

教育セミナー：プロテオミクス熊の巻 2015 総合論文

プロテオミクスにおけるファージディスプレイ技術の役割

村岡 賢^{*1,2}, 田原栄俊¹

*E-mail: satoshi.muraoka@jfc.or.jp

¹ 広島大学大学院医歯薬保健学研究院細胞分子生物学研究室：734-8553 広島市南区霞 1-2-3

² 公益財団法人がん研究会ゲノムセンターがんオーダーメイド医療開発プロジェクト プロテオミクス解析グループ：
135-8550 東京都江東区有明 3-8-31 がん研究所 311-313

(受付 2016 年 5 月 13 日, 改訂 2016 年 6 月 24 日, 受理 2016 年 6 月 28 日)

ファージディスプレイ技術は、1915 年に Twort FW が、細菌に感染するウイルスとしてバクテリオファージを発見したのが始まりで、その後、1985 年に Smith GP が、繊維状ファージの表層にランダムペプチドの提示が可能であることを Science 誌に報告した。また、1990 年から 1991 年にかけて、McCafferty J や Winter G により抗体ドメインのファージ表層への提示に成功した。それ以降、これらの技術を用い、異なる種類の抗体を提示するヒト抗体ファージライブラリが構築され、抗体を迅速に単離する手法として発展し、抗体医薬に大きな成果をもたらしている。その一方で、抗体・ペプチドファージライブラリを用いた癌抗原の探索、自己免疫疾患に関わる自己抗体の同定にも多く利用されている。現在では、ファージディスプレイ技術は、抗体、ペプチドだけでなく、新たな機能性分子の創出に向けて、まだ尚多くの研究者に重宝されている技術である。本論文では、それらの技術について概説するとともに、ファージディスプレイ技術の今後の展望も踏まえて紹介する。

1 序論

1985 年に Smith GP らにより、バクテリオファージの表層タンパク質の N 末端に人工ペプチド配列を提示できるファージディスプレイ技術が発表されてから約 30 年が経過した¹⁾。この間にも、リボソームディスプレイ、酵母ディスプレイ、mRNA ディスプレイなどの幾つかのディスプレイ技術が開発されてきたが、取り扱いの簡便さ、提示させる分子の多様性、システムの安定性がファージディスプレイ技術では特に優れており、ペプチド、タンパク質のライブラリを構築するのにとても適した技術であり、多くの研究者らにより利用されている^{2)~4)}。また、1990 年に Winter G らは、抗体が抗原を認識するのに必要な H 鎖の V 領域 (VH) と L 鎖の V 領域 (VL) ドメインをリンカーでつないだ最小のドメイン抗体を繊維状ファージの表層に提示することに成功した⁵⁾。これが、抗体ファージライブラリの幕開けとなり、抗体医薬の時代を切り開くに至った。一方で、近年では、その技術を応用し、ペプチド、抗体に限らずに、非抗体タンパク質のフレームをランダム配列に変化させた、マイクロプロテインの A ドメインを基に構築したアビマー、フィブロネクチン由来のモノボディなどのタンパク質の提示が数多く報告されている^{6),7)}。このような技術を用いることで、モノクローナル抗体、様々な結

合分子の獲得に限らず、変異体タンパク質の機能解析も可能となっている。

2 バクテリオファージ

Twort FW は、1915 年に細菌に感染するウイルスとしてバクテリオファージを発見した⁸⁾。構造としては、タンパク質の外殻と遺伝情報を担う核酸から構成されている。バクテリオファージは、細菌に感染すると細胞膜を破壊する溶菌という現象を引き起こすことから溶菌剤としての使用が試みられ、ファージセラピーとして利用されてきた^{9)~11)}。東ヨーロッパでは、本格的に実用化されており、西ヨーロッパや米国などでも臨床実験が行われている。また、近年では、薬剤耐性菌テロが想定されており、それに対する治療薬としての開発研究も進められている。一方で、多くの研究者に利用されているバクテリオファージは、大腸菌に感染性のあるファージで、T4 ファージや T7 ファージ、λ ファージ、繊維状 M13 ファージなどがある (Fig. 1)。それらのバクテリオファージは、その生活環の違いから溶菌性ファージ、溶原性ファージ、繊維状ファージに分類されている^{12),13)} (Fig. 2)。溶菌性ファージには、T4 ファージや T7 ファージなどが知られており、感染後期に宿主を溶菌しながら増殖する特徴がある^{14),15)} (Fig. 2A)。一方、溶原性ファージには、λ ファージが知られており、ファー

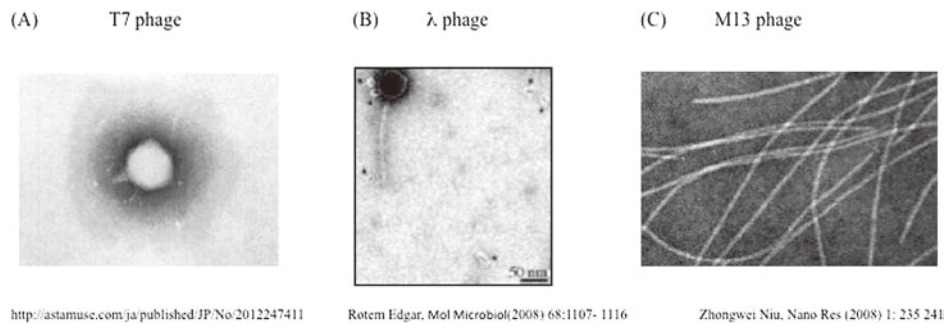


Fig. 1 Imaging of T7 phage (A), M13 phage (B), and λphage (C) by transmission electron microscope

Reprinted with permission from Ref. 46 © (2008) Tsinghua Press and Springer-Verlag GmbH and Ref. 47 © (2008) Blackwell Publishing Ltd.

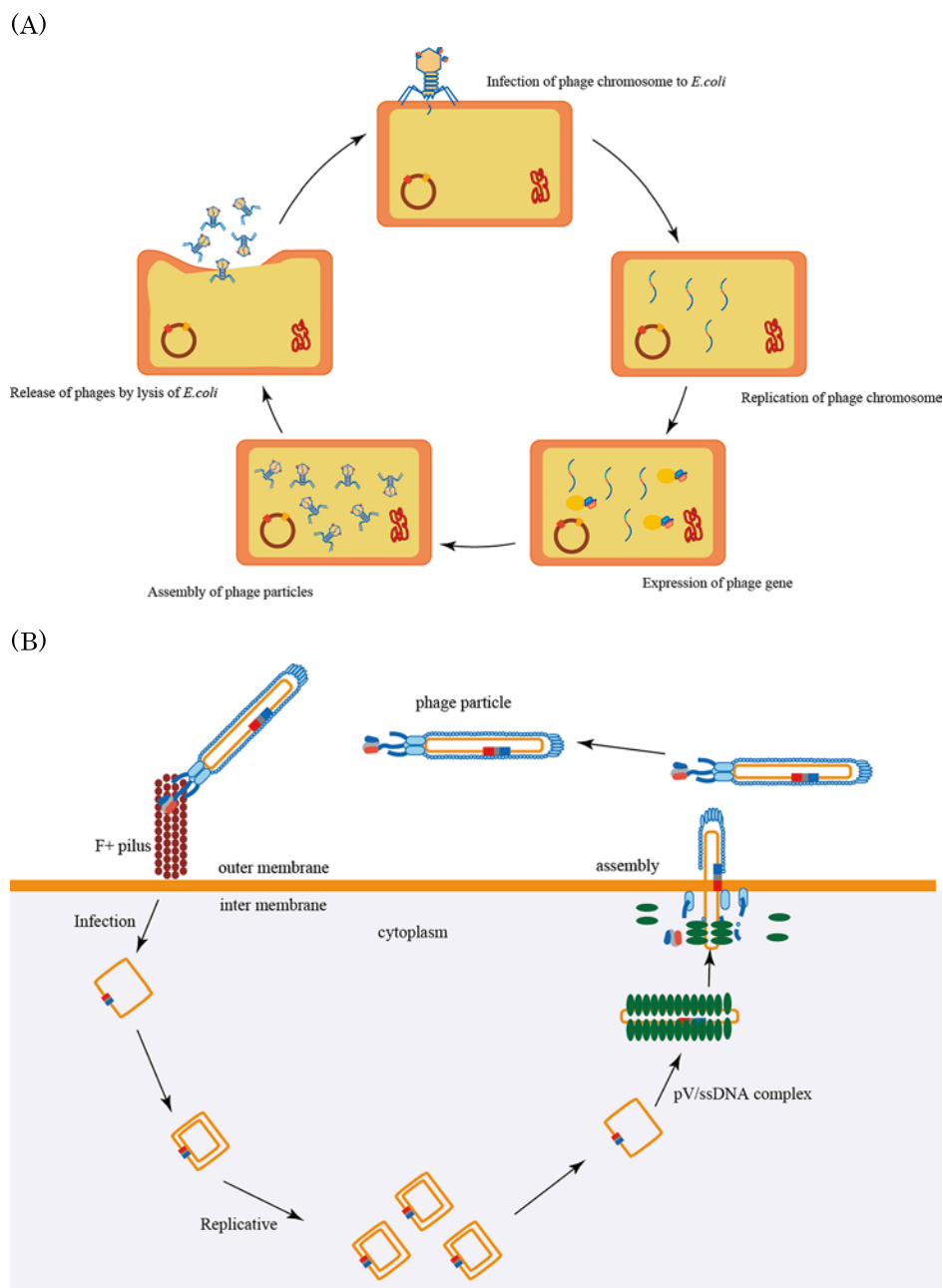


Fig. 2 Life cycle of T7 phage(A) and M13 phage (B)

Modified and reused with permission from Ref. 17 © (1999) Elsevier Science Ltd.

ジゲノムが大腸菌の染色体に組込まれて、菌の染色体の一部として増殖する。誘導因子の添加などによりファージ粒子が形成されると同時に染色体からファージゲノムを離脱させ、ファージ粒子に取り込まれ、最後に宿主を溶菌して増殖する¹⁶⁾。また、抗体を提示させるのに多く利用されているファージは、繊維状 M13 ファージであり、上記で示したライフサイクルとは違った方法で増殖する。繊維状 M13 ファージは、大腸菌の F 鞭毛に結合することで感染が始まり、1 本鎖のファージミドが大腸菌内に注入される。その後、ヘルパーファージを重感染させることにより、ファージ粒子が形成される。ファージ粒子の形成は、大腸菌の外膜及び内膜で行われ、アセンブリと同時に大腸菌の外側へとファージは放出されていく¹⁷⁾ (Fig. 2B)。以上のように、それぞれのファージは、異なった生活環で無限に増殖を繰り返しており、提示させるペプチド、タンパク質の特性にあったファージを用いて研究が行われている。

3 ファージディスプレイ技術

ファージディスプレイ技術は、Smith GP らが繊維状ファージの表層にペプチドの提示が可能であることを 1985 年に Science 誌に報告したのが始まりである¹⁾。その後、1991 年に Winter G らにより繊維状ファージ表層にドメイン抗体を提示させることに成功した⁵⁾。ファージディスプレイ技術は、ファージゲノムに外来の遺伝子を組み込むことで、外来タンパク質・ペプチドをファージの外殻タンパク質と融合した形でファージ粒子の表層に提示することが可能となる。Fig. 3A に示すように、溶菌性のファージである T7 ファージは、直鎖状 2 本鎖 DNA のファージゲノムを持ち、頭部は、g10p キャプシドタンパク質が 415 個アセンブリすることで形成されている。この g10p の 3' 末端に外来の遺伝子を組み込むことで、外来のペプチド、タ

ンパク質を g10p の融合タンパク質として提示することが可能となる。一方、Fig. 3B のような繊維状 M13 ファージは、環状 1 本鎖 DNA を持ち、11 種のタンパク質から構成されている。その中の g3p の N 末端に外来ペプチド、タンパク質を、若しくは g8p の N 末端に数アミノ酸のペプチドを提示することが可能となっている。現在までに、それぞれのファージを利用して、数アミノ酸から数十アミノ酸のリニア及び環状ペプチド、抗体、様々なタンパク質の提示が可能であることが報告されており、それぞれにおいてライブラリの構築が行われ、多様な抗原に対する結合分子の獲得に大きく貢献している^{18)~20)}。

4 ファージライブラリからの結合分子のスクリーニング方法

構築された様々なファージライブラリから、特異的に認識する結合分子の単離は、抗原の特性に応じた手法を用いて行われている。その代表的な手法を Fig. 4 に示している。Fig. 4A は、一般的な手法で、プレートやビーズに固定した抗原に対してファージライブラリを反応させ、特異的なファージの単離を行う。Fig. 4B では、抗原過剰発現細胞株を樹立して、ソーティング技術により、細胞をソーティングすると同時に抗原に結合するファージクローンを単離する方法である。Fig. 4C では、組織サンプルにファージライブラリを反応させて、重要な組織部を laser microdissection の技術によりファージクローンと同時に回収を行い、特異的なファージを単離する方法である。Fig. 4D では、腫瘍などを移植したマウスにファージライブラリを投与し、腫瘍の回収と同時に腫瘍特異的なファージクローンを単離する。他にも様々な手法が、多くの研究者により開発されている²⁾。

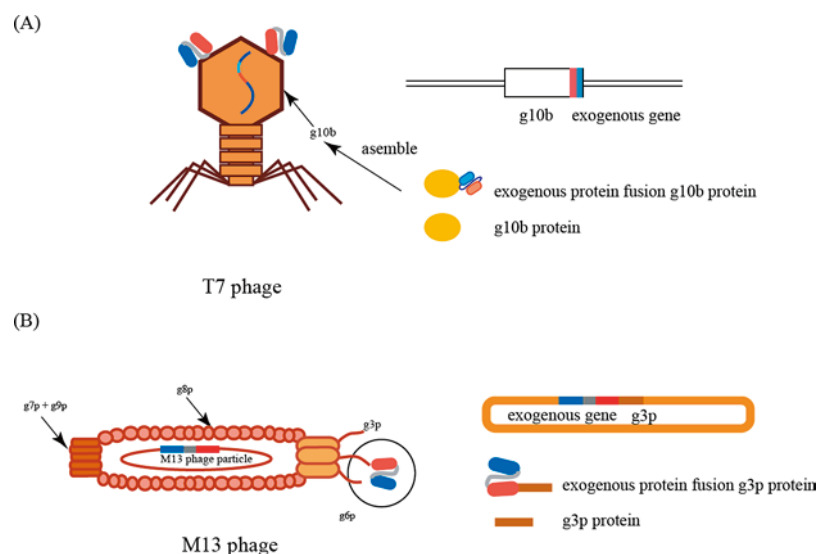


Fig. 3 Construction of T7 phage (A) and M13 phage display (B)

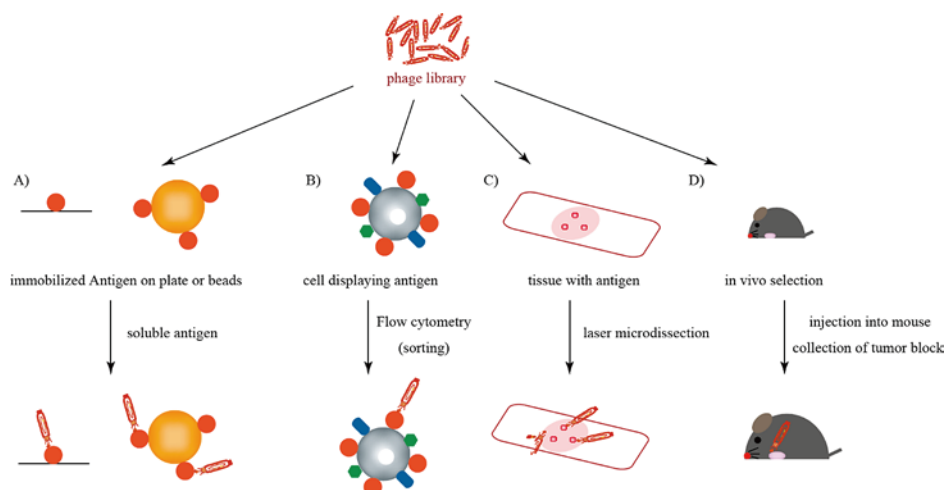


Fig. 4 Many different selection and screening methods

A) Immobilized soluble antigen; plate, tube, and beads. B) Cell displaying antigen; Sorting by flow cytometry. C) Tissue with antigen; laser microdissection. D) In vivo selection; animal.

5 ファージディスプレイ技術の応用

ファージディスプレイ技術は、様々なところで応用がなされている。モノクローナル抗体、様々な抗原認識分子の獲得から、自己抗原、自己抗体の探索、タンパク質の変異体の機能解析、ファージワクチン、ファージを電池として利用するなど、幅広く応用されている^{18),19),21)~25)}。中でも多くの報告がある自己抗原、自己抗体の探索について一部を次の項で紹介する。

5-1 自己抗体、自己抗原の探索技術

2011年に Larman BH らにより T7 ファージの表層タンパク質にヒトの ORF (24,239 proteins) の合成ペプチド (413,611 peptides) を提示させたペプチドライブラリ (synthetic human peptidome) を構築し、傍腫瘍性神経症候群の自己抗体に反応する抗原の探索を行っている。方法として、非特異的なファージの除去を行い、目的のヒト脳脊髄液や血清と反応させ、自己抗体に特異的に結合する T7 ファージを単離する。その後、単離した特異的に結合する T7 ファージのファージゲノムから cDNA 解析を行うことにより抗体に反応する抗原の情報を取得する (Fig. 5)²²⁾。この結果、現在までに報告されていた NOVA, TGIF2LX, 報告がなかった GAD65 などが同定された。このように、cDNA peptide T7 phage を用いた大規模な探索方法は、低コスト、短期間で、有用なマーカーを効率良く単離することが可能となっている。また、Wang X らにより 2005 年に、前立腺癌患者由来の cDNA を T7 ファージに提示させた cDNA T7 ファージライブラリによる癌抗原の探索が報告された。方法としては、患者血清由来の抗体 (癌抗原を認識する抗体が含まれている) を結合させた

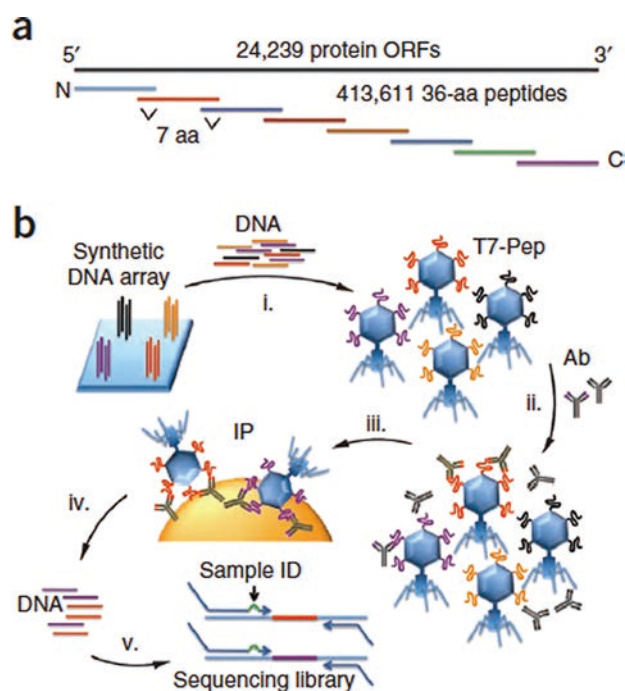


Fig. 5 Construction and characterization of T7-Pep and the PhIP-Seq methodology

Reprinted with permission from Ref. 22 © (2011) Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature.

Protein G ビーズに構築した cDNA T7 ファージ (健康者血清由来の抗体を用いて吸収操作済み) を反応させ、特異的に結合する cDNA T7 ファージクローンを単離した。その結果、BRD2, eIF4C1, RPL13a, RPL22 の 4 種類の癌抗原の同定に至った (Fig. 6)。また筆者らは、ガラススライドにこれら 4 種類のタンパク質を提示した T7 ファージの固相化を行い、128 検体の血清を反応させて評価を行っており、その結果、転移性のバイオマーカーとしての有用性が示された²¹⁾。このように、cDNA ライブラリ、合成ペプ

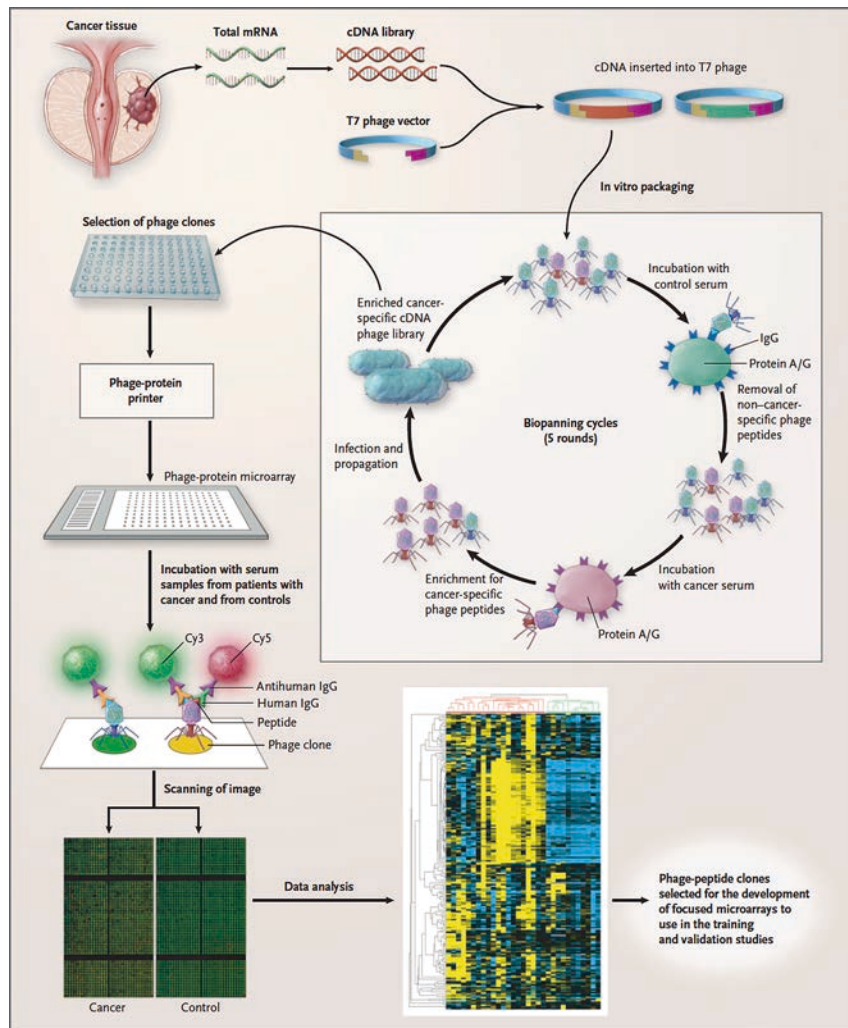


Fig. 6 Schematic representation of the development of phage-protein microarrays to characterize autoantibody signatures in prostate cancer

Reprinted with permission from Ref. 21 © (2005) Massachusetts Medical Society.

チドライブラリを用いることで、有用な自己抗体・癌抗原の探索が効率良く行えることが報告されている。

6 抗体医薬

抗体医薬の市場は、リツキシマブが2005年に初めて医薬品の売り上げの上位にランクされて以降、2005年の3,867百万ドルから2013年の52,298百万ドルへと約13.5倍も合計売上高が増加し、まだなお成長しており、今後も売り上げの上位を占めることが予測されている。その始まりは、1975年にKohler GとMilstein Cらによって確立されたモノクローナル抗体作製技術（ハイブリドーマ法）にある（Fig. 7）²⁶。その技術は、細胞融合法を利用したものであり、マウスに抗原を投与し、脾臓から抗体を産生するB細胞を分離した後に、不死化させるためにエミローマと細胞融合を行うことで、モノクローナル抗体を作製するものであった。しかし、この技術により作製したモノクローナル抗体は、完全マウス由来の抗体であったため、ヒ

トに投与すると重篤な副作用が起り得る可能性が示唆され、大きな壁にぶち当たった。しかし、遺伝子工学の技術が発達すると、キメラ抗体、ヒト型化抗体（CDR領域がマウス）が作製され、副作用の軽減に期待がもたれ、現在の臨床応用されている抗体は、キメラやヒト型化抗体である。一方で、近年では、完全にヒト由来の抗体を作製する技術が開発された。その技術の一つが1991年に開発されたヒト抗体ファージディスプレイ技術を用いた方法であり、ヒトの体に存在する抗体をin vitroで再現させたヒト抗体ファージライブラリから、様々な抗原に特異的に結合する抗体を単離することにより、完全ヒトモノクローナル抗体を得るというものである。これらのファージディスプレイ技術により開発された世界で最初の抗体は、ヒト型抗ヒトTNF α モノクローナル抗体であるアダムリムマブ（ヒュミラ）であり、日本では2008年3月に関節リウマチ患者において承認された生物学的製剤である。アダムリムマブは、マウス抗ヒトTNF- α 抗体を元にファージディスプレイ技

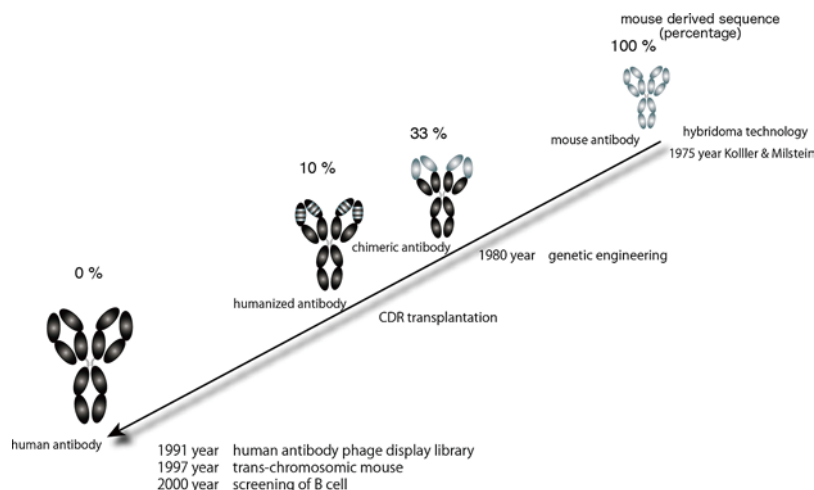


Fig. 7 The history of antibody research

In 1975, Kohler and Milstein first generated mouse monoclonal antibody in mice using a hybridoma technique. In 1980, chimeric and humanized antibody was raised using genetic engineering to reduce the immunogenicity of mouse antibodies. And fully human antibody generated using Human antibody phage display library, trans-chromosomal mouse, and screening of B cell since 1990.

術による Guiding the selection と呼ばれる手法によりヒト抗 TNF α 抗体の作製が行われた。Guiding the selection とは、マウス抗ヒト TNF α 抗体 (MAb32) の H 鎖とヒト末梢血由来の L 鎖を提示した抗体ファージライブラリを用いて、TNF α に結合するヒト抗体 (L 鎖) を選択し、その後、単離したヒト L 鎖抗体とヒト末梢血由来の H 鎖提示抗体ファージライブラリを用いて TNF α に結合する抗体 (H 鎖) を単離するものである。結果として、H 鎖、L 鎖両方ともヒト由来の抗体が構築され、完全ヒト型のモノクローナル抗体の取得に成功し、現在までに臨床において利用されている²⁷⁾。また、その他の技術として、1997年には、ヒトの抗体遺伝子をマウスに移植したトランスクロモマウスが報告され、2000年代にはヒトの末梢血に存在する抗体を産生する B 細胞を直接スクリーニングする技術が開発されてきた^{28),29)}。その中でも、現在、ファージディスプレイ技術により単離された 42 種類もの完全ヒト抗体の臨床試験が行われており、副作用が少なく効果の高い医薬品として期待が持たれている。次の項では、筆者らが行ったヒト抗体ファージライブラリを用いた成人 T 細胞白血病特異的癌抗原 (バイオマーカー) の探索とそれに対する抗体医薬品の開発、また、現在行っている抗体ファージライブラリを用いたエクソソーム早期診断マーカーの開発についても紹介する。

7 成人 T 細胞白血病細胞を標的とする抗体医薬品の開発

成人 T 細胞白血病 (ATL: Adult T-cell leukemia) は、HTLV-1 (Human T cell Leukemia virus type I) が原因で発症する悪性リンパ腫である^{30),31)}。HTLV-1 キャリアな患者は、世界に 1~2 千万人いて、そのうちの 5% の感染者が数十年の潜伏期間を経て ATL を発症する (Fig. 8)³²⁾。一

旦 ATL を発症すると死亡率が高いことからキャリアな患者さんに存在する HTLV-1 感染細胞株のみを排除する有効な治療薬の開発、ATL への転換を予測、診断するバイオマーカーの開発が求められている。現在では、2012 年に承認された CCR4 に対する抗体 (モガムリズマブ) が有効な治療効果を示している^{33),34)}。しかし、当時、開発段階であったことから、筆者らは、上記に紹介した抗体ファージディスプレイ技術を用いて、HTLV-1 感染細胞に特異的に発現する表面抗原の探索・その抗原に対するモノクローナル抗体の単離を行った³⁵⁾。Fig. 9 に示す方法により、 10^{10} の多様性を有するヒト抗体 scFv (single-chain Fv) ファージライブラリを用いて、HTLV-1 感染細胞に特異的に結合する抗体ファージの濃縮を行った。その結果、HTLV-1 感染細胞に特異的に結合する抗体の単離に成功した (Fig. 10)。次に、単離した HTLV-1 感染細胞膜特異的抗体の抗原の同定解析を質量分析によって検討した結果、免疫応答に重要であるという主要組織適合遺伝子複合体タンパク質であった。さらに、とても興味深いことに、単離したドメイン抗体は、HTLV-1 感染細胞に特異的に強く細胞死を誘導する機能を有することがわかった (Fig. 11)。現在は、HLA-DR β 鎖のバイオマーカーとしての有用性及び完全ヒト抗体の作製、さらなる機能解析を行っているところである。

8 細胞外小胞に着目したスキルス胃がんのバイオマーカー探索

現在、筆者らは、抗体ファージディスプレイ技術を用いて細胞外小胞を認識する抗体・抗原の探索を行っている。細胞外小胞は、様々な細胞により分泌される膜小胞であり、分泌経路や、サイズの違いにより、エクソソーム (50-200 nm)、マイクロベシクル (100-1000 nm)、アポトー

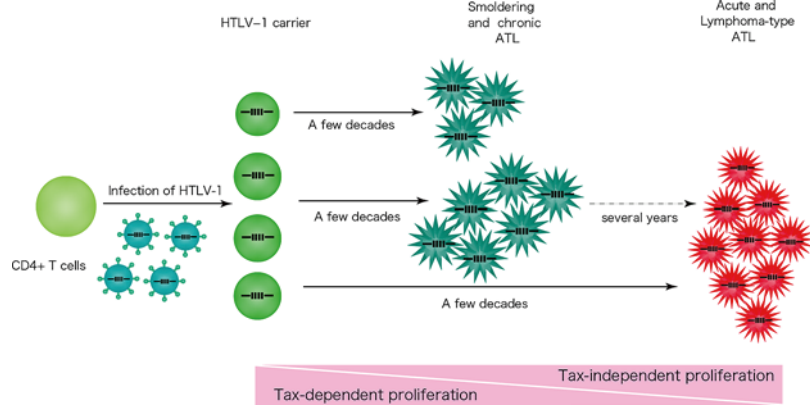


Fig. 8 Model of ATL development

After HTLV-1 infection, HTLV-1 promotes clonal proliferation of infected cells by Tax and viral proteins. Proliferation of HTLV-1 infected cells is controlled by cytotoxic T cells (CTL). The frequency of ATL development in the life of the carriers is low (2–6%). The progression to acute type ATL from carrier and smoldering type ATL takes after a long latent period of a few decade years. During the periods, multistep mechanism is involved in the development ATL.

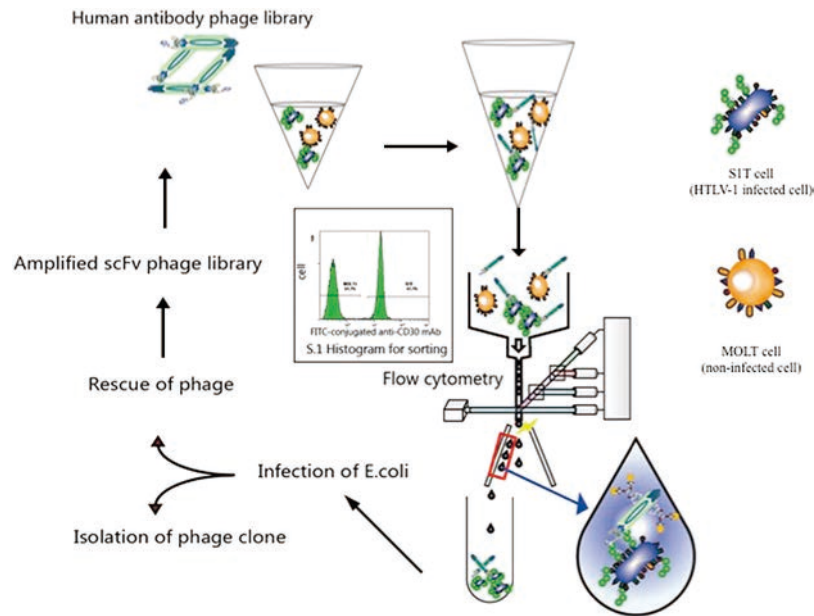


Fig. 9 Workflow: Selection of specific antibody for HTLV-1 infected cell

シス小体の3つに分けられている。唾液、血液、尿などの体液中に多く含まれており、様々なRNAやタンパク質が含まれており、細胞間の情報伝達に重要な役割があることが多くの研究者らにより報告されている (Fig. 12)^{36)~39)}。近年、細胞外小胞は、多くの疾患の診断バイオマーカーの探索、治療への応用研究に用いられている^{40)~43)}。そこで、筆者は、スキルス胃がん由来の細胞外小胞に特異的に結合する抗体ファージの単離を試みた。細胞外小胞は、段階超遠心法、スクロス密度勾配法、様々な企業から市販されているカラム、ビーズなどを用いて精製が行われている⁴⁴⁾。Fig. 13Aは、筆者が調整に使用した超遠心・スクロス密度勾配法を示している。調整した細胞外小胞のウェスタンブロットの結果を Fig. 13B に示しており、細胞外

小胞のマーカーとして報告されている CD9, CD63, CD81 をはじめ、Alix, TSG101 の発現も確認されている。近年、Wauben MH らは、Flow Cytometry による1粒子の細胞外小胞の検出、ソーティング技術による細胞外小胞の回収に成功している⁴⁵⁾。現在、筆者は、この技術を利用して Fig. 14 に示す workflow によりがん細胞由来細胞外小胞に特異的に発現する抗原の同定、同時にその抗原に特異的に結合する抗体の獲得に向けて抗体ファージライブラリを用いて研究を進めているところである。将来的に、単離した抗体を用いたスキルス胃がんの早期診断可能な診断キットの開発を目指している。

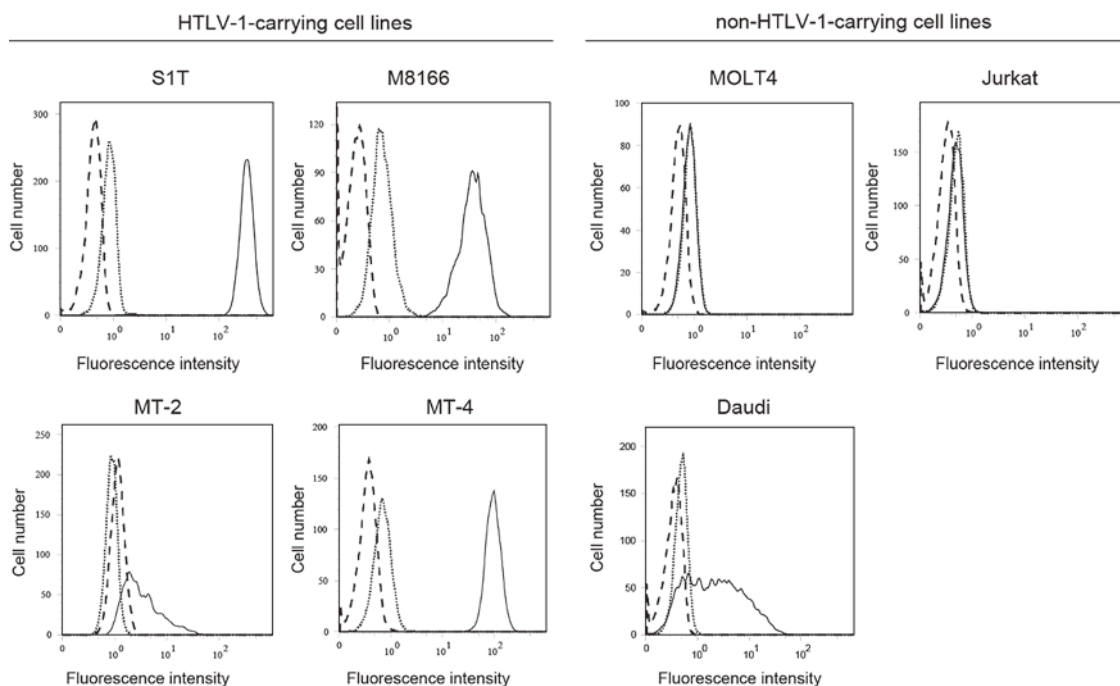


Fig. 10 The binding specificity of isolated antibody clone to HTLV-1 infected cells

Bindings of isolated scFv to HTLV-1-carrying T-cell lines (S1T, MT2, MT4 and M8166) and non-HTLV-1-carrying T-cell lines (MOLT4 and Jurkat). The cells were stained with isolated scFv, anti-His-tagged mouse mAb and FITC-labeled anti mouse antibody and supplied to FACS analysis (thick line). The broken and dotted lines indicate the cells only and the cells stained without scFv, respectively.

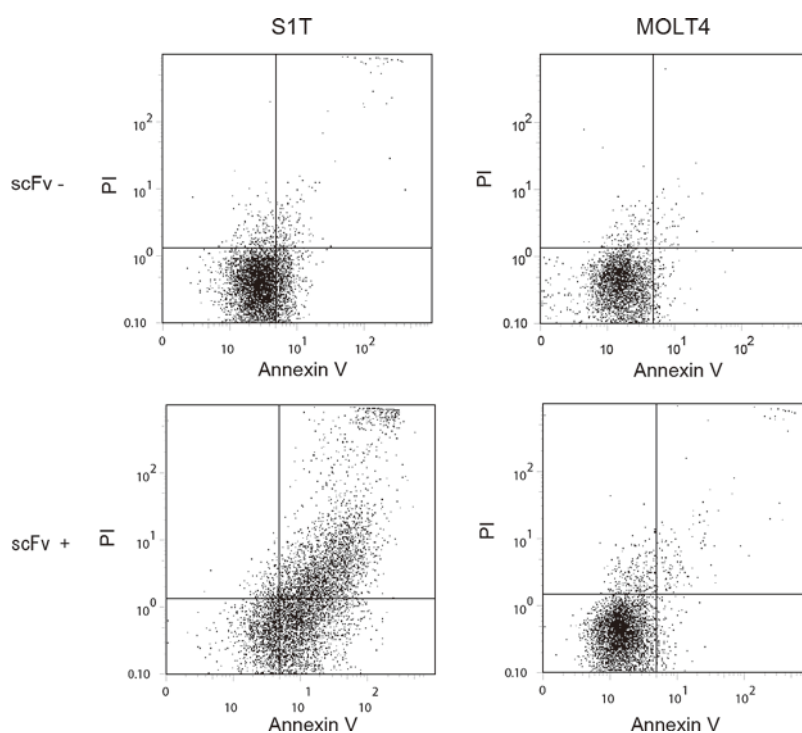


Fig. 11 Apoptosis-like cell death of S1T cells induced by isolated antibody

S1T cells or MOLT4 cells were incubated with isolated scFv (5 nM) at 37°C for 1 h and were stained with propidium iodide (PI) and Annexin V staining solution for 15 min. The stained cells were analyzed on a flow cytometry.

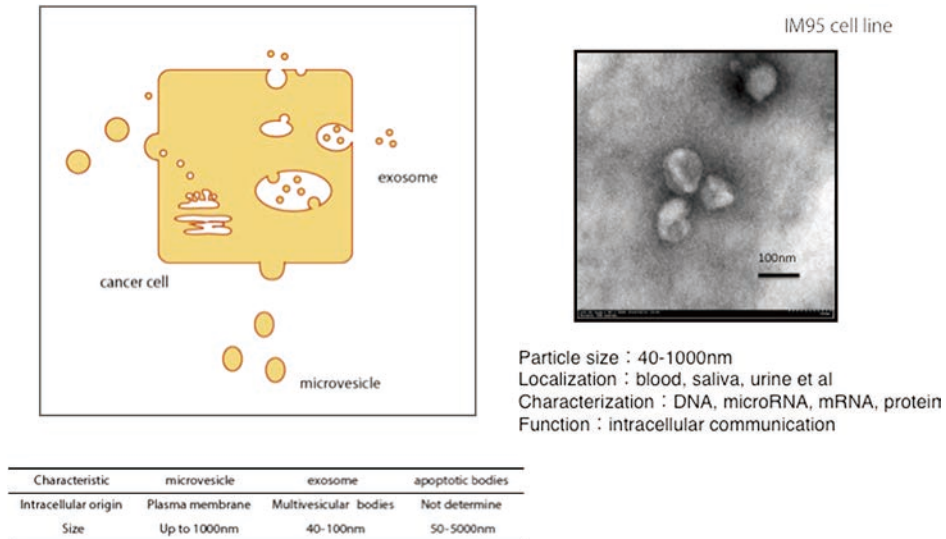


Fig. 12 Characterization of extracellular vesicles

Extracellular vesicle including exosome, microvesicles, and apoptotic body are 50–1000 nm in diameter, release from cancer cell and various cell into extracellular space. They contain microRNA, mRNA, and protein that could be transferred to target cells for intercellular communication. Their Extracellular vesicles derived from IM95 cell line were detected using transmission electron microscopy (TEM).

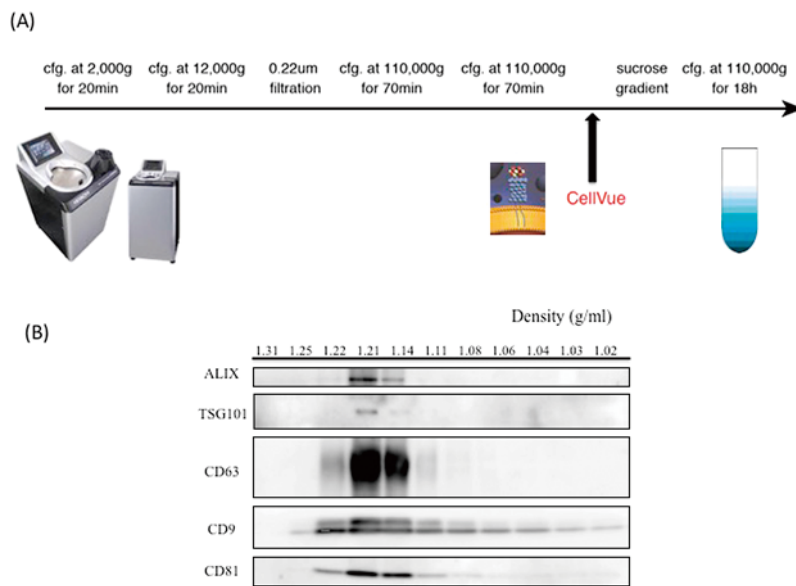


Fig. 13 Extracellular vesicles isolation protocol

(A) Extracellular vesicles were isolated from cell culture supernatant or body fluid by differential ultracentrifugation and sucrose gradient ultracentrifugation. (B) EVs were enriched at density of 1.11–1.22 mg/ml by exosomal protein CD9, 63, 81 Alix, and TSG101 by western blotting analysis.

9 結論

抗体医薬は、がん領域を中心に自己免疫疾患領域などの疾患で開発が進んでおり、今後もまだまだ市場が拡大すると予想されている。その中で、約40年前に発見されたファージディスプレイ技術は、この抗体医薬の分野において革新的な技術として大きく貢献してきた。この技術を用いて開発された数十種類の抗体が、現在臨床試験が行われており、有効な分子標的薬の開発に期待がもたれている。

一方で、ファージディスプレイ技術は、抗体医薬の分野に限らず、抗体ドメイン以外の様々スキャフォールドタンパク質の設計が行われており、異分野への技術導入が進められている。その中で、私は、最後に示した細胞外小胞を標的にした早期スキルス胃がんの診断キットの開発研究を試みながら、新たにプロテオミクス分野に大きく貢献できるようなファージディスプレイ技術を用いた革新的技術を創り出せるようにしたい。

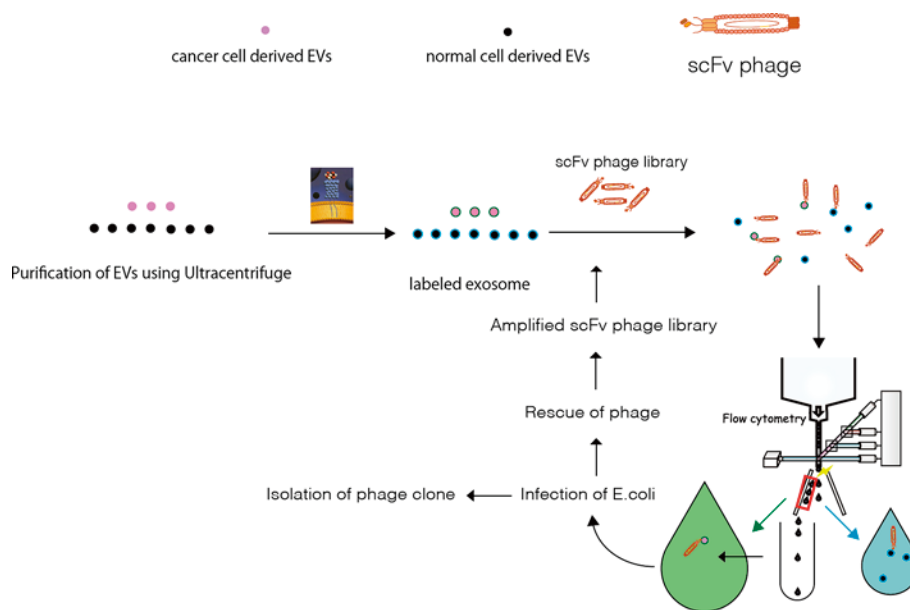


Fig. 14 Workflow: Isolation of extracellular vesicle specific antibody

謝辞

この雑誌を執筆するにあたり、鹿児島大学での学部、修士、博士課程の時に抗体ファージディスプレイ技術をご指導頂いた杉村和久教授、伊東祐二教授、医薬基盤研究所でプロテオミクス技術をご指導頂いた朝長毅グループリーダー、広島大学で細胞外小胞の研究をご指導頂いた田原栄俊教授、そして、現職で、質量分析、細胞外小胞の研究をご指導頂いている植田幸嗣プロジェクトリーダー、また、私の研究に携わって頂いた皆様へ心から感謝の気持ちとお礼を申し上げます。

著者らに開示すべき利益相反状態は無い。

文献

- 1) Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. 1985;228:1315–1317.
- 2) Hoogenboom HR. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol*. 2005;23:1105–1116.
- 3) Marx H, Lemeer S, Schliep JE, *et al*. A large synthetic peptide and phosphopeptide reference library for mass spectrometry-based proteomics. *Nat Biotechnol*. 2013;31:557–564.
- 4) Robinson WH, Steinman L. Human peptidome display. *Nat Biotechnol*. 2011;29:500–502.
- 5) McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*. 1990;348:552–554.
- 6) Silverman J, Liu Q, Bakker A, *et al*. Multivalent avimer proteins evolved by exon shuffling of a family of human receptor domains. *Nat Biotechnol*. 2005;23:1556–1561.
- 7) Wojcik J, Hantschel O, Grebien F, *et al*. A potent and highly specific FN3 monobody inhibitor of the Abl SH2 domain. *Nat*

- Struct Mol Biol. 2010;17:519–527.
- 8) Duckworth DH. “Who discovered bacteriophage?”. *Bacteriol Rev*. 1976;40:793–802.
- 9) Keen EC. Phage therapy: concept to cure. *Front Microbiol*. 2012;3:238.
- 10) Abedon ST. Phage therapy of pulmonary infections. *Bacteriophage*. 2015;5:e1020260.
- 11) Kutter E, De Vos D, Gvasalia G, *et al*. Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections. *Curr Pharm Biotechnol*. 2010;11:69–86.
- 12) Feiner R, Argov T, Rabinovich L, Sigal N, Borovok I, Herskovits AA. A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13:641–650.
- 13) Hobbs Z, Abedon ST. Diversity of phage infection types and associated terminology: the problem with ‘Lytic or lysogenic’. *FEMS Microbiol Lett*. 2016;363.
- 14) Campbell A. The future of bacteriophage biology. *Nat Rev Genet*. 2003;4:471–477.
- 15) Salmond GP, Fineran PC. A century of the phage: past, present and future. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13:777–786.
- 16) Houbiers MC, Hemminga MA. Protein-lipid interactions of bacteriophage M13 gene 9 minor coat protein. *Mol Membr Biol*. 2004;21:351–359.
- 17) Lubkowski J, Hennecke F, Pluckthun A, Wlodawer A. Filamentous phage infection: crystal structure of g3p in complex with its coreceptor, the C-terminal domain of TolA. *Structure*. 1999;7:711–722.
- 18) Binz HK, Amstutz P, Kohl A, *et al*. High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries. *Nat Biotechnol*. 2004;22:575–582.
- 19) Beste G, Schmidt FS, Stibora T, Skerra A. Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:1898–1903.
- 20) Dai M, Temirov J, Pesavento E, *et al*. Using T7 phage display to select GFP-based binders. *Protein Eng Des Sel*.

- 2008;21:413–424.
- 21) Wang X, Yu J, Sreekumar A, *et al.* Autoantibody signatures in prostate cancer. *N Engl J Med.* 2005;353:1224–1235.
 - 22) Larman HB, Zhao Z, Laserson U, *et al.* Autoantigen discovery with a synthetic human peptidome. *Nat Biotechnol.* 2011;29:535–541.
 - 23) Nomura T, Abe Y, Kamada H, *et al.* Creation of an improved mutant TNF with TNFR1-selectivity and antagonistic activity by phage display technology. *Pharmazie.* 2010;65:93–96.
 - 24) Hashiguchi S, Yamaguchi Y, Takeuchi O, Akira S, Sugimura K. Immunological basis of M13 phage vaccine: Regulation under MyD88 and TLR9 signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;402:19–22.
 - 25) Lee YJ, Yi H, Kim WJ, *et al.* Fabricating genetically engineered high-power lithium-ion batteries using multiple virus genes. *Science.* 2009;324:1051–1055.
 - 26) Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975;256:495–497.
 - 27) Jespers LS, Roberts A, Mahler SM, Winter G, Hoogenboom HR. Guiding the selection of human antibodies from phage display repertoires to a single epitope of an antigen. *Biotechnology (N Y).* 1994;12:899–903.
 - 28) Ishida I, Tomizuka K, Yoshida H, Kuroiwa Y. *TransChromo Mouse.* *Biotechnol Genet Eng Rev.* 2002;19:73–82.
 - 29) Jin A, Ozawa T, Tajiri K, *et al.* A rapid and efficient single-cell manipulation method for screening antigen-specific antibody-secreting cells from human peripheral blood. *Nat Med.* 2009;15:1088–1092.
 - 30) Matsuoka M, Jeang KT. Human T-cell leukemia virus type I at age 25: a progress report. *Cancer Res.* 2005;65:4467–4470.
 - 31) Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. A retrovirus from human leukemia cell lines: its isolation, characterization, and implication in human adult T-cell leukemia (ATL). *Princess Takamatsu Symp.* 1982;12:285–294.
 - 32) Ohshima K. Pathological features of diseases associated with human T-cell leukemia virus type I. *Cancer Sci.* 2007;98:772–778.
 - 33) Kurose K, Ohue Y, Wada H, *et al.* Phase Ia Study of FoxP3+ CD4 Treg Depletion by Infusion of a Humanized Anti-CCR4 Antibody, KW-0761, in Cancer Patients. *Clin Cancer Res.* 2015;21:4327–4336.
 - 34) Ishida T, Joh T, Uike N, *et al.* Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody (KW-0761) for relapsed adult T-cell leukemia-lymphoma: a multicenter phase II study. *J Clin Oncol.* 2012;30:837–842.
 - 35) Muraoka S, Ito Y, Kamimura M, *et al.* Effective induction of cell death on adult T-cell leukaemia cells by HLA-DRbeta-specific small antibody fragment isolated from human antibody phage library. *J Biochem.* 2009;145:799–810.
 - 36) Simons M, Raposo G. Exosomes—vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol.* 2009;21:575–581.
 - 37) Katsuda T, Kosaka N, Ochiya T. The roles of extracellular vesicles in cancer biology: toward the development of novel cancer biomarkers. *Proteomics.* 2014;14:412–425.
 - 38) An T, Qin S, Xu Y, *et al.* Exosomes serve as tumour markers for personalized diagnostics owing to their important role in cancer metastasis. *J Extracell Vesicles.* 2015;4:27522.
 - 39) Shimoda A, Ueda K, Nishiumi S, *et al.* Exosomes as nanocarriers for systemic delivery of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA. *Sci Rep.* 2016;6:18346.
 - 40) Ueda K, Ishikawa N, Tatsuguchi A, Saichi N, Fujii R, Nakagawa H. Antibody-coupled monolithic silica microtips for highthroughput molecular profiling of circulating exosomes. *Sci Rep.* 2014;4:6232.
 - 41) Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer. *J Clin Invest.* 2016;126:1208–1215.
 - 42) Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature.* 2015;527:329–335.
 - 43) Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, *et al.* Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature.* 2015;523:177–182.
 - 44) Sunkara V, Woo HK, Cho YK. Emerging techniques in the isolation and characterization of extracellular vesicles and their roles in cancer diagnostics and prognostics. *Analyst.* 2016;141:371–381.
 - 45) Groot Kormelink T, Arkesteijn GJ, Nauwelaers FA, van den Engh G, Nolte-'t Hoen EN, Wauben MH. Prerequisites for the analysis and sorting of extracellular vesicle subpopulations by high-resolution flow cytometry. *Cytometry A.* 2016;89:135–147.
 - 46) Niu Z, Bruckman MA, Harp B, Mello CM, Wang Q. Bacteriophage M13 as a scaffold for preparing Conductive polymeric composite fibers. *Nano Res.* 2008;1:235–241.
 - 47) Rotem E, Assaf R, Morgan F, Szabolcs S, Martin K, Marcia BG, Sankar A, Amos BO. Bacteriophage infection is targeted to cellular poles. *Mol Microbiol.* 2008;68:1107–1116.

Role of Phage Display Technology to Proteomics

Satoshi Muraoka*^{1,2}, Hidetoshi Tahara¹

*E-mail: satoshi.muraoka@jfcf.or.jp

¹Department of Cellular and Molecular Biology Basic Life Sciences, Institute of Biomedical & Health Sciences, Hiroshima University, 1-2-3, Kasumi, Minami-ku, Hiroshima city, Hiroshima 734-8553, Japan

²Cancer Proteomics Group, Project for Realization of Personalized Cancer Medicine, Genome Center, Japanese Foundation for Cancer Research, 3-8-31, Ariake, Koto-ku, 135-8550, Japan

(Received: May 13, 2016; Revised: June 24, 2016; Accepted: June 28, 2016)

In 1915, Frederick, T initially identified bacteriophages, referring to viruses that infect and replicate within bacteria. Subsequently, phage display technology was reported by Smith, GP in 1985, when he demonstrated random peptides on the surfaces of filamentous bacteriophages. Subsequently, McCafferty, J and Winter, G reported that antibodies were the first proteins to be displayed successfully on the surfaces of phages in 1990. Since then, many researchers have constructed large phage antibody or peptide libraries using powerful techniques in an attempt to discover novel therapeutic targets or prognostic biomarkers and select biologically active ligands. Recently, scaffolds different from antibodies were reported to form suitable binding ligands in subcellular locations, leading to the successful construction of a scaffold phage library. This review highlights the possibilities and advantages of the application of phage display technology in the search for new drug targets, cell receptors, and their ligands.

Keywords: antibody; extracellular vesicle; membrane protein; phage display; proteomics.