

機関番号：17401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790610

研究課題名 (和文)

抗体ファージライブラリーにて検索・作製した組換え抗体による新規薬物検出法の開発

研究課題名 (英文)

Development of novel phage antibody libraries for preparation of anti-drug antibodies

研究代表者

笹尾 亜子 (SASAO AKO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：80284751

研究成果の概要 (和文)：抗薬物抗体を迅速に調製できるような抗体ファージライブラリーの構築を本研究の目的とした。抗うつ薬フルボキサミンに対する抗体産生ハイブリドーマを用いて、その抗体遺伝子のシーケンス解析を行った。次に、その結果を元にフルボキサミンに対する一本鎖抗体作製のプラスミドベクターを調製した。また、抗精神病薬フェノチアジン類に対するハイブリドーマの調製を行い、その抗体のキャラクタリゼーションを行った。

研究成果の概要 (英文)：The aim of this study was to develop phage antibody libraries to facilitate anti-drug antibodies preparation. The hybridoma that produces anti-fluvoxamine (FLV; antidepressant) antibodies was used for analysis of the epitope sequence. And also, plasmid vector to produce the anti-FLV single chain variable fragment (scFv) was prepared. The hybridoma that produces anti-phenothiazines (antipsychotic) antibodies was also prepared.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：社会医学、抗薬物抗体、法医中毒学、組換え抗体

1. 研究開始当初の背景

近年のわが国における中毒事故の発生状況を見ると、「医薬品」による自殺事例の大幅な増加が認められる¹⁾。このような状況の中、検屍や法医解剖時における薬物服用のスクリーニングは「トライエージ[®]」等の免疫学的手法を応用した市販の検出キットに依存している現状がある。しかし、市販のキットで検出可能な薬物は濫用薬物や一部の向精神薬に限られており、その他多くの薬物は

簡易なスクリーニング法を持たない。そこで、我々は国内において中毒事例が多い薬物や、将来的に中毒事例の増加が危惧される薬物に対する免疫学的簡易検出法の開発を検討してきた(平成16～17年度 基盤研究(C)「向精神薬の免疫学的簡易検出システムの開発と法医中毒学への応用」研究代表：恒成茂行)。その研究の中で、免疫学的検出を行うための必須材料であるモノクローナル抗体の作製に約半年もの長期間を要する事や、対象薬物

によっては化学構造上の不安定さから免疫動物内で抗原として機能せず、結果として抗体作製に至らない場合を経験してきた。日々数多く開発される薬物に対して、迅速かつ確実に、多くの労力を必要とせずに抗体を作製し、対象薬物のスクリーニング手段を得る方法の確立は法医中毒学の分野において重要な課題であると考えられる。

2. 研究の目的

上記に述べた背景から、我々は抗体作製にかかる時間の短縮が可能で、多種多様な薬物に対する抗体の同時作製が容易になりえるファージディスプレイライブラリー法を用いた抗薬物抗体の作製を計画した。

抗体ファージライブラリー^{2,3)}を使ったモノクローナル抗体の作製の一連の流れとしては、まず抗体の可変領域を発現する遺伝子DNAをランダムに組み合わせたものを調製し、バクテリオファージの一本鎖DNAに導入する。これによってファージの表面に多種多様な抗原認識部位が提示され、抗体ファージライブラリーとして保管できる。これを目的とする薬物と反応させ、結合したファージを選別（パンニング）する。選別されたファージを大腸菌に感染、増幅させて再度薬物との反応性を確認する。これを繰り返すことによって、薬物と反応性の高い認識部位を提示するファージが単離・濃縮される。このファージからは、薬物認識部位のDNA配列が得られる事となる。得られたDNA配列は、抗体を発現する遺伝子の可変領域に挿入する事で「組み換え抗体」の調製に利用でき、また、薬物認識部位のタンパク質はそれ自体の化学的修飾等によって薬物検出のツールとなり得るものである。

