

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月17日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650227

研究課題名（和文） 金魚を用いたポリクローナル抗体の調製プロセス開発による動物実験4Rの推進

研究課題名（英文） Promotion of the 4Rs in animal experiments by the development of a production process for polyclonal antibodies using a goldfish

研究代表者

浅野 竜太郎 (ASANO RYUTARO)

東北大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：80323103

研究成果の概要（和文）：本研究では、抗体を含むリンパ液を簡便に、かつ恒常的に採取可能なスイハウガンと呼ばれるキンギョを用いたポリクローナル抗体の調製プロセス開発を目指した。結果、スイハウガンの水泡から採取したリンパ液からポリクローナル抗体を精製することに成功し、さらにELISAを用いた検出系を確立した。また免疫時の補助剤を検討することで、特異的な抗体が水泡内リンパ液に産生されることをドットブロッキングにより確認した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we tried to the development of a production process for polyclonal antibodies using a particular kind of goldfish, in which lymph can be sustainably and easily collected from its enlarged corneas containing antibodies. We successfully purified polyclonal antibodies in lymph extracted from goldfish and established the detection system for them based on ELISA. Further, we confirmed it by dot blotting that specific antibodies in lymph can be produced by examining adjuvants at the immunization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：実験動物福祉、免疫学、生体分子、蛋白質、ポリクローナル抗体、キンギョ、リンパ液、魚類抗体

1. 研究開始当初の背景

高い特異性と親和性を有する抗体は、医薬としても応用されているが、様々な研究分野で今もなお検出のためのプローブとして汎用的に利用されている。多くの場合、ポリクローナル抗体でも十分に機能するが、哺乳動物を免疫する必要があるため、一般的な研究室では設備や手続き上、手軽には調製できない。一方、より下等な生物である魚類も抗体を有するが、中でも興味深いことにキンギョの品種であるスイハウガンは、抗体を含んだリンパ液を内包した水泡を有していて、このリンパ液を採取しても1週間程度での回復が

みられる(秋山ら, 日本分子生物学会(2009))。即ち、もしスイハウガンの免疫法や採取した抗体を用いた検出系を確立できれば、研究室で手軽に飼育でき、かつ任意のポリクローナル抗体を採取し続けることが可能な代替免疫動物になり得るといえる。

申請者は、タンパク質工学を駆使して多種多様な、がん治療人工抗体を創製してきた(J. Biol. Chem., 285, 20844-9 (2010)他)。さらに最近、臨床応用を目指す上では、その抗原性が懸念されるペプチドタグを必要としない調製法も開発したが(FEBS J., 277, 477-87 (2010))、一方で抗タグ抗体が使用で

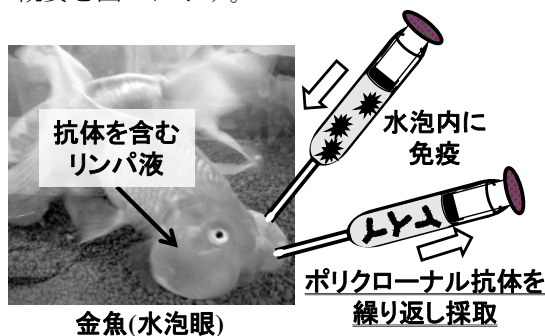
きないため、実製造プロセスの確立に於いて目的の人工抗体をトレースすることができないという新たな問題が生じた。しかしながら人工抗体それぞれに対して哺乳動物を免疫してポリクローナル抗体を作製するのは現実的ではない。そこで特別な申請、設備を必要とせず、かつ生命倫理を考慮したスイホウガンを用いたポリクローナル抗体の調製プロセス開発を目指す本提案の着想に至った。元来、観賞用のキンギョとして人気が高いため、研究環境衛生の向上などの副次的な効果も期待できる。

2. 研究の目的

ポリクローナル抗体は様々な研究分野で汎用的に用いられているが、哺乳動物を免疫する必要があるため、研究室では手軽には調製できない。本研究は、抗体を含むリンパ液を簡便に、かつ恒常的に採取可能なスイホウガンと呼ばれるキンギョを用いたポリクローナル抗体の調製プロセス開発を目指すことで、動物実験の3Rの推進の達成と4つ目のRとしてRecreation(娯楽)、即ち環境衛生の向上を副次的な効果として期待している。具体的には、まずスイホウガンから採取したリンパ液からのポリクローナル抗体の精製法の検討とキャラクタリゼーション、およびELISAに基づく検出系の確立を目指し、さらに免疫法に関する検討も併せて進めた。

3. 研究の方法

スイホウガンを用いた汎用的なポリクローナル抗体の調製プロセスの開発と検出系の確立を目指して、まずポリクローナル抗体の精製法とELISAに基づく検出系を確立させた後、免疫法に関する検討を行った。一方、膜タンパク質抗原に対するポリクローナル抗体の調製を目指した免疫法も検討し、結晶化抗体としての可能性を追求した。本研究の概要を図1に示す。



動物実験の4Rの推進

- Replacement**→代替として下等な魚類
- Reduction**→繰り返し採取・利用による実験動物の削減
- Refinement**→免疫法の検討による苦痛の削減
- Recreation**→環境衛生の向上をもたらす娯楽

図1 水泡眼を用いたポリクローナル抗体の調製

具体的には、まずスイホウガンの水泡内リンパ液からのポリクローナル抗体の精製法の確立を目指して、抗体精製のリガンドタンパク質として汎用的に用いられているプロテインAを用いて検討を行った。キンギョはコイ科のフナの変異個体であるため抗コイ抗体が交差性を示すことが報告されている(秋山ら, 日本分子生物学会(2009))。そこで市販の抗コイ抗体を用いたELISA法に基づく検出系の確立を目指した。

一方、免疫法に関しては精製タンパク質を中心に用いて、効果的な免疫条件の検討を、アジュバント(免疫補助剤)や免疫スケジュールの最適化等の観点から進めた。さらに膜タンパク質抗原を強制発現させたCHO細胞を用いた免疫も検討することで、結晶化抗体の取得法としての展開を図った。

4. 研究成果

まずスイホウガンの水泡内リンパ液の採取と、その後の回復速度等を確認するため、比較的大きな個体(~20cm)のスイホウガンを購入し、ある程度飼育した後、シリンジを用いた採取を試みた。水泡が裂けないよう、極力小さい針を用いて行ったが、個体や水泡内の部位によって、リンパ液の粘度が異なっていたため、最終的に18Gの針を用いて採取を行った結果、一方の頬から5~10mL程度のリンパ液の採取に成功した(図2)。リンパ液はやや黄みがかっており、水泡は約1週間で採取前の状態への復帰がみられた。

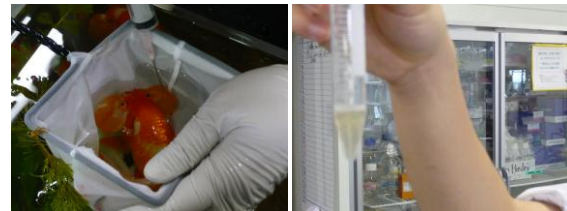


図2 シリンジを用いた水泡内リンパ球の採取(左)と採取したリンパ液(右)

続いて、キンギョの抗体はマウスやヒト抗体と構造類似性が比較的高いという報告(秋山ら, 日本分子生物学会(2009))から、ヒトやマウスのIgG抗体の精製リガンドタンパク質として最も汎用的に使われているプロテインAを用いた精製検討を行った。その溶出画分のポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行った結果を図3に示す。

還元条件下でのSDS-PAGEにおいて、2つの主要なタンパク質のバンドがみられた。それぞれ抗体の重鎖と軽鎖に対応するものと考えられるが、コントロールとして泳動したマウスモノクローナルIgGに比べ、より大きい方のバンド、即ち重鎖と考えられるバンドに移動度の差が大きくみられた。魚類の血清中

にはIgMタイプが多く含まれることが知られており、また実際にコイ科の血清抗体を解析した文献(Bag MR, et. al., Fish Shellfish Immunol., 26, 275-8 (2009))の泳動結果とも良く一致していた。マウスやヒトではIgMはIgGに比べて定常領域のドメインが1つ多いこと、さらには近年の報告(田丸, 東海国立3大学新技術説明会(2011))とも一致していることから、本実験で得られた抗体はIgMの可能性が高いといえる。

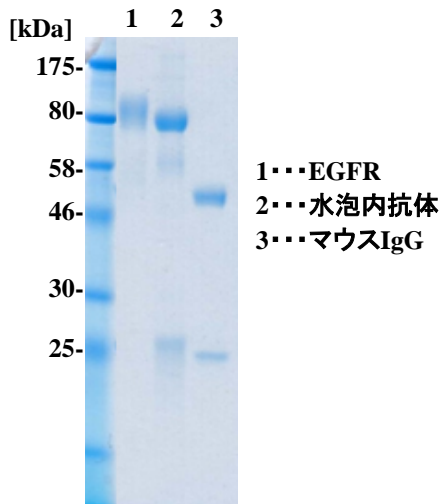


図3 水泡液からプロテインA精製した溶出画分のSDS-PAGE

続いて、精製したIgMを用いてELISA法に基づく検出系の確立を目指した。精製IgMを濃度を振って固定化後、HRP標識された抗コイ抗体とコントロールとしてHRP標識された抗ウサギ抗体を用いて検出を行った。結果、前者のみに発色がみられたため、抗コイ抗体を用いることでキンギョ抗体が検出可能であることが示された。

免疫に関しては、当該研究室で開発したがん治療人工抗体Ex3を可溶性のモデル抗原として、またヒト上皮増殖因子受容体(EGFR)を強制発現させたCHO細胞を、膜タンパク質を標的とした結晶化抗体を取得するためのモデル抗原としてそれぞれ用いて行った。一般的に行われているマウスを用いた免疫の際の抗原タンパク質量を参考にし、水泡内に直接注入し、1週間ごとにサンプリングと再免疫を繰り返して行った。前述の通り、サンプリングにより消失した水泡内リンパ液は次のサンプリング時までには、ほぼ回復がみられたため、リンパ液を採取し続けることが可能であることが示された。

続いて、リンパ液中の抗体活性を調べるために、フローサイトメトリーを行ったが、いずれのサンプルも明確な結合活性はみられなかった。これは用いた抗コイ抗体がフローサイトメトリーを適用としていないことが要因と考えられたため、上述のELISAでの検

出を試みた。より感度を上げるために、2種類の抗コイ抗体を用いたサンドウィッチELISA法による検出を行ったが、精製キンギョIgMも含めて明確な発色はみられなかった。用いた2種類の抗コイ抗体のエピトープがオーバーラップしていた可能性が考えられるため、上述のようにリンパ液の直接的な固定化による検出が有効と考えられる。

一方で、より簡便な検出法の確立を目指したドットブロッキングの検討と、そのモデル抗原として可溶性のEGFRを用いた免疫を行った。免疫はアジュバントとして、まず市販の合成コポリマー系アジュバントを用いて水泡内に同様に直接注入し、1週間ごとにサンプリングと再免疫を繰り返して行った。ドットブロッキングは、採取したリンパ液をニトロセルロース膜にブロッキングし、乾燥後、ヒスチジンタグが付加された可溶性のEGFRを添加後、さらにHRP標識された抗ヒスチジンタグ抗体を添加することで行った。結果、ポジティブコントロールとして用いた抗EGFR IgGのみ濃度に依存した発色がみられたため、ドットブロッキング自体は成功しているものの、免疫がされていない可能性が示唆された(図4)。

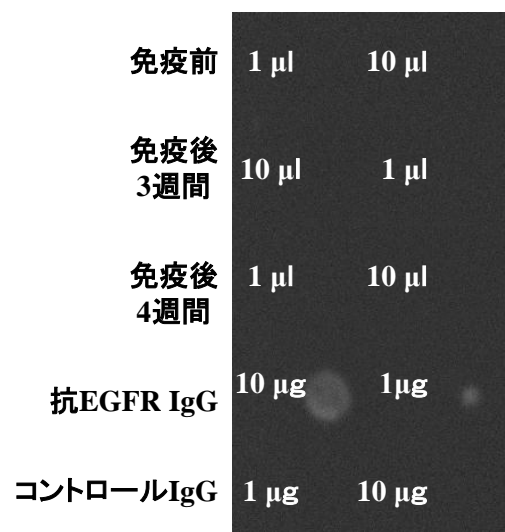


図4 水泡液内抗体のドットブロッキングを用いた検出検討

そこで、他のアジュバントとして、酵母抽出物やペプトンを含む培地を用い、さらにアジュバント効果を期待して、抗原タンパク質を精製せず、その発現ベクターで形質転換させた大腸菌の超音波破碎液を滅菌したもの利用も検討した。同様に免疫、サンプリングした結果、アジュバントとして培地を用いた際の9週目の水泡内にEGFRに対する抗抗体の陽性反応がみられた(図5)。諸条件はまだ検討する必要があるが、免疫後に特異的抗体が出現するのが比較的遅いという報告(田丸, 東海国立3大学新技術説明会(2011))とも一致しており、また酵母抽出液は汎用的に

