

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

抗体ライブラリを活用した疾患関連蛋白質可視化解析技術の研究

平成18年度 総括研究報告書

主任研究者 角田 慎一

平成19（2007）年 4月

目 次

I. 総括研究報告 抗体ライブラリを活用した疾患関連蛋白質可視化解析技術の研究 角田慎一	-----	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	15
III. 研究成果の刊行物・別刷		

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
総括研究報告書

抗体ライブラリを活用した疾患関連蛋白質可視化解析技術の研究
主任研究者 角田 慎一
独立行政法人医薬基盤研究所 基盤的研究部 主任研究員

研究要旨

本研究は疾患プロテオミクス技術、分子イメージング技術、ファージライブラリを用いたin vitro抗体作製技術を融合することにより、細胞内で機能できる疾患関連蛋白質に対する抗体を創出し、その蛍光標識体を用いた細胞内での疾患関連蛋白質の可視化、あるいは機能制御を可能とする技術を開発するものである。細胞内で機能しうる抗体を得るためには、まずイムノグロブリンL鎖およびH鎖をリンカーで繋いだ一本鎖化抗体scFv型が簡便に得られること、また、細胞内では適切にフォールディングせず、不溶化する抗体も多いことから、迅速に多種類の抗体クローンを得て、その中から有効に機能するクローンを見出すことが必要となる。従来のハイブリドーマ法による抗体作製では親和性クローンを得るだけでも長期を要し、さらにscFv化、可溶性クローンの探索まで行うには多大な時間と労力を必要とする。そこで本研究では、初年度において、イントラボディを創製する基盤としての高品質な一本鎖Fv抗体（scFv）のファージライブラリ構築と性能評価を目標として研究を実施した。まず多様な抗原に対する抗体を取得可能となるように、生体が有する抗体遺伝子V領域を網羅的にカバーしうるPCRミックスプライマーを設計し、それにより非免疫マウスB細胞由来cDNAからVHおよびVL遺伝子を増幅回収した。これら遺伝子をリンカー配列でランダムに連結し、ファージミドベクターに挿入してscFvファージライブラリを構築した。得られたscFv抗体遺伝子のライブラリのサイズは 2×10^9 であり、生体の有する膨大な抗体レパートリーをカバーしうるライブラリが構築できたものと考えられた。そこで本ファージ抗体ライブラリの性能を確かめるため、複数のモデル抗原に対する抗体のスクリーニングを試みたところ、アフィニティパンニングによる結合性クローンの濃縮、およびその中から目的抗体クローンを得られることが確認できた。本成果をもとに次年度以降、scFv抗体を細胞内で発現させ、抗体として機能するイントラボディを探索するとともに、機能解析や蛍光イメージングへの応用に向けた基礎評価を試みる予定である。

A. 研究目的

遺伝子(ゲノム)の機能を具現するのは、miRNAなどを除き、最終産物である蛋白質(プロテオーム)である。また蛋白質は翻訳後修飾を受けた後、種々生体分子と相互作用することによって機能発現するため、mRNAと蛋白質との間に質的、量的な相関関係が成立しない場合が多く、遺伝子の発現解析だけでは、十分な情報を得られない。そのため、疾患プロテオミクス研究により疾患の発症や悪化、治癒に至る病態

メカニズムを解明し、「創薬ターゲットとなる蛋白質」や「医薬品シーズとなる蛋白質」を同定しようとする試みが世界規模で進展中である。しかし、世界的に観ても疾患プロテオミクス研究の成果に基づき、疾患メカニズムの解明や医薬品開発に成功した例は殆どないのが現状である。これは、健常状態と比較して疾患状態で発現変動している疾患関連蛋白質が数百以上も存在しているばかりでなく、蛋白質の生体内・細胞内挙動が正確に評価できておらず、それらの機能が未だ解明されていないことに

大きく起因している。即ち、質量分析機器やその周辺の研究環境（データベース等）の著しい進歩によって疾患関連蛋白質の網羅的探索効率や探索精度が向上したものの、数多くの疾患関連蛋白質の中から疾患の発症や悪化、治癒の鍵となる蛋白質を絞り込むための技術が未成熟であるため、医療に有用なターゲットを同定できていない。そのため、多種多様な疾患関連蛋白質の中から「創薬ターゲット」や「医薬品シーズ」を絞り込もうと考えた場合、個体レベルおよび細胞レベルで“いつ”、“どこで”、“どの蛋白質”が、“どのようにして”、疾患の発症や悪化、治癒に関わっているのかという情報を集積できる基盤技術が必要不可欠となっている。本研究では、細胞内での疾患関連蛋白質の挙動解析に焦点を絞り、この課題の克服に取り組むものである。本研究では、まず微量の疾患関連蛋白質に対する抗体を迅速・網羅的に創製する技術の確立、さらに、得られた抗体による細胞内蛋白質の機能制御、あるいは細胞内機能型抗体（イントラボディ）をプローブとする蛍光イメージング技術の確立を目指す。

本研究成果はプロテオミクスの成果を有効活用し、疾患原因の解明や効率的な医薬品開発に寄与できるものであるため、我が国の産官学の医薬学研究の進展のみならず、国民の健康と福祉の向上に貢献できるものと考えられる。

B. 研究方法

B-1 非免疫マウス scFv ファージ抗体ライブラリ作製法の確立

cDNA の作製

3系統（C57BL/6, Balb/c, C3H）の非免疫マウス（雄6週齢）をペントバルビタールにより深麻酔し、骨髄細胞と脾細胞を回収した。50～100 mg の組織に対して1 ml の TRIzol reagent (Invitrogen)を加え、ホモジネートした。室温で5分間インキュベーションし、TRIzol reagent 1 ml に対して200 μ l の chloroform を加え、15秒間攪拌した。室温で3分間インキュベーションし、12000 \times g、4 $^{\circ}$ C で15分間遠心した。上清を新しいマイクロチューブに移し、等量の isopropyl alcohol と1/10容量の3 M sodium acetate を加えた。室温で10分間インキュベーションし、12000 \times g、

4 $^{\circ}$ C で15分間遠心した。上清を除き、70% ethanol で wash し、7500 \times g、4 $^{\circ}$ C で5分間遠心した。上清を除き、pellet を RNA free 水で溶解し、total RNA を得た。この total RNA 5 μ g 当たり、50 μ M oligo(dT)₂₀ (Invitrogen) 1 μ l、10 mM dNTP mix 1 μ l を混合し、DEPEC 処理水を加えて10 μ l とし、65 $^{\circ}$ C で5分間インキュベーションした。10 \times RT buffer 2 μ l、25 mM MgCl₂ 4 μ l、0.1 M DTT 2 μ l、RNaseOUT (Invitrogen) 1 μ l、SuperScript III RT (Invitrogen) 1 μ l を加えて、50 $^{\circ}$ C で50分間、85 $^{\circ}$ C で5分間反応させた。RNase H (Invitrogen) 1 μ l を加え、37 $^{\circ}$ C で20分間反応させ、骨髄および脾細胞由来 cDNA を得た。

scFv 遺伝子の作製

前項のcDNAをテンプレートとし、アニーリング温度を50 $^{\circ}$ Cで1分間、伸長反応を68 $^{\circ}$ Cで1分間に設定し、Table 1に示したprimer sets (2 pmol)とKOD-plus-DNA Polymerase (TOYOBO)を用いてPCRを35サイクル行った。このPCR産物をPCR purification kit (QIAGEN)で精製し、VL断片とVH断片とした。VL断片とVH断片をテンプレートとしてアニーリング温度63 $^{\circ}$ Cで1分間、伸長反応を68 $^{\circ}$ Cで1分間に設定し、KOD-plus-DNA Polymeraseを用いてassembly PCRを19サイクル行った。このassembly PCR産物と、NotI サイトを有するプライマー Y15 (5' -GC CAAGCTTTGGAGCCTTTTTTTTGGAGATTTTCAACGTGAAA A AATTATTATTCGCAAT TCCTTTAGTTGTTCTCTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGG CC-3')、及びNcoI サイトを有するプライマー Y16 (5' -TTAGTAAATGAATTTTCTGTATGAGGTTTTGCTAAA CAA CTTTCAACAGTCTATGCGGCACGCGGTTCCACGGATCCGGA TACGGCACC GGCGCACCTGCGGCCGC-3')を用い、アニーリング温度を65 $^{\circ}$ Cで1分間、伸長反応を68 $^{\circ}$ Cで1分間に設定し、KOD-plus-DNA Polymeraseを用いてPCRを35サイクル行った。このPCR産物をPCR purification kitで精製し、scFv遺伝子を作製した。

非免疫マウス scFv ファージ抗体ライブラリの作製

scFv 遺伝子を制限酵素 Nco I 及び Not I

で処理し、あらかじめ *Nco* I 及び *Not* I で処理したファージミドベクター pCANTAB5E と T4 ligase を用いて 16° C、16 時間ライゲーション反応を行った。得られたライゲーション産物を PCR purification kit で精製した。あらかじめ 2YT 培地で OD=0.3~0.6 まで培養した大腸菌 TG1 (Stratagene) を、MilliQ 水で 3 回洗浄操作を行い、10% Glycerol で懸濁氷冷し、エレクトロポレーション用 TG1 とした。本 TG1 50 µl に対して、精製後のライゲーション産物 1 µl を添加し、GenePulser Xcell (Bio-Rad) を用い、1.8 kV、0.25 µF、200 Ω でエレクトロポレーションを行った。その後、2% Glucose 含有 2YT 培地を添加し、1 時間培養した後、その一部をとって 50 µg/ml Ampicillin、2% Glucose 含有 2YT 培地で希釈し、Petrifilm (3 M) に播種し、37° C で一晩培養した。得られた形質転換コロニー数を計測することで、ライブラリサイズを算出した。

