

- 3P-003 変異能力を有する B 細胞株 DT40-SW を用いたタンパク質ディスプレイシステムにおけるタンパク質進化**
 ○渡邊 康二, 日笠 卓哉, 植月 英知, 徳光 浩, 曲 正樹, 大森 斉, 金山 直樹
 (岡山大学院・自・化学生命)
 nkanayam@okayama-u.ac.jp

我々は、ニトリ B 細胞株 DT40 の変異能力を用いて in vitro 抗体作製システムを構築してきた。変異導入機構が内包された DT40 のタンパク質ディスプレイシステムへの応用は、変異タンパク質ライブラリーの効率的作製の点で非常に有用である。これまでに DT40 の抗体定常部遺伝子をヒト IgG1 抗体 Fc 遺伝子に置換することにより、任意のタンパク質を Fc 融合タンパク質として DT40 細胞表面および培養上清中に発現させ、目的タンパク質に変異を導入できることを見いだした。本発表では、数種のモデルタンパク質をこの新規な動物細胞ディスプレイシステムに導入した例について報告する。ヒト IgG1 Fc 発現型 DT40 の抗体重鎖可変部遺伝子を赤色蛍光タンパク質 mCherry 遺伝子に置換したところ、mCherry はヒト IgG1 Fc との融合タンパク質として細胞表面および培養上清中に発現された。さらに、この細胞株の変異能力を ON にして得られた mCherry 変異体発現細胞ライブラリーの中から、蛍光波長がより赤色側にシフトした mCherry 変異体発現細胞を、セルソーターを用いて単離することに成功した。特定のガン細胞に発現する上皮成長因子受容体 (EGFR) に結合するラマ由来の単一ドメイン抗体の可変部を、同様に DT40 の細胞表面に発現させることに成功しており、現在、その親和性成熟を試みている。本ディスプレイシステムは、変異・発現・選択を細胞内に一体化した新たなディスプレイシステムとして、さまざまなタンパク質改変への応用が期待される。

Protein evolution in a protein display system using the hypermutating B cell line DT40-SW.

○Koji Watanabe, Takuya Hikasa, Hidetomo Uetsuki, Hiroshi Tokumitsu, Masaki Magari, Hitoshi Ohmori, Naoki Kanayama
 (Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Sci. Tech., Okayama Univ.)

Key words DT40 cells, cell surface display, antibody, somatic hypermutation

- 3P-005 Fc 融合二重特異性ががん治療抗体の配向性の検討と親和性向上による高機能化**
 ○浅野 竜太郎, 今野 翔太, 下村 一平, 梅津 光央, 熊谷 泉
 (東北大院・工)
 ryutaro@kuma.che.tohoku.ac.jp

抗体医薬の薬価の低減に向けては、低用量でも十分な効果を発揮する人工設計に基づく高活性の組換え抗体の創製に期待が寄せられている。我々は、ヒト上皮増殖因子受容体 (EGFR) と T 細胞表面抗原 CD3 間の架橋効果により特異的な抗腫瘍効果を発揮する低分子二重特異性抗体 Ex3 に、さらにヒト Fc 領域を融合させることでエフェクター機能を付与させた Ex3-Fc を開発してきた。本研究では、Ex3-Fc のさらなる高機能化に向けて、抗原結合ドメインの配向性を検討すると共に、親和性を向上させるための変異導入を行った。Ex3-Fc は、構成する 2 種の抗原結合ドメインの連結順を入れ換えることで 4 種の配向性が存在するが、興味深いことにがん細胞に対する細胞傷害活性に差がみられた。標的抗原に対する親和性は同等であったが、EGFR と T 細胞間の架橋能を評価した結果には差異がみられたため、細胞間の架橋における立体障害の違いが影響を及ぼしたと考えられる。一方で、プロテアーゼで Fc 領域を切断した後も細胞傷害活性の優劣は同様であったため、立体障害は抗原結合ドメインと Fc 領域との間ではなく、標的抗原近傍の分子との間に生じていることが予想された。さらに最も活性の強い配向性の Ex3-Fc に対して、以前にファージ提示法により単離された EGFR に対する高親和性変異を導入したところ、親和性の向上に起因すると考えられる細胞傷害活性の向上がみられた。組換え抗体の高機能化には立体障害を回避するような配向性の検討や親和性を向上させる変異導入が有効であるといえる。

Functionalization of cancer therapeutic bispecific antibody with human Fc region by rearranging the domain order and affinity maturation

○Ryutaro Asano, Shota Konno, Ipppei Shimomura, Mitsuo Umetsu, Izumi Kumagai
 (Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

Key words antibody, protein engineering, scFv, scFv-Fc

- 3P-004 インフルエンザウイルス H1N1 特異的組換え抗体の単離及びウイルス検出への応用**
 ○董 金華¹, 朴 龍洙², 上田 宏¹
 (東工大・資源研,²静大・グリーン科学技術研)
 ueda@res.titech.ac.jp

【目的】 インフルエンザウイルスは、我々人類全体に対する脅威である。歴史上多数のパンデミックが起き、大きな被害をもたらしてきた。特に H1N1 ウイルスは変異しやすく、大規模なパンデミックを起こし得るため、迅速高感度な診断を要するターゲットである。このため、簡便で感度が高く、測定時間も短い免疫測定法の開発が望まれている。本研究ではファージ提示法を用いて H1N1 特異的な組換え抗体断片を取得し、それらを用いて H1N1 の迅速高感度な検出法を開発することを目指した。
 【方法と結果】 無毒化された H1N1 ウイルスを免疫し、高い抗体価を示したマウスの脾臓から全 RNA を抽出し、抗体遺伝子を増幅した。そしてこれをファージ提示ベクター pDong1 に組込み、Fab 抗体提示ファージライブラリを作製した。固定化 H1N1 を用いた 3 回のパニングとクローニングにより、H1N1 ウイルスに特異的に結合する 4 株の抗体、B1、B2、B5 及び F1 を取得した。いずれも新規な配列を持ち、B2 と F1 を用いたサンドイッチ ELISA では、H1N1 ウイルスを 0.1 ng/ml の感度で検出することが出来た。今後検出系を改良することで、更なる高感度化、迅速化を達成したい。

Isolation of recombinant antibodies against H1N1 influenza virus and their application to viral detection

○Jinhua Dong¹, Enoch Y. Park², Hiroshi Ueda¹
 (¹Chem. Res. Lab., Tokyo Tech, ²Inst. Green. Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words influenza virus, recombinant antibody, phage display, immunoassay

- 3P-006 リボヌクレアーゼ融合抗体の機能におけるドメイン配置の影響**
 ○中西 猛, 工藤 光代, 西浦 大祐, 大崎 智弘, 北村 昌也
 (阪市大・院工・化生)
 nakanishi@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

バクテリアや植物に由来する毒素と抗体を融合したイムノトキシンは、強力な標的細胞傷害性を示す一方で、毒素に起因する副作用や抗原性が懸念される。我々は、より安全で効果的ながん治療薬の開発を目指して、ヒト由来リボヌクレアーゼ (RNase) を毒素の代替として用いた融合抗体を作製し、その機能評価を行った。具体的には N 末端側から C 末端側へ、RNase、ラマ由来可変領域 (VHH)、ヒト定常領域 (Fc) の順に配置し、二量体型融合抗体を作製した。本研究では、がん細胞に過剰発現する上皮増殖因子受容体 (EGFR) を標的とする VHH を用いた。さらに、プロテアーゼ消化により Fc を除去することで単量体型融合抗体を調製し、二量体型融合抗体と比較した。酵素活性を評価したところ、両者に違いは見られなかった。フローサイトメトリーにより、がん細胞に対する結合を比較した結果、二量体型融合抗体の方が高い結合活性を示した。その一方で単量体型融合抗体は、RNase を融合していない VHH に比べて低い結合活性を示した。一般に抗原結合領域は VHH の N 末端側に位置することから、融合した RNase の立体障害により、EGFR に対する結合活性が低下したと考えた。以上の結果から、各機能ドメインの配置が RNase 融合抗体の設計において重要な因子であることが示唆された。現在、RNase と VHH の配置を入れ換えた融合抗体について検討を進めている。

Effect of domain arrangement on the function of an antibody-ribonuclease fusion protein

○Takeshi Nakanishi, Mitsuyo Kudo, Daisuke Nishiura, Tomohiro Osaki, Masaya Kitamura
 (Dept. Appl. Chem. and Bioeng., Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ.)

Key words antibody, ribonuclease, fusion protein, epidermal growth factor receptor