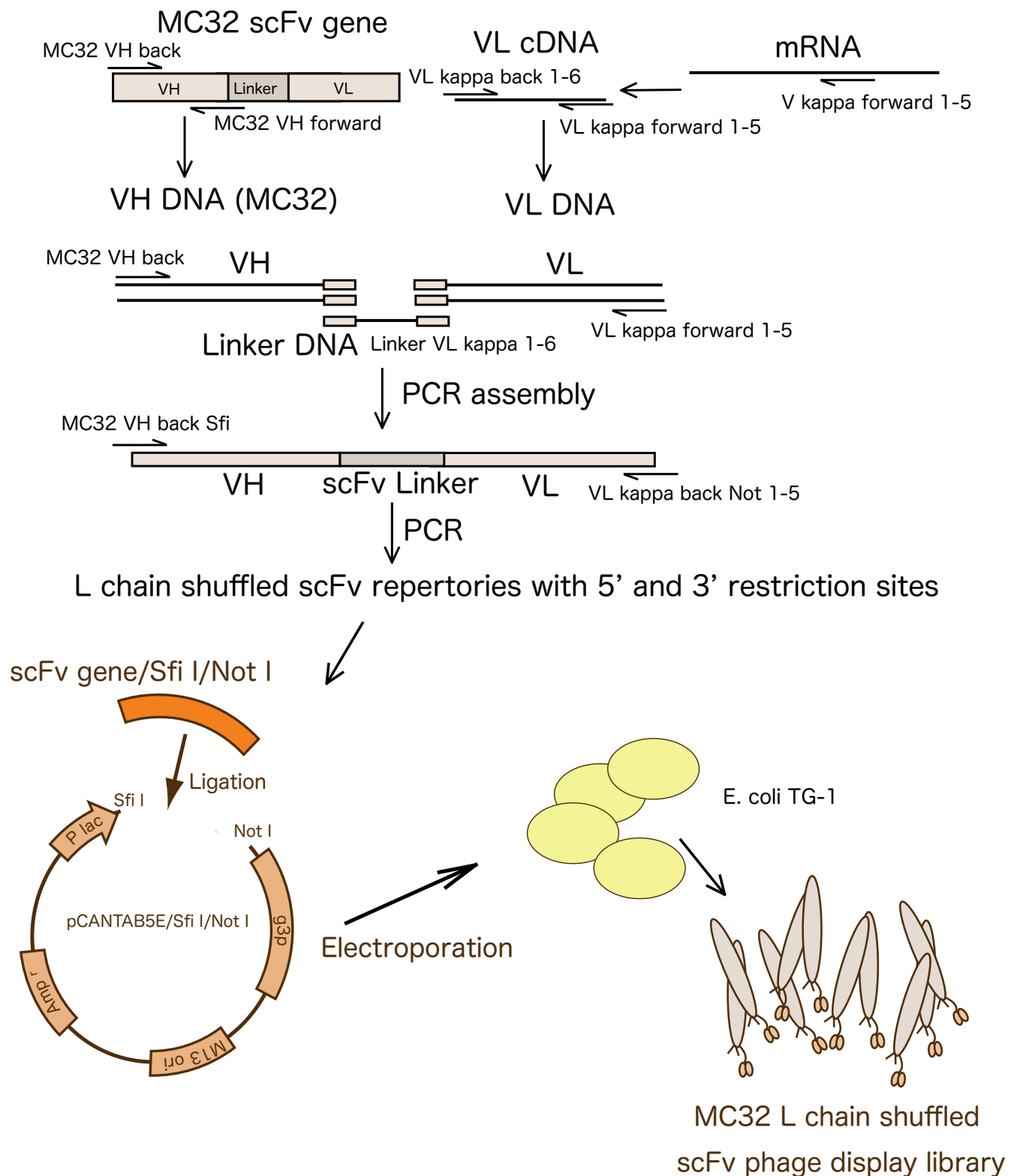


図 5-1. MC32 VL shuffling library の作製

MC32 scFv 遺伝子より VH 領域を PCR で増幅した。VL レポートリーは、20名の健康人由来の PBMC cDNA より V κ 特異的プライマーを用いた PCR で増幅した。VH 遺伝子断片、VL レポートリー遺伝子断片、ペプチドリンカーをコードする DNA を PCR により連結させ、VL shuffling scFv 遺伝子を構築した。

VL shuffling scFv 遺伝子は制限酵素サイト Sfi I および Not I をもちいてファージミドベクター pCANTAB5E へ組み込み、大腸菌 TG-1 株に形質転換させヘルパーファージの重感染により MC32 VL shuffling scFv を提示したファージライブラリーを作製した。

