

研究区分	教員特別研究推進 地域振興
------	---------------

研究テーマ	抗薬物抗体に対する高親和性 DNA アプタマーの獲得と ADA アッセイへの展開				
研究組織	代表者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	轟木 堅一郎
	研究分担者	所属・職名	東京農工大学・教授	氏名	池袋 一典
		所属・職名		氏名	
		所属・職名		氏名	
	発表者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	轟木 堅一郎

講演題目	微量抗体に対する抗イディオタイプ DNA アプタマー獲得法の開発
研究の目的、成果及び今後の展望	<p>【目的】当研究室では抗体医薬を特異的に認識する抗イディオタイプ DNA アプタマーによるバイオアナリシス法を開発してきた^{1, 2)}。このアプタマーの獲得には高度な操作と長期間を要していたことから、最近我々は誰でも迅速かつ簡便に抗イディオタイプ DNA アプタマーを獲得できるよう、タンパク質精製用クロマトグラフと大量 DNA を用いた結合スクリーニング法を報告した³⁾。しかしながらこの方法では、mg スケールの標的抗体を必要とするため抗薬物抗体や中和抗体など大量入手が難しい微量抗体に対するアプタマー獲得には適用が困難であった。本研究では微量抗体に対して比較的容易に抗イディオタイプ DNA アプタマーを獲得するための新たな手法を考案した。本法では PCR チューブの内壁に微量の標的抗体を吸着保持させ、25 mer のランダム配列を持つ DNA ライブラリーとチューブ内で結合解離反応⁴⁾を行う。結合した DNA のみをチューブ内で PCR 増幅し、これを標識抗体が固定された別の PCR チューブに移す。この操作を繰り返すことで微量の標的抗体に結合する配列のみが濃縮される。この配列を NGS 解析後、アプタマー探索アルゴリズム RaptRanker⁵⁾、更には mfold による二次構造予測、HDOCK⁶⁾によるドッキングフォームの評価および CDR 接近アミノ酸数の推定を行い、最適候補配列の導出を行った。今回、標的抗体には trastuzumab (製剤名 Herceptin) を用いた。</p> <p>【方法】200 μL PCR チューブに trastuzumab 溶液を一晩かけて固定させた後、洗浄やブロッキング操作を行った。このチューブに 25 mer のランダム配列を持つオリゴ DNA を加え、99 サイクルの PCR 操作を行った。これらの操作を 10 ラウンド連続で行い、7、10 ラウンドの反応液を併せて NGS 解析した。解析結果を RaptRanker でランク付けし、上位 30 配列に対し mfold による二次構造予測と順位付け、trastuzumab の Fab 構造 (PDB: 6MH2) との HDOCK によるドッキングスコア算出と順位付け、CDR 近接 (3 Å 以内) アミノ酸数の推定と順位付けを行い、その総合順位から上位配列を決定した。</p> <p>【結果】総合評価が最も高かった配列の二次構造の ΔG 値、ドッキングスコア、CDR 近接アミノ酸数はそれぞれ、-2.26 kcal/mol、-333.00、13 個であり、高い結合親和性とイディオタイプ性が示唆された。BLI 法により算出したこの配列の解離定数 (K_d 値) は 8.7 nM であり、同アプタマーをリガンドとする LBA においてヒト血清中 trastuzumab 分析への可能性を示すことができた。</p> <p>【参考文献】1) <i>Anal. Chem.</i>, 91, 3125 (2019), 2) <i>Molecules</i>, 24, 857 (2019), 3) <i>J. Pharm. Biomed. Anal. Open</i>, 1, 100006 (2023), 4) <i>J. Immunol. Methods</i>, 296 45 (2005), 5) <i>Nucl. Acids Res.</i>, 48, e82 (2020), 6) <i>Nat. Protoc.</i>, 15 1829 (2020).</p>