

ペプチドアプタマーによる がんマーカー検出技術開発

埼玉大学 大学院 理工学研究科 物質科学部門

教授 松岡 浩司

(先端産業国際ラボラトリー メディカルイノベーション研究ユニット)

2020年 1月21日



cDNAディスプレイによるVHH抗体の取得

① 次世代抗体スクリーニング技術

(cDNAディスプレイ法)

⇒ 次世代抗体の獲得

② AIE(凝集誘発発光)技術

(ウイルス等との結合により)

⇒ ウイルスの見える化

③ 機能性微粒子作製技術

(種々の微粒子作製法)

⇒ 検出・診断系に応用

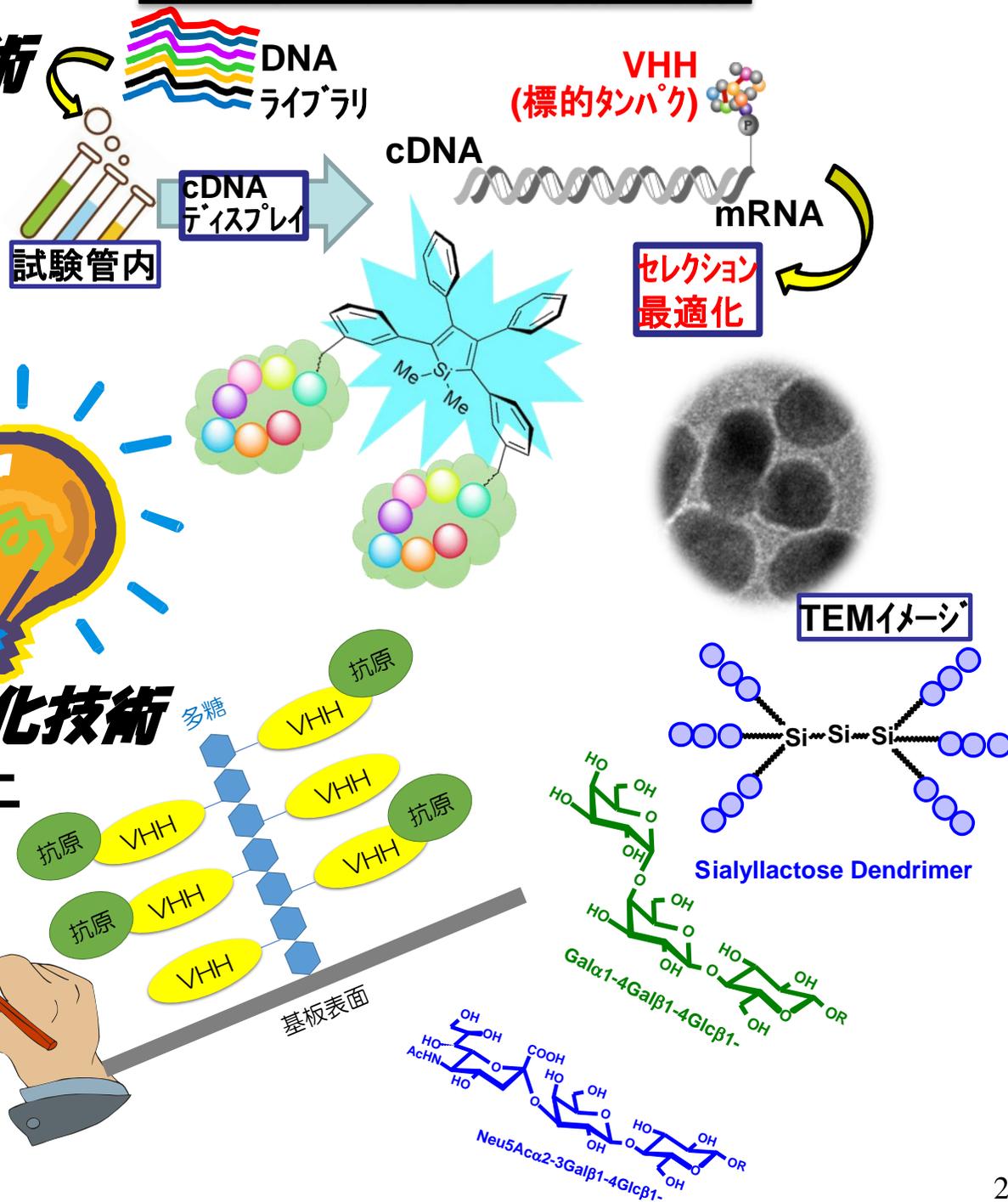
④ 多価化合物によるクラスター化技術

⇒ 多価接着による感度向上

⑤ 糖鎖活用技術

⇒ オリゴ糖合成、機能化

基盤技術



本技術の要旨

- **がんマーカー**として知られる**ミッドカイン(Midkine; MK)**が、カルシウムイオン非存在条件下にて**カルモジュリン結合ペプチド(Calmodulin-binding peptide; CBP)**に対して**高い親和性を持つ**ことを見出した。
