

200812008A

200812008B

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

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20年度 総括報告書
平成18～20年度 総合研究報告書**

研究代表者 角田 慎一

平成21(2009)年4月

目次

総括研究報告書

- 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 14
- III. 研究成果の刊行物・別刷 15

総合研究報告書

- I. 総合研究報告
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 46
- II. 研究成果の刊行に関する一覧表 65
- III. 研究成果の刊行物・別刷 68

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

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～20年度 総合研究報告書

研究代表者 角田 慎一

平成21(2009)年 4月

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

研究代表者 角田 慎一

独立行政法人医薬基盤研究所 基盤的研究部 サブプロジェクトリーダー

研究要旨

本研究では、細胞内で機能する一本鎖化Fv(scFv)抗体、あるいは細胞内発現型抗体（イントラボディ）を創出し、疾患関連蛋白質の機能解析・機能制御に応用することを目的に、①簡便かつ迅速に、微量の抗原蛋白質に対する抗体を創製可能な抗体ライブラリおよび、そのスクリーニング法の確立、②それら抗体と蛍光蛋白等との結合体を用い、蛍光分子イメージング技術を活用することで、細胞内疾患関連蛋白質の動態や蛋白間相互作用等を効率よく解析できる技術の開発を目指すものである。

蛋白質の特異的標識には抗体が最も優れたツールとなるが、通常の抗体では生細胞中の多種多様な蛋白質の解析に迅速に対応することができない。そこで本研究ではファージ抗体ライブラリによる抗体の迅速・網羅的創製技術、およびそれにより得られる低分子 scFv 抗体の細胞内での応用（イントラボディ）を試みた。まず、*in vitro* で迅速に種々の抗原に対する scFv 抗体を単離可能とする高品質マウス由来抗体ライブラリの構築を行った。抗体遺伝子増幅用プライマーセットの改良等により、多様性に優れたナイーブファージ抗体ライブラリを構築することに成功し、得られたライブラリを用いることで、種々の蛋白質に対するモノクローナル抗体（ファージ scFv 抗体）を *in vitro* で数週間以内に取得可能であることを明らかとした。さらに、本抗体ライブラリを利用することにより、疾患プロテオミクス研究で汎用される二次元ディフェレンシャル電気泳動（2D-DIGE）解析によって同定・回収される、微量の疾患関連蛋白質を抗原として、ダイレクトに抗体を創製しうる技術を確立した。本技術では、わずか0.5ngという極微量の蛋白質を用意できれば、それらに対する抗体を一挙に、かつ短時間で作製可能であることを明らかとした。そこで、本抗体創製技術を用いて癌関連蛋白質の同定を試みたところ、20種類の候補蛋白質を2D-DIGEにより見出した。2D-DIGEゲルから回収した蛋白質の一部を用いて、質量分析により蛋白質を同定し、同時に抗体の単離を試みたところ、全ての候補蛋白質に対する抗体を取得することに成功した。このように、プロテオミクスで同定できる多数の蛋白質に対し、わずか数週間で網羅的に抗体を創製可能な本技術は、極めて有用であると考えられる。さらに、同定した蛋白質の中の機能未知分子の解析を目的に、取得した scFv 抗体を蛍光蛋白質との融合蛋白質をとして細胞内で発現させ、蛍光イメージング解析を試みたところ、細胞内の当該標的分子を可視化できる可能性が示唆された。今後、さらなる最適化等が必要であるが、本研究で開発した技術は、疾患プロテオミクスによる創薬ターゲット、バイオマーカー候補の探索から、可視化機能解析までの絞り込みを効率化し、創薬研究を大きく加速するものと期待される。

A. 研究目的

細胞の中で遺伝子(ゲノム)の機能を具現する主たるものは、蛋白質(プロテオーム)である。また多くの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と蛋白質との間に量的相関関係が成立しない場合も多く、トランスクリプトームレベルの発現解析だけでは生命現象の解明に十分な情報を得ることができない。そのため、疾患プロテオミクスのアプローチにより、疾患の発症や悪化、治癒に至る分

子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、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未だ乏しいのが現状である。これは、一般に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の候補が数百以上も存在しているため、蛋白質の生体内・細胞内挙動の解析をはじめとする各種機能解析に多大な時間と労力を要する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のである。したがって、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簡便に集積できる基盤技術が必要不可欠となっている。本観点から当該研究課題においては、抗体ライブラリ法を有効活用することにより、細胞内での疾患関連蛋白質の効率よい挙動解析技術の確立を目指す。具体的には、まず微量の疾患関連蛋白質に対する抗体を迅速・網羅的に創製する独自技術の確立を行い、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）をプローブとする新規蛍光イメージング技術の確立を試みる。本研究はプロテオミクスの成果を有効活用するものであり、疾患原因の解明や効率的な医薬品開発に寄与するものと期待される。

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秒間撹拌した。室温で3分間インキュベーションし、12000 \times g、4°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°Cで15分間遠心した。上清を除き、70% ethanol で wash し、7500 \times g、4°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°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°Cで50分間、85°Cで5分間反応させた。RNase H (Invitrogen) 1 μ l を加え、37°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°Cで1分間、伸長反応を68°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°Cで1分間、伸長反応を68°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 CAAGCTTTGGAGCCCTTTTTTTGGAGATTTCACGTGAAAA AATTATTATTCGCAAT TCCTTTAGTGTTCCTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCC-

3')、及びNcoI サイトを有するプライマーY16 (5' -TTAGTAAATGAATTTCTGTATGAGGTTTCTAAACAACTTTCAACAGTCTATGCGGCACGGTTCACGGATCCGGATACGGCACCGGCGCACCTGCGGCCG-3')を用い、アニーリング温度を65°Cで1分間、伸長反応を68°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=0.3⁰.6 まで培養した大腸菌 TGI (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 TGI とした。本 TGI 50 μ l に対して、精製後のライゲーション産物 1 μ l を添加し、GenePulser Xcell (Bio-Rad) を用い、1.8 kV、0.25 μ F、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 μ g/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。

