

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：12608

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26889028

研究課題名(和文)新規免疫素子Q-bodyを用いたClaudinの生細胞イメージング

研究課題名(英文)Development of Quenchbody to image and quantify tumor-associated membrane protein claudin

研究代表者

鄭熙陳 (Jeong, Hee-Jin)

東京工業大学・資源化学研究所・助教

研究者番号：70737981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、当研究室で最近開発されたQuenchbody(Q-body)を用いた簡便迅速な新規免疫測定法を用いて、多くの癌細胞においてその異常発現が報告されているクローデインを検出することに成功した。クローデイン特異的な抗体遺伝子を用いてQ-bodyを作製し、クローデイン精製蛋白質添加時の蛍光強度を測定した結果、精製蛋白質の濃度依存的にQ-bodyの蛍光強度が増加し、最大約3.1倍の蛍光応答が確認された。更に、クローデイン発現細胞にQ-bodyを添加した際に細胞膜上に顕著な蛍光が観察され、Q-bodyを用いて簡便に細胞膜上のクローデインをイメージすることができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we successfully detected claudins which are abnormally expressed on cancer cells by Quenchbody(Q-body)-based simple and convenient novel immunoassay method. We constructed Q-body using anti-claudin antibody gene and measured the fluorescent intensity in the present of purified claudin. As a result, the intensity was claudin-concentration dependently increased and showed the maximum 3.1-fold response. Moreover, when we added the Q-body into the claudin-expressed cells, it showed significant fluorescent, indicating the effort of this Q-body for imaging the over-expressed claudins.

研究分野：抗体工学

キーワード：クエンチボディー クローデイン 免疫センサー 細胞イメージング

1. 研究開始当初の背景

近年、ファージ提示法などにより得られたヒト型抗体が、治療用抗体としてがんや関節リウマチなど多くの難治性疾患に絶大な効果を示しているのは周知の通りである。その一方で、高価な治療用抗体の投与においては、その標的分子や、治療にあたってその効果を予測するための、分子の濃度や分布を簡便かつ正確に調べることでできる診断薬(コンパニオン薬)の必要性が益々高まってきている現状がある。特に、抗体と抗原との結合が特異的であることに基づく免疫測定法は、測定対象物質として生体物質、非生体物質を問わず、広範囲な物質を対象として、混合物中に微量に存在する物質を選択的に、かつ感度よく検出・定量可能である。そのことから、抗体を用いた免疫測定法は各種診断マーカーの高感度かつ特異的検出など、幅広い分野で使用されており、その重要性は増加してきている。しかし、従来の免疫測定法は高感度であるが、測定に時間と手間を要す上、測定対象を低分子と高分子に分けて異なる方法を用いる必要があった。

以上の背景のもと、最近当研究グループでこのような問題を潜在的に解決しうる新規免疫センサー蛋白質 Quenchbody (以下、Q-body) の作製原理が見出された。その作製法は、目的分子に対する抗体配列を一本鎖抗体(scFv)またはFab化し、そのN末端近傍に蛍光色素結合配列を導入し、蛍光色素標識を行うものである。Q-bodyを用いた測定は、抗原非存在時には抗体分子内のトリプトファン残基によって色素の蛍光が消光(クエンチ)されているが、抗原結合により抗体断片が空間的に移動し、消光が解除されるという今までに無いまったく新しい原理に基づく。Q-bodyを用いた測定法は、微量サンプルを測定試薬と混合し、数分後にその蛍光強度を測定するだけで測定が完了し抗原の定量が可能となる簡便性、迅速性、抗体次第で低分子から高分子まで検出できる汎用性など多くの利点を持つ。しかし、これまでQ-bodyを細胞内外の抗原の蛍光観察に応用した例はなかった。

クローデインは、分子量約25 kDaの4回膜貫通型の膜タンパク質であり、N末端とC末端は細胞質側に存在し、さらに細胞外に2つの細胞外ループを持っている。N末端側は通常10残基以下と短く、C末端側は21~63残基で、クローデインが密着結合に局在するために必要な部分である。クローデインの主な機能はタイトジャンクションにおける細胞間パイヤーの中心的な働きである。また、発見する細胞によってその構造は微妙に異なっており、現在までに27種類まで報告されている。さらに、クローデインは癌との関連性も深いことが知られている。現在までに様々な癌細胞において、その異常発現が次々と報告されてきており、特にクローデイン4に関しては、卵巣癌や乳癌など、様々な腫瘍

においてその異常発現が観察されている。

2. 研究の目的

本研究では、蛋白質やその修飾の動態を知ることが出来る、Q-bodyを用いた細胞イメージングを目指した。特に、Q-bodyの膜タンパク質検出への応用を目指し、クローデインの細胞外領域の検出を試みた。クローデインは多くの癌細胞においてその異常発現が観察されていることから、最終目標としては新しい癌診断法の開発を目指している。

3. 研究の方法

大阪大学大学院薬学研究科近藤昌夫准教授の研究グループからご提供いただいた、クローン化されたクローデインの細胞外領域を認識する抗体遺伝子5種類(クローデイン1特異的な2D1, 3A2と、クローデイン4特異的な4D3, 5A5, および5D12)を用いて大腸菌にてFabを発現した。その後、各クローデインを膜発現する細胞を用いて抗原結合能の評価を行った。詳しくは、計5種類の抗体の可変領域の遺伝子を、Fab発現用ベクターに組み込んだ。その後、大腸菌を用いてFabを発現し、HisタグやFlagタグを用いて精製した。SDS-PAGEによってその発現を確認し、結合を確認するアッセイを行った。

次に、結合能を有するFabに蛍光色素を部位特異的に修飾してQ-bodyを作製し、精製クローデインでのQ-bodyの性能を評価した。特に、Cysタグ前のGSリンカー、抗体クローン、色素の種類、Bufferの検討および各段階における反応条件の最適化を行い、タンパク質の収量と修飾効率の最大化を試みた。

最後に最適化されたQ-bodyを用いて実際にクローデイン発現細胞のイメージングを行い、Q-bodyを細胞イメージングに用いることの有意性を確認した。

4. 研究成果

作製した5種類全てのFabを可溶性タンパク質として得ることに成功し、精製度も高いことを確認した。細胞膜上Claudinへの結合活性を示した結果に関しては、最初はELISAと固定法での蛍光免疫染色で結合能の評価を行ったが、良い結果は得られなかった。その原因としては、今回用いたクローデイン抗体はいずれも細胞外領域の立体構造を認識するものであり、ELISA法でのプレートへの固定や、免疫染色の際のスライドガラスへの固定と細胞膜の浸透操作では抗原の構造が壊れ、抗体が認識できなくなっていると考えられる。しかし、生細胞のままでの結合性の評価(フローサイトメトリー、固定しない方法の蛍光免疫測定法)では、抗クローデイン4 Fabに関しては、抗原に対する明らかな結合性が示された。また、抗クローデイン1抗体に関しては、3A2 Fabの多少の結合性は示されたが、3A2フル抗体ほどの明らかな結合性は見られず、その結合性は低下しているの

ではないかと思われる。Fab に変えた際にその安定性や結合性が低下したのではないかと推測される。

次に、TAMRA-C5 ラベル Q-body を調製し、各濃度の Claudin-4 精製タンパク質を加え、室温で 2 時間反応させた後その蛍光強度を測定した。この結果、精製蛋白質を用いた実験より、二種類の Claudin-4 Q-body に関してその蛍光強度増加の濃度依存性が見られ、Claudin-4 の高感度検出に成功した。抗原濃度依存的な蛍光強度の変化が測定されたことから、クローディン 4 の定量が可能であることが示された。なお、その検出限界値は、元々のフル抗体の KD 値を考慮しても感度の良い値であり、今後さらに濃い濃度のクローディン 4 精製タンパク質を用いることが出来れば、より正確な検量線が作成できると同時に、その定量製も増加するだろう。

さらに、抗クローディン 4 Fab に関して、リンカーの有無からクローン間の差、さらに蛍光色素の差と反応緩衝液の影響を検討した。結果として、リンカー無し、蛍光色素は ATTO520 もしくは TAMRAC5 がよく、またクローンは 5A5, 5D12 が適しているだろうということが示された。これらが適していた理由については、抗体の構造(トリプトファン の位置、Cys-tag と抗原結合界面の距離)や色素同士の影響(H-dimer 形成、疎水性相互作用、電化)などが考えられる。反応緩衝液の影響に関しては、0.05% Tween20 入りの反応緩衝液 PBS (PBST) と、Tween20 入れていない反応緩衝液 PBS (PBS) の両者で、蛍光応答の差が見られた。その理由として、おそらく色素の電荷は疎水性が関わっているだろうと考えられる。ATTO520 は、分子内で電気的に陽性であり、界面活性剤 Tween20 の影響で色素が外に出やすくなった可能性がある。また、TAMRA-C5 は電気的に中性であり、Tween20 の影響をあまり受けなかった可能性がある。以上の結果から、以降細胞を用いて実験することも考慮し (PBS が望ましい)、最も適した Q-body は TAMRAC5 で修飾した 5A5 であると結論付けた。

最後に、クローディン 4 を細胞膜上発現するヒト筋芽細胞 HT1080 を用いて、Q-body による細胞膜上クローディンの観察を行った。用いた Q-body は全部で 4 種類である(クローン 5A5, 5D12 と色素 ATTO520, TAMRA の組み合わせ)。その結果、ATTO520 修飾 Q-body に関しては、どちらのクローンも明確な細胞膜のイメージングを確認することができなかったのに対し、TAMRAC5 修飾 Q-body では細胞膜を綺麗にイメージングすることに成功した。これにより、播種した細胞に Q-body を添加するだけで膜上のクローディンを観察することに成功したと言える。さらに、クローディン発現細胞イメージングへの Q-body の有意性を確認するため、Alexa488 を用いて従来の抗体修飾法(非特異ラベル)でラベルした 5A5 Fab を作製し、それと今回

作製した Q-body との比較を行った。その結果、洗浄過程がないので、非特異的にラベルされた従来法での Fab に関しては、バックグラウンドの蛍光が高すぎて明確に細胞膜が見えなかったのに対し、Q-body を用いた場合は明確な細胞膜の染色が確認できた。これは、クローディン 4 に結合していないときの Q-body がクエンチした状態であり、洗浄過程無しでもバックグラウンド蛍光が低く抑えられているからである。それに対して、非特異ラベルした 5A5 Fab は抗体内の N 末端やリシン残基の一級アミンがラベルされているので、蛍光色素は通常時ほとんどクエンチしておらず、クローディン 4 に結合していない時でも蛍光を発していると考えられ、それでバックグラウンド蛍光が高くなる。非特異ラベリングを行った Alexa488 は TAMRA とは波長がかなり異なるため、厳密には比較できないが、それを考慮した上でも Q-body だけが洗浄過程なしで明確にイメージングできたとと言える。

本研究では、膜タンパク質であるクローディンの細胞外領域特異的に認識する抗体の遺伝子配列から Fab を発現し、それを用いて Q-body を合成することができ、さらには溶液中のクローディン 4 の定量が可能であるだけでなく、細胞膜に発現するクローディン 4 のイメージングにも成功した。これは、Q-body として膜タンパク質を検出することに成功した初めての例であり、Q-body の汎用性の広さが示されただけでなく、今後クローディン以外の膜タンパク質検出への足がかりとなることが期待される。また、今回クローディン 4 に関しては、nM レベルでの定量も可能であることが示された。将来的に血中のエキソソーム上の異常クローディン検出などに応用できれば、血液レベルでの癌診断が可能となる可能性がある。もちろん、細胞膜上の発現異常をイメージングできれば、それだけで癌診断に応用できる可能性がある。いずれにしても、本研究でクローディン 4 に対する Q-body の開発に成功したことで、今後の癌診断の発展に大きく寄与できることを期待できる。今後、これらの Q-body を体内でのがん細胞イメージング、あるいは血中エキソソーム上の異常クローディン検出などに応用することで、本法が生体内外での新しい癌診断法となることが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

1. Abe R, Jeong HJ, Arakawa D, Dong J, Ohashi H, Kaigome R, Saiki F, Yamane K, Takagi H, and Ueda H. Ultra Q-bodies: quench-based antibody probes that utilize dye-dye

interactions with enhanced antigen-dependent fluorescence. *Sci Rep*, 2014; 4:4640, 査読有.

2. Jeong HJ and Ueda H. Strategy for making a superior Quenchbody to proteins: effect of the position of fluorophore. *Sensors*, 2014; 14:13285-97, 査読有.
3. Jeong HJ, Itayama S, and Ueda H. A signal-on fluorosensor based on quench-release principle for sensitive detection of antibiotic rapamycin. *Biosensors*, 2015; 5:131-40, 査読有.
4. Dong J, Jeong HJ, and Ueda H. Preparation of Quenchbodies by protein transamination reaction. *J Biosci Bioeng*, 2016; 15: 00447-8, 査読有.
5. Jeong HJ, Kawamura T, Dong J, and Ueda H. Q-bodies from recombinant single chain Fv fragment with better yield and expanded palette of fluorophores. *ACS Sens*, 2016; 1: 88-94, 査読有.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 河村拓哉、飯田愛未、川東祐美、滝川睦美、鍾蟬伊、鄭熙陳、董金華、近藤昌夫、上田 宏、がん関連膜タンパク質クロードイン高感度検出のための蛍光抗体プローブの開発、化学工学会第 80 年会、2015 年 3 月 19 日、東京都江東区芝浦工業大学 (ポスター賞受賞)
2. 鄭熙陳、河村拓哉、飯田愛未、川東祐美、滝川睦美、鍾蟬伊、董金華、近藤昌夫、上田 宏、がん関連膜蛋白質クロードインを認識する Quenchbody の開発、第 15 回蛋白質科学会年会、2015 年 6 月 24 日、徳島県徳島市あわぎんホール
3. 河村拓哉、鄭熙陳、飯田愛未、川東祐美、滝川睦美、鍾蟬伊、董金華、近藤昌夫、上田 宏、がん関連膜タンパク質クロードイン可視化のための Quenchbody の開発、第 9 回バイオ関連化学シンポジウム、2015 年 9 月 10 日、熊本市中央区熊本大学
4. H. Ueda, H. Jeong, T. Kawamura, M. Iida, Y. Kawahigashi, M. Takigawa, C. Chung,

J, Dong, M, Kondoh, Development of Quenchbody to image and quantify tumor-associated membrane protein claudin, The international chemical congress of pacific basin societies 2015、2015 年 12 月 18 日、Hawaii, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鄭 熙陳 (Jeong, Hee-Jin)

東京工業大学・資源化学研究所・助教

研究者番号：70737981