

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860378

研究課題名(和文)疾患バイオマーカーの微量検出を目的とする超高親和力変異抗体の効率的創出法の開発

研究課題名(英文) Development of efficient methods for preparation of high-affinity antibody mutants suitable for sensitive detection of small biomarker molecules

研究代表者

大山 浩之(Oyama, Hiroyuki)

神戸薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：80572966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：高親和力で特異的な抗体は、臨床検査における体外および体内診断薬として有用である。しかし、従来のハイブリドーマ法で得られる抗体の性能には限界がある。そこで、天然の抗体遺伝子を改変する抗体工学が期待されているが、膨大な多様性をもつ抗体提示ファージライブラリーから目的の改良分子種を効率的に選別することは困難である。この問題を解決するために、本研究ではフローサイトメトリーの原理を基盤とする改良抗体の革新的な単離法の確立を目指した。必要なキー試薬であるモノクローナル抗ファージ抗体を作製し、これを人工のミニ抗体(scFv)に改変した。さらに、発光タンパク質との融合体を調製し、その有用性を検討した。

研究成果の概要(英文)：Antibodies with high affinity and specificity work as a powerful tool for in vitro and in vivo clinical diagnosis. These antibodies have been prepared by the hybridoma method using immune spleen cells, but often lack sufficient binding abilities. Recent antibody engineering technology could improve the native antibodies, but considerable labor and period are required to select rare improved binders from a vast library of various mutated antibodies. To overcome this problem, this study aimed to develop innovative methods for isolating the improved species based on the flow cytometry principle. We prepared a key reagent for these systems, a monoclonal anti-phage antibody, and converted it to relevant single-chain Fv fragment (scFv). Moreover, this scFv was linked with a luminescent protein, and utility of this fusion protein was investigated.

研究分野：医歯薬学

キーワード：抗体工学 臨床化学

1. 研究開始当初の背景

体外および体内診断薬として優れた抗体は高感度で特異的な臨床検査法を確立するうえで強力なツールとなるが、その調製法には動物を免疫するB細胞ハイブリドーマ法が多用されている。こうした天然の抗体分子を遺伝子レベルで改変する抗体工学が発展してきたが、膨大な多様性をもつ抗体提示ファージライブラリーから目的の改良分子種を効率的に選別することが困難であることが多かった。

2. 研究の目的

疾患バイオマーカーを精密に認識・捕捉する抗体は、高感度で特異的な臨床検査法を確立するうえで強力なツールになる。診断用モノクローナル抗体は、主にB細胞ハイブリドーマ法で調製されているが、近年、その機能を遺伝子操作によりさらに改善する抗体工学の試みがなされている。抗体の抗原結合部位を構成するH鎖およびL鎖の可変部ドメインの遺伝子にランダム変異を加えた後に一本鎖 Fv フラグメント (single-chain Fv fragment; scFv) に変換し、適当な宿主内で発現させて莫大な多様性をもつ変異抗体のライブラリーを調製し、偶然に生成した改良型分子種を選択・単離するものである。*in vitro* の実験系で短期間に改良型分子種を得ることから、「試験管内分子進化」とも呼ばれる。改良型分子種を効率良く単離するために、scFv を繊維状バクテリオファージ粒子の表面に発現させる、「遺伝型 - 表現型一体化」の手法が活用される。すなわち、「ファージ抗体」のライブラリーを作製し、ごく希少な改良型分子種を、大量に副生する「改悪分子種」から選別しつつ単離する。具体的には、目的の抗原を固定化した固相にファージライブラリーをまとめて反応させて、非特異的なファージを洗浄・除去した後に、特異的なファージを一般的には酸、塩基を加えて溶出・回収する。この選択・単離の手法は「パンニング」と呼ばれている。

以上の原理と基本的な実験系は 1990 年代前半にほぼ確立され、天然の抗体を遙かに上回る「スーパー抗体」を創出しようとする革新的な方法論と期待あるいは喧伝されてきた。しかし、現実にはそのような水準には程遠い。上記のポテンシャルは理論上は明白であるにもかかわらず、実用的な抗体

を作製するうえでハイブリドーマ法には未だ及ばない。申請者らのように、両方を共に経験している限られた研究者のみが知る事実である。申請者は、これまで抗体の試験管内分子進化について研究を続け、パンニングによる改良型クローンの選別効率の悪さが、上述の低迷の一因であると確信するに至った。本法に用いられる繊維状ファージは極めて疎水性が大きい粒子であり、パンニング中に試験管などに非特異的に吸着するうえ、相互に会合・凝集する。このため、固定化抗原との反応系には大量のキャリアタンパク質が添加されるが、それでも不十分で、特異的なファージの溶出・回収操作において、非特異的なファージも大量に混入してくるため、その後の目的クローンの特定が困難になる。そこで、例えば、フローサイトメトリーを応用した全く新しい改良分子種の効率的選別法を開発してこの問題を抜本的に解決する。ファージ粒子を水溶性の高い抗ファージ抗体で被覆して分散させた後、溶液中で蛍光標識抗原と反応させ、フローサイトメーターに付して、抗原を捕捉したファージ粒子を個別にソーティングするのである。この試みが成功すれば、ライブラリーの中に極微量に存在する超高親和力抗体発現クローンの単離も可能になり、「試験管内分子進化」は、名実ともに次世代の診断薬を創出しようとする戦略基盤として完成するものと期待される。

3. 研究の方法

(1) マウスモノクローナル抗ファージ抗体の創製

ファージ提示法でヘルパーファージとして多用される VCSM13 を大腸菌から大量調製してポリエチレングリコールにより沈殿精製したのち、免疫原として用いた。これを免疫増強剤とともに BALB/c マウスに隔週で皮下投与し、4 回繰り返した。免疫マウスから採血した血清について ELISA で抗体価を調べた。すなわち、VCSM13 ファージを固定化したマイクロプレートにマウス血清を加えて反応させた。プレートを洗浄後、ここへ、ペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体を加えて検出した。

(2) 野生型抗ファージ一本鎖 Fv フラグメントの創製

抗ファージ抗体産生ハイブリドーマ細胞から mRNA を抽出して、逆転写反応により

cDNA を得た。さらにこれを鋳型にして PCR を行い、 V_H および V_L 遺伝子をクローニングした。その塩基配列を決定し、 V_H および V_L ドメインのアミノ酸配列を推定した。クローニングした V_H および V_L 遺伝子を overlap extension PCR により連結して *scFv* 遺伝子を構築した。これを発現ベクターに組込んだのち、大腸菌に導入して可溶性抗ファージ-scFv をペリプラズム抽出液として調製し、その VCSM13 に対する結合能を ELISA により調べた。VCSM13 を固定化したマイクロプレートに *scFv* を加えてインキュベートした。プレートを洗浄したのち、*scFv* の C 末端に付加した FLAG タグを認識するペルオキシダーゼ標識抗 FLAG 抗体を反応させ、固相に残る酵素活性を吸光光度法で測定した。

(3) 抗ファージ *scFv*-Gaussia ルシフェラーゼ融合タンパク質の創製

クローニングした抗ファージ *scFv* 遺伝子の下流に海洋プランクトンの一種であるカイアシ類の *Gaussia princeps* に由来する *Gaussia* ルシフェラーゼ (*GLuc*) 遺伝子を連結させ、発現ベクターに組み込んだのち大腸菌に導入した。この形質転換菌を培養してペリプラズム抽出液を調製し、*scFv*-*GLuc* 融合タンパク質を得た。本融合タンパク質のファージ結合能を ELISA で調べた。VCSM13 ファージを固定化したマイクロプレートに *scFv*-*GLuc* を加えて 37 °C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、固相に残存する *GLuc* 活性をセレンテラジンを基質として添加し、直ちに発光強度 (480 nm) を測定した。

4. 研究成果

(1) マウスモノクローナル抗ファージ抗体の創製

免疫したマウス 5 匹の血清を ELISA で調べたところ、強い陽性反応が認められたマウスを選別し、最終免疫したのち、その脾細胞をミエローマ P3/NS1/1-Ag4-1 細胞と融合させた。融合後の細胞を HAT 選択してハイブリドーマの選択培養を行い、これらの上清を ELISA に付して目的の抗体の有無を調べた。その結果、90 種のハイブリドーマの培養上清が強い陽性反応を示し、限界希釈によるクローニングを経て 4 種のマウスモノクローナル抗ファージ抗体産生ハイブリドーマ株を樹立した (図 1)。

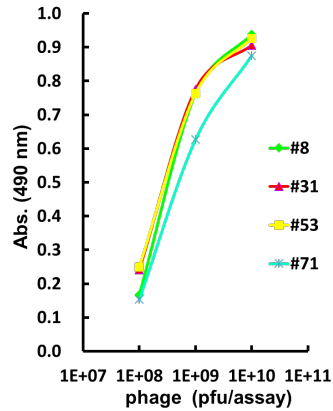


図 1. 得られた 4 種のクローンを用いる ELISA の用量作用曲線

(2) 野生型抗ファージ一本鎖 Fv フラグメントの調製

野生型抗ファージ *scFv* 遺伝子を導入して得られた形質転換菌を培養して調製したタンパク質の VCSM13 ファージに対する反応性を ELISA により調べた。その結果、 $10^7 \sim 10^9$ pfu のファージの添加で競合現象に伴うシグナルの減少が認められた。また、本タンパク質を精製したのち SDS-PAGE に付したところ、30 kDa 付近に単一のバンドとして確認され、多量体の存在は認められなかった (図 2)。本 *scFv* タンパク質を介して蛍光標識抗 FLAG 抗体を用いて、ファージ粒子の蛍光観察を共焦点レーザー顕微鏡により行った。その結果、 10^7 pfu のファージ量では蛍光観察が可能と判断されたが、フローサイトメトリーでの目的ファージの検出には感度が不足していると考えられた (図 3)。そこで蛍光標識よりも高感度な発光タンパク質との融合タンパク質を調製してこの不足を補えるか検討した。

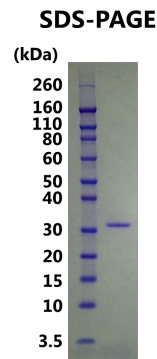


図 2. SDS-PAGE による *scFv* タンパク質の発現の確認

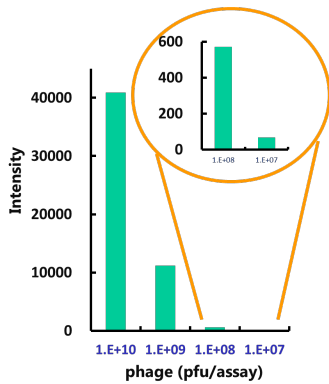


図 3. 抗ファージ scFv を用いる蛍光抗体法

(3) 抗ファージ scFv-*Gaussia* ルシフェラーゼ融合タンパク質の創製

scFv-GLuc 遺伝子を導入した形質転換菌を培養して得られたタンパク質を精製したのち、SDS-PAGE に付したところ、52 kDa 付近に scFv-GLuc と予想されるバンドが認められ、ウェスタンブロッティングによりファージとの反応性を有することが認められた (図 4)。次にこの scFv-GLuc のファージへの結合能を ELISA で調べたところ、 10^6 cfu 以上のファージ量についてバックグラウンドと明瞭に識別することが可能であった。本融合タンパク質はマイクロアレイを用いるファージ粒子の選別において目的ファージの検出およびそのファージ産生大腸菌の特定に有用であると期待している。

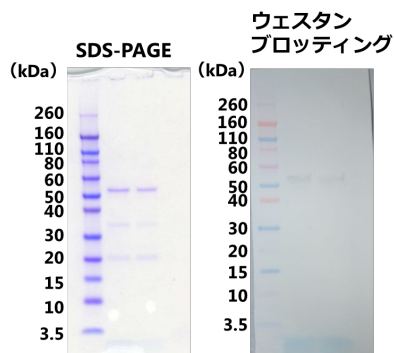


図 4. SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングによる scFv-GLuc の発現の確認

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 1 件)

H. Oyama, I. Morita, Y. Kiguchi, S. Miyake, A. Moriuchi, T. Akisada, T. Niwa, N. Kobayashi, *Gaussia* luciferase as a

genetic fusion partner with antibody fragments for sensitive immunoassay monitoring of clinical biomarkers, *Anal. Chem.*, **87**(24), 12387-12395, 2015. 査読有.
DOI: 10.1021/acs.analchem.5b04015

〔学会発表〕(計 16 件)

黒田 裕美, 森田 いずみ, 伊藤 綾, 小山 千尋, 池田 夏美, 大山 浩之, 小林 典裕, 「オンサイト分析を目的とする Teoc 化覚せいアミンに対するモノクローナル抗体の作製」日本薬学会第 136 年, 2016.03.28, パシフィコ横浜 (横浜).

山本 知佳, 大山 浩之, 木口 裕貴, 森田 いずみ, 小林 典裕, 「抗エストロジオール scFv 試験管内親和性成熟機構の解析(2)」日本薬学会第 136 年, 2016.03.28, パシフィコ横浜 (横浜).

木口 裕貴, 藤田 真聡, 片山 恵美子, 大山 浩之, 森田 いずみ, 小林 典裕, 「高性能変異抗体の効率的単離を目的とする抗ファージ抗体 scFv - GLuc 融合体の調製」日本薬学会第 136 年, 2016.03.28, パシフィコ横浜 (横浜).

大山 浩之, 江浪 友理, 田川 達矢, 山本 知佳, 森田 いずみ, 小林 典裕, 「改良型抗エストロジオール scFv の親和性成熟機構の解析」日本分析化学会第 64 年会, 2015.09.11, 九州大学 (福岡).

大山 浩之, 宮下 貴之, 森田 いずみ, 小林 典裕, 「scFv - ルシフェラーゼ融合タンパク質を用いるチロキシン生物発光 ELISA の試み」日本分析化学会第 64 年会, 2015.09.11, 九州大学 (福岡).

大山 浩之, 江浪 友理, 山本 知佳, 田川 達矢, 小林 典裕, 「高親和力抗エストロジオール変異 scFv の創製とその親和性成熟機構の解析」第 55 回日本臨床化学会年次学術集会, 2015.10.31, 大阪大学 (吹田).

大山 浩之, 「試験管内親和性成熟による実用抗体の創製: 低分子バイオマー

カーを例に」生物化学的測定研究会第20回学術シンポジウム, 2015.11.13, 神戸薬科大学 (神戸).

Morita I., Oyama H., Kobayashi N., ““Antibody breeding” for more sensitive immunoassay 2 : Human urinary cotinine ELISA using an affinity matured scFv to monitor tobacco smoke exposure”, *European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2015.06.22, Paris (France).

Oyama H., Kobayashi N., ““Antibody breeding” for more sensitive immunoassay 1 : Three-step affinity maturation generated an improves scFv suitable for serum estradiol -17 beta ELISA”. *European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, , 2015.06.22, Paris (France).

Oyama H., Kobayashi N., “Sensitive luminescent ELISA for human serum cortisol using a fusion protein combining anti-cortisol scFv and Gaussia Lusiferase”, *European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2015.06.22, Paris (France).

伊藤 綾, 安尾まゆみ, 竜田都加, 森田 いずみ, 大山 浩之, 小林 典裕, 「大麻成分に対するモノクローナル抗体の調製とキャラクタリゼーション」日本薬学会第135年会, 2015.03.27, 神戸学院大学 (神戸).

堀江 有紀, 土屋 沙織, 大山 浩之, 小林 典裕, 斎藤 博幸, 「アミロイドーシスの病態解明を目指した抗 ApoA- モノクローナル抗体の作製」日本薬学会第135年会, 2015.03.27, 神戸学院大学 (神戸).

森田 いずみ, 西村 沙貴, 蓑田 早耶香, 木口 裕貴, 大山 浩之, 小林 典裕, 「抗コチニン scFv の親和性成熟における部位特異的変異の効果」日本薬学会第135年会, 2015.03.27, 神戸学院大学 (神戸).

大山 浩之, 江浪 友理, 木口 裕

貴, 森田 いずみ, 小林 典裕, 「抗エストロジオール scFv 試験管内親和性成熟機構の解析」日本薬学会第135年会, 2015.03.27, 神戸学院大学 (神戸).

森田 いずみ, 平井 杏奈, 西村 沙貴, 大山 浩之, 太田 光熙, 小林 典裕, 「改良型変異 scFv フラグメントを用いるヒト尿中コチニンのモノクローナル ELISA」日本分析化学会第63年会, 2014.09.19, 広島大学 (東広島).

大山 浩之, 三宅 沙也香, 森田 いずみ, 丹羽 俊文, 小林 典裕, 「高感度ヒト血清中コルチゾール ELISA の開発を目的とする scFv-ルシフェラーゼ融合タンパク質の創製」日本分析化学会第63年, 2014.09.19, 広島大学 (東広島).

〔図書〕(計 1 件)

生物化学的測定研究会編 (小林 典裕, 他) 講談社, 免疫測定法 基礎から先端まで, 2014, 336.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大山 浩之 (OYAMA HIROYUKI)
神戸薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：80572966