

「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」

平成15年度採択研究代表者

山口 陽子

(東海大学工学部 教授)

「糖鎖構造特異的単鎖抗体ライブラリーの構築」

1. 研究実施の概要

本研究の目的は、個体を免疫してポリまたはモノクローナル抗体を作らせる従来の方法とは本質的に異なる手法である“抗体産生の機構を生体外で達成できるファージディスプレイ法”を活用し、個体が認識できない“糖鎖抗原”をも含めて、各種糖鎖に特異的かつ高親和性で結合する単鎖抗体を網羅的にスクリーニングし、糖鎖特異的単鎖抗体ライブラリーを構築することである。

本研究は平成15年10月から開始された。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、本研究の目的を達成する。戦略会議を月1回の割合で開催し、グループ間での密接な相互交流を図っている。

平成16年度終了時をphase 1とし、1年半の研究成果に基づいて17年度からはphase 2としての目標を掲げ、同時進行させている。Phase 1では、本研究開始時に提案し予備実験で糖鎖結合性抗体ファージが同定された従来法を使い、各種糖鎖に対する抗体ファージを単離し、その糖鎖特異性と遺伝子配列を解析した。同時進行で、各ステップでの技術改良に努力した。Phase 2では、phase 1で取れた抗体ファージの糖鎖特異性・親和性を解析するとともに、単鎖抗体として発現させて、その解析を進める一方、改良法による新たな糖鎖結合性抗体ファージのスクリーニングを開始する。また、phase 3に向けて、目標とする糖鎖抗原をしぼり、合成を開始する予定である。

2. 研究実施内容

東海大学グループでは、糖鎖工学研究施設で調製・解析された人工糖脂質を用いた単鎖抗体の網羅的スクリーニングを開始した。人工糖脂質を抗原とする際、従来のタンパク質抗原と同様なパニング・ELISAによるスクリーニング方法をそのまま適用できない為、至適条件の検討を行いながら実施し、特異的かつ親和性の高いクローンの単離を目指し、得られたクローンの解析を進めている。平成15年度にパニング・ELISAによるpositiveの判定・同定が進行中であった ① mannotriose (M3) ② Le^x (LNFP III) ③ 5 neoglycolipid mixture (LNnT, LNFP I, LNFP II, LNFP III, LNDFH I)に加え、平成16年

度に以下の糖鎖抗原に対する抗体ファージのパニングを順次開始した。④ neoglycolipid mixtureでパニングをした③の4thパニングからLNnT, LNFP I, LNFP II, LNDFH Iによる各種糖鎖特異的抗体ファージのスクリーニング ⑤ 野口研で3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミドを基本骨格とした合成糖鎖プローブ、Tn抗原とT抗原(PEGスパーサー付なので①-④との違いが予想される)が調製され東海大学でのパニング・ELISAに使用された。これまでにELISAで再現性が確認された抗体ファージクローン数(分子)とスクリーニングしたクローン数(分母)を表1にまとめた。なお、Tn抗原とT抗原に関しては、比較の意味で1st ELISAの結果も載せた。得られた抗体ファージは、順次DNA配列決定、単鎖抗体の発現、特異性・親和性の解析を進めている。

表1 平成16年度までに、従来法により単離された単鎖抗体提示ファージ(抗体ファージ)分子はpositiveクローン数、分母はスクリーニングしたクローン数を表記

	After 1 st ELISA (S/N ratio)	After 1 st & 2 nd ELISA (S/N ratio)	scFv insert detected by PCR
Mannotriose (M3)		26/864 (>2)	25/26
Le ^x (LNFP III)		100/864 (>4)	5*/100
5 Neoglycolipid mixture (LNnT, LNFP I, LNFP II, LNFP III, LNDFH I)		11/288 (>2)	5*/11
LNnT		3/192 (>2)	
LNFP I		0/96	
LNFP II		2/96 (~2)	2/2
LNDFH I		5/96 (>2)	5/5
T-antigen	85/96 (>2)	25/96 (>4)	22/23
Tn-antigen	3/192 (>2)		

*Of these, two clones are the same.

Abbreviation used: LNnT, LNFP I, LNFP II, LNFP III, and LNDFH I are lacto-*N*-neotetraose, lacto-*N*-fucopentaose I, lacto-*N*-fucopentaose II, lacto-*N*-fucopentaose III, and lacto-*N*-difucohexaose I, respectively.

