

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月1日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790617

研究課題名（和文） 診断マーカー感度向上に向けた高親和性抗体迅速単離法の開発

研究課題名（英文） Development of rapid generation of antibodies with high affinity for improvement of detection limit

研究代表者

小澤 龍彦（OZAWA TATSUHIKO）

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・助教

研究者番号：10432105

研究成果の概要（和文）：抗原特異的ウサギモノクローナル抗体（RaMoAbs）は親和性及び特異性が非常に高く特異的抗原の検出に非常に有用であることから、迅速かつ網羅的な RaMoAbs の作製法が望まれている。今回我々は、抗原特異的 RaMoAbs の迅速な作製法の開発に取り組んだ。その結果、抗原で免疫したウサギ由来末梢血リンパ球を調整してから7日以内に親和性の高い抗原特異的 RaMoAbs を網羅的に得る事に成功した。我々の確立した迅速かつ網羅的な RaMoAbs の新しい作製法は、研究用途のみならず、臨床用途にも寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Antigen-specific rabbit monoclonal antibodies (RaMoAbs) are useful due to their high specificity and high affinity, and the establishment of a comprehensive and rapid RaMoAb generation system has been highly anticipated. Here, we present a novel system for rapid RaMoAb generation and produce antigen-specific RaMoAbs with high affinity within a time period of only 7 days. We have used this system to efficiently generate RaMoAbs that are specific to a phosphorylated signal-transducing molecule. Our system provides a new method for the comprehensive and rapid production of RaMoAbs, which may contribute to laboratory research and clinical applications.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床検査医学、高親和性抗体、ウサギモノクローナル抗体

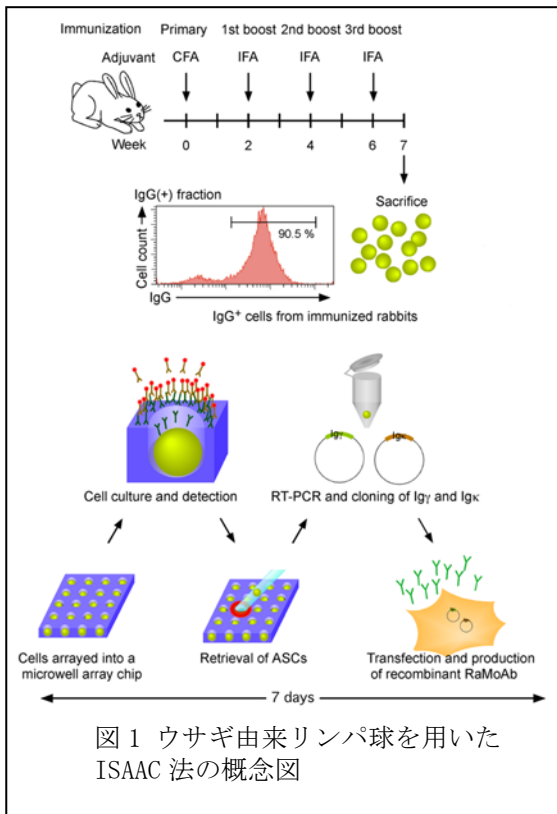
1. 研究開始当初の背景

ウサギモノクローナル抗体（RaMoAbs）は従来のマウスモノクローナル抗体よりも親和性、特異性が極めて高いことから、検出用途の抗体としては非常に理想的である。その作製法は現在までに、ウサギ形質細胞腫由来細胞株 240E-1 を用いたハイブリドーマ法が開発されている（PNAS 9348:92, 1995）が、そのハイブリドーマの作製が困難であることが欠

点である。

2. 研究の目的

我々は以前にリンパ球チップを用い、迅速かつ効率的にヒト由来抗原特異的抗体産生細胞を検出し、そのリコンビナント抗体を最短1週間程度で構築するシステム、ISAAC法を確立した（Nat Med, 1088:15, 2009）。本研究課題は、我々が開発した ISAAC 法をウサギ