- 表面プラズモン共鳴(SPR)法による分子間相互作用解析装置であるBIAcore X100を用い、**ミッドカイン—CBP結合の特異性を確認**し、またその**解離定数を求めた**。
- **CBP**は、**抗MKペプチドアダプター**として、**診断・検査キットへの高い応用可能性が示唆される**。

本技術の背景

ミッドカイン (Midkine; MK)

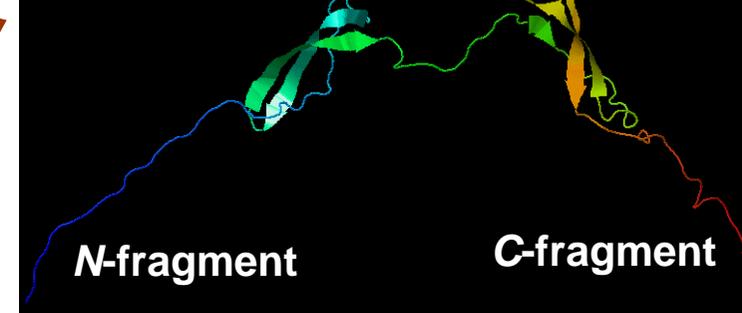
☞ 胚性腫瘍細胞の分化初期において
一過性に発現する **増殖・分化因子**

☞ **ヒトがんの多くで発現が増大**
(食道がん, 胃がん, 大腸がん, 肝臓がん等)

⇒ **がん患者血清中MK値が多くのケースで増大**

腫瘍マーカーとしての有用性 高

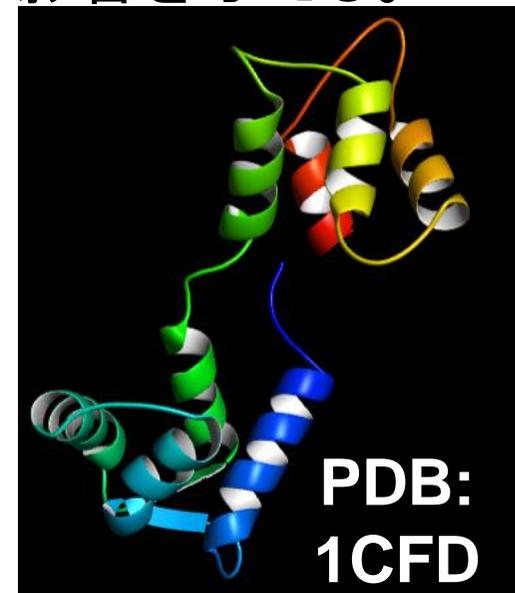
PDB: 2LUT



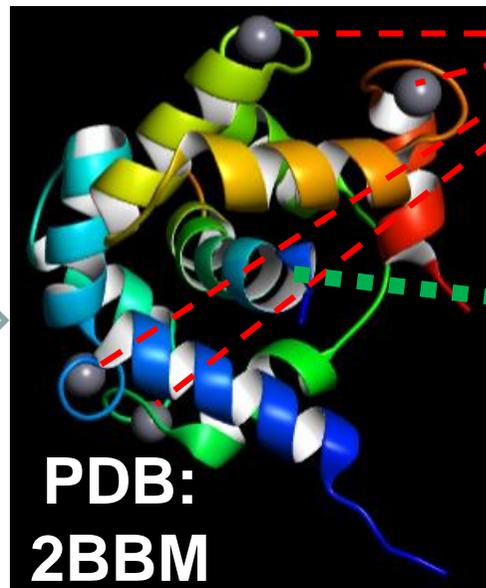
ゼブラフィッシュ ミッドカインの溶液中立体構造

カルモジュリン結合ペプチド (Calmodulin-binding peptide; CBP)

カルシウム結合タンパク質で、多種類のタンパク質の制御を行い、様々な細胞機能に影響を与える。



+4 Ca²⁺



Ca²⁺

KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL



ミオン軽鎖リン酸化酵素のカルモジュリン結合ドメイン

従来技術とその問題点

先行技術との比較

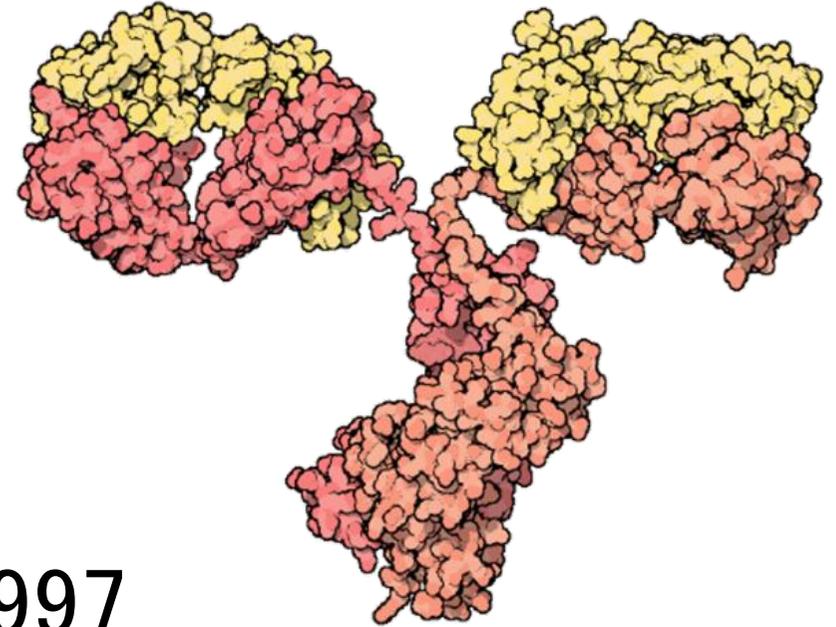
☞ 抗MKモノクローナル抗体(mAb)

⇒ウサギ`由来のIgG

☞ 抗MK RNAアプタマー

⇒WO2008/059877 &

WO2014/080997



抗体の立体構造の一例

デメリット

- ✓ 安定性
- ✓ 生産性

一般的な抗体の
エピトープは

5~8アミノ酸残基

⇒これで十分???

実施例

BIAcore X100 を用いた分子間相互作用測定

アナライト: ヒトミッドカイン(hMK), ウシ血清アルブミン(BSA), 緑色蛍光タンパク質(GFP), ウサギ血清由来免疫グロブリンG(IgG), サバイヒン(Suv)

リガンド: 変異型カルモジュリン結合ペプチド(mtCBP);

Biotin-AAARWKKAFIAVSAANRFKKIS

野生型カルモジュリン結合ペプチド(wtCBP);

Biotin-AAARWKKNFIAVSAANRFKKIS

NM23タンパク質結合性ペプチド(anti-NM23 pep.);

Biotin-IRNGPSSP

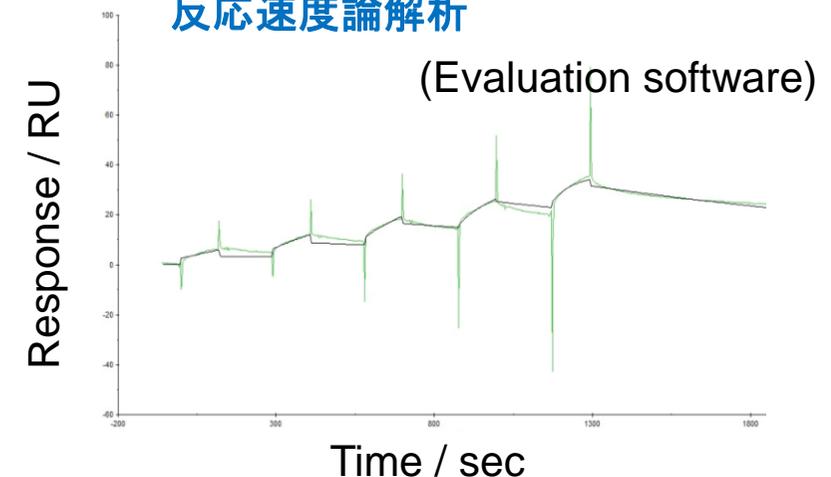
MKとmtCBPが分子間相互作用を示すことを確認

結合速度定数 (k_a) = 7.113×10^4 (1/Ms)