この技術を用いて、我々は抗薬物抗体の作製に最適な抗体ファージライブラリーの構築を行い、それを用いた抗薬物抗体の作製と薬物検出法の確立を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究期間内においては、現在簡易検出法を持たない新規抗うつ薬フルボキサミンに対するファージライブラリーを構築するよう、既に樹立済みの抗フルボキサミン抗体産生ハイブリドーマからの RNA 抽出と抗原認識部位 DNA の解析、その結果に基づく一本鎖抗体用遺伝子の調製を行った。また、中毒事例が頻発しながらも簡易な検出法を持たない抗精神病薬フェノチアジン類に対するライブラリーの構築を目指して、出発物質となるハイブリドーマの調製を実施した。

以下に、各々の実験方法について簡単に述べる。

(1) 抗フルボキサミン一本鎖抗体の調製

① 抗体可変領域 DNA 配列の確認

既に調製済みの抗うつ薬フルボキサミンに対する抗体産生ハイブリドーマから RNA を抽出し、RT-PCR によって抗体可変領域 DNA (V_H , V_L) の増幅・精製を行った。pBluescript II KS (+) をベクターとして、各 DNA (V_H , V_L) を挿入したプラスミドを調製し、これをコンピテントセル (DH5 α) に対してカルシウム法にて形質転換を行った。コロニー PCR でスクリーニングした後、プラスミドを抽出、その遺伝子配列をキャピラリー DNA シーケンサーにて確認した。確認した可変領域に対するプライマーを設計し、以下の検討に用いた。

② 一本鎖抗体発現用プラスミドベクターの調製

① で確定した V_H , V_L ドメイン DNA を PCR にて増幅し、熊本大学大学院生命科学研究部の森岡教授よりご供与いただいたプラスミドベクターと共に目的箇所を制限酵素で各々切断した。各試料の精製後、プラスミドへのライゲーション、大腸菌への形質転換を行い、遺伝子配列の確認を行った。

(2) 抗フェノチアジンモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの調製

① ハイブリドーマの調製

既に調製済みのフェノチアジン類似化合物に対し、キャリアタンパクとしてキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) を用いて免疫抗原 (KLH-PTZ) を調製した (図 1)。常法に従ってマウス (Balb/c、雌性) に 4 回免疫し、その脾臓を用いてハイブリドーマを調製した。牛血清アルブミンにフェノチアジン類似化合物を結合させたタンパク (BSA-PTZ) を固相化した ELISA プレートでスクリーニングを行い、抗フェノチアジン抗体産生ハイブリドーマ 2 株を得た。各ハイブリドーマは無血清培地中で培養し、その培養上清を粗抗体用液として保存した。

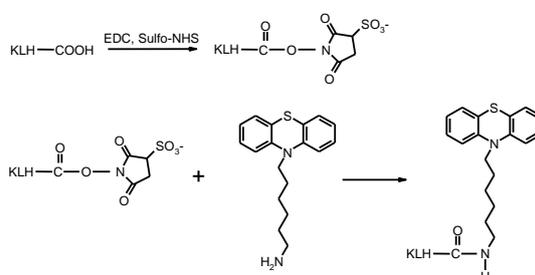


図 1 免疫抗原 (KLH-PTZ) の調製

② 抗フェノチアジンモノクローナル抗体の精製

①の粗抗体用液に対してProtein Gセファロースカラムを用いて精製を行った。精製度の確認のため、タンパク定量 (BCA 法)、ELISA 及び SDS-PAGE を行った。

③ 抗フェノチアジンモノクローナル抗体のキャラクタリゼーション

精製抗体 (PTZ14) と各種薬物 (図 2) との反応性を ELISA にて調べた。実験方法としては、各種濃度の薬物と抗体を 30 分間室温でインキュベートした後、固相化抗原との反応性を調べる非競合法で行った。

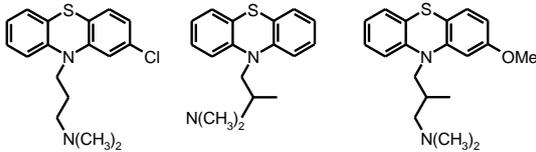


図 2 各種のフェノチアジン系薬物
左から塩酸クロルプロマジン (CPZ)、
塩酸プロメタジン (PMZ)、
マレイン酸レボメプロマジン (LPZ)

4. 研究成果

(1) 抗フルボキサミン一本鎖抗体の調製

① 抗体可変領域 DNA 配列の確認

抗フルボキサミンモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから抽出した抗体可変領域のアミノ酸配列は図 3 の通りであった。Kabat database と照らし合わせた結果、VH は Ig H 鎖サブグループ V に、VL は Ig κ 鎖サブグループ V に近似する事が明らかとなった。

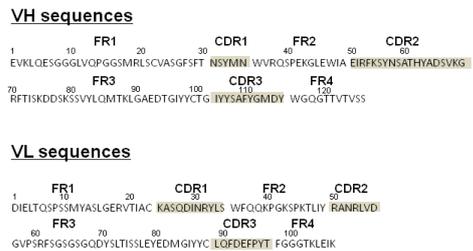


図 3 抗体可変領域 (VH、VL) のアミノ酸配列

② 一本鎖抗体発現用 DNA の調製

①で確定した VH、VL を用いて図 4 に示す一本鎖抗体発現用プラスミドベクターを調製した。なお、各 DNA の挿入後に DNA シークエンスの確認を行った。

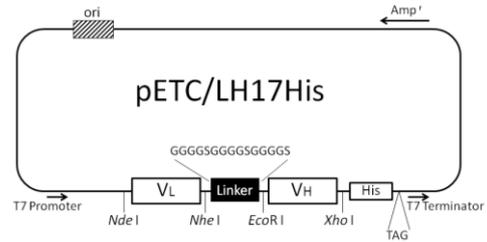


図 4 一本鎖抗体発現用プラスミドベクター (pETC/LH17His)

(2) 抗フェノチアジンモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの調製

① ハイブリドーマの調製

常法に従ってハイブリドーマを調製した結果、2 株 (PTZ14、PTZ178) が得られた。各々のタイピングの結果、共に IgG₁ の κ タイプであった。そこで、PTZ との反応性が高い PTZ14 株について、マウス IgG₁ に親和性の高い Protein G セファロースゲルを用いて精製を行った。

② 抗フェノチアジンモノクローナル抗体の精製

PTZ14 株の培養上清 440 ml から精製抗体約 14.2 mg を回収した。SDS-PAGE の結果、抗体タンパク以外を含まず高純度に精製された事が確認できた。

③ 抗フェノチアジンモノクローナル抗体のキャラクタリゼーション

得られた精製抗体 (PTZ14) を用いて、図 2 に示す各種のフェノチアジン系薬物との反応性を調べた (図 5)。

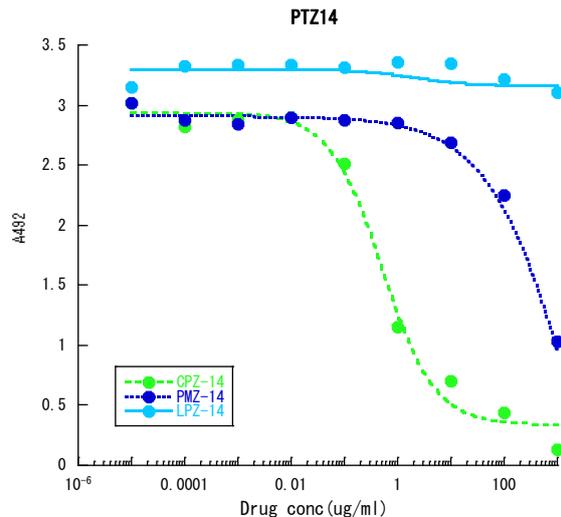


図 5 各濃度の薬物による PTZ14 と固相化抗原との ELISA 反応阻害

その結果、PTZ14 は CPZ とよく反応し、高濃度の PMZ にも反応性を示した。一方、LPZ に対する反応性は弱かった。この結果から、PTZ14 はフェノチアジン骨格から伸びる炭素鎖まで含めた構造をエピトープとしており、PMZ や LPZ のような側鎖の存在が反応性を低下させる可能性が高いと考えられた。

