

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 5月 10日現在

機関番号：12602 研究種目：若手研究（B） 研究期間：2011～2012 課題番号：23790392 研究課題名（和文）ファージディスプレイ法を用いた病理標本上での予後因子検索 研究課題名（英文）Search for disease-specific factors on the pathological specimens using the phage display method. 研究代表者 阿部 晋也（ABE SHINYA） 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教 研究者番号：70596725

研究成果の概要（和文）：ファージディスプレイ法は、理論上はどのような抗原に対する抗体も単離できる、非常に画期的な手法である。しかし、この方法は病理組織学的手法には応用されていない。本研究では骨髄異形成症候群（MDS）症例の骨髄材料を用いて「抗疾患特異的抗体」を作製することを目的とした。MDSの骨髄標本にのみ結合できるファージ抗体を約3000クローン得ることができた。得られたクローンを混合してポリクローナルに使用することで、予後不良のMDS検体のみに染まる免疫染色法を構築することができた。今後は、疾患原因因子の同定を行う。

研究成果の概要（英文）：Phage display technology is a powerful method for the selection of monoclonal antibodies against a given antigen. In the present study, we created disease-specific antibody by using a material marrow myelodysplastic syndrome (MDS) patients to "anti-disease specific antibody". Results of the study, it was possible to obtain about 3000 phage antibody clones capable of binding only to MDS bone marrow specimens. By using the polyclonal by mixing the clones obtained, it was possible to build immunostaining dyed only MDS samples poor prognosis. In the future, we will carry out the identification of disease-causing factor.

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	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：人体病理

科研費の分科・細目：若手研究（B）

キーワード：ファージディスプレイ、抗体療法

1. 研究開始当初の背景

ファージディスプレイ法は、一本鎖を表面に提示するファージをライブラリ化したもの

であり、理論上はどのような抗原に対する抗体も単離できる、非常に画期的な手法である。しかし、この方法は病理組織学的手法には積

極的に応用されていない。一般的には特異的ファージ抗体の選択は精製されたタンパクやペプチドが用いられる。この方法においては、目的の抗原に対する抗体を確実に得ることが可能である。そこで、本研究では病理切片などの病態が可視化できる人体材料を抗原としてファージ抗体の選択を行うことで疾患特異的に結合する「抗疾患特異的抗体」を作製することが可能ではないかと考えられた。さらにこの抗体をモノクローンにし、結合する抗原を同定することで疾患関連分子、予後因子の検索が可能になると考えられる。さらに得られた抗体が、細胞表面抗原などであった場合、そのまま抗体医薬化できる可能性もある。

2. 研究の目的

ファージディスプレイ法は、主に抗体医薬開発に大きく貢献している。しかし、病理組織学的手法には積極的に応用されていない。そこで、本研究では、病態が可視化できる病理標本上のパラフィン切片上の抗原を標的としたファージディスプレイ法を用いることによって、疾患における予後決定に関わる分子のみに結合するファージ抗体を作製する。サンプルとしては、本研究室でこれまで様々な病態解析が行われてきた骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndrome: MDS)の骨髄病理標本を用いる。この予後不良の MDS サンプルのみに結合するファージ抗体を選別し、さらにこのファージ抗体が認識する抗原を同定することで MDS における予後因子の検索も行う。

3. 研究の方法

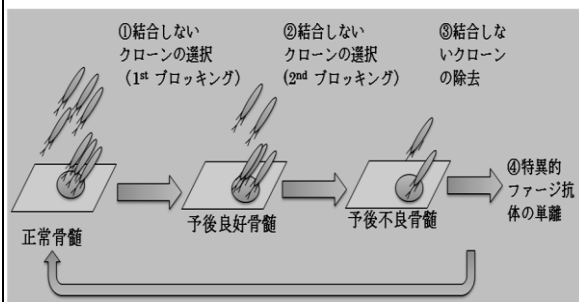
(1) 検体の選択

東京医科歯科大学附属病院にて採取された MDS 骨髄検体、対象として腫瘍の存在し

ない正常骨髄検体の凍結標本または、パラフィン包埋切片を用いる。MDS においては初診時の芽球比率(RA、RCMD か、RAEB1/2 か)、経過中の白血球化の有無、骨髄不全の有無などをパラメーターとして、予後良好、不良を大別する。

(2) 病理標本上でのファージ選択 (バイオパンニング)

スライドガラス上の組織切片を抗原として、ファージの選択・精製を行う。まず正常骨髄のティシューマイクロアレイにファージライブラリを反応させ、結合しないクローンのみを選択し (1st ブロッキング) これを大腸菌 TG1 に感染させ、選択したファージのみを増殖させる。次に得られたクローンを予後良好骨髄のティシューマイクロアレイと反応させ、同様に結合しないクローンを回収し (2nd ブロッキング)、同様の作業を行って、選択したファージを増やす。さらにこれを予後不良の骨髄と反応させ、ここでは予後不良骨髄のティシューマイクロアレイと結合するクローンのみを回収する。この工程を 2~3 回繰り返す。



(3) MALDI-TOF/TOF 質量分析システムも用いたプロテオーム解析

各種細胞株より得られた cell lysate と単クローン化ファージ抗体を反応させ、免疫沈降法を用いてファージ抗体に結合してくるタンパク抽出する。このタンパクを SDS-PAGE で分離し、CBB 染色を行ってタンパクの分子

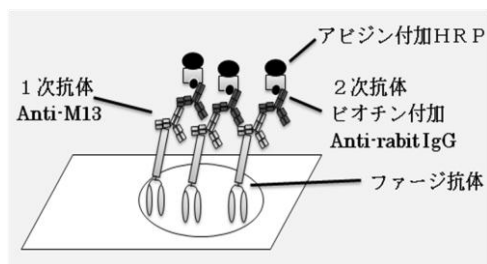
量を確認する。さらに、得られたバンド部分のポリアクリルアミドゲルを切り出し、ゲル内消化してペプチド化したものを、MALDI-TOF/TOF 法を用いて質量分析を行う。

4. 研究成果

(1) 上記の方法でバイオパンニングを行い、まず正常骨髄のティシューマイクロアレイにファージライブラリを反応させ、結合しないクローンのみを選択した。その結果ほとんど正常骨髄に反応しないファージライブラリの作製に成功した。

(2) 次に選択したファージのみを増殖させる。得られたクローンを予後良好骨髄のティシューマイクロアレイと反応させ、同様に結合しないクローンを回収し(2nd ブロッキング)、同様の作業を行って、選択したファージを増やし、さらにこれを予後不良の骨髄と反応させ、ここでは予後不良骨髄のティシューマイクロアレイと結合するクローンのみを回収した。この工程を5回繰り返すことで、予後不良の骨髄標本にのみ結合できるファージ抗体を約3000クローン得ることができた。

(3) この得られたファージ抗体を混合した状態で、免疫組織化学染色を試行した。ファージ抗体を反応させた切片に、ファージ抗体のコードタンパクを認識するウサギM13抗体を反応させ、さらにABC法を用いて発色



させる。これにより、予後不良のMDS検体のみに染まる免疫染色法を構築することができた。

(4) 次にこの予後不良のMDSにのみ結合するファージ抗体を単クローン化した。得られたクローンが3000クローンと膨大なため、その一部のみを対象として質量分析をおこなった。選択したファージ抗体を各種細胞株より得られたcell lysateと単クローン化ファージ抗体を反応させ、免疫沈降法を用いてファージ抗体に結合してくるタンパク抽出した。このタンパクをSDS-PAGEで分離し、CBB染色を行ってタンパクの分子量を確認し、得られたバンド部分のポリアクリルアミドゲルを切り出し、ゲル内消化してペプチド化したものを、MALDI-TOF/TOF法を用いて質量分析を行なった。分析の結果、得られたタンパクは一般的に組織に発現するタンパクが中心で、疾患特異的な分子とは言えない分子のみが同定されてしまった。

(5) 以上の結果より、「予後不良MDS特異的抗体」の作製には成功した。しかし、得られたファージ抗体のクローン数が膨大であったため、疾患特異的分子の同定までには至らなかった。しかし、本研究期間に解析したクローンはわずかであり、今後根気強く解析を続けることで疾患特異的分子の同定が可能になることが考えられた。また、病理標本を用いたバイオパンニングの方法などを改変することによって、さらに方法を改善することも重要である。今後は、MDSにおける疾患特異的分子の再検索ならびに、他疾患においても、このファージディスプレイ法を用いた、疾患特異的抗体の開発に向けて研究を進める予定である。

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8件)

(1) Miwa Y, Tomohito H, Suzuki S, Abe S, Onishi I, Kirimura S, Kitagawa M, Kurata M: Up-regulated expression of CXCL12 in spleens with extramedullary hematopoiesis. Pathology 2013; in press.

(2) Shimada M, Abe S, Takahashi T, Shiozaki K, Okuda M, Mizukami H, Klinman DM, Ozawa K, Okuda K: Prophylaxis and treatment of Alzheimer's disease by delivery of an adeno associated virus encoding a monoclonal antibody targeting the amyloid beta protein. Plos one 2013; 8(3): e57606.

(3) Yagi K, Yamamoto K, Umeda S, Abe S, Suzuki S, Onishi I, Kirimura S, Fukayama M, Arai A, Kitagawa M, Kurata M: Expression of *multidrug resistance 1* gene in B-cell lymphomas: association with follicular dendritic cells. Histopathology 2013; 62(3): 414-20

(4) Abe S, Kurata M, Suzuki S, Yamamoto K, Aisaki K, Kanno J, Kitagawa M: Minichromosome Maintenance 2 Bound with Retroviral Gp70 Is Localized to Cytoplasm and Enhances DNA-Damage-Induced Apoptosis. PLoS One 2012; 7(6): e40129.

(5) Suzuki S, Kurata M, Abe S, Miyazawa R, Murayama T, Hidaka M, Yamamoto K,

Kitagawa M: Overexpression of MCM2 in myelodysplastic syndromes: Association with bone marrow cell apoptosis and peripheral cytopenia. Experimental and Molecular Pathology 2012; 92: 160-166

(その他3件)

[学会発表] (計5件)

(1) Shinya Abe, Morito Kurata, Shiho Suzuki, Masanobu Kitagawa: Minichromosome Maintenance 2 Bound with Retroviral Gp70 Is Localized to Cytoplasm and Enhances DNA-Damage-Induced Apoptosis. 第35回日本分子生物学会総会; 2012. 福岡.

(2) 阿部晋也、倉田盛人、鈴木志保、日高龍路、名桐俊也、北川昌伸: MCM2 Enhances DNA-damage-induced Apoptosis in Association with Cytoplasmic Localization. 第71回日本癌学会総会; 2012. 札幌.

(3) 阿部晋也、倉田盛人、鈴木志保、日高龍路、名桐俊也、北川昌伸: DNA 損傷誘発アポトーシス増強における MCM2 の機能解析. 第101回日本病理学会総会; 2012. 東京

(4) 阿部晋也、倉田盛人、鈴木志保、日高龍路、名桐俊也、北川昌伸: DNA 損傷誘発アポトーシス増強における MCM2 の機能解析. 第101回日本病理学会総会; 2012. 東京

(その他1件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/med/pth2/pth2-J.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 晋也 (ABE SHINYA)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：70596725

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

北川 昌伸 (KITAGAWA MASANOBU)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10177834