

3La09 各種ヒト型抗体酵素の細胞傷害性と特異性

○飯倉 陵¹, 園田 沙理¹, 一二三 恵美^{2,3}, 宇田 泰三^{1,3}
(¹大分大院・工,²大分大・全学研究推進機構,³科技団・CREST)
uda@cc.oita-u.ac.jp

抗体酵素は抗原に対する高い反応特異性を有し、さらに酵素の活性をもつ抗体鎖である。本研究では、ヒトの白血球より抽出したκ鎖 subgroup II 由来のヒト抗体軽鎖遺伝子をクローニングし、大腸菌で発現させて高純度に精製した。この作製したヒト型抗体軽鎖を用いて各種癌細胞に対する細胞傷害性を検討した。

抗体軽鎖はNiカラムクロマトグラフィーと陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。

細胞傷害性試験では、培養した SNU-1, A549 を $0.5 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4$ cells/well で 96 穴プレートに播種し、抗体軽鎖を添加して 24-48 時間培養した。WST-1 試薬 (Roche) を添加し、450 nm の吸光度により生成したホルマザン色素を測定することで細胞生存率を求めた。

数種の抗体軽鎖について試験を行ったところ、#1 Dimer(D) と Monomer(M), 23D4 D が SNU-1 細胞の増殖を抑制した。その程度は強い方から順に #1 D, 23D4 D, #1 M であった。これらの抗体軽鎖を A549 細胞に反応させたところ、#1 D と #1 M が SNU-1 細胞よりも低いレベルで増殖を抑制し、23D4 D は効果を示さなかった。一方、SNU-1 細胞では効果の程度が低かった #11 D が A549 細胞に対して効果を示した。これらの結果から細胞株毎に効果の示す clone が異なることが分かった。また、#1 は可変領域に His を 4 残基持つという特徴があったことから、配列との関連に着目しながら、引き続き subgroup II 由来の抗体軽鎖について、各種癌細胞や正常細胞に対する傷害性を検討する。

Cytotoxicity and specificity of several human catalytic antibody light chains

○Ryou Iikura¹, Sari Sonoda¹, Emi Hifumi^{2,3}, Taizo Uda^{1,3}
(¹Grad. Sch. Eng., Oita Univ.,²Research Promotion Project, Oita Univ.,³CREST, JST)

Key words catalytic antibody, cytotoxicity, cancer cell

3La11 ヒト型「スーパー抗体酵素」(Antigenase)の効率的作製法と生化学的性質

○一二三 恵美^{1,3}, 宇田 泰三^{2,3}
(¹大分大・全学研究推進機構,²大分大・工・応化,³科技団・CREST)
e-hifumi@oita-u.ac.jp

演者からこれまでで定常状態にある抗原をマウスに免疫することで、HIV gp41, CCR-5, *H. pylori* ウレアーゼなどに対するスーパー抗体酵素 (Antigenase) を作製してきた。酵素活性が軽鎖 (κ鎖) に存在する場合には、bb1, cr1, bd2 などのある特定の germline gene に集中して見出された。そこで、この概念をヒトについても応用し、いくつかの興味ある結果を見出したので報告する。

狂犬病ワクチン接種者のボランティアの白血球より抽出した RNA から cDNA を合成し、軽鎖の Subgroup II 遺伝子だけを選択的に増幅させてクローン化した。発現には pET20b(+) vector, 大腸菌株は BL21(DE3)pLysS を用いた。発現誘導後、可溶性画分を用いて Ni-NTA カラフィーと陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて軽鎖タンパクを精製した。これら軽鎖タンパクの Peptidyl-MCA 基質に対する分解活性を調べると、ほとんどのクローンが QAR-MCA 基質を分解し、逆に APA-MCA 基質は全く分解しなかった。K-MCA 基質に対してはいくつかのクローンで弱い分解活性が認められ、概してトリプシン様活性をもつと推測された。次に、#18 クローンを用いて狂犬病ウイルスに対する *in vitro* および *in vivo* 試験を実施したところ、感染能に強く影響するという興味ある結果を得た。また、現在インフルエンザウイルスなどについても抗ウイルス試験を実施し、特異性などを検証しているところである。

Highly efficient preparation method and biological features of human super catalytic antibodies (Antigenase)

○Emi Hifumi^{1,3}, Taizo Uda^{2,3}
(¹Res. Center Appl. Med. Eng., Oita Univ.,²Dept. Appl. Chem., Fac. Eng., Oita Univ.,³CREST, JST)

Key words catalytic antibody, light chain, rabies, influenza

3La10 ヒト型抗体酵素の核酸分解活性についての研究 (II)

○森口 智尋^{1,3}, 廣田 勝己^{1,3}, 高本 麻衣^{1,3}, 本庄 栄二郎^{1,3},
一二三 恵美^{2,3}, 宇田 泰三^{1,3}
(¹大分大院・工,²大分大・全学研究推進機構,³科技団・CREST)
uda@cc.oita-u.ac.jp

演者らはこれまで酵素活性を持つ完全ヒト型抗体軽鎖の探索を行ってきた。本研究では、ヒト型 kappa 鎖の germline gene Subgroup II に着目し、ヒト型抗体軽鎖の中に DNA (pBR322) を分解する clone があるかどうかを Nuclease 活性試験と In-gel assay で確認した。

Nuclease 活性試験では、10 mM MgCl₂, 25 mM pH 7.5 Tris-HCl, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl 水溶液中で 20 μg/mL の pBR322 と 50 μg/mL の抗体軽鎖を、反応温度 37 °C、反応時間 24 および 48 時間で反応させた。In-gel assay では、calf thymus DNA を含む SDS ゲルを作製し、泳動前にクロンを 0.1 % SDS を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) で 22 °C、20 分インキュベートし、SDS-PAGE 電気泳動を行った。泳動後に、20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) で常温、1 時間インキュベートし、4 mM MgCl₂ と 0.2 mM CaCl₂、また 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) を含む buffer で反応温度 25 °C、反応時間 15 時間で反応させた。どちらも反応後に Ethidium bromide 染色により分解活性の有無を判断した。

2 次精製 (Ni-NTA カラム + 陽イオン又は抗体アフィニティークラム) まで行った高純度ヒト型抗体軽鎖の Wild Type において 17 clone の Nuclease 活性試験を行ったところ、8 clone が活性を示し、特に #4 clone が高い活性を示した。また、由来 germline が同じもので触媒三ツ組残基様構造を持つと思われた clone には核酸分解活性は認められず、変異によって触媒三ツ組様構造を持たなくなった clone には核酸分解活性が認められた。これらの活性は In-gel assay によっても確認された。

Study on the catalytic activity of human antibody light chain digesting a DNA (II)

○Chihiro Moriguchi^{1,3}, Katsuki Hirota^{1,3}, Mai Takamoto^{1,3}, Eijiro Honjo^{1,3},
Emi Hihumi^{2,3}, Taizo Uda^{1,3}
(¹Grad. Sch. Eng., Oita Univ.,²Research Promotion Project, Oita Univ.,³CREST, JST)

Key words human antibody light chain, DNase activity

3La12 In vitro domain shuffling を利用したヒト抗 CD20 抗体のスクリーニング

○佐々木 栄樹¹, 熊田 陽一², 岸本 通雅²
(¹京工繊大院・工芸科学・物質工学,²京工繊大院・工芸科学・生体分子工学)
kumada@kit.ac.jp

【背景・目的】抗体医薬は疾患部位に対して特異的に作用し、体内の免疫系を活性化させ選択的に排除できるため高い治療効果が期待されている。しかし、従来、実用化されてきた抗体医薬の多くは抗原結合ドメインの一部にマウス由来のアミノ酸領域を有するキメラ抗体やヒト化抗体であり、それらの抗原性が排除できないため、副作用や薬効の低下が問題視されている。本研究では In Vitro Domain Shuffling 技術を用いてキメラ抗 CD20 抗体 (rituximab) から同等以上の抗原親和性を有する完全ヒト抗体の単離を試みた。

【実験方法・結果】モデル抗体医薬として悪性リンパ腫の治療薬である抗 CD20 抗体 (rituximab) を用いた。本抗体は Fv 領域にマウス由来のアミノ酸配列を含むキメラ抗体である。本抗体の Fab H および L にポリスチレン親和性ペプチド (PS-tag) を融合したキメラ Fab H, キメラ Fab L を作製した。さらにヒト Fab H, ヒト Fab L の C 末端部に PS-tag を導入し、これらを Fab H ライブラリ, Fab L ライブラリとした。まず、キメラ Fab H とヒト Fab L ライブラリ、またはキメラ Fab L とヒト Fab H ライブラリの組み合わせによって高い抗原親和性を示すクローンを選出し、選出されたクローンに対し、ヒト Fab H ライブラリ、またはヒト Fab L ライブラリを組み合わせ、抗原親和性を高く維持しているヒト Fab H/Fab L の組み合わせを選出した。現在、得られたヒト Fab 抗体 (ヒト Fab H, ヒト Fab L) の抗原親和力をキメラ抗 CD20 Fab 抗体と比較している。

Screening of human anti-CD20 antibody by in vitro domain shuffling technology

○Eiju Sasaki¹, Youichi Kumada², Michimasa Kishimoto²
(¹Dept. Chem. Materials. Tech., Kyoto Inst. Tech.,²Dept. Biomol. Eng. Tech., Kyoto Inst. Tech.)

Key words in vitro domain shuffling, PS-tag, rituximab