

平成30年6月15日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14043

研究課題名(和文)抗体のミスフォールディング情報を出力する交差反応性分子ライブラリの創製

研究課題名(英文) Development of cross-reactive molecule libraries for generating information on antibody misfolding

研究代表者

富田 峻介 (Shunsuke, Tomita)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究員

研究者番号：50726817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、治療用抗体は医薬品売上高の上位を占めるようになってきたが、抗体は精製や輸送、保存過程において劣化しやすいことが未だ問題となっている。そのため、抗体医薬品を設計する際には、各過程における抗体の処理・保管法を、複数の分離・分光分析を併用して、厳密に設定する必要がある。本研究では、交差反応性を示す蛍光DNA/ナノサイズ酸化グラフェン(nGO)複合体群を利用することで、抗体のミスフォールディング情報をフィンガープリントとして出力し、これを多変量解析によって解析することで抗体の劣化状態を簡易かつ迅速に同定できる新規センシング法を開発した。

研究成果の概要(英文)：In recent years, antibodies have been widely used for medical purposes, but there is a problem that antibodies tend to degrade during purification, transportation and storage processes. Therefore, when designing therapeutic antibodies, it is necessary to strictly determine the methods and conditions of antibody processing and storage in each process based on a combination of separation and spectroscopic analyses. In this project, a novel sensing method was developed to address these issues. By using cross-reactive complexes between fluorescent DNAs and nanosized-graphene oxides (nGOs), the information on antibody misfolding was transduced into response fingerprints, and multivariate analyses of these fingerprints allowed for rapid and facile identification of the degraded states of the antibodies.

研究分野：バイオ分析化学

キーワード：抗体 バイオセンサー 酸化グラフェン DNA 多変量解析 高分子

1. 研究開始当初の背景

抗体タンパク質は、特異性が高く、毒性が低いため、次世代の医薬品として有望視されている。しかし、一般に抗体は不安定であり、製造から投薬までに加わる様々なストレスによって立体構造が壊れ、簡単に機能を失う。こうした治療用の抗体のミスフォールディングは、効能低下だけでなく、全身性のアレルギー反応などの重篤な副作用を起こすため、医薬品として認可されるには想定されるストレスに抗体が耐えられることが必須である。

抗体のミスフォールディング経路は、ストレスの種類だけでなく、アミノ酸配列や立体構造などの複雑な要因によって決まる。そのため、ミスフォールディングを防ぐための配列改変方針や保存条件は、経路に応じて戦略を立てて決定する必要がある。しかし、ミスフォールディング経路は、専門知識・技術の必要な高価な装置を、各経路に対して個別に用いることでしか特定することができない。このプロセスは通常、数日から数週間もの時間を要するため、抗体を選定・改良する初期スクリーニングの段階においてボトルネックとなっている。

そこで本研究では、我々が取り組んできた、「交差反応型タンパク質センシング法」(図1)を利用することで、上記の課題を解決することを目的とした。交差反応型タンパク質センシング法では、まず、多様な性質をもつ分子群を用いることで、タンパク質の性質を反映した応答フィンガープリントを得る。次に多変量解析法の一つである線形判別分析によってフィンガープリントを解析することで、多候補からタンパク質の種類を識別できる。本研究では、まず治療用抗体の分析に最適な分子群の作製を試みた。そして、様々な経路でミスフォールドした抗体の組成情報を一度の簡易なアッセイで取得できる「ミスフォールド抗体フィンガープリント法」の開発を推進した。

2. 研究の目的

本研究では、治療用抗体開発の効率化の鍵となるミスフォールド抗体の新規評価法の開発を目指す。具体的には、ミスフォールド抗体のフィンガープリンティングに適した分子群の候補として、DNA とナノサイズの酸化グラフェン (nGO) の複合体群を利用し、交差反応型センシングによるタンパク質の同定に対する利用可能性を調べる。そして、ミスフォールドした治療用抗体の状態の同定への応用を試みる。