DNA シークエンス解析

上記コロニーから任意にピックアップしたクローンからプラスミドを QIAprep Miniprep Kit (QIAGEN) を用いて回収し、プライマー 156 (5' -CAACGTGAAAAAATTATTATTCGC-3') とプライマー 158 (5' -GTAAATGAATTTCTGTATGAGG-3')、及び BigDye Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてサイクルシークエンス反応を行った。その後、PERFORMA Gel Filtration Cartridge (Edge Bio Systems) を用いて精製し、ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により DNA シークエンスを解析した。

B-2 非免疫ファージ抗体ライブラリを用いた抗体単離システムの最適化

scFv 提示ファージの作製

scFv ライブラリ遺伝子を組み込んだファージミドベクターを大腸菌 TG1 株にエレクトロポレーションし、その適量を 50 µg/ml Ampicillin、2% Glucose 含有 LB プレートに播種し、37° C で一晩培養した。50 µg/ml Ampicillin、2% Glucose 含有 2YT 培地を加えてコロニーを全て回収し、250 rpm、37° C で OD600 = 0.3~0.6 まで培養した。M13K07 ヘルパ

ーファージ (Invitrogen) を添加し、110 rpm、37° C で 30 分間、250 rpm、37° C で 30 分間培養後、2000 rpm で 10 分間遠心し、得られたペレットに対して 100 µg/ml Ampicillin、50 µg/ml Kanamycin 含有 2YT 培地を添加して 6 時間培養した。4° C、2000 rpm で 10 分間、さらに 10000 rpm で 15 分間遠心し、回収した上清に氷冷した 20% PEG-6000、2.5 M NaCl を 1/5 volume 加え、激しく混和して氷上で 1 時間静置した。15000 rpm で 10 分間遠心して得られたペレットを NTE buffer (100 mM NaCl、10 mM Tris、1 mM EDTA) に懸濁し、0.45 µm の Millex-HV (MILLIPORE) を用いてフィルターろ過し、ファージを回収した。

BIAcore を用いたパンニング

パンニングには BIAcore 3000 (BIACORE) を用いた。センサーチップ CM3 (BIACORE) 上に 50 µg/ml に調製した蛋白質を 100 µl を用い、CM3 固相化プロトコルに基づいて固相化した。蛋白質として human KDR Fc chimera (R&D systems) を用いた。作製したファージライブラリを input として用い、HBS-EPT buffer (0.05% Tween 20 を含む HBS-EP (BIACORE)) で 10 回洗浄した。抗原に結合したファージを Gly-HCl (pH 2.0) と Gly-NaOH (pH 11.0) により溶出回収し、output とした。1 M Tris-HCl (pH 8.0) を 4 µl と 2% Glucose 含有 2YT 培地を 250 µl 加え、その一部を用いてタイターを測定した。残りのファージを大腸菌 TG1 株に感染させ、増殖させた後、上記のファージ作製法に準じてファージを産出し、再度パンニング操作を行った。

ファージ ELISA によるスクリーニング

パンニング後に回収したファージを TG1 に感染させ、生じたコロニーを 96 well プレートにピックアップした。各ウェルが OD600 = 0.3~0.6 に達するまで培養した後、100 µg/ml Ampicillin、2% Glucose 含有 2YT 培地で 10 倍希釈した M13K07 ヘルパファージ溶液を 20 µl/well で添加した。37° C で 1 時間静置培養した後、2000 rpm で 10 分間遠心し、上清を除去した。100 µg/ml Ampicillin、50 µg/ml Kanamycin 含有 2YT 培地を 200 µl 加えて 37° C で一晩培養し、2000 rpm で 10 分間遠心し、回収された上清を以下のスクリーニング実験に用いた。

anti-human IgG を 10 µg/ml となるように B buffer (0.05M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6)) で希釈し、イムノプレートに 100 µl/well 添加して 8 時間静置した。PBS で 1 回洗浄し、0.4% Block Ace (大日本製薬株式会社) で希釈した human KDR Fc chimera (0.5 µg/ml) を 100 µl/well 添加し、一晩 4° C で静置して固相化した。固相化後に well 内の液を捨て、4% Block Ace を 200 µl/well 添加してブロッキングした。PBS で 1 回洗浄後、ファージサンプル 80 µl 及び 4% Block Ace 20 µl を各ウェルに添加し、緩やかに振とうさせながら室温で 2 時間反応させた。PBST (0.05% Tween 20 を含む PBS) で 3 回洗浄後、0.4% Block Ace で 3000 倍希釈した HRP/anti-M13 monoclonal antibody (GE Healthcare Bioscience) を 100 µl/well 添加し、振とうさせながら室温で 1 時間反応させた。PBST で 3 回洗浄後、TMB 溶液 (Moss Inc.) を加えて発色を行い、2 N 硫酸を添加することで反応を停止させた。吸光度 (測定波長 450 nm、対照波長 655 nm) はマイクロプレートリーダーで測定した。

Dot Blot analysis

各種濃度の抗原蛋白質を Bio-Dot Microfiltration Apparatus (Bio-Rad) を用い、TBS に浸したニトロセルロース膜上に固相化した。①抗 KDR scFv 抗体の特異性評価の実験では、抗原として human KDR Fc chimera、mouse KDR Fc chimera、human TNFR2 Fc chimera (R&D systems)、luciferase、BSA (Amersham)、human importin-α (JENA BIOSCIENCE)、human importin-β (CALBIOCHEM) を使用した。②抗 KDR scFv 抗体の検出感度を検討する際は、固相化する抗原量として human KDR Fc chimera を 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg を使用した。各 well に blocking buffer (10% skim milk & 25% glycerol) を 200 µl ずつ添加して、室温で 2 時間静置してブロッキングを行った。TBS で 1 回洗浄後、blocking buffer で希釈した精製ファージを 200 µl/well 添加し、室温で 2 時間静置した。TBST (0.1% Tween 20 を含む TBS) と TBS で 5 回洗浄後、blocking buffer で 7000 倍希釈した HRP/anti-M13 monoclonal antibody を 200 µl/well 添加した。TBST と TBS で 3 回洗浄後、メンブランを ECL plus Western Blotting Detection System (Amersham) で処理

し、発光像を LAS-3000 (FUJIFILM) を使用して撮影した。

ファージ ELISA

固相化する抗原として、human KDR Fc chimera と mouse KDR Fc chimera (Genzyme-Techne) を用い、前項に準じて行った。

B-3 種々のモデル疾患関連蛋白質に対する抗体の単離

BIAcore を用いたパンニング

センサーチップ (CM3) に固相化する蛋白質として、luciferase (Promega)、human Bid (ALEXIS BIOCHEMICALS)、human importin-β (CALBIOCHEM) を用いて、前項に準じて行った。

ファージ ELISA

固相化する蛋白質として、luciferase、Bid、importin-β を用いて、前項に準じて行った。

倫理面への配慮

本年度の研究においては、マウスからリンパ球を採取し、mRNA を抽出した。本実験は、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針に準じ、所属機関実験動物委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果・考察

抗体を細胞内で機能させるためには、イムノグロブリン L 鎖および H 鎖の可変領域をリンカーで結合させた一本鎖化抗体 (scFv 抗体) が簡便に得られること、また、細胞内では適切にフォールディングせず、不溶化する抗体も多いことから、迅速に多種類の抗体クローンを取得し、その中から有効に機能するクローンを見出すことが必要となる。しかし従来のハイブリドーマ法による抗体作製では、抗原親和性クローンを得るだけでも長期を要し、さらに scFv 化、可溶性クローンの探索まで行うには多大な時間と労力を必要とする。そこで本年度は、イントラボディを創製するための基盤技術として、scFv 抗体を発現するファージライブラリ構築と性能評価を行った。

C-1 非免疫マウス scFv ファージ抗体ライ

ブラリ作製法の確立

過去に報告され、現在も汎用されているマウス scFv ファージ抗体ライブラリ用のプライマーセットは、①プライマーの組み合わせが 1440 通りと多様性に乏しく、②scFv 遺伝子を作製する際に VL 遺伝子、リンカー配列、VH 遺伝子の 3 fragment assembly を必要としているため、連結効率の低下やフレームシフトが起これ、高品質なライブラリを得ることができないという 2 つの大きな問題点を有している。これら問題点を克服するために、まず、多様な抗体遺伝子を均等に増幅できるように、過去の報告と Kabat 抗体データベースを参考に、約 1000 万種類以上もの組み合わせからなるプライマーセットを独自に設計した (Table 1)。そして、3 fragment assembly を省くため、VL 遺伝子下流と VH 遺伝子上流にリンカー配列をあらかじめ組み込むことで、VL 遺伝子、VH 遺伝子をダイレクトに連結可能とした。このプライマーセットを用いて非免疫マウスの骨髄、脾臓細胞由来 mRNA から VL、VH 遺伝子断片をそれぞれ増幅した。その結果、作製された PCR 産物は、約 380 bp と約 400 bp 付近に位置し、目的の VL、VH 遺伝子断片が増幅されていることを確認した。この両遺伝子を assembly PCR により連結した。そして、この産物をテンプレートとして Y15、Y16 プライマーを用い PCR によって scFv 遺伝子を増幅し、酵素処理後、電気泳動により約 720 bp 付近に遺伝子断片が増幅されていることを確認した (Fig. 1)。この得られた scFv 遺伝子断片をファージミドベクター pCANTAB5E に組み込み、大腸菌 TG1 にエレクトロポレーションにより形質転換した。得られたファージ抗体ライブラリのライブラリサイズは、大腸菌への形質転換効率から計算したところ 2.4×10^9 CFU であった (Fig. 2)。また、ライブラリから任意にピックアップしたクローンの DNA シーケンスを解析した結果 (Table 2)、フレームシフトやフレーム内の変異は認められなかった。さらに、VH の CDR3 領域は抗体のアミノ酸配列の中で最も多様であり、抗原に対する特異的結合に重要であるといわれている部位である。シーケンス解析の結果、本ライブラリにおいても、CDR 領域の長さ、配列ともに多様な大きい構成になっていることが確認された。以上の結果から、本研究で作製された非免疫マウス