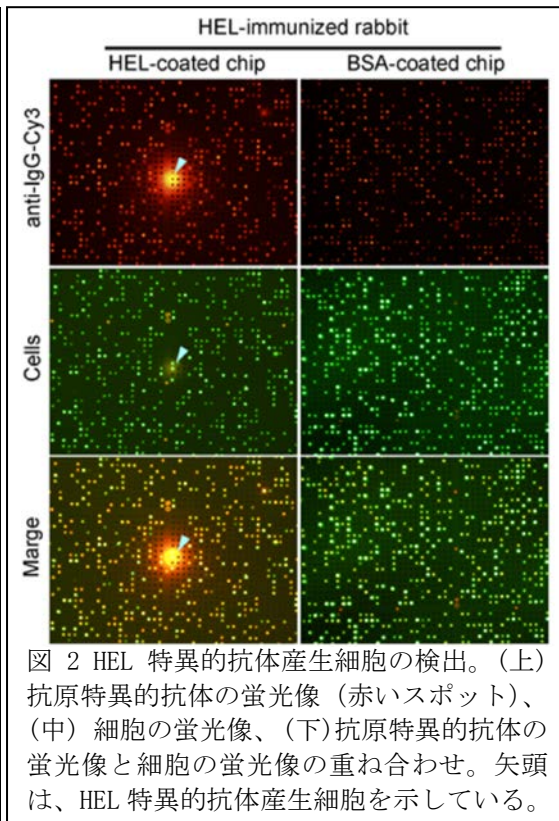
に応用し、迅速かつ効率的に RaMoAbs を作製する技術開発を行う事を目的とした。この技術を用いて作製した RaMoAbs の評価を行った。

3. 研究の方法

ウサギへの免疫及びリンパ球の回収は、承認された動物実験計画に従って行った。抗原としてリゾチーム (HEL) 及び human transforming growth factor- β -activated kinase (TAK1) 由来リン酸化ペプチド (p-TAK1pep) を免疫したウサギよりリンパ球を回収した。我々が独自に開発した ISAAC 法を用い、HEL 及び p-TAK1pep 特異的抗体産生細胞の検出を行った。その細胞を採取し、そこから抗体遺伝子の増幅を行い、リコンビナント RaMoAbs を作製した。これら抗体の親和性の測定ならびに、ELISA 及びウエスタン法による検出感度の検討を行った。

4. 研究成果

初めに、HEL 特異的抗体産生細胞の検出を ISAAC 法により行った (図 1)。HEL 免疫ウサギ由来リンパ球を HEL もしくはウシ血清アルブミン (BSA) を予め固相化したリンパ球チップに播種し、37°C で 3 時間培養させた。その後 Cy3 標識-抗ウサギ IgG 抗体を用いて分泌された抗原特異的抗体の検出を行った。HEL を固



相化したリンパ球チップでは ISAAC によるイムスポットが観察されたのに対し、BSA を固相化したリンパ球チップでは観察されなかった (図 2)。

次にこれらイムスポットを形成した 189 個の細胞を 1 個ずつ回収し、単一細胞 5' -RACE 法を用いてウサギ抗体重鎖及び軽鎖可変領域の遺伝子断片を増幅させた。合計 56 個の細胞よりウサギ抗体重鎖及び軽鎖可変領域の遺伝子断片が増幅できた。これらをウサギ抗体重鎖及び軽鎖の定常領域を含むプラスミドにクローニングした。作製したプラスミドを CHO-S 細胞へ導入し、合計 55 種類のリコンビナント RaMoAb を作製した。これら RaMoAb が HEL と結合するかを ELISA により検討を行った結果、24 種類の抗体が HEL と結合することが示された。

HEL と結合した抗体のそれぞれの塩基配列を解析した結果、2 種類の配列が重複しており、合計 21 種類の異なる塩基配列が得られた。

これら抗体のそれぞれの親和性 (KD) を ELISA により算出を行った結果、 1×10^{-7} から 1×10^{-12} M の値であった。特に 24 種類のうち 14 種類 (56%) は 1×10^{-10} M 以下という非常に KD が優れている事が示された。