解離速度定数 (k_d) = 5.785×10^{-4} (1/s)

解離定数 ($K_D = k_d/k_a$) = 8.132×10^{-9} (M)

反応速度論解析



実施例

BIAcore X100 を用いた分子間相互作用測定

アナライト: ヒトミッドカイン(hMK), ウシ血清アルブミン(BSA), 緑色蛍光タンパク質(GFP), ウサギ血清由来免疫グロブリンG(IgG), サバイビン(Suv)

リガンド: 変異型カルモジュリン結合ペプチド(mtCBP);

Biotin-AAARWKKAFIAVSAANRFKKIS

野生型カルモジュリン結合ペプチド(wtCBP);

Biotin-AAARWKKNFIAVSAANRFKKIS

NM23タンパク質結合性ペプチド(anti-NM23 pep.);

Biotin-IRNGPSSP

	Midkine	BSA	GFP	IgG	Survivin
mtCBP(変異型)	◎	×	×	×	×
wtCBP(天然型)	○	-	-	-	-
Anti-NM23 pep.	×	-	-	-	-

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術の問題点であった、**安定性を改良**することに成功した。
- 従来は大量合成の点で極微量の使用に限られていたが、**グラムオーダーで合成することが可能**となった。
- 本技術の適用により、抗体がペプチドで置換できるため、**製造コストが1/10～1/100程度まで削減**されることが期待される。

想定される用途

がんマーカー検査キットへの応用イメージ

抗原

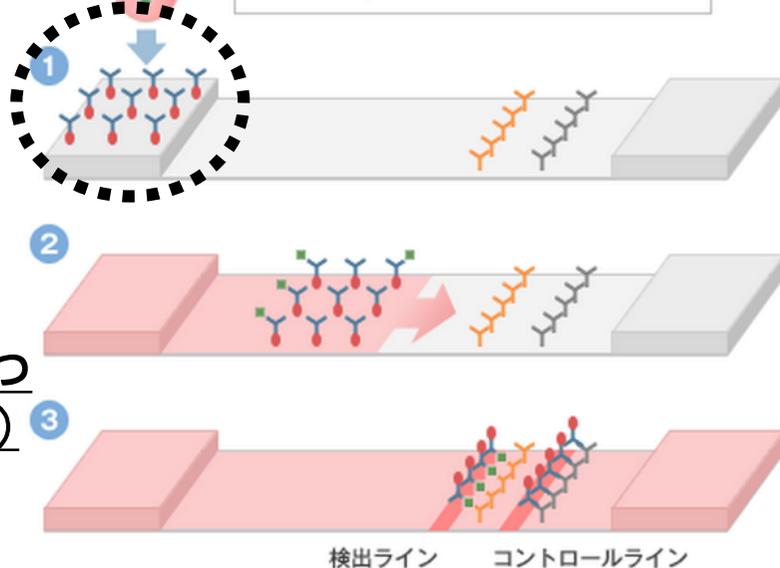
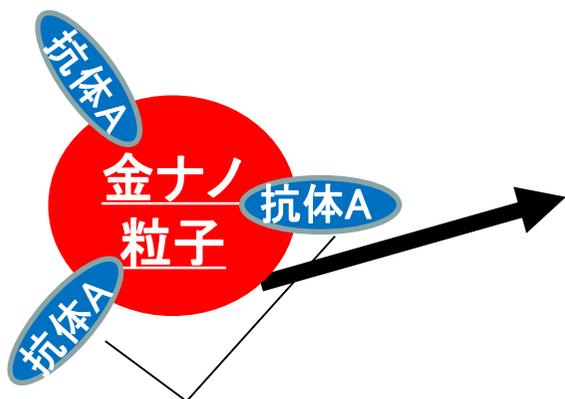
血液：がんマーカー

【測定結果例】

がん罹患の判別

検体

◆ 抗原 