

1S-Ep04 次世代シーケンサー配列解析による効率的な抗原特異的抗体の同定

○伊東 祐二
(鹿児島大院・理工)
k2174603@kadai.jp

【背景と目的】免疫システムは、B細胞上の極めて多様な抗体配列（ライブラリ）から、抗原刺激によるB細胞のクローン増殖によって抗原特異的な抗体配列が選択され、さらに突然変異による最適化によって高親和的な抗体を生み出している。一方、ファージライブラリを代表とする人工抗体ライブラリからの特異抗体の選択においては、バイオパンニングと呼ばれる *in vitro* 選別法によって、特異的クローンの選別が行われるが、その選別には、クローン化の作業とそれらの結合スクリーニングといった煩雑な作業を要する。近年の次世代シーケンサー（NGS）によるDNA塩基配列のハイスループット解析は、生物のゲノム解析のみならず、抗体のレパートリーの解析にも利用されるようになってきた。本発表では、特にアルパカ由来のVHH抗体並びにヒト単鎖Fv抗体ファージライブラリからのバイオパンニングによる抗原特異的抗体の単離において、NGSを使った網羅的配列解析を利用することで、効率的に多様な抗体の単離、同定を試みた例について報告する。

【方法】抗原免疫したアルパカの血液リンパ球から重鎖抗体由来のVHH抗体ファージライブラリを構築し、バイオパンニングを行った。このバイオパンニング前と後のファージのプールからファージミドDNAを精製し、特異的なプライマーによりVHH遺伝子を増幅後、NGS用のインデックス配列並びにアダプター配列を付加するためのPCRを行った。得られたPCR産物は、次世代シーケンサー Miseq (illumina) 上で、MiSeq Reagent Kits v3 (600 cycles) の試薬を使用して分析した。得られた配列情報から、低クオリティのデータと200base以下の配列が除外され、Merge プログラムによって、5'側と3'側からのリード配列を連結したものを、配列系統解析に用いた。ヒト単鎖Fv抗体ファージライブラリからの抗原特異的な解析においても同様の手法で行い、VH配列のみをNGS解析に供した。

【結果および考察】抗原免疫VHH抗体ファージライブラリでは、わずか1回のバイオパンニングで抗原に特異的なVHH抗体特異的抗体を濃縮された。パンニング前と後の配列をNGSで解析し、それぞれ10万弱のVHH配列を得た。各配列のライブラリ中での存在率(%)を計算し、パンニング後での各配列の存在率の変化(増幅率)を評価したところ、高いものでは数百倍以上の増幅倍率が見られた。これらの増幅倍率の高い(標準的には30倍以上)配列について、H-CDR3配列を基に設計したプライマーを使い、各ライブラリのプールDNAを鋳型に、PCRによりVHH遺伝子を増幅し、得られたVHH遺伝子をファージに組み込んだ。そのようにして再生したファージのついて抗原との結合活性を評価したところ、7-8割において、抗原特異的な結合活性が見られた。以上のように、バイオパンニング前後での抗体配列をNGSで網羅的に解析することにより、高い確率で抗原特異的な抗体の特定が可能であり、多様なCDR配列を有する抗体のセットを取得したい場合には、このような手法が特に有効である。バイオパンニングの濃縮効率が低いナイーブ抗体ファージライブラリからの特異的ファージの単離や細胞パンニングにおける特異的ファージの単離にも、この手法は有効であり、これらの結果についても紹介したい。

Identification of specific antibodies from the phage library using high throughput sequence analysis

○YUJI ITO
(Grad. Sch. Sci. Eng., Kagoshima Univ.)

Key words antibody, phage display, affinity selection, high-throughput screening

1S-Ep05 トランスサイレチンアミロイドーシス治療を目指した新規抗体創出

○鳥飼 正治¹, 細井 亜樹彦¹, 蘇 宇², 城野 博史³, 樋口 浩文¹, 副島 見事¹, 菅原 敬信¹, 郭 建エイ², 植田 光晴², 末永 元輝², 本川 拓誠², 池田 徳典², 千住 覚², 安東 由喜雄², 中島 敏博¹
(¹化血研, ²熊大院・生命科学, ³熊大院・薬)
torikai@kaketsuken.or.jp

家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) はトランスサイレチン (TTR) 遺伝子の変異が原因となり起こる遺伝性疾患である。変異型 TTR がアミロイド線維を形成し、ほぼ全身の諸臓器に沈着して機能不全を起こす。一旦発症すると徐々に病態が進行し、10年あまりで死に至るという非常に重篤な経過を辿る。現在 FAP に対する治療法としては肝移植や低分子の薬剤があるものの、いずれも多くくの課題があり、新たな FAP の新規治療法の開発が望まれている。127個のアミノ酸からなる TTR に関して、これまでに120種以上の変異型が発見されている。正常な TTR は血中で四量体として挙動しているが、変異型は四量体の安定性が損なわれ、単量体のミスフォールディングに続いて凝集体を形成し、その後、難溶性のアミロイド線維となり、全身の臓器に沈着し障害を起こすと推定されている。その毒性発現のメカニズムについては未解明な部分が多い。

そこで我々はAβ研究での試み等を参考に、TTRアミロイド形成過程の二つの分子種に対する特異的な抗体を創出することにより、有効な抗体を創出することを試みた。

A: TTRがアミロイドを形成することで新たに分子表面に露出するエピトープとして我々が同定したTTRのcryptic epitope, TTR 115-124を認識する抗体をTTRノックアウトマウスで作製し、ヒト化した。

B: 生理的条件下でTTR凝集物(アミロイドの前段階)を形成し、細胞毒性を示すと報告されているS1121変異体を用い、ヒト可変領域を提示したnaiveファージ抗体ライブラリからTTR凝集体特異的クローンを取得した。

上記の2つの方法で取得した抗TTRモノクローナル抗体はいずれも期待通り、アミロイド化したTTRに特異的に反応し、正常型TTRには反応性を示さなかった。また、*in vitro*での解析により、TTRのアミロイド化に対する抑制作用と、マクロファージのアミロイド食食に対する促進作用を有することを見出した。さらに、変異型TTRトランスジェニックラットを用いた薬効解析により、TTRアミロイドの組織沈着に対する抑制作用を確認した。本抗体は、正常型TTRには作用せず、異常型TTRによるアミロイド形成のみを抑えるという新たな治療戦略を可能にすると考えられ、安全性に優れた新規治療法を提供するものと期待される。

Generation of novel antibodies aimed for treatment of Transthyretin amyloidosis

○Masaharu Torikai¹, Akihiko Hosoi¹, Yu Su², Hirofumi Jono³, Hirofumi Higuchi¹, Kenji Soejima¹, Keisin Sugawara¹, Jianying Guo², Mitsuharu Ueda², Genki Suenaga², Hiroaki Motokawa², Tokunori Ikeda², Satoru Senju², Yukio Ando², Toshihiro Nakashima¹
(¹KAKETSUKEN, ²Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto Univ., ³Grad. Sch. Pharm. Sci., Kumamoto Univ.)

Key words antibody, transthyretin, amyloidosis