一番 KD が優れていた Ra_HEL21

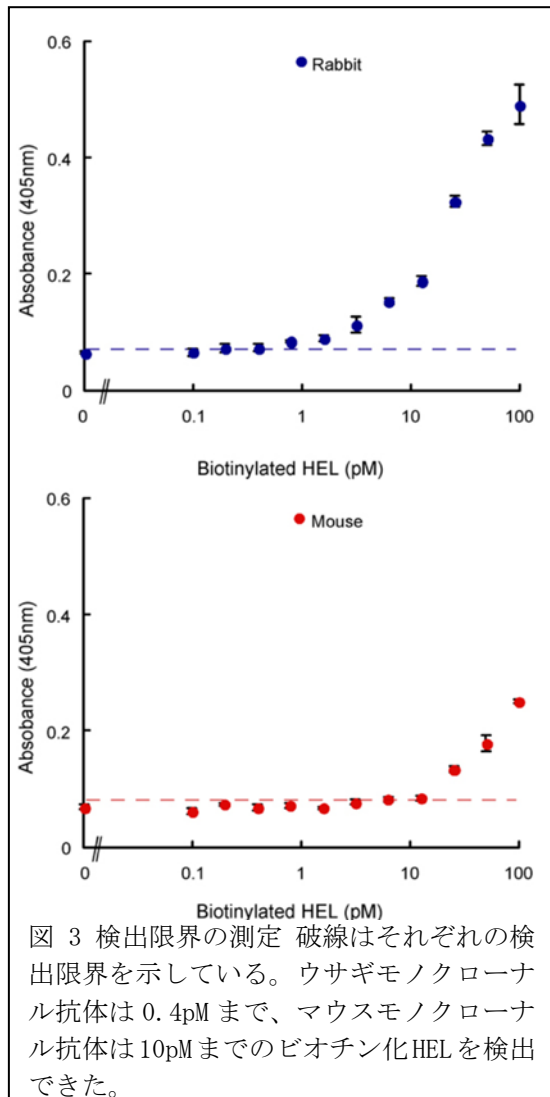


図 3 検出限界の測定 破線はそれぞれの検出限界を示している。ウサギモノクローナル抗体は0.4pMまで、マウスモノクローナル抗体は10pMまでのビオチン化HELを検出できた。

(KD; $1.35 \times 10^{-12} \text{M}$)と我々が以前にISAAC法で作製したマウス由来HEL抗体、Mo_HEL10 (KD; $3.71 \times 10^{-10} \text{M}$)を用いてHELの検出限界の比較を行った。その結果、Mo_HEL10ではせいぜい10pMのHELが検出できたのに対し、Ra_HEL21は25倍以上薄い0.4pMのHELが検出できた(図3)。この結果より、ウサギ由来抗体は従来のマウス由来抗体よりも検出感度に優れていることが改めて示された。

次にKDが優れている抗体を細胞の回収段階で選別出来る方法に取り組んだ。Adamsらは腫瘍細胞をKDの異なる抗体を用いて染色した際、KDの優れている抗体では局所的にしか染色できないのに対し、KDの優れていない抗体では全体的に染色できるという報告をしている(Cancer Res 4750:61, 2001)。この報告を受けて、イムノスポットの大きさがKDの値と相関しているのではないかと考え、HEL特異的イムノスポットの性質を解析した。

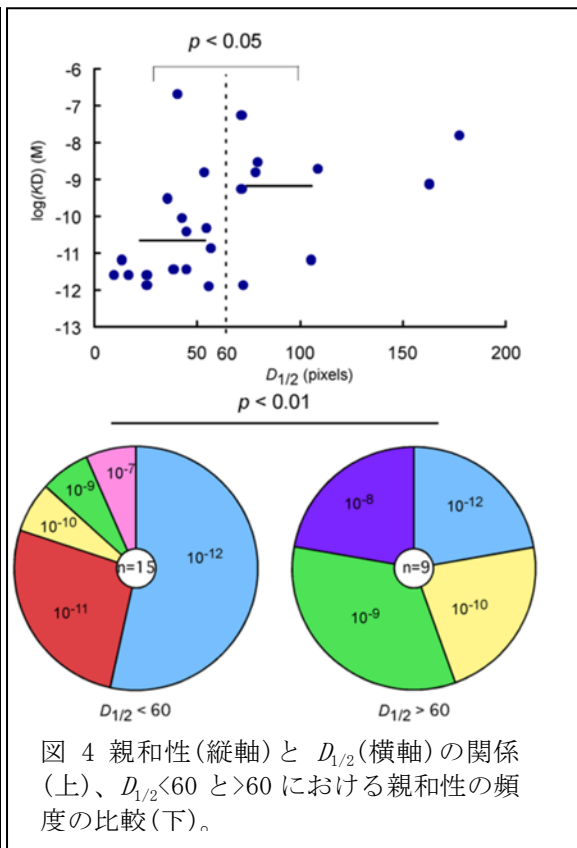


図 4 親和性(縦軸)と $D_{1/2}$ (横軸)の関係(上)、 $D_{1/2} < 60$ と > 60 における親和性の頻度の比較(下)。

それぞれのイムノスポットの蛍光強度がイムノスポットの中心から半分になる距離($D_{1/2}$)を求め、KDと $D_{1/2}$ の散布図を作成した。 $D_{1/2} < 60$ におけるKDの平均値は $2.56 \times 10^{-11} \text{M}$ であり、 $D_{1/2} > 60$ におけるKDの平均値は $7.34 \times 10^{-10} \text{M}$ であった(図4、tテスト、 $p < 0.05$)。また、 $D_{1/2} < 60$ の抗体の80%もがKDが 10^{-10}M 以下という非常に高親和性であったのに対し、 $D_{1/2} > 60$ の抗体ではKDが 10^{-10}M 以下は22%であった(図4、フィッシャーテスト、 $p < 0.01$)。この結果より、イムノスポットの半径が小さいものを選択することで、高親和性の抗体を選別できる事が示された。

次にウエスタン解析に使用できるリン酸化特異的抗体の取得を試みた。p-TAK1pepを免疫したウサギよりリンパ球を回収し、p-TAK1pepと結合する64種類のリコンビナントRaMoAbを作製したが、このうち59種類はリン酸化されていないTAK1ペプチド(TAK1pep)とも結合し、リン酸化特異的抗体は僅か5種類であった。

効率よくリン酸化特異的抗体を取得するため、検出段階で予めTAK1pepでブロッキングし、その後イムノスポットを形成させた。19種類のリコンビナントRaMoAbを作製し、そのうち18種類がリン酸化特異的抗体であつた。

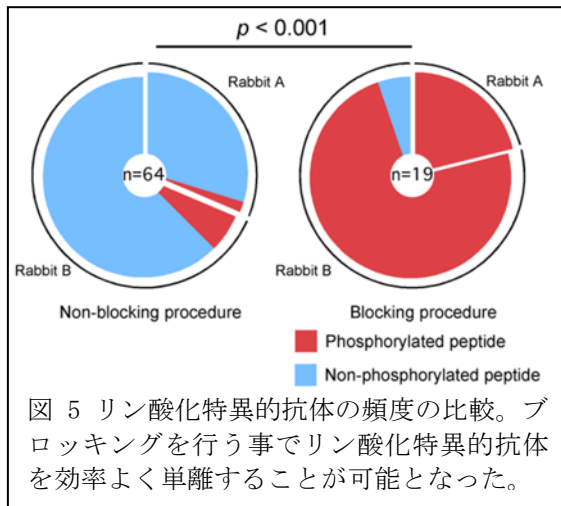


図 5 リン酸化特異的抗体の頻度の比較。ブロッキングを行う事でリン酸化特異的抗体を効率よく単離することが可能となった。

た。この結果より予めブロッキングすることで効率的にリン酸化特異的抗体を得られることが示された(図5、フィッシャーテスト、 $p < 0.001$)

p-TAK1pepと結合した抗体のそれぞれの塩基配列を解析した結果、多くの配列が重複しており、合計8種類の異なる塩基配列が得られた。これら抗体のそれぞれの親和性をELISAにより算出を行った結果、 1×10^{-6} から 1×10^{-9} Mの値であった。

最後に得られたリン酸化特異的モノクローナル抗体がウエスタン解析に使用できるかの検討を行った。HeLaにTAK1及びTAK1のリン酸化を誘導するTAB1を共発現させ、その細胞抽出液を用いてウエスタン解析を行った。TAK1とTAB1を共発現させた細胞抽出液ではバンドが検出されたのに対し、該当のリン酸化部位をアラニンに置換したTAK1(T187A)ではバンドが検出されなかった(図6)。次にTNF- α を用いて内在性のリン酸化を誘導したHeLaの細胞抽出液を用いてウエスタン解析を行った。リコンビナント抗体Ra_p-TAK23では時間経過と共にバンドが検出されたのに対し、市販の抗体では検出できなかった。この結果より、今回作製したリコンビナント抗体は市販の抗体より検出感度に優れていることが示された。

RaMoAbsは高い親和性、及び特異性の面から有用性に優れている。しかしながらその作製には時間もかかり、また困難を極めていることから、その使用は限定的であった。本研究課題の結果より、従来より行われているRaMoAbsの作製を細胞レベルからの抗体単離を遺伝子レベルに代えることでより迅速、かつ効率的にRaMoAbsを作製する事が可能とな

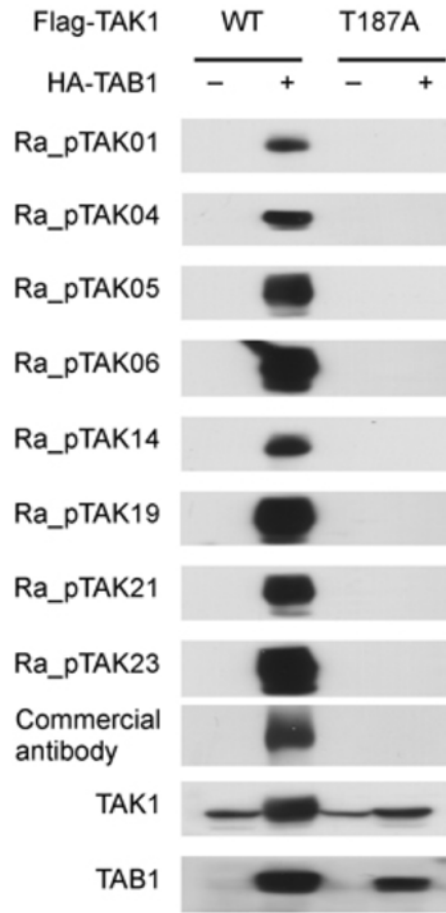


図6 ウエスタン解析。HeLaにTAK1及びTAB1を共発現させ、その細胞抽出液を用いて解析を行った。

った。研究の場のみならず臨床の場においても検出用抗体の使用頻度は極めて高い。本研究の技術を診断用抗体に応用することでその検出感度の上昇が見込まれることから、病気の早期発見につながると期待される。さらには得られたRaMoAbsをヒト化抗体に変換させることで、高い特異性とヒトに対する抗原性が小さいという2つの利点を兼ね備えた抗体医薬品開発への応用が期待される。

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6件)

[1] Kurosawa N, Fujimoto R, Ozawa T, Itoyama T, Sadamori N, Isobe M (2013) Reduced Level of the BCL11B Protein Is Associated with Adult T-Cell

Leukemia/Lymphoma. PLoS One 8: e55147. DOI: 10.1371/journal.pone.0055147 (査読あり)

[2] Ozawa T, Piao X, Kobayashi E, Zhou Y, Sakurai H, Andoh T, Jin A, Kishi H, Muraguchi A (2012) A novel rabbit immunospot array assay on a chip allows for the rapid generation of rabbit monoclonal antibodies with high affinity. PLoS One 7: e52383. DOI: 10.1371/journal.pone.0052383 (査読あり)

