

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15321

研究課題名（和文）終末糖化産物の構造を識別する機能性一本鎖抗体を用いた高感度画像解析法の開発

研究課題名（英文）Development of highly sensitive imaging method by use of functional single-chain antibodies that discriminate the structure of advanced glycation endproduct

研究代表者

森岡 弘志（MORIOKA, HIROSHI）

熊本大学・大学院生命科学研究部（薬）・教授

研究者番号：20230097

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：終末糖化産物（AGE）を認識する一本鎖抗体（scFv）融合タンパク質を作製し、生体内に局在するAGEをin vivoイメージングする方法の開発研究を行った。ファージディスプレイ法によって、抗原結合性ならびに熱安定性の高いscFv抗体を作製した。次にscFvの血中滞留性を改善するために、Sortase Aを用いてヒト血清アルブミンとの融合分子を作製し、血中滞留性の向上が確認できた。scFv抗体にランタノイド蛍光ペプチド配列を結合させ、時間分解蛍光測定が可能なランタノイドイオンの導入を試みたが、蛍光は観測されなかった。現在、クリック反応を用いて蛍光プローブの導入を進めている。

研究成果の概要（英文）：We have produced the single-chain antibody (scFv) fused protein that recognizes a kind of advanced glycation end-product (AGE), GA-pyridine, and conducted research on development of in vivo imaging method for AGE localization in the body. The mutant scFv clones that exhibited higher affinity for antigen and thermal stability have been obtained using a combination of a phage display system and random mutagenesis. In order to improve stability and retentivity of the scFvs in blood, the scFv/human serum albumin (HSA) fused protein have been prepared by using transpeptidase Sortase A and consequently the improvement was confirmed in animal experiments. We have prepared scFv containing lanthanoid binding peptide (LBP) and tried to introduce lanthanoid ion usable for time-resolution fluorescent measurement in LBP, however could not observe fluorescence. Currently, we are carrying out introduction of fluorescent substance by click chemistry.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：機能性一本鎖抗体 終末糖化産物 蛍光プローブ 時間分解蛍光測定法 クリックケミストリー

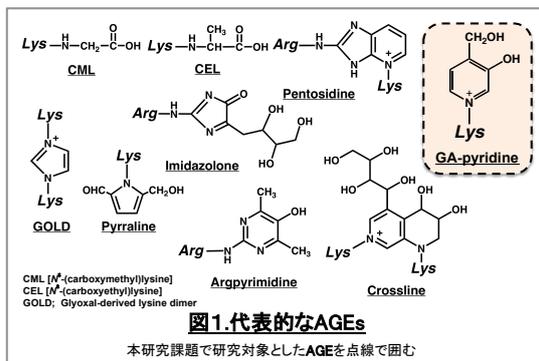
1. 研究開始当初の背景

タンパク質が非酵素的に糖化修飾されると、終末糖化産物 (AGEs: advanced glycation endproducts) と言われる糖化化合物が生じる (図1)。生体内で生成した AGEs は、糖尿病合併症と関連している。糖尿病血管合併症は、高血糖状態で AGEs が加速的に生成・蓄積され、細胞や組織が損傷することが要因だとされている。AGEs による細胞・組織損傷メカニズムを解明し、糖尿病血管合併症の発症・進行を予防するには、生体内の AGEs の動態解析が必須である。現在、抗 AGE モノクローナル抗体を用いる免疫測定法が行われているが、この方法は多段階にわたる体外処理を施すため、生体内の状況を正しく反映できない。生体内に局在する AGEs を正確かつ簡便に *in vivo* イメージングする方法を開発できれば、糖尿病血管合併症の解明と治療への大きな一歩となる。

以上の背景のもと、AGE 構造を識別できる機能性一本鎖抗体分子の新規創製と *in vivo* イメージング法の開発を計画した。

2. 研究の目的

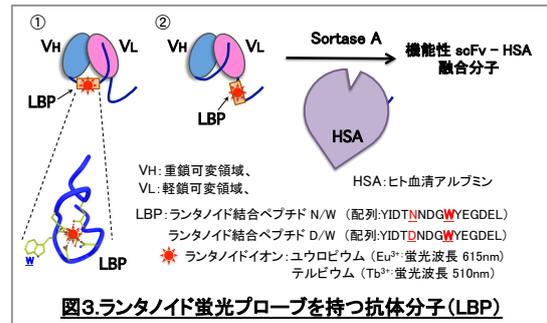
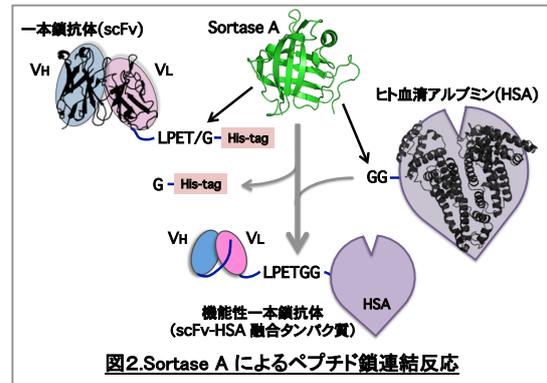
生体内のタンパク質が糖化してできる AGEs は、高血糖状態が続くと組織に蓄積され、糖尿病血管合併症の発症・進展を引き起こす。AGEs の局在や存在量を検出するには、モノクローナル抗体を用いる方法があるが、測定試料を生体外処理するため、生体内の動態を正確には反映できず、AGEs 関連疾患解明の障害となっている。この解決のために、生体内に局在する AGEs を的確に測定できる新規の機能性分子を創製し、AGEs 関連疾患の発症・進展メカニズムの解明、さらには、先進的な検査・治療法の確立を目指した。本研究は、蛍光プローブを分子内に含む独自の機能性一本鎖抗体融合分子を創製し、AGE 構造を標的とした生体内高感度画像解析法 = *in vivo* イメージング法の開発を進めた。



3. 研究の方法

AGEs 修飾タンパク質の生体内局在を高感度 *in vivo* イメージングできる機能性抗 AGEscFv 融合分子を創製し、糖尿病血管合併症の発症・進展メカニズムの解明と新たな治療法の開発につながる研究を計画した。そのために、(1) AGE 構造に特異的な scFv の調製

と抗原結合能の詳細な解析を行い、(2) ファージディスプレイ法による、抗 AGEscFv の抗原親和性、ならびに、熱安定性の改良を進めた。次に、(3) 消失半減期が短い scFv の血中滞留性を改善するために、ヒト血清アルブミン (HSA) との融合タンパク質 scFv-HSA を Sortase A を用いた酵素的連結法により作製した (図2)。さらに一方で、(4) 抗 AGEscFv 分子に時間分解蛍光測定が可能なランタノイド蛍光プローブの導入を試みた (図3)。



4. 研究成果

(1) GA-pyridine に特異的な scFv の調製

GA-pyridine (図1) を特異的に認識する scFv 遺伝子は、大腸菌のシステムにより発現させ、ヒスチジンタグを利用したアフィニティークロマトグラフィー、リフォールディング、ゲル濾過クロマトグラフィーにより高純度に精製した。

(2) 抗 GA-pyridine scFv の抗原結合活性の測定

抗 GA-pyridine scFv (AGE73scFv) の抗原結合活性は、等温滴定型カロリメーター (ITC) を用いて、速度論的・熱力学的解析を行った (表1)。得られた熱力学的パラメーター (ΔG , ΔH , $T\Delta S$) から、抗原結合、ならびに、scFv 構造の安定化に関わる本質的な分子間、ならびに、分子内相互作用 (水素結合、静電相互作用、ファンデルワールス相互作用、疎水的相互作用等) を評価し、高性能な scFv 抗体を作製するための情報とした。

(3) ファージディスプレイ法による高性能な抗 GA-pyridine scFv の獲得

error-prone PCR による VH、VL 遺伝子へ変異の導入とバイオパニングによるスクリーニング条件の検討により、3 種類の高性能

な scFv (73MuL-V94AscFv、73MuL9scFv、73MuH19scFv) を獲得することができた。その後、選択された scFv を(2)と同様に抗原結合活性を解析・評価した(表1)。また、scFv の熱安定性は示差走査型マイクロカロリーメーター (DSC) で、scFv 分子の慣性半径は X 線小角散乱法 (BioSAXS) で解析・評価した(表1)。その結果、高品質な scFv 分子の獲得が確認できた。

scFv clones	$K_D \times 10^3$ (M)		T_m (°C)	R_g (Å)
	25°C	37°C		
AGE73	13.4 ± 0.5	80.9	62.8	25.1
73MuL-V94A	5.3 ± 1.3	20.6	62.7	22.5
73MuL9	4.4 ± 0.8	18.8	65.8	22.6
73MuH19	4.7 ± 1.1	33.3	65.0	20.5

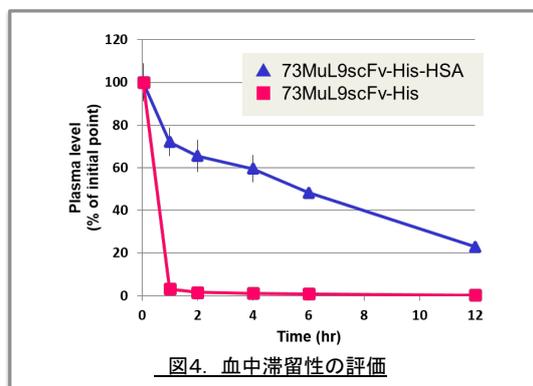
¹ITC 抗原結合活性データ、²DSC 熱安定性データ、³SAXS 慣性半径データ

(4) 73MuL9scFv-His-HSA 融合分子の調製

HSA は、宿主としてメタノール産化酵母を用い、既に報告された方法により調製した。scFv と HSA の連結には、配列特異的なペプチド転移反応を触媒する *Staphylococcus aureus* 由来の Sortase A を用いた(図2)。

73MuL9scFv-HSA 融合分子の抗原結合能を表面プラズモン共鳴 (SPR; Biacore T200) により解析した。その結果、融合分子の結合親和性は scFv 単体 (73MuL9scFv-His) と同等であることが確認できた。

また、融合分子の血中滞留性を評価するために、73MuL9scFv-His と融合分子に ^{125}I 標識を行い、マウスに投与した。投与後、3 min、30 min、1 hr、3 hr、6 hr、12 hr 後の血液を採取し、血漿中の ^{125}I カウント数をガンマカウンターにより測定し、血中滞留性を調べた。その結果、融合分子は、6 hr までは HSA 単体と同様の結果が得られ、融合分子にすることで血中滞留性が明らかに向上したことが分かった(図4)。



(5) ランタノイド蛍光プローブを分子内に含む機能性 scFv 分子の調製

生体内高感度測定を可能にするために、scFv 分子の特徴的な2つの領域、① scFv の VH と VL をつなぐリンカー領域、あるいは、② scFv の C 末端側領域にランタノイド蛍光プ

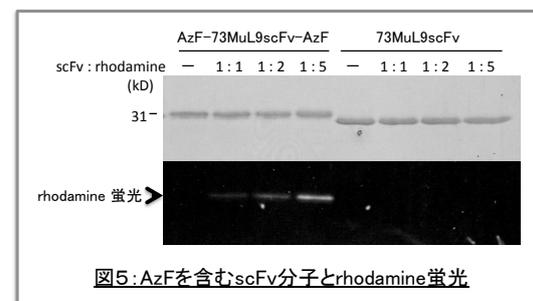
ローブ (LBP) を遺伝子工学的手法によって導入した。今回 2 種類の代表的な LBP 配列 [YIDTNDGWYEGDEL (N/W), YIDTDNDGWYEGDEL (D/W) : W は受光部] を選択した(図3)。LBP を含む scFv 分子の遺伝子は、大腸菌のシステムにより発現させ、ヒスチジンタグを利用したアフィニティークロマトグラフィー、リフォールディング、ゲル濾過クロマトグラフィーにより高純度に精製した。得られた LBP を含む scFv-LBP 分子の抗原結合活性は scFv 単体と同等であることが確認できた。

次に、ランタノイドイオンとして Eu^{3+} 、および、 Tb^{3+} を選択し、LBP 中での錯体形成を様々な条件下で試みた。しかしながら、2 種類の LBP [N/W、および、D/W] とともに蛍光を観測することができなかった。この理由として、scFv の調製の際に行う巻き戻し操作が LBP の構造形成に影響を与えていることが考えられた。

scFv 分子の調製には、巻き戻し操作が必須であるため、LBP の活用のほか、新たに、クリックケミストリーの方法を利用して、ランタノイド蛍光プローブを導入することを計画した。

(6) クリック反応による 73MuL9scFv 分子への p-フェニルアラニンの導入

アジド基とシクロオクチンの自発的環化付加反応 (クリック反応) を利用して、部位特異的に蛍光プローブ修飾を行うために、scFv 分子にアジド基を持つ非天然アミノ酸、p-フェニルアラニン (AzF) の導入を試みた。今回は、終始コドンの一つであるアンバーコドン (TAG) を非天然アミノ酸に対応させる手法を用いた。定法に従い、大腸菌のシステムにより AzF を N および C 両末端側それぞれに含む AzF-73MuL9scFv-AzF 分子を調製した後、市販されているローダミン色素を持つ化合物 (Carboxyrhodamine 110PEG4-DBCO; Broadpharm) と反応させたところ、蛍光色素の導入を確認することができた(図5)。現在、様々なシクロオクチン誘導体を用いて、ランタノイドイオン (Eu^{3+} 、または、 Tb^{3+}) を錯体形成できる化合物の調製を進めており、今後得られたランタノイド蛍光プローブにより scFv 分子の蛍光修飾を行う。



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 Fukuda, N., Noi, K., Weng, L., Kobashigawa, Y., Miyazaki, H., Wakeyama, Y., Takaki, M., Nakahara, Y., Tatsuno, Y., Uchida-Kamekura, M., Suwa, Y., Sato, T., Ichikawa-Tomikawa, N., Nomizu, M., Fujiwara, Y., Ohsaka, F., Saitoh, S., Maenaka, K., Kumeta, H., Shinya, S., Kojima, C., Ogura, T., and Morioka, H.: Production of single-chain Fv antibodies specific for GA-pyridine, an advanced glycation end-product (AGE), with reduced inter-domain motion. *Molecules*. **22** (10), 1695 (2017). DOI:10.3390/molecules22101695.
- ② Sasao, A., Takaki, M., Ohtsu, Y., Mishima, S., Yonemitsu, K., Morioka, H., and Nishitani, Y.: Development of an immunoassay for fluvoxamine detection using a recombinant single-chain variable fragment antibody. *Forensic Toxicol.* **35**, 301-308 (2017). DOI:10.1007/s11419-017-0358-9.
- ③ Fukuda, N., Suwa, Y., Uchida, M., Kobashigawa, Y., Yokoyama, H., and Morioka, H.: Role of the mobility of antigen binding site in high affinity antibody elucidated by surface plasmon resonance. *J. Biochem.* **161**, 37-43 (2017). DOI:10.1093/jb/mvw050.
- ④ Wang, Q., Zhang, L., Kuwahara, K., Li, L., Liu, Z., Li, T., Zhu, H., Liu, J., Xu, Y., Xie, J., Morioka, H., Sakaguchi, N., Qin, C., and Liu, G.: Immunodominant SARS coronavirus epitopes in humans elicited both enhancing and neutralizing effects on infection in non-human primates. *ACS Infect. Dis.* **2**, 361-376 (2016). DOI:10.1021/acsinfecdis.6b00006.
- ⑤ Maruta, Y., Kuwata, T., Tanaka, K., Alam, M., Ramirez-Valdez, K. P., Egami, Y., Suwa, Y., Morioka, H., and Matsushita, S.: Cross-neutralization activity of single-chain variable fragment (scFv) derived from anti-V3 monoclonal antibodies mediated by post-attachment binding. *Jpn. J. Infect. Dis.* **69**, 395-404 (2016). DOI:10.7883/yoken.JJID.2015.667.

〔学会発表〕 (計 11 件)

- ① 劉 宸江、豊田湧也、福田夏希、佐藤卓史、小橋川敬博、森岡弘志: 大腸菌発現系を用い

た一本鎖抗体の効率的試料調製法に関する研究、第 5 回生命分子科学研究会 Biomolecular Science Meeting MINAMI-ASO、休暇村南阿蘇 (高森)、2018/3/8

② 山内聡一郎、福田夏希、寺本真香、佐藤卓史、小橋川敬博、野井健太郎、小椋光、森岡弘志: 実用化に向けた安定な一本鎖抗体の創製、第 5 回生命分子科学研究会 Biomolecular Science Meeting MINAMI-ASO、休暇村南阿蘇 (高森)、2018/3/8

③ 森田光佑、小谷俊介、中島 誠、福田夏希、佐藤卓史、小橋川敬博、森岡弘志: 終末糖化産物 GA-pyridine に対する一本鎖抗体の抗原特異性と親和性の評価、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (第 40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会) ConBio2017、神戸ポートアイランド (神戸)、2017/12/6

④ 翁 力棟、宮崎広海、分山結加里、中原悠介、福田夏希、佐藤卓史、小橋川敬博、森岡弘志: NMR 解析に向けた終末糖化産物の 1 種である GA-pyridine に対する一本鎖抗体 (scFv) の創製、第 41 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、休暇村南阿蘇 (高森)、2017/8/31

⑤ 森岡弘志: 高品質な一本鎖抗体の創製と血清 AGE 修飾タンパク質の解析、第 49 回若手ペプチド夏の勉強会、長崎ブルースカイホテル・スカイホテル (長崎)、2017/8/6

⑥ 森岡弘志: 高品質な一本鎖抗体の創製に向けた物理化学的手法による評価、第 3 回蛋白質工学研究会ワークショップ『小分子抗体関連技術』、仙台国際センター (仙台)、2017/6/19

⑦ 福田夏希、宮崎広海、分山結加里、中原悠介、佐藤卓史、小橋川敬博、逢坂文那、齊藤貴士、前仲勝実、野井健太郎、小椋光、堀内正隆、増田 豪、大槻純男、森岡弘志: 高品質な一本鎖抗体の創製と血清 AGE 修飾タンパク質の検出、2016 年度日本生物物理学会北海道支部例会・第 23 回ファーマサイエンスフォーラム・北海道大学創薬センター合同シンポジウム、北海道大学薬学部 (札幌)、2017/3/16

⑧ 福田夏希、佐藤卓史、堀内正隆、小橋川敬博、大槻純男、森岡弘志: 一本鎖抗体を用いた AGEs 修飾タンパク質の分離・濃縮法の開発、第 26 回日本メイラード学会年会 26th JMARS、筑波国際会議場 (つくば)、2016/11/11

⑨ 森岡弘志: 低分子化合物を認識する高機能性小型抗体の開発 一本鎖抗体の実用化を目指して、大阪大学蛋白質研究所セミナー

～抗体創薬の最前線～ 「バイオ医薬品開発の鍵となる分子設計技術」、九州大学病院キャンパス（福岡）、2016/11/1

⑩ 森岡弘志：低分子化合物を認識する高機能性一本鎖抗体の開発研究 実用化を目指して、第40回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、指宿ベイテラス（指宿）、2016/8/28

⑪ 福田夏希、宮崎広海、分山結加里、中原悠介、佐藤卓史、小橋川敬博、逢坂文那、齊藤貴士、前仲勝実、野井健太郎、小椋光、中村照也、山縣ゆり子、森岡弘志：生体内AGE化蛋白質検出系の構築に向けた一本鎖抗体（scFv）の創製と評価、第16回日本蛋白質科学会年会、福岡国際会議場（福岡）、2016/6/8

〔図書〕（計2件）

① 福田夏希、二階堂里那、小橋川敬博、森岡弘志：機能性一本鎖抗体 抗体薬物複合体（ADC）の設計開発（松村保広 監修）、シーエムシー出版、第II編 第2章、pp. 18-30（2016）.

② Kobashigawa, Y., Fukuda, N., Nakahara, Y., and Morioka, H.: Surface Plasmon Resonance. *Advanced Methods in Structural Biology* (Senda, T. and Maenaka, K., eds), 227-237, Springer, Tokyo Japan (2016), doi: 10.1007/978-4-431-56030-2_13.12405.

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

①名称：終末糖化産物の濃縮方法
発明者：森岡弘志、小橋川敬博、佐藤卓史、福田夏希
権利者：同上
種類：特許
番号：特願2016-202461
出願年月日：平成28年10月14日
国内外の別：国内

②名称：終末糖化産物に対する抗体およびその使用
発明者：竹内正義、山本哲郎、土田仁美、森岡弘志、山内聡一郎
権利者：同上
種類：特許
番号：特願2017-168387
出願年月日：平成29年9月1日
国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

新たな抗体分子をつくり医療につなげよう
～新薬を創る・病気の状態を調べる・治療法を開発する～

http://seimeibunseki.org/research/page_01.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森岡弘志 (MORIOKA Hiroshi)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：20230097

(2) 研究分担者

小橋川敬博 (KOBASHIGAWA Yoshihiro)
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号：90455600

佐藤卓史 (SATO Takashi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：70555755

(3) 連携研究者

前仲勝実 (MAENAKA Katsumi)
北海道大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：10322752

丸山徹 (MARUYAMA Toru)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：90423657

(4) 研究協力者

福田夏希 (FUKUDA Natsuki)
熊本大学・薬学教育部・大学院生
研究者番号：なし