を加え5 分後にファージを含む溶液を回収し、ただちに100 μ l の1M Tris-HCl (pH 9.1) を加え中和した。回収したファージ溶液を対数増殖期の大腸菌TG-1 株の溶液に加え、37 °Cで30 分静置して感染させた。その後、培地を2TYAG に換えて16 時間培養してグリセロールストックした。また、回収したファージ溶液の一部を段階希釈したのち大腸菌TG-1 に感染後、2TYAG プレートに播くことで回収されたファージのタイターを計測した。

ファージの感染したTG-1 を対数増殖期まで37°Cで培養し、ヘルパーファージ(M13KO7) を重感染させ、培地を2TYAK に置き換え30 °Cで12 時間培養し、scFv を提示したファージを産生させた。培養液から遠心分離で大腸菌を取り除いた上清に0.1 volume のPEG/NaCl 溶液を加え4 °C で4 時間冷やしたのち、遠心分離でファージを回収した。回収したファージはクローン化され、各クロンのファージ溶液についてMCP-1 特異的結合活性をELISA 法で解析した。

5-2-3 ELISA (phage)

ELISA プレートにヒトMCP-1 (80 ng/40 μ l/well)、BSA、ゼラチン、スキムミルク、HSA およびヒトMIP-1 α をコートした。ブロッキング溶液をウェルに加え2 時間ブロッキングした後、ウェルをPBST で3 回洗浄した。その後、各ファージクローンを加え室温で1 時間反応させた。その後、PBST で3 回洗浄後、ビオチン化された抗g8p 抗体を加え1 時間反応させた。PBST で3 回洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識されたストレプトアビジンを加え、1 時

間反応させた。PBST で3回洗浄後、基質としてp-nitrophenylphosphate 溶液を加え405 nm における吸光度を測定した。

5-2-4 表面プラズモン解析

MC32 VL 変異体scFv のアフィニティを調べるため、BIAcore X-100 を用いたSPR 解析を行った。ヒトMCP-1 をPBS 中で、EDC-NHS により活性化されたセンサーチップCM5 に10 μ l/min の流速で流し込み、アミンカップリングによってセンサーチップ上にMCP-1 を固定化した。その後、センサーチップ上の未反応の官能基を1M エタノールアミン 溶液で不活性化した。抗体のアフィニティ解析はすべて25 $^{\circ}$ C PBS 中、流速30 μ l/min で行い、各サイクルの後にチップは0.1M Glycine -HCl (pH 2.1) で30 sec で再生させた。ペリプラズム画分を用いてクルードな状態での解離速度定数を求めた。精製したscFv については各濃度で解析をおこなった。得られた各抗体濃度のセンサーグラムをBIAevaluation X で解析し、会合速度定数(k_a)、解離速度定数(k_d) を算出した。解離定数(KD) は k_d/k_a によって得られた。

5-2-5 MC32 VL 変異体の遺伝子配列解析

MC32 VL 変異体のDNA 配列は、下流からpCANTAB5-S6 プライマー (5'-gtaaatagaattttctgtatgagg-3') をもちいてDye terminator 法によって決定した。伸長反応の条件は、96 $^{\circ}$ C 10 秒、50 $^{\circ}$ C 5 秒、60 $^{\circ}$ C 4 分のサイクルを25 回行った。20 μ l の反応産物をエタノール沈殿によりペレットにし、脱ホ

ルムアミドに溶解後、ABI PRISM 3100 Genetic analyzer により解析をおこなった。さらに抗体の塩基配列をIMGT/V-QUEST データベースにより解析し、抗体の超可変領域 (CDR-1, 2, 3)、フレームワーク (FR-1-FR4),および抗体遺伝子のgermline が決定された。

5-2-6 MC32 VL 変異体の遊走阻害活性

遊走阻害実験は、MCP-1 により遊走するヒトTHP-1 細胞株を用いておこなった。MCP-1 (最終濃度 2.2 nM) をscFv 抗体と37 °C30 分反応させ、48 ウェルマイクロチャンパーの下ウェルに加えた。下ウェルと上ウェルを8 μ m の穴のあるフィルターで仕切り、上ウェルにTHP-1 細胞(3.75×10^5 cells/well)を加えた。5 % CO₂ インキュベーターで37 °C2 時間置いた後、フィルターを回収し、フィルター上面の透過していない細胞を拭き取った。フィルターをパラホルムアルデヒド溶液で固定し、透過した細胞をディフクイック染色液で染色した。顕微鏡下で遊走した細胞を計測した。

5-3 実験結果

5-3-1 MC32 L chain shuffling library の作製

MC32 VL shuffling ライブラリーを調製したところ、以下のようなライブラリーができた。各VL ファミリーにおける多様性(independent clone)はそれぞれ

れ、 $V_{\kappa 1}:6.4 \times 10^6$, $V_{\kappa 2}:9.8 \times 10^6$, $V_{\kappa 3}:4.8 \times 10^6$, $V_{\kappa 4}:7.2 \times 10^6$, $V_{\kappa 5}:8.7 \times 10^6$, $V_{\kappa 6}:6.4 \times 10^6$, であった。またファージのタイター(t.u./ml) はそれぞれ、 $V_{\kappa 1}:1.2 \times 10^{13}$, $V_{\kappa 2}:1.7 \times 10^{13}$, $V_{\kappa 3}:8.6 \times 10^{13}$, $V_{\kappa 4}:7.7 \times 10^{13}$, $V_{\kappa 5}:9.8 \times 10^{13}$, $V_{\kappa 6}:1.0 \times 10^{13}$, であった。

5-3-2 MC32 VL 変異体ファージの単離 (パンニング)

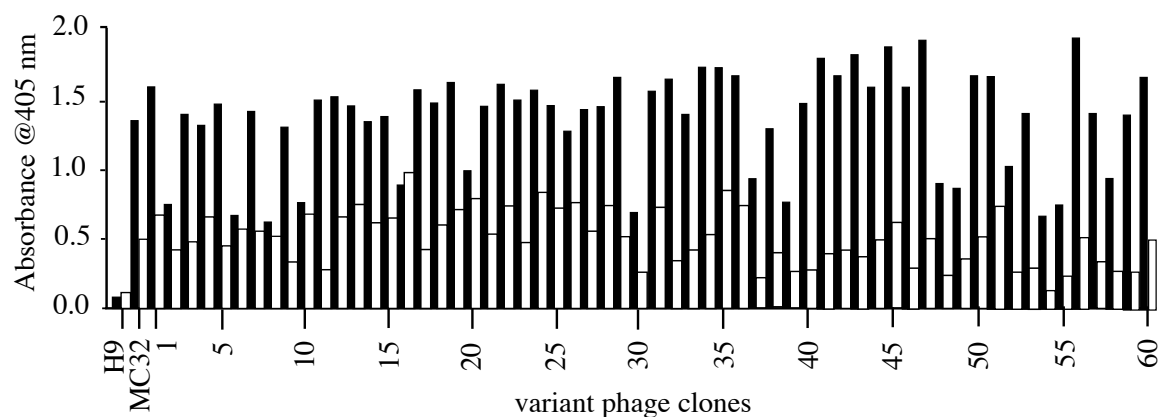
MC32 VL shuffling ライブラリーから、1 ラウンドのパンニングをおこないヒトMCP-1 に結合活性を有するMC32 VL 変異体ファージの単離を試みた。

60クローン調製し、ELISA によりヒトMCP-1 への結合活性を調べたところ、60クローンすべてにおいてMCP-1 特異的結合がみられた (図5-2 a)。このことは、MCP-1 への結合におもにVH が寄与しているという考え方と一致している。

5-3-3 表面プラズモン解析

MC32 VL 変異体のうちペリプラズム画分に scFv を発現していたクローン

(a)



(b)

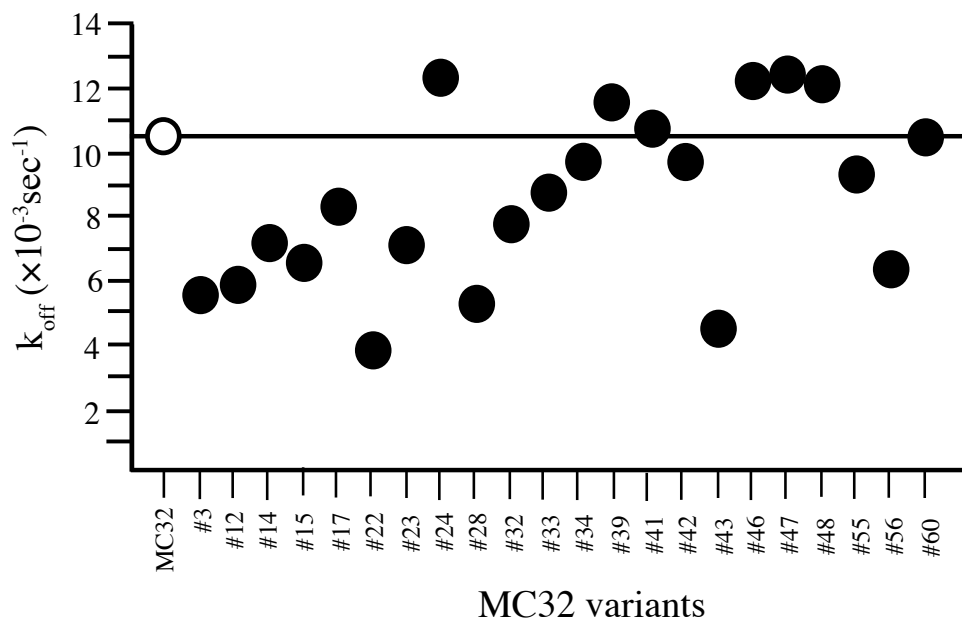


図 5-2. MC32 VL 変異体の MCP-1 結合活性および親和性解析

(a) MC32 VL 変異体の MCP-1 特異的結合活性 MC32 VL shuffling scFv を提示したファージライブラリーを用いて、hMCP-1 に対して 1 ラウンドのパニングを行い 60 クローンについて ELISA 法で MCP-1 への結合活性を調べた。H9 はコントロール scFv クローン。すべてのクローンで hMCP-1 特異的結合活性を示し、このことは MCP-1 への結合には VH 領域がおおきく寄与していることを強く示唆する。

(b) MC32 VL 変異体の親和性解析 MC32 VL 変異体のうちペリプラズム画分に scFv を発現していたクローンについて、クルードなペリプラズム画分を用いた BIAcore 解析により解離速度定数 k_{off} を解析した。約 75% のクローンにおいて解離速度定数が遅くなっており親和性が增強していることが示唆される。

