

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19550114

研究課題名 (和文) 抗タキソールモノクローナル抗体を反応場としたタキソールの合成

研究課題名 (英文) Attempted synthesis of taxol utilizing anti-taxol monoclonal antibody as a as a chiral mould

研究代表者

上里 新一 (UESATO SHINICHI)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：50111969

研究成果の概要 (和文)：2'-succinyltaxol と BSA 複合体および RSA 複合体を合成した。これら複合体から誘導したペプチド断片混合物につき、ニュートラルロススキャン法、MS/MS 法との組み合わせで質量分析を行うことにより、taxol のタンパク結合を確認する方法を見出した。2'-succinyltaxol-RSA 複合体をマウスに免疫し、常法に従って処理し、抗 taxol モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを 4 種得た。しかし、いずれも、抗体生産能は高くなく、また、抗体価も低かった。残念なことに、抗体産生能力も継代とともに減弱化した。アジュバントや抗原の量、ハイブリドーマ培養法、を検討したが、改善しなかった。予備実験として、粗精製抗体存在下、C13 位側鎖カルボン酸の活性エステルと baccacin III とのエステル縮合を試みた。

研究成果の概要 (英文)：2'-Succinyltaxol-BSA and 2'-succinyltaxol-RSA conjugates were prepared. Formation of a linkage between hapten and protein is usually confirmed by the UV or fluorescamine method. However, it was difficult to confirm the binding of 2'-succinyltaxol to the protein by these methods owing to the similar UV absorption maxima of 2'-succinyltaxol and protein. We therefore conducted a mass spectrometric analysis using the neutral loss scan and MS/MS techniques to confirm the formulation of the 2'-succinyltaxol-protein conjugate. Balb/c mice were immunized i.c. at 2-week intervals each with 2'-Succinyltaxol-RSA. The spleen cells from the mice were treated in a conventional way, giving four hybridomas producing an anti-taxol monoclonal antibody. However, the hybridomas did not have a high production ability of an anti-taxol monoclonal antibody, and their antibody titers were rather low. Unfortunately, production of the antibody declined gradually with cloning. This problem was not improved in spite of our efforts with amounts of antibody and kinds of adjuvant as well as culturing conditions. Condensation reaction between baccacin III and an activated ester (vinyl ester) of C13-carboxylic acid was attempted under a crude antibody as a preliminary experiment. Further examination of the antibody reaction has not yet been conducted owing to a loss of antibody production function.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 1,500,000 | 450,000   | 1,950,000 |
| 2008年度 | 1,400,000 | 420,000   | 1,820,000 |
| 2009年度 | 700,000   | 210,000   | 910,000   |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・合成化学

キーワード：分子認識、モノクローナル抗体、タキソール、ハプテン

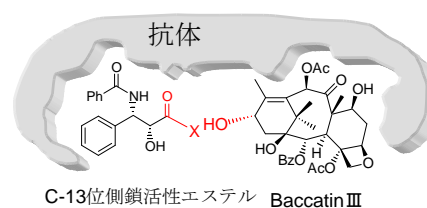
1. 研究開始当初の背景

モノクローナル抗体を有機合成に利用する方法として、LernerやSchultzらによるcatalytic antibody法が広く知られている。この方法は、ある特定の反応の遷移状態アナログのタンパク質複合体を抗原として作製し、これにより得たモノクローナル抗体を用いて反応の活性化エネルギーを低下させ、目的化合物への反応を触媒しようというものである。これには遷移状態アナログの合成が必要であることから、複雑な構造の化合物の合成への適用には限界がある。これに対し、我々は、合成目的とする化合物のタンパク質複合体を合成し、これからモノクローナル抗体を作製し、鑄型(反応場)として利用することで、稀少天然有機化合物を合成することを企図した。即ち、モノクローナル抗体下、基質や反応剤を分子配列させた後、温和な酸化剤や還元剤或いは温和な塩基や2価金属イオン触媒などを用いて選択的反応や縮合反応を行い、効率よく目的の化合物を合成することを考えた。目的化合物を認識するモノクローナル抗体を鑄型とすることで、次の効果が期待できる。(1) 基質と反応剤の分子配列の場となる。(2) ケモセレクトィブな反応が期待できる。(3) 基質と反応剤の反応点同士が接近しうするため、保護基なしでも位置選択的に反応が進行する。(4) エステル交換などの縮合反応では、生成物はモノクローナル抗体に捕捉された状態にあり、逆反応(加水分解)の進行が抑制される。(5) 緩衝液、pH、可溶化溶媒、温度、2価金属イオン等を種々変えることによって、抗体を反応の遷移状態構造に親和性の高い3次構造に導き、

turn-overの可能な触媒機能を示す条件を見いだす可能性がある。(6) 複雑な構造の化合物の合成に適用できる。これまでに、ビンプラスチン(VLB)を認識する抗 VLB モノクローナル抗体(MAb-10-A9)を作製し、この存在下酸素と NaBH<sub>3</sub>CN を用いて、anhydoVLB を立体選択的かつ位置選択的に VLB へ誘導することに成功した(収率：4時間後 16%；24時間後 21%) (特許出願：上里ら、PCT/JP2005/001901)。この結果は、MAb-10-A9 が、enamine への C-20'位水酸基導入過程の立体化学を制御する鑄型となり得ることを示した。しかし、抗体反応をturn-over させることはできなかった。その原因として、反応4時間後出発原料のanhydoVLB が約 80% 回収されたことから、律速段階は anhydoVLB→dihydropyridinium salt であり、C-20'位水酸基導入過程ではない可能性が考えられた。

2. 研究の目的

タキソール(taxol)を認識する抗 taxolモノクローナル抗体を作製し、下図のように、この抗体内に C-13 位側鎖鎖活性エステルユニットと Baccatin III を配列させ、エステル交換反応により、一段階で、taxol 合成を触媒する条件を見出すことを目的とする。



3. 研究の方法

(1) taxol-タンパク質複合体の合成：  
2'-succinyltaxol-BSA 及び RSA 複合体を合成

する。合成の確認は、UV 法、fluorescamine 法では困難なので、熱変性、ジスルフィドの還元、スルフィド基のアルキル化、トリブシン消化を行い、得られたペプチド断片を、API3000 を用いて、ニュートラルロススキャン、プリカーサーイオンスキャン及び MS/MS 測定に供して、合成の確認を行う。これらを免疫用並びに ELISA 用抗原として使用する。

(2) 抗 taxol モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製： Balb/c SPF マウスに前記 taxol-タンパク質複合体を投与（アジュバントとして Freund's complete adjuvant）し、順次、ELISA、脾臓細胞とミエローマ細胞 Sp210-Ag14 との細胞融合、HAT セレクション、ハイブリドーマのスクリーニングとクローニングを行い、目的とする抗体産生ハイブリドーマを得る。

(3) 抗 taxol モノクローナル抗体の獲得： ハイブリドーマを Balb/c ノードマウス腹腔内に投与し、腹水を得る。アフィニティークロマトグラフィーにより、目的の抗体を精製する。

(4) C-13 位側鎖活性エステルの合成： 植物から供給可能な中間体 Baccatin III C-13 位 OH 基と C-13 位側鎖活性エステルとのエステル交換縮合反応を、モノクローナル抗体存在下で行う。その準備段階として、次の C-13 位側鎖活性エステルを合成する。C-13-COX: X = OCH=CH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>CN, OCH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>

(5) taxol の合成： 抗 taxol モノクローナル抗体により配列して、互いに接近した Baccatin III C-13 位 OH 基と C-13 位側鎖活性エステル間でエステル交換反応を起こさせ、taxol 合成を行う。反応系として、単相系（例えば、DMSO と bicine buffer などの緩衝液）や二相系（例えば、CHCl<sub>3</sub>、octane と bicine buffer などの緩衝液）を利用する。目的物の生成確認、収率は高速液体クロマトグラフィーによって確認する。

#### 4. 研究成果

(1) 抗 taxol モノクローナル抗体の作製： 2'-succinyltaxol-RSA 複合体と Freund's complete adjuvant（タンパク濃度が 80µg/100µl となるよう混合）とを、Balb/c マウス（5 匹, 6 weeks, ♀）に 2 週間毎に一匹当たり 100µl 皮下投与した。投与期間は抗体価が最大になる 6 週目までとした。抗体価の上昇が確認されたマウスから脾臓を摘出し、抗体産生細胞を獲得した。次に PEG を用いて抗体産生細胞とマウスミエローマ細胞 SP2/O-Ag14 を融合させハイブリドーマを作製し、HAT 培地を用いて 96 穴プレートで HAT セレクションを行な

った。ハイブリドーマがコロニーを形成していることが確認することが出来た well から上清を回収し、ELISA 法を用いて抗体価を確認した。その結果 4 つの well で抗体価が確認された。スクリーニングで得た陽性ハイブリドーマを、限界希釈法を用いてクローニングした結果、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株 F6①, F6②, C10, D10 の 4 株を獲得した。これら抗体産生ハイブリドーマ細胞株を GIT 培地で培養した後、Balb/c ノードマウス（6 weeks, ♀）の腹腔内に 2000×10<sup>4</sup> cell/ml in PBS で投与した。14 日後に腹水を各 3.5 ml 獲得した。アフィニティークラムを用いた抗体の精製：F6①, F6②を別々に腹腔内投与したマウスから獲得した腹水を Protein A Sepharose 4 Fast Flow column (IgG 抗体の精製に用いる) を用いて、目的とする IgG 抗体の単離を試みたが、抗体の抗体価は低かった。そこで、C10, D10 を、Protein A Sepharose 4 Fast Flow column と Protein G Sepharose 4 Fast Flow column (前者の column より IgG<sub>1</sub> 抗体との結合性が高い) に吸着させ、IgG 抗体の単離を試みたが、目的の抗体を獲得することはできなかった。そこで、ハイブリドーマ F6①を 150×10<sup>4</sup> cell/15 ml で GIT 培地に懸濁し、CELLLine CL 1000 の培養タンクに入れ、基礎培地として RPMI1640 培地を使用して培養した結果、細胞上清を 15 ml 獲得した。獲得した上清を、高速遠心濾過ユニット(vivaspin)を用いて 5 ml まで濃縮し、Protein G Sepharose 4 Fast Flow column を用いて IgG 抗体の単離を試みたが、精製過程で抗体価が低下した。基礎培地に GIT 培地を用いた場合でも、同様の結果であった。結論として、今回獲得した抗 taxol モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの抗体産生能が低かったか、または、抗体自身が不安定であったか、のいずれかであろうと推察している。

(2) 抗体下 taxol 合成の試み：

C-13 位側鎖活性エステル： vinyl ester, thiol ester, cyanomethyl ester, trifluoroethyl ester を合成した。このうち、C-13 位側鎖 vinyl ester (1 mM, 25 µl)を用い 10%DMSO 500µM 中、Bicine buffer (pH 8.5), 抗体（粗精製 8 µM, 100 µl）、Baccatin III (1 mM, 25 µl)、とともに 7 時間インキュベーションした。除タンパク後、LC-MC で taxol に相当するピークの存在を検討した(C18、H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN = 1/1)。その他、緩衝液や反応物濃度比等を変えて反応を試みたが、多くの共雑 peaks とともに、taxol 近辺の微小な peak が得られたのみであった。

(3) LC-MS を用いた 2'-succinyltaxol - RSA 複合体の形成確認：

ハプテン-タンパク複合体の形成確認は、通常タンパク由来の 280 nm の紫外線吸光度とハプテン由来の極大吸光度とから算出して行う。しかし、2'-succinyltaxol - RSA 複合体では、ハプテン由来の吸収が 273 nm であり、タンパク由来の吸収(280 nm)に接近しているため、この方法で結合形成を確認するには問題があった。そこで、2'-succinyltaxol-RSA 複合体をペプチド断片化し、得られた断片を、ニュートラルロススキャン等の測定に供し、タンパクに taxol が結合しているかの確認を行った。2'-succinyltaxol-RSA 複合体につき、熱変性、ジスルフィドの還元、スルフィド基のアルキル化、トリプシン消化を行い、TopTip (C-18) により脱塩・濃縮し、ペプチド混合物を得た。API3000 と XTerra MS C8 5 μm カラム (2.1 mm × 150 mm Column, 移動相 H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN, サンプル 5 μl) を用いニュートラルロススキャン測定した結果、2'-succinyltaxol とペプチド断片が結合していると考えられるピーク  $m/z$ : 1730.2 が見られた。次に LC-MS を行うと、taxol-ペプチド断片複合体と予想される  $m/z$ : 1731.7 のピークが見られた。このピークにつき、LC-MS/MS を行った結果、2'-succinyltaxol と RSA ペプチド断片との複合体ピークから、taxol が脱離したと考えられるピーク  $m/z$ : 878.3 が見られた。このようにして、従来法では困難である、ハプテン-タンパク複合体の形成確認を、ペプチド断片化、質量分析法を組み合わせて行うことが出来ることを見出した。

#### 5. 主な発表論文

(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 2 件)

- ① Ishii Y., Hattori Y., Yamada T., Uesato S., Maitani K., Nagaoka Y. Histone deacetylase inhibitor prodrugs in nanoparticle vector enhanced gene expression in human cancer cells. *Eur. J. Med. Chem.*, **44**, 4603–4610 (2009).
- ② Negishi J., Shirahama T., Nagaoka Y., Takemoto Y., Uesato S., Attempt to Detect Natural Anticancer Compounds – Protein Binding through Precursor Ion Scan and MS/MS Measurements, *The Pharmaceutical Society of Japan.*, **128**, 1317-1323 (2008).

[学会発表] (計 4 件)

① 瓦谷泰之、平田佳之、長岡康夫、原田知彦、上里新一、芝野真喜雄、谷口雅彦、安田正秀、馬場きみ江：新規細胞周期M期制御化合物の抗がん活性と関連化合物の構造活性相関について 第28回メディシナルケミストリーシンポジウム (2009年11月25日) (東大本郷)

② Uesato S., Kawaratani Y., Nagaoka Y. Novel M-phase regulating compounds comprising a nitrooxymethyl group in the molecule 第68回日本癌学会学術総会 (2009年10月3日) (パシフィコ横浜)

③ 武本佳樹, 白浜 辰弥, 河野 武幸, 辻 琢己, 盛實祐希, 長岡 康夫, 上里新一：モノクローナル抗体を反応場としたタキソール合成の試みー抗タキソールモノクローナル抗体の作製 日本薬学会第129年会 (2009年3月27日(金), 京都) 発表番号 27P-am192

④ 白浜 辰弥, 武本 佳樹, 山本 智加, 根岸 淳, 長岡 康夫, 上里 新一：ニュートラルロススキャン法およびMS/MS法を用いたタキソール-タンパク質複合体形成の確認について 日本薬学会第129年会 (2009年3月26日(木), 京都) 発表番号 26P-am035

[その他]

<http://pharm.life-bio.kansai-u.ac.jp>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

上里 新一 (UESATO SHINICHI)  
関西大学・化学生命工学部・教授  
研究者番号：50111969

##### (2) 研究分担者

( )  
研究者番号：

##### (3) 連携研究者

長岡 康夫 (NAGAOKA YASUO)  
関西大学・化学生命工学部・教授  
研究者番号：90243039

河野 武幸 (KOUNO TAKEYUKI)  
摂南大学・薬学部・教授  
研究者番号：50178224