scFv ファージ抗体ライブラリは、生体が有する抗体の多様性を模倣する優れたライブラリであることが示唆された。

C-2 非免疫ファージ抗体ライブラリを用いた抗体単離システムの最適化

パンニングには抗原の固相化量や抗体クローンとの結合性を表面プラズモン共鳴 (SPR) 法によってリアルタイムに測定でき、マイクロ流路系で送液等の一連の操作を自動化可能なシステムである BIAcore を使用した (Fig. 3)。まずパンニング方法を最適化し、目的蛋白質に対してより結合力の強い抗体を単離・同定するため、非特異的に結合したファージを効率よく除くことが可能な洗浄条件の設定を試みた。洗浄条件は HBS-EPT で 2 回洗浄と 10 回洗浄の条件でそれぞれパンニングを行い、どちらの条件で蛋白質に対する抗体の濃縮効率が良いのかを比較した。パンニング前のファージ抗体ライブラリ (input ファージ) と、パンニングにより回収されたファージ (output ファージ) の比率を検討したところ、パンニングを重ねるにつれて KDR に結合するファージの比率は上昇しており、抗 KDR 抗体を提示したファージが濃縮されていることが示唆された (Fig. 4)。10 回の洗浄操作を行うプロトコルでは、1st パンニング後と比較して 5th パンニング後では、KDR に結合性を示すファージ集団が約 1000 倍に増加していた。

次に、パンニングによる濃縮後のライブラリから目的クローンをスクリーニングするため、各ラウンドで回収されたファージを大腸菌 TG1 に再感染させることでモノクローン化し、大腸菌培養上清中に産生されたファージを用いて、KDR に対するファージ ELISA により結合性を評価した (Fig. 5)。その結果、input ファージでは、KDR に結合性を示すクローンはほとんど認められなかったのに対し、5th パンニング後の output ファージでは KDR に結合性を示すクローンが多数認められた。また、2 回の洗浄操作を行うプロトコルに比べ、10 回洗浄の条件のほうが抗 KDR 抗体の数が顕著に増加しており、高親和性を示唆するクローンが効率よく濃縮されていることが判明した。したがって、より厳しい洗浄条件でパンニングを行うことにより、効率よく抗体を選択できるうえ、目的蛋白質に対

して高親和性を示唆するクローンを得ることが可能であると考えられた。

次に、スクリーニングによって同定された KDR に高親和性を有すると考えられる 8 クローンについて DNA シークエンス解析を行ったところ、これらクローンは異なる 3 種類の配列をもつ抗体であることが確認された (Table 3)。本検討では、パンニング後にスクリーニングを行った約 100 クローンのうち、親和性が高いと考えられた 8 クローンについてのみシークエンス解析を行った。しかし、さらにスクリーニングするクローン数を増加させることにより、より多種類の抗体を単離・同定できるものと考えられる。

続いて、非免疫ファージ抗体ライブラリから単離された 3 種類の抗 KDR scFv 抗体 (anti-KDR-1, 2, 3) の特異性を Dot Blot 法を用いて評価した (Fig. 6)。固定化された human KDR Fc chimera, human TNFR2 Fc chimera, luciferase, BSA, human importin- α , human importin- β に対する結合性を検討した結果、ヒト KDR に対して 3 種すべての抗 KDR scFv ファージは結合性を有していたが、それ以外の蛋白質に対してはいずれのクローンも結合性を示さなかった。したがって、これら 3 クローンは、KDR 特異的な抗体であることが示唆された。また、SDS および加熱によって変性させた KDR についても結合性を示したことから、これら抗 KDR scFv 抗体は、Western Blot などにも応用可能な汎用性の高い抗体であることが判明した。また、この 3 種類の抗 KDR 抗体を用いることで、どのくらい微量の蛋白質まで検出可能かどうかの検討を Dot Blot 解析により行った (Fig. 7)。その結果、anti-KDR-2 では 10 ng, anti-KDR-1, anti-KDR-3 を用いると、わずか 100 pg という微量の蛋白質でも検出できる高感度な抗体であることが明かとなった。

ファージ抗体ライブラリの特性として、B 細胞から単離した mRNA から VL, VH 遺伝子を別々に増幅し、その後に遺伝子工学的に連結させるため、生体では通常存在しない自己抗原を認識する抗体を得られる可能性が示唆されている。そこで、今回単離した、この 3 種類の抗 KDR scFv 抗体がパンニング抗原として用いたヒト KDR だけではなく、抗体遺伝子ソースと同じマウスの KDR も認識可能かどうか ELISA により評価した (Fig. 8)。その結果、3 種類の抗 KDR scFv

抗体、全てがヒト KDR だけではなく、マウス KDR にも同様の結合性を示すことが確認された。なお、本実験に用いたマウス KDR はヒト IgG1 Fc とのキメラであるが、同型の IgG1 Fc をもつ、ヒト TNFR2 Fc キメラにも抗 KDR scFv は結合しなかったことから、これらマウス scFv クローンはマウス KDR、すなわち自己抗原を認識できることが明らかとなった。ハイブリドーマによる抗体作製法では通常、自己抗原を認識する抗体を得ることは困難である。また、自己抗原でなくても、免疫動物種の抗原蛋白質とアミノ酸配列のホモロジーが高い異種蛋白質を抗原とした場合には抗体が得られにくいことが知られている。本ファージ抗体ライブラリを用いると同種抗原に対する抗体を得ることができるという事実は、臨床応用可能なヒト型抗体医薬の開発において、ヒト由来抗体ライブラリの有用性を示唆するものである。

以上のように、本研究で構築した非免疫ファージ抗体ライブラリは、100 pg 程度の極微量の蛋白質でも特異的に検出可能な優れた抗体を単離できたこと、さらには、自己抗原に対する抗体も単離できたことから、有用性の高い高品質なライブラリであることが明かとなった。

C-3 種々のモデル疾患関連蛋白質に対する抗体の単離

本研究で構築した非免疫ファージ抗体ライブラリの有用性を評価するために、アポトーシス関連蛋白質である Bid, 核輸送関連蛋白質である importin- β , および luciferase に対してアフィニティーパンニングを行った (Fig. 9)。その結果、各抗原蛋白質に結合し、回収されるファージの割合はパンニングを重ねるにつれて顕著に上昇し、各蛋白質に結合する抗体を提示したファージが選択・濃縮されたことが示唆された。次に、パンニングの結果をより詳細に評価するため、各ラウンドで回収されたファージをモノクローン化し、各蛋白質に対する結合性を ELISA により評価した。その結果、input ファージでは抗原結合性のクローンはほとんど認められなかったのに対し、5th パンニング後の output ファージでは各蛋白質に結合を示すクローンが顕著に増加していた。以上の結果から、本ライブラリは、様々な抗原に対して抗体が単離可能な優れた品質を有しており、今後

次々と見出されてくる疾患関連蛋白質に対する抗体作製技術として、極めて有用であることが示唆された。

D. 結論

本年度は、イントラボディを創製する基盤としての高品質な一本鎖Fv抗体 (scFv) のファージライブラリ構築と性能評価を目標として研究を実施した。まず多様な抗原に対する抗体を取得可能となるように、生体が有する抗体遺伝子V領域を網羅的にカバーしうるPCRミックスプライマーを設計し、それにより非免疫マウスB細胞由来cDNAからVHおよびVL遺伝子を増幅回収した。これら遺伝子をリンカー配列でランダムに連結し、ファージミドベクターに挿入してscFvファージライブラリを構築した。得られたscFv抗体遺伝子のライブラリのサイズは 2×10^9 であり、生体の有する膨大な抗体レパートリーをカバーしうるライブラリが構築できたものと考えられた。そこで本ファージ抗体ライブラリの性能を確かめるため、複数のモデル抗原に対する抗体のスクリーニングを試みたところ、アフィニティパンニングによる結合性クローンの濃縮、およびその中から目的抗体クローンを得られることが確認できた。本成果をもとに次年度以降、scFv抗体を細胞内で発現させ、抗体として機能するイントラボディを探索するとともに、機能解析や蛍光イメージングへの応用に向けた基礎評価を試みる予定である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Imai S, Mukai Y, Nagano K, Shibata H, Sugita T, Abe Y, Nomura T, Tsutsumi Y, Kamada H, Nakagawa S, Tsunoda S. Quality enhancement of the non-immune phage scFv library to isolate effective antibodies. *Biol Pharm Bull.* 29: 1325-1330 (2006).
- 2) Mukai Y., Sugita T., Yamato T., Yamanada N., Shibata H., Imai S., Abe Y., Nagano

K., Nomura T., Tsutsumi Y., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S. Creation of novel protein transduction domain (PTD) mutants by a phage display-based high-throughput screening system. *Biol Pharm Bull.* 29: 1570-1574 (2006).

- 3) Kawamura M., Shibata H., Kamada H., Okamoto T., Mukai Y., Sugita T., Abe Y., Imai S., Nomura T., Nagano K., Mayumi T., Nakagawa S., Tsutsumi Y., Tsunoda S. A novel method for construction of gene fragment library to searching epitopes. *Biochem Biophys Res Commun.* 346: 198-204. (2006).
- 4) Kamada H., Okamoto T., Kawamura M., Shibata H., Abe Y., Ohkawa A., Nomura T., Sato M., Mukai Y., Sugita T., Imai S., Nagano K., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T., Tsunoda S. Creation of novel cell-penetrating peptides for intracellular drug delivery using systematic phage display technology originated from Tat transduction domain. *Biol Pharm Bull* 30: 218-223 (2007).
- 5) Nomura T., Kawamura M., Shibata S., Abe Y., Ohkawa A., Mukai Y., Sugita T., Imai S., Nagano K., Okamoto T., Tsutsumi Y., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S. Creation of novel cell penetrating peptide, using random 18mer peptides library. *Pharmazie* (in press).

2. 学会発表

- 1) 長野一也, 向 洋平, 今井 直, 杉田敏樹, 山名田夏枝, 中川晋作, 真弓忠範, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 非免疫ファージ抗体ライブラリを用いた疾患関連蛋白質抗体の迅速単離法の確立, 第22回日本DDS学会学術集会, 東京, 2006年.
- 2) 今井 直, 向 洋平, 長野一也, 杉田敏樹, 山名田夏枝, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央, 中川晋作 : ファージ抗体ライブラリを用いた疾患関連蛋白質抗体の迅速単離法の確立, 第4回 JHUP0 大会, 東京, 2006年.
- 3) 山名田夏枝, 向 洋平, 杉田敏樹, 今井直, 長野一也, 岡田直貴, 鎌田春彦, 中

- 川晋作, 角田慎一, 堤 康央 : 細胞内薬物導入キャリアとしての細胞内移行性ペプチド(PTD)の機能評価, 第2回創剤フォーラム若手発表討論会, 京都, 2006年.
- 4) 長野一也, 向 洋平, 今井 直, 杉田敏樹, 山名田夏枝, 岡田直貴, 鎌田春彦, 中川晋作, 角田慎一, 堤 康央 : フェージ抗体ライブラリを駆使した細胞内抗体(イントラボディ)の創製検討, 第2回創剤フォーラム若手発表討論会, 京都, 2006年.
 - 5) 今井 直, 向 洋平, 長野一也, 杉田敏樹, 山名田夏枝, 鎌田春彦, 中川晋作, 堤康央, 角田慎一 : フェージ抗体ライブラリを用いた疾患関連蛋白質抗体の迅速単離法の確立, 日本薬学会第127年会, 富山, 2007年.
 - 6) 長野一也, 向 洋平, 今井 直, 杉田敏樹, 山名田夏枝, 吉川友章, 鎌田春彦, 中川晋作, 角田慎一, 堤 康央 : フェージ抗体ライブラリを用いたイントラボディの効率的創製法の開発, 日本薬学会第127年会, 富山, 2007年.
 - 7) 杉田敏樹, 山名田夏枝, 向 洋平, 吉川友章, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤康央 : 細胞内薬物療法の最適化を目指した細胞内移行性ペプチド(PTD)の特性評価, 日本薬学会第127年会, 富山, 2007年.
 - 8) 角田慎一, 山名田夏枝, 杉田敏樹, 長野一也, 今井 直, 向 洋平, 吉川友章, 中川晋作, 今澤孝喜, 鎌田春彦, 堤 康央 : 細胞内への薬物送達を志向したペプチドキャリアーの特性評価, 日本薬学会第127年会, 富山, 2007年.
 - 9) 角田慎一, 吉川友章, 長野一也, 今井 直, 向 洋平, 鎌田春彦, 長田直樹, 堤 康央 : カニクイザル遺伝子資源に対応する網羅的な抗体作製に向けた基礎検討, 日本薬学会第127年会, 富山, 2007年.
 - 10) 角田慎一 : 疾患関連たんぱく質に対する抗体作製とその応用, 小野薬品工業特別講演会, 大阪, 2006年.
 - 11) 角田慎一 : 疾患関連たんぱく質の探索とその有効活用技術の開発-1, 大阪大学大学院薬学研究科特別講演会, 大阪, 2006年.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
- なし
- H. その他
- 協力研究者
- 堤 康央 独立行政法人医薬基盤研究所
創薬プロテオミクスプロジェクト
プロジェクトリーダー
- 鎌田春彦 独立行政法人医薬基盤研究所
創薬プロテオミクスプロジェクト
主任研究員

Table.1 Primers for PCR amplification of VL and VH

VL Forward	<p style="text-align: center;">NcoI</p> <p>5'-cctttctatgcccagccgCCATGGcc-</p> <p>-GAYATTGTWCTCWCCTCARTC -3'</p> <p>-GAYATTSTGMTSACYCAGTC -3'</p> <p>-GAYATTGTGTMACTCAGTC -3'</p> <p>-GAYATTGTGHTWACACAGTC -3'</p> <p>-GAYATTGTRATGAMCCAGTC -3'</p> <p>-GAYATTMAGATRAMCCAGTC -3'</p> <p>-GAYATTCCAGATGAVDCAGTC -3'</p> <p>-GAYATTTGCTGACTCAGTC -3'</p> <p>-GAYATTGTCTCAWCCAGTC -3'</p> <p>-GAYATTGWGCTSACCCAAATC -3'</p> <p>-GAYATTSTRATGACCCARTC -3'</p>	VH Forward	<p style="text-align: center;">S G G G S G G G S</p> <p>5'-agcggcggcggcggctctggtggatcc-</p> <p>-GAGGTRMAGCTTCAGGAGTC -3'</p> <p>-GAGGTNCAGCTBCAGCAGTC -3'</p> <p>-CAGGTGCAGCTGAAGSASTC -3'</p> <p>-CAGSTBCAGCTGCAGCAGTC -3'</p> <p>-GAGGTTCAGCTYCAGCAGTC -3'</p> <p>-GAGTCCARCTGCACARTC -3'</p> <p>-CAGGTTCAGCTBCAGCARTC -3'</p> <p>-CAGGTTCARCTKACAGCAGTC -3'</p> <p>-CAGGTCCACSTGAAGCAGTC -3'</p> <p>-GAGGTGAASSTGGTGGARTC -3'</p> <p>-GAVGTGAWGYTGGTGGAGTC -3'</p> <p>-GAGGTGAAGGTCATCGAGTC -3'</p>
	<p style="text-align: center;">NcoI</p> <p>5'-accagagccgcccggcgcctaccaccacc-</p> <p>-CCGTTTGATTTCCARCTKIG -3'</p> <p>-CCGTTTATTTCCAGCTTGG -3'</p> <p>-CCGTTTSAAGCTCAGCTTGG -3'</p>		<p style="text-align: center;">S G G G S G G G S G</p> <p>5'-gggcaccggcgcacctGCGGCCGC-</p> <p>-YGAGGAACCGTGACCGTGGT -3'</p> <p>-YGAGGAGACTGTGAGAGTGGT -3'</p> <p>-YGAGGAGACCGTGACTGAGRT -3'</p>
VL Reverse	<p style="text-align: center;">NcoI</p> <p>5'-cctttctatgcccagccgCCATGGcc-</p> <p>-GAYRTTKTGATGACCCAVAC -3'</p> <p>-GAYATYCAGATGACACAGAC -3'</p> <p>-GAYATTGTGATGACACAACC -3'</p> <p>-GAYATCCAGCTGACTCAGCC -3'</p> <p>-GAYATTGTGATGACBCAGKC -3'</p> <p>-GAYATTGTGATAACYCAGGA -3'</p> <p>-GAYATTGTGATGACCCAGWT -3'</p> <p>-GAYTGSTGMTSACYCAGTC -3'</p> <p>-GAYGCTGTGTACTCAGGAATC -3'</p> <p>-GAYATTGTDHTVWCHCAGTC -3'</p>	VH Reverse	<p style="text-align: center;">NotI</p> <p>5'-gggcaccggcgcacctGCGGCCGC-</p> <p>-YGAGGAAGACTGTAGAGTGGT -3'</p> <p>-YCGCGAGACASTGACCCAGAGT -3'</p> <p>-YGCAGAGACASTGACCCAGAGT -3'</p>

S=G/C, R=G/A, K=G/T, M=A/C, Y=C/T, W=A/T, H=A/C/T, B=C/G/T, V=A/C/G, D=A/G/T, N=A/T/G/C

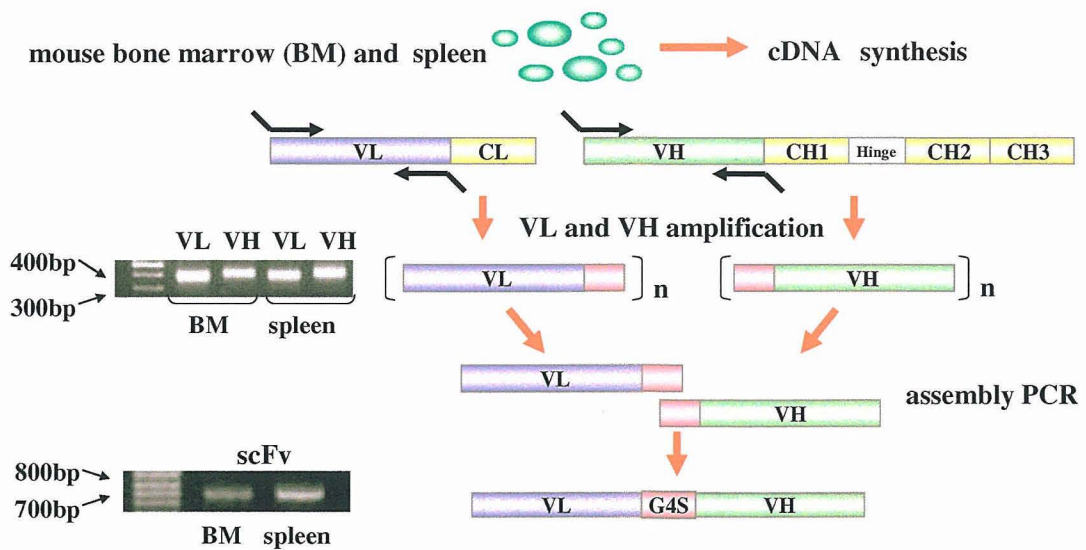


Fig.1 Construction of scFv gene library

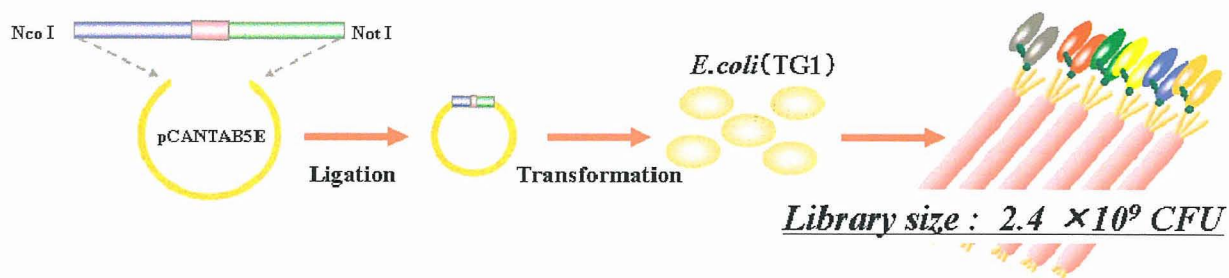


Fig.2 Construction of phage library displaying scFvs

Table.2 Amino acid sequences of randomly picked clones from the non-immune svFv library VL

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	Linker
1	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIIC	KASQDVSTAVA	WYQQRFGQSPKLLIY	SASYRYS	GVPDRFTGSGGIDFILTISNVQAE DLAVYYC	QQVNSVPYT	FGGGLKLEIKR	GGGSGGGGGGGGG
2	-----PSS-YA-L-E--T---	----INSYLS	-F---K--T---	R-NRLVD	---S--S---Q-YS---SLEY--MGI---	LLSTVSS--	-----	-----
3	-----TPLTL-VTI-QPA--S-	-S--SLLDSDGKTYLN	-LL-R---R---	LV-KLD-	-----K--R-E--G---	W-GTHF-R-	-----	-----
4	-Q--AAPSVPVTP-ES--S-	RS-KSLLDSDGNTIYLY	-FL-R---Q---	RM-NLA-	-----S---A--R--R-E--VG---	M-HLE--L-	--A-----	-----
5	-----Q-----V--	---N-G-N-	-----A---	-----	-----S---E-F-	-----	-----	-----
6	--LL-----	---N-G-N-	-----	W--T-HT	-----Y--S--L---	--HY-T-L-	--A--LE-	-----
7	-E--Q-----V--	---N-G-N-	-----A---	-----	-----S---E-F-	-----L-	-----L-	-----
8	N--Q-----V-	---N-G-N-	-----A---	YT-RLH-	-----S--E-F-	-----L-	-----	-----
9	-----PAI-A-P-EK-TM--	S-SS-SYMH	---S-T--RW-	DT-KLA-	---A--S---SYS--R-E--A-T---	--WS-N-P-	--A-----	-----
10	-----	-----	-----	W--TRHT	-----S--E-F-	-----L-	-----L-	-----
11	--LN-----	-----	-----	-----T	-----F--S-----	--HY-T---	-----L-	-----
12	-----	---G---	-----	W--T-HT	-----Y--S--L---	--HY-T---	-----L-	-----

VH

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
1	EVQLVESGGGLVHPGGLSKLSAASGFTFS	SYGMS	WVRQIPEKLEWVA	YISSGGSTIYYPDSVKG	RFTISRDAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCAR	GGGVFDY	WGQGITLTVSS
2	Q--QQ-AE-----A-V-I-K--YA--	--W-N	--K-R-G---IG	Q-YP-DGD-N-NGKF--	KA-LTA-KSSS-A-MQL--T--S-V-F--G	GTYYFDY	-----
3	D-H-----R-----	-T-	---R---	---GN---	-----R-----R-----	GHY	-----
4	--HW-----	D--H	---A---	---S--I--A-T---	-----F--T--R-----	LITVVDY	-----
5	-K-----Q-----	-----	---D-R-L-	T-N-N-GS	-----	DGNLYLLAY	---LV---
6	-N-----	-T-	---R---	---GN---	-----R-----R-----	RGNVYDYGFDV	--A--V---
7	-----Q-----	D--H	---A---	---S--I--A-T---	-----P--F-----T-	GINWYFDY	-----
8	--K--E-----	--A-	---R---	---DYI--A-T---	-----R-----T-	EERYFDY	-----
9	--M--E--Q--S--M--T---	D-Y-A	-----	N-NYD--S--L--L-S	--I-----I-----T---	DLYYFDY	-----
10	--R-----	--A-	---R---	T-D-Y	-----N-----K	HGGSSYGFAY	---LV---
11	--K--E--Q--S--M--T---	D-Y-A	---V---	N-NYD--S--L--L-S	--I-----I-----T--T-	RGGVCFDY	-----
12	Q--QQ-AE-----A-V-I-K--YA--	SSWM-N	--K-R-G---IG	R-YP-DGD-N-NGKF--	KA-LTA-KSSS-A-MQL--T--S-V-F--	DDD	-----

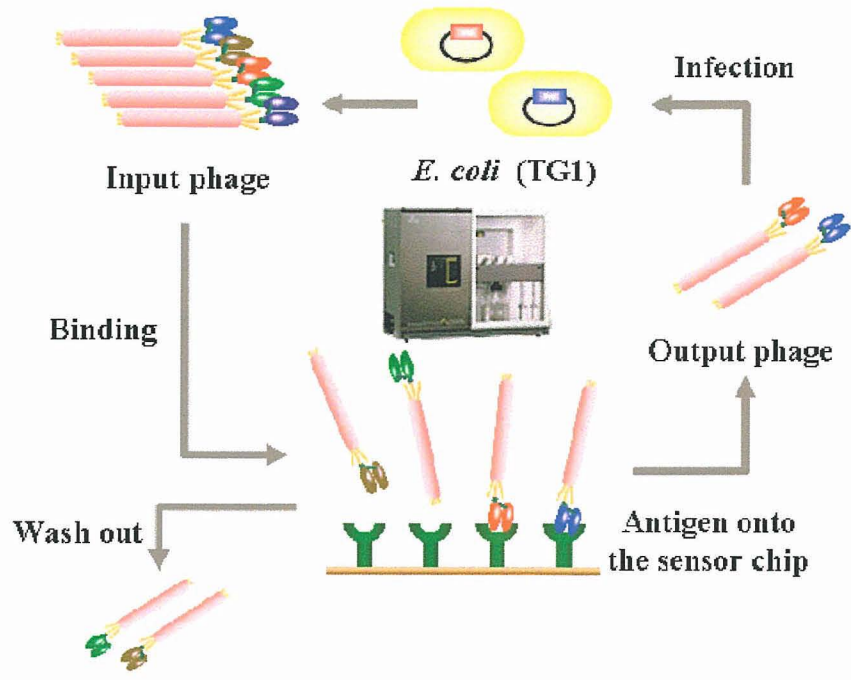


Fig.3 Affinity selection by panning on BIAcore system

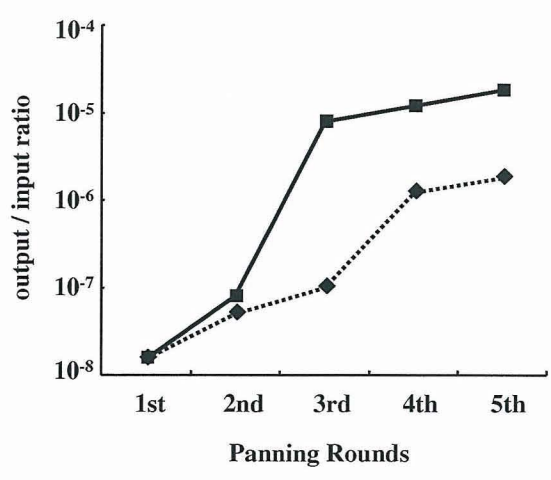


Fig.4 Enrichment of KDR-binding phages from the library by BIAcore panning

Affinity panning was performed by using the BIAcore®. The scFv phage library loaded onto the KDR-immobilized sensor chip. After the binding step, the sensor chip was washed twice and ten times with HBS-EPT. The bound phage was eluted with Gly-HCl (pH 2.0) and Gly-NaOH (pH 11.0). The ratio was calculated as follows ; (output phage titer) / (input phage titer).

(◆) Wash × 2 , (■) Wash × 10

< panning input >

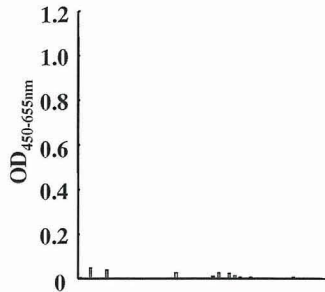


Fig.5 Isolation of antibodies to KDR

After panning on KDR, the binding properties of selected clones were measured by ELISA.
(A) Wash $\times 2$, (B) Wash $\times 10$

< 5th panning output >

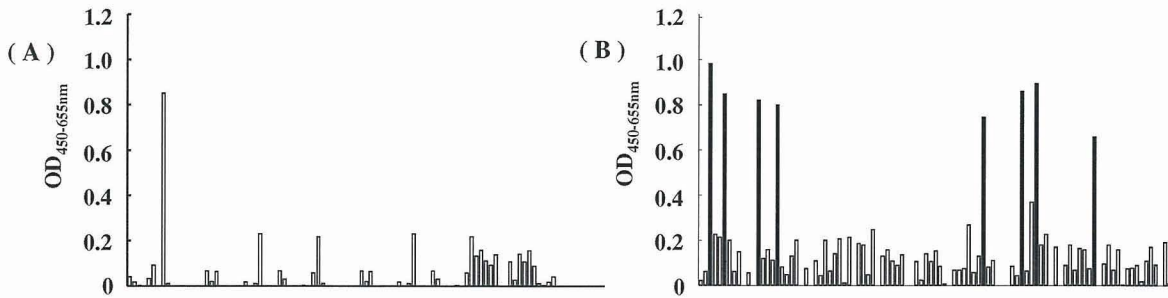


Table.3 Amino acid sequences of anti-KDR scFvs

VL

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	Linker
1	DIIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSC	RASQNISAYLH	WYQKSHESPRLLIK	YASQSYS	GIPSRFSGSGSGS-FTLSINSVEPEDVGVYYC	QNGHSFPYT	FGGGTKLEIKR	GGGGSGGGSGGGGS
2	-----QKFM-TSV-----VT-	K---VGTNVA	----PGQ--KA--Y	S--YRY-	-V-D--T-----TD---T-SN-QS--LAE-F-	-QYN-Y-W-	-----L--	-----
3	-----HKFM-TSV-----VT-	K---VGTNVA	----PGQ--KA--Y	S--YRY-	-V-D--T-----TD---T-SN-QS--LAE-F-	-QYN-Y-LL-	--A-----I--	-----

VH

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
1	EVKLVQSGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFT	SYWMH	WVKQRPGQGLEWIG	AIYPGNSDTSYNQKPKG	KAKLTAVTSASTAYMELSSLTNEDSAIVYICIR	EWDYYAMDY	WGQGTSTVTVSS
2	Q-QV-E--GG--K--G-L---A--F--S	--A-S	--R-T-EKR---VA	T-SS-G-Y-Y-PDSV--	RFTISRDNAKN-L-LQM---RS--T-M---A-	QRRDGSIWYFDV	--A--T-----
3	E-QL-E--GG--Q--G-L---A--F--S	--G-S	--R-T-DKR---VA	T-SS-G-Y-Y-PDSV--	RFTISRDNAKN-L-LQM---KS--T-M---A-	HYGSSYYFDY	-----TL----



















	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)	(G)	(H)
anti-KDR-1								
anti-KDR-2								
anti-KDR-3								

Fig.6 Binding specificity of anti-KDR scFvs

(A) Native human KDR Fc chimera, (B) human TNFR2 Fc chimera, (C) luciferase, (D) BSA, (E) human importin- α , (F) human importin- β , (G) and denatured human KDR (100 ng each) were dot blotted on nitrocellulose membrane and then the purified anti-KDR scFvs antibodies was reacted in the wells. (H) No protein were blotted. Binding properties of anti-KDR scFv antibodies was measured by CCD image analyzer.








	KDR (10 ng)	KDR (1 ng)	KDR (100 pg)	KDR (10 pg)	none
anti-KDR-1					
anti-KDR-2					
anti-KDR-3					

Fig.7 Sensitivity of the anti-KDR scFvs for antigen detection

Anti-KDR scFv antibodies were reacted to KDR-Fc chimera (10 ng, 1 ng, 100 pg and 10 pg in each spot) immobilized on the nitrocellulose membrane using dot blot manifold. Experimental protocol was described in the section of materials and methods.

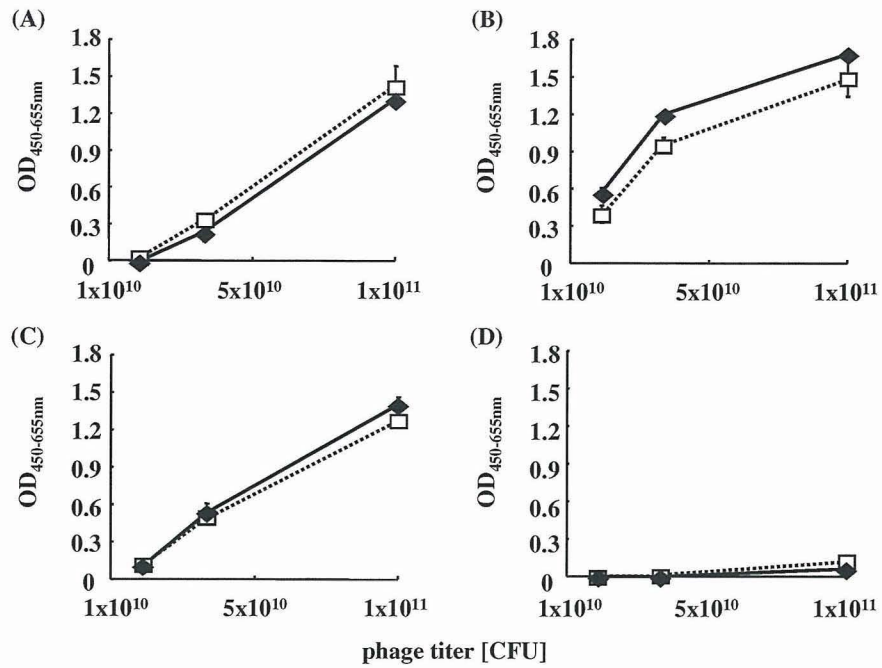


Fig.8 Binding properties of the isolated scFvs to human and murine KDRs

Binding properties to human KDR or murine KDR of anti-KDR-1,2,3 were measured by ELISA. (A) anti-KDR-1, (B) anti-KDR-2, (C) anti-KDR-3, (D) negative control (anti-Luciferase) (◆) human KDR, (□) mouse KDR

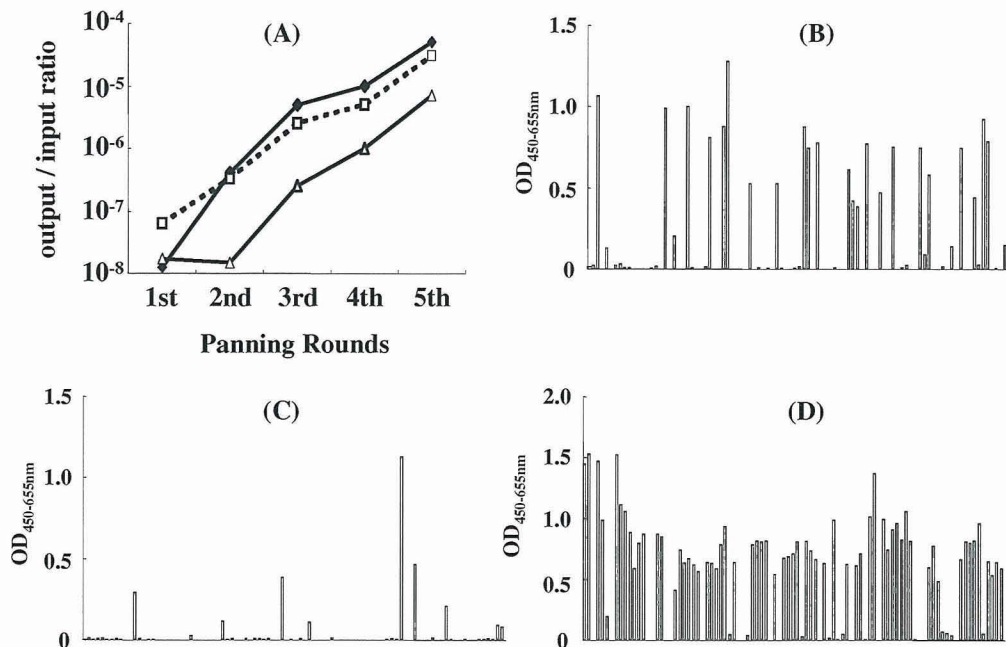


Fig.9 Enrichment of scFv library to various disease-related proteins

Enrichment of the desired clones was performed by affinity panning on the immobilized various antigens using BIAcore®. (A) The ratio of phage titer at each panning round was plotted. (◆) luciferase, (□) Bid, (△) importin-β (B) After the fifth panning on various antigens, the binding properties of the selected phage clones were analyzed by ELISA. (B) luciferase, (C) Bid, (D) importin-β.

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Imai S, Mukai Y, Nagano K, Shibata H, Sugita T, Abe Y, Nomura T, Tsutsumi Y, Kamada H, Nakagawa S, Tsunoda S.	Quality enhancement of the non-immune phage scFv library to isolate effective antibodies	Biol Pharm Bull	29	1325-1330	2006
Mukai Y., Sugita T., Yamato T., Yamanada N., Shibata H., Imai S., Abe Y., Nagano K., Nomura T., Tsutsumi Y., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S.	Creation of novel protein transduction domain (PTD) mutants by a phage display-based high-throughput screening system	Biol Pharm Bull	29	1570-1574	2006
Kawamura M., Shibata H., Kamada H., Okamoto T., Mukai Y., Sugita T., Abe Y., Imai S., Nomura T., Nagano K., Mayumi T., Nakagawa S., Tsutsumi Y., Tsunoda S.	A novel method for construction of gene fragment library to searching epitopes	Biochem Biophys Res Commun.	346	198-204	2006
Kamada H., Okamoto T., Kawamura M., Shibata H., Abe Y., Ohkawa A., Nomura T., Sato M., Mukai Y., Sugita T., Imai S., Nagano K., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T., Tsunoda S.	Creation of novel cell-penetrating peptides for intracellular drug delivery using systematic phage display technology originated from Tat transduction domain	Biol Pharm Bull	30	218-223	2007
Nomura T., Kawamura M., Shibata S., Abe Y., Ohkawa A., Mukai Y., Sugita T., Imai S., Nagano K., Okamoto T., Tsutsumi Y., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S.	Creation of novel cell penetrating peptide, using random 18mer peptides library	Pharmazie		In press	

Highlighted paper selected by Editor-in-chief

Quality Enhancement of the Non-immune Phage scFv Library to Isolate Effective Antibodies

Sunao IMAI,^{a,b,#} Yohei MUKAI,^{a,b,#} Kazuya NAGANO,^{a,b} Hiroko SHIBATA,^{a,b} Toshiki SUGITA,^{a,b}
Yasuhiro ABE,^{a,b} Tetsuya NOMURA,^{a,b} Yasuo TSUTSUMI,^{a,b} Haruhiko KAMADA,^a
Shinsaku NAKAGAWA,^b and Shin-ichi TSUNODA^{*,a}

^aLaboratory of Pharmaceutical Proteomics, National Institute of Biomedical Innovation (NiBio); 7–6–8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567–0085, Japan; and ^bDepartment of Biopharmaceutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University; 1–6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565–0871, Japan.