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 TGI 株にエレクトロポレーションし、その適量を 50 μ g/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 μ g/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 = 0.3⁰.6 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 μ g/ml Ampicillin、50 μ g/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 μ m 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 μ g/ml に調製した蛋白質を 100 μ l 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 μ l と 2% Glucose 含有 2YT 培地を 250 μ l 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 TGI 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。

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。

B-2 微量疾患関連タンパク質に対する抗体作製技術

2D-DIGE

乳腺細胞株 184A1 と乳癌細胞株 SKBR3 をモデルとして使用し、各細胞を溶解処理後、各 50 µg のタンパク質をそれぞれ 400 pmol のラベル化試薬 cy2, cy3, cy5 で標識し混合した。また、蛋白質を回収するための pick ゲル用に、標識しないサンプルも同様に混合調製した。IPG-gel (pH 5-6) スリッパ と

ETtan IPGPhor を用いて、上記サンプルの等電点電気泳動を行い、泳動終了後、IPG-gel を平衡化し、Ettan Daltsix Electrophoresis System と、acrylamide と diallyltartardiamide (DATD) を混合して調製したゲルを用いて、2次元目の電気泳動を行った。pick 用ゲルは Deep purple を用いて一晩染色し、脱色液により脱色を行った。解析には、Typhoon scanner、Ettan DIGE を使用し、spot pick には Ettan Spot Picker を使用した。回収した spot ゲルに 88mM NaIO₄ を用いてゲルを溶解し、蛋白質を抽出した。この蛋白質を抗原として以下のパンニング操作を行った。

ファージ抗体ライブラリを用いた dot blot パンニング

2D-DIGE から回収されたスポットゲル由来のタンパク質の 1/10 量をドットプロット装置 (Bio-Dot Microfiltration Apparatus) を用い、ニトロセルロース膜上に固相化した。前年度確立した dot blot パンニング法にパンニングを行った後、output ファージ溶液に 2% Glucose 含有 2YT 培地を加え、その一部を Petrifilm に播種し、37°C で一晩培養し、得られた形質転換コロニー数を計測した。残りのファージを大腸菌 TGI 株に感染させ、増殖させた後、ファージを産出し、パンニング操作を 4 回繰り返した。

Dot Blot を用いたスクリーニング

2D-DIGE spot から抽出したタンパク質を Bio-Dot Microfiltration Apparatus を用い、1 ng/well になるようにニトロセルロース膜上に固相化した。Blocking buffer (10% skim milk & 25% glycerol) を添加して、室温で 2 時間静置した後、TBS で 1 回洗浄後、大腸菌を用いてモノクローン化したファージ抗体および blocking buffer を添加し、室温で 2 時間静置した。0.1% TBST で 10 回洗浄後、HRP/anti-M13 monoclonal antibody を添加し、室温で 1 時間静置した。TBST で 3 回洗浄後、ECL plus を用いて発色させ、LAS3000 イメージャーを用いて発色度合いを定量的解析した。

MS による蛋白質の同定

Spot picker によって回収したゲル断片を洗浄後、trypsin 消化を行った。その後、50% アセトニトリルと 5% TFA を用いて、消化されたタンパク質由来ペプチドを回収した。このペプチド溶液を Speed vac で濃縮し、質量分析計 (AutoFlexII MS/MS) を用いて、蛋白質を同定した。

ファージ ELISA

各種抗原タンパク質 (TRAIL-R2, KDR, TNFR1, caspase-8, importin- α) を 1 μ g/ml に希釈し、室温で 96 穴プレート上に 8 時間固相化後、4% BSA でブロッキングした。PBS で 1 回洗浄後、サンプルを添加し、室温で 2 時間培養した。PBST で 3 回洗浄後、HRP/anti-M13 monoclonal antibody を添加し、室温で 1 時間静置した。その後、PBST で 3 回洗浄し、基質溶液を加え発色を行い、吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

ファージ免疫染色

乳腺、および乳癌細胞株を 24well プレートに播種後、氷冷メタノールを用いて細胞の固定化を行った。PBS で洗浄後、Biotin Blocking System と 5% BSA を用いてブロッキングした。ブロッキング後、PBS で洗浄し、 1×10^{12} CFU に調製したファージを添加し、室温で 2h インキュベーションした。PBST で 3 回洗浄後、HRP/anti-M13 monoclonal antibody を添加し、1h 静置した。さらに PBST で 3 回洗浄後、Streptavidin/AP を加え、1h インキュベーションした。最後に PBST で 3 回洗浄後、Liquid Permanent Red により発色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。

B-3 ファージペプチドライブラリによる改良型 PTD の創出

Tat 改変体ライブラリ-1 の構築

PCR 法を用い、アルギニン以外のアミノ酸をコードする塩基コドン、全 20 種類のアミノ酸をコードするランダムな塩基配列 (NNS 配列; N = A/T/G/C, S = G/C) に置換した遺伝子ライブラリを調製した。pY03' mTNF FLAG をテンプレートに、PCR プライマー: Y-oligo22 3' ex と Tat11 (47-57) R を用い、

PCR (95°C, 1 min → 65°C, 1 min → 68°C, 1 min, 35 サイクル)により Tat 変異体遺伝子を増幅した。得られた PCR 産物を QIAquick PCR purification kit で精製後、Hin d III (Toyobo, Co., Ltd.) 及び Not I (Toyobo, Co., Ltd.) によって処理した。あらかじめ Hin d III, Not I で処理したファージミドベクター-pY03' FLAG へ、T4 ligase (Roche Diagnostics) 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 Eco 81 I 及び Alkaline phosphatase (Toyobo, Co., Ltd.) で処理し、QIAquick PCR purification kit で精製した。あらかじめ 2YT 培地 30 ml で OD600 = 0.4 まで培養し、ミリ Q 水で 3 回洗浄操作を行い、10%グリセロール溶液で 200 μ l に懸濁し氷冷しておいた大腸菌 TGI に対して、精製後の溶液 10 μ l を添加し、Gene purser II (Bio-Rad) を用い、2.5 kV, 0.25 μ F, 200 \cdot でエレクトロポレーションを行った。その後、2%グルコース含有 2YT 培地を添加し、1 時間培養した後、その一部をとって 50 μ g/ml アンピシリン (Sigma-Aldrich, Inc.)、2%グルコース含有 2YT 培地で段階希釈した後、クローンディスク (TAKARA BIO, Inc.) に播種し、一晚培養した。得られた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。

Tat 変異体ライブラリ-2 の構築

PCR 法を用い、Tat 配列中の 10 個のアミノ酸 (下線部が変異アミノ酸: GRKRRRQRRRPPQ) をコードする塩基コドンを含、全 20 種類のアミノ酸をコードする NNS 配列に置換した遺伝子ライブラリを調製した。プライマー: P-oligo1 と P-oligo2 (表 1) をアニーリング (96°C, 10 min → 72°C, 5 min → 68°C, 5 min → 37°C, 5 min, 各段階を 0.01 °C/sec) させた。この反応液に Klenow Fragment (Toyobo, Co., Ltd.) 1 μ l, 10 mM dNTP (Sigma-Aldrich, Inc) 1 μ l, 10 x klenow Buffer 1 μ l, DW 7 μ l を添加し、37°C で 1 時間反応させた。得られた産物を QIAquick PCR purification kit で精製し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH) で目的の遺伝子を抽出した。抽出後のサンプル 0.5 μ l をテンプレートとし、pCANTAB HindIII 及び Not I extension

を用い、PCR (96°C, 1 min → 65°C, 1 min → 68°C, 1 min, 35 サイクル) により、Tat 変異体遺伝子を増幅した。得られた PCR 産物を QIAquick PCR purification kit で精製後、Hin d III 及び Not I によって処理した。あらかじめ Hin d III, Not I で処理したファージミドベクター-pY03' FLAG へ、T4 ligase を用いて 16°C, 16 時間ライゲーション反応を行った。あらかじめ 2YT 培地 30 ml で OD600 = 0.4 まで培養し、ミリ Q 水で 3 回洗浄操作を行い、10%グリセロール溶液で 200 μ l に懸濁し氷冷しておいた大腸菌 TGI に対して、精製後の溶液 10 μ l を添加し、Gene purser II を用い、2.5 kV, 0.25 μ F, 200 Ω でエレクトロポレーションを行った。その後、2%グルコース含有 2YT 培地を添加し、1 時間培養した後、その一部をとって 50 μ g/ml アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地で段階希釈した後、クローンディスクに播種し、一晚培養した。得られた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。

ランダム 18 mer ペプチド発現ファージライブラリの作製

PCR 法を用い、ランダムな 18 アミノ酸をコードする遺伝子ライブラリを調製した。プライマー: P-oligo1 と P-oligo4 をアニーリング (96°C, 10 min → 72°C, 5 min → 68°C, 5 min → 37°C, 5 min, 各段階を 0.01 °C/sec) させた。この反応液に Klenow Fragment 1 μ l, 10 mM dNTP 1 μ l, 10 x klenow Buffer 1 μ l, DW 7 μ l を添加し、37°C で 1 時間反応させた。得られた産物を QIAquick PCR purification kit で精製し、QIAquick Gel Extraction Kit で目的の遺伝子を抽出した。抽出後のサンプル 0.5 μ l をテンプレートとし、pCANTAB HindIII 及び Not I extension を用い、PCR (96°C, 1 min → 65°C, 1 min → 68°C, 1 min, 35 サイクル) により、ランダムな 18 アミノ酸をコードする遺伝子を増幅した。得られた PCR 産物を QIAquick PCR purification kit で精製後、Hin d III 及び Not I によって処理した。あらかじめ Hin d III, Not I で処理したファージミドベクター-pY03' FLAG へ、T4 ligase を用いて 16°C, 16 時間ライゲーション

オン反応を行った。あらかじめ 2YT 培地 30 ml で OD600 = 0.4 まで培養し、ミリ Q 水で 3 回洗浄操作を行い、10%グリセロール溶液で 200 μ l に懸濁し氷冷しておいた大腸菌 TG1 に対して、精製後の溶液 10 μ l を添加し、Gene purser II を用い、2.5 kV、0.25 μ F、200 \cdot でエレクトロポレーションを行った。その後、2%グルコース含有 2YT 培地を添加し、1 時間培養した後、その一部をとって 50 μ g/ml アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地で段階希釈した後、クローンディスクに播種し、一晚培養した。得られた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。

シーケンズ解析

B-1 項に準じた。

ファージの作製

B-1 項に準じた。

Cell panning

24 穴プレート (Nalge NUNC International) に HaCaT 細胞を 5×10^5 cells/well で播種し、37°C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養した。PBS で 3 回洗浄した後、Opti-MEM I で希釈した 2% ウシ血清アルブミン (BSA) を用いて 37°C で 2 時間ブロッキングした。精製したファージについても等量の 2%BSA を用いて 4°C で 1 時間ブロッキングした。ブロッキングが終了したファージを HaCaT 細胞に加え、15 分ごとに振とうしながら 37°C で 2 時間培養した。この細胞を PBS で 20 回洗浄した後、50 mM HCl 1 ml を加えて 4°C で 10 分間培養した。このファージ溶出液を回収し、1 M Tris-HCl pH 8.0 500 μ l を添加し、その 50 μ l を用いて下記の方法に従いタイターを測定した。残りのファージ溶液は 2%グルコース含有 2YT 培地を 4.5 ml 加えて再度 TG1 に感染させ、増幅させて上記のファージ作製法に準じてファージを産出し、再度同様のパンニング操作を行ったものを 2nd、3rd パンニングとした。

PSIF 発現ベクターへの組換え

作製したライブラリ及び 3rd パンニング後のライ

ブラリから回収したプラスミドを Nco I 及び Not I で処理した。あらかじめ Nco I 及び Not I で処理した PSIF 発現ベクター-pY7 (pCANTAB5E に PSIF 発現コドンを組み込んだもの) にライゲーションキット Ver. 2 を用いて組み込むことで、ペプチドと PSIF との融合体を発現するプラスミドを構築した。

ペプチドと PSIF との融合体を含む培養上清の調整

ペプチドと PSIF との融合体を発現するプラスミドを TG1 にエレクトロポレーションにより導入し、得られたコロニーを 96 穴プレートヘラダムにピックアップして一晚培養した。50 μ g/ml アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地 100 μ l を新たに添加したプレートに、一晚培養した培養液 10 μ l を添加し、OD600 = 0.4~0.5 まで培養した。4°C、3000 rpm、20 分間遠心した後、上清を除き 1 mM IPTG、50 μ g/ml アンピシリン含有 2YT 培地 200 μ l を添加し、37°C で 12 時間培養した。再び 4°C、3000 rpm、20 分間遠心し、上清を回収して以降のスクリーニングに供した。

ペプチドの細胞内移行能の評価

96 穴プレートに Opti-MEM で 1.5×10^4 cells/well に希釈した HaCaT 細胞を播種し、終濃度 50 μ g/ml となるようにシクロヘキシミド (Wako Pure Chemicals) を添加した。続いて、上記の方法に従って調整した培養上清をそれぞれ 50 μ l ずつ加え、37°C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養した。その後、5 mg/ml の MIT (Wako Pure Chemicals) 溶液を 10 μ l 加え、さらに 37°C で 4 時間培養した。20% SDS/0.01 N HCl を 100 μ l 加え暗所で 4 時間静置することで、生成したホルマザンを溶解し、Benchmark Plus マイクロプレートリーダーで吸光度を測定 (Test wave length: 595 nm / Reference wave length: 655 nm) し、PSIF による細胞傷害性を指標にペプチドの細胞内移行能を評価した。また、viability は PSIF を発現しない TG1 の培養上清を加えた群を 100%、終濃度 1 mg/ml のシクロヘキシミドを加えた群を 0% として算出した。

B-4 免疫ライブラリによるscFv抗体作製

BALB/cマウスに対するproCASP8蛋白質の免疫

マウスはBALB/c(メス、6-7週齢、日本SLC)を用いた。proCASP8組み換え蛋白質を等量のTiter Max Gold (Sigma-Aldrich Corporation, USA) と混合し、エマルジョンとした。これを抗原蛋白質量として50 μ g/mouseとなるように、マウス頸部皮下、左脚筋肉内に数箇所に分けて投与した(1次免疫 day 0)。2週間後(day 14)に同様の方法でエマルジョンを作製し、追加免疫を行なった(2次免疫)。その1週間後(day 21)に眼底採血を行い後述する方法で血清中のproCASP8に対する抗体価を測定した。ELISAによる抗体価測定は次のように行った。免疫に用いたproCASP8蛋白質をB buffer (0.05 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6); Sigma-Aldrich Corporation, USA) で10 μ g/mLに希釈し、Maxisorb 96 well plateに100 μ L/well添加し、一晚4°Cで静置して固相した。PBSで洗浄後、4% Block Ace 300 μ Lを各wellに添加し、37°C、2時間でブロッキングした。PBSで洗浄後、0.4% Block Aceで段階希釈された血清それぞれを100 μ L/well添加し、室温で2時間反応させた。PBSTで3回洗浄後、HRP標識anti-mouse IgG抗体を0.4% Block Aceで50,000倍希釈したものを100 μ L/well添加し、1時間室温で反応させた。その後再びPBSTで3回洗浄後、基質溶液(TMBZ)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。

cDNAの作製

抗原特異的な抗体価の上昇が認められたマウスをペントバルビタールにより深麻酔し、脾細胞を回収した。50~100 mgの組織に対して1 mLのTRIzol reagent (Invitrogen Corporation, USA)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、12,000 \times g、4°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isopropylalcohol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、12,000 \times g、4°Cで15分間遠心した。上清を除き、70% ethanolでwashし、7500 \times g、4°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 Corporation, USA) 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°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 Corporation, USA) 1 μ L、SuperScript I I I RT (Invitrogen Corporation, USA) 1 μ Lを加えて、50°Cで50分間、85°Cで5分間反応させた。RNase H (Invitrogen Corporation, USA) 1 μ Lを加え、37°Cで20分間反応させ、脾細胞由来cDNAを得た。本cDNAを用いて、前年度確立した方法に準じて免疫ファージ抗体ライブラリを構築した。

アフィニティーパンニング

anti-FLAG M2 Agarose (Sigma-Aldrich Corporation, USA) 100 μ Lに、精製したscFv提示ファージライブラリを4% Block Aceと等量混合したinput溶液を100 mL添加した。4°Cで1時間、転倒混和させた。続いて0.1% Tween-20-PBSで5回洗浄後、1 mg/mLに調整した3XFLAG Peptide (Sigma-Aldrich Corporation, USA)を100 μ L添加し、40分間、4°Cで転倒混和することで結合ファージを溶出した。一方で、抗原を炭酸緩衝液で10 μ g/mLに希釈し、イムノプレートに4°Cで一晩固相化させた。4% Block Aceを添加し、37°Cで2時間ブロッキングした。これに上記3XFLAG Peptideで溶出したファージを100 μ L添加し、4°Cで1時間、インキュベートした。PBSTで洗浄後、10 mM glycine-HCl (pH 2.0)とglycine-NaOH (pH 11.0)をそれぞれ100 μ L添加し、結合ファージを溶出した。回収したファージ溶液は直ちに50 μ LのTris-HCl buffer (pH 8.0)で中和し、output溶液とした。outputファージは大腸菌TG1に感染させてモノクローン化した。各抗原蛋白質について、本

パンニング操作を2回繰り返し、ファージELISA、DNAシーケンスによりスクリーニングを行った。

B-5 抗体プロテオミクスによる乳癌関連蛋白質の探索

2D-DIGE

B-2項に準じた。

ファージ抗体ライブラリの作製

B-1項に準じた。

ファージ抗体ライブラリを用いた dot blot パンニング

B-2項に準じた。

Dot Blot を用いたスクリーニング

B-2項に準じた。

MSによる蛋白質の同定

ビックしたゲル片に100 μ lの脱色液(25 mM ammonium bicarbonate (Nacalai Tesque) / 50% acetonitrile (Nacalai Tesque))を加え、室温で10分振とうさせた後、液を除去することで脱色した。続いて200 μ lのacetonitrileを加え、ゲル片が白濁した後取り除き、遠心濃縮器(CENTRIFUGAL CONCENTRATOR, TOMY)によって乾燥させた。脱水したゲル片に5 μ lのtrypsin溶液(20 μ l/ml trypsin (Promega) / 50 mM ammonium bicarbonate)を加え、37°Cで16時間反応させることで、ゲル内の蛋白質を消化した。その後、ゲル片に抽出液(1回目は50 μ lの50% acetonitrile / 5% TFA溶液、2回目は50 μ lの80% acetonitrile / 5% TFA溶液、3回目は50 μ lの100% acetonitrile)を加え、3分間ソニケーションし、更に30分間ボルテックスした後の抽出液を回収するという操作を3回行うことでペプチドを抽出した。ペプチド抽出液は遠心濃縮器によって濃縮し、ZipTip C18チップ(Millipore)を用いて精製し、これをサンプル溶液とした。サンプル溶液1 μ lをPrespotted AnchorChip for Proteomics (BRUKER DALTONICS)に滴下し、乾燥させ、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行

時間型質量分析計(MALDI-TOF/MS/MS, autoflexII, BRUKER DALTONICS)により解析した。

ファージELISA

各種抗原タンパク質(TRAIL-R2, KDR, TNFR1, caspase-8, importin- α)を1 μ g/mlに希釈し、常温で96穴プレート上に8時間固相化後、4% BSAでブロッキングした。PBSで1回洗浄後、サンプルを添加し、室温で2時間培養した。PBSTで3回洗浄後、HRP/anti-M13 monoclonal antibodyを添加し、室温で1時間静置した。その後、PBSTで3回洗浄し、基質溶液を加え発色を行い、吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

ファージ抗体を用いた組織アレイ解析

市販のヒト正常・乳がん組織アレイ(US Biomax)とmulti組織アレイ(US Biomax)を用い、まず、キシレン・エタノールを使用して脱パラフィン処理を行った。脱パラフィンした組織アレイにDAKO Target Retrieval Solution pH 9 (DAKO)を浸して、125°Cで30秒、90°Cで30秒処理することで抗原賦活化を行った。組織アレイ染色の一連の操作には自動染色装置DAKO AutoStainer (DAKO)を使用した。ブロッキングにはDAKO Peroxidase-Blocking Reagent (DAKO)を5分及び10% BSAを30分インキュベーションすることで行った。その後 10^{13} CFU/mlファージを添加し、室温で1時間静置した。TBST(0.05% Tween 20を含むTBS)で5回洗浄後、anti-mouse M13 monoclonal Ab(100倍希釈)を添加し、30分静置した。(IgG型抗体の検討ではファージ抗体およびanti-mouse M13抗体の代わりに、50倍希釈したanti-TRAIL-R2 Ab (R&D systems)を使用) TBST(0.05% Tween 20を含むTBS)で3回洗浄後、ENVISION+ Dual Link (DAKO)を添加した。TBSTで3回洗浄後、DAB+ liquid (DAKO)を用いて発色させた。組織アレイの染色度合いに基づいた抗原発現レベルのスコア化に関しては、組織中のがん細胞領域で何割程度発現しているかを2段階で、発現の強度を3段階でスコア化し、両者の合計スコアが2以下の場合にネガティブ、3以上の場合にポジティブとして判定した。臨床情報との相関に関する統計解析には、

ソフトウェア StatView を使用した。

B-6 イントラボディによる可視化解析

anti-RREB1 scFvの哺乳類発現ベクターの構築

anti-RREB1 scFv遺伝子が組み込まれたファージミドベクターpCANTAB5Eを、制限酵素Nco I、およびNot Iで処理した。次いで、Venus (YFP mutant、理化学研究所 宮脇敏史博士より供与いただいた)があらかじめ組み込まれた哺乳類細胞用発現ベクターpTriExをNco I、およびNot Iで処理し、DNA Ligation Kit ver. 2.1を用いて、anti-RREB1 scFv遺伝子と16°C、30分間ライゲーション反応を行った。これにより、anti-RREB1 scFv-Venus融合蛍光蛋白質を哺乳類細胞内で発現するpTriEx aRREB1-Venusを得た。

anti-RREB1 scFvの細胞への遺伝子導入

12 well tissue culture plateを用い、 2×10^5 cells/wellにてヒト293-T細胞株を播種し、24時間培養した。1 μ g のpTriEx aRREB1-Venusプラスミドを、50 μ Lの無血清培地Opti-MEM (Invitrogen) で希釈した後、2.5 μ Lの遺伝子導入試薬FUGENE HD (ロッシュダイアグノスティクス)と複合体を形成させ、トランスフェクションを行った。

scFvの細胞内発現によるイメージング

上記方法により遺伝子導入した24時間後の細胞を、蛍光顕微鏡を観察し、蛋白質の局在の解析を行った。

C. 研究結果・考察

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り、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。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。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。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、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。

バ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。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。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 TGI 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。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。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。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。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らかとなった。

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。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量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らかとなった。

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。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。