東海大学中田班では、単離された単鎖抗体の特異性・親和性の解析法の確立を目的とし、まず既存の抗体やレクチンで条件を検討し、ドットブロット法(TLC-overlay法)と表面プラズモン共鳴法(ビアコア)により、得られた抗体ファージの糖鎖結合特異性を簡易に解析する方法を確立した。清水班は、網羅的スクリーニングに使用する為に、広範な人工糖脂質ライブラリーの構築を行っている。糖鎖構造が明らかな数十種類のオリゴ糖鎖から人工糖脂質を合成し、高純度に精製した糖鎖抗原を提供している。さらに、糖鎖抗原用

ELISAの条件を検討し、糖鎖特異性解析用multi-target assayを確立した。

慶應大学グループは、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を行い東海大学グループへ供与している。また、抗体ライブラリーの性能の向上のため、共発現ベクターを作製した。これにより、産生ファージ量の増加および可溶性抗体の増加が認められた。これらの性質は、スクリーニング効率を上げる働きがあると考えられる。

平成15年度に抗ガングリオシド抗体のスクリーニングを開始し、牛脳由来ガングリオシド混合物を抗原とし、通常のタンパク性抗原と同様にスクリーニングを行ったが、ガングリオシドに結合するクローンをほとんど得ることができなかった。そこで、ブロッキング剤、洗浄液、大腸菌株および培養法を検討しスクリーニング法の至適化を行った結果、ガングリオシド混合物に結合する抗体ファージクローンを多数単離した。平成16年度は至適化したスクリーニング法を用いて抗ガングリオシド抗体ファージのスクリーニングを開始した。個別の精製ガングリオシドを用いて、より特異性の高いクローンの単離を試みた。その結果、一種類のガングリオシドにのみ結合する抗体ファージは得られなかったが、数種のガングリオシドに結合する抗体ファージが得られた。現在、さらなる解析を進めている。

野口研究所グループは、糖鎖構造特異的単鎖抗体のパンニングの為に、*N*-ヘキサエチレングリコール-3,5-ビス（ドデシロキシ）ベンズアミド(E6BDB)を基本骨格とし、糖鎖としてT及びTn抗原を結合した糖鎖プローブの合成を行い、パンニング及びELISA用に提供した。この他に、ラクトース及び各種の単糖をE6BDBに結合した糖鎖プローブの合成も並行して行っている。

また、プラスチックディッシュ表面に固定する糖鎖プローブとは異なったモードのパンニングを可能にする目的で、糖鎖とビオチンの間をヘキサエチレングリコールで結んだ水溶性糖鎖プローブの設計、合成、評価を行った。合成手順によっては、水溶性糖鎖プローブは、E6BDB型のプローブと共通の合成中間体を用いることも可能である。糖鎖としてGlcNAcを結合した水溶性糖鎖プローブは、十分な水溶性を有し、アビジンを用いて糖鎖を認識する蛋白質等を結合したまま回収可能であることを確認した。

3. 研究実施体制

東海大学グループ

- ① 研究分担グループ長：山口 陽子（東海大学工学部、教授）
- ② 研究項目：各種人工糖脂質を用いた抗体ファージの網羅的スクリーニング
単鎖抗体の発現・特異性・親和性の解析方法の改良と確立

慶應義塾大学グループ

- ① 研究分担グループ長：高柳 淳（慶應義塾大学医学部、助手）
- ② 研究項目：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
人工糖脂質(ガングリオシド)を用いた単鎖抗体の網羅的スクリーニング

野口研究所グループ

- ① 研究分担グループ長：川上 宏子（野口研究所（財）、研究員）
- ② 研究項目：ファージ抗体パンニングの為の人工糖脂質の調製と改良

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- Suzuki M, **Takayanagi A**, Shimizu N. Targeted gene delivery using humanized single-chain antibody with negatively charged oligopeptide tail. *Cancer Sci.* 95:424-429(2005).
- Tang W, Kokudo N, Sugawara Y, Guo Q, Imamura H, Sano K, Karako H, Qu X, **Nakata M**, and Makuuchi M: Des- γ -carboxyprothrombin expression in cancer and/or non-cancer tissues: Association with survival of patients with resectable hepatocellular carcinoma. *Oncol Report* **13**, 25-30, 2005.
- Tang W, Guo Q, Usuda M, Kokudo N, Seyama Y, Minagawa M, Sugawara Y, **Nakata M**, Kojima N, and Makuuchi M: Histochemical Expression of Sialoglycoconjugates in Carcinoma of the Papilla of Vater. *Hepato-Gastroenterology* 52: 67-71, 2005.
- Matsushita M, Matsushita A, Endo Y, **Nakata M**, Kojima N, Mizuochi T, and Fujita T: Origin of the classical complement pathway: Lamprey orthologue of mammalian Clq acts as a lectin. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 10127-10131, 2004.

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：3件（CREST研究期間累積件数：3件）