

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590119

研究課題名 (和文) 抗パクリタキセルモノクローナル抗体を活用した *Taxus* 属植物の探索並びに育種研究研究課題名 (英文) Preparation of monoclonal antibody against paclitaxel and its application for a survey and breeding of *Taxus* spp.

研究代表者

田中 宏幸 (TANAKA HIROYUKI)

九州大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：30253470

研究成果の概要：キシロシルパクリタキセル(xy1-PA)をハプテンとして用い、常法により免疫原の調製、免疫感作、細胞融合を試みた結果、1種の抗 PA MAb の作製に成功した。本抗体は、PA のみならず PA 関連化合物であるドセタキセルに対し 71%、xy1-PA に対し 32%、セファロマンニンに対して 6.2%の交差反応性を示した。続いて、本抗体を用いて 15～250 ng/ml の検量域を有する競合的システムによる Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)を構築し、PA 様化合物のスクリーニングに有用な手法であることを確認した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：環境系薬学

キーワード：パクリタキセル、モノクローナル抗体、ELISA、イムノクロマトストリップ

1. 研究開始当初の背景

パクリタキセル (PA) は、太平洋イチイ (*Taxus brevifolia*) の樹皮から分離されたタキサン系の化合物であり、日本では卵巣癌、子宮体癌、非小細胞肺癌、胃癌、乳癌に対する化学療法において多用されている最も有効な抗癌剤の一つである。近年の癌患者の増加に伴い安定供給が切望されている医薬品であることから、これまでに世界中の多くの

創薬研究者により安価な化合物を原料とし、高度な有機化学的手法による全合成が試みられてきた (Holon R. A., et al. *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116, 1597; Kuwajima I, et. al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 112, 3811; Mukaiyama T., et al., *Chem. Lett.* 1998, 1)。しかしながら、短工程で安価に合成する手法は未だ達成されておらず、PA の供給は天然資源に依存しているのが現状である。 *T. brevifolia*

以外の天然資源を対象にPAを探索する研究が行われ、その成果として現在最も効率的なPA生成法となっている半合成手法が見出された。即ち、ヨーロッパイチイ (*Taxus baccata*) の針葉より合成の材料になる10-デアセチルバッカチンIIIを単離精製し、これをもとにPAを合成する手法である。しかしながら、現状では10-デアセチルバッカチンIIIからの半合成を利用したとしてもPAを安価に供給するには程遠く、新たな供給源を求める資源探索研究やPA或いはバッカチンを高濃度に含有する有用品種の育種研究が重要な方策といえる。

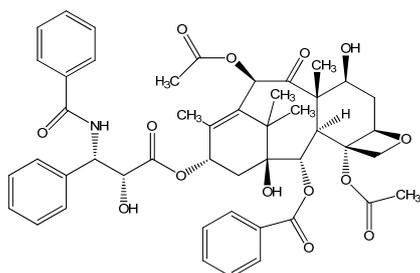


図1. パクリタキセル(PA)の化学構造

2. 研究の目的

申請者は本研究課題において上記課題を効果的に遂行するためのPAやPA供給資源となりうる関連化合物を効率的にスクリーニングする資源探索システムの開発を目指した。具体的には、これまでに申請者が培ってきた免疫化学的手法を採用し、多検体同時分析可能なenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) やフィールドでの分析を実現する迅速、簡便で目視判定によりサンプルの評価が可能なimmunochromatographic stripを開発することを第一の目標とした。続いて、これらの免疫化学的分析手法をスクリーニング法としてアジアに自生している*Taxus*属植物を対象に資源探索研究を行い、PAの新たな供給源を短期間に効率良く見出し、見出した優良な個体を育種研究の材料として研究を進展することで、最終的にはPA高含有品種の選抜育種を達成することが本申請課題の目的である。

3. 研究の方法

(1) PA に対するモノクローナル抗体 (MAb) の作製

各種免疫手法を開発するためにはPAを認識する抗体の作製が必須である。PAを認識する抗体を作製するために、スクシニル PA

やキシロシル PA (xyl-PA) をハプテンとして用いた。各々の化合物と蛋白質を結合し、免疫原性を有する複合体を調製し、これを免疫原としてマウスに免疫感作した。

続いて、PA 蛋白質複合体をマウスに免疫感作した後、適宜血中抗体価の測定を行い、抗 PA 抗体産生の有無を調査した後、十分な血中抗体価が得られた段階で細胞融合を行なった。細胞融合後、抗体産生細胞の評価をELISAにより行い、PAに反応性を有するMAbを産生するハイブリドーマを作出した。続いて、得られたハイブリドーマについて、限界希釈法によるクローニングを行い、クローンを得た。

(2) 抗体の精製、評価

得られた MAb 産生細胞を大量培養した後、培養上清から MAb の精製を行った。精製した高品質の抗体を用いて親和性、タキサン系化合物並びに各種植物二次代謝産物に対する交差反応性を調査した。

(3) ELISA の確立と評価

PA に特異的な MAb を活用することで競合的 ELISA による PA の定量的分析法を確立した。また、タキサン系化合物に幅広い交差反応性を有する MAb を利用し、資源探索に応用可能な ELISA を確立した。さらに、確立した ELISA について感度、信頼性、迅速性を調査し、育種研究並びに品質評価法としての有用性を評価した。

(4) Immunochromatographic strip の作製

図2のようなニトロセルロース膜上にPA-コンジュゲートを塗布した簡便なImmunochromatographic stripによるキットを作製した。固相化抗原に対する金コロイド標識抗PA抗体の結合を、サンプル中のPA関連化合物がどの程度阻害するかを指標にキットの評価を行った。

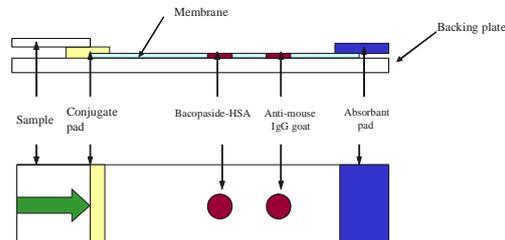


図1. Immunochromatographic strip の概略図

図2. Immunochromatographic strip の概略

4. 研究成果

(1) 抗PA MAb産生ハイブリドーマ1C1の作製
 二種類の異なるハプテンを有する免疫原を作製し、それらを免疫感作することで抗PA抗体の作製を試みた。その結果xyl-PA-牛血清アルブミン (xyl-PA-BSA) を投与した場合にPAを認識する抗体の産生を確認した。その後、2度の追加免疫を実施し、高い血中抗体価が得られた段階で、脾細胞を調製し、続いてPEG法による細胞融合を行った。アミノプテリンを含んだ培地で培養することで融合細胞のみを得、続いて抗PA抗体産生細胞の評価を行った結果、1C1と仮称するハイブリドーマをクローニングすることに成功した。クローニングの完了した抗PA抗体産生ハイブリドーマ1C1を大量に培養し、得られた培養上清を材料としてプロテインアフィニティークラムに付すことで抗PA MAbを精製した。

(2) 抗PA MA b 1C1 を活用した間接競合法ELISAの確立

まず、精製したMA b を用いて免疫化学的分析手法の中で最も一般的な手法であるELISAを構築した。xyl-PA-卵白アルブミン ovalbuminコンジュゲート (xyl-PA-ova) を固相化抗原とし、二次抗体としてはPOD標識の抗マウス IgG、基質は2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)を用いた。その結果、図3に示すような15~250 ng/mlの濃度領域において直線性を示す検量線を得た。

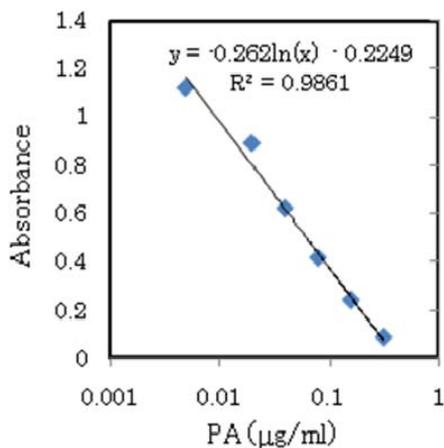


図3. 抗PA MAbを活用したELISAにおける検量線

続いて、本手法により抗体の各種PA関連化合物に対する反応性を検証した。その結果、表1に示すように、PAのみならずPA関連化合物であるドセタキセルに対し71%、キシロシルPAに対し32%、セファロマンニンに対して6.2%

の交差反応性を示した。また、本ELISAの信頼性試験については各種濃度のPA標準溶液を対象としたイムノプレート内（イントラアッセイ）とイムノプレート間（インターアッセイ）の測定誤差を調べることで検証した。その結果、イムノプレート内の測定値の変動係数 (CV)は4.3%以下であり、イムノプレート内の測定値のCVは5.5%以下であったことから、今回開発したELISAが十分な信頼性を有するものであることが明確となった(表2)。

表1. 抗PA MAbの各種関連化合物に対する交差反応性

交差反応性 (CR)	%
PA	100
docetaxel	70.7
7-xyloxy-PA	31.8
cephalomannine	6.17
1-hydroxybaccatin I	<0.111
baccatin III	<0.111
10-deacetylbaccatin III	<0.111
13-acetyl-9-dihydrobaccatin III	<0.111
1-acetoxy-5-deacetyl-baccatin I	<0.111

$$CR(\%) = \frac{\text{PAの50\%阻害濃度}}{\text{各種関連化合物の50\%阻害濃度}} \times 100$$

表2. 抗PA MA b を用いたELISAのイントラアッセイ、インターアッセイの結果

イントラアッセイ	
PA (µg/ml)	変動係数 CV (%)
0.25	3.42
0.125	1.67
0.0625	3.88
0.03125	4.31
0.015625	2.18
インターアッセイ	
PA (µg/ml)	変動係数 CV (%)
0.25	1.90
0.125	4.92
0.0625	5.53
0.03125	4.88
0.015625	1.96

(3) *Taxus*属植物中のPA関連化合物のELISAによる定量

先に確立した抗PA MAbを用いたELISAにより、*Taxus chinensis*中のPA関連化合物の定量を行った。南方医科大学の晁博士から提供を受けた*T. chinensis*の針葉並びに枝を微粉末とした後、メタノールを用いて抽出し精製したエキスを20%メタノールにて適切に希釈し、ELISAに供した。その結果、針葉中のPA関連化合物の含量は枝中のものに比べて高い値を示し、その含量は針葉が442 ng/mg dry wt., 枝中の含量は87 ng/mg dry wt.であった。これらの含量は、通常含まれている*T. chinensis*中のPA含量よりも高く、このことから今回確立したELISAによりPAのみならずPA関連化合物についても検出できることが推察された。今後は、複数の*Taxus*属植物を入手し、それらを用いてELISAによりどのような化合物がどの程度検出可能であり、検出できた化合物が抗腫瘍活性を有するか否かについても研究する計画である。

(4) Immunochromatographic stripの作製

抗PA MAbを常法により金コロイドで標識し、これを用いた簡便なPA検出キットの作製を行った。作製したキットの性能を評価するために、各種濃度のPAを用いて検出感度を調べた結果、150 ng/ml以下のPAを検出できることを明らかにした。現在、更なる感度の向上を目指しキットの改良を進めており、最適化を達成した後に、各種*Taxus*属植物の定量的な分析を行う計画である。

(5) 結論

PAが安価な化学物質から合成できない現状ではPAの安定供給は、天然資源からの単離、精製に頼らざるをえない。本研究ではPAの安定供給を目指し、PAの新たな供給源の探索、有望な資源の発見と育種を目的として、研究の成否の鍵を握るテーマとして効果的なPAやタキサン系化合物の分析法の開発を行い、抗PA MAbを用いた二種類の免疫化学的分析手法を確立した。確立した手法は、高感度であり多検体同時定量可能な理想的特性を備えており、上記研究を格段に推し進めるツールと考えている。さらに、我々が世界に先駆けて発信している低分子化合物を対象とした免疫染色法であるEastern blottingをPA関連化合物の探索に応用する研究を進めるための予備的な検討を進めており、その可能性をできるだけ早く明らかにしたい。

今回作製した抗PA MAbは、PAのみならず臨床において広く使用されている半合成医薬品ドセタキセルも認識できる。このことは、臨床において広く使用されている二種類の抗癌剤を対象として、それら医薬品の適正使用を念頭に置いた薬物動態研究など臨床薬学的

研究へと展開できることを意味しており、幅広い応用性を秘めている。

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 0件)

[学会発表] (計 0件)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 宏幸 (TANAKA HIROYUKI)

九州大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：30253470