

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：34512  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22590542  
 研究課題名（和文） 低分子バイオマーカーの高感度モニタリングを支援する新世代抗体ライブラリーの創製  
 研究課題名（英文） Generation of recombinant antibody libraries that facilitate highly sensitive monitoring of low molecular weight 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

## 研究成果の概要（和文）：

低分子バイオマーカーに対する高性能変異 scFv を創製するために、高頻度で利用される V<sub>H</sub> と V<sub>L</sub> のサブグループから成るマスターフレームをベースとする scFv ライブラリーを作製したが、実用的な分子種は単離できず、変異導入部位の選択に莫大な試行錯誤が必要と思われた。そこで、よりシンプルな構造を持つストレプトアビジンに着目し、そのループ配列の特定の部位にランダム変異を導入したところ、エストラジオールとコルチゾールに対する結合能を獲得した変異クローンが得られた。

## 研究成果の概要（英文）：

To generate high-performance scFv mutants that are specific to small biomarkers, we constructed a hapten-targeting scFv library based on a single master-frame of which V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> subgroups are those frequently used in anti-hapten antibodies. However, this library failed to yield any practical binder, suggesting that repeated trials are necessary to select suitable positions/patterns for mutagenesis. Thus, we decided to use streptavidin (stav) as a new scaffold, and generated a library of stav mutants, each member of which has random mutations in their loop structures. After several rounds of selection, we found mutant clones that gained binding abilities to estradiol or cortisol.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：バイオマーカー、モニタリング、抗体

## 1. 研究開始当初の背景

ステロイド、チロキシン、カテコールアミンなど、生体内には極微量で強力かつ重要な生理作用を発揮する低分子化合物が数多く存在し、その消長が病態を鋭敏に反映し、バイオマーカーとして有用なものも少なくない。これらは免疫化学的な性質から「ハプテン」と総称され、分子全体が1つの抗原決定基として働く。ハプテンの体液中レベルの超微量測定には免疫アッセイが多用されているが、その感度は用いる抗体の親和定数 ( $K_a$ ) に大きく依存し、 $K_a$  値が大きいほど感度は向上する。ハプテンに対する抗体の作製には、現在、B細胞ハイブリドーマ法が一般的に用いられている。しかし、その  $K_a$  値が  $10^{10}$  ( $M^{-1}$ ) を上回るような高親和力の抗ハプテン抗体を調製することは困難で、このため femtomole を超える感度を達成することは不可能である。

近年、遺伝子操作により、動物を免疫して得られる天然の抗体よりも親和力や特異性に優れる変異型の抗体を創製することが可能視されるに至っている。抗体は2本のH鎖と2本のL鎖から成る分子量約15万のタンパク質で、その抗原結合部位(パラトープ)はH鎖およびL鎖の2つの可変部ドメイン ( $V_H$  と  $V_L$ ) の間に形成される。これら可変部ドメインは各鎖のN末端の約110アミノ酸から構築されるが、その遺伝子をクローニングし、ランダムな核酸塩基の変異を導入したのちに  $V_H$  と  $V_L$  を連結させて一本鎖 Fv フラグメント (single-chain Fv fragment; scFv) の遺伝子を構築する。scFv は、いわば人工のミニ抗体で、IgG に比べて遺伝子操作が容易である。これを大腸菌などに発現させて、莫大な種類の変異抗体の分子集団 (ライブラリー)

を作製する。その中から「偶然に」もとの抗体 (野生型抗体) よりも優れた性能を獲得した分子種 (クローン) を選択・単離するもので、そのプロセスは、生体内で起こるクローン選択と類似している。この単離を容易にするために、scFv をファージ粒子上に発現させるファージ提示系がしばしば活用される。変異導入の鋳型となる野生型抗体として、化学合成オリゴ DNA から構築した人工の抗体も利用できるため、実験動物に免疫投与する工程を完全に省くことも可能である。実際、この「抗体工学」の戦略により、タンパク質抗原については既に実用的な抗体が得られている。

しかし、ハプテンについては、高感度な免疫アッセイを可能とする親和力をもつ抗体を創出した報告例は世界的に乏しく、抗体工学が生体内での免疫応答を超えるうえでの大きな壁となっている。上記のようなハイブリドーマ法の限界を考慮するとき、高親和力で subfemtomole レベルの測定を容易に可能とする変異抗体を創出するプラットフォームの構築が強く望まれる。

## 2. 研究の目的

上記のように、ハプテン抗原の範疇に入る低分子量のバイオマーカーについては、遺伝子操作による抗体の改良が困難であった。

申請者らは、これまで、様々なハプテンに対して特異的な数多くのハイブリドーマ抗体のアミノ酸配列を解析し、抗ハプテン抗体に高頻度で現れるサブグループを明らかにしてきた。本研究では、これらの知見をもとに、ハプテンに対する実用的な変異抗体を効率よく創出しようとする変異抗体ライブラリーの構築を試みた。この目標が達成されれば、ひ

とつのライブラリーの中から、様々な低分子量バイオマーカーについて、従来の天然型の抗体を上回る結合能（親和力、特異性、安定性、組織への浸透性など）を有し、臨床診断薬として有用な「次世代の抗体試薬」が効率よく得られるものと期待された。

### 3. 研究の方法

抗体の可変部は、ループ構造をとり抗原と直接接触する相補性決定部 (complementarity-determining region; CDR) と、 $\beta$ -シートの土台 (scaffold) を形成して CDR を支える枠組み配列 (framework region; FR) から成る。CDR は親和力と特異性の発現に重要な役割を演じ、 $V_H$  と  $V_L$  に 3 箇所ずつ存在する。一方、FR は  $V_H$  では 11 種類、 $V_L$  では 6 種類のサブグループに分類されるが、後述のように、ハプテンにフィットするパラトープの構築に有利と推定される  $V_H$  と  $V_L$  のサブグループをいくつか特定することができる。そこでこれらサブグループに属する "マスターV ドメイン" にランダム化した CDR を配した  $V_H$  と  $V_L$  のライブラリーを化学合成オリゴ DNA から構築し、さらにこれらをシャッフルするように連結して莫大な多様性をもつ scFv のライブラリーを創製する。本ライブラリーから、新規なパンニング法などを駆使して、各種ハプテンに対する高性能変異 scFv の探索を試みることとした。

### 4. 研究成果

$V_H$ ,  $V_L$  のアミノ酸配列をみると、FR の多様性は CDR に比べて小さく、同じサブグループ内では類似の配列をとる。我々は、抗ハプテン抗体アミノ酸配列のデータベースを作成して精査し、 $V_H$  のサブグループとして IIA と IIID が、 $V_L$  のサブグループとして II と V が

高頻度に現れることを見出した。

そこで、上記のサブグループを持つマスターFR の遺伝子を設計し、変異  $V_H$  と変異  $V_L$  を overlap extension PCR (OEP) によりリンカー部分を介して連結して scFv 遺伝子を構築し、従来から使用しているファージ提示用ベクターに組み込んだのち大腸菌を形質転換してライブラリーを構築した。しかし、インフレームの scFv を発現する形質転換クローンの割合が低いため目的の実用変異 scFv の探索は困難と懸念され、この結果は OEP においてフレームシフトが高頻度で起こるため、と推定された。この難点を解決するために、まずファージ提示用ベクターを改良した。すなわち、ベクターの骨格に予めリンカー部分の遺伝子断片を挿入し、その 5'側に  $V_H$  を、3'側に  $V_L$  の遺伝子をクローニングする部位を設けて、OEP を行うことなく変異 scFv ライブラリーの構築を可能とした。

次に、当研究室で既にクローニングした抗コルチゾール抗体 scFv [サブグループ  $V_H$  = IIB (IIA と酷似),  $V_L$  = II] をマスターフレームとして、ライブラリーを作製した。しかし、期待に反してオリジナル抗原であるコルチゾールにさえ、実用的な結合能を示す変異 scFv が単離できず、結合部位の構築に  $V_H$  と  $V_L$  の 2 つのドメインを必要とする scFv の複雑さを克服するには、変異導入部位の選択について莫大な試行錯誤が必要と思われた。そこで、よりシンプルなマスターフレームを模索し、ビオチン結合タンパク質であるストレプトアビジン (stav; 単一のドメインから成り分子量は scFv の約 1/2) に着目した。stav は 8 つの  $\beta$ シート ( $\beta 1 \sim \beta 8$ ) を持ち、連続する  $\beta$ シートはランダムコイル (ループ) で連結されている。そこで、 $\beta 1 \sim \beta 2$  間、 $\beta 3 \sim \beta 4$  間、 $\beta 4 \sim \beta 5$  間のいずれかのループ内に、連続する 3 アミノ酸に 12 通りの多様性を生じる縮重コドン

を導入したライブラリーを構築したところ、エストラジオールとコルチゾールに対する結合能を獲得した変異クローンを単離することができた。

#### 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 6 件)

- ① Kobayashi N., Odaka K., Uehara T., Imanaka-Yoshida K., Kato Y., Oyama H., Tadokoro H., Akizawa H., Tanada S., Hiroe M., Fukumura T., Komuro I., Arano Y., Yoshida T., Irie T., Toward in vivo imaging of heart disease using a radiolabeled single-chain Fv fragment targeting Tenascin-C. *Anal. Chem.* **2011**, 83(23), 9123-9130, 査読有.  
DOI:10.1021/ac202159p
- ② Kobayashi N., Banzono E., Shimoda Y., Oyama H., Kunihiro T., Morita I., Ohta M., A monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for human urinary cotinine to monitor tobacco smoke exposure., *Anal. Methods*, **2011**, 3(9), 1995-2002, 査読有.  
DOI:10.1039/c1ay05083d
- ③ Kobayashi N., Oyama H., Antibody engineering toward high-sensitivity high-throughput immunosensing of small molecules. *Analyst*, **2011**, 136(4), 642-651, 査読有.  
DOI:10.1039/c0an00603c
- ④ Kobayashi N.; Oyama H.; Kato Y.; Goto J.; Söderlind E.; Borrebaeck A. K. C., Two-step in vitro antibody affinity maturation enables estradiol-17 $\beta$  assays with more than 10-fold higher sensitivity., *Anal. Chem.*, **2010**, 82,

1027-1038, 査読有.

DOI:10.1021/ac902283n

- ⑤ Kobayashi N., Oyama H., Suzuki I., Kato Y., Umemura T., Goto J., Oligosaccharide-assisted direct immunosensing of small molecules., *Anal. Chem.*, **2010**, 4333-4336, 査読有.  
<http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ac100865p>
- ⑥ Hosogi J., Tanaka H., Fujita K., Kuwabara T., Ikegawa S., Kobayashi N., Mano N., Goto J., LC-MS/MS coupled with immunoaffinity extraction for determination of estrone, 17 $\beta$ -estradiol and estrone 3-sulfate in human plasma., *J. Chromatogr. B*, **2010**, 878, 222-227. 査読有.  
DOI:10.1016/j.jchromb.2009.08.010

[学会発表] (計 15 件)

- ① 大山 浩之, 山口 修子, 中田 茂利, 丹羽 俊文, 小林 典裕, 「試験管内分子進化による高親和力抗エストラジオール scfv の創製と応用」, 第52回日本臨床化学会年次学術集会, 2012.09.07, 盛岡.
- ② 大山 浩之, 田中 瑛梨, 丹羽 俊文, 小林 典裕, 「 $\beta$ 型抗イディオタイプ抗体 scFv-酵素融合体を用いるハプテンイムノメトリックアッセイの試み」, 日本分析化学会第60年会, 2011.09.15, 名古屋.
- ③ 大山 浩之, 寺本 隆佑, 宮岡 広子, 森田 いずみ, 小林 典裕, 「部位特異的変異導入による抗コチニン scFv の試験管内親和性成熟の試み」, 日本分析化学会第60年会, 2011.09.15, 名古屋.
- ④ 丹羽俊文, 加賀幸斗, 小嶋菜月, 林慎一, 大山浩之, 田中瑛梨, 小林典裕, 「抗イディオタイプ抗体 scFv-酵素融合体をトレーサーに用いる競合型ハプテン ELISA の構

- 築」, 日本薬学会第131年会, 2011.03.29, 静岡.
- ⑤ 森田いずみ, 久保智士, 大山浩之, 小林典裕, 「高親和力抗ハプテン抗体の単離に用いる Cleavableビオチン標識ハプテンの合成と性質」, 日本薬学会第131年会, 2011.03.29, 静岡.
- ⑥ 大山浩之, 山口修子, 綺田尚久, 小林典裕, 「実用診断試薬を創出する試験管内分子進化 (1). 抗エストラジオール抗体のKaが250倍も増大」, 日本薬学会第131年会, 2011.03.29, 静岡.
- ⑦ 小林典裕, 大山浩之, 石井香好, 久保智士, 寺本隆祐, 太田光熙, 「実用診断試薬を創出する試験管内分子進化 (2). 高感受動喫煙モニタリングを目指す抗コチニン抗体の親和性成熟」, 日本薬学会第131年会, 2011.03.29, 静岡.
- ⑧ Hiroyuki Oyama, Generation of an engineered diagnostic antibody fragment for estradiol through 250-fold improvement in the affinity, IBC 21st Annual International Conference: Antibody Engineering, 2010.12.06-08, San Diego, USA.
- ⑨ Norihiro Kobayashi, Direct immunosensing of hapten molecules using single-chain Fv fragments that recognize hapten-oligosaccharide complexes, IBC 21st Annual International Conference: Antibody Engineering, 2010.12.06-08, San Diego, USA.
- ⑩ 大山浩之, 番園恵理佳, 石井香好, 寺本隆祐, 小林典裕, 太田光熙, 「ELISAの高感度化を目的とする抗コチニン抗体の試験管内アフィニティマチュレーション」, 第50回日本臨床化学学会年次学術集会, 2010.09.24, 甲府.
- ⑪ 大山浩之, 綺田尚久, 山口修子, 小林典裕, 「抗体工学的アプローチによるエストラジオール免疫測定法の高感度化」, 日本分析化学会第59年会, 2010.09.15, 仙台.
- ⑫ 大山浩之, 鈴木巖, 安井孝治, 小林典裕, 「ハプテン・オリゴ糖複合体を認識するscFvの単離とハプテンイムノメトリックアッセイへの応用」, 日本分析化学会第59年会, 2010.09.15, 仙台.
- ⑬ 大山浩之, 小林典裕, 加藤 芳徳, 丹羽 俊文, 「ハプテンの高感度測定を目的とする抗イディオタイプ抗体scFv—酵素融合体の調製と諸性質」, 日本薬学会第130年会, 2010.03.29, 岡山.
- ⑭ 大山浩之, 加藤 芳徳, 小林典裕, 「Ka値が30倍以上増大: “第3世代” 変異抗エストラジオール抗体フラグメント」, 日本薬学会第130年会, 2010.03.29, 岡山.
- ⑮ 番園 恵理佳, 下駄 祐子, 国広 俊臣, 大山浩之, 小林典裕, 太田 光熙, 「ヒト尿中コチニンELISA 用モノクローナル抗体の調製とscFv化」, 日本薬学会第130年会, 2010.03.29, 岡山.
- [図書] (計4件)
- ① 小林 典裕, 廣川書店, NEW 薬品分析化学 (第2版), 2012, 309.
- ② 日本薬学会編, 東京化学同人, 薬学用語辞典, 2012.
- ③ 日本薬学会編, 東京化学同人, スタンダード薬学シリーズ2・物理系薬学II, 化学物質の分析 (第3版), 2012.
- ④ 日本薬学会編, 東京化学同人, スタンダード薬学シリーズ2 物理系薬学II.化学物質の分析, 2011, 188-199.
- [産業財産権]
- 出願状況 (計1件)
- 名称: 核医学診断装置の制御方法, 核医学

診断装置, 診断剤キット, および標識抗テ  
ネイシン C scFv フラグメント.

発明者: 小林典裕ほか 11 名,

番号: 特願 2012-102732

出願年月日: 2012

## 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

### (3) 連携研究者

小山 淳子 (KOYAMA JUNKO)

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号: 60102109

森田 いずみ (MORITA IZUMI)

神戸薬科大学・薬学部・助手

研究者番号: 20299085