Received February 17, 2006; accepted March 23, 2006

The non-immune phage antibody library system is one of the most attractive technologies available to current therapeutic, diagnostic and basic scientific research. This system allows the rapid isolation of antibodies of interest that could subsequently be applied directly to drug delivery systems and antibody therapy. Previously, we reported the primer sets to encompass the antibody repertoire and thus improve library quality. However, a wide number of varying primer sets cause to decrease the amplification efficiency of antibody genes. In the present study, we re-generated the library primer sets newly and constructed an improved library from non-immune mice that was far superior in terms of variety and quality. This new library contained 2.4 billion independent clones. In addition, we optimized the selection step from this library to isolate high-affinity antibodies. The optimization of an affinity panning protocol by the incorporation of an automated Microfluidics instrument led to the successful isolation of three different monoclonal antibodies for human vascular endothelial growth factor receptor 2 (KDR). These antibodies were demonstrated to exhibit high specificity and were able to detect a mere 0.6 fmol of KDR by dot blot analysis. Previously reported antibodies for luciferase were also isolated successfully from this library. Our results clearly demonstrate the importance of the improved protocol for the library preparation of antibodies and the resulting isolation of antibodies for clinical and research applications.

Key words non-immune antibody library; phage display system; single-chain Fv; high-throughput screening; vascular endothelial growth factor receptor 2

Monoclonal antibodies are not only highly regarded as reagents for basic biochemical research but also for clinical diagnostic and therapeutic applications.^{1–4)} The production of a monoclonal antibody is laborious and time-consuming using established methodology involving the immunization of animals with large amounts of antigen, the isolation of B cells and the production of antibody-producing hybridomas. Therefore, the development of a rapid and easy method to produce monoclonal antibodies is highly desirable as an alternative to conventional hybridoma technology.^{5,6)}

Over recent years, phage display library technology has received a great deal of attention in terms of antibody production.^{7–10)} The phage display system is able to construct a large repertoire of protein or peptide libraries consisting of hundreds of millions of molecules. The phage antibody library which displays the single chain Fv fragment (scFv) of immunoglobulin is one of the most promising applications of the phage display system. Monoclonal antibodies against target antigens are obtained rapidly by the use of an affinity panning procedure *in vitro* which selects and amplifies the phage clones specific for the antigen required. There are two different types of phage antibody library system: the immune library made by using B cells isolated from patients or immunized animals as a gene source,¹¹⁾ and the non-immune library made by using B cells isolated from healthy persons or non-immunized animals.^{12,13)} By using the non-immune library, antibodies for vast number of different kinds of antigens can be isolated without the need for *in vivo* immunization. However, several studies report that the common non-immune scFv libraries do not function effectively because of

inefficiencies related to library preparation. The first problem associated with scFv library preparation is poor coverage of the PCR primer set used to amplify immunoglobulin genes. The second problem relates to the complicated procedure associated with the 3 fragment assembly which connects the VL and VH gene to a linker sequence. This assembly process is inefficient and often cause sequence frame shifts resulting in poor library quality.

In an attempt to overcome these problems, we previously attempted to construct a higher quality library by preparing an scFv library with improved PCR primer sets.¹⁴⁾ However, because the previous primer sets were constructed using mixed bases, the combinations of primer sets available to amplify the VL and VH fragments amounted to approximately two billion and six billion sets, respectively. Therefore, the ratio of one primer contained in primer sets was extremely low. In addition, because the amplification efficiency of PCR was extremely low, it was possible to incur bias in the amplification of antibody genes. Moreover, antibodies could not be isolated to some antigens using the previous library. In order to prepare a much better quality scFv gene library, it is necessary to re-design new primer sets for which the amplification efficiency of PCR is extremely high.

In the present study, we re-generated the original primer sets to remove any unnecessary primer variation whilst taking care to maintain sufficient diversity to encompass a wide variety of antibody genes. Using this new primer set, we were able to amplify antibody genes effectively and prepare a much better quality scFv gene library. Furthermore, we optimized the use of antibody selection methods with this new li-

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: tsunoda@nibio.go.jp

These authors contributed equally to the work.

brary and successfully isolated several high affinity clones specific for a tumor endothelial marker, KDR.^{15,16)}

MATERIALS AND METHODS

Construction of scFv Genes Total RNA was extracted from spleen cells and femoral bone marrow cells prepared from non-immunized 6-week-old male C57BL/6, Balb/c, and C3H mice. The mRNA was purified using a mRNA Purification Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, U.S.A.) and first-strand cDNA was synthesized with the SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.). From each cDNA, immunoglobulin heavy-chain and light-chain genes were separately amplified and recombined by three subsequent PCR reactions as follows. In the first-step PCR, variable regions of the heavy and light chain genes (VH and VL) were amplified. The light chain 5' primers were modified to include an *Nco*I site, and heavy chain 3' primers to include a *Not*I site. Light chain 3' primers were designed to assemble with heavy chain 5' primers (Fig. 1). Light and heavy chain variable region genes were amplified by PCR reaction containing 1 µl of RT PCR products (cDNA) and 2 pmol of each primer set. The samples were cycled 35 times at 96 °C for 60 s, 50 °C for 60 s, and 68 °C for 60 s. The PCR products were then purified using a QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Valencia, CA, U.S.A.). In the second PCR, equal amounts of the previously amplified VL and VH DNA were mixed and cycled 20 times at 96 °C for 60 s, 63 °C for 60 s, and 68 °C for 60 s without primers. The resulting PCR products, the scFv gene library, were then purified using a QIAquick PCR Purification Kit. In the third-step, the additional sequences were extended from *Nco*I and *Not*I sites upstream of the scFv gene library by overlap PCR using primer Y15 (5'-GCCAAGCTTTGGAGCCTTTTTTTTTGGAGATTTTCAACGTG-AAAAAATTATTATTCGCAATTCCTTTAGTTGTTCCCTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCC-3') and primer Y16 (5'-TTAGTAAATGAATTTTCTGTATGAGGTTTTGCTAAACAATTTC AACAGTCTATGCGGCACGCGGTTCCACGGATCCGGATACGGCACCGGCGCACCTGCGGC-CGC-3') by cycling 35 times at 96 °C for 60 s, 65 °C for 60 s, and 68 °C for 60 s.

Construction of Non-immune Mouse scFv Phage Libraries and DNA Sequencing The PCR amplified scFv genes and pCANTAB5E phagemid vector were digested with *Nco*I and *Not*I. The resultant scFv fragments were inserted into the pCANTAB5E vector to generate a scFv-gene III fusion library, using T4 ligase (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, U.S.A.) at 16 °C for 16 h. The ligated product, *E. coli* TG1 was transformed by electroporation and grown at 37 °C on culture plates containing 2YT medium supplemented with 100 µg/ml ampicillin and 2% glucose (2YTAG medium). Twelve clones were selected at random and insert plasmid DNA was sequenced and analyzed.

Phage Purification A scFv phage library containing 2.4×10^9 clones was used for the affinity selection. Glycerol stocks of the scFv library were grown in the log phase, rescued with M13KO7 helper phage (Invitrogen) and then amplified at 37 °C for 6 h in 2YT medium supplemented with 100 µg/ml ampicillin and 50 µg/ml kanamycin. The phage was subsequently precipitated with PEG-NaCl (4% PEG,

0.5 M NaCl) and then resuspended in NTE buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris, and 1 mM EDTA).

Affinity Panning Affinity panning was performed by using the BIAcore 3000 system (BIAcore, Uppsala, Sweden). The sensor chip CM3 (BIAcore) was modified with 5 µg of antigen (KDR-Fc chimera; R&D systems Inc., Minneapolis, MN, U.S.A.) or luciferase (Promega Co., Madison, WI, U.S.A.). The scFv phage library was then incubated with 50% HBS-EP buffer (BIAcore) and loaded onto the antigen-immobilized sensor chip. After the binding step, the sensor chip was rinsed with HBS-EPT (HBS-EP containing 0.05% Tween 20). Bound phage was then eluted with Glycine-HCl buffer (pH 2) and Glycine-NaOH buffer (pH 11). These processes were regulated by BIAcore Control Software. The eluted phage was then incubated in log phase TG1 cells and glycerol stocks prepared for further repeat panning cycles. Phage titer was measured by counting the number of infected colony cells on Petrifilm (3M Co., St. Paul, MN, U.S.A.).

Phage ELISA Following the panning process, individual TG1 clones were picked, grown at 37 °C in 96-well plates and then rescued *via* M13KO7 helper phage infection. The amplified phage preparation was then blocked with 2% Block Ace (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Osaka, Japan) at 4 °C for 1 h and then added to an immunoassay plate

VL Forward	5'-cccttctatgcgccagccggccCATGGcc-	
	-GAYATTGTCWCCCACTC -3'	-GAYRTTKTGATGACCCAVAC -3'
	-GAYATTSTGNTSACYCAGTC -3'	-GAYATYCAGATGACACAGAC -3'
	-GAYATTGTTGNTMACCTCAGTC -3'	-GAYATTGTTGATGACACBACC -3'
	-GAYATTGTTGHTRWCAAGTC -3'	-GAYATCCAGCTGACTCAGCC -3'
	-GAYATTGTTGATGACBCAGTC -3'	-GAYATTGTTGATGACBCAGTC -3'
	-GAYATTMAGATRAMCCAGTC -3'	-GAYATTGTTGATAACYCAGGA -3'
	-GAYATTCCAGATGAYDCAGTC -3'	-GAYATTGTTGATGACCCAGWT -3'
	-GAYATTGTTGCTGACTCAGTC -3'	-GAYGTGTTGNTSACYCAGTC -3'
	-GAYATTGTTCTCACCAGTC -3'	-GAYGCTGTTGTTACTCAGGAATC -3'
-GAYATTGTTGCTSACCCAATC -3'	-GAYATTGTTGHTVWCHCAGTC -3'	
-GAYATTSTRATGACCCARTC -3'		
VL Reverse	5'-accagagccgcccgcgctaccaccaccacc-	
	-CCGTTTGTATTCCARCTTTC -3'	-CCGTTTWTATTCCAACTTTG -3'
	-CCGTTTATTTCAGCTTTC -3'	-CCCTAGGACAGTCAGTTTTC -3'
	-CCGTTTSAGCTCCAGCTTTC -3'	
VH Forward	5'-agcggcggcggcggcctctggtggtggtggaatcc-	
	-GAKGTRMAGCTTCAGGAGTC -3'	-SAGGTGCAGSRGGTGGAGTC -3'
	-GAGGTCNACGCTBCAGCAGTC -3'	-GAKGTGCMCTGGTGGAGTC -3'
	-CAGGTGCAGCTGAAGSASTC -3'	-GAAGTGCAGVCTGGTGGAGTC -3'
	-CAGSTBCAGCTCAGCAGTC -3'	-GAGGTGAAGCTGATGGARTC -3'
	-GAGGTYCAGCTYACGAGTC -3'	-GAGCTGCARCTTGTGGAGTC -3'
	-GARGTCCARCTGCAACARTC -3'	-GARGTRAAGCTTCTCGAGTC -3'
	-CAGGTYCAGCTBCAGCARTC -3'	-GAAGTGAARSTTGGAGGTC -3'
	-CAGGTYCARCTKACGAGTC -3'	-GAAGTGTGCTGGTGGAGTC -3'
	-CAGGTCACGCTGAAGCAGTC -3'	-CAGGTTACTPTRAAGWGTSTG -3'
	-GAGGTGAASSTGGTGGARTC -3'	-CAGGTTCAAYTVCAGCAGTC -3'
	-GAVGTGAWGTYGTTGGAGTC -3'	-GATGTGAACCTGGAGGTC -3'
	-GAGGTGAAGSTCATCAGTC -3'	
VH Reverse	5'-cgccaccggcggcgaactCGGGCCGC-	
	-YGAGGAACAGCTGACCGTGGT -3'	-YGAGGAAGACTGTAGAGTGGT -3'
	-YGAGGAGACTGTGACAGTGGT -3'	-YGGCGGAGCAGTACAGCAGAGT -3'
	-YGAGGAGACGGTACTGAGRT -3'	
	-YGCAGAGACAGTACAGCAGAGT -3'	

S=G/C, R=G/A, K=G/T, M=A/C, Y=C/T, W=A/T, H=A/C/T,
B=C/G/T, V=A/C/G, D=A/G/T, N=A/T/G/C

Fig. 1. Primers for PCR Amplification of VL and VH

New primer sets were designed that allowed immunoglobulin genes to be amplified as efficiently as possible by referring previous reports and the Kabat Database. Linker sequences were added downstream of the VL gene primers and upstream of the VH gene primers so that the amplified VL and VH genes could be easily connected.

coated with the antigens. Plates were then incubated for 2–3 h, with agitation at 250 rpm, and were then washed three times with phosphate buffered saline/0.1% Tween 20 (PBST), and finally incubated with HRP-conjugated anti-M13 monoclonal antibody (Amersham Bioscience). Plates were then washed once more with PBST and then TMB peroxidase substrate (MOSS, INC.) was added. Absorbance was then measured at 450 nm and 655 nm as a reference.

Dot Blot Analysis Antigens were immobilized on nitrocellulose membranes using the Bio-Dot Microfiltration Apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A.). The membrane was incubated with blocking solution (10% skimmed milk, 25% glycerol) for 2 h and then washed twice with TBST (Tris buffered saline containing 0.1% Tween 20). The phage preparation was pre-incubated with 90% blocking solution at 4 °C for 1 h and then applied to each well. After 2–3 h incubation, the apparatus was washed five times with TBST and then incubated with HRP-conjugated anti-M13 monoclonal antibody. After three further washes with TBST and TBS, the membrane was treated with ECL-Plus reagent (Amersham Bioscience) and detected by use of a CCD image analyzer (LAS-3000, Fuji Photo Film Co. Ltd., Kanagawa, Japan).

RESULT AND DISCUSSION

In this study, we aimed to isolate a scFv monoclonal antibody from a non-immune antibody phage display library constructed using our improved PCR primer set. We specifically designed the primer sets to produce a non-immune antibody library that was superior in variety and accuracy than the past libraries (Fig. 1). To begin with, we re-designed

primers which allowed immunoglobulin genes to be amplified as efficiently as possible by excluding an unnecessary mixture of bases from the previous primer sets. The combinations of primers to amplify the VL and VH genes were approximately four thousand and three thousand sets, respectively. Furthermore, the combination of primer sets to construct a scFv gene was more than ten million. The diversity of this primer set increased by approximately 10000-fold in comparison with that of the past reports. In addition, by using these primer sets randomly, we confirmed that the PCR products were gotten from all reactions (data not shown). In addition, in accordance with our previous report, linker sequences were added downstream of the VL gene primers and upstream of the VH gene primers such that the amplified VL and VH genes were easily connected, thereby reducing the possibility of frame shift in the sequence. Using the modified primer sets, the non-immune murine scFv phage library was prepared by the method described in our previous report.¹⁴⁾

The titer of the resultant scFv phage library was 2.4×10^9 cfu. The repertoire of this library was as diverse as that of the library previously reported. DNA sequence analysis of twelve clones picked randomly from the library demonstrated no evidence of frame shift in the scFv genes (Fig. 2). Because the diversity of the CDR3 domain that is important for antigen binding is estimated to be in the region of twenty million, we suggest that our new scFv library has almost equal potential as the murine or human immune system.^{18,19)} Additionally, because the pIII protein of phage is generally toxic against *E. coli*, it was likely that contamination of the plasmid coding for the frame-shifted scFv gene promotes the production of the wild type phage that does not display antibody (data not shown). This means that we could not isolate

VL

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	Linker
1	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSTIC	KASQDVSTAVA	WYQQKPGQSPKLLIY	SASRYYS	GVPDRFTGSGSGTDFLTISNVAQEDLAVYYC	OQYNSVYPYT	FGGGTKLEIKR	GGGSGGGGSGGGGS
2	-----PSS-YA-L-E--T---	----INSYLS	-F-----K--T---	R-NRLVD	--S--S---Q--YS---SLEY--MGI---	LLSIVSS--	-----KLEIKR	-----
3	-----TPI,TL-VTI-QPA--S-	-S-SLLDSGKTYLN	-LL-R-----R---	LV-KLD-	-----K--R-E---G---	W-GTHF-R-	-----	-----
4	--Q---AAPSPVPTP-ES---S-	RS-KSLHSDCNTYLY	-FL-R-----Q---	RM-NLA-	-----S-----A--R--R-E---VG---	M-HLE--L-	--A-----	-----
5	-----Q-----V---	-----N-G-N--	-----A---	-----	-----S---E-F-	-----	-----	-----
6	--LL--Q-----V---	-----N-G-N--	-----A---	W--T-HT	-----Y---S---L---	--HY-T-L-	--A---LE-	-----
7	--E---Q-----V---	-----N-G-N--	-----A---	-----	-----S---E-F-	-----L-	-----L-	-----
8	N-----Q-----V---	-----N-G-N--	-----A---	YT-RLH-	-----S---E-F-	-----L-	-----L-	-----
9	-----PAI-A--P-EK-TM--	S-SS-SYXH	-----S-T---RW--	DT-KLA-	--A--S-----SYS---R-E--A-T---	--WS-N-P-	--A-----	-----
10	-----	-----	-----	W--TRHT	-----S---E-F-	-----	-----L-	-----
11	--LN-----	-----	-----	-----T	-----F--S-----	--HY-T---	-----L-	-----
12	-----	-----G---	-----	W--T-HT	-----Y---S---L---	--HY-T---	-----	-----

VH

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
1	EVQLVESGGLVKPGGSLKRLKCAASGPTFS	SYGMS	HVRQTPEKGLENVA	YISSGGSTIYPDSVKG	RFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCAR	GGGVFYDY	WGQGTTLTVSS
2	Q---Q-Q-AE-----A-V-I--K---YA--	--W-N	--K-R-G-----IG	Q-YF-DGD-N-NGKF--	KA-LTA-KSSS-A-MQL---T---S-V-F--G	GTYFYDY	-----
3	D-H-----R-----	-----R-----	-----R-----	-----GN-----	-----R-----R-----	GHY	-----
4	--HW-----	D---H	---A-----	---S--I--A-T---	-----F--T--R-----	LTIVVDY	-----
5	--K-----Q-----	-----	-----D-R--L-	T-N-N-GS-----	-----	DGNLILLY	---LV---
6	--N-----	--T---	-----R-----	-----GN-----	-----R-----R-----	RGNYYDYDGYFDV	--A--V---
7	-----Q-----	---H	---A-----	---S--I--A-T---	-----P-----F-----T---	GTNWDYFDY	-----
8	--K---E-----	--A--	-----R-----	---DYI--A-T---	-----P-----	EERYYPDY	-----
9	--M---E---Q--S--M---T---	D-V-A	-----	N-NYD--S--L--L-S	--I-----I-----T---	DLYYFDY	-----
10	--R-----	--A--	-----R-----	T--D---Y-----	-----N-----K	HGGSSYGFAY	---LV---
11	--K---E---Q--S--M---T---	D-V-A	---V-----	N-NYD--S--L--L-S	--I-----I-----T---	RGSTVCFDY	-----
12	Q---Q-Q-AE-----A-V-I--K---YA--	SSWM-N	--K-R-G-----IG	R-YF-DGD-N-NGKF--	KA-LTA-KSSS-A-MQL---T---S-V-F--G	DDD	-----

Fig. 2. Predicted Amino Acid Sequences of Non-immune Library
 Amino acid sequences of 12 clones which were randomly picked from the library and analyzed by DNA sequence.