抗体ファージライブラリーの種類としては、免疫ライブラリー、ナイーブライブラリー、合成ライブラリー³⁾があるが、効率良く目的物と反応するタンパクを発現するファージを得るには免疫ライブラリーが推奨されている。そこで本研究では、新規抗うつ薬として処方が拡がっているフルボキサミンと国内で中毒事故の頻発する抗精神病薬フェノチアジン類に対する免疫ライブラリーの構築を目指した。

既に樹立済みの抗フルボキサミン抗体産生ハイブリドーマから得られたアミノ酸配列は、VH は Ig H 鎖サブグループ V に、VL は Ig κ 鎖サブグループ V に近似する事が明らかとなり、抗体の配列である事を確認できた。この遺伝子配列を元にプライマーを設計し、以下の検討における PCR に用いた。ご供与いただいたプラスミドベクターは、異なる VH、VL 遺伝子が挿入されたプラスミドであったため、VL、VH 遺伝子の順に遺伝子工学的に切り出しと挿入を行い、その都度シーケンス解析を行って遺伝子配列の確認を行った。なお、一般的に VL-VH の配列で調製した一本鎖抗体タンパクがよく発現されるとの助言に従い、図 4 のように設計した。今後は、このプラスミドベクターを発現用大腸菌に形質転換し、一本鎖抗体タンパク質の抽出・精製、そしてフルボキサミンとの構造活性相関を調べてこの遺伝子配列を元にライブラリーの調製へと進める予定である。

フェノチアジンを含めた多くの薬物は低分子であるため、そのままでは免疫抗原となりにえないハプテンである。そのため、タンパク質などの高分子化合物との複合体を調製し、これを免疫抗原として用いる。本研究では既に合成済みのフェノチアジン類似物とキーホールリンペットヘモシアニンの複合体を図 1 のように作成した。これを免疫抗原として得られたモノクローナル抗体は、フェノチアジン骨格から伸びる炭素鎖まで含めた構造をエピトープとしている事が明らかとなった。そのため、PMZ や LPZ のような側鎖の存在が反応性を低下させる可能性が高いと考えられた。今後は作成したハイブリドーマを抗体遺伝子のソースとして用いてフルボキサミンと同様にライブラリーを作製する予定である。

抗体ファージライブラリーを使った抗体

作製の技術は、作製に要する時間短縮を可能にするだけでなく、かつて抗体作製が困難であった抗原（生体構成成分や免疫する事のできない毒物、薬物等の小分子化合物）に対する抗体の獲得を可能とした点でも画期的である。つまり、我々の目的とする抗薬物抗体の作製法として十分期待される技術である。当該分野において、免疫学的薬物検出キットは頻用される一方、その研究はほとんど為されていない。しかし、多種多様な薬物のスクリーニング法に対する需要は法医学領域のみならず、救急の現場においても今後益々高まるものと予想される。本研究は当該分野においては極めて萌芽的な研究テーマでもあり、本研究考案時の計画通りに遂行する事は困難であったが、この成果は今後も開発が続くさまざまな薬物のスクリーニング手段を確立する可能性を持つものであり、我々が最も危惧する「薬物中毒死の見逃し」を防ぐ一手段として将来的に大きな意義を持つ研究である事を確信している。

<参考文献>

- 1) 科学警察研究所. 薬物による中毒事故等の発生状況, 第 47 報, 2005.
- 2) 高津聖志, 他. タンパク質研究のための抗体実験マニュアル, pp181-187, 羊土社, 2003.
- 3) 伊東祐二. BIO ベンチャー, 2, 51-58, 2002.

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ①笹尾亜子, 他. 車両内に流入した排気ガスによる不慮の一酸化炭素中毒死事例, 第 60 回日本法医学会学術九州地方集会(2010 年 10 月 15~16 日 北九州・産業医科大学)
- ②笹尾亜子, 他. 高濃度のブタンが検出された若年者のガス濫用事例, 第 94 次日本法医学会学術全国集会(2010 年 6 月 23~25 日 東京・タワーホール船堀)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹尾 亜子 (SASAO AKO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：80284751

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし