

3P-033 一細胞解析を目指したキنگィヨ抗体の定量的測定系の開発

○額田 夏生¹, アヴシャル 恵利子¹, 都築 祥子¹, 中井 沙織¹, 田丸 浩^{1,2,3}
 (¹三重大・生資, ²三重大・新産業, ³三重大・生命支セ)
 ytamaru@bio.mie-u.ac.jp

【背景】7回膜貫通型タンパク質 G-protein coupled receptor (GPCR) などの創薬標的に対する特異的抗体を取得できるかどうか抗体医薬開発において重要である。一方、免疫寛容などの問題によってマウスなどの哺乳動物を免疫しても、有用な抗体が作製できない場合がある。このような課題を克服するために脊椎動物の源流に位置しており、自然免疫系に加えて獲得免疫系を有する魚類を用いた抗体生産系の開発に着目した。本研究は、スイホウガン（水泡眼）という眼下に角膜が肥大化した水泡を有するキنگィヨを免疫動物とした抗体測定系を確立するために、水泡液中に含まれるキنگィヨ Immunoglobulin M (gIgM) の定量的検出法の開発を行った。

【方法・結果】抗 gIgM ウサギポリクローナル抗体を作製するために、大腸菌を用いて発現させた gIgM 重鎖の CH3 領域の組換えタンパク質を精製しウサギへ免疫を行った。Western blotting 法の結果より、得られた抗 gIgM ウサギ抗体は水泡液および血清中の gIgM 重鎖に特異的に反応することが確認された。さらに、水泡液から精製した gIgM および抗 gIgM ウサギ抗体を用いて、ELISA 法による gIgM の定量的測定を行った。その結果、濃度依存的に gIgM を測定することに成功した。キنگィヨ IgM の定量的測定が可能になったことから、標的抗原に対する特異的抗体を生産する B 細胞を一細胞レベルで検出することが可能になり、抗体医薬開発に繋がると大いに期待できる。

Development of quantitative determination against goldfish IgM towards single-cell analysis

○Natsuki Nukada¹, Eriko Avsar¹, Shoko Tsuzuki¹, Saori Nakai¹, Yutaka Tamaru^{1,2,3}
 (¹Fac. Bioresour., Mie Univ., ²Ind. Technol. Innov. Inst., Mie Univ., ³Life Sci. Res. Center, Mie Univ.)

Key words antibody, ELISA, goldfish, IgM

3P-035 がん細胞成長阻害活性を有する多量体化抗 EGFR 一本鎖抗体の精密機能解析

○浅野 竜太郎¹, 小山 典明¹, 鉦 陽介¹, 古本 祥三², 荒井 杏子¹, 尾形 裕未¹, 梅津 光央¹, 熊谷 泉¹
 (¹東北大院・工・バイオ工, ²東北大・学際科学フロンティア研)
 ryutaro@prn.che.tohoku.ac.jp

低分子抗体は、イメージング剤などへの応用が期待されてきたが、通常結合価数が一価であるため親和性が低い。低分子抗体のひとつである一本鎖抗体 (scFv) は、リンカー長等の改変がもたらす多量体化により、親和性を向上させることができるが、近年多量体化により IgG にはみられない薬効を示す例も報告されている。本研究は、多量体化によりがん細胞の成長阻害活性を示す抗ヒト上皮増殖因子受容体 (EGFR) scFv の詳細な解析を様々な観点から進めた。抗 EGFR scFv の二量体と三量体に関して、まず EGFR のリン酸化を調べたところ、多量体化により IgG 抗体と同様の阻害能を示すことが明らかになり、このことががん細胞の成長阻害活性をもたらしたと考えられる。また担がマウスを用いた *in vivo* 実験においても、いずれも有意な抗腫瘍効果を示したが、特に三量体に市販の抗体医薬に匹敵する効果が確認された。さらに、三量体の調製溶液中に四量体が含まれることを見出し、培養と精製条件の検討により、それぞれを分離することに成功した。四量体は、三量体に比べて EGFR に対するより高い親和性、より強いがん細胞の成長阻害活性、およびより長い血中半減期を示し、数か月保存後も目立った三量体への解離がみられなかったことから、分子種として比較的安定であることがいえる。微生物で生産可能な多量体化抗 EGFR scFv、特にその四量体分子は、イメージング剤のみならず、治療薬としても期待が持たれる分子である。

Detailed analysis on anti-EGFR scFv multimers with tumor growth inhibition effect

○Ryutaro Asano¹, Noriaki Koyama¹, Yosuke Masakari¹, Shozo Furumoto², Kyoko Arai¹, Hiromi Ogata¹, Mitsuo Umetsu¹, Izumi Kumagai¹
 (¹Dept. Biomol. Eng., Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., ²FRIS, Tohoku Univ.)

Key words scFv, antibody, antitumor, kinase

3P-034 インフルエンザウイルス検出用新規免疫測定素子 UQ-body の構築

○董 金華, 鄭 熙陳, 上田 宏
 (東工大)
 ueda@res.titech.ac.jp

【背景と目的】 インフルエンザウイルスの検出には抗体を用いた免疫測定法が主に用いられる。しかし、ELISA 法では時間がかかり、イムノクロマトグラフィ法は偽陰性率が高いのが問題となっている。本研究では、新規免疫測定素子 Ultra Quenchbody (UQ-body) を用いたインフルエンザウイルス検出法を検討した。

【方法及び結果】 Quenchbody 法 (1) は、蛍光色素を抗体の内部に導入し、抗原不在時にこれを消光させ、抗原との結合時にこれが外部に放出され、再び蛍光を発する、という原理による簡便迅速な免疫測定法である。本研究ではインフルエンザウイルス抗体 Fi6v3 の二種類の Fab 断片を大腸菌により発現させた。これらの重鎖、および一種類の軽鎖のアミノ末端に Cys-Tag を付加しておき、ここに蛍光色素 TAMRA あるいは ATTO520 を修飾し、シングル及びダブルラベル UQ-body を作製した (2)。これらを用いて、インフルエンザウイルス H1N1 A/New Caledonia/20/1999 組換えヘマグルチニン HA を検出したところ、TAMRA 修飾 UQ-body は 10⁻⁷ M、ATTO520 修飾 UQ-body は 10⁻⁸ M の HA を検出できた。今後無毒化ウイルスを用いた検出系の検証と、構造改良による測定感度向上の検討を予定している。文献: 1) Abe et al., JACS, 133:17386-94, 2011 2) Abe et al., Sci. Rep., 4:4640, 2014

Construction of a novel immunosensor UQ-body for the detection of influenza viruses

○Jinhua Dong, Hee-Jin Joeng, Hiroshi Ueda
 (Tokyo Tech)

Key words Influenza virus, Immunoassay, Ultra-Quenchbody

3P-036 抗体断片群からの迅速な二重特異性低分子抗体の調製と活性ルール抽出

○杉山 在生人, 中澤 光, 細川 勝洗, 浅野 竜太郎, 熊谷 泉, 梅津 光央
 (東北大院・工・バイオ工)
 mitsuo@prn.che.tohoku.ac.jp

抗体は、標的分子に対する高い特異性と親和性を有しており、分子標的薬としてがん治療などに利用されている。しかし、現在の抗体には、より高いリンパ球活性化や、より腫瘍深部への浸透性が求められる時がある。その解決策として、細胞数の多い T-リンパ球を利用し、かつ、低分子化により腫瘍深部に浸透しやすくなる低分子型二重特異性抗体が提案されている。この二重特異性抗体は、がん細胞および T-リンパ球各表面上の蛋白質を標的とする抗体の結合機能ドメインのみから構成されており、T-リンパ球をがん細胞表面に集積させることで効率的にがん細胞の傷害を誘導でき、かつ、低分子ゆえ腫瘍深部への浸透も期待できる。この二重特異性抗体は、構成抗体の機能特性 (標的分子、エピトープ) によって、傷害活性が 10³ のオーダーで変化する。つまり、活性変化の原因を解明できれば、活性の高い組換え抗体を作製できる可能性がある。そこで我々は、現在、多くの腫瘍がんに過剰発現している上皮増殖因子受容体群 (EGFR 群) を標的分子とする抗体 13 種と、T-リンパ球上の活性化シグナル伝達タンパク質 (CD3, CD28) を標的とする抗体を構成要素とした抗体 4 種を対象として、100 種以上の二重特異性抗体を迅速に設計・活性評価を行うプロセスを開発することによって、高活性な二重特異性抗体が持つ機能特性を抽出することを試みている。今回は、このシステムを利用して、52 種類の組換え抗体の活性評価を同時に行い、高活性を示す分子や高収量の候補分子を見出したので報告する。

How effective new small bispecific antibodies are created from existing antibody library

○Aruto Sugiyama, Hikaru Nakazawa, Katsuhiko Hosokawa, Ryutaro Asano, Izumi Kumagai, Mitsuo Umetsu
 (Dept. Biomol. Eng., Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

Key words antibody, protein engineering, bispecific, cancer