

cohort study. Yamazaki H, Sakai R, Koike R, Miyazaki Y, Tanaka M, Nanki T, 他 19 人。

3. 第 76 回アメリカリウマチ学会。Washington DC, USA, 2012/11. Am80, a retinoic acid receptor agonist, ameliorates murine vasculitis through the suppression of neutrophil migration and activation. Miyabe C, Miyabe Y, Miura N, Takahashi K, Terashima Y, Toda E, Honda F, Morio T, Yamagata N, Ohno N, Shudo K, Suzuki J, Isobe M, Matsushima K, Tsuboi R, Miyasaka N, Nanki T.

4. 第 33 回日本炎症・再生医学会。福岡、2012/7。シンポジウム 8「脂溶性メディエーター・脂肪組織と炎症・免疫」、オートタキシン/リゾフォスファチジン酸受容体阻害による関節リウマチの新規治療開発。南木敏宏。

5. 第 33 回日本炎症・再生医学会。福岡、2012/7。A comparison of incidence and associated factors of serious adverse events in rheumatoid arthritis patients receiving TNF inhibitors between Korea and Japan. 趙秀卿、酒井良子、Yoon-Kyoung Sung、南木敏宏、Sang-Cheol Bae、宮坂信之、針谷正祥。

6. ヨーロッパリウマチ学会。Berlin, Germany, 2012/6. Anti-IL-6 autoantibody inhibited elevation of serum C-reactive protein level in two patients with severe bacterial infection. Nanki T, Onoue I, Nagasaka K, Hirata S, Hosoya T, Ebisawa M, Sugihara T, Harigai M, Miyasaka N.

7. ヨーロッパリウマチ学会。Berlin, Germany, 2012/6. Different risk factors are associated

with serious infection in rheumatoid arthritis patients with and without pulmonary comorbidities; analyses from the REAL database. Sakai R, Tanaka M, Nanki T, Yamazaki H, Watanabe K, Koike R, Miyasaka N, Harigai M, for the REAL Study Group.

8. 第 56 回日本リウマチ学会総会。東京、2012/4。Registry of Japanese rheumatoid arthritis patients for long-term safety (REAL) コホート。針谷正祥、酒井良子、南木敏宏。

9. 第56回日本リウマチ学会総会。東京、2012/4。REALを用いた関節リウマチ患者における重篤な有害事象に対する肺合併症の影響。酒井良子、田中みち、南木敏宏、山崎隼人、渡部香織、小池竜司、宮坂信之、針谷正祥。

10. 第56回日本リウマチ学会総会。東京、2012/4。TNF阻害薬使用関節リウマチ患者におけるニューモシスチス肺炎。渡部香織、酒井良子、田中みち、駒野有紀子、山崎隼人、南木敏宏、小池竜司、宮坂信之、針谷正祥。

11. 第56回日本リウマチ学会総会。東京、2012/4。Am80による *Candida albicans* water-soluble fraction誘導血管炎の抑制効果。宮部千恵、宮部斉重、大野尚仁、高橋啓、宮坂信之、南木敏宏。

12. 第56回日本リウマチ学会総会。東京、2012/4。カンナビノイドによる関節炎抑制作用。福田真、高安愛子、横山和佳、宮部千恵、宮部斉重、宮坂信之、南木敏宏。

13. 第56回日本リウマチ学会総会。東京、2012/4。オートタキシン/リゾフォスファチジン酸受容体を標的とした関節リウマチの新規治療法開発。宮部

斉重、宮部千恵、高安愛子、福田真、横山和佳、  
宮坂信之、南木敏宏。

14. 第56回日本リウマチ学会総会。東京、2012/4。  
関節リウマチの病態形成におけるCCL25/CCR9相  
互作用の関与。横山和佳、金子佳代子、高安愛子、  
福田真、宮部斉重、宮部千恵、宮坂信之、南木敏  
宏。

15. 第56回日本リウマチ学会総会。東京、2012/4。  
CCL18による関節リウマチ線維芽細胞様滑膜細胞  
の活性化。高安愛子、宮部斉重、金子佳代子、宮  
部千恵、横山和佳、福田真、窪田哲朗、宮坂信之、  
南木敏宏。

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。

## 次世代型 IL-6 受容体抗体使用時の炎症マーカーとしての LRG 定量キットの開発と臨床応用

研究分担者 緒方 篤 大阪大学大学院医学系研究科呼吸器免疫アレルギー内科学講師

### 研究要旨

関節リウマチ (RA) の治療には TNF を阻害する生物製剤以外に本邦で開発された IL-6 受容体抗体 (tocilizumab) が劇的な治療効果を上げている。しかし、IL-6 に強く影響を受ける疾患活動性マーカーは IL-6 阻害療法を行なう時に疾患活動性を正確に反映しない事があり、IL-6 の影響の少ないマーカーが期待されている。これまで研究主任の仲らは最新のプロテオミクス手法を駆使して leucine-rich alpha-2 glycoprotein (LRG) が IL-6 の影響を受けにくい CRP に代わる RA の新たな活動性マーカーとなり得る可能性を報告し、血液中の LRG を定量出来る ELISA システムを構築してきた。我々は、この ELISA キットを用いて、関節リウマチ患者の血清を測定できるように、大阪大学医学部附属病院において免疫関連疾患の病態解析のための検体バンクの構築を行なった。この検体バンクのシステムを用いて、次世代型 IL-6 受容体抗体による治療を受ける関節リウマチ患者だけでなく、従来の治療を受ける関節リウマチ患者、それ以外にも炎症性疾患、自己免疫疾患など多彩な疾患の貴重な血液サンプルを収集するシステムを整備した。