用いている大腸菌用培地をそのまま利用可能であるという利点も有しているため、研究室でのより簡便なポリクローナル抗体調製法としての可能性を示すことができたといえる。

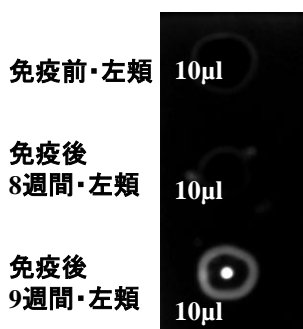


図5 アジュバントを用いた免疫後のドットプロット

一方、環境衛生の向上を副次的な効果として期待した動物実験における4つ目のRとしてのRecreation(娯楽)に関しては、学生等による自主的な飼育や観察がみられるなど、生命倫理を考えるツールの他、Refreshment(爽快)としての効果も得られた。

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5件)

1. Asano R., Nakayama M., Kawaguchi H., Kubota T., Nakanishi T., Umetsu M., Hayashi H., Katayose Y., Unno M., Kudo T., Kumagai I., Construction and humanization of a functional bispecific EGFR × CD16 diabody using a refolding system. *FEBS J.*, **279**(2), 223-233 (2012) 査読有, 10.1111/j.1742-4658.2011.08417.x
2. 浅野竜太郎, 熊谷 泉, 進化する抗体医薬. *リウマチ科*, **47**(6), 700-706 (2012), 査読無
3. Watanabe Y., Asano R., Arai K., Shimomura I., Ogata H., Kawaguchi H., Hayashi H., Ohtsuka H., Yoshida H., Katayose Y., Egawa S., Nakanishi T., Umetsu M., Yasui H., Ishida T., Imai K., Kudo T., Unno M., Kumagai I., In vitro and in vivo antitumor effects of recombinant bispecific antibodies based on humanized anti-EGFR antibody. *Oncol. Rep.*, **26**(4), 949-955 (2011) 査読有, 10.3892/or.2011.1382
4. 浅野竜太郎, 熊谷 泉, タンパク質工学を駆使した次世代抗体医薬の創製. *医工学治療*, **23**(3), 218-223 (2011), 査

読無

5. 浅野竜太郎, 熊谷 泉, 低分子抗体と抗体様スキマフォールドに基づく次世代抗体医薬の開発. *BIO INDUSTRY*, **28**(7), 22-27 (2011) 査読無

[学会発表] (計4件)

1. 浅野竜太郎, 瀧慎太郎, 生駒桂子, 梅津光央, 熊谷 泉, Detailed Analysis on an effective multimeric molecule of small recombinant bispecific antibody, 第64回日本生物工学会大会, 2012年12月14日, 福岡
2. 浅野竜太郎, 小山典明, 萩原康世, 鍼陽介, 古本祥三, 梅津光央, 熊谷 泉, Study on functionalization of anti-EGFR scFv multimers for cancer therapy, 第64回日本生物工学会大会, 2012年10月26日, 神戸
3. 細川勝洗, 浅野竜太郎, 瀧慎太郎, 梅津光央, 熊谷 泉, 低分子がん治療二重特異性抗体の機能の向上を目指した変異導入と機能評価, 生物工学会若手研究者の集い 夏のセミナー 2012, 2012年6月30日, 宮城
4. 浅野竜太郎, 古本祥三, 熊谷 泉, In vivo antitumor effect of anti-EGFR scFvs induced by multimerization, 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月5日, 名古屋

[図書] (計3件)

1. 浅野竜太郎, 熊谷 泉, 次世代医薬開発に向けた抗体工学の最前線, 137-143 (2012), シーエムシー出版
2. 浅野竜太郎, 熊谷 泉, 新機能抗体開発ハンドブック, 174-178 (2012), エヌ・ティー・エス
3. 浅野竜太郎, 熊谷 泉, 第III編 微生物を用いた製造 第5章 低分子治療抗体の開発. *バイオ医薬品製造の効率化と生産基材の開発*, 96-102 (2012), シーエムシー出版

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅野 竜太郎 (ASANO RYUTARO)
 東北大学・大学院工学研究科・准教授
 研究者番号: 80323103

(2) 研究分担者

梅津 光央 (UMETSU MITSUO)
 東北大学・大学院工学研究科・准教授
 研究者番号: 70333846