

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590139

研究課題名(和文)抗体の交差反応性を利用する新しい医薬リード探索法の開発

研究課題名(英文)New approach to discover the medicinal seeds using the cross-reactivity of monoclonal antibody

研究代表者

宮本 智文(Miyamoto, Tomofumi)

九州大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40182050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：交差反応性とはある抗原の免疫により得られた抗体が、別の抗原とも結合反応を示す現象である。ファーマコファーをモノクローナル抗体(MAb)の抗原認識部位に想定し、交差反応性を逆に利用してELISAへ応用することで、抗原と類似した構造を持つ新規化合物の探索が可能となると考えた。そこで本研究では標的化合物をmorphineとし、海洋生物よりmorphine様の反応性を示す新規化合物の探索を目的としてanti-morphine MAbの作製を行った。更に作製したanti-morphine MAbの交差反応性を利用したELISAを確立し、実際にmorphine様化合物の探索を行った。

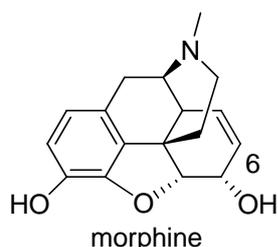
研究成果の概要(英文)：Cross-reactivity is the reaction against a different but similar antigen. We hypothesises that the recognition site of antibody is equivalent to the receptor domain, and utilizing the cross-reactivity, it makes possible to discover the new structures which possess the equivalent of pharmacophar as a small molecule antigen. We developed the new approach for natural product drug discovery utilizing the cross-reactivity of anti-morphine monoclonal antibody (MAb).

研究分野：天然物化学

キーワード：monoclonal antimody cross-reactivity ELISA morphine polyacetylene papuamine haliclonadi amine

## 1. 研究開始当初の背景

近年、製薬業界においてインシリコスクリーニングが創薬基盤技術の中心となりつつある。インシリコスクリーニングによる化合物の分子設計においてはファーマコファアと呼ばれる部分が重要となる。一方、交差反応性とはある抗原の免疫により得られた抗体が、別の抗原とも結合反応を示す現象である。ここで、ファーマコファアをモノクローナル抗体(MAb)の抗原認識部位に想定し、交差反応性を逆に利用してELISAへ応用することで、抗原と類似した構造を持つ新規化合物の探索が可能となると考えた。そこで本研究では標的化合物を morphine とし、海洋生物より morphine 様の反応性を示す新規化合物の探索を目的として anti-morphine MAb の作製を行った。更に作製した anti-morphine MAb の交差反応性を利用したELISAを確立し、実際に morphine 様化合物の探索を行った。



## 2. 研究の目的

交差反応性はある抗原の免疫により得られた抗体が別の抗原とも結合反応を示す現象である。これは両抗原構造が非常に類似しているために起きる抗体活性の縮退と理解されている。近年、低分子化合物も BSA などのタンパク質にコンジュゲートし免疫原性を高めることで抗体の作成が可能となり、ELISA を利用した品質評価に利用されている。申請者は抗体の交差反応性を利用することで、抗原として用いた低分子化合物と同等のファーマコファアを占有する新しい化合物の発見が可能と考え、抗原にモルヒネを用い、抗モルヒネ抗体に対する交差反応を指標に化合物を探索する、新しい Structure-based Drug Screening 法の開発を計画した。

## 3. 研究の方法

モルヒネ6位のアリルコールにコハク酸をスペーサーに調製した BSA コンジュゲート (M6S-BSA) を免疫源に Anti-MorMAb を作成する。M6S-BSA をイムノプレートに固定化し、モルヒネ類似化合物と Anti-MorMAb との競合的 ELISA を確立し、研究室保有の海洋無脊椎動物二次代謝産物抽出エキスを対照にモルヒネ類似化合物のスクリーニングを行う。Anti-MorMAb に交差反応性の認められた抽出エキスより活性を指標にモルヒネ類似化合物を分離、精製し、各種スペクトルデータの解析により化学構造を決定する。単離構造決定したモルヒネ類似化合物についてオピオイド受容体に対するバインディング

グアッセイを行う。

## 4. 研究成果

### 1. Anti-morphine MAb の作製

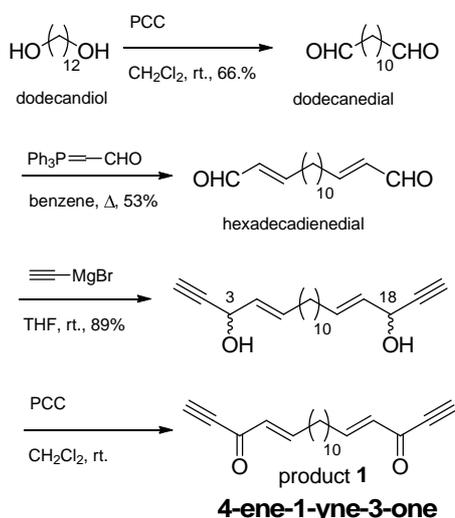
文献に従い morphine-6-hemisuccinate (M-6-S) を合成し、1) 次に BSA との複合体を作製した。この複合体を用い MAb 作製法に則り、2) 目的の MAb を産生しているハイブリドーマクローン 2G1-H4 を選出した。このクローンをを用いて anti-morphine MAb の精製を行い anti-morphine MAb を 80.7 mg 得た。この MAb の isotype は  $\lambda$  light chain を有する IgG1 subclass に属していることが判明した。競合的 ELISA に用いる適正濃度は 0.11  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、その際 positive control として用いる Morphine の濃度は 0.22  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と決定した。Morphine に対する M-6-S の交差反応性は 290% と判明した。Anti-morphine MAb の結合定数は  $4.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  と決定した。わずかながら Met-enkephalin とも反応した。更に anti-morphine MAb の POD 標識を行い、適正濃度を 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と決定した。また、anti-morphine MAb の再作製を現在行っており、Morphine と Naloxone に反応する抗体を産生するハイブリドーマが確認されている。

### 2. Anti-morphine MAb を用いた ELISA による海洋無脊椎動物由来 Morphine 様化合物の探索

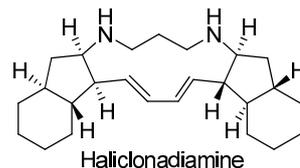
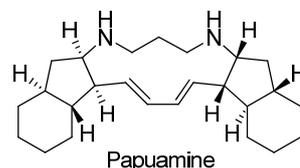
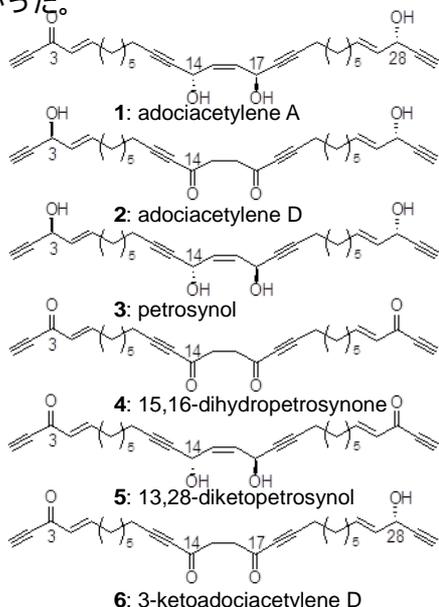
2009 年沖縄県八重山諸島にて採集した 95 種類の海洋無脊椎動物についてそれぞれ EtOH エキスを調製し、anti-morphine MAb の交差反応性を利用した競合的 ELISA を行い、Morphine 様化合物含有エキスのスクリーニングを行った。交差反応性を確認した 14 種類の試料について Et<sub>2</sub>O, BuOH で順次分配し再度交差反応性を確認したところ、*Petrosia* sp. に属する 3 つの海綿の Et<sub>2</sub>O ext. に交差反応性が確認された。これら 3 つのエキスについて活性を指標に各種カラムクロマトグラフィーを行い、compound 1-6 を単離した。各種スペクトルデータの解析により、1-6 を図に示すポリアセチレンと同定した。Compound 2 は詳細に検討すると (3*S*, 28*S*) 体 (2a)、*meso* 体 (2b)、(3*R*, 28*R*) 体 (2c) が存在した。Compound 2b, 2c, 6 は新規化合物であった。また、海綿 *Haliclona* sp. から活性化合物として環状アルカロイドである Papuamine および Haliclonadamine を単離した。

### 3. 単離化合物の活性に関する詳細な検討

ポリアセチレン類の活性については、市販の octandiol, nonenal を出発原料として、PCC 酸化、Grignard 反応により、各種ポリアセチレン関連化合物を合成し、構造活性相関を検討したところ、活性部位は末端の "4-ene-1-yne-3-one" ユニットであり、活性化合物は固相抗原に結合して抗原-抗体反応を阻害していることが各種合成誘導体の調製により明らかとなった。特に、分子両末端に "4-ene-1-yne-3-one" ユニットの有する product 1 は天然物の内、最も強い活性を示した compound 4 と同等の活性を示した。



また、Morphine と compound 1 の結合を  $^1\text{H-NMR}$  にて確認したところ、3 級窒素から二重結合付近に結合していることが示唆された。また、Papuanamine および Haliclonadamine については、ELISA において morphine と競合することが示唆された。両化合物はオピオイド受容体においても morphine と競合し、アゴニスト、アンタゴニスト活性を有することが期待される。外部委託によりオピオイド受容体バインディングアッセイを行う予定であったが、新たに採取した海綿より充分量の試料が得られなかったため、アッセイを行えなかった。そこで、分子ドッキングシミュレーション (Schrodinger suite) により、上記アルカロイドとオピオイド  $\mu$  受容体のドッキングシミュレーションを行った。PDB:4DKL および 3T6B のタンパク質構造を用い、リガンド構造の最適化と化合物の重ね合わせ、複合体の構造最適化が現在進行中である。なお、採取した海綿からアルカロイドは単離できなかったが、新規なポリアセチレン系化合物の単離、構造解析に成功した。しかし、これらの新規化合物にモルヒネに対する親和性は確認できなかった。



## 5. 研究の総括

- 本研究では抗体の交差反応性を利用して類似化合物をスクリーニングすることを目的としているため、比較的選択的認識が緩やかな MAb の方が類似化合物を多く認識しやすいと考えられる。スクリーニングへの応用が可能な選択性の最小限界値は、今後検討すべき課題の一つである。Morphine、Naloxone の両者に反応する抗体は、免疫原である M-6-S-BSA のうち特に BSA および succinic acid から離れた部分(3 級窒素やフェノール性水酸基など)を認識していると考えられる。この性質は本研究の目的に合致しており、今後 MAb を単離したのち交差反応性を利用した ELISA に適用することで海洋生物由来の Morphine 様化合物の探索研究に大きく寄与することができると考えられる。
- 今回得られた活性 polyacetylene 類は固相抗原に結合することで MAb の結合を阻害していることが明らかとなったが、この結果よりこれら活性 polyacetylene 類は固相抗原上の Morphine 部分に結合することで抗原 抗体反応を阻害していると推測される。Morphine と直接結合する特徴を持つ低分子化合物は非常に珍しく、今後更なる研究を行うことで Morphine の検出や Morphine 中毒の治療などに応用できる可能性があり、大変興味深い結果と考えられる。

## 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2件)

- T. Shirouzu, K. Watari, M. Ono, K. Koizumi, I. Saiki, C. Tanaka, R. W. M. van Soest, T. Miyamoto\*, Structure, Synthesis, and Biological Activity of a C-20 Bisacetylenic Alcohol from a Marine Sponge Callispongia sp., 2013, J. Nat. Prod., 76, 1337-1342.
- A. F. Gabriel, Z. Li, R. Kusuda, C. Tanaka, T. Miyamoto\*, Six new polyacetylenic alcohols from the marine sponges Petrosia sp. and Halichondria sp. 2015, Chem. Pharm. Bull., 63, 469-475.

〔学会発表〕(計5件)

- 1) 宮本智文, 海綿由来のビスアセチレンアルコールのユニークな生物活性, 第15回マリンバイオテクノロジー学会, 平成25年6月2日(沖縄)招待講演
- 2) 菰方 浩人, 田中 宏幸, 田中 千晶, 宮本智文, VAN SOEST Rob W. M., 抗体の交差反応性を利用した新規医薬シーズ探索法の開発, 日本薬学会 第132年会, 2012.03.31 (学生優秀発表賞受賞)
- 3) 田中千晶, 菰方浩人, 田中宏幸, 宮本智文, 抗体の交差反応性を利用した新規医薬シーズ探索法の開発(2), 日本薬学会第132年会, 2012.03.30
- 4) Chiaki Tanaka, Hiroto Komokata, Hiroyuki Tanaka, and Tomofumi Miyamoto, New approach for natural product drug discovery based on the cross-reactivity of antibody, U.S.-Japan Seminar on Marine Natural Products, 2011.12.13
- 5) Tomofumi Miyamoto and Chiaki Tanaka, New Biological Functions of Polyacetylenic Compounds from Marine Sponges, U.S.-Japan Seminar on Marine Natural Products, 2011.12.11, 国際招待講演

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
HTTP://npchem.phar.kyushu-u.ac.jp  
6. 研究組織  
(1) 研究代表者

宮本智文(九州大学・薬学研究院・准教授)

研究者番号：40182050

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：