

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25630376

研究課題名(和文) GPCR立体構造特異的モノクローナル抗体の革新的作製技術の創製とその応用

研究課題名(英文) Advanced hybridoma technology for selective generation of stereospecific monoclonal antibodies to GPCRs and its application

研究代表者

富田 昌弘 (Tomita, Masahiro)

三重大学・工学研究科・教授

研究者番号：20183494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：革新的新技术に基づき、GPCRの1つであるストレス応答に関与するhCRHR1に対する立体構造特異的モノクローナル抗体(ssmAb)を作製した。Cell-ELISA法によって複数の陽性ハイブリドーマが確認でき、限界希釈法に基づきクローン化したところ、IgGおよびIgM両タイプのssmAbを得ることに成功した。さらに、他のGPCRに対する本新規法の応用性も証明できた。ssmAbが膜表面のhCRHR1を特異的に認識することを免疫蛍光染色法によって実証した。

研究成果の概要(英文)：Based on next generation of hybridoma technology, we could successfully generate stereospecific monoclonal antibodies (ssmAbs) against stress-related human CRHR1, which belongs to one of GPCRs. After Cell-ELISA positive hybridoma cells were cloned by limiting dilution method, not only IgM-typed but also IgG-typed ssmAbs were obtained. Furthermore, this new technology was applicable to selective production of ssmAbs against other GPCR. Immunofluorescence analysis demonstrated that ssmAb specifically recognized intact hCRHR1 on the cell surface.

研究分野：抗体工学

キーワード：バイオテクノロジー 生体分子 生体機能利用 免疫学 細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

モノクローナル抗体の作製法は、大きく分けて2つある。1つは、「ハイブリドーマテクノロジー」に基づき、抗体産生B細胞とミエローマ細胞(B細胞由来のガン細胞)を融合してハイブリドーマ細胞(雑種細胞)を取得し、モノクローナル抗体を作製する技術である。もう1つは、遺伝子工学を用いた方法である。どちらも優れた方法であるが、生体の本来の免疫機能を利用し、高特異的・高親和性のモノクローナル抗体を作製するには前者がより適している。ローらは、その技術に基づく画期的なB細胞ターゲティング法を世界で初めて開発した(Lo *et al.* Nature, 1984)。しかし、彼らの方法を含め現在までに報告されている殆ど全ての方法は、抗原のアミノ酸配列(一次構造)を認識するものであった。抗原となるタンパク質は、独自の高次構造によってその機能が発揮されるため、抗原の本来の機能解明には、その高次構造を特異的に認識するモノクローナル抗体の取得が必須となる。しかし、現在のところその成功例は報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、抗原として、多数の重要な情報伝達に関わっている7回膜貫通タンパク質である「GPCR(G protein-coupled receptor: Gタンパク質共役受容体)」に着目し、その立体構造を特異的に認識するモノクローナル抗体の革新的作製法を世界に先駆け創製、応用することを目的とした。

モノクローナル抗体は、目的抗原との高い特異性・親和性およびその均一性から基礎研究のみならず臨床分野でも幅広く利用されている。近年、次世代の分子標的治療薬として注目されており、世界中でその研究が展開している。抗原は独自の高次構造(二次構造および三次構造)を保持することによってその機能を発揮しているため、抗原の高次構造を特異的に認識するモノクローナル抗体の利用価値は、計り知れないほど高い。しかし、未だその作製方法は確立されていない。本研究では、抗原発現ミエローマ細胞を用いたB細胞選択に基づく「革新的作製技術」の確立を目ざした。

3. 研究の方法

(1) DNA免疫および組換え細胞の調製

立体構造特異的モノクローナル抗体(stereospecific monoclonal antibody: ssmAb)の取得には、立体構造を保持した状態で抗原をマウス免疫系に認識させ、目的の抗体産生B細胞を感作する必要がある。そのためにDNA免疫方法を利用した。抗原として、ヒトの副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン受容体1(human corticotropin releasing-hormone receptor 1: hCRHR1)を用い、その組換えプラスミドベクターを利用してDNA免疫法を行った。

本研究の目的達成のために、2種類の組換え細胞を調製した。1つは、hCRHR1発現ミエローマ細胞であり、もう1つは、hCRHR1発現CHO細胞である。前者は、立体構造特異的ターゲティング法(後述)において、感作B細胞の選択に用いるためのものである。また、後者は、Cell-ELISA法(後述)にて利用するために調製した。目的遺伝子(hCRHR1)の各細胞へのトランスフェクションは、HVJ(センダイウイルス)法に基づき行い、目的遺伝子の下流には蛍光タンパク質遺伝子を導入した。目的抗原の発現を蛍光タンパク質の発現を指標として確認した。

(2) 立体構造特異的ターゲティング(stereospecific targeting: SST)法

GPCRに対するssmAbの革新的作製技術を開発するため、1回膜貫通タンパク質でその有用性が示されているSST法を利用した。その骨子は、免疫化された目的B細胞を抗原発現ミエローマ細胞によって選択後、B細胞-ミエローマ細胞複合体を電気パルスによって選択融合する方法である。本新規法に基づき目的のssmAb産生ハイブリドーマを高効率かつ選択的に作製した。

(3) B細胞-ミエローマ細胞複合体の可視化解析

抗原抗体反応に基づき、hCRHR1発現ミエローマ細胞によって選択された目的のB細胞複合体を蛍光ラベルにて検証した。B細胞を蛍光標識(赤色)抗マウスIgG抗体によって可視化し、一方、hCRHR1発現ミエローマ細胞は、hCRHR1下流のGFPによる緑色蛍光にて検出した。

(4) Cell-ELISA (細胞-酵素免疫測定) 法
 ハイブリドーマ上清のモノクローナル抗体が目的抗原の立体構造を認識するかどうかを Cell-ELISA 法によって検証した。その原理は、hCRHR1 発現 CHO 細胞を立体構造を保持したインタクトな状態で 96 穴培養プレート上に固相化し、そこに ssmAb を含むハイブリドーマ上清を加えた。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識 2 次抗体 [抗マウス IgG(H+L) 抗体・HRP] を用いて発色させた。発色によって得られる OD_{490nm} 値 0.5 以上を指標として目的のハイブリドーマを取得し、限界希釈法に基づくクローニングを行った。

(5) 立体構造特異的モノクローナル抗体 (ssmAb) の高次構造保持抗原との特異的結合

ssmAb の立体構造保持標的抗原に対する結合能を検証するため、人工細胞および組換え細胞を用いて検証した。

① プロテオリポソーム (人工細胞)

hCRHR1 組換えバキュロウイルスを用いて、hCRHR1 の方向性を保った状態でリポソームと融合して人工細胞を構築した後、ssmAb を作用させ、特異的結合を検討した。

hCRHR1 発現 CHO 細胞 (組換え細胞)

hCRHR1 発現 CHO 細胞上の hCRHR1 抗原は、立体構造を保持した状態で発現されている。そこで、この組換え細胞に対して hCRHR1 特異的 ssmAb を作用後、蛍光標識 (赤色) 2 次抗体を加え、ssmAb の膜表面抗原への特異的結合を可視化解析した。

4. 研究成果

(1) 感作 B 細胞 - 抗原発現ミエローマ細胞複合体の可視化解析

本研究において、ストレス応答への関与が報告されている G-タンパク質共役受容体 (GPCR) の 1 つである hCRHR1 に着目し、その受容体に対する ssmAb の作製技術の創製とその応用について検討した。DNA 免疫後のマウス脾臓細胞中には、hCRHR1 に対する目的の感作 B 細胞が含まれていると考えられる。そこで、免疫後の脾臓細胞懸濁液を hCRHR1 発現ミエローマ細胞とインキュベートし、抗原発現ミエローマ細胞による B 細胞選択を可視化解析法にて検討した。その結果、B 細胞 - ミエローマ細胞複合体

を確認することができた (図 1)。この原理は、感作 B 細胞表面には目的抗原に対する抗体 (抗原レセプター) が発現されているため、抗原抗体反応に基づき hCRHR1 発現ミエローマ細胞と特異的に結合することができる。

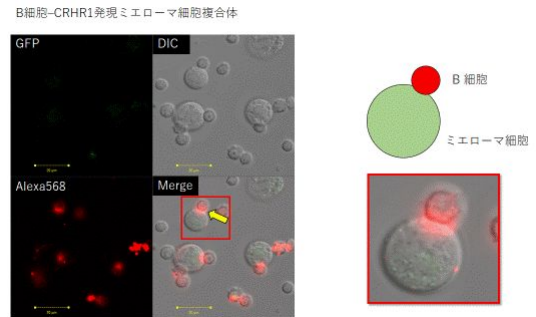


図 1. 感作 B 細胞 - 抗原発現ミエローマ細胞複合体の可視化解析

DNA 免疫後、感作 B 細胞上の抗原レセプターを介して、抗原発現ミエローマ細胞 (GFP 緑色蛍光を発現) によって目的の B 細胞を選択した。その後、抗マウス IgG 抗体 - Alexa 568 標識によって目的の B 細胞の蛍光標識 (赤色) を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて解析した。

(2) 立体構造特異的ターゲティング法 (SST 法) による立体構造特異的モノクローナル抗体 (ssmAb) の作製

図 1 において、SST 法の最も重要なステップの 1 つである目的 B 細胞 - ミエローマ細胞複合体を確認することができた。さらに、DNA 免疫後の血清中の抗体価を Cell-ELISA 法によって認めることができた。そこで、SST 法に基づき hCRHR1 に対する ssmAb の作製を試みた (図 2)。

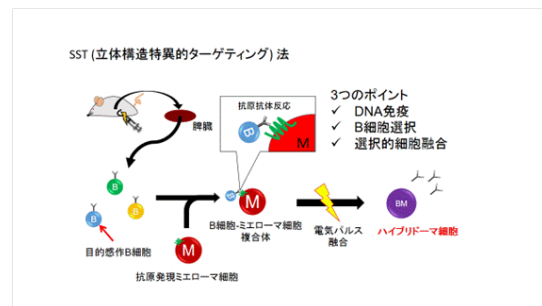


図 2. 立体構造特異的ターゲティング (SST) 法

hCRHR1 (抗原) 発現ミエローマ細胞によって感作 B 細胞を選択し、B 細胞 - ミエローマ細胞複合体を形成させた。両細胞に電気パルスを負荷することによって選択融合し、目的

の ssmAb 産生ハイブリドームを作製した。

CRHR1 Hybridoma 抗体価

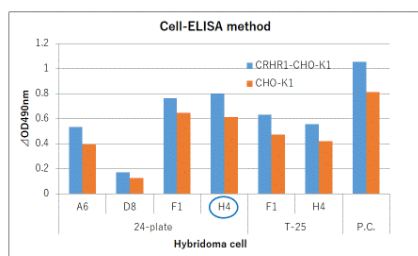


図 3. Cell-ELISA 陽性ハイブリドームの確認

Cell-ELISA 法に基づきハイブリドーム上清中の抗体価を測定し、目的の hCRHR1 に対する ssmAb のスクリーニングを行った。

具体的には、感作 B 細胞を hCRHR1 発現ミエローム細胞によって選択後、B 細胞 - ミエローム細胞複合体に対して直流矩形波の電気パルスを利用して選択融合することによって、目的の立体構造特異的抗体産生ハイブリドームを作製した。

その結果、多くのハイブリドームを確認でき、さらに、Cell-ELISA 陽性ハイブリドームを認めることができた (図 3)。本研究において、SST 法を利用して融合実験を繰り返し行ったところ、hCRHR1 に対する IgG タイプおよび IgM タイプの両タイプの ssmAb を得ることに成功した。また、本革新的技術の他の GPCR に対する有効性も検証したところ、Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4 (LGR4) に対する ssmAb の作製を示唆する結果が得られた。本新規技術の汎用性を実証することができた。

(3) 立体構造特異的モノクローナル抗体 (ssmAb) の立体構造認識の検証

SST 法によって作製された ssmAb の立体構造認識の検証を行った。この目的のためには、目的の hCRHR1 抗原がインタクトな状態で膜上に提示される必要がある。そこで、まず初めに、プロテオリポソームを用いて検討した。hCRHR1 組換えバキュロウイルスとリポソームを膜融合することによって、hCRHR1 提示プロテオリポソームを調製した。そこに、hCRHR1 に対する ssmAb を作用させたところ、予備的ではあるが特異的な結合が示された。

次に、hCRHR1 組換え CHO 細胞を用いた免疫蛍光染色法に基づきさらに検証した。限界希釈法によってクローン化されたハイブリドームによって産生される hCRHR1 に対する ssmAb (クローン名: H4-D11-C9) を使用した。

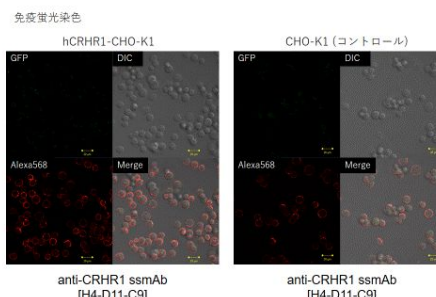


図 4. 免疫蛍光染色による立体構造認識の検証

hCRHR1 発現 CHO 細胞および CHO 細胞 (コントロール) に対して、クローン化された ssmAb (H4-D11-C9) を作用させ、Alexa568 標識 (赤色蛍光) 抗マウス IgG(H+L) 抗体を利用して、免疫蛍光染色を行った。

その結果、hCRHR1 発現 CHO 細胞に対して特異的に結合する ssmAb を確認することができた (図 4)。一方、コントロールの CHO 細胞にも蛍光標識が認められた。この結果は、図 3 の Cell-ELISA 法の結果と一致していた。すなわち、ヒト由来の CRHR1 に対する ssmAb が CHO 細胞上のハムスター由来の CRHR1 にも交差反応することを示している。この結果は、大変興味深いと考えられる。目的タンパク質の高次構造認識に基づき、種を超えた抗原特異性を有することを示唆している。

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 16 件)

R. Hikosaka, F. Nagata, M. Tomita, K. Katsuya, Optimization of pore structure and particle morphology of mesoporous silica for antibody adsorption for use in affinity chromatography, *Appl. Sur. Sci.*, 2016, 384, 27-35, 査読有。

DOI:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.05.016>

T. Hattori, K. Nakanishi, T. Mori, M.

Tomita, K. Tsumoto, The method used to culture host cells (Sf9 cells) can affect the qualities of baculovirus budding particles expressing recombinant proteins, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2016, 80, 445-451, 査読有.
DOI:10.1080/09158451.2015.1101331

K. Nakanishi, M. Tomita, K. Kato, Gold nanoparticle-mesoporous silica sheet composites with enhanced antibody adsorption capacity, *New J. Chem.*, 2015, 39, 4070-4077, 査読有.
DOI:10.1039/c5nj00033e

M. Tomita, C. Miyamae, Y. Isozaki, Y. Yamasaki, K. Tsumoto, Strict targeting of receptors by stereospecific monoclonal antibodies, *FEBS J.*, 2014, 281(Suppl.1), 503-504, 査読有
DOI: なし

T. Orita, M. Tomita, K. Nakanishi, K. Kato, Immunoprecipitation of bisphenol A by antibody-mesoporous silica composites, *J. Asian Ceram. Soc.*, 2014, 2, 275-280, 査読有
DOI: org/10.1016/j.jascer.2014.05.010

T. Shimizu, T. Mori, M. Tomita, K. Tsumoto, pH switching that crosses over the isoelectric point (pI) can improve the entrapment of proteins within giant liposomes by enhancing protein-membrane interaction, *Langmuir*, 2014, 30, 554-563, 査読有.
DOI: jx.doi.org/10.1021/la403361j

K. Nakanishi, M. Tomita, H. Nakamura, K. Kato, Specific binding of immunoglobulin G to protein A-mesoporous silica composites for affinity column chromatography, *J. Mater. Chem. B* 1, 2013, 1, 6321-6328, 査読有.
DOI: 10.1039/c3tb20998a

[学会発表](計 93 件)

Y. Isozaki, H. Miura, K. Tsumoto, M. Tomita, Advanced hybridoma technology for stereospecific monoclonal antibodies as a next therapeutic medicine, 10th Anniversary International Symposium on Nanomedicine (ISNM2016), 24-26 November 2016, Auditorium of National Institute of Advanced Industrial

Science and Technology (AIST)(茨城県、つくば市)

磯崎勇志、三浦広己、湊元幹太、冨田昌弘、次世代抗体医薬を目指した立体構造特異的モノクローナル抗体の作製およびその評価、第 68 回日本生物工学会大会、2016 年 9 月 28 日-30 日、富山国際会議場(富山県、富山市)

三浦広己、磯崎勇志、湊元幹太、冨田昌弘、GPCR 特異的立体構造認識モノクローナル抗体の効率的作製法の開発とその応用、第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 25 日-27 日、仙台国際センター/東北大学(宮城県、仙台市)

中西航平、西上美佐子、冨田昌弘、湊元幹太、インテグリンを再構成した巨大組換えプロテオリポソームの調製、第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 25 日-27 日、仙台国際センター/東北大学(宮城県、仙台市)

K. Tsumoto, K. Nakanishi, T. Hattori, M. Tomita, Recombinant baculovirus particles as resources of membrane proteins for artificial cell membrane reconstitution, The Fourth Japan-China symposium on Nanomedicine, 12-13 May 2016, Kitakyushu International Center (福岡県、北九州市)

C. Miyamae, Y. Isozaki, K. Tsumoto, M. Tomita, Selective generation of stereospecific monoclonal antibodies for the next generation of new therapeutic medicines, 9th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2015), 10-12 December 2015, Mie University(三重県、津市)

Y. Isozaki, C. Miyamae, K. Tsumoto, M. Tomita, Anti-GPCR monoclonal antibodies as novel antibody medicine, 9th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2015), 10-12 December 2015, Mie University(三重県、津市)

磯崎勇志、宮前智帆、湊元幹太、冨田昌弘、SST 法に基づく立体構造認識モノクローナル抗体の作製、BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会合同大会) 2015 年 12 月 1 日-4 日、神戸ポートアイランド(兵庫県、神戸市)

磯崎勇志、宮前智帆、湊元幹太、冨田昌弘、受容体特異的立体構造認識モノクロ

ーナル抗体の効率的作製、第 67 回日本生
物工学会大会、2015 年 10 月 26 日-28 日、
城山観光ホテル（鹿児島県、鹿児島市）

Y. Yamasaki, C. Miyamae, Y. Isozaki, K.
Tsumoto, M. Tomita, Stereospecific
Targeting of Receptors, 8th
International Symposium on
Nanomedicine (ISNM2014), 4-6 December
2014, Ehime University (愛媛県、松山市)

K. Tsumoto, M. Nishigami, T. Mori, M.
Tomita, A novel method for developing
GUV artificial cell membranes
displaying recombinant protein
receptors with baculovirus expression
systems, 8th International Symposium
on Nanomedicine (ISNM2014), 4-6
December 2014, Ehime University (愛媛
県、松山市)

富田昌弘、山崎康裕、磯崎勇志、宮前智
帆、湊元幹太、立体構造認識次世代ハイ
ブリドーマテクノロジーの開発とその可
視化解析、第 37 回日本分子生物学会年会、
2014 年 11 月 25 日-27 日、パシフィコ横
浜（神奈川県、横浜市）

M. Tomita, C. Miyamae, Y. Isozaki, Y.
Yamasaki, K. Tsumoto, Strict targeting
of receptors by stereospecific
monoclonal antibodies, FEBS EMBO 2014
Conference, 30 August - 4 September,
2014, Paris, France.

M. Tomita, K. Tsumoto, Next generation
of therapeutic antibodies, The
eighteenth International Conference on
Human Antibodies & Hybridomas
(HAH2014), 31 March - 2 April, 2014,
Vienna, Austria.

富田昌弘、革新的高効率特異的抗体作製
技術の迅速疾病診断への応用、JST 新技
術説明会、2014 年 1 月 14 日、JST 東京別
館ホール（東京都）

M. Tomita, K. Tsumoto, New hybridoma
technology for selective production of
stereospecific monoclonal antibodies,
7th International Symposium on
Nanomedicine (ISNM2013), 7-9 November
2013, Kyushu Institute of Technology
(福岡県、北九州市)

K. Tsumoto, M. Nishigami, T. Mori, M.
Tomita, Cell-sized liposomes: Basic
structures for mimicking cell systems,
7th International Symposium on
Nanomedicine (ISNM2013), 7-9 November

2013, Kyushu Institute of Technology
(福岡県、北九州市)

〔図書〕(計 1 件)

K. Tsumoto, Y. Isozaki, M. Tomita, John
Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ.,
Culture of Animal Cells: A Manual of
Basic Technique and Specialized
Applications, Seven Edition
(authored/edited by R. Ian Freshney),
25.6 Production of Monoclonal
Antibodies, 2016, 728 (p544-545).

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：微生物の迅速診断を可能とする特異抗
体の高効率作製法

発明者：富田昌弘

権利者：国立大学法人三重大学

種類：特許

番号：特願 2013-209093

出願年月日：平成 25 年 10 月 4 日

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

[http://www.bio.chem.mie-u.ac.jp/index.h
tml](http://www.bio.chem.mie-u.ac.jp/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 昌弘 (TOMITA Masahiro)

三重大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：20183494

(2) 研究分担者

湊元 幹太 (TSUMOTO Kanta)

三重大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：80362359