### A. 研究目的

本研究の目的は現在開発中の次世代型 IL-6 受容体抗体を含めて IL-6 受容体抗体治療における実用的な血清炎症マーカーがないための不利益を克服するための新規 IL-6 非依存性の炎症性マーカーとして開発され、実用化を目指している leucine-rich alpha-2 glycoprotein (LRG) の ELISA キットの実臨床における有用性を検証するための患者検体収集システムの構築を目的としている。

分担研究者が所属する大阪大学においては免疫学フロンティアセンターを始めとする基礎免疫の研究が盛んであり、基礎免疫学の成果を臨床に応用するための臨床データを完備した患者検体に対するニーズがもともとあった。これまで、研究分担者は個別の臨床検体のニーズに対して個別に必要な検体を準備することとして対応していたが、個別の研究計画書を倫理委員会に提出して承認を得てから患者検体

の収集をしていたため、非常に煩雑であり、検体の収集に時間がかかるという問題点があった。そのため、臨床研究に利用する目的で検体を収集する包括同意のもと検体を常時収集する検体バンクを作成し、すみやかに基礎研究への臨床検体提供を行なうシステムの構築を行なった。本研究においてもこのシステムを用いて検体を供給する予定である。

### B. 研究方法

研究分担者が中心となり、大阪大学附属病院において臨床検体の収集し検体バンクに集積するために「免疫関連疾患の病態解析のための検体バンクの構築」という課題名で、大阪大学医学部附属病院の臨床研究倫理審査委員会において承認を得た（承認番号 11122）。この検体バンクシステムは、研究分担者が所属する大阪大学呼吸器免疫アレルギー内科が中心に大阪大学附属病院にて検体の収集を行ない、大

阪大学呼吸器免疫アレルギー内科と免疫学フロンティアセンターに検体を保存する。臨床データの収集と、管理は大阪大学呼吸器免疫アレルギー内科において行い、必要があれば臨床検体を提供する。将来的に検体を収集でき施設を増やし、バンクの充実を図って行く予定である。

#### (倫理面への配慮)

#### インフォームドコンセント

大阪大学医学部医学倫理委員会により承認を得て、文書により包括同意を得て、検体を収集する。本研究への利用に関してはすでに大阪大学医学部付属病院の倫理委員会にて承認を得ている。いずれも医薬基盤研究所を共同研究者、研究協力者として承認を得ている。

#### C. 研究結果

結果はD項にまとめて記載した。

#### D. 結果・考察

検体バンクとして包括同意のもと、検体の収集を開始している。現在は次世代型 IL-6 受容体抗体の臨床試験が開始されていないので、従来型 IL-6 受容体抗体治療患者を特に重点的に検体収集を行なっているが、現時点で本研究の対象とならないものも含めて300検体以上のサンプルが集積され、検体バンクとしてのシステムは順調に稼働している。今後、関連施設も含めたシステムをさらに拡充していく予定である。

#### E. 結論

本研究において必要な臨床検体の収集するためのシステムが構築され、順調に稼働しており、必要な検体の集積を行なっていく準備が整った。

#### F. 健康危険情報

該当無し。

#### G. 研究発表

##### G-1 論文発表

1. Hishitani Y, Ogata A, Shima Y, Hirano T, Ebina K, Kunugiza Y, Shi K, Narazaki M, K Hagihara K, Tomita T, H Yoshikawa H, T Tanaka T, Kumanogoh A. Retention of tocilizumab and anti-tumour necrosis factor drugs in the treatment of rheumatoid arthritis. Scand J Rheumatol. In Press
2. Nojima S, Toyofuku T, Kamao H, Ishigami C, Kaneko J, Okuno T, Takamatsu H, Ito D, Kang S, Kimura T, Yoshida Y, Morimoto K, Maeda Y, Ogata A, Ikawa M, Morii E, Aozasa K, Takagi J, Takahashi M, Kumanogoh A. A point mutation in Semaphorin 4A associates with defective endosomal sorting and causes retinal degeneration. Nat Commun. 2013; 4:1406.
3. Tanaka T, Ogata A, and Narazaki M. Tocilizumab: An Updated Review of Its Use in the Treatment: Rheumatoid Arthritis and Its Application for Other Immune-Mediated Diseases. Clinical Medicine Insights: Therapeutics 2013;5:33-52.
4. Watanabe K, Sakai R, Koike R, Sakai F, Sugiyama H, Tanaka M, Komano Y, Akiyama Y, Mimura T, Kaneko M, Tokuda H, Iso T, Motegi M, Ikeda K, Hiroshi Nakajima H, Taki H, Kubota T, Kodama H, Sugii S, Kuroiwa T, Nawata Y, Shiozawa K, Ogata A, Sawada S, Matsukawa Y, Okazaki T, Mukai M, Iwahashi M, Saito K, Tanaka Y, Nanki T, Miyasaka N, Harigai M. Clinical characteristics and risk factors for Pneumocystis jirovecii 5 pneumonia in patients with rheumatoid arthritis receiving 6 adalimumab: a retrospective review and case; control study 7 of 17 patients. Mod Rheumatol. 2012 In Press
5. Ogata A, Kumanogoh A, Tanaka T.

Pathological role of interleukin-6 in psoriatic arthritis. *Arthritis*. 2012;2012:713618.

6. Nakatsuji Y, Okuno T, Moriya M, Sugimoto T, Kinoshita M, Takamatsu H, Nojima S, Kimura T, Kang S, Ito D, Nakagawa Y, Toyofuku T, Takata K, Nakano M, Kubo M, Suzuki S, Matsui-Hasumi A, Uto-Konomi A, **Ogata A**, Mochizuki H, Sakoda S, Kumanogoh A. Elevation of Sema4A implicates Th cell skewing and the efficacy of IFN- $\beta$  therapy in multiple sclerosis. *J Immunol*. 2012;188:4858-65.

7. **Ogata A**, Hirano T, Hishitani Y, Tanaka T. Safety and efficacy of tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord*. 2012;5:27-42.

8. **Ogata A**, Tanaka T. Tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis and other systemic autoimmune diseases: current perspectives and future directions. *Int J Rheumatol*. 2012;2012:946048.

9. Hirano T, Ohguro N, Hohki S, Hagihara K, Shima Y, Narazaki M, **Ogata A**, Yoshizaki K, Kumanogoh A, Kishimoto T, Tanaka T. A case of Behçet's disease treated with a humanized anti-interleukin-6 receptor antibody, tocilizumab. *Mod Rheumatol*. 2012;22(2):298-302.

10. **Ogata A**, Umegaki N, Katayama I, Kumanogoh A, Tanaka T. Psoriatic arthritis in two patients with an inadequate response to treatment with tocilizumab. *Joint Bone Spine*. 2012;79:85-7.

## G-2 学会発表

1. 第 118 回中部日本整形外科災害外科学会・学術集

会 2012.4.7.大阪. 関節リウマチ診療のニューパラダイムー合併症ー. **緒方篤**.

2. 第 109 回日本内科学講演会 2012.4.13-14.京都. Behcet 病に対する Infliximab の中長期投与経験. 菱谷好洋、平野亨、中井慶、大黒伸行、萩原圭祐、**緒方篤**、嶋良仁、榑崎雅司、田中敏郎、熊ノ郷淳.

3. 第 5 6 回日本リウマチ学会総会・学術総会. 2012.4.26-28.東京.関節リウマチに対する DMARDs 非併用下でのトシリズマブ皮下投与による有効性及び安全性の検討-国内第 III 相二重. 盲検並行群間比較試験成績 (MUSASHI study). **緒方篤**.

4. 第 5 6 回日本リウマチ学会総会・学術総会. 2012.4.26-28.東京.大阪大学における生物学的製剤の使用経験. 菱谷好洋、平野亨、嶋良仁、萩原圭祐、榑崎雅司、**緒方篤**、蝦名耕介、歴史賢林、棚座康夫、富田哲也、田中敏郎、熊ノ郷淳.

5. 第 5 6 回日本リウマチ学会総会・学術総会. 2012.4.26-28.東京.3年間ノトシリズマブ投与を行なった強皮症患者の病状. 嶋良仁、菱谷好洋、平野亨、榑崎雅司、**緒方篤**、田中敏郎、熊ノ郷淳.

6. 第 5 6 回日本リウマチ学会総会・学術総会. 2012.4.26-28.東京. 萩原圭祐、有光潤介、岸田友紀、中西美保、中林晃彦、森島淳仁、吉田祐志、菱谷好洋、平野亨、嶋良仁、榑崎雅司、**緒方篤**、田中敏郎、芳川秀樹、熊ノ郷淳. Bio-plex cytokine array による肺高血圧症患者におけるサイトカインの病態的意義.

7. 第 5 6 回日本リウマチ学会総会・学術総会. 2012.4.26-28.東京.リウマチ膠原病患者での EPA/AA についての検討-関節リウマチ患者では、血中アラキドン酸濃度と CRP は逆相関する. 萩原圭祐、有光潤介、岸田友紀、中西美保、中林晃彦、森島淳仁、吉田祐志、菱谷好洋、平野亨、嶋良仁、榑崎雅司、**緒方篤**、田中敏郎、芳川秀樹、熊ノ郷淳.

8. 第56回日本リウマチ学会総会・学術総会.  
2012.4.26-28.東京.トシリズマブから他の生物学的製剤にスイッチングした関節リウマチ13症例についての検討. 蝦名耕介、史賢林、柵座康夫、富田哲也、緒方篤、平野亨、菱谷好洋、芳川秀樹.

9. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR) 2012, Berlin, Germany 6 - 9 June 2012. The MUSASHI STUDY: Comparison of subcutaneous tocilizumab monotherapy versus intravenous tocilizumab monotherapy: result from double blind, parallel-group, comparative phase III non-inferiority study in Japanese patients with rheumatoid arthritis. Ogata A, and MUSASHI study Group.

10. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR) 2012, Berlin, Germany 6 - 9 June 2012. Effect of switching tocilizumab to other biologics in patients with rheumatoid arthritis. Ebina K, Shi K, Hirano M, Hashimoto J, Kunugiza Y, Tomita T, Ogata A, Hirano T, Hishitani Y and Yoshikawa H.

11. 第22回日本脊椎関節炎学会. 2012.9.29.大阪. 血清反応陰性性脊椎関節症に対する抗IL-6治療. 緒方篤.

12. 2012 ACR/ARHP Annual Scientific Meeting, Washington DC USA, 9-14 November 2012. Effectiveness and Tolerability of Subcutaneous Tocilizumab in Rheumatoid Arthritis Patients Switched From Intravenous Tocilizumab: Results From the Extension Period of the Musashi Study. Ogata A and MUSASHI study group.

13. 2012 ACR/ARHP Annual Scientific Meeting, Washington DC USA, 9-14 November 2012. Comparison of Tolerability Between Tumor

Necrosis Factor-Inhibitors and Tocilizumab for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. Hishitani Y, Hirano T, Shima Y, Narazaki M, Ogata A, Higihara K, Kumanogouh A, Tanaka T.

