

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07033

研究課題名(和文) 低分子化合物の超高感度測定を目指す抗メタタイプ抗体の効率的創出システムの構築

研究課題名(英文) Construction of efficient systems for generation of anti-metatypic antibody for high-sensitive detection of small molecules

研究代表者

大山 浩之(Oyama, Hiroyuki)

神戸薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80572966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：抗原抗体反応を利用する免疫測定法は、臨床検査や診断薬に多用される。サンドイッチELISAは異なる2種の抗体を用いることで高い感度や特異性が得られるが、低分子化合物(ハプテン)への適用は原理的に困難であった。抗メタタイプ抗体は抗原抗体複合体を認識する特殊な抗体で、ハプテンのサンドイッチアッセイを成立させる鍵となる。しかし、動物を免疫する従来法では調製が困難であった。本研究ではアレイ型のスクリーニング法を用いて、抗体提示ファージライブラリーから抗メタタイプ活性を示す変異抗体の効率的な創出システムを構築した。得られた変異抗体はチロキシンのサンドイッチELISAを可能にした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究は抗体ライブラリーの活用と目的の抗体分子種を選択する新たな方法の組み合わせであり、類例はほとんどない。免疫複合体に高い選択性を示す抗メタタイプ抗体の効率的な調製は、従来不可能であったステロイドやビタミン類のサンドイッチ型測定法の構築が容易となる。結果として、検体の測定感度が飛躍的に改善されるうえ操作性にも優れ、臨床診断や現場分析に大きく貢献すると思われる。

研究成果の概要(英文)：Immunoassay using antigen-antibody reactions are frequently used in clinical testing and diagnostics. Sandwich ELISAs use two different types of antibodies to achieve high sensitivity and specificity, but in principle it has been difficult to apply them to small molecules (haptens). Anti-metatypic antibodies are special antibodies that recognize antigen-antibody complexes and are the key material to establishing sandwich ELISAs for haptens. However, it was difficult to generation them by the conventional method of immunizing animals. In this study, an array-type screening method was used to prepare an efficient system for generating mutant antibodies that exhibit anti-metatypic activity from antibody-displaying phage libraries. The mutant antibodies obtained enabled sandwich ELISA for thyroxine.

研究分野：抗体工学

キーワード：免疫測定法 抗メタタイプ抗体 scFv 抗体ライブラリー ハプテン サンドイッチELISA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

抗原抗体反応を用いる分析法は、簡便で多検体の同時処理が可能のため様々な分野で重用される。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、イムノクロマト法や抗体アレイ法などにも用いられる。しかし、ステロイドやビタミン類などの低分子化合物(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。このため競合法での測定に依存せざるを得ず、感度に限界があった。

### 2. 研究の目的

抗原抗体複合体を認識する抗複合体抗体(抗メタタイプ抗体)は、ハプテンの非競合法を可能にするキーマテリアルとして注目される(図 1A)。抗メタタイプ抗体とは抗原と複合体を形成した状態の抗体を特異的に認識する「特殊な第 2 抗体」でこれを用いることにより、“セミ”サンドイッチアッセイ(図 1B)が可能になる。しかし、その調製は困難を極める。動物由来の抗ハプテン抗体をハプテンと混合し、形成される複合体を実験動物に投与する従来の免疫法では成功例は極めて低い。これは IgG 分子量が大きいためハプテンとの複合体形成に伴う構造変化が相対的に小さいことと、動物体内で免疫系に認識される前に複合体が解離することに起因すると思われる。ところが、25-ヒドロキシビタミン D に対する抗メタタイプ抗体の作製が報告され、これを利用する非競合法の ELISA キットが市販された。この抗体はトリ由来抗体ライブラリーを用いた *in vitro* での選択法により得られたものである。動物への免疫を回避して上述の難点を克服した例であり、抗体ライブラリー法による抗メタタイプ抗体の単離が可能であることが示唆された。抗体ライブラリー法では、含まれる変異体の多様性が大きいほど目的の結合特性を持つ変異体が含まれる確率が高まるが、その反面、より大量の非特異的な変異体に埋もれ、選択単離が困難になる。今回、従来の「パンニング」の難点を抜本的に克服した新しい選択法である clonal array profiling (CAP) 法を導入し、ハプテンのセミサンドイッチアッセイを可能とする変異型抗メタタイプ抗体が効率よく獲得できるかどうか、本研究の目的である。

