

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790568

研究課題名(和文) 抗メタタイプ抗体の効率的創製を機軸とする低分子バイオマーカー超高感度測定法の開発

研究課題名(英文) Development of a highly sensitive monitoring method for small biomarker molecules based on efficient preparation of anti-metatype antibodies

研究代表者

大山 浩之(Oyama, Hiroyuki)

神戸薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：80572966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：血中や尿に含まれる低分子化合物(ハプテン)は病態診断の有用なバイオマーカーとなるが、その高感度測定は容易ではない。抗原抗体複合体を認識する抗メタタイプ抗体はハプテンのサンドイッチ型非競合型免疫アッセイへの応用を可能にするが、従来の免疫法での産生は難しい。本研究では人工ミニ抗体である一本鎖Fvフラグメント(scFv)を標的ハプテンのアクセプター分子として着目した。また、scFvの他に単ドメイン抗体やアプターを用いた抗メタタイプ抗体フラグメントの創製も検討した。

研究成果の概要(英文)：There are various small molecules (haptens) in blood or urine which are useful as biomarker for clinical diagnosis. However, conventional immunoassays are not always applicable for sensitive determination of such haptens due to insufficient affinity of anti-hapten antibodies. Anti-metatype antibodies, which bind specifically to antigen-antibody complex, have been applied for sandwich-type noncompetitive immunoassays. However, the traditionally protocol of immunization cannot easily generate the anti-metatype antibodies. In this study, we have selected scFvs (single-chain Fv fragments) as acceptor molecules for a target hapten to generate suitable complexes to induce anti-metatype antibodies. We have also investigated utility of the other acceptor: for example, sdAbs (single-domain antibodies) and aptamers.

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：臨床化学 抗体工学

### 1. 研究開始当初の背景

抗原抗体反応を用いる分析法は、簡便で多検体の処理に優れるため臨床化学・臨床検査医学分野で重要な役割を果たす。とくにサンドイッチ法は異なる2種類の抗体を用いることで感度・特異性ともに高く、抗体アレイ法などにも用いられる。しかし、低分子化合物(ハプテン)への適用はその分子サイズゆえに原理的に困難であることから競合法での測定に依存しており、その感度にも限界があった。

### 2. 研究の目的

抗原抗体複合体を認識する抗体である抗メタタイプ抗体はハプテンのスンドイッチ型免疫測定法を可能にするキーマテリアルとして注目され、これを用いることで図1に示すアッセイ系の構築が可能になる。しかし、IgG型抗体とハプテンの複合体を形成させて、免疫賦活剤(アジュバント)と共に実験動物に投与する従来の免疫法では成功率は極めて低い。これはIgGの分子量が大きいこと、ハプテンとの複合体形成に伴う構造変化が小さいこと、動物体内で免疫系に認識される以前に複合体が解離することが原因と考えられた。

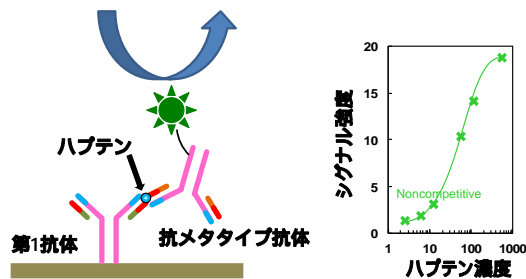


図1. 抗メタタイプ抗体を活用するハプテンのスンドイッチアッセイの概略

抗メタタイプ抗体の創製にはハプテンの結合前後による構造変化が期待でき、なおかつ抗体と同等以上の結合力を有するアクセプター分子である必要がある。また、免疫によって生じる副産物も最小限に低減しなければならない。scFvは抗体可変部(V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>)をリンカーで連結した人工ミニ抗体