C-2 微量疾患関連タンパク質に対する抗体作製技術の確立

先に確立したメンブランパンニング法を用い、モ

デル疾患サンプルとして乳癌細胞株 SKBR3 の 2D-DIGE 解析を行い、発現変動スポットを同定した。ピック用ゲルから発現変動スポットを切りだし、MS によるタンパク同定を行い、一方で、過ヨウ素酸によるゲル分解を行うことでタンパク質を回収し、抗体パンニング、およびスクリーニング用の抗原として用いた。

2D-DIGE 解析の結果、20 個の発現変動スポットが検出され、ピックしたゲルからのタンパク質を MS により同定した。一方で可溶化したゲルからのタンパク質を抗原としてファージ抗体ライブラリのパンニングを行った結果、21 種全てのタンパク質に対するファージ抗体の濃縮が確認され、スクリーニングの結果、わずか 2 週間という短期間で、それぞれのタンパク質についてモノクローン化ファージ抗体を得ることができた。

得られた抗体のひとつ、TRAILR2 抗体を用いて乳癌細胞 SKBR3 および不死化乳腺細胞株 184A1 の蛍光免疫染色を試みたところ、SKBR3 のみ選択的に染色されたことから、得られたファージ抗体が細胞の免疫染色に利用可能であることが判明した。また、データには示さないが、組織切片の免疫染色も同様に可能であることが確認できた。

C-3. ファージペプチドライブラリによる改良型 PTD の創出

まず Tat 改変体ライブラリ、及びランダム 18 mer ペプチドライブラリの構築のため、ランダムな NNS 塩基配列 (N=A/T/G/C、S=G/C) を含む degenerate primer を用いた PCR 法によって、Tat 配列中の目的アミノ酸をランダムなアミノ酸に置換した Tat 改変体ライブラリ遺伝子、及び、ランダムな 18 アミノ酸をコードするランダム 18 mer ペプチドライブラリ遺伝子を作製した。本ライブラリ遺伝子をファージミドベクターに組み込み、大腸菌 TG1 株に導入、ヘルパーファージを感染させることで、多様な種類のペプチドをファージマイナー外殻蛋白質である g3p の先端に発現する各ペプチド発現ファージライブラリを作製した。それぞれ作製し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 シークエンスを解析した結果、NNS 塩基配列を導入した簡

所がランダムなアミノ酸に置換されており、独立したクローンで構成されていることを確認した。従って、構築した3種類のファージライブラリは、多様なペプチドを提示したファージクローンから構成される質の高いライブラリであることが示唆された。

構築した Tat 改変体ライブラリ-1 を用いて、モデル細胞である HaCaT 細胞に対してパンニングを3回行った。セルパンニングにより選別・濃縮されたクローンを、PSIF 発現ベクターに組換えた後に、大腸菌に形質転換し、PTD-PSIF 融合体を含む大腸菌培養上清を標的細胞に添加した際の細胞傷害活性を評価した。Tat 融合 PSIF 作用群が約70%の viability を示す条件下で検討したところ、パンニング前は、いずれも Tat と同等以下の細胞傷害活性を示すクローンのみであったのに対し、パンニング後のクローンでは Tat よりも強い細胞傷害活性を示す多数のクローンを得ることに成功した。このことから、筆者が考案した2-stepスクリーニングが、PTDの機能改変戦略として非常に有効であることが示唆された。Tat 改変体ライブラリ-1 から選別してきたクローンのアミノ酸配列を確認したところ、アルギニンが増加している傾向が認められたことから、PTDの細胞内への移行には塩基性アミノ酸の中でもアルギニンが重要な役割を果たす可能性が示唆された。しかし、Futaki らが報告しているように、鎖長の異なるポリアルギニンペプチドの細胞内移行効率の検討から、アルギニン数と細胞内移行活性が必ずしも正の相関を示すわけではないと考えられている。従って、PTDの細胞内移行活性はアルギニン残基の数、つまり塩基性の高さのみに依存するのではなく、アルギニン以外の構成アミノ酸の関与する可能性も十分に考えられる。事実、本検討で得られたクローンでは、アルギニンに次いでプロリンが増加している傾向にあった。プロリンは、唯一の環状アミノ酸であり、主鎖構造の折れ曲がりに関与する等、蛋白質やペプチドの立体構造上、重要な役割の担っていることが知られている。従って、プロリンのように蛋白質の立体構造を維持する上で非常に重要なアミノ酸が保存される傾向にあったという事実は、PTDの一次構造のみならず、高次構

造が細胞内移行活性に関与している可能性を示唆するものである。

本研究で得られたPTDと細胞内移行活性との相関に関する情報は、2-stepスクリーニングを駆使することによって初めて可能となった非常に興味深い知見である。本年度は、Tat改変ライブラリ-1に焦点を絞って解析したが、将来的には残り三つのライブラリを用いて同様の検討を行うことによって、改良型PTDの設計指針を提示できる有用な知見が得られるものと期待される。今後は、本細胞内蛋白質導入ペプチドを用いて、蛋白質医薬品の細胞内安定性評価系の確立を試みる予定である。

C-4 免疫ライブラリによる scFv 抗体作製

非免疫ファージ抗体ライブラリよりも、多種類の scFv クローンを得ること、よりアフィニティの高い scFv クローンを得られる可能性のある方法として、免疫マウス由来抗体遺伝子を用いて免疫抗体ライブラリを構築した。本ライブラリから抗proCASP8抗体を得るために、まずパンニングを2回くり返し、proCASP8に結合するファージクローンを濃縮した。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、各パンニングラウンドで回収されたファージを大腸菌 TGI 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、proCASP8 に対するファージELISAにより結合性を評価した。その結果、inputファージでは、proCASP8に結合性を示すクローンは認められなかったのに対し、パンニングを繰り返すことによって、抗原結合性のクローンが増加し、2ndパンニング後のoutputファージではproCASP8に結合性を示すクローンが多数認められた。次に、proCASP8に結合性を有すると考えられる17クローンについてDNAシーケンス解析を行ったところ、異なる7種類の配列をもつ抗体であることが確認された。次にこれらの抗体の特異性をファージELISA法にて評価したところ、単離されたどの抗proCASP8抗体も、proCASP8に対してはファージ表面上に提示された抗体量依存的に結合性を示したのに対し、他の抗原蛋白質には結合性は認められなかった。この結果から、免疫ファージ抗体ライ

ラリから単離した7種類の抗体はproCASP8特異的な抗体であることが示唆された。以上のように、免疫抗体ライブラリを用いることにより、多種類のscFvクローンを取得しうる事が明らかとなった。さらにスクリーニングするクローン数を増やせば、より多種類の抗原特異的な抗体を単離・同定できるものと考えられる。また、proCASP8蛋白質をマウスに免疫してからモノクローナル抗体を単離するまでに要した期間はおよそ2ヶ月であり、本方法が、従来の抗体作製法であるハイブリドーマ法に比べても、迅速に高親和性の抗体を単離しうるシステムであると考えられた。また、本研究で構築した免疫ファージ抗体ライブラリは、イントラボディ創製にあたり、数多くの抗原特異的モノクローナル抗体を迅速に、かつ効率よく単離できる優れた抗体作製システムになりうる事が明らかとなった。

C-5 微量疾患関連タンパク質に対する抗体作製技術の確立

疾患プロテオミクス研究の進展により、多数の疾患関連蛋白質候補が見いだされつつあり、この中から真に価値のある創薬バイオマーカー蛋白質(診断マーカー蛋白質)を見つけ出すこと、およびその技術開発が、今後の創薬研究における最重要課題と言える。本目的において、疾患関連蛋白質候補に対するモノクローナル抗体は最も有用なツールの一つであり、迅速にモノクローナル抗体を得るための技術が大いに期待されている。本研究では、プロテオミクス等で見出される多数の疾患関連候補蛋白質について、特に細胞内蛋白質に着目し、有用な創薬ターゲット等の絞り込み技術に抗体を活用することを考案し、前年度までに、質の高いファージ抗体ライブラリの構築と、2D-DIGE法によって検出された疾患関連蛋白質候補に対して迅速かつ網羅的に抗体が作製可能なシステムを確立した。

そこで、まず抗体プロテオミクス技術を実証し、イントラボディによる解析対象を見出す目的で、乳がん関連蛋白質の探索を行った。乳腺細胞株から調製した蛋白質を対照サンプルに乳がん細胞株から調製した蛋白質を疾患サンプルとして2D-DIGE法を試みた。定量的解析を行い、特に発現変動レベルの

大きかった20個のspotに対して、ゲルspotをビックし、過ヨウ素酸処理によりゲルを溶解することで蛋白質を抽出・回収した。spotから抽出した蛋白質の一部をMS解析による蛋白質の同定を行い、一部をニトロセルロース膜にblotし、Dot Blotを用いた抗体ライブラリのパンニングを行った。同定した蛋白質の中で、乳がんに関連するマーカーとして既に報告があるものはspot 8 (TRAIL-R2)だけであり、それ以外の蛋白質については、乳がんとの関連は不明であった。

同定した蛋白質の中で、まずspot 8 (TRAIL-R2)について抗体ライブラリからの抗体単離を試みた。inputファージ数に対するoutputファージ数の割合(Ratio)を各パンニングラウンドで評価した結果、1stパンニング後と比較して4thパンニング後では、当該spot蛋白質に親和性を示すファージが約1000倍に濃縮されていると考えられた。さらに目的抗原に対する抗体を単離するため、濃縮後のライブラリをモノクローン化し、TRAIL-R2に対する親和性をファージクローンごとにDot Blot ELISAにより評価した。その結果、4thパンニング後のクローンから、多数のTRAIL-R2に対する抗体が単離できた。また、得られたファージ抗体の特異性を評価するため、ファージ抗体を用いたWestern Blotと免疫染色により評価したところ、単離したファージ抗体はTRAIL-R2特異的に結合し、Western Blotや免疫染色などのアプリケーションに使用可能な汎用性の高い抗体であることが示唆された。以上の抗体単離のプロセスは約2週間で完了しており、本抗体創製技術が、微量で多数の候補蛋白質に対する抗体の迅速・簡便な単離技術として極めて有用であることが示された。

次に、同定した候補蛋白質の中から有用な癌関連蛋白質の絞り込みを行うため、上記で作製したファージ抗体を用い、189症例の乳がん組織と15症例の正常の乳腺組織が搭載された組織アレイの免疫染色を試みた。その結果、SPATA5 protein, beta-actin variant, FLJ31438 protein, hPAK65, XRN1 proteinに関しては正常乳腺組織、および、がん組織において全く染色が認められなかった。一方で、RREB-1は約40%の症例に共通して発現していることが判

明した。

C-6 イントラボディによる可視化解析

上記で見出したRREB1は細胞内の転写関連因子と考えられているが、その詳細な機能は不明な分子である。そこで、RREB1に対する蛍光標識scFv抗体をイントラボディとして細胞内で発現させ、イメージングによる解析を試みた。同時に、p53に対するscFv遺伝子も用いた。293T細胞に蛍光蛋白質Venusを融合させた抗RREB1-scFvおよびp53-scFv遺伝子をトランスフェクションするにより発現させ、24時間後に蛍光顕微鏡観察を行った。対照としては、Venusのみ発現させた。その結果、Venus単独およびRREB1-scFv-Venusは細胞質に広く拡散して発現していたのに対し、p53-scFv-Venusは核付近に集積していた。細胞内でscFv抗体と標的分子との結合性など、さらに詳細な検討は必要であるが、異なった標的分子に対するscFv抗体-Venusが異なった局在性を示したことから、本解析法が標的分子のイメージングできているものと考えられた。すなわち、scFv抗体をイントラボディとして細胞内に発現・機能させることにより、標的蛋白質の局在等を迅速に解析しうることが明らかとなり、本研究で確立した疾患関連蛋白質の可視化解析技術の有用性が示唆された。

D. 結論

本研究では、抗体ライブラリを利用することにより、疾患プロテオミクス研究で汎用される二次元ディフュゼンシャル電気泳動(2D-DIGE)解析によって同定・回収される、微量の疾患関連蛋白質を抗原として、ダイレクトに抗体を創製しうる技術を確認した。本技術では、わずか0.5ngという極微量の蛋白質を用意できれば、それらに対する抗体を一挙に、かつ短期間で作製可能であることを明らかとした。さらに、本抗体創製技術を用いて癌関連蛋白質の同定を試みたところ、20種類の候補蛋白質を2D-DIGEにより見出した。2D-DIGEゲルから回収した蛋白質の一部を用いて、質量分析により蛋白質を同定し、同時に抗体の単離を試みたところ、全ての候補蛋白質に対する抗体を取得することに成功した。このよ

うに、プロテオミクスで同定できる多数の蛋白質に対し、わずか数週間で網羅的に抗体を創製可能な本技術は、極めて有用であると考えられる。さらに、同定した蛋白質の中の機能未知分子の解析を目的に、取得したscFv抗体を蛍光蛋白質との融合蛋白質として細胞内で発現させ、蛍光イメージング解析を試みたところ、細胞内の当該標的分子を可視化できる可能性が示唆された。今後、さらなる最適化等が必要であるが、本研究で開発した技術は、疾患プロテオミクスによる創薬ターゲット、バイオマーカー候補の探索から、可視化機能解析までの絞り込みを効率化し、創薬研究を大きく加速するものと期待される。

E. 健康危険情報

該当なし

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) Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Yamanada

- N., Yamato T., Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Shibata H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S. (C.A.), Tsutsumi Y.: Improved cytosolic translocation and tumor-killing activity of Tat-shepherdin conjugates mediated by co-treatment with Tat-fused membrane-disruptive HA2 peptide., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363: 1027-1032, 2007.
- 5) Nomura T., Kawamura M., Shibata H., 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*, 62: 569-573, 2007.
- 6) 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.
- 7) Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Yamanada N., Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Shibata H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Comparative Study of the Protein Transduction Domains-Mediated Molecular Transduction., *Br. J. Pharmacol.*, 153(6):1143-52, 2008.
- 8) Yoshikawa T., Sugita T., Mukai Y., Yamanada N., Nagano K., Nabeshi H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Organelle-targeted delivery of biological macromolecules using the protein transduction domain: Potential applications for peptide aptamer delivery into the nucleus., *J. Mol. Biol.*, 380(5):777-782, 2008.
- 9) Imai S., Mukai Y., Takeda T., Abe Y., Nagano K., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: The effect of protein properties on display efficiency using the M13 phage display system., *Pharmazie*, 63(10):760-764, 2008.
- 10) Nagano K., Imai S., Mukai Y., Nakagawa S., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Rapid isolation of intrabody candidates by using an optimized non-immune phage antibody library., *Pharmazie*. 64: 238-241, 2009.
- 11) 角田慎一、癌治療最適化のための細胞内薬物ターゲットング技術の研究、*Pharma Vision News*, 13: 32-36, 2009.
- 12) Yoshikawa T., Sugita T., Mukai Y., Yamanada N., Nagano K., Nabeshi H., Shibata H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: The augmentation of intracellular delivery of peptide therapeutics by artificial protein transduction domains., *Biomaterials*, 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, 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, 第4回JHUPO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: ファ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, 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: ファージ抗体ライブラリを用いたイントラボディの効率創製法の開発, 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.
 - 12) 今井 直, 長野一也, 杉田敏樹, 吉田康伸, 向洋平, 吉川友章, 鎌田春彦, 角田慎一, 中川晋作, 堤 康央: プロテオミクス創薬を志向した疾患関連蛋白質抗体の迅速単離システムの開発., 日本ヒトプロテオーム機構第5回大会, 東京, 2007年7月.
 - 13) 鎌田春彦, 吉岡靖雄, 柴田寛子, 阿部康弘, 野村鉄也, 養輪恭子, 鍋師裕美, 中川晋作, 角田慎一, 堤 康央: 腫瘍壊死因子- α の活性に及ぼす90番目のアミノ酸の影響に関する検討., 日本ヒトプロテオーム機構第5回大会, 東京, 2007年7月.
 - 14) Mukai Y., Tsutsumi Y., Nakagawa S.: Application of membrane-permeable Protein Transduction Domain (PTD) for efficient intracellular drug delivery., 第5回メンブレイン・ストレスバイオテクノロジー(MSB)シンポジウム, 大阪, 2007年9月.
 - 15) Tsunoda S., Mukai Y., Yoshikawa T., Kamada H., Nakagawa S., Tsutsumi Y.: A method for rapid preparation of antibodies to tumor-related proteins by the combination of phage library and 2D-DIGE., 第66回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007年10月.
 - 16) 吉川友章, 向 洋平, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: 細胞膜透過性TATペプチドと膜融合性HA2ペプチドを活用した核内高分子送達法の開発., 第66回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007年10月.
 - 17) 向 洋平, 今井 直, 吉川友章, 長野一也, 中川晋作, 堤 康央, 角田慎一: 新規抗体医薬の開発を目指した乳がん細胞特異マーカーの探索とそれらに対する網羅的抗体創製法の開発., 第57回日本薬学会近畿支部大会, 大阪, 2007年10月.
 - 18) 今井 直, 長野一也, 杉田敏樹, 吉田康伸, 向洋平, 吉川友章, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: 血栓性疾患の機能解明・治療を目指した新規抗体単離システムの構築., 第30回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007年11月.
 - 19) 長野一也, 今井 直, 杉田敏樹, 向 洋平, 吉川友章, 吉田康伸, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: 血栓性疾患の機能解