

<p>サブテーマ名： マウス長鎖cDNAがコードする蛋白質に対する抗体作製技術の開発及びその作製・評価</p> <p>小テーマ名：</p> <p>① 抗原部位推定技術の開発 ② ハイスループットな抗体作製技術 (H13-H15)</p> <p>① 組換え完全長 mKIAA 蛋白質の産生 (H16)</p> <p>① 抗体精製の歩留まりと費用概算の提示、②組織染色を利用した作製抗体の評価、③抗ヒト KIAA 蛋白質ウサギポリクローナル抗体の100個の取得 (H17)、</p> <p>①mKIAA 抗体の商品化に向けての品揃え、②組織染色を利用した作製抗体の評価 (H18)</p>
<p>サブテーマリーダー (所属、役職、氏名) 千葉県産業振興センター (研究員) 原 康洋、島田 希代</p> <p>小テーマリーダー (所属、役職、氏名) (株) プロテイン・エクスプレス、副社長、高木 広明</p> <p>研究従事者 (所属、役職、氏名) (株) プロテイン・エクスプレス (研究員) 岸 フク子 (H16を除く)・竹内 淳 (H16を除く)・中川 啓、(部長)宮内 明、(部長) 恵比須 省吾、(副社長) 高木 広明</p>
<p>研究の概要、新規性及び目標</p> <p>①研究の概要</p> <p>機構分研究開発 (テーマ2、サブテーマ1) において、マウス長鎖cDNAがコードするタンパク質を大腸菌で発現精製し、ウサギに免疫して抗血清を作製している。本テーマは、この研究開発を支援するものである。具体的には、効率的な抗原タンパク質と抗体の作製技術の構築と開発、抗体の品質評価を行う。さらに、取得した抗体を、創薬研究や遺伝子解析等の基礎研究用ツールとして早期に順次商品化することを目指す。</p> <p>②研究の独自性・新規性</p> <p>本テーマ自体には新規性や独自性は低いが、国内外を問わず本事業と同様なコンセプトを持つプロジェクトは実施されていなく、本共同研究開発事業を実施しツールの取得、開発は重要である。特に、抗体の精製の要不要や精製度に関するシステムティックな情報はなく、精製抗体を試作しユーザーが満足するレベルでの品質を立証するところに新規性がある。抗体の特異性評価では、力価評価のみでなくウエスタンブロッティング、免疫化学的組織染色法まで総合的に方法を確立し実施するところが従来とは異なり、ユーザーの立場に立った評価であり、フェーズⅡやフェーズⅢでの商品化を見据えた研究開発である。</p> <p>③研究の目標 (フェーズ毎に数値目標等をあげ、具体的に)</p> <p>フェーズⅠ (H13-H15) : 機構分で年間400種、事業終了時2000種の抗体作製を目標としたため、早期に抗体作製方法論を提案・反映できる体制づくりに努めるとともに、発現用プラスミドの構築、発現用プラスミドの改良を目指した。</p> <p>フェーズⅡ (H16-H18) : KIAAクローンに対する抗血清をモデルとして、免疫前血清、抗血清、特異精製抗体の品質評価を行う。特異精製抗体の評価として、疾患組織に対する組織染色を行い、疾患マーカータンパク質探索の可能性を探る。</p> <p>取得した精製抗体は、創薬研究用及び遺伝子解析等の基礎研究用ツールとして早期に順次商品化することを目指す。</p> <p>フェーズⅢ (H18、11.25事業完了日以降) : 抗体商品を充実させる。また、プロテインチップへの活用を図り、創薬研究用及び遺伝子解析等の基礎研究用ツールとして提供するビジネスを継続する。</p>
<p>研究の進め方及び進捗状況 (目標と対比して)</p> <p>1) フェーズⅠ、Ⅱの抗体作製の改良や精製方法の開発は、事業分で作製する2000種類の抗体作製法に反映させるため、当社で先行して行なっているヒトKIAA遺伝子からの抗体作製の結果をできるだけ早くフィードバックさせるようにする。</p> <p>2) 疾患組織の抗体染色は、東京医科大学と共同で行なう。</p> <p>3) 抗体の商品化のために、販売会社を選定した (和光純薬株式会社)。</p>
<p>主な成果</p> <p>具体的な成果内容：</p> <p>①抗原作製の標準化</p> <p>1. ショットガン断片の発現プラスミドへの変換を目的に3系統のGateWay 発現ベクターを作製した。</p> <p>2. 網羅的発現に適した宿主大腸菌として Rosetta 株を選定した。</p> <p>3. 発現させるcDNAが多種であることから、抗体作製の実績が多いC末端領域を抗原部位として優先させることが最も効率的であると判断した。</p> <p>4. GFP融合全長タンパク質を発現する目的で、昆虫細胞用発現ベクター、小麦胚芽無細胞用発現ベクターを作成した。</p>

②抗体精製に関する知見。

1. 免疫前血清、抗血清、抗原アフィニティ精製抗体によるヒト組織パラフィン包埋切片に対する反応性を検討した。抗血清、または免疫前血清による組織染色において、高いバックグラウンドになることが多く、未知タンパク質に対する特異的な反応性の判断には、抗原アフィニティ精製抗体が重要であると思われた。
2. 抗体作製の歩留まりと問題点  
 抗原の精製度が抗体の品質に大きく影響を及ぼす。特に、大腸菌 Heat Shock Proteins 由来抗体の除去は抗体の精製では困難なため、抗原精製時にできるだけ分離することが好ましい。大腸菌による抗原作製 (GST 融合タンパク質)、抗血清の取得、特異精製 (MBP-抗原でアフィニティ精製) による抗体の取得それぞれの工程の歩留まりは、80%、90%、70%であり、全工程での特異精製取得率は 50%であった。高品質抗体が取得できないとき、同一抗原部位での再調整による取得率は 25%であった。抗体が得られない場合は、別の抗原部位による抗体取得を試みるのが好ましい。

③精製抗体を用いた肺がん組織の組織染色

13種類の抗体を選び、10症例の肺がん組織を染色し、6抗体が反応した。その中で、抗体KD0281は、B細胞性リンパ腫に選択的に反応し、T細胞性リンパ腫には反応しなかった。また、後腹膜線維症では腫瘍性のものに反応し、非腫瘍性には反応しなかった。精製抗体による組織染色により、疾病マーカータンパク質を発見できる可能性を示した。

④抗体の商品化

1. 精製抗体5種類を有償配布した。
2. 簡易精製 (ProteinA精製) 21種類を有償配布準備中。

特許件数：0                      論文数：（主要論文は別途提出ください）0                      口頭発表件数：0

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比

国内外を問わず、本事業と同様なコンセプトを持つプロジェクトは実施されていない。抗体は蛋白質解析ツールとして重要であり、組換え蛋白質に特異的な抗体は遺伝子と蛋白質をつなぐツールとなる。また、抗体チップや抗体アレイはプロテオーム解析や診断薬・治療薬の開発に重要なツールとなってくると期待されている。従って、高品質の抗体を保有することは、ポストゲノム研究として重要なプロテオーム研究をより発展させる研究用ツールを担うと期待される。

2 実用化に向けた波及効果

本事業で取得を予定した2,000種の精製抗体という高付加価値ツールをゲノム創薬やバイオ基礎研究者に提供できるようになる。これにより、バイオテクノロジー産業全般への効果、あるいは、疾病の治療や予防に結びつく新薬、臨床検査薬、新しい治療法の開発に結びつけば、国民の健康や医療経済面への効果が期待できる。

残された課題と対応方針について

極めて特異性の高いポリクローナル抗体作製のためにはコストがかかる。コストと品質を両立できる新規抗体の製造方法や精製方法の開発が重要になる。

	J S T 負担分 (千円)							地域負担分 (千円)							合 計
	H 13	H 14	H 15	H 16	H 17	H 18	小計	H 13	H 14	H 15	H 16	H 17	H 18	小計	
人件費								1,266	5,257	2,405	2,787	2,638	1,480	15,833	15,833
設備費															
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)								383	1,639	788	676	610	2,372	6,468	6,468
旅費															
その他															
小 計								1,649	6,896	3,193	3,463	3,248	3,852	22,301	22,301

代表的な設備名と仕様 [既存 (事業開始前) の設備含む]

J S T 負担による設備：なし

地域負担による設備：タンパク質精製装置 (AKTA)、光学顕微鏡、マイクローム、DNAシーケンサー、電気泳動装置、ルミノイメーリアナライザー