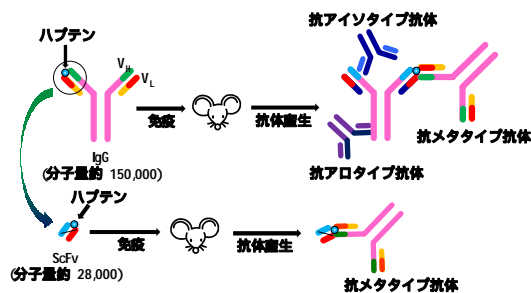


図2. 抗メタタイプ抗体産生の戦略

で、元のIgG抗体と比較しても遜色のない機能を発揮し、分子量も約28,000と小さい。

そのため1分子内でのパラトープが占める割合が大きく、IgG型抗体を免疫すると副生する抗アロタイプ抗体や抗アイソタイプ抗体なども抑えられると期待できる(図2)。

以上の観点からコチニン(CT)およびジゴキシン(Dig)を標的ハプテンとするscFvを調製し、抗メタタイプ抗体産生のアクセプターとしての有用性を検討した。

本法で目的の抗メタタイプ抗体の産生が困難である場合の打開策として、scFvよりもさらに小さく(分子量約15,000)、抗体の最小機能単位である単ドメイン抗体(sdAb)に着目し(図3)、ランダム変異を導入した変異sdAbライブラリーを構築し、アクセプター分子として有用な変異sdAbの選択を試みた。

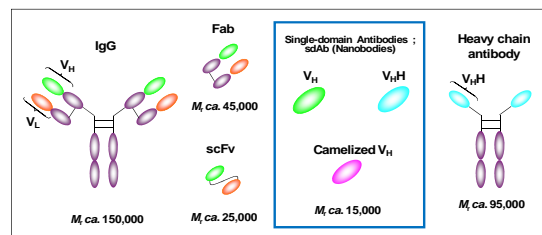


図3. IgGまたはscFvの構造と単ドメイン抗体(sdAb)の比較

さらに、上述のsdAbよりもハプテンとの結合前後で立体構造の顕著な変化が期待できる機能性核酸であるアプタマー(Apt)を新規なアクセプター分子としてとりあげ、ハプテン-Apt複合体を認識する抗メタタイプ抗体フラグメントの創製も試みた。

### 3. 研究の方法

(1) 野生型抗CTおよび抗Dig一本鎖Fvフラグメントの調製およびこれらをアクセプターとする抗メタタイプ抗体の産生

先にクローニングしたマウス抗CT抗体または抗Dig抗体由来のH鎖およびL鎖の可変部を連結した一本鎖Fvフラグメント(scFv)の遺伝子が組み込まれた大腸菌XL1-Blueをそれぞれ培養して、目的のscFvをペリプラズム抽出物として調製した。これらをscFvのC末端に付加したFLAGタグを利用して、抗FLAG抗体固定化アガロースゲルを用いてアフィニティー精製したのちアクセプターとして用いた。免疫は一定量のscFvに対して、対応するハプテン(CTまたはDig)を過剰量加えて反応させたのち、BALB/cマウスに隔週で皮下投与して行った。免疫を3回繰り返したのち、免疫マウスから採血した血清についてELISAで抗メタタイプ活性を調べた。

すなわち、抗マウス抗体をマイクロプレートに固定化したのち、マウス血清を加えて反応させた。プレートを洗浄後、ここへ、予め

別のプレートでCTまたはDig (1,000 ng) の存在下あるいは非存在下に対応する scFv (100 ng) を反応させた溶液を添加した。次いで、ウサギ抗FLAG抗体、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ抗体を順次加えて、検出した。

#### (2) 変異単ドメイン抗体ライブラリーの調製およびCT結合能を示す変異体の探索

先に当研究室では抗エストロジオール-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>) 抗体のV<sub>H</sub>ドメインをラクダ化したsdAbを調製している。本sdAb遺伝子のうち、抗原との結合に最も寄与するとされる相補性決定部(CDR)H3をターゲットにしてランダム変異を導入した変異sdAbライブラリーを構築し、様々な標的ハプテンと相互作用しうると多様性の創出を企てた。

まず、目的とするランダム変異が導入されたプライマーを用いてPCRを行い、変異遺伝子断片群を増幅した。これらを overlap extension PCR により連結し、得られた変異sdAb 遺伝子ライブラリーを発現ベクターに組み込んだのち、大腸菌に導入した。続いて、本ライブラリーをファージ提示し、CT に結合能を示すクローンの選択を試みた。すなわち、CT-ウシ血清アルブミン (BSA) を固定化した試験管にファージライブラリーを反応させたのち、未反応のファージを洗浄除去し、遊離のCTを加えて結合ファージを競合的に溶出した。得られたファージを大腸菌に感染させて、増幅し、次の選択操作に用いた。このサイクル(パンニング)を3回繰り返したのちモノクローナルファージを調製しELISAによりクローン分析を行った。

#### (3) 抗メタタイプ活性を示す変異単ドメイン抗体の探索

酵素の基質結合部位を認識するsdAbの創製が報告されている。上述(2)の研究で用いた変異sdAbライブラリーについても抗体可変部を認識する変異体の存在が期待される。そこで、抗原抗体複合体に結合するsdAbの選択を試みた。モデルハプテンとしてコルチゾール(CS)をとりあげた。

まず、抗CS抗体を固定化した試験管にファージ提示したライブラリーを添加した。未反応のファージを洗浄除去したのち、遊離のCSを反応させた。一定時間インキュベート後、上清を回収し、大腸菌に感染させた。このサイクル(パンニング)を3回繰り返して得られたポリクローナルファージのCS結合能をELISAにより調べた。抗CS抗体を固定化したプレートをブロッキングしたのち、調製したファージおよび遊離のCSを加えた。続いて、未反応のファージを洗浄除去したのち、ペルオキシダーゼ標識抗ファージ抗体を反応させた。同様に洗浄したのち、発色基質を用いて酵素反応を行い、吸光度を測定した。

#### (4) アプタマーを用いる抗メタタイプ抗体産生の試み

E<sub>2</sub>に結合能を示すビオチン標識Aptを既報に従って設計し、調製した。続いて、一定量のAptと過剰量のE<sub>2</sub>を反応させたのち、反応液に変異scFv提示ファージライブラリーを加えて一定時間インキュベートした。これら3者複合体をアビジン固定化試験管に添加したのち、未反応のファージを洗浄除去した。次いで、固相に捕捉したファージを回収し大腸菌に感染して増幅した。このサイクルを3回繰り返して得られた感染菌からモノクローナルファージを調製し、ELISAで抗メタタイプ活性を調べた。

アビジン固定化マイクロプレートへビオチン標識AptとE<sub>2</sub>の反応液を加えたのち、プレートを洗浄後、scFv提示モノクローナルファージを反応させた。一定時間インキュベート後、同様に洗浄して、ペルオキシダーゼ標識抗ファージ抗体を添加し、酵素反応を行って吸光度を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 野生型抗CTおよび抗Dig一本鎖Fvフラグメントの調製およびこれらをアクセプターとする抗メタタイプ抗体の産生

CTおよび抗CT scFvの反応液を免疫したマウス6匹のうち、採血量が多かったマウスの血清をELISAで調べたところ、CT存在下で非存在下に比べ顕著なシグナルの増大は認められなかった(図4)。Digと抗Dig scFvの実験系についても期待していた抗メタタイプ活性を示す免疫マウスは得られなかった。

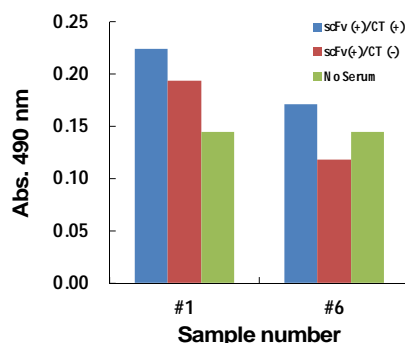


図4. 免疫マウスの血清を用いるELISAの抗メタタイプ活性の評価

CTでは、用いた野生型scFvのCTに対する親和力が十分ではなく、マウスの生体内で解離したことが原因ではないかと推測した。そこで、抗CT scFvの親和力を向上させる *in vitro* affinity maturationを試みたが、改良型scFvの創製に予想以上の時間を要してしまい、これを精製して免疫に用いる実験は期間内に着手できなかった。今後、より強固に結合した複合体を免疫投与することで抗メタタイプ抗体の産生の可否について期待がもたれる。

##### (2) 変異単ドメイン抗体ライブラリーの調

### 製およびCT結合能を示す変異体の探索

パンニングを経て得られたモノクローナルファージ 19 種について ELISA による CT 結合能を調べたところ、10 種が良好なシグナルを示した (図 5A)。続いて、このうち 3 種のクローンで弱いながらも遊離の CT による競合反応が認められた (図 5B)。今後、得られたファージクローンから sdAb を可溶性タンパク質として調製し、目的のアクセプターとして機能すれば抗メタタイプ抗体産生への応用が可能であると考えられる。

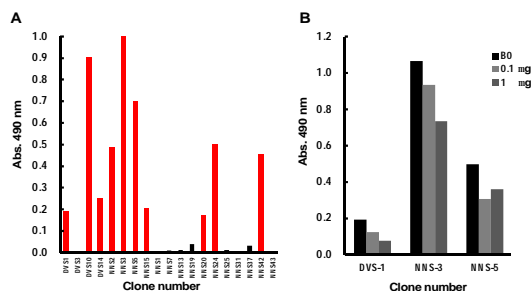


図 5. ELISA による sdAb 提示ファージの CT 結合能

### (3) 抗メタタイプ活性を示す変異単ドメイン抗体の探索

パンニングを繰り返して得られたポリクローナル sdAb 提示ファージを用いる ELISA では、抗 CS 抗体固定化プレートに対して CS の用量依存的 (100~10,000 ng) なシグナルの増大が認められ (図 6)、抗メタタイプ様の結合活性を示すクローンの存在が示唆された。現在、本感染菌をクローン分離し、目的の変異体をスクリーニングしており、他の抗原抗体複合体でも同様の成果が得られるか興味を持たれる。

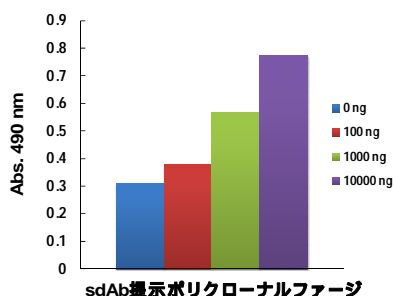


図 6. 得られたポリクローナルファージを用いる ELISA の用量作用曲線

### (4) アプタマーを用いる抗メタタイプ抗体産生の試み

計 96 種のモノクローナルファージを調製し、ELISA に付したところ、10 種について良好なシグナルが得られた (図 7)。このうち、クローン #10-18 は  $E_2$  存在下のシグナルが非存在下に比べ 2.3 倍 (バックグラウンドを差し引いた場合) であった。本クローンは弱いながらもアプタマーと  $E_2$  の複合体を認識する抗メタタイプ様の活性をもつことが示唆された。

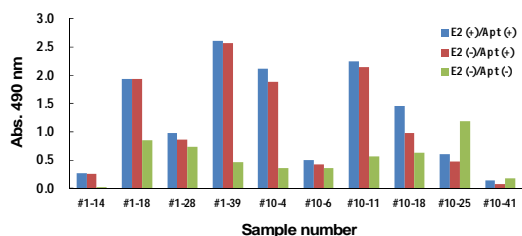


図 7. 得られたモノクローナルファージの  $E_2$  存在下または非存在下におけるアプタマーとの結合能の評価

### 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)

Oyama H., Yamaguchi S., Nakata T., Niwa T., Kobayashi N., “Breeding” diagnostic antibodies for higher assay performance a 250-fold affinity-matured antibody mutant targeting a small biomarker., *Analytical Chemistry*, 85, 4930-4937 (2013) (査読有).

Oyama H., Tanaka E., Kawanaka T., Morita I., Niwa T., Kobayashi N., Anti-idiotype scFv-enzyme fusion proteins: A clonable analyte-mimicking probe for standardized immunoassays targeting small biomarkers., *Analytical Chemistry*, 85, 11553-11559 (2013) (査読有).

[学会発表](計 12 件)

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, 盛岡, 2012 年 9 月 7 日.

大山浩之, 中田茂利, 丹羽俊文, 小林典裕: “実用診断試薬を創出する試験管内分子進化 (5). 改良型 scFv を用いるヒト血清中エストラジオールの測定” 日本薬学会第 133 年会, 横浜, 2013 年 3 月 28 日.

森田いずみ, 大山浩之, 渡部芳郎, 平井杏奈, 太田光熙, 小林典裕: “実用診断試薬を創出する試験管内分子進化 (6). 改良型 scFv を用いるヒト尿中コチニン ELISA の確立” 日本薬学会第 133 年会, 横浜, 2013 年 3 月 28 日.

大山浩之, 森田いずみ, 太田光熙, 小林典裕: “試験管内親和性成熟 scFv を用いるヒト尿中コチニンの ELISA” 生物化学的測定研究会 第 18 回学術集会・総会, 京都, 2013 年 6 月 7 日.

大山浩之, 三宅沙也香, 森内彩香, 秋定辰紀, 小林典裕: “高親和力 scFv 融合タンパク質を用いるコルチゾールの高感度 ELISA”

第 53 回日本臨床化学会年次学術集会, 徳島,  
2013 年 8 月 30 日.

Hiroyuki Oyama, Toshifumi Niwa, Norihiro Kobayashi: “ Breeding ” diagnostic antibodies: A 250-fold affinity-matured scFv mutant for measuring human serum estradiol-17 $\beta$ , Fifth Annual PEGS EUROPE Protein & Antibody Engineering Summit, 4-8, November, 2013, Lisbon, Portugal.

Izumi Morita, Hiroyuki Oyama, Erika Banzono, Mitsuhiro Ohta, Norihiro Kobayashi: “ Breeding ” diagnostic antibodies: An affinity-matured scFv for urinary cotinine ELISA to monitor tobacco smoke exposure, Fifth Annual PEGS EUROPE Protein & Antibody Engineering Summit, 4-8, November, 2013, Lisbon, Portugal.

Norihiro Kobayashi, Hiroyuki Oyama, Izumi Morita, Toshifumi Niwa,: Anti-idiotypic scFv-enzyme fusion proteins work as a clonable analyte-mimicking probe that enables standardization of hapten immunoassays, Fifth Annual PEGS EUROPE Protein & Antibody Engineering Summit, 4-8, November, 2013, Lisbon, Portugal.

大山浩之, 平井杏奈, 楓知亜紀, 石井香好, 渡部芳郎, 森田いずみ, 太田光熙, 小林典裕: “ ヒト尿中コチニン測定における改良型変異抗体フラグメントの有用性 ” 第 24 回日本臨床化学会近畿支部総会 神戸, 2014 年 2 月 22 日.

大山浩之, 三宅沙也香, 秋定辰紀, 森内彩香, 丹羽俊文, 小林典裕: “ scFv ルシフェラーゼ融合タンパク質を用いるコルチゾール高感度発光 ELISA の開発 ” 日本薬学会第 134 年会, 熊本, 2014 年 3 月 29 日.

大山浩之, 森下知美, 福島咲子, 安井孝治, 小林典裕: “ 実用診断試薬を創出する試験管内分子進化 (7). 低親和力抗コルチゾール抗体の親和性成熟 ” 日本薬学会第 134 年会, 熊本, 2014 年 3 月 29 日.

森田いずみ, 寺澤清伽, 泉亜紀, 宮岡広子, 大山浩之, 小林典裕: “ 抗チロキシン一本鎖 Fv フラグメントの創製と諸性質 ” 日本薬学会第 134 年会, 熊本, 2014 年 3 月 29 日.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

大山 浩之 ( OYAMA HIROYUKI )  
神戸薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号 : 80572966