

G. 研究発表

G-1 論文発表

1. Shima Y, Hosen N, Hirano T, Arimitsu J, Nishida S, Hagihara K, Narazaki M, **Ogata A**, Tanaka T, Kishimoto T, Kumanogoh A. Expansion of range of joint motion following treatment of systemic sclerosis with tocilizumab. *Mod Rheumatol*. 2013 In Press.
2. **Ogata A**, Tanimura K, Sugimoto T, Inoue H, Urata Y, Matsubara T, Kondo M, Ueki Y, Iwahashi M, Tohma S, Ohta S, Saeki Y, Tanaka T. and the MUSASHI Study Investigators. A Phase 3 Noninferiority Study of the Efficacy and Safety of Subcutaneous Tocilizumab Monotherapy Versus Intravenous Tocilizumab Monotherapy in Patients With Rheumatoid Arthritis With an Inadequate Response to Synthetic and/or Biologic DMARDs in Japan (MUSASHI Study). *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2013 In Press.
3. 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, **Ogata A**, Naka T, Plevy SE, Takehara T, Miyoshi E. Lectin-based Immunoassay for Aberrant IgG Glycosylation as the Biomarker for Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(2):321-31.
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 of 17 patients. *Mod Rheumatol*. 2013;23(6):1085-93.
5. 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*. 2013;42(4):253-9.
6. Ogawa M, Matsuda T, **Ogata A**, Hamasaki T, Kumanogoh A, Toyofuku T, Tanaka T. DNA Damage in Rheumatoid

Arthritis: An Age-Dependent Increase in the Lipid Peroxidation Derived DNA Adduct, Heptanone-Etheno-2'-Deoxycytidine. Autoimmune Dis. 2013;2013:183487.

G-2. 学会発表

1. 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会. 京都 2013.4.18-20. 蛭名耕介、史賢林、梶座康夫、富田哲也、緒方篤、平野亨、菱谷好洋、吉川秀樹. 関節リウマチにおけるエタネルセプトとアダリムマブの一次、2次無効に対するメソトレキセートとステロイドの影響についての検討-Osaka Biologics for Rheumatic Disease (BiRD) registry 284 症例での検討-.

2. 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会. 京都 2013.4.18-20. 緒方篤. 関節リウマチ患者(RA)を対象としたトシリズマブ皮下注(TCZ-SC)単剤による長期投与及びトシリズマブ点滴静注(TCZ-IV)から TCZ-SC への切り替えにおける有効性・安全性の検討.

3. 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会. 京都 2013.4.18-20. 濱野芳匡、木田博、森島淳仁、平野亨、檜崎雅司、嶋良仁、緒方篤、立花功、田中敏郎、熊ノ郷淳. 特発性非特異的間質性肺炎(Idiopathic NSIP)における疾患特異的自己抗体検索.

4. 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会. 京都 2013.4.18-20. 森島淳仁、平野亨、緒方篤、田中敏郎、熊ノ郷淳. ベーチェット病における新規自己抗体の探索.

5. 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会. 横浜 2013.5.11-12. 中林晃彦、檜崎雅司、新居卓朗、西出真之、濱野芳匡、平野亨、嶋良仁、緒方篤、田中敏郎、熊ノ郷淳. 気管支喘息、好酸球性副鼻腔炎を先行した IgG4-Mikulicz 病の一例.

6. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR) 2013, Madrid, Spain 12 -15 June 2013. Ogata A, and MUSASHI study Group. Normalization of C-reactive protein within the first 8 weeks is a predictive factor for the effectiveness of subcutaneous tocilizumab monotherapy in Japanese rheumatoid arthritis patients: Results from the MUSASHI study.

7. 第200回日本内科学近畿地方会 2013.6.8.神戸. 三谷祐貴子、中林晃彦、高島聡士、西出真之、西田純幸、平野亨、緒方篤、熊ノ郷淳. 出血減不明のくも膜下出血をきたした neuropsychiatric SLE (NPSLE)の1例.

8. 第201回日本内科学近畿地方会 2013.9.7.京都. 原侑紀、西出真之、檜崎雅司、濱野芳匡、中林晃彦、平野亨、嶋良仁、緒方篤、田中敏郎、熊ノ郷淳. 無気力のみを主訴とし

たが、MRI で広汎な白質病変を認めた
NPSLE の 1 例.

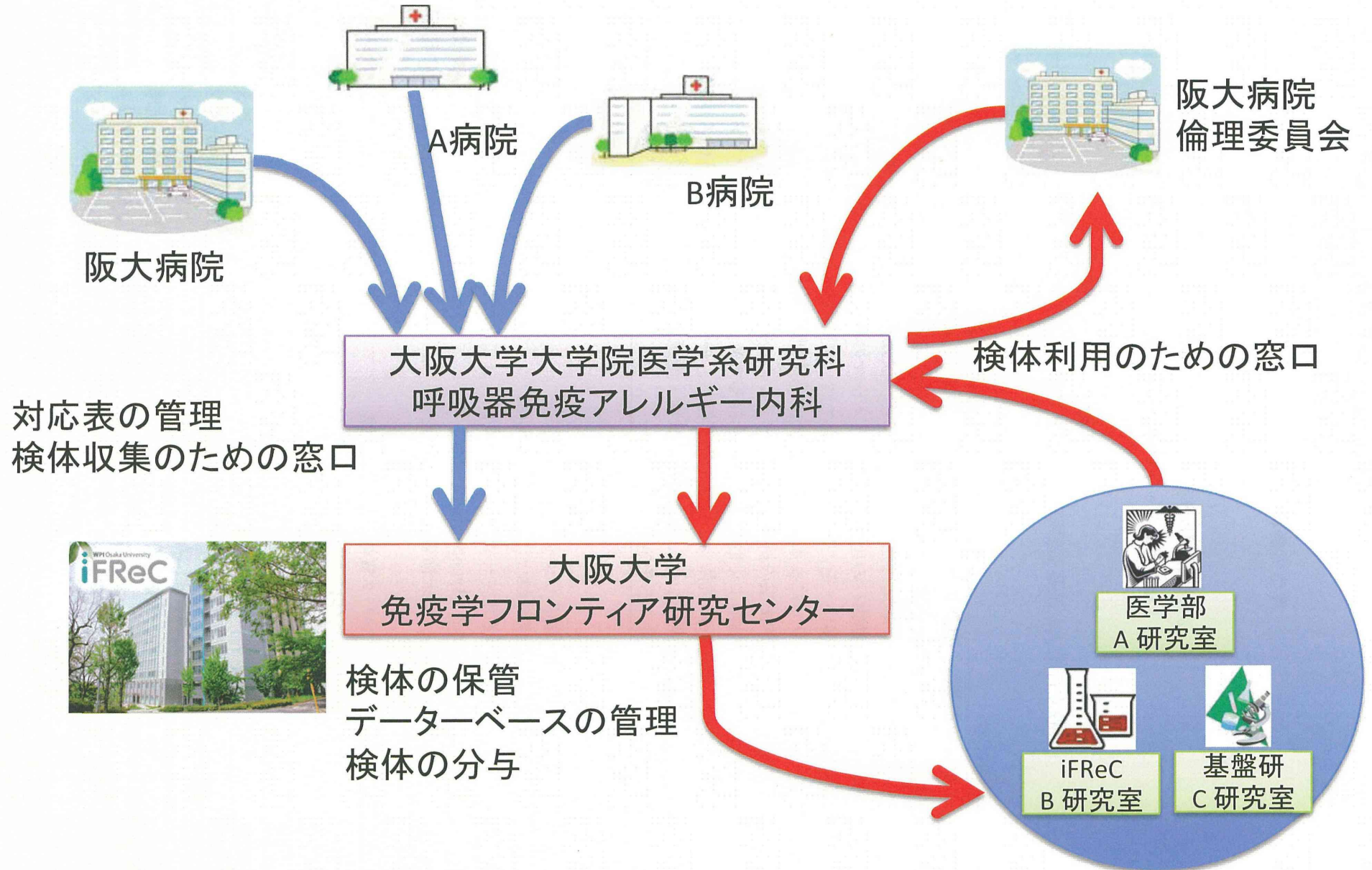
9. 第 23 回日本リウマチ学会近畿支部学
術集会. 大阪 2013.9.7. 西出真之, 植崎雅司,
沈嬌, 濱野芳匡, 中林晃彦, 平野亨, 嶋良仁, 緒
方篤, 田中敏郎, 熊ノ郷淳. IgG4 関連疾患が
疑われた無菌性髄膜炎の一例.

10. 2013 ACR/ARHP Annual Scientific
Meeting, San Diego USA, 25-30 October
2013. Ogata A and MUSASHI study
group. E Safety and Efficacy Of
Subcutaneous Tocilizumab Monotherapy
In a Long-Term Extension Study In
Japanese Rheumatoid Arthritis Patients.
Abst #1430,

H. 知的財産の出願. 登録状況

該当なし

検体バンク 概念図



厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

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)の有用性を明らかにし、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。昨年度は非免疫マウスリンパ球由来の抗体遺伝子ソースからscFv抗体ライブラリを構築した。本年度は、より高親和性の抗体を効率よく取得する方法を探るため、抗原で免疫したマウスのリンパ球由来の抗体遺伝子ソースからscFv抗体ライブラリを構築し、モデル抗原に対する抗体の単離を試みた。

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)の有用性を明らかにし、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。

昨年度は非免疫マウスリンパ球由来の抗体遺伝子ソースからscFv抗体ライブラリを構築した。本年度は、より高親和性の抗体を効率よく取得する方法を探るため、抗原で免疫したマウスのリンパ球由来の抗体遺伝子ソースからscFv抗体ライブラリを構築し、モデル抗原に対する抗体の単離を試みた。

B. 研究方法

マウスに対する抗原免疫

マウスはBALB/c(メス、6-7 週齢、日本 SLC)を用いた。モデル抗原として proCASP8 蛋白質を用いた。proCASP8 組み換え蛋白質を等量のアジュバント (Titer Max Gold, Sigma-Aldrich) 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、マウス頸部皮内、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、血清 proCASP8 抗体価を測定した。

ELISA による抗体価測定は以下のように行った。proCASP8 蛋白質を B buffer (0.05 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6); Sigma-Aldrich) で 10 μ g/mL に希釈し、Maxisorb 96 well plate (Nunc) 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 (DS ファーマバイオメディカル) 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、脾臓を摘出し、脾細胞を回収した。50~100 mg の組織に対して 1 mL の TRIzol reagent (Invitrogen) 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) 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 I I I 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、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) 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 ファージ溶液を 100 mL 添加し、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) 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、Maxisorp イムノプレートに 4° C で一晚固相化させた。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 1 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 ファージ溶液とした。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。

ファージ ELISA

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 μ g/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 μ l/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 μ g/ml Ampicillin、50 μ g/ml Kanamycin 含有 2YT 培地を 200 μ l 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操作に用いた。抗原を固相化したイムノプレートに 4% Block Ace を 200 μ l/well 添加してブロッキングした。PBS で 1 回洗浄後、ファージ懸濁液 80 μ l 及び 4% Block Ace 20 μ l 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) を 100 μ l/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。

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・考察

非免疫ファージ抗体ライブラリよりも、よりアフィニティの高い scFv クローンを多数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 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、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(図1)。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(IC-1~7)をもつ抗体であることが確認された(表1)。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(表2)。この結果から、免疫ファージ抗体ライブラリから単離した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ことが明らかとなった。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として有用と考えられた。

D. 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。昨年度確立した非免疫マウス由来抗体ライブラリに加え、より高親和性のscFv抗体を効率よく取得しうる方法として、抗原免疫マウス由来の抗体遺伝子をソースとして免疫ファージ抗体ライブラリを構築した。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、本手法の有用性が明らかとなった。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。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

F-1. 論文発表

1. Yoshikawa M, Mukai Y, Okada Y, Tsumori Y, **Tsunoda S**, Tsutsumi Y, Aird WC, Yoshioka Y, Okada N, Doi T, Nakagawa S. Robo4 is an effective tumor endothelial marker for antibody-drug conjugates based on the rapid isolation of the anti-Robo4 cell-internalizing antibody. Blood. 2013;121:2804-13.

2. **Tsunoda S**. Antibody Engineering for Next-Generation Biodrug Development. Yakugaku Zasshi. 2013;133(9): 923-24.

3. Morishige T, Yoshioka Y, Narimatsu S, Ikemizu S, **Tsunoda S**, Tsutsumi Y, Mukai Y,

Okada N, Nakagawa S. Mutants of lymphotoxin-α with augmented cytotoxic activity via TNFR1 for use in cancer therapy. Cytokine. 2013;61:578-84.

F-1. 論文発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

H. その他

該当なし

I. 協力研究者

鎌田春彦	独立行政法人医薬基盤研究所 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	独立行政法人医薬基盤研究所 抗体スクリーニングプロジェクト サブプロジェクトリーダー
長野一也	独立行政法人医薬基盤研究所 バイオ創薬プロジェクト プロジェクト研究員

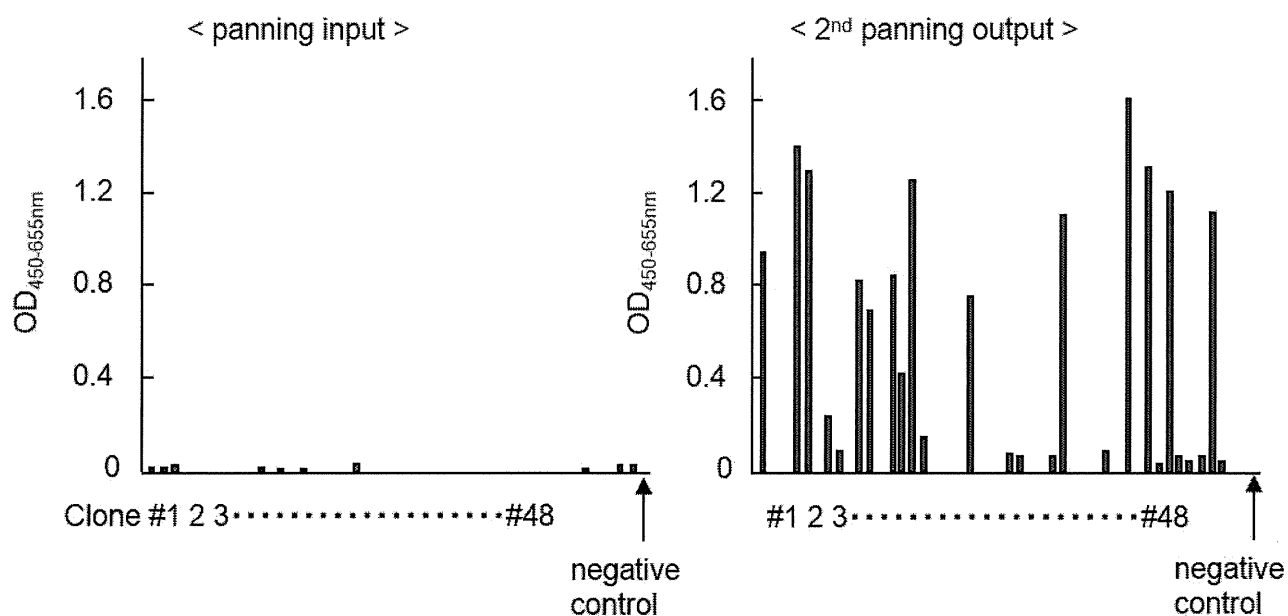


図1 免疫抗体ライブラリによるモデル抗原 (proCASP8) に対する scFV クローンのスクリーニング

パンニング前及び2nd パンニング後のライブラリから48 クローンをピックアップしてモノクローン化し、産生された scFv 抗体発現ファージを用いてファージ ELISA (固相 proCASP8, 一時抗体: scFV 抗体発現ファージ, 二次抗体: anti-M13 抗体) により結合性を評価した。ネガティブコントロールとして抗 KDR 発現ファージを用いた。パンニング後には、多数の proCASP8 親和性の候補クローンが濃縮されていた。

VL

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
IC-1	DIQNIQSQKFMSTSVGDRVSVC	KASQNVGTVA	WYQQRPGQSPKALIY	SASYRYS	GVPDRFTGSGSGTDFLTISNQSEDLAEYFC	QQVNSYPLT	FGAGTELEIKR
IC-2	---T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IC-3	---V-T-----	-----	-----	-----	-----D---	---S---	---G---
IC-4	---V-T-----	-----	-----	-----	-----	-----	---G---
IC-5	--LLT--PTT-AA-P-EKITI--	S--SSISSNYLH	----F--L---	RT-NLA-	--A-S---SYS--GTMEA--V-T-Y-	--GS---	-----L-
IC-6	--VLT--PTT-AA-P-EKITI--	S--SSISSNYLH	----F--L---	RT-NLA-	--A-S---SYS--GTMEA--V-T-Y-	--GS---	-----L-
IC-7	--VLJ--PTT-AA-P-EKITI--	S--SSISSNYLH	----F--L---	RT-NLA-	--A-S---SYS--GTMEA--V-T-Y-	--GS---	-----L-

VH

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
IC-1	EVOLVESGGGLVFPGGSLKLSAASGFAPS	SYDMS	WVRQTPKKRLWVA	TISSGGSITYYPDSVEG	RFTISRDNARNVILQMSLSRSEDTALYYCAR	HWYY	WGQGTILTYS
IC-2	---M-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IC-3	---K-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IC-4	---K-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IC-5	-----Q-K-----T-N	-YA-N	---A-G-G---	R-R-KSNWATYYADSVED	-----DSQSM-----NN-KT---M--V-	HTVTMDY	---SV---
IC-6	---H-----Q-K-----T-N	-YA-N	---A-G-G---	R-R-KSNWATYYADSVED	-----DSQSM-----NN-KT---M-F-V-	HTVTMDY	---SV---
IC-7	-----Q-K-----T-N	-YA-N	---A-G-G---	R-R-KSNWATYYADSVED	-----DSQSM-----NN-KT---M--V-	HTVTMDY	---SV---

表1 免疫ライブラリから取得した 抗 proCASP8-scFv 抗体のアミノ酸シーケンス

上パネル： VL ドメイン

下パネル： VH ドメイン

横棒： 上段に記載のアミノ酸残基に同じ

	proCASP8	bid	Importin-β	venus	TNFR2	KDR	luciferase
IC-1	+	-	-	-	-	-	-
IC-2	+	-	-	-	-	-	-
IC-3	+	-	-	-	-	-	-
IC-4	+	-	-	-	-	-	-
IC-5	+	-	-	-	-	-	-
IC-6	+	-	-	-	-	-	-
IC-7	+	-	-	-	-	-	-

表2 抗 proCASP8-scFv クローンの結合特性（ファージ ELISA）

7 クローン（IC1～IC7）の抗 proCASP8 scFv 発現ファージの抗原特異性を、各種リコンビナント蛋白質に対する結合性で評価した。

抗 leucine rich alpha-2 glycoprotein(LRG)抗体の開発と ELISA システムの構築

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、本邦で開発された抗 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抗 IL-6 受容体抗体を開発中である。次世代型抗 IL-6 受容体抗体は、最新の抗体工学技術(Igawa T *et al*, Nat Biotechnol 2010)を用いて現行の抗 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、抗 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、抗 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 native な立体構造を認識する抗 LRG モノクローナル抗体を複数種類作成し、ELISA システムの構築を試みた。その結果、非常に高感度なヒト LRG ELISA システムの構築に成功した。ヒトの関節炎モデルとして霊長類のカニクイザルを用いたコラーゲン誘導性関節炎が用いられているが、今回開発したヒト LRG ELISA キットはカニクイザル血漿 LRG の定量も可能であった。結合活性の高い抗 LRG 抗体を仲のグループに輸送し、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結果、抗 IL-6 受容体抗体により治療を受ける関節リウマチ患者において、CRP 低値でありながら、疾患活動性(CDAI)にて活動性のある患者を検出できるマーカーとなり得ることが示唆された。

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、

本邦で開発された抗 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抗 IL-6 受容体抗体を開発中である。次世代型抗 IL-6 受容体抗体は、最新の抗体工学技術(Igawa T *et al*, Nat Biotechnol 2010)を用いて現行の抗 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、抗 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、抗 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抗 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、ヒト LRG の native な立体構造を認識するモノクローナル抗体の開発、及び、高感度な ELISA システムの構築を試みた。

B. 研究方法

(1) 抗原タンパク質の調製

ヒト LRG-FLAG/His 遺伝子を CHO 細胞に遺伝子導入し、安定発現株を樹立した。培養上清を ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel (Sigma-Aldrich)に通し、樹脂を洗浄後にヒト LRG-FLAG/His タンパク質を FLAG ペプチドで競合的に溶出した。溶出したタンパク質溶液をゲル濾過精製するとともに、PBS にバッファ交換した。カニクイザル LRG-FLAG/His タンパク質も同様の方法にて精製した。

(1) ヒト LRG に対する抗体の開発

ウサギ(N=3)にヒト LRG-FLAG/His タンパク

質を 4 回免疫し、末梢血リンパ球と脾臓より IgG 陽性の B 細胞を MACS で精製し、LRG と結合する抗体を持つ細胞を FACS にて選択した。抗体の変換領域の DNA 配列解析を行い、動物細胞に抗体遺伝子を導入して培養上清から抗体を精製した。Octet システムを用いた相互作用解析により、native な立体構造の LRG と結合する抗体を選別した。

サンドイッチ ELISA では、2 種類の抗体を組み合わせる必要があるが、2 種類ともウサギモノクローナル抗体であると、検出が困難となる。そこで、効率的にサンドイッチ ELISA システムを開発できるように、それぞれのクローン(ウサギモノクローナル抗体)について、Fc 領域をヒト IgG1 型に変換したものを作成し、固相化用抗体にはヒト IgG1 型、検出用抗体にはウサギ IgG 型抗体を使用した。

(倫理面への配慮)

動物実験は実験動物委員会の承認を得、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

ヒト LRG モノクローナル抗体の開発と ELISA システムの構築

精製した遺伝子組み換えヒト LRG タンパク質をウサギに免疫し、LRG に対して高い結合活性を有する抗体を 94 種類選抜した。これらの抗体の定常領域をウサギ型とヒト型に組み換えた抗 LRG 抗体を調製し、サンドイッチ ELISA を効率良く開発できるように全抗体の競合 ELISA を実施した。選抜した抗体を用いて、ヒト LRG を検出できる ELISA システムの構築に成功し、同様にカニクイザルの LRG も検出できることを明らかにした (図 1、図 2 参照)。

E. 結論

本研究にて新たに開発した LRG 抗体は native な LRG の立体構造を認識するものであり、従来の変性させた LRG を認識する ELISA システムとは異なり、感度も向上している。抗 IL-6 受容体抗体治療時の関節リウマチ患者血清中の LRG の定量は、研究代表者の仲のグループが行っているが、CRP 陰性 (CRP<0.2) でありながら、疾患活動性 (CDAI>2.8) の患者の一部において LRG 濃度が高値を示しているため、血清 LRG をモニターすることが抗 IL-6 受容体抗体治療時の疾患活動性マーカーとなり得る事を示唆している。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Mimoto F, Katada H, Kadono S, Igawa T, Kuramochi T, Muraoka M, Wada Y, Haraya K, Miyazaki T, **Hattori K**. Engineered antibody Fc variant with selectively enhanced FcγRIIb binding over both FcγRIIaR131 and FcγRIIaH131. Protein Eng Des Sel. 2013;26:589-98.
2. Igawa T, Maeda A, Haraya K, Tachibana T, Iwayanagi Y, Mimoto F, Higuchi Y, Ishii S, Tamba S, Hironiwa N, Nagano K, Wakabayashi T, Tsunoda H, **Hattori K**. Engineered monoclonal antibody with novel antigen-sweeping in vivo. PLoS One. 2013;8:e63236.

3. Sampei Z, Igawa T, Soeda T, Okuyama-Nishida Y, 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**. Identification and multidimensional optimization of an asymmetric bispecific IgG antibody mimicking the function of factor VIII cofactor activity. PLoS One. 2013;8:e57479.

4. Mimoto F, Igawa T, Kuramochi T, Katada H, Kadono S, Kamikawa T, Shida-Kawazoe M, **Hattori K**. Novel asymmetrically engineered antibody Fc variant with superior FcγR binding affinity and specificity compared with afucosylated Fc variant. MAbs. 2013;13:229-36.

5. Ueda O, Tateishi H, Higuchi Y, Fujii E, Kato A, Kawase Y, Wada NA, Tachibe T, Kakefuda M, Goto C, Kawaharada M, Shimaoka S, **Hattori K**, Jishage K. Novel genetically-humanized mouse model established to evaluate efficacy of therapeutic agents to human interleukin-6 receptor. Scientific Reports. 2013;3:1196.

G-2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

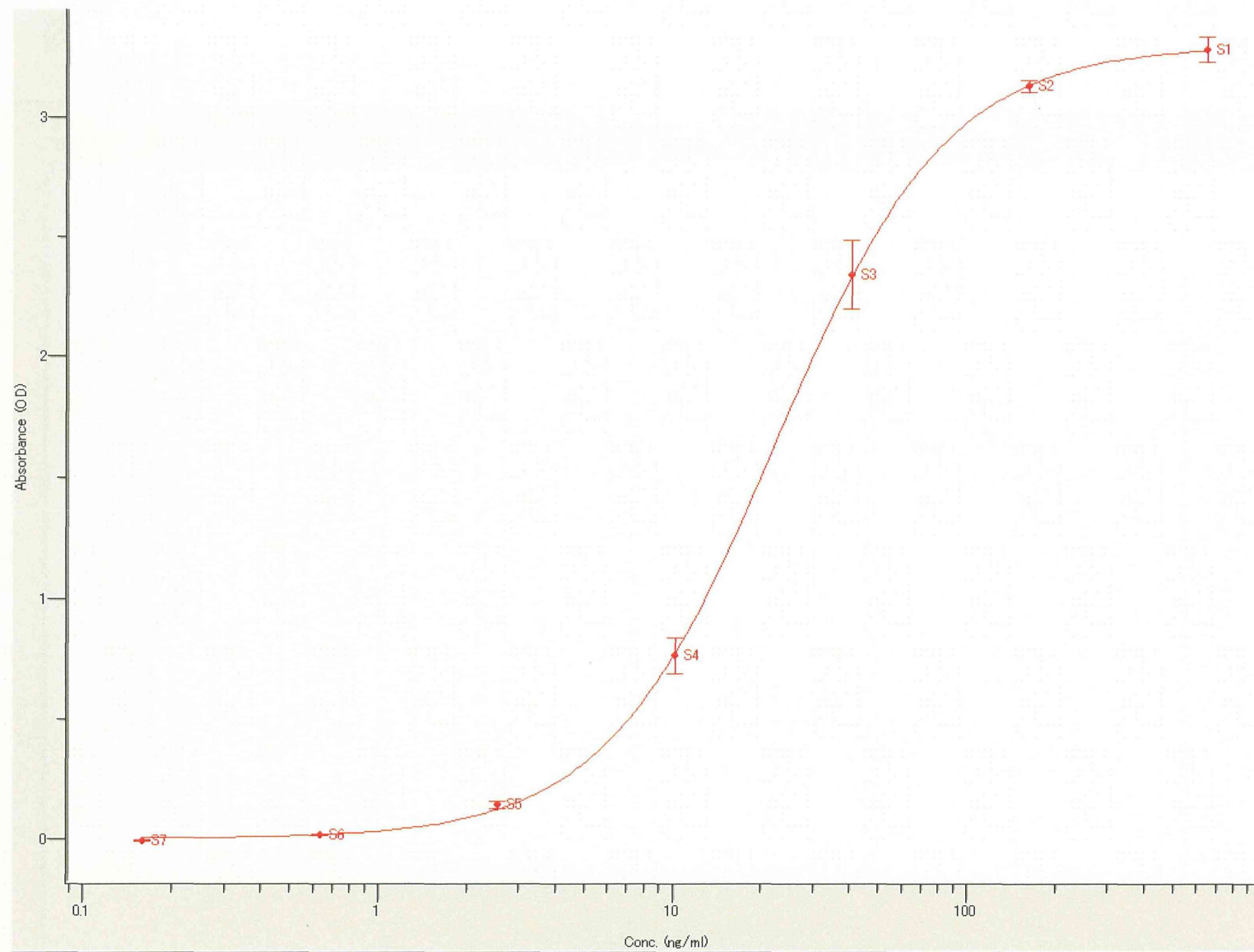


図1.ヒトLRGモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAシステムによるヒトLRGの検量線

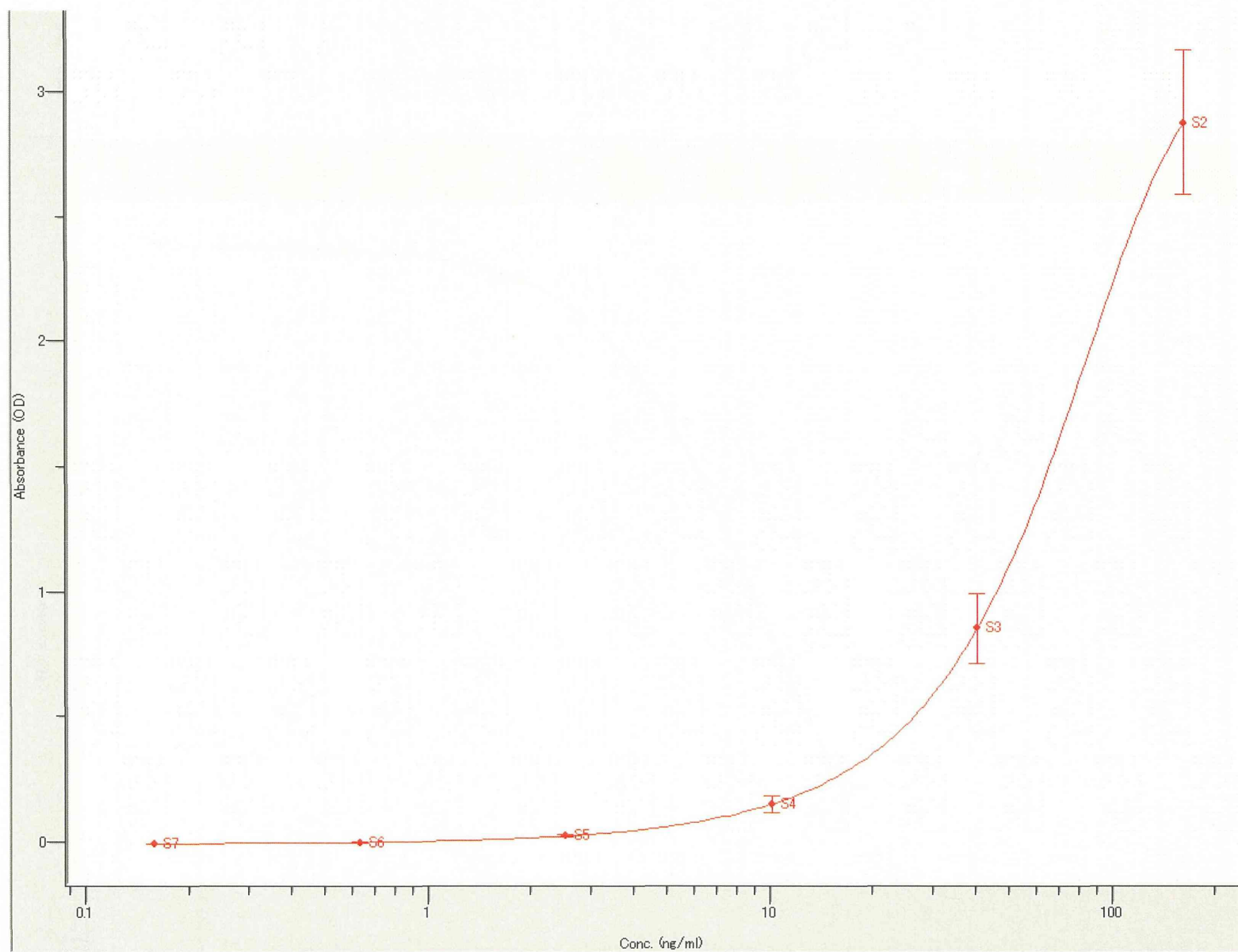


図2.ヒトLRGモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAシステムによる
カニクイザルLRGの検量線

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
Ota M, Serada S, <u>Naka T</u> , Mori Y.	MHC class I molecules are incorporated into human herpesvirus-6 viral particles and released into the extracellular environment.	Microbiol Immunol.			2013 In Press
Sadaoka T, Serada S, Kato J, Hayashi M, Gomi Y, <u>Naka T</u> , Yamanishi K, Mori Y.	Varicella-zoster virus ORF49 functions in the efficient production of progeny virus through its interaction with essential tegument protein ORF44.	J Virol.			2013 In Press
Matsuzaki S, Enomoto T, Serada S, Yoshino K, Nagamori S, Morimoto A, Yokoyama T, Kim A, Kimura T, Ueda Y, Fujita M, Fujimoto M, Kanai Y, Kimura T, <u>Naka T</u> .	Annexin A4-conferred platinum resistance is mediated by the copper transporter ATP7A.	Int J Cancer.			2013 In Press
Shimada K, Serada S, Fujimoto M, Nomura S, Nakatsuka R, Harada E, Iwahori K, Tachibana I, Takahashi T, Kumanogoh K, Kishimoto T, <u>Naka T</u> .	The molecular mechanism underlying anti-proliferative effect of SOCS-1 in non-small cell lung cancer cells.	Cancer Sci.			2013 In Press
Umegaki-Arao N, Tamai K, Nimura K, Serada S, <u>Naka T</u> , Nakano H, Katayama I.	Karyopherin alpha2 is essential for rRNA transcription and protein synthesis in proliferative keratinocytes.	PLoS One.	8(10)	e76416	2013

Ishii H, Tanabe S, Ueno M, Kubo T, Kayama H, Serada S, Fujimoto M, Takeda K, <u>Naka T</u> , Yamashita T.	IFN-g-dependent secretion of IL-10 from Th1 cells and microglia/macrophages contributes to functional recovery after spinal cord injury.	Cell Death Dis.	4	e710	2013
Yamada M, Mugnai G, Serada S, Yagi Y, <u>Naka T</u> , Sekiguchi K.	Substrate-attached materials are enriched with tetraspanins and are analogous to the structures associated with rear-end retraction in migrating cells.	Cell Adh Migr.	7(3)	304-14	2013
Takahashi T, Serada S, Ako M, Fujimoto M, Miyazaki M, Nakatsuka R, Ikezoe I, Yokoyama A, Taguchi T, Shimada K, Kurokawa Y, Yamasaki M, Miyata H, Nakajima K, Takiguchi S, Mori M, Doki Y, <u>Naka T</u> , Nishida T.	New findings of kinase switching in gastrointestinal stromal tumor under imatinib using phosphoproteomic analysis.	Int J Cancer.	133(11)	2737-43	2013
Tang H, Serada S, Kawabata A, Ota M, Hayashi E, <u>Naka T</u> , Yamanishi K, Mori Y.	CD134 is a cellular receptor specific for human herpesvirus-6B entry.	Proc Natl Acad Sci U S A.	110(22)	9096-9	2013
Nishioka C, Ikezoe T, Furihata M, Yang J, Serada S, <u>Naka T</u> , Nobumoto A, Kataoka S, Tsuda M, Uda K, Yokoyama A.	CD34(+) /CD38(-) acute myelogenous leukemia cells aberrantly express CD82 which regulates adhesion and survival of leukemia stem cells.	Int J Cancer.	132(9)	2006-19	2013

He P, Kuhara H, Tachibana I, Jin Y, Takeda Y, Tsumoto S, Minami T, Kohmo S, Hirata H, Takahashi R, Inoue K, Nagatomo I, Kida H, Kijima T, <u>Naka T</u> , Morii E, Kawase I, Kumanogoh A.	Calretinin mediates apoptosis in small cell lung cancer cells expressing tetraspanin CD9.	FEBS Open Bio.	3	225-30	2013
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, Ogata 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.	19(2)	321-31	2013
<u>Takeuchi T</u> , Kawai S, Yamamoto K, Harigai M, Ishida K and Miyasaka N.	Post-marketing surveillance of the safety and effectiveness of tacrolimus in 3267 Japanese patients with rheumatoid arthritis.	Mod Rheum.			2013 In Press
Kaneko Y, Kondo H and <u>Takeuchi T</u> .	ACR/EULAR remission criteria maintains strict performance when evaluated in 44 joints.	J Rheumatology.			2013 In Press

Koike T, Harigai M, Inokuma S, Ishiguro N, Ryu J, Takeuchi T , Tanaka Y, Yamanaka H, Hirose T, Yoshinaga T, and Suzuki M.	Safety and effectiveness of 6 months etanercept monotherapy and combination therapy in Japanese patients with Rheumatoid Arthritis: Effect of concomitant disease-modifying anti-rheumatic drugs.	J Rheumatology.			2013 In Press
Nishina N, Kaneko Y, Kameda H, Kuwana M, and Takeuchi T .	Reduction of plasma IL-6, but not TNF- α by methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis: a potential biomarker for radiographic progression.	Clinical Rheumatology.			2013 In Press
Nakajima A, Saitoh K, Kojima T, Amano K, Yoshio T, Fukuda W, Inoue E, Taniguchi A, Momohara S, Minota S, Takeuchi T , Ishiguro N, Tanaka Y, and Yamanaka H.	No increased mortality in patients with rheumatoid arthritis treated with biologics: results from the biologics register of six rheumatology institutes in Japan.	Mod Rheum.			2013 In Press
Takeuchi T , Yamanaka H, Ishiguro N, Miyasaka N, Mukai M, Matsubara T, Uchida S, Akama H, Hartmut K, Vipin A, and Tanaka Y.	Adalimumab, a Human anti-TNF monoclonal antibody, outcome study for the prevention of joint damage in Japanese patients with early RA: the HOPEFUL study.	Ann Rheum Dis.			2013 In Press

Tsuboi H, Hagiwara S, Asashima H, Umehara H, Kawakami A, Nakamura H, Sano H, Tsubota K, Ogawa Y, Takamura E, Saito I, Inoue H, Nakamura S, Moriyama M, Takeuchi T , Tanaka Y, Hirata S, Mimori T, Matsumoto I, and Sumida T.	Validation of different sets of criteria for the diagnosis of Sjogren's syndrome in Japanese patients.	Mod Rheum.	23	219-25	2013
Takeuchi T and Suzuki K.	CD247 variants single nucleotide polymorphisms observed in systemic lupus erythematosus.	Rheumatology.	52 (9)	1551-5	2013
Takeuchi T , Matsubara T, Nitobe T, Suematsu E, Ohta S, Honjyo S, Abe T, Yamamoto A, Miyasaka N, and The Japan Abatacept Study Group.	Phase II dose-response study of abatacept in Japanese patients with active rheumatoid arthritis with inadequate response to methotrexate.	Mod Rheum.	23 (2)	226-35	2013
Takeuchi T , Horigaya M, Tanaka Y, Yamanaka H, Ishiguro N, Yamamoto K, Miyasaka N, Koike T, Kanazawa M, Ohba T, Yoshinari T, Baker D, and the GO-MONO study group.	Golimumab monotherapy in Japanese patients with active rheumatoid arthritis despite prior treatment with disease-modifying anti-rheumatic drugs: results of the Phase 2/3, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled GO-MONO study through 24 weeks.	Ann Rheum Dis.	72 (9)	1488-95	2013