[3] Ozawa T, Horii M, Kobayashi E, Jin A, Kishi H, Muraguchi A (2012) The binding affinity of a soluble TCR-Fc fusion protein is significantly improved by crosslinkage with an anti-C β antibody. Biochem Biophys Res Commun 422: 245-249. (査読あり)

[4] Sun X, Saito M, Sato Y, Chikata T, Naruto T, Ozawa T, Kobayashi E, Kishi H, Muraguchi A, Takiguchi M (2012) Unbiased Analysis of TCR α / β Chains at the Single-Cell Level in Human CD8(+) T-Cell Subsets. PLoS One 7: e40386. DOI: 10.1371/journal.pone.0040386 (査読あり)

[5] Fujimoto R, Ozawa T, Itoyama T, Sadamori N, Kurosawa N, Isobe M (2012) HELIOS-BCL11B fusion gene involvement in a t(2;14)(q34;q32) in an adult T-cell leukemia patient. Cancer Genet 205: 356-364. (査読あり)

[6] Ozawa T, Jin A, Tajiri K, Takemoto M, Okuda T, Shiraki K, Kishi H, Muraguchi A (2011) Characterization of a fully human monoclonal antibody against extracellular domain of matrix protein 2 of influenza A virus. Antiviral Res 91: 283-287. (査読あり)

[学会発表] (計 18 件)

[1] Piao X, Muraguchi A, Hamana H, Ozawa T, Kobayashi E, Jin A, Kishi H. Rabbit ISAAC (rabbit immunospot array assay on a chip) allows for the rapid generation of rabbit monoclonal antibodies with high affinity. Keystone Symposia (Antibodies as Drugs) 2013. 1. 27-31: Vancouver, British Columbia, Canada.

[2] Ozawa T, Piao X, Kobayashi E, Zhou Y, Sakurai H, Andoh T, Jin A, Kishi H,

Muraguchi A. A novel rabbit immunospot array assay on a chip allows for the rapid generation of rabbit monoclonal antibodies. 第34回日本分子生物学会年会 2012. 12. 11-14: 福岡.

[3] Ozawa T, Kobayashi E, Jin A, Kishi H, Muraguchi A. The binding affinity of a soluble TCR-Fc fusion protein is significantly improved by crosslinkage with an anti-C β antibody. 第41回日本免疫学会総会・学術集会 2012. 12. 5-7: 神戸.

[4] Piao X, Ozawa T, Kobayashi E, Kishi H, Muraguchi A. Rapid generation of super-antibodies using rabbit ISAAC. 第41回日本免疫学会総会・学術集会 2012. 12. 5-7: 神戸.

[5] Kobayashi E, Kishi H, Hamana H, Ozawa T, Nakagawa H, Jin A, Muraguchi A. Cloning of human antigen-specific TCRs can confer the candidates for cancer gene therapy. 第41回日本免疫学会総会・学術集会 2012. 12. 5-7: 神戸.

[6] Kishi H, Jin A, Kobayashi E, Ozawa T, Hamana H, Muraguchi A. Detection of antigen-stimulated cytokine-secretion in human T-cells at single cell levels on a live cell chip. 第41回日本免疫学会総会・学術集会 2012. 12. 5-7: 神戸.

[7] Hamana H, Kobayashi E, Kishi H, Ozawa T, Jin A, Muraguchi A. Comparison of TCR repertoires in EBV-specific T cells detected by three different staining methods. 第41回日本免疫学会総会・学術集会 2012. 12. 5-7: 神戸.

[8] Kishi H, Obata T, Takami S, Kazui M, Ozawa T, Ogawa A, Muraguchi A. Analysis of cellular responses at single cell levels with a hybrid magnetic microwell array chip. International Joint Symposium on Single-Cell Analysis 2012. 11. 27-28: 京都.

[9] Kobayashi E, Mizukoshi E, Kishi H, Hamana H, Nagai T, Ozawa T, Nakagawa H, Jin A, Kaneko S, Muraguchi A. Cloning of human antigen-specific TCRs can confer the candidates for cancer gene therapy. SITC 27th Annual Meeting 2012. 10. 26-28: North Bethesda, MD, USA.

[10] 岸裕幸, 小林栄治, 水腰英四郎, 小澤龍彦, 金子周一, 村口篤. がんのTCR遺伝子

治療にむけた候補TCR遺伝子の迅速クローニング法. 第71回日本癌学会学術集会
2012.9.19-21: 札幌.

[11] Ozawa T, Piao X, Kobayashi E, Kishi H, Muraguchi A. A high-throughput method for generating rabbit monoclonal antibodies by immunospot array assay on a chip technology. 第33回日本分子生物学会年会 2011.12.6-9: 横浜.

[12] 小澤龍彦, 小林栄治, 岸裕幸, 村口篤. 可溶化TCRの作製と機能解析. 第40回日本免疫学会総会・学術集会 2011.11.27-29: 千葉.

[13] Ozawa T, Kobayashi E, Tajiri K, Jin A, Kishi H, Muraguchi A. The novel method to detect single antibody-secreting B-cells and single cytokine-secreting T-cells using a cell-microarray chip. Cold Spring Harbor Meeting, Single cell analysis 2011.7.22-24: New York, USA.

[14] Kobayashi E, Hamana H, Nagai T, Ozawa T, Kishi H, Muraguchi A. 単一細胞解析に基づく迅速な抗原特異的T細胞受容体クローニングシステム. 第40回日本免疫学会総会・学術集会 2011.11.27-29: 千葉.

[15] 浜名洋, 小林栄治, 長井輝美, 小澤龍彦, 岸裕幸, 村口篤. 迅速なTCR cDNAクローニングシステムを用いたEBV特異的単一T細胞のTCR α/β レパトア解析. 第40回日本免疫学会総会・学術集会 2011.11.27-29: 千葉.

[16] 朴秀虹, 小澤龍彦, 小林栄治, 岸裕幸, 村口篤. ISAAC法を用いた迅速かつハイスループットなウサギモノクローナル抗体作成法の開発 第40回日本免疫学会総会・学術集会 2011.11.27-29: 千葉.

[17] Kishi H, Kobayashi E, Ozawa T, Hamana H, Nagai T, Tajiri K, Muraguchi A. 細胞チップを用いた抗原特異的サイトカイン分泌T細胞の単一細胞レベルでの検出. 第40回日本免疫学会総会・学術集会 2011.11.27-29: 千葉.

[18] Kobayashi E, Hamana H, Nagai T, Horii M, Ozawa T, Kishi H, Muraguchi A. Single T cell analysis system for rapid cloning and functional evaluation of antigen-specific T cell receptors Cold Spring Harbor Conferences Asia 2011.5.24-28: Suzhou, China.

[図書] (計4件)

[1] Kishi H, Jin A, Ozawa T, Tajiri K, Obata T, Muraguchi A. Screening of antigen-specific antibody-secreting cells. Springer, Methods Mol Biol (2012) 853: 141-150.

[2] 小澤龍彦, 田尻和人, 岸裕幸, 村口篤, ニューサイエンス社, リンパ球アレイ法を用いた抗体医薬の開発. 細胞 (2011) 43: 20-23.

[3] 小澤龍彦, 岸裕幸, 村口篤, シングル細胞チップと抗体医薬への応用. シーエムシー出版, ナノ融合による先進バイオデバイス (2011) 50-57.

[4] 小澤龍彦, 岸裕幸, 村口篤, 新しい抗体スクリーニング法. 医薬の門社, 感染・炎症・免疫 (2011) 41: 29-37.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 抗原特異的ウサギ抗体産生細胞の迅速な特定方法およびその利用

発明者: 村口篤, 岸裕幸, 小澤龍彦

権利者: 同上

種類: 産業財産権

番号: 特願 2012-221822

出願年月日: 平成 24 年 10 月 4 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤 龍彦 (OZAWA TATSUHIKO)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・
助教

研究者番号: 10432105

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし