

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19590573
 研究課題名（和文）抗腫瘍マーカーモノクローナル抗体の遺伝子組換え植物による大量発現系の構築
 研究課題名（英文）Construction of efficient expression system of anti-tumor marker protein-mono-clonal antibodies in transgenic plant.
 研究代表者
 佐藤 浩之（SATO HIROYUKI）
 東邦大学・理学部・准教授
 研究者番号：80187228

研究成果の概要（和文）：現在、腫瘍のマーカー検査は非常に高価であるが、検査用抗体を植物で発現させれば、著しいコスト削減が可能である。今回、肝細胞癌の検査に用いるAFPとPIVKA-IIタンパク質のモノクローナル抗体産生株を作製し、それらの γ グロブリンcDNAをクローン化し、scFv型に組換えた。現在、遺伝子組換え植物を作製中である。また検査の高感度活性測定に応用可能な高活性ペルオキシダーゼを日本ワサビから見だし、質量分析により部分配列を決定し、遺伝子のクローン化を行った。

研究成果の概要（英文）：To reduce the production cost of monoclonal antibody for diagnosis, we tried to express gamma-globulin cDNAs of AFP and PIVKA-II in transgenic plant for the diagnosis of hepatocellular carcinoma. After we cloned the cDNAs, construction of cDNAs into scFv was made for its expression in transgenic-plant. As the other approach, we found some novel peroxidases possess higher activity from Japanese wasabi radish than that of horse radish peroxidase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：

肝細胞癌、 α フェトプロテイン、PIVKA-II、遺伝子組換え植物、ペルオキシダーゼ、モノクローナル抗体、腫瘍マーカー検査

1. 研究開始当初の背景

腫瘍マーカー検査に用いられるモノクローナル抗体は、抗体産生細胞とミエローマ細胞とのハイブリドーマを培養することで作製される。ハイブリドーマの培養にはウシ胎児血清など高価な培地が必要であり、また、工業規模の生産には厳密に管理された大型の無菌培養装置と、それを稼働させるための高度な無菌技術が必要である。このような設備や技術を持ってしても培養時には常に感染性ウイルス等の混入の危険性を考慮する必要がある。これらのことから、モノクローナル抗体の生産は概して非常に高コストであり、それをを用いた検体検査も相応に高額である。

近年、ハイブリドーマから得たグロブリン cDNA を植物で発現させる技術が開発され、plantibody と命名されている。plantibody 生産の利点は、低生産コストと高い安全性である。大規模な設備も高度な無菌技術も不要であり、単に抗体遺伝子を組込んだ遺伝子組み換え植物を畑に播くだけで、植物は雨と太陽によって成長する。栽培も一般的な農家の技術があれば良く、その生産コストは従来の 1/100~1/1000 と言われている。十分に成長した葉から抗体分子を精製するが、植物細胞由来のタンパク質であるため、栽培過程や精製過程でヒトへの感染性粒子の混入の可能性がほぼ無視でき、高い安全性が確保される。現在すでに、臨床検査に用いるがん胎児性抗原(CEA)や *Streptococcus mutans* の SAI 抗原に対する plantibody が臨床試験段階にあり、実用化目前の状況である。このような安価なモノクローナル抗体の作製技術は、先進諸国などよりも、発展途上の貧しい国々での使用において特に有用である。

本研究のもう 1 つの課題は、植物で生産させた抗体の抗原との結合量の検出に使われるペルオキシダーゼとして、現在使われているものよりも高性能な酵素を探索し、抗体検査の感度を高める事である。現在は抗原への抗体結合の検出にはほぼセイヨウワサビ (horse radish) ペルオキシダーゼ (HRP) のみしか用いられていないが、われわれは前にニホンワサビから HRP よりもさらに比活性が高く、耐熱性、pH 依存性に優れたペルオキシダーゼ (WRP) を見いだしている。

2. 研究の目的

現在、多くの plantibody の開発が進められているが、本研究では臨床検査に用いるた

めの抗腫瘍マーカーモノクローナル抗体の植物中における発現コンストラクトを作製し、最終的には植物中においてこれを大量発現させる。特に、本研究では肝細胞癌で血中濃度が上昇する PIVKA-II および AFP について、そのモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製し、 γ グロブリン cDNA をクローン化して scFv (単鎖抗体) 化し、植物で発現させる事を最終目的とする。

また、もう 1 つの課題として本研究では HRP よりも高性能であるペルオキシダーゼ WRP を精製し、characterize してその cDNA をクローン化し、検査への応用の可能性を探ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) PIVKA-II

①抗 PIVKA-II モノクローナル抗体の作製

PIVKA-II は肝臓特異的に発現する血液凝固第 2 因子 (プロトロンビン) であり、通常はグルタミン酸残基の一部が γ カルボキシル化される。肝細胞が癌化するとグルタミン酸残基がカルボキシル化されずに血中に分泌され、これが PIVKA-II として検出される。このため抗原とする合成ペプチドは、タンパク質表面にあつて、できるだけ多くのカルボキシル化グルタミン酸残基を含む領域として、22-NH₂-CSYEEAFEALLES-COO-33 とした。この領域の 4 個のグルタミン酸残基は全て γ カルボキシル化を受けるため、PIVKA-II を効率よく検出できると考えられる。ペプチド合成は企業に外注した。合成ペプチドはキャリアとして KLH とコンジュゲートした。

②ヒト PIVKA-II cDNA のクローニング

作製したモノクローナル抗体の力価や特異性を評価するためにヒト PIVKA-II cDNA の抗原決定部位を PCR で増幅した。増幅後、大腸菌発現ベクター pET22b へクローン化して大腸菌中で発現させ、SDS-PAGE で展開した。

③発現タンパク質のウェスタンブロット分析

大腸菌で発現させた組換え PIVKA-II をイモビロン PVDF 膜へ転写し、作製したモノクローナル抗体を用いて反応させ、HRP 結合抗マウス γ グロブリン抗体を用いて検出した。

④モノクローナル抗体の精製

ハイブリドーマの培養上清 5 リットルに

硫酸アンモニウム 1570g を加え、十分に攪拌後、遠心分離によって沈殿を集め、透析により脱塩し、抗体画分とした。

⑤市販の検査キットとの力価の比較

得られた抗体画分の力価を評価するためにエーザイ社製、エイテスト PIVKA-II を対照として ELISA 法により比較評価を行った。

⑥ハイブリドーマの γ グロブリン cDNA のクローニング

DNA データベースからマウス γ グロブリンの H 鎖、L 鎖の配列を取得し、定常領域の配列を align して共通配列を見だし、タカラバイオ社製キットを用いて 5' -RACE PCR を行って可変領域をクローン化した。

得られたクローンの配列を決定した。

⑦scFv (単鎖抗体) の作製

得られた γ グロブリン H 鎖、L 鎖の可変領域をリンカー配列により連結し single chain Fragment variable (単鎖抗体) が発現するように construction を行った。

(2) AFP

①抗 AFP モノクローナル抗体の作製

AFP の 38-119 の 82 残基が抗原決定部位と報告されており、この中の NH₂-C+KDALTAIEKPTGD-COO (peptide-1) および NH₂-SSGLENQLP AFLEE-COO (peptide-2) の 2 つのペプチドを KLH にコンジュゲートし、受託業者に依頼してハイブリドーマを作製した。

②抗 AFP モノクローナル抗体の評価

得られたモノクローナル抗体の特異性および力価を評価するために、抗原とした 2 種のペプチドを用いて ELISA を行った。

③ハイブリドーマの γ グロブリン cDNA のクローニング

DNA データベースから既知のマウス γ グロブリンの H 鎖、L 鎖の配列を取得し、定常領域の配列を align して共通配列を見だし、タカラバイオ社製キットを用いて 5' -RACE PCR を行って可変領域をクローン化した。

(3) 高性能ニホンワサビペルオキシダーゼの性能評価と高活性酵素の精製

①酵素タンパク質の精製

ニホンワサビの根を磨砕してガーゼでろ過し、遠心分離した上清について、硫酸アンモニウムを加え、60%~90%飽和画分を得た。透析後、レクチンによるアフィニティークロ

マトグラフィーを行い、さらに native-PAGE を行って精製した。得られた電気泳動のバンドを切り出し、MS/MS 解析による配列決定を行った。

②ペルオキシダーゼ cDNA ライブラリーの作製

他植物の既知ペルオキシダーゼの配列を DNA データベースから取得し、align して保存領域を決定し、DNA primer を合成してワサビ mRNA の逆転写産物について PCR を行ってクローン化し、多数の cDNA クローンを得てライブラリーを構築した。

4. 研究成果

(1) PIVKA-II

①抗 PIVKA-II モノクローナル抗体の作製

PIVKA-II の抗原決定部位の合成ペプチドを用いてモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製した。4 個の陽性クローンが得られたが、1 クローンが脱落し、ハイブリドーマ株としては 3 クローンが得られた。しかし、そのうち 1 クローンは IgM 産生株であり、さらに 1 クローンは IgG2 および IgM の混入があった。このことから、得られた抗 PIVKA-II IgG 抗体産生ハイブリドーマは 1 クローンのみであることが解った。

この株で発現するモノクローナル抗体を大量に精製し、特異性および力価の評価を行った。ウエスタンブロット分析の結果、大腸菌で発現した PIVKA-II 抗原決定部位と非常に高い特異性で反応した。

一方、エイテスト PIVKA-II を用いて ELISA 法によって力価を測定した結果、現在マーカー検査に用いられている抗体の約 1/100 程度の力価しかない事がわかった。しかしながら、得られた株がこの 1 株のみであり、また本研究によって植物で大量に抗体を発現させることができれば、この不利を補ってあまりある量の抗体を検査に用いる事ができるため、この株を用いて以降の研究を遂行した。

②cDNA のクローン化

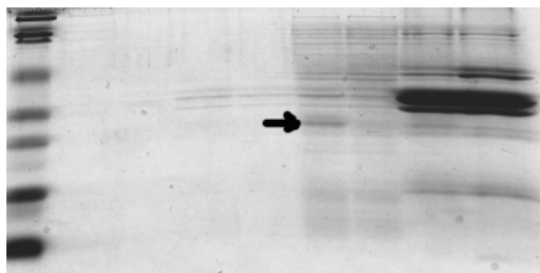
既知のマウス γ グロブリンの H 鎖および L 鎖の cDNA の alignment から推定し、合成した DNA プライマーを用いて 5' -RACE RT-PCR を行い、H 鎖および L 鎖 (κ) をクローン化する事ができた。

③scFv の構築および大腸菌中での発現

得られた H 鎖及び L 鎖の cDNA の可変部領域をリンカーペプチド、GGGGS の 3 回の繰り返し配列を介して遺伝子上で接続した。配列の両端には植物へ組込むための pBI バイナリ

ーベクターおよび、大腸菌で発現させるための pET ベクターへのクローン化に用いる制限酵素部位を付加した。

植物へ導入する前に scFv の評価を行うためにこれを大腸菌中で発現させた。発現誘導中の培養温度は 18°C とした。18°C における発現誘導の結果、大腸菌破碎液の上清（可溶性画分）に予想される大きさ（24kDa）の発現タンパク質がみられた（下図、矢印）。



右から IPTG 無添加の不溶性画分、IPTG 添加の不溶性画分、IPTG 無添加の可溶性画分、IPTG 添加の可溶性画分である。抗 His-Tag 抗体を用いてウェスタンブロット分析を行った結果、このバンドが His-Tag を有しており、目的のタンパク質の発現が確認された。

引き続き、この scFv が PIVKA-II を認識するかどうかの実験を現在行っている。一方、これを植物中で発現させるために、pBI バイナリーベクターにクローン化した。scFv の特性および力価の評価を終え次第、植物への遺伝子導入を行う。

(2) AFP

AFP の抗原決定基に対応した 2 種類の合成ペプチドを用いて、抗 AFP モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製し、7G6、7D6、9D1 の 3 株のハイブリドーマを得た。ELISA 法により、各ハイブリドーマが産生する抗体の反応性を評価したところ、以下の結果を得た。

	peptide 1	peptide 2
7G6	0.373	0.133
7D6	0.348	0.137
9D1	0.682	0.182

以上の結果から、得られた 3 株は全て peptide-1 に対するもので、力価は 9D1 が最も高いものであった。このため、PIVKA-II と同様の方法により、9D1 の γ グロブリン H 鎖

L 鎖の cDNA をクローン化した。現在、その配列の決定を行っており、PIVKA-II と同様、scFv を作製する予定である。

(3) 高性能ニホンワサビペルオキシダーゼの性能評価と高活性酵素の精製

現在、免疫化学的検出に用いられている酵素標識二次抗体は、ほぼ全てセイヨウワサビ由来の HRP である。植物は地球上に数 100 万種類現存しており、その中には HRP よりも高性能な未知のペルオキシダーゼがあると考えられる。我々は前に様々な植物由来のペルオキシダーゼについて活性の評価を行っているが、ニホンワサビから HRP よりも高活性、高温耐性、広 pH 依存性の酵素アイソザイムの存在を見いだした。今回の研究により、その中の高比活性型のアイソザイムの検出および精製、クローン化を試みた。

酵素の精製の結果、HRP と比較して高活性な酵素アイソザイムの検出に成功した。このアイソザイムはセイヨウワサビにおける主要なアイソザイムとは native-PAGE による電気泳動上の移動度が異なっていた。このバンドを native-PAGE ゲルから切り出し、MS/MS 解析によって部分アミノ酸配列を決定した。

ニホンワサビにおけるペルオキシダーゼ cDNA のライブラリーを作製するために、他植物のペルオキシダーゼに保存的な領域のプライマーを用いて PCR を行って、プラスミドベクターに組み込み、48 クローンの塩基配列を決定した。その結果、これらのクローンは 16 のグループに分類でき、そのうちの 7 グループがペルオキシダーゼであった。これらのなかには耐熱性アイソザイムや広 pH 依存性アイソザイムなどが含まれるが、それらの対応を検討するためには異種発現系を構築する必要がある。

異種発現系の構築と MS/MS 解析の結果と併せた cDNA の同定を現在進めている。

今後の予定としては、植物でモノクローナル抗体を発現させる際に、scFv に高比活性ニホンワサビペルオキシダーゼ cDNA を連結させて、酵素と抗体を同時に発現させることを検討している。

(4) まとめ

本研究により、以下の成果を得た

①肝細胞癌の腫瘍マーカー検査に用いるため、抗 AFP 抗体および抗 PIVKA-II モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製した。

②PIVKA-II モノクローナル抗体の γ グロブリンについては cDNA のクローン化および scFv の構築、植物遺伝子導入用のベクターへ

の組込みを終了し、抗 AFP 抗体については、グロブリン cDNA のクローンを終えた。scFv の特異性および力価の評価が終了し次第、植物への導入を試み、大量発現系を構築する。

③ HRP よりも高活性のペルオキシダーゼを精製し、その部分配列を決定した。これとは別に、ペルオキシダーゼの cDNA ライブラリーを構築し、7 グループのペルオキシダーゼの cDNA を得た。これらと酵素の対応を現在検討中である。

④ 今後は植物への scFv の導入および、高活性ペルオキシダーゼの scFv への遺伝子レベルでの付加を行い、臨床検査に用いるモノクローナル抗体の生産コストの大幅な削減を現実のものとしたい。

⑤ なお、特許申請を検討しているため、遺伝子やタンパク質の配列情報を含む論文発表を行っておらず、学会発表は1件を除き行っていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計0件)

〔学会発表〕 (計1件)

小嶋 拓也, 佐藤 浩之: ニホンワサビペルオキシダーゼのcDNAクローニング
第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (2008年12月, 神戸)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 浩之 (SATO HIROYUKI)
東邦大学・理学部・准教授
研究者番号: 80187228

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし