

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：糖鎖構造特異的単鎖抗体ライブラリーの構築
2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者：山口 陽子(東海大学工学部 教授)

主たる共同研究者：

高柳 淳(慶応義塾大学医学部 講師)

川上 宏子((財)野口研究所研究部 研究員)

3. 研究内容及び成果：

本研究は平成 15 年 10 月から開始された。当初、東海大学と野口研の持つ糖鎖精製・合成・解析技術を発展させ、慶應義塾大学で開発された“安定でレパートリー数の多いファージ提示型ヒト単鎖抗体ライブラリーの簡易システム”を活用することで、各種糖鎖抗原に対するヒト型単鎖抗体提示ファージを単離し、単鎖抗体を発現・精製後、糖鎖結合性の解析を目指した。人工糖脂質に対するファージ提示型単鎖抗体のスクリーニングは、基本的には、抗原の固相化、ファージライブラリーとの反応、洗浄、大腸菌への感染、ヘルパーファージの重感染による抗体ファージの調製、というパンニングを繰り返すことにより濃縮・回収されたファージを、ELISA で発色し目的のクローンをスクリーニングするというものである。単離されたファージは、単鎖抗体インサートを PCR 増幅し、その DNA 配列によりグループ分けを行い、各々のグループの代表的抗体について、大腸菌での可溶性単鎖抗体の産生・部分精製の後、その特異性・親和性の確認をした。この初期解析の結果から選択された単鎖抗体について、大量発現・精製した上で、特異性・親和性の解析を行った。その結果、診断薬・治療薬の開発の可能性が期待できる抗体を各種得ることができた。

東海大学グループでは、「糖鎖特異的単鎖抗体の発現・特異性・親和性解析の研究」を研究項目とし、慶應大学で開発されていた第3世代ファージライブラリーから、東海大ですでに合成されていた DPPE 化人工糖脂質と、野口研から提供されたスペーサー付人工糖脂質を、糖鎖抗原として、抗体ファージをパンニング・スクリーニングした。その結果、mannotriose(Man3)-, Le<sup>x</sup>-, T-antigen に対する単鎖抗体の作製に成功したが、当初に目的とした、“糖鎖特異的単鎖抗体ライブラリーを構築すること”は、方法論の確立に時間がかかったこと、ファージ提示単鎖抗体が安定性を欠くこと、単鎖抗体タンパク質の効率的発現が著しく困難なこと、などの理由により、残念ながら一部達成に止まった。しかしながら、Man3 に対する抗体はその性質上、これまでに得られていないもので、現在そのがん特異的組織染色性の検討や、Man3 との結合性を NMR で解析する新たな共同研究が進行中である。

一方、前半の研究終了時に、Tn-antigen スペーサー付人工糖脂質によるスクリーニングでファージクローンが得られなかったことから、単糖そのものに対する抗体は取得できないとの結論を出した。これは、抗体の抗原結合ドメインの大きさから考えて予想されることでもあった。一方、抗 Tn 抗原特異的モノクローナル抗体(MLS128)が大腸がん細胞の増殖阻害を誘起すること、その機構として IGF-I 受容体のダウンレギュレーションが関与している、という新知見を得たため(投稿中)、Tn-antigen が 3 連続したものを(Tn3)をエピトープとする MLS128 と同様な特異性をもつヒト型抗体作製に着手した。ここでは、人工糖脂質は使わずに、peptide(バックボーン)と Tn3-peptide を野口研で設計・合成し、糖鎖抗原として使用した。その結果、改良された第 5 世代ファージライブラリーからヒト型単鎖抗体を得ることが出来た。これは、分子標的治療薬に繋がる抗体と期待できる。

慶應大学グループでは、「ファージ提示型ヒト単鎖抗体ライブラリーの作製と改良・ガングリオシドに対する単鎖抗体の単離の研究」を研究項目とし、ファージライブラリーの改良に努め、第5世代まで作製した。さらに、大腸菌発現株の改良を順次行った。これらは東海大学グループにプロトコールとともに提供された。並行して、市販のガングリオシドを糖鎖抗原として抗体ファージのパンニング・スクリーニングを実施した。糖脂質の固相化法の改良、合成高分子系ブロッキング剤の採用、ラクトシルセラミド、ガラクトシルセラミド、スフィンゴミエリン混合物を用いたサブトラクション法の導入を行い、ガングリオシド GM2、GD1a、GM4 に結合する抗体の単離に成功した。さらに、野口研より供与されたガングリオシド GM3 の糖鎖部分に親水性リンカーおよびビオチンを付加した合成糖鎖に結合する抗体も単離された。

野口研グループでは、「抗体ライブラリー取得の為の糖鎖プローブの合成および改良の研究」を研究項目とし、最初に、ファージ抗体との非特異的な相互作用が起こりにくい構造の糖脂質型プローブの構造設計と合成を実施した。次に、アビジン固定化プレートを使用した方法、水溶液中でファージ抗体と結合した後アビジンビーズにより抗体との複合体を回収する為のツールとして、ビオチンに結合した糖鎖プローブの設計と合成を行った。糖鎖部分とビオチンや脂質などをつなぐリンカー部分には、これまでヘキサエチレングリコールを使用していたが、東海大学のパンニングの結果などから、リンカー部分が揺動しすぎるため抗体認識の妨げになっている可能性が示唆された。そこで、リンカー部分の自由度を制限する為にエチレングリコール鎖を短くし、リンカーと糖との結合部をエーテル結合からアミド結合にした構造のものを合成した。また、Tn3 糖鎖抗原の調製に当たり、ペプチド鎖自体に強い抗原性が現れないように設計し、特定の電荷を持たないアミノ酸から成る6残基のペプチド鎖 (Gly-Thr-Thr-Thr-β Ala-Gly) を選択した。そのうちのThr残基にはそれぞれα-GalNAcが結合した糖アミノ酸を使用し、3連続したα-GalNAcを持つ構造の糖ペプチドの合成を行った。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

ファージディスプレイ法自体は一般的な方法であるので、糖鎖抗原についての問題点を解決し、新しい方法論を確立することを目指す研究である。人工糖脂質を抗原として、糖鎖特異的単鎖抗体をファージライブラリーから作成するという課題は、一応達成されていることは評価できる。しかし、途中さまざまな問題点が明らかとなり、糖鎖抗体作成において、動物に免疫する従来法との顕著な優位性をもつ一般的手法を確立するに至っていない。

この方法で作製した高い親和性を持った Mannotriose (Man3) 抗原に対する抗体は、一定の評価ができるが、他の抗体は既知のものであり新鮮味がない。

発表論文数は多くないが、特許出願は積極的にされており、この姿勢は評価できる。是非産業化に結びつく知財を確保して欲しい。

原著論文 8 件    招待講演 2 件    口頭発表 9 件  
特許出願 国内 8 件    海外 1 件

##### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

ファージライブラリーのサイズに関しては、おそらく世界でも冠たるものが作製されたと思われ、この点は評価できる。残るはこれを利用して、いかなる糖鎖構造に対して抗体を作製すれば、今後の研究に役立てるかを考えることである。

また、作製した Man3 抗原に対する抗体をどのように応用するかを議論する必要がある。

#### 4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

チームを構成する各グループはそれぞれ異なる領域の専門家であり、比較的良く連携して研究を進めた。しかし、本法の特徴を出すには、よりインパクトのあるターゲットを選ぶ必要があった。そのために、レベルの高い生物学の専門家が加わるべきであった。

確立したライブラリーを利用して、今後役に立つ抗体開発を続けることが期待される。

以上