3. 研究の方法

(1) タンパク質評価系の構築: 3種の配列のDNAのそれぞれに対して異なる蛍光団 (FAM, TAMRA, Cy5) を修飾し、これらの混合溶液に

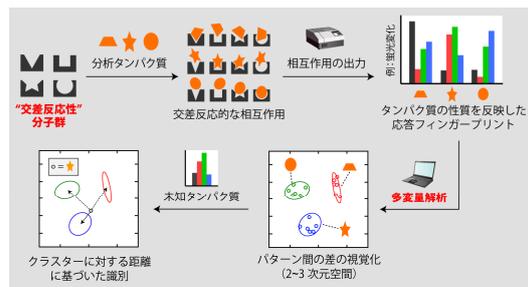


図1. 交差反応型センシングの模式図。

対して nGO を加え、複合体を形成させた。ここに性質の異なる様々なタンパク質を加えた後、各蛍光団に対応する蛍光をマルチチャンネルで検出し、タンパク質固有の蛍光フィンガープリントを1ウェルのみから取得できるかどうかを調査した。得られた応答は線形判別分析を用いて解析した。

(2) ミスフォールド抗体評価系の構築: リン酸生理食塩水 (PBS) 中で様々な抗体を一定時間加熱することで、変性や凝集など様々な劣化状態の抗体サンプルを作製した。このサンプルを、蛍光団として TAMRA を修飾した6種の配列の DNA と nGO の複合体群と混合した後、蛍光強度を測定し、(1)と同様に解析を行った。

4. 研究成果

(1) 蛍光 DNA/nGO 複合体群を用いた交差反応型マルチチャンネルタンパク質センシング

交差反応型タンパク質センシングを実現するには、2つの機能をもった分子群を作る必要がある。1つは、様々なタンパク質に対して幅広い交差反応性をもつために必要な、構造の多様性、もう1つは、分子とタンパク質の間の相互作用を、検出できる形に変換して出力する機能である。そこで本研究では、任意の配列かつ蛍光団を有するものを安価に購入できる点を考慮し、DNA を候補材料として選択した。この DNA をナノサイズの酸化グラフェン (nGO) と複合体化して消光させたものを、交差反応性材料として使用した。

初めに、DNA/nGO 複合体群の交差反応型タンパク質センシングへの応用可能性を調べた。識別に利用可能なフィンガープリントを得るには、通常、複数のウェルから別々に応答を取得する必要があった。本研究では、より効率的なフィンガープリントの獲得を実現するために、複数の蛍光団を用いるマルチチャンネル化によって1ウェルからでも応答フィンガープリントを得られる方法の構築を試みた (図2A)。これによって1ウェルからの情報であっても、タンパク質の高精度な識別が可能であることを示した。

本研究では、以下の3種のDNAを選択した [FAMを修飾したGカルテット構造を形成する配列 (P1-FAM)、TAMRAを修飾したシトシンの反復配列 (P2-TAMRA)、Cy5を修飾したヘア

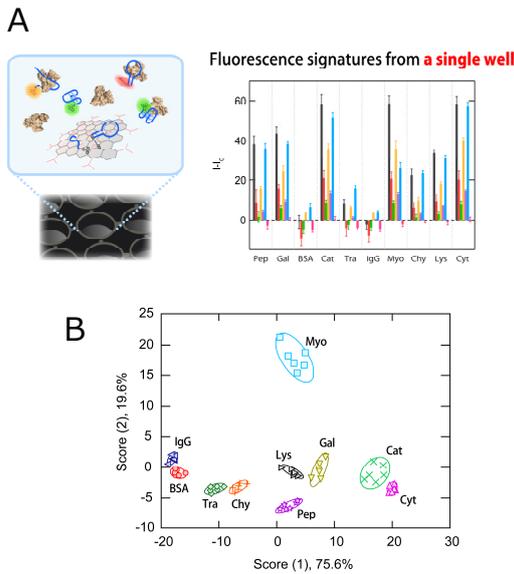


図 2. (A) マルチチャンネル化による 1 ウェルからの蛍光フィンガープリント獲得の模式図と、得られたフィンガープリント。(B) 判別スコアプロット。

ピン構造を形成する配列 (P3-Cy5)]. PBS 中で、20 nM の 3 種の DNA を 100 μ g/mL nGO と混合すると、複合体の形成に伴い、3 種の蛍光団すべてが消光した。ここに等電点や分子量の異なる 10 種のタンパク質 (15 μ g/mL) を加え、各色素に対応する蛍光強度の変化をマイクロプレートリーダーにより測定した。得られた蛍光フィンガープリント (図 2A) を線形判別分析により解析した結果、判別スコアプロット上で各タンパク質のクラスターが重なることなく分離した (図 2B)。この結果は、フィンガープリント間に十分な差があることを意味する。識別能を定量的に評価するために、ジャックナイフ交差検定を行ったところ、98%の精度でサンプルを正しく識別することに成功した (Sensors, 2017)。

(2) 蛍光 DNA/nGO 複合体群を用いた交差反応型ミスフォールド抗体センシング

次に、ミスフォールド抗体評価への蛍光 DNA/nGO 複合体群の応用可能性を調べた。抗体は、加熱や pH 変化、振動などのストレスを受けると、立体構造が壊れて変性する。変性するとタンパク質内部の疎水性部位が露出するため、露出部位同士が相互作用して抗体間で凝集する。ミスフォールディングによる抗体のこうした物性変化は、蛍光 DNA/nGO 複合体との相互作用のバランスに影響を与えるはずである。そのため、蛍光 DNA/nGO 複合体群によって、抗体の状態に固有の応答フィンガープリントが得られることが期待された (図 3)。

PBS 中で、適切な温度での熱処理により、変性状態および凝集状態の 2 種類の抗体サンプル [ポリクローナル抗体 (pI = 7.3)、モノ

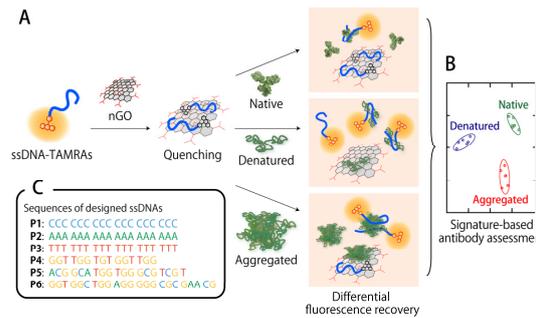


図 3. 蛍光 DNA/nGO 複合体群によるミスフォールド抗体フィンガープリンティングの模式図。

クローナル抗体 (pI = 7.6)] を調製した。このサンプルをマイクロプレート内で、TAMRA を修飾した配列が異なる 6 種類の DNA (図 3C) と nGO との複合体群とそれぞれ混合した後、蛍光強度の変化を測定した。得られた応答を線形判別分析によって解析した結果、図 4A に示すように、各抗体の天然・変性・凝集状態に対応するクラスター全てがよく分離していた。興味深いことに、抗体のフォールディング状態が天然→変性→凝集と変化するとき、いずれの抗体のクラスターもほとんど同じ軌道で移動していた。このことは本手法によって抗体の各状態に共通の特性を認識できたことを意味する。

さらに本手法は、熱によるモノクローナル抗体の複雑な劣化経路のモニタリング (図 4B) や、ミスフォールド状態の異なる抗体の

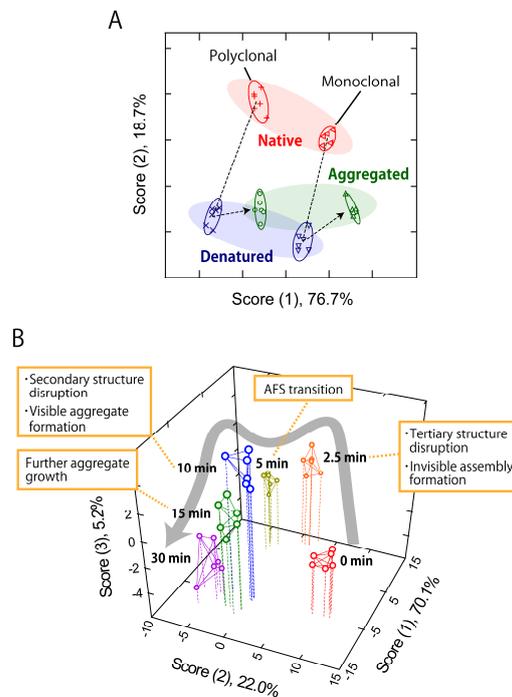


図 4. (A) 2 種類の抗体のミスフォールド状態の識別。(B) モノクローナル抗体の劣化経路のモニタリング。

混合サンプルの組成の同定にも利用できることが明らかになった。本手法は、1回の簡単なアッセイで迅速に抗体の状態を決定できるため、将来的には抗体産生における条件スクリーニングなどに資する分析技術としての利用が期待できる (*Anal. Chem.*, 2017)。

また、蛍光 DNA/nGO 複合体群を開発する過程で、交差反応型タンパク質センシングに利用可能なイオン性高分子/酵素複合体群 (*Anal. Chem.*, 2016) や環境応答性高分子 (*ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017) を開発することにも成功した。現在は、これまでに得られた交差反応性材料群の設計指針をもとに、より微少な抗体劣化でも正確に検出できるセンシング系の構築を進めている。

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 7 件)

(1) Shunsuke Tomita, Osamu Niwa, Ryoji Kurita: Artificial modification of an enzyme for construction of cross-reactive polyion complexes to fingerprint signatures of proteins and mammalian cells, *Analytical Chemistry*, 88, 9079-9086 (2016). (査読有)

(2) Furuhashi Yuichi, Yuka Kikuchi, Shunsuke Tomita, Keitaro Yoshimoto: Small spheroids of adipose-derived stem cells with time-dependent enhancement of IL-8 and VEGF-A secretion, *Genes to Cells*, 21, 1380-1386 (2016). (査読有)

(3) Shunsuke Tomita, Sayaka Ishihara, Ryoji Kurita: Environment-sensitive turn-on fluorescent polyamino acid: Fingerprinting protein populations with post-translational modifications, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9, 22970-22976 (2017). (査読有)

(4) Takaaki Kurinamaru, Kengo Kuwada, Shunsuke Tomita, Tomoshi Kameda, Kentaro Shiraki: Noncovalent PEGylation through protein-polyelectrolyte interaction: Kinetic experiment and molecular dynamics simulation, *The Journal of Physical Chemistry B*, 121, 6785-6791 (2017). (査読有)

(5) Shunsuke Tomita, Ayumi Matsuda, Suguru Nishinami, Ryoji kurita, Kentaro Shiraki: One-step identification of antibody

degradation pathways using fluorescence signatures generated by cross-reactive DNA-based arrays, *Analytical Chemistry*, 89, 7818-7822 (2017). (査読有)

(5) Shunsuke Tomita, Sayaka Ishihara, Ryoji Kurita: A multi-fluorescent DNA/graphene oxide conjugate sensor for signature-based protein discrimination, *Sensors*, 17, 2194 (2017). (査読有)

(6) 冨田 峻介, 吉本 敬太郎, 丹羽 修, 栗田 僚二: 交差反応の光学フィンガープリンティングを利用するタンパク質センシング, *分析化学*, 66, 1-10 (2017). (査読有)

(7) 冨田 峻介: タンパク質の特徴パターンを出力できる分子群を用いた生体試料センシング, *月刊バイオインダストリー*, 2, 6-14 (2018). (査読無)

[学会発表] (計 12 件)

(1) Shunsuke Tomita, Keitaro Yoshimoto, Osamu Niwa, Ryoji Kurita: Libraries of block-copolymer/enzyme complexes for protein fingerprinting: Toward markerless and noninvasive stem cell evaluation, ISFAC2016 (Borneo Convention Centre Kuching, Kuching, Malaysia), 2016/8/15-18

(2) 冨田 峻介, 栗田 僚二, 吉本 敬太郎: 分泌タンパク質組成を反映したフィンガープリントを出力する材料ライブラリ, 第4回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム (もてなしドーム, 石川県), 2016/9/4

(3) 冨田 峻介, 石原 紗綾夏, 栗田 僚二: タンパク質の微少な構造の差異情報を出力可能な高分子材料の開発, 日本分析化学会第65年会 (北海道大学工学部, 北海道), 2016/9/14-16

(4) 冨田 峻介, 石原 紗綾夏, 栗田 僚二: 交差反応性蛍光ポリアミノ酸によるタンパク質の特徴情報の出力, 日本化学会第97春季年会 (慶應義塾大学 日吉キャンパス, 神奈川県), 2017/3/16-19

(5) 冨田 峻介, 石原 紗綾夏, 栗田 僚二: タンパク質の特徴情報を出力する環境応答性蛍光ポリアミノ酸の開発, 第66回高分子学会年次大会 (幕張メッセ, 千葉県千葉市), 2017/5/29-31

(6) Shunsuke Tomita, Sayaka Ishihara,

Ryoji Kurita: Environment-sensitive polymers for fingerprinting of protein characteristics, ISPAC2017 (Hotel Continental Saigon, Ho Chi Minh City, Vietnam), 2017/6/8-10

(7) 富田 峻介: タンパク質の特徴情報を出力できる高分子アレイを利用したバイオメトリクス技術, JST 新技術説明会 (JST 東京本部別館 1F ホール, 東京都千代田区), 2017/7/13

(8) 富田 峻介, 石原 紗綾夏, 栗田 僚二: タンパク質の特徴パターンを出力可能な交差反応性ポリマー群の開発, 第 11 回バイオ関連化学シンポジウム (東京大学弥生キャンパス, 東京都文京区), 2017/9/7-9

(9) 富田 峻介: 機械学習を活用したタンパク質分析法の開発と細胞評価への応用, 日本分析化学会第 66 年会 (東京理科大学葛飾キャンパス, 東京都葛飾区), 2017/9/9-12

(10) 富田 峻介: 非特異的な相互作用を活用するタンパク質の特徴パターンを出力できる分子群による生体試料メトリクス, 蛋白研セミナー: 産業応用を志向するタンパク質溶液研究 (大阪大学タンパク質研究所, 大阪府吹田市), 2017/9/11-12

(11) 富田 峻介, 石原 紗綾夏, 栗田 僚二: 交差反応性蛍光ポリアミノ酸群を用いたタンパク質フィンガープリンティング法の開発, 第 32 回高分子学会関東支部茨城地区若手の会交流会 (つくばセミナーハウス, 茨城県), 2017/10/30-31

(12) Shunsuke Tomita, Sayaka Ishihara, Ryoji Kurita: An environment-sensitive fluorescent polyamino acid for fingerprint-based protein profiling, ACS National Meeting & Expo (Ernest N. Morial Convention Center, New Orleans, LA), 2018/3/18-22

[図書] (計 1 件)

(1) Shunsuke Tomita: Noninvasive and label-free cell characterization for tissue engineering in *Biomedical Engineering Challenges: A Chemical Engineering Insight*, pp.145-173, Editors: Piemonte V., Basile A., Ito T., Marrelli L., John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, NJ (2018)

[その他]

ホームページ等

<https://staff.aist.go.jp/s.tomita/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 峻介 (TOMITA, Shunsuke)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究員

研究者番号: 50726817

(2) 研究分担者

白木 賢太郎 (SHIRAKI, Kentaro)

筑波大学大学院・数理物質科学研究科・教授

研究者番号: 90334797