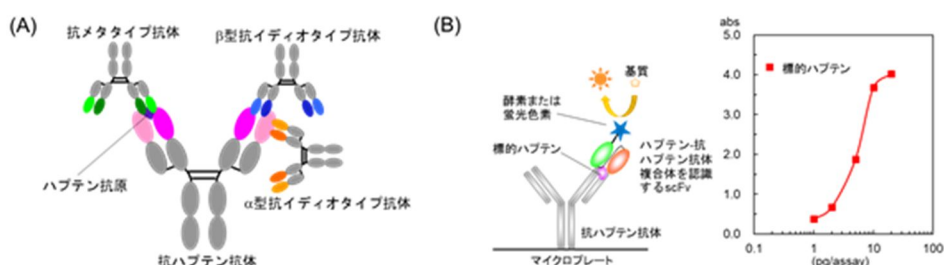


図1. 抗メタタイプ抗体の結合部位とサンドイッチアッセイへの応用例

### 3. 研究の方法

抗体の抗原結合部である可変部ドメインをリンカーで連結した一本鎖 Fv フラグメント (single-chain Fv fragment; scFv) は、元の IgG 抗体に遜色のない機能を発揮することから人工のミニ抗体として様々な分野で活用される。本研究に先立って抗 11-デオキシコルチゾール抗体の可変部を認識して結合するマウス由来の型抗イディオタイプ抗体を創製し、その scFv 化に成功している。抗体可変部のアミノ酸配列は抗体分子種ごとに異なるが、抗体の土台(シート構造)を構築する枠組み配列の立体構造は類似性が大きい。そこで、この scFv 遺伝子にランダム変異を導入したライブラリーにはハプテンが結合した状態の可変部、すなわちハプテン-抗ハプテン抗体複合体を特異的に反応する分子種が含まれるものと期待し、上記の抗イディオタイプ抗体 scFv を元にライブラリーを調製し、ファージ提示を活用した CAP 法により目的の抗メタタイプ活性を獲得した scFv 提示ファージの選択を試みた。本研究ではモデルハプテンとして甲状腺機能のマーカーとなるチロキシン ( $T_4$ ) をとりあげ、 $T_4$  との結合前後で構造変化が期待できる抗  $T_4$  scFv をアクセプター分子とした。

#### (1) 野生型抗 $T_4$ scFv の調製

先にクローニングしたマウス抗  $T_4$  抗体由来の H 鎖および L 鎖の可変部を連結した scFv の遺伝子が組み込まれた大腸菌 XL1-Blue を培養して、scFv をペリプラズム抽出物として調製した。これをアフィニティー精製したのち、scFv の C 末端に付加したポリスチレン結合ペプチドタグを介して ELISA プレートに固定化し、 $T_4$  結合能を ELISA で評価した。すなわち、ブロッキング後のウェルへ His6 タグで標識した  $T_4$  ペプチドを加え、洗浄後、マウス抗 His6 抗体、ペルオキシダーゼ (POD) 標識抗マウス抗体を順次反応させて、固相の POD 活性を吸光光度法で測定した。

#### (2) 抗メタタイプ活性を示す変異 scFv の探索 (CAP 法)

従来のファージ提示に基づく抗体ライブラリー法では、固相上に形成される限られた量のハプテン-抗ハプテン抗体複合体に対して、ライブラリーを構成する全 scFv 提示ファージが同時に反応することになるが、目的のクローンが特異性・親和力の乏しい大量のクローンと競合的に反応するため、その回収が困難であった。このような過剰の非特異的ファージによる淘汰を防ぐために、個々の変異 scFv 導入大腸菌クローンに個別にファージを産生させてその抗原結合能を精査することが重要と考え、研究代表者が所属する研究室で独自に開発した CAP 法を活用した(図 2)。すなわち、変異 scFv 遺伝子群を大腸菌に導入し (i)、その形質転換菌コロニーを、個別にマイクロプレートに播種して培養し、ファージを産生させる (ii)。生成したファージの scFv が複合体を特異的に認識する場合、予めプレートに固定化した複合体に結合する (iii)。プレートを洗浄したのち、固相上のファージをルシフェラーゼ融合型抗ファージ scFv と反応させる (iv)。再び洗浄後、発光基質を加えて、微量ファージを検出する (v)。強い発光を示したウェルからファージを回収し、大腸菌に再感染させて大量調製し、ELISA により抗メタタイプ活性を調べた。

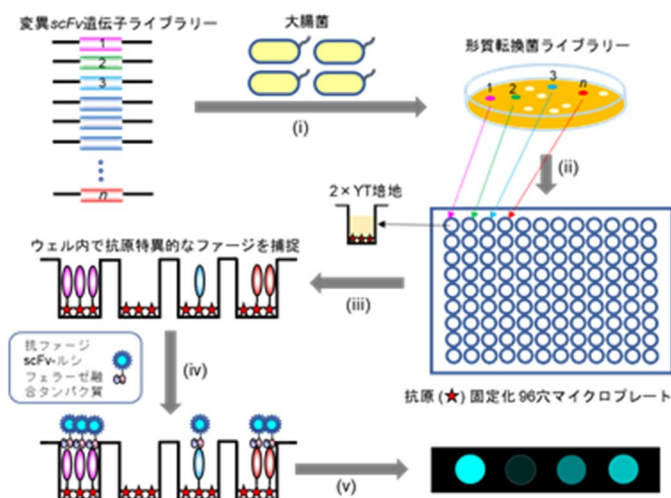


図 2. CAP 法の概略

#### 4. 研究成果

##### (1) 野生型抗 T<sub>4</sub> scFv の調製

調製した抗 T<sub>4</sub> scFv (1.0 μg/mL) をプレートに直接固定化し、T<sub>4</sub> 結合能を ELISA で調べたところ、His6 タグで標識した T<sub>4</sub> ペプチドの用量依存的にシグナルの増大が認められた(図 3)。また、遊離の T<sub>4</sub> を添加する競合 ELISA を行ったところ、感度の指標を示す 50% 阻害値は 200 pg であり、CAP 法の固定化抗原として利用可能であると考えられた。

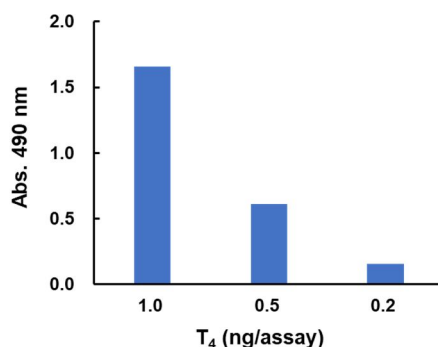


図 3. ELISA による抗 T<sub>4</sub> scFv の固定化条件の検討

##### (2) 抗メタタイプ活性を示す変異 scFv の探索 (CAP 法)

寒天培地に塗布した形質転換菌計 4230 種について、100 ng の遊離 T<sub>4</sub> を添加して、CAP 法により抗メタタイプ活性を調べたところ、高い発光強度を示した 44 種のファージクローンを回収した。これらのうち、ELISA により T<sub>4</sub> の用量依存的にシグナル強度の増大を示したクローンが 9 種得られた(図 4)。

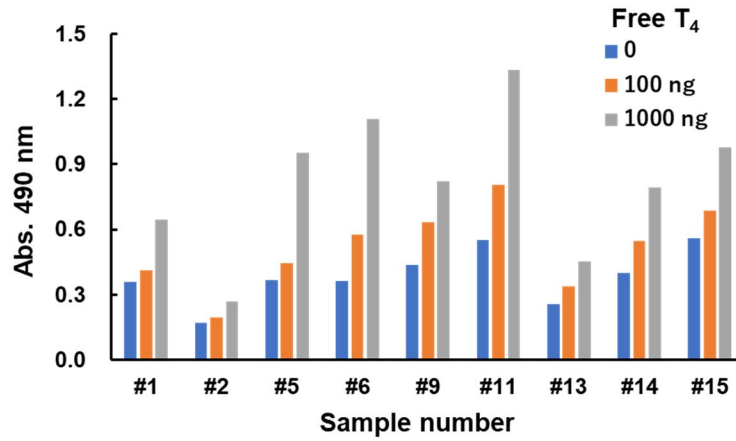


図 4. 得られたファージの抗メタタイプ活性の評価

続いて、これら 9 種の scFv 提示ファージから可溶性 scFv タンパク質を調製し、ELISA による抗メタタイプ活性を調べた。その結果、クローン#2 を用いる ELISA では遊離 T<sub>4</sub> の 100 ~ 5000 ng の範囲で用量依存的なシグナルの増大が認められた (図 5)。この成果は、これまで不可能であったハプテンのサンドイッチアッセイを可能にする抗メタタイプ抗体の効率的な創出システムとして期待される。

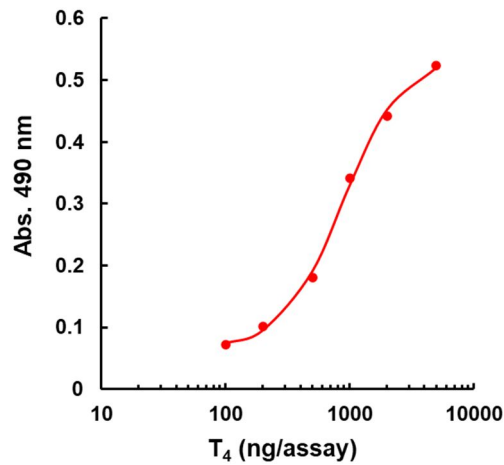


図 4. 得られた可溶性 scFv を用いるサンドイッチ ELISA の用量作用曲線

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Oyama Hiroyuki, Kiguchi Yuki, Morita Izumi, Miyashita Takayuki, Ichimura Akiyoshi, Miyaoka Hiroko, Izumi Aki, Terasawa Sayaka, Osumi Natsumi, Tanaka Hiroki, Niwa Toshifumi, Kobayashi Norihiro	4. 巻 1161
2. 論文標題 NanoLuc luciferase as a suitable fusion partner of recombinant antibody fragments for developing sensitive luminescent immunoassays	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 238180 ~ 238180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aca.2020.12.055	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kiguchi Yuki, Oyama Hiroyuki, Morita Izumi, Nagata Yasuhiro, Umezawa Naoko, Kobayashi Norihiro	4. 巻 11
2. 論文標題 The VH framework region 1 as a target of efficient mutagenesis for generating a variety of affinity-matured scFv mutants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8201 ~ 8201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-87501-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kiguchi Yuki, Oyama Hiroyuki, Morita Izumi, Morikawa Mai, Nakano Asuka, Fujihara Wakana, Inoue Yukari, Sasaki Megumi, Saijo Yuki, Kanemoto Yuki, Murayama Kaho, Baba Yuki, Takeuchi Atsuko, Kobayashi Norihiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Clonal array profiling of scFv-displaying phages for high-throughput discovery of affinity-matured antibody mutants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14103 ~ 14103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-71037-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大山浩之, 木口裕貴, 森田いずみ, 丹羽俊文, 小林典裕
2. 発表標題 高感度な発光ELISAを目的とするscFv融合用レポーター酵素の比較検討
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木口裕貴, 大山浩之, 森田いずみ, 小林典裕
2. 発表標題 VH-FR1へのアミノ酸挿入による抗コルチゾールscFvの試験管内親和性成熟
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木口裕貴, 大山浩之, 森田いずみ, 中野明日香, 森川真衣, 小林典裕
2. 発表標題 免疫測定法の高感度化を目指す高親和力抗コルチゾール変異抗体の効率的創製
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大山浩之, 山越悠可, 池田あさひ, 森田いずみ, 木口裕貴, 小林典裕
2. 発表標題 ストレプトアビジン結合ペプチド融合scFvを用いる抗体固定化ELISA系の開発
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	森田 いずみ  (Morita Izumi)  (20299085)	神戸薬科大学・薬学部・講師    (34512)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	小林 典裕  (Kobayashi Norihiro)  (90205477)	神戸薬科大学・薬学部・教授     (34512)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関