

平成30年6月11日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08629

研究課題名(和文) 疾患バイオマーカーの高感度測定を支援する高性能変異抗体の効率的創製システム開発

研究課題名(英文) Efficient systems for generating high-performance antibody mutants that enable sensitive determinations of diagnostic biomarkers

研究代表者

小林 典裕 (KOBAYASHI, NORIHIRO)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90205477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：在来の診断用抗体の機能を遺伝子操作により改善することが可能と期待されている。抗体を一本鎖Fvフラグメント(scFv)に変換し、ランダム変異を加えた後にファージ粒子の表面に発現させて多様性に富むライブラリーを作製し、「パンニング」により希少な改良型分子種を選択・単離する。しかし、その選択効率に難があり、必ずしも好結果が得られない。そこで、ファージ産生菌をクローニングする新しい原理に基づく選択・単離法を開発した。コルチゾールに対するscFvの変異体ライブラリーを作製し、本法により高親和力変異体の単離を試みたところ、従来のパンニングからは得られなかった高親和力変異体を得られ、その有用性が示された。

研究成果の概要(英文)：Phage-display-based molecular evolution potentially provides antibody mutants with greater diagnostic utilities than conventional antibodies. The panning, in which whole members were reacted simultaneously to immobilized antigens, has still been used to isolate evolved mutants in diverse antibody libraries, but often missed valuable species. Thus, we developed a new selection strategy to solve this crucial problem. Bacterial clones in a library, each harboring a single-chain Fv fragment (scFv) gene, were cultured separately in microwells, and scFv-displaying phage generated therein was examined for their antigen-binding property using a bioluminescent assay. One-shot application for an scFv library against cortisol provided several scFv clones with improved affinities, none of which could be isolated through a repeated trials of conventional panning. Thus we evaluated that the present method should be of significant utility for generating high-performance diagnostic antibodies.

研究分野：分析化学

キーワード：抗体 一本鎖Fvフラグメント 変異体 ライブラリー 選択方法 パンニング

1. 研究開始当初の背景

疾患バイオマーカーを精密に認識・捕捉する抗体は、高感度で特異的な臨床検査法を確立するうえで強力なツールになる。診断用抗体は、主に B 細胞ハイブリドーマ法で調製されているが、その機能を遺伝子操作により改善することが原理的に可能である。抗原結合部位を構成する抗体の H 鎖および L 鎖可変部の遺伝子にランダム変異を加えた後に「人工のミニ抗体」である一本鎖 Fv フラグメント (single-chain Fv fragment; scFv) の遺伝子に変換し、適当な宿主内で発現させて莫大な多様性をもつ変異抗体の分子集団 (ライブラリー) を調製し、偶然に生成した改良型分子種を選択・単離する。その効率を高めるために、scFv を繊維状バクテリオファージ粒子の表面に発現させる「遺伝型 - 表現型一体化」の手法が活用される。すなわち、「ファージ抗体」のライブラリーを作製し、ごく希少な改良型分子種を、大量に副生する「改悪分子種」から選別しつつ単離する。具体的には、目的の抗原を固定化した固相にファージライブラリーをまとめて反応させて、非特異的なファージを洗浄・除去した後に、特異的なファージを酸や塩基などを加えて溶出・回収する。この選択・単離の手法は「パンニング」と呼ばれている。

以上の原理と基本的な実験系は 1990 年代前半にほぼ確立され、天然の抗体を遥かに上回る「スーパー抗体」を創出しようとする革新的な方法論と期待されてきた。しかし、現実にはそのような水準には程遠く、実用的な抗体を作製するうえでハイブリドーマ法には未だ及ばない。申請者は、過去 15 年来、抗体の試験管内分子進化について研究を続け、パンニングによる改良型クローンの選別効率の悪さが上述の低迷の一因であると確信するに至った。繊維状ファージは極めて疎水性が大きい粒子であり、パンニング中に試験管などに非特異的に吸着するうえ、相互に会合・凝集する。このため、特異的なファージの溶出・回収操作において非特異的なファージが大量に混入し、その後の目的クローンの特定が困難になるのである。この問題が、遺伝子操作による改良型「人工」抗体の普及を妨げる大きな障害と考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、上記の問題の抜本的な解決を目的として、改良型抗体フラグメントを提示するファージクローンをライブラリーから効率よく選択し単離する方法の開発を目指すこととした。

3. 研究の方法

本研究に着手した当初は、抗体提示ファージのライブラリーを修飾を最小限に留めた標的抗原と液相中で反応させ、大過剰の「改悪ファージ」による淘汰を防ぐためにクローニングと選択を同時に行うことが重要と考え、次の方法を考案した。すなわち、まず、ある蛍光色素 (A とする) で標識した抗原と scFv 提示ファージのライブラリーを溶液中で反応させたのち、ファージ外殻を異なる蛍光色素 (B とする) で染色する。次いで、この二重染色反応溶液を、1 滴あたりに 1 ピリオン (ファージ粒子 1 個) の抗体提示ファージを含むように細分化して、個々の液滴が陽性ファージを含むか否かを「デジタル検出」するものである。この「デジタル検出」の手段として、マイクロウェルに分注して各ウェルの蛍光を検出するマイクロアレイ方式と反応液をフローサイトメーター/セルソーターに付す方式が考えられたが、いずれも感度が及ばず、断念せざるを得なかった。

そこで、scFv ファージではなく、ファージ産生菌をクローニングする方法に切り替えた。この場合、1 個の菌体から多数のファージ粒子が産生されるため、その検出が容易になる。具体的には、変異 scFv 遺伝子を大腸菌に導入して寒天培地に塗布し、形成されたコロニーを、予め標的抗原を固定化したマイクロウェルに分注した培地に懸濁し、ヘルパーファージ共存下に振とう培養する。プレートを洗浄後、抗原抗体反応によりウェル内に残るファージを、抗ファージ scFv-ルシフェラーゼ融合タンパク質をプローブとして発光検出するものである。

4. 研究成果

上記の新規選択法の有用性を評価するために、コルチゾール (CS) に対する scFv の変異体ライブラリーを作製し、高親和力変異体の単離を試みた。当研究室でクローニングされたマウス抗 CS 抗体の可変部からなる野生型 scFv 遺伝子 (WT) を鋳型とし、error-prone PCR により scFv 全長にランダム変異を導入した。これを大腸菌に導入し、寒天培地上に形成されたコロニーを、ヘルパーファージを含む培地を分注した CS-BSA 結合体固定化マイクロプレートの各ウェルに加え、振とう培養した。プレートを洗浄した後、自作の抗ファージ scFv-ルシフェラーゼ融合タンパク質を反応させて固相上のファージを発光検出した。高いシグナルを示した 40 ウェルからファージを回収し、再増幅したのち競合 ELISA に付したところ、7 種のクローンが WT より高い感度を示した。これらを可溶性タンパクとして調製し、³H 標識 CS を用いる Scatchard 法により結合定数 K_a を求めた。変異体 #10 の値は $1.3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ であり WT ($3.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) よりも 38 倍も親和力が向上していた。本改良型クローンは、固定化 CS 試験管を用いる従来のパンニングからは得られ

なかったことから、今回開発した選択法は期待通り有用と評価される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

H. Oyama, I. Morita, Y. Kiguchi, T. Morishita, S. Fukushima, Y. Nishimori, T. Niwa, N. Kobayashi, A Single-Step "Breeding" Generated a Diagnostic Anti-cortisol Antibody Fragment with Over 30-Fold Enhanced Affinity, *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, 2017, 40(12), 2191-2198. DOI : 10.1248/bpb.b17-00633

I. Morita, H. Oyama, M. Yasuo, K. Matsuda, K. Katagi, A. Ito, H. Tatsuda, H. Tanaka, S. Morimoto, N. Kobayashi, Antibody Fragments for On-site Testing of Cannabinoids Generated via in Vitro Affinity Maturation, *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, 2017,40(2), 174-181. DOI : 10.1248/bpb.b16-00669

H. Oyama, I. Morita, Y. Kiguchi, E. Banzono, K. Ishii, S. Kubo, Y. Watanabe, A. Hirai, C. Kaede, M. Ohta, N. Kobayashi, One-Shot In Vitro Evolution Generated an Antibody Fragment for Testing Urinary Cotinine with More Than 40-Fold Enhanced Affinity, *Anal. Chem.*, 査読有, 2017, 89(1), 988-995. DOI : 10.1021/acs.analchem.6b04332

H. Kimura, S. Mikawa, C. Mizuguchi, Y. Horie, I. Morita, H. Oyama, T. Ohgita, K. Nishitsuji, A. Takeuchi, S. Lund-Katz, K. Akaji, N. Kobayashi, H. Saito, Immunochemical Approach for Monitoring of Structural Transition of ApoA-I upon HDL Formation Using Novel Monoclonal Antibodies, *Sci. Rep.*, 査読有, 2017, 7, 2988. DOI : 10.1038/s41598-017-03208-8

H. Kameyama, H. Nakajima, K. Nishitsuji, S. Mikawa, K. Uchimura, N. Kobayashi, K. Okuhira, H. Saito, N. Sakashita, Iowa mutant Apolipoprotein A-I (ApoA-I_{Iowa}) fibrils target lysosomes, *Sci. Rep.*, 査読有, 2016, 6, 30391. DOI : 10.1038/srep30391

H. Nakajima, K. Nishitsuji, H. Kawashima, K. Kuwabara, S. Mikawa, K. Uchimura, K. Akaji, Y. Kashiwada, N. Kobayashi, H. Saito, N. Sakashita, The polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents apoA-I_{Iowa} amyloidosis *in vitro* and protects human embryonic kidney 293 cells against amyloid cytotoxicity, *Amyloid*, 査読有, 2016, 23(1), 17-25. DOI : 10.3109/13506129.2015.1113167

H. Oyama, I. Morita, Y. Kiguchi, S. Miyake, A. Moriuchi, T. Akisada, T. Niwa, N. Kobayashi, *Gaussia* luciferase as a genetic fusion partner with antibody fragments for sensitive immunoassay monitoring of clinical biomarkers, *Anal. Chem.*, 査読有, 2015, 87(24), 12387-12395.

DOI : 10.1021/acs.analchem.5b04015

K. Kuwabara, K. Nishitsuji, K. Uchimura, S.-C. Hung, M. Mizuguchi, H. Nakajima, S. Mikawa, N. Kobayashi, H. Saito, N. Sakashita, Cellular interaction and cytotoxicity of the Iowa mutation of Apolipoprotein A-I (ApoA-I_{Iowa}) amyloid mediated by sulfate moieties of heparan sulfate, *J. Biol. Chem.*, 査読有, 2015, 290(40), 24210-24221.

DOI : 10.1074/jbc.M115.652545

M. Ohta, A. Fujinami, N. Kobayashi, A. Amano, A. Ishigami, H. Tokuda, N. Suzuki, F. Ito, T. Mori, M. Sawada, K. Iwasa, J. Kitawaki, K. Ohnishi, M. Tsujikawa, H. Obayashi, Two chalcones, 4-hydroxyderricin and xanthoangelol, stimulate GLUT4-dependent glucose uptake through the LKB1/AMP-activated protein kinase signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes *Nutrition Res.*, 査読有, 2015, 35(7), 618-625.

DOI : 10.1016/j.nutres.2015.05.010

[学会発表](計 18 件)

H. Oyama, I. Morita, T. Niwa, and N. Kobayashi, "Utility of *Gaussia* luciferase as a fusion partner with scFvs for bioluminescent immunoassays testing clinical biomarkers", *European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, (2017.06.12, Athens).

I. Morita, H. Oyama, Hiroyuki Tanaka, Satoshi Morimoto, and N. Kobayashi, "In vitro affinity maturation of a single-chain Fv fragment for on-site testing of cannabinoids", *European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, (2017.06.12, Athens).

小林典裕、大山浩之、森田いずみ、木口裕貴、「アッセイ感度の向上を目指す「抗体育種」: 抗コチニン抗体を例として」
日本法中毒学会第36年会(2017.07.07 品川)

大山浩之、森田いずみ、松田和久、片木謙吾、田中宏幸、森元聡、小林典裕「抗 Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール一本鎖Fvフラグメントの作製と試験管内親和性成熟」
日本法中毒学会第36年会(2017.07.06 品川)

森田いずみ、大山浩之、神田結、安尾まゆみ、伊藤綾、小林典裕「新規モノクローナル抗ケタミン抗体の作製とその諸性質」
日本

法中毒学会第 36 年会 (2017.07.06 品川)

大山浩之, 木口裕貴, 井上由香莉, 高嶺百合子, 藤原若菜, 森田いずみ, 小林典裕, 「高親和力を保持した抗エストロジオール scFv 最少変異体調製の試み」 日本分析化学会 66 年会 (2017.09.11 葛飾)

森田いずみ, 神田結, 安尾まゆみ, 伊藤綾, 大山浩之, 小林典裕, 「オンサイト免疫測定法を目的としたモノクローナル抗ケタミン抗体の新規調製」 日本分析化学会 66 年会 (2017.09.11 葛飾)

大山浩之, 森田いずみ, 松田和久, 伊藤綾, 小林典裕, 「大麻成分の検出を目的とする抗 Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール scFv の試験管内親和性成熟」 日本分析化学会第 65 年会 (2016.09.15 札幌)

森田いずみ, 黒田裕美, 伊藤綾, 池田夏美, 小山千尋, 大山浩之, 小林典裕, 「オンサイト免疫測定法を目的とした Teoc 化覚せいアミンに対するモノクローナル抗体の新規調製」 日本分析化学会第 65 年会 (2016.09.15 札幌)

Shiho Mikawa, Chiharu Mizuguchi, Izumi Morita, Hiroyuki Oyama, Teruhiko Baba, Akira Shigenaga, Toshinori Shimanouchi, Norihiro Kobayashi, Akira Otaka, Kenichi Akaji, Hiroyuki Saito, "Effect of Heparin on Amyloid Fibril Formation of ApoA-I Fragment Peptides" 第 53 回ペプチド討論会 (2016.10 京都)

三河志穂, 木村仁, 森田いずみ, 大山浩之, 小林典裕, 斎藤博幸, 「ApoA-I 構造特異抗体の開発に向けた抗体評価系の確立」 日本薬学会第 137 年会 (2017.03 仙台)

N. Kobayashi, H. Oyama, I. Morita, T. Niwa, Sensitive luminescent ELISA for human serum cortisol using a fusion protein combining anti-cortisol scFv and *Gaussia* luciferase, *European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Paris PARIS 2015* (2015.06.22 Paris)

H. Oyama, T. Niwa, N. Kobayashi, "Antibody breeding" for more sensitive immunoassays 1: Three-step affinity maturation generated an improved scFv suitable for serum estradiol-17 β ELISA, *European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Paris PARIS 2015* (2015.06.22 Paris)

I. Morita, H. Oyama, E. Banzono, M. Ohta, N. Kobayashi, "Antibody breeding" for more sensitive immunoassays 2: Human urinary cotinine ELISA using an affinity-matured scFv to monitor tobacco smoke exposure, *European*

Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Paris PARIS 2015 (2015.06.22 Paris)

大山浩之, 江浪友理, 田川達矢, 山本知佳, 森田いずみ, 小林典裕, 「改良型抗エストロジオール scFv の親和性成熟機構の解析」 日本分析化学会第 64 年会 (2015.09.11 福岡)

大山浩之, 宮下貴之, 森田いずみ, 小林典裕, 「scFv - ルシフェラーゼ融合タンパク質を用いるチロキシン生物発光 ELISA の試み」 日本分析化学会第 64 年会 (2015.09.11 福岡)

大山浩之, 江浪友理, 山本知佳, 田川達矢, 小林典裕, 「高親和力抗エストロジオール変異 scFv の創製とその親和性成熟機構の解析」 第 55 回日本臨床化学会年次学術集会 (2015.10.31 吹田)

N. Kobayashi, "Generation, molecular breeding, and biomedical application of antibodies specific to low molecular weight drugs" *The 2015 Annual convention of the Korean Society of Applied Pharmacology*, (2015.11.08 Seoul).

〔その他〕
ホームページ等
神戸薬科大学 生命分析化学研究室 HP
(<http://www.kobepharma-u.ac.jp/analchem/>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者
小林典裕 (KOBAYASHI, Norihiro)
神戸薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 90205477

(2) 研究分担者
大山浩之 (OYAMA, Hiroyuki)
神戸薬科大学・薬学部・助教
研究者番号: 80572966

森田いずみ (MORITA, Izumi)
神戸薬科大学・薬学部・助手
研究者番号: 20299085