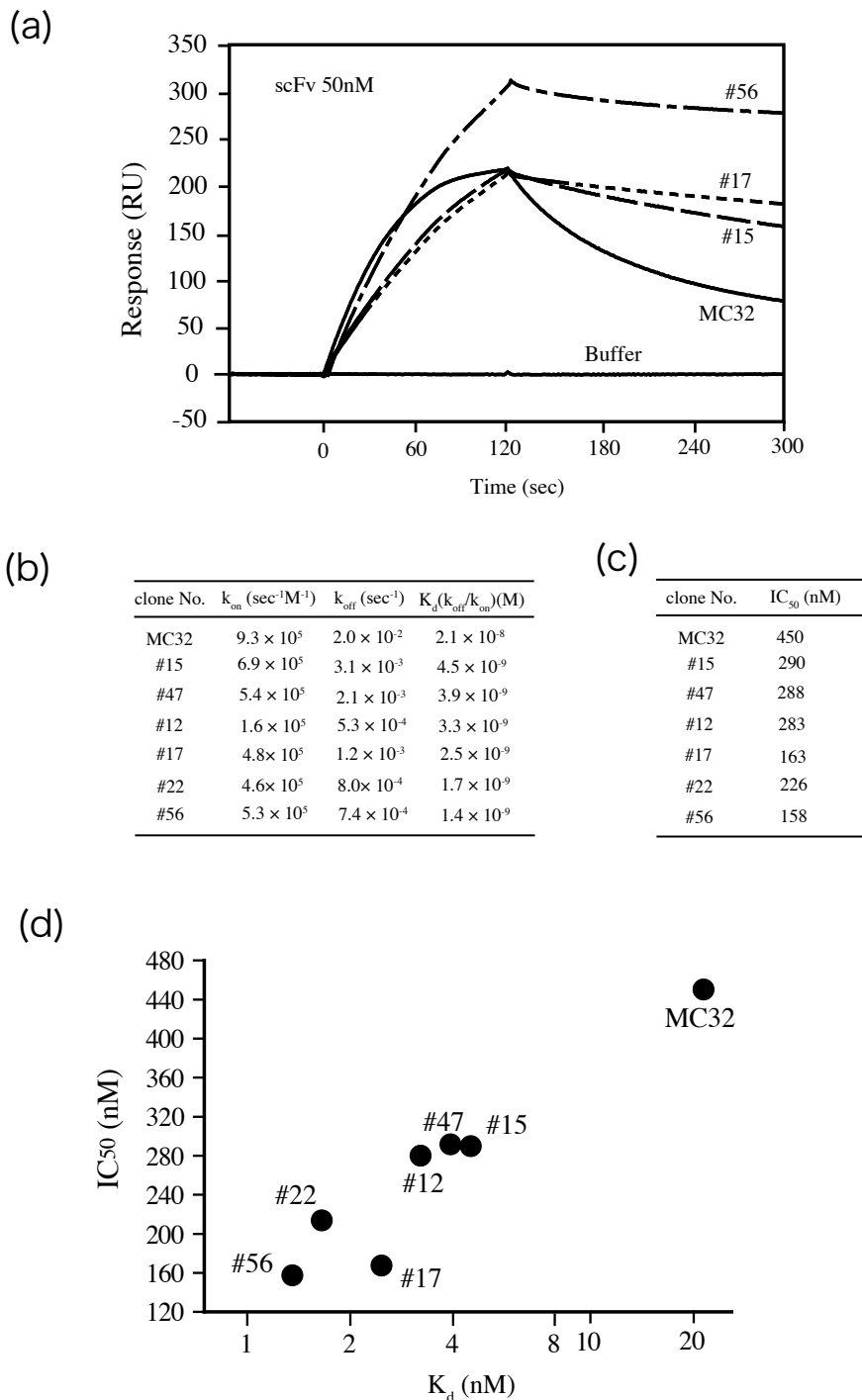


図 5-3. MC32 VL 変異体のアフィニティと阻害活性

(a) MC32 VL 変異体の BIACORE センサーグラム 精製した MC32 VL 変異体 scFv を用いて BIACORE により hMCP へのアフィニティを解析した。アフィニティの向上がみられ、とくに解離速度が遅くなっているクローンが顕著である。

(b) MC32 VL 変異体の結合親和性 BIACORE センサーグラムより会合速度定数 (k_{on})、解離速度定数 (k_{off})、解離定数 (K_d) を求めた。結合親和性の強いクローンでは MC32 に比べて約 15 倍もの親和性増強がみられた。親和性増強において、とくに解離速度定数の変化の寄与が大きかった。

(c) MC32 VL 変異体の細胞遊走阻害活性 MC32 VL 変異体 scFv を用いて MCP-1 依存的な細胞遊走の阻害実験をおこなった。阻害活性から IC_{50} を算出した。ほとんどのクローンにおいて遊走阻害活性の向上がみられた。

(d) MC32 VL 変異体のアフィニティと阻害活性の相関 MC32 VL 変異体の解離定数と IC_{50} をプロットしてアフィニティと阻害活性との相関を調べた。アフィニティと阻害活性はほぼ相関しており、アフィニティの強いクローンは阻害活性も増強されていた。

について、クルードなペリプラズム画分を用いた BIACORE 解析により解離速度定数 k_{off} を解析した（図 5-2 b）。約 75% のクローンにおいて解離速度定数が遅くなっており親和性が增強していることが示唆される。

精製した scFv を用いて表面プラズモン解析を行ったところ、いくつかの変異体において親和性の向上がみられた（図 5-3 a, b）。親和性向上の大きなクローンでは約 15 倍の向上がみられた。この親和性の向上には会合速度定数 (k_a) よりも解離速度定数 (k_d) の寄与が大きかった。よって、VL が置き換わることで抗体が MCP-1 から離れにくくなっていると考えられる。

5-3-4 MC32 VL 変異体の遺伝子配列解析

親和性の向上のみられたクローンについて VL のアミノ酸配列を比較したところ、いくつかの置換がみられ、特に CDR3 部位の置換が親和性向上に寄与していると考えられた（図 5-4）。

5-3-5 MC32 VL 変異体の遊走阻害活性

MC32 VL 変異体を用いて、細胞の遊走阻害実験をおこなったところ親和性の向上にともなって細胞の遊走阻害活性も強くなっていた（図 5-3 c,d）。

	FR1	CDR L1	FR2	CDR L2
MC32	DIQLTQSPSTLSASVGDRATISC	RSSQSIN-----TYLH	WYQKPGEAPKLLIY	AASTLQS
#15	DVVMTQSPSTLSASVGDRATISC	RSSQSIN-----TYLH	WYQKPGEAPKLLIY	AASSLQS
#12	DIQMTQSPSTLSASVGDRATISC	RSSQSIN-----TYLH	WYQKPGEAPNLLIY	SASSLVN
#47	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSIITC	RASQSIN-----TYLH	WYQKPGEAPKLLIY	AASTLQS
#22	DVMMTQSPSSLSASVGDRVITITC	RASQGIN-----TYLH	WYQKPGEAPKLLIY	AASTLQS
#56	DIQMTQSPSPLSASVGDRVITITC	RASQGIN-----TYLH	WYQKPGEAPKLLIY	AASTLQS
#17	DVMMTQSPSLSLSVTPGQPASISC	KSSSESLHLSNGKTYFY	WYLQKPGQSPQLLIS	EVSNRFS

	FR3	CDR L3	FR4
MC32	GVPSRFGSGSGTDFTLTITTLQPEDFATYYC	QQSF TTPLT	FGGGTKVEIKR
#15	GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQSYSTP-S	FGGGTKVEIKR
#12	GVPSRFGSGSGTDFTLTINGLQPEDFATYYC	QQAYKMPLT	FGGGTKLEIKR
#47	GVPSRFGSGSGTDFTLTITTLQPEDFATYYC	QQSF TTPFH	FRPCNQSGYQTCV
#22	GVPSRFGSGSGTDFTLTITTLQPEDFATYYC	QQANSFPPT	FGGGTKVEIKR
#56	GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQSFNMPLT	FGGGTKVDIKR
#17	GVPLDRFGSGSGTDFTLRIISRVEAEDVGYYC	MQSLQLPLT	FGGGTKLEIKR

図 5-4. MC32 VL 変異体のアミノ酸配列

MC32 VL 変異体について VL 遺伝子の塩基配列を解読した。塩基配列よりアミノ酸配列を決定した。各クローンでアミノ酸配列の置換がみられた。CDR L3 での置換が顕著であるため、この領域が親和性向上に寄与していることが示唆される。

第6章 総括および展望

本研究では、ヒトscFv 抗体ファージライブラリーから、ヒトMCP-1 に特異的に結合する抗体を7クローン単離した。7クローンのアミノ酸配列を比較したところ、VH において類似性を示し、とくにVH1 germ line geneはすべてのクローンにおいて同一であった。このことから、MCP-1 への結合には主にVH 領域が寄与することが考えられる。

そのうち2クローン(MC8, MC32) はMCP-1 依存的細胞遊走を濃度依存的に抑制した。この2クローンは他のクローンに比べCDR1 の配列が異なるため、この領域が阻害活性に寄与していることが考えられる。

MC32 のIgG 型抗体を作製したところ、MCP-1 特異的結合活性を維持しておりアフィニティはほとんど変化しなかったものの、阻害活性で3.3 倍の増強がみられた。この阻害活性の向上は、2価になったことによる効果であると考えられる。IgG 型にすることで、構造の安定化、免疫学的エフェクター機能の付与、血中半減期の増加などの利点が考えられる。また、完全なヒトIgG 抗体であるので早期の治療への応用が可能である。

MC32 scFv のMCP-1 特異的結合活性は主にVH 領域が寄与していると考えられるため、親和性向上の手段としてVL shuffling 法を用いた。この方法では他の変異を導入する方法と違いVL を他のヒトVL レパートリーに置き換えるだけなので免疫原性の問題が回避できる。ヒトVL レパートリーをMC32 のVH と

組み合わせたMC32 VL shuffling library を作製し、1 ラウンドのパンニングを行ったところ解析したすべてのクローンにおいてMCP-1 特異的結合活性がみられた。このことは、MCP-1 への結合にVH 領域が寄与していることを強く裏付けている。これらのクローンについて解析を行ったところ、いくつかのクローンで親和性の増強がみられ#22, #56 などでは15 倍も増強されていた。親和性の増強において k_{on} より k_{off} の変化が顕著であった。親和性の増強にともない、細胞の遊走阻害活性も増強されていた。これらのVL 変異体についてVL のアミノ酸配列を解析、比較したところ親和性の増強には主にCDR3 領域の置換が影響していた。このように親和性向上されたクローンを得ることができたため、抗体の結合活性がVH またはVL のどちらかに大きく依存している場合、親和性向上の手段としてchain shuffling が有効であると考えられる。

#56 のような親和性増強されたクローンが単離できたので、そのIgG 型への変換、VH 領域への抗体エンジニアリングなどがこれからの課題である。

引用文献

- 1, Yoshimura, T., Robinson, E.A., Tanaka, S., Appella, E., Kuratsu, J., Leonard, E.J. (1989) Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants. *J. Exp. Med.* **169**, 1449-1459.
- 2, Matsushima, K., Larsen, C.G., DuBois, G.C., Oppenheim, J.J. (1989) Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *J. Exp. Med.* **169**, 1485-1490.
- 3, Gerard, G., and Rollins, B.J. (2001) Chemokines and disease. *Nat. Immunol.* **2**, 108-115
- 4, Rollins, B.J. (1997) Chemokines. *Blood.* **90**, 909-928
- 5, Boring, L., Gosling, J., Cleary, M., and Charo, I.F. (1998) Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature.* **394**, 894-897
- 6, Nelken, N.A., Coughlin, S.R., Gordon, D., and Wilcox, J.N. (1991) Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J. Clin. Invest.* **88**, 1121-1127
- 7, Peng, L., Shu, S., Krauss, J.C. (1997) Monocyte chemoattractant protein inhibits the generation of tumor-reactive T cells. *Cancer. Res.* **57**, 4849-4854
- 8, Takeya, M., Yoshimura, T., Leonard, E.J., and Takahashi, K. (1993) Detection of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic lesions by an anti-monocyte chemoattractant-1 monoclonal antibody. *Hum Pathol.* **24**, 534-539
- 9, Yla-Herttuala, S., Lipton, B.A., Rosenfeld, M.E., Sarkioja, T., Yoshimura, T., Leonard, E.J., Witztum, J.L., and Steinberg, D. (1991) Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 5252-5256
- 10, Harigai, M., Hara, M., Yoshimura, T., Leonard, E.J., Inoue, K., and Kashiwazaki, S. (1993) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in inflammatory joint disease and its involvement in the cytokine network of rheumatoid synovium. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **69**, 83-91
- 11, Flory, C.M., Jones, M.L., Warren, J.S. (1993) Pulmonary granuloma formation in the rat is partially dependent on monocyte chemoattractant protein 1. *Lab. Invest.* **69**, 396-404

- 12、 Lukacs, N.W., Strieter, R.M., Warmington, K., Lincoln, P., Chensue, S.W., and Kunkel, S.L. (1997) Differential recruitment of leukocyte populations and alteration of airway hyperreactivity by C-C family chemokines in allergic airway inflammation. *J. Immunol.* **158**, 4398-4404
- 13、 Zisman, D.A., Kunkel, S.L., Strieter, R.M., Tsai, W.C., Bucknell, K., Wilkowski, J., and Standiford, T.J. (1997) MCP-1 protects mice in lethal endotoxemia. *J. Clin. Invest.* **99**, 2832-2836
- 14、 Rand, M.L., Warren, J.S., Mansour, M.K., Newman, W., and Ringler, D.J. (1996) Inhibition of T cell recruitment and cutaneous delayed-type hypersensitivity-induced inflammation with antibodies to monocyte chemoattractant protein-1. *Am. J. Pathol.* **148**, 855-864
- 15、 Gong, J.H., Ratkay, L.G., Waterfield, J.D., and Lewis, I.C. (1997) An antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) inhibits arthritis in the MRL-lpr mouse model. *J. Exp. Med.* **186**, 131-137
- 16、 Fukumoto, T., Torigoe, N., Kawabata S., Murakami, M., Ueda, T., Nishi, T., Ito, Y., and Sugimura, K. (1998) Peptide mimics of CTLA4-binding domain stimulate T-cell proliferation. *Nat Biotechnol.* **16**, 267-270.
- 17、 Fukumoto, T., Torigoe, N., Ito, Y., Kajiwar, Y., and Sugimura, K. (1998) T cell proliferation-augmenting activities of the gene 3 protein derived from a phage library clone with CD80-binding activity. *J. Immunol.* **161**, 6622-6628
- 18、 Kaji, M., Ikari, M., Hashiguchi, S., Ito, Y., Matsumoto, R., Yoshimura, T., Kuratsu, J., and Sugimura, K. (2001) Peptide mimics of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) with an antagonistic activity. *J. Biochem.* **129**, 577-583.
- 19、 Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Bonnert, T.P., McCafferty, J., Griffiths, A.D., and Winter, G. (1991) By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.* **222**, 581-597
- 20、 Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellenhofer, G., Hoess, A., Wolle, J., Pluckthun, A., and Virnekas, B. (2000) Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J. Mol. Biol.* **296**, 57-86
- 21、 Griffiths, A.D., Malmqvist, M., Marks, J.D., Bye, J.M., Embleton, M.J., McCafferty, J., Baier, M., Holliger, K.P., Gorick, B.D., Hughes-Jones, N.C., Hoogenboom, H.R., and Winter, G. (1993) Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *EMBO. J.* **12**, 725-734

- 22、 Hashiguchi, S., Nakashima, T., Nitani, A., Yoshihara, T., Yoshinaga, K., Ito, Y., Maeda, Y., and Sugimura, K. (2003) Human FcεR I α-specific human single-chain Fv (scFv) antibody with antagonistic activity to IgE / FcεR I α-binding. *J. Biochem.* **133**, 43-49
- 23、 Hamasaki, T., Hashiguchi, S., Ito, Y., Kato, Z., Nakanishi, K., Nakashima, T., and Sugimura, K. (2005) Human anti-Human IL-18 Antibody Recognizing the IL-18-Binding Site 3 with IL-18 Signaling Blocking Activity. *J. Biochem.* **13**, 433-442
- 24、 Gejima, R., Tanaka, K., Nakashima, T., Hashiguchi, S., Ito, Y., Yoshizaki, K., and Sugimura, K. (2002) Human single chain Fv (scFv) antibody specific to human IL-6 with the inhibitory activity on IL-6-signaling. *Hum. Antibodies.* **11**, 121-129
- 25、 Tomlinson, I.M., Williams, S.C., Ignatovich, Corbett, S.J., and Winter, G. (1996) VBASE sequence directory, Medical Research Council Center for Protein Engineering, Cambridge
- 26、 Kabat, E.A. and Wu, T.T. (1991) Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *J. Immunol.* **147**, 1709-1719
- 27、 Carr, M.W., Roth, S.J., Luther, E., Rose, S.S., and Springer, T.A. (1994) Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 3652-3656.
- 28、 Allavena, P., Bianchi, G., Zhou, D. (1994) Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2, -3. *Eur. J. Immunol.* **24**, 3233-3236.
- 29、 Lutgens, E., Faber, B., Schapira, K., Evelo, C. T. A., Haaften, R. V., Heeneman, S., Cleutjens, K. B. J. M., Bijmens, A. P., Beckers, L., Daemen, M. J. A. P. *et al.* (2005) Gene profiling in atherosclerosis reveals a key role for small inducible cytokines. *Circulation.* **111**, 3443-3452.
- 30、 Reid, C., Rushe, M., Jarpe, M., Vlijmen, H. V., Dolinski, B., Qian, F., Cachero, T. G., Cuervo, H., Yanachkova, M., Broriack-Sjodin, P. A. *et al.* (2006) Structure activity relationship of monocyte chemoattractant proteins in complex with a blocking antibody. *Protein. Eng. Des. Sel.* **19**, 317-324.
- 31、 Sorensen, T. L., Ransohoff, R. M., Strieter, R. M., Sellebjerg, F. (2004) Chemokine CCL2 and chemokine receptor CCR2 in early active multiple sclerosis. *Eur. J. Neurol.* **11**, 445-449.

- 32、 Kusano, K. F., Nakamura, K., Kusano, H., Nishi, N., Banda, K., Ikeda, T., Hashimoto, K., Yamamoto, M., Fujio, H., Ohe, T. *et al.* (2004) Significance of the level of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerosis. *Circ. J.* **68**, 671-676.
- 33、 Hayashida, K., Nanki, T., Girschick, H., Yavuz, S., Ochi, T., Lipsky, P. E. (2001) Synovial stromal cells from rheumatoid arthritis patients attract monocyte by producing MCP-1 and IL-8. *Arthritis. Res.* **3**, 118-126.

謝辞

本研究は、鹿児島大学大学院、理工学研究科物質生産工学専攻、分子生物工学講座（杉村研究室）においておこなわれ、私が本研究室で約3年をかけてまとめた研究成果である。

杉村研究室ではじめて分子生物学の研究の世界に入り、サイエンスの世界の奥深さ、おもしろさ、厳しさを実感いたしました。日々、実験をおこなったり、論文を読んだり、研究室のメンバーでディスカッションすることで、科学的な考え方というものが身に付いたと思います。本研究室は、実験機器などの設備が充実しており、経験豊かなスタッフなど非常によい研究環境に恵まれていたと実感し、そのことに深く感謝しております。また、研究をするうえで学問的な知識はもちろん研究をつらぬく“哲学”の存在が重要であると強く感じました。

御懇意なご指導ご鞭撻を賜り、私が精神的な面でくじけそうになったとき見放すことなく励まし続けてくださいました杉村和久教授に深く感謝いたします。研究についていろいろ相談に乗ってくださった伊東祐二准教授、橋口周平助教に深く感謝いたします。また、苦楽をともにした杉村研究室のみなさんに感謝いたします。

最後に、学位取得まで心配をかけ続け、学費、生活費の面で多大な援助をしてくれた両親に深く感謝いたします。

この研究を足がかりに、博士の名に恥じぬよう日々精進していく所存でございます。

平成20 年3 月 吉永 圭介

主論文

Keisuke Yoshinaga, Miyuki Matsumoto, Masaharu Torikai, Kazuki Sugyo, Saori Kuroki, Kentaro Nogami, Ryo Matsumoto, Shuhei Hashiguchi, Yuji Ito, Toshihiro Nakashima, and Kazuhisa Sugimura

Ig L-chain Shuffling for Affinity Maturation of Phage Library-derived Human Anti-human MCP-1 Antibody Blocking its Chemotactic Activity.

Journal of Biochemistry. (Accepted Jan 7, 2008)

学会発表

須堯一樹、吉永圭介、田中孝一、橋口周平、中島敏博、伊東祐二、杉村和久
ヒトMCP-1 特異的ヒト抗体MC32 のVL gene shuffling による親和性増強の試み
第35 回日本免疫学会総会学術集会記録、35 巻、p.158、2005 年、横浜

吉永圭介、須堯一樹、田中孝一、橋口周平、中島敏博、伊東祐二、杉村和久
ヒトMCP-1特異的抗体MC32のVL gene shufflingによる親和性増強の試み
平成18 年度日本生化学会九州支部例会 プログラム抄録、2006年5月、福岡

著書

杉村和久、濱崎隆之、吉永圭介
ファージディスプレイとヒト抗体エンジニアリング

DOJIN News, **109**: 1-7 (2004)