14. 第199回日本内科学会近畿地方会. 2012.12.8. 大阪. 血小板減少の原因が肺梗塞/多発血栓症であったSLEの一例. 森本桂子、前田悠一、西出真之、中林晃彦、西田純幸、平野亨、嶋良仁、榑崎雅司、緒方篤、熊ノ郷淳.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

次世代型IL-6受容体抗体使用時の炎症マーカーとしての  
LRG定量キットの開発 ―抗体作製法に関する検討―

分担研究者 角田 慎一 独立行政法人医薬基盤研究所

バイオ創薬プロジェクト プロジェクトリーダー

## 研究要旨

本研究事業は、関節リウマチ(RA)の患者において、抗IL-6R抗体医薬等による治療効果を客観的に評価しうるバイオマーカーとして血清leucine-rich alpha-2 glycoprotein (LRG)の有用性を明らかとし、臨床検査法への応用を図るものである。検査薬としての抗体を作成するにあたり、一般的な抗体作製法である動物への免疫とハイブリドーマの作製による方法では、必ずしも至適な抗体を取得できない場合も多い。そこで本分担研究では、検査薬として有用な抗LRG抗体の作製を念頭に、ファージ抗体ライブラリによる抗体のin vitro迅速創製技術の確立を試みることにした。

まず、in vitroで迅速に種々の抗原に対するscFv型抗体を単離可能とする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を設計し、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した。その結果、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で速やかに取得可能であるライブラリの構築が確認できた。今後、本研究で開発した技術をさらに改良・最適化し、バイオマーカータンパク質に対する検査用抗体等の作製を試みる予定である。

### A. 研究目的

本研究事業は、関節リウマチ(RA)の患者において、抗IL-6R抗体医薬等による治療効果を客観的に評価しうるバイオマーカーとして血清leucine-rich alpha-2 glycoprotein (LRG)の有用性を明らかとし、臨床検査法への応用を図るものである。

バイオマーカータンパク質の測定による臨床検査薬としては、抗体による定量的検出系が特異性や簡便性、コストに点から最も有望な方法の一つと考えられる。LRGについては、産生細胞による糖鎖付加の違いなどにより、生理機能が異なる可能性が示唆されていることから、検出用抗体の最適化が重要になるものと考えられる。また、一般的な抗体作製法である動物への免疫とハイブリドーマの作製による方法では、必ずしも至適な抗体を取得できない場合も多い。そこで本分担研究では、

検査薬として有用な抗LRG抗体を効率良く作製することを念頭に、ファージ抗体ライブラリによるin vitro抗体迅速創製技術の確立を試みることにした。

ファージ抗体ライブラリは、多様なレパートリーの抗体Vドメインを一本鎖化したscFv型抗体をファージ表面に網羅的に発現させるものである。In vitroにおいて、標的抗原に親和性を有するscFvを発現するクローンを速やかに濃縮し、最短2週間程度で特異的結合性のscFv発現ファージ、および、scFv遺伝子を取得することが可能となる。本研究では、様々な抗原に対する検査用抗体の取得を念頭に、マウス生体に存在する抗体レパートリーの遺伝子をもとにした、非免疫マウス由来scFv抗体ファージライブラリの構築を試みた。

### B. 研究方法

## 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  $\mu$ 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  $\mu$ g 当たり、50  $\mu$ M oligo(dT)<sub>20</sub> (Invitrogen) 1  $\mu$ l、10 mM dNTP mix 1  $\mu$ l を混合し、DEPEC 処理水を加えて 10  $\mu$ 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  $\mu$ l、25 mM MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu$ l、0.1 M DTT 2  $\mu$ l、RNaseOUT (Invitrogen) 1  $\mu$ l、SuperScript III RT (Invitrogen) 1  $\mu$ 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  $\mu$ 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 CAAGCTTTGGAGCCTTTTTTTGGAGATTTCAACGTGAAAA AATTATTATTCGCAAT TCCTTTAGTTGTTCTCTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCC -3' )、及びNcoI サイトを有するプライマーY16 (5' -TTAGTAAATGAATTTCTGTATGAGGTTTGGCTAAACA

A

CTTTCAACAGTCTATGCGGCACGCGTTCCACGGATCCGGATA CGGCACCGGCCACCTGCGGCCGC-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 $^{\circ}$ 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  $\mu$ l に対して、精製後のライゲーション産物 1  $\mu$ l を添加し、GenePulser Xcell (Bio-Rad) を用い、1.8 kV、0.25  $\mu$ F、200  $\Omega$  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  $\mu$ g/ml Ampicillin、2% Glucose 含有 2YT 培地で希釈し、Petri film (3M) に播種し、37 $^{\circ}$ 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 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 ヘルパーファージ溶液を 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  $\mu$ l/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。

#### (倫理面への配慮)

抗体遺伝子の単離のため、マウスからリンパ球を採取した。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、所属機関動物実験倫理委員会の承認を得て適切に行った。

### C. 研究結果

結果はD項にまとめて記載した。

### D. 結果・考察

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の多様性に乏しく、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  $2.4 \times 10^9$  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 シークエ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。シークエンス解析の結果、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。

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。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 (Fig. 1)。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 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。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 (Fig. 2)。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. 2)。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- $\alpha$ 、human importin- $\beta$  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 (Fig. 3)。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量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、わずかに 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 (Fig. 4)。

そこで次に、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、アポトシス関連蛋白質である Bid、核輸送関連蛋白質である importin- $\beta$ 、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 (Fig. 5)。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 (Fig. 5)。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、種々のバイオマーカータンパク質に対する抗体作製技術として、有用であることが示唆された。

## E. 結論

本年度は、検査薬として有用な抗 LRG 抗体を効率良く作製することを念頭に、ファージ抗体ライブラリによる *in vitro* 抗体迅速創製技術の確立を試みた。多様な抗原に対する抗体を効率良く取得可能とするため、マウス生体が有する抗体遺伝子 V 領域を網羅的に増幅可能な PCR プライマーセットを設計した。さらに、それによって非免疫マウスリンパ球由来 cDNA から VH および VL 遺伝子ライブラリを調製し、これら遺伝子をリンカー配列で連結し、scFv 抗体ファージライブラリを構築した。これにより、ライブラリサイズが  $2 \times 10^9$  であって、生体が有する抗体レパートリーをカバーしうる scFv 抗体ファージライブラリを得ることができた。本ライブラリの有用性を検証するため、モデル抗原に対して抗体の取得を試みた結果、親和性を有する scFv 抗体発現クローンを取得することができた。本結果をもとに、次年度以降、LRG に対する抗体作製等を試みる予定である。

## F. 健康危険情報

該当無し。

## G. 研究発表

### G-1. 論文発表

1. Takano M, Yamashita T, Nagano K, Otani M, Maekura K, Kamada H, **Tsunoda S**, Tsutsumi Y, Tomiyama T, Mori H, Matsuura K, Matsuyama S. Proteomic analysis of the hippocampus in Alzheimer's disease model mice by using two-dimensional fluorescence difference in gel electrophoresis. *Neurosci Lett*. 2013;534: 85-89.

2. Yamashita T, Nagano K, Kanasaki S, Maeda Y, Furuya T, Inoue M, Nabeshi H, Yoshikawa T, Yoshioka Y, Itoh N, Abe Y, Kamada H, Tsutsumi Y, **Tsunoda S**. Annexin A4 is a possible biomarker for cisplatin susceptibility of malignant mesothelioma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 421:140-4.

3. Yamashita T, Okamura T, Nagano K, Imai S, Abe Y, Nabeshi H, Yoshikawa T, Yoshioka Y, Kamada H, Tsutsumi Y, **Tsunoda S**. Rho GDP-dissociation inhibitor alpha is associated with cancer metastasis in colon and prostate cancer. *Pharmazie*. 2012; 67: 253-255.

4. Higashisaka K, Yoshioka Y, Yamashita K, Morishita Y, Pan H, Ogura T, Nagano T, Kunieda A, Nagano K, Abe Y, Kamada H, **Tsunoda S**, Nabeshi H, Yoshikawa T, Tsutsumi Y. Hemopexin as biomarkers for analyzing the biological responses associated with exposure to silica nanoparticles. *Nanoscale Res Lett*. 2012; 7: 555.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## I. 協力研究者

鎌田春彦 医薬基盤研究所

バイオ創薬プロジェクト サブプロジェクトリーダー

向 洋平 医薬基盤研究所

バイオ創薬プロジェクト プロジェクト研究員

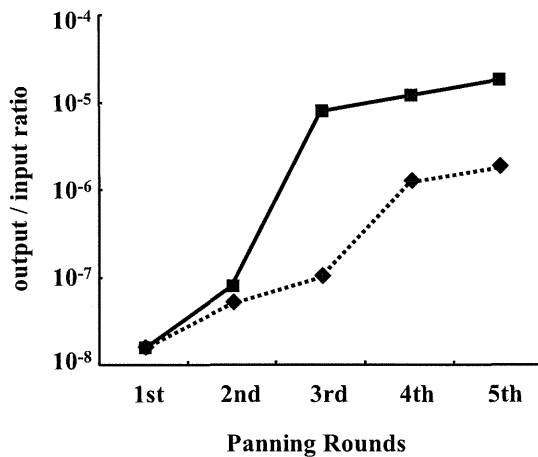
長野一也 医薬基盤研究所

バイオ創薬プロジェクト プロジェクト研究員

**Table.1 Primers for PCR amplification of murine VL and VH genes**

VL Forward	<p style="text-align: center;">NcoI</p> <p>5'-cctttctatgcgccagccgCCATGGc-</p> <p>-GAYATTGTCWCCARTC -3'    -GAYRTTKTGATGACCCAVAC -3'</p> <p>-GAYATTSTGMTSACYCAGTC -3'    -GAYATYCAGATGACACAGAC -3'</p> <p>-GAYATTGTGMTMACTCAGTC -3'    -GAYATTGTGATGACACAACC -3'</p> <p>-GAYATTGTGHTRWCCAGTC -3'    -GAYATCCAGCTGACTCAGCC -3'</p> <p>-GAYATTGTRATGACMCAGTC -3'    -GAYATTGTGATGACBCAGKC -3'</p> <p>-GAYATTMAGATRAMCCAGTC -3'    -GAYATTGTGATAACYCAGGA -3'</p> <p>-GAYATTCAGATGAYDCAGTC -3'    -GAYATTGTGATGACCCAGWT -3'</p> <p>-GAYATTTTGCTGACTCAGTC -3'    -GAYGTGSTMTSACYCAGTC -3'</p> <p>-GAYATTGTCTCAWCCAGTC -3'    -GAYGCTGTGTACTCAGGAATC -3'</p> <p>-GAYATTGWGCTSACCCAATC -3'    -GAYATTGTDHTVWCHCAGTC -3'</p> <p>-GAYATTSTRATGACCCARTC -3'</p>		VH Forward	<p style="text-align: center;">S G G G G S G G G G S</p> <p>5'-accggcggcggcgctctgggtggatcc-</p> <p>-GAGGTRMAGCTTCAGGAGYC -3'    -SAGGTGCAGSKGGTGGAGTC -3'</p> <p>-GAGGTNCAGCTBCAGCAGTC -3'    -GAGGTGCAMCTGGTGGAGTC -3'</p> <p>-CAGGTGCAGCTGAAGSASTC -3'    -GAAGTCAVCTGGTGGAGTC -3'</p> <p>-CAGSTBCAGCTGCAGCAGTC -3'    -GAGGTGAAGCTGATGGARTC -3'</p> <p>-GAGGTYCAGCTYCAGCAGTC -3'    -GAGGTGCARCTGTTGAGTC -3'</p> <p>-GARGTCCARCTGCAACARTC -3'    -GARGTRAAGCTTCTCGAGTC -3'</p> <p>-CAGGTYCAGCTBCAGCARTC -3'    -GAAGTGAARSTGAGGAGTC -3'</p> <p>-CAGGTYCARTKACGACAGTC -3'    -GAGGTGATGCTGGTGGAGTC -3'</p> <p>-CAGGTCCAGCTGAAGCAGTC -3'    -CAGGTTACTCTRAAAGNGTSTG -3'</p> <p>-GAGGTGAASSTGGTGGARTC -3'    -CAGGTCCAAYTCAGCARCC -3'</p> <p>-GAVGTGANWYTGTTGGAGTC -3'    -GATGTGAACCTGGAAGTGTGTC -3'</p> <p>-GAGGTGAAGGTCATCGAGTC -3'</p>	
	VL Reverse	<p style="text-align: center;">G G G G S G G G G S G</p> <p>5'-accagagccgcccgcgctaccaccaccacc-</p> <p>-CCGTTTGATTTCCARCTTKG -3'    -CCGTTYWATTTCCAACCTTWG -3'</p> <p>-CCGTTTATTTCCAGCTTGG -3'    -CCCTAGGACAGTCAGTTTGG -3'</p> <p>-CCGTTTSAGCTCCAGCTTGG -3'</p>		VH Reverse	<p style="text-align: center;">NotI</p> <p>5'-cgggaccggcgaccctGCGGCCGc-</p> <p>-YGAGGAAACGGTGACCCGTGGT -3'    -YGAGGAAGACTGTAGAGTGGT -3'</p> <p>-YGAGGAGACTGTGAGAGTGGT -3'    -YCGGAGACASTGACCAGAGT -3'</p> <p>-YGAGGAGACGGTGACTGAGRT -3'    -YGCAGAGACASTGACCAGAGT -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

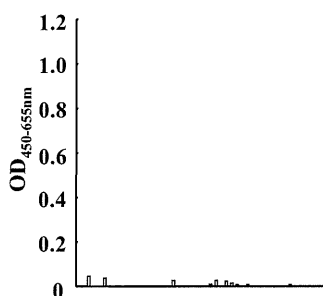


**Fig.1 Enrichment of KDR-binding phages from the library by BIAcore panning**

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

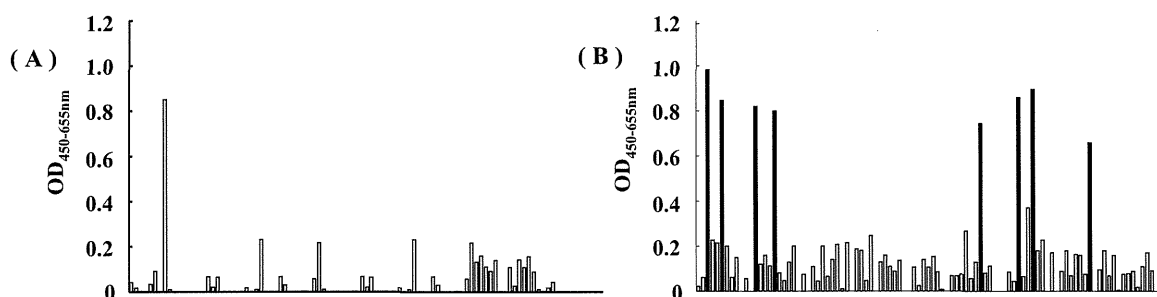
< panning input >



**Fig.2 Isolation of antibodies to KDR non-immune libraries by panning in BIAcore®**

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

< 5<sup>th</sup> panning output >



**Table.2 Amino acid sequences of anti-KDR scFvs**

**VL**

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	Linker
1	DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSC	RASQNI SAYLH	WYQQKSHESPRLLIK	YASQSI S	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	WVQRPGGLEWIG	A IYPGNSDTSYNQKFKG	KAKLTAVTSASTAYMELSSLTNEDSA VYYCTR	EDWYYAMDY	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-	QRDGS I WYFDV	--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-	HYGSSYFDY	----TL----

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

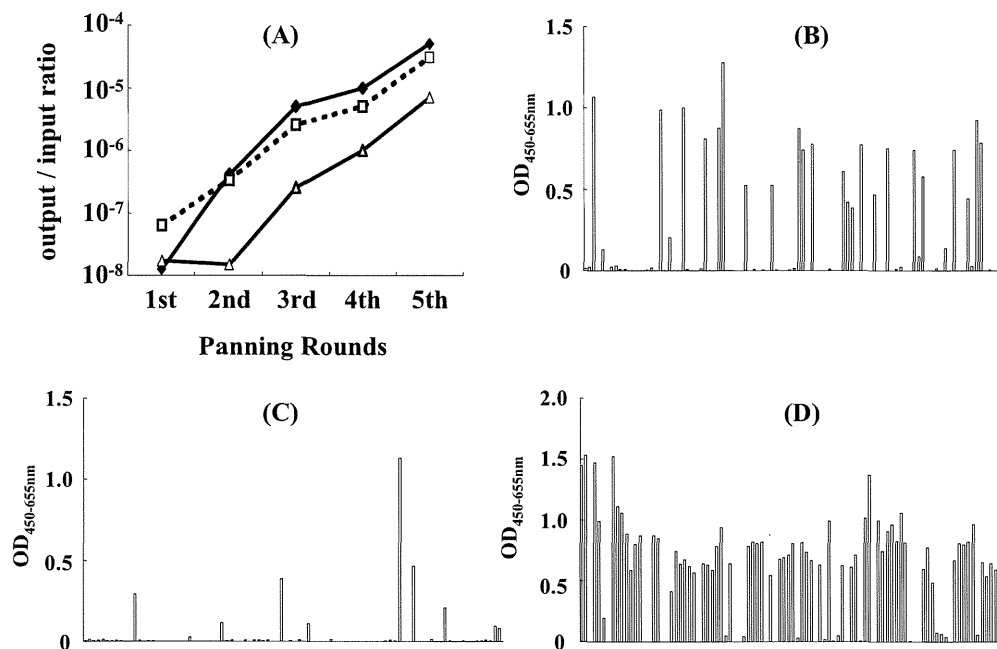
**Fig.3 Binding specificity of anti-KDR scFvs**

(A) Native human KDR Fc chimera, (B) human TNFR2 Fc chimera, (C) luciferase, (D) BSA, (E) human importin- $\alpha$ , (F) human importin- $\beta$ , (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.4 Sensitivity of the anti-KDR scFvs for antigen detection <sup>s</sup>**

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.5 Enrichment of scFv library to various 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.



## サルコラーゲン関節炎モデルの作成と次世代型 IL-6 受容体抗体投与時の血漿サンプルの収集

研究分担者 服部有宏 中外製薬株式会社 富士御殿場研究所

研究本部 探索研究部 探索研究部長

### 研究要旨

近年、関節リウマチ(RA)等の自己免疫疾患に対して抗体医薬品が開発され、優れた治療効果を示している。RA の治療には TNF- $\alpha$  を阻害する生物学的製剤(infliximab, etanercept など)や、抗原提示細胞と T 細胞間の共刺激経路を阻害することで T 細胞活性化を調節する生物製剤(abatacept)以外にも、本邦で開発された IL-6 受容体抗体(tocilizumab)が劇的な治療効果を上げている。現在、スーパー特区(岸本班)において共同研究者の中外製薬は次世代型 IL-6 受容体抗体を開発中である。次世代型 IL-6 受容体抗体は、最新のタンパク工学技術(Igawa T *et al*, Nat Biotechnol 2010)を用いて現行の IL-6 受容体抗体(tocilizumab)に比べて半減期を2倍以上に延長したものであり、投与回数の減少により医療費の削減に貢献するものと期待される。しかし、IL-6 受容体抗体に無効な症例も存在するため、無効例を早期に判別し薬剤変更することが疾患の進行を阻止するために重要である。現在、RA の疾患活動性マーカーとして CRP が使用されているが、IL-6 受容体抗体投与時には IL-6 依存性の CRP が常に陰性化し、感染症を合併しても上昇することがないため、無効例への継続投与やその発見の遅れから感染症重症化の懸念がある。本研究代表者の仲らのグループは血清中の leucine rich alpha-2 glycoprotein(LRG)濃度が CRP よりも RA の疾患活動性とより強く相関することを明らかにしている(Serada S, Naka T, *et al*, Ann Rheum Dis 2010)。そして、LRG の発現が IL-6 以外にも IL-22 や TNF- $\alpha$  などのサイトカインにより誘導されることも報告している。

本研究では次世代型 IL-6 受容体抗体について、サルコラーゲン関節炎モデルに投与することで、関節炎スコアと血漿サンプルを継続的に収集した。関節炎スコアと血漿サンプルは研究代表者の仲のグループに輸送し、仲のグループにて樹立された LRG の ELISA システムで解析した。その結果、血漿中の LRG 濃度は CRP よりも関節炎スコアとより強く相関することが明らかとなった。カニクイザルコラーゲン関節炎モデルにおいて、LRG は CRP よりも関節炎スコアと相関することから、次世代型 IL-6 受容体抗体投与時の RA 患者疾患活動マーカーとして臨床応用できることが期待される。

#### A. 研究目的

近年、関節リウマチ(RA)等の自己免疫疾患に対して抗体医薬品が開発され、優れた治療効果を示している。RA の治療には TNF- $\alpha$  を阻害する生物学的製剤(infliximab, etanercept など)や、抗原提示細胞と T 細胞間の共刺激経路を阻害することで T 細胞活性化を調節する生物製

剤(abatacept)以外にも、本邦で開発された IL-6 受容体抗体(tocilizumab)が劇的な治療効果を上げている。現在、スーパー特区(岸本班)において共同研究者の中外製薬は次世代型 IL-6 受容体抗体を開発中である。次世代型 IL-6 受容体抗体は、最新のタンパク工学技術(Igawa T *et al*, Nat Biotechnol 2010)を用いて現行の

IL-6 受容体抗体(tocilizumab)に比べて半減期を2倍以上に延長したものであり、投与回数の減少により医療費の削減に貢献するものと期待される。しかし、IL-6 受容体抗体に無効な症例も存在するため、無効例を早期に判別し薬剤変更することが疾患の進行を阻止するために重要である。現在、RAの疾患活動性マーカーとしてCRPが使用されているが、IL-6 受容体抗体投与時にはIL-6 依存性のCRPが常に陰性化し、感染症を合併しても上昇することがないため、無効例への継続投与やその発見の遅れから感染症重症化の懸念がある。本研究代表者の仲らのグループは血清中のleucine rich alpha-2 glycoprotein(LRG)濃度がCRPよりもRAの疾患活動性とより強く相関することを明らかにしている(Serada S, Naka T, *et al*, Ann Rheum Dis 2010)。そして、LRGの発現がIL-6以外にもIL-22やTNF-alphaなどのサイトカインにより誘導されることも報告している。

本研究では次世代型IL-6 受容体抗体について、血中LRG濃度が疾患活動性を把握する上でCRPよりも有用性が高いことを明らかにすることを目的とした。そのために、まず関節炎の動物モデルを用いて、LRGの疾患活動性マーカーとしての有用性を検証する事とした。次世代型IL-6 受容体抗体がカニクイザルにおいてもIL-6 受容体阻害活性を示すことから、カニクイザルコラーゲン関節炎モデルを作成し、次世代型IL-6 受容体抗体投与時の関節炎スコアと血漿サンプルを継続的に収集した。

## B. 研究方法

### (1) 試料

カニクイザル(雌、3-5歳、中国産)を使用した。

### (2) カニクイザルコラーゲン関節炎モデルの作成

カニクイザルコラーゲン関節炎モデルは、ウシII型コラーゲン溶解液と等量の Freund 完全

アジュバントを混合して作製したエマルジョンを初回感作として背部皮内及び尾根部皮内に接種し、この3週間後同様の方法にて2回目感作を行うことにより作成した。

関節炎スコアの評価は麻酔下で以下の腫脹評価基準に従ってブラインドで行った。中手指節関節、近位指節間関節、遠位指節間関節、手関節、足関節、肘関節、膝関節の腫脹レベルの評価を行った(計64カ所)。

スコア0:異常なし

スコア1:腫脹は目視では認められないが、触診で検出される

スコア2:腫脹は目視でわずかに認めら、触診で検出される

スコア3:腫脹は目視でははっきりと認められる。

スコア4: 関節の強直

### (3) 薬剤投与

次世代型IL-6 受容体抗体の調製は過去に報告した方法に準じて調製した(Igawa T *et al*, Nat Biotechnol 2010)。コントロール群には溶媒を用いた。関節炎を発症したカニクイザルに溶媒又は30 mg/kgの次世代型IL-6 受容体抗体を初回感作後30日目から2週に1回の割合で計3回皮下投与した。

### (4) 採血

血液は大腿静脈から採血し、EDTA-2Kを加えることで血液の凝固を阻害することで血漿サンプルを調製した。血漿サンプルは-85℃で保存した。

### (倫理面への配慮)

動物実験は動物実験委員会の承認を得、適切な取り扱いを行った。

## C. 研究結果

結果はD項にまとめて記載した。

## D. 結果・考察

## 次世代型 IL-6 受容体抗体投与時のコラーゲン 関節炎カニクイザル血漿サンプルの収集

ウシ II 型コラーゲン溶解液と等量の Freund 完全アジュバントを混合して作製したエマルジョンを皮内に接種し、3 週間後に 2 回目感作することで、カニクイザルコラーゲン関節炎モデルを作成した。血漿サンプルについて、血液検査を行った。本研究において収集された血漿サンプルの一部は研究代表者の仲のグループへ輸送した。血漿サンプル中の LRG 濃度の定量結果と疾患活動性スコアとの相関関係については、研究代表者の項を参照。

## E. 結論

カニクイザルを用いたコラーゲン関節炎モデルに対し、次世代型 IL-6 受容体抗体投与時における血漿を採取し、これらの検体を研究代表者の仲のグループへ輸送し、解析を実施した。仲のグループにて独自に開発された LRG の ELISA システムを用いて次世代型 IL-6 受容体抗体投与時の血中 LRG 濃度を定量した結果、血中 LRG 濃度が関節炎スコアと相関し、CRP よりも LRG の方が関節炎スコアと強く相関したことから、血中 LRG 濃度が次世代型 IL-6 受容体抗体投与時の疾患活動性マーカーとなり得る事が示唆された。

## F. 健康危険情報

該当無し。

## G. 研究発表

### G-1. 論文発表

1. Kitazawa T, Igawa T, Sampei Z, Muto A, Kojima T, Soeda T, Yoshihashi K, Okuyama-Nishida Y, Saito H, Tsunoda H, Suzuki T, Adachi H, Miyazaki T, Ishii S, Kamata-Sakurai M, Iida T, Harada A, Esaki K, Funaki M, Moriyama C, Tanaka E,

Kikuchi Y, Wakabayashi T, Wada M, Goto M, Toyoda T, Ueyama A, Suzuki S, Haraya K, Tachibana T, Kawabe Y, Shima M, Yoshioka A, **Hattori K.** A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. Nat Med. 2012 Sep 30;18(10):1570-4.

### G-2. 学会発表

1. 54<sup>th</sup> ASH-American Society of Hematology (2012). Generation of a Novel Bispecific Antibody (ACE910) Against Activated Factor IX and Factor X Mimicking the Function of Factor VIII Cofactor Activity. Igawa T, Sampei Z, Soeda T, Okuyama-Nishida, Moriyama C, Wakabayashi T, Tanaka E, Muto A, Kojima T, Kitazawa T, Yoshihashi K, Harada A, Funaki M, Haraya K, Tachibana T, , Suzuki S, Esaki K, Nabuchi Y, **Hattori K.**

2. 54<sup>th</sup> ASH-American Society of Hematology(2012).Hemostatic Effect of a Novel Bispecific Antibody (ACE910) Against Activated Factor IX and Factor X in an Acquired Hemophilia A Model. Muto A, Kitazawa T, Yoshihashi K, , Takeda M, Soeda T, Igawa T, Sampei Z, Sakamoto Y, Okuyama-Nishida Y, Saito H, Kawabe Y, Shima M, Yoshioka A, **Hattori K.**

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
南木敏宏	炎症性筋疾患(多発性筋炎、皮膚筋炎)	足立満、笠間毅	アレルギー・リウマチ膠原病診療-最新ガイドライン	総合医学社	東京	2012	166-169

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
Shinzaki S, Kuroki E, Iijima H, Tatsunaka N, Ishii M, Fujii H, Kamada Y, Kobayashi T, Shibukawa N, Inoue T, Tsujii M, Takeishi S, Mizushima T, Oogata A, <u>Naka T</u> , Plevy SE, Takehara T, Miyoshi E.	Lectin-based Immunoassay for Aberrant IgG Glycosylation as the Biomarker for Crohn's Disease.	Inflamm Bowel Dis	In Press		2012
Nishioka C, Ikezoe T, Furihata M, Yang J, Serada S, <u>Naka T</u> , Nobumoto A, Kataoka S, Tsuda M, Udaka K, Yokoyama A.	CD34(+) /CD38(-) acute myelogenous leukemia cells aberrantly express CD82 which regulates adhesion and survival of leukemia stem cells.	Int J Cancer	In Press		2012
Yokoyama T, Enomoto T, Serada S, Morimoto A, Matsuzaki S, Ueda Y, Yoshino K, Fujita M, Kyo S, Iwahori K, Fujimoto M, Kimura T, <u>Naka T</u> .	Plasma membrane proteomics identifies bone marrow stromal antigen 2 as a potential therapeutic target in endometrial cancer.	Int J Cancer	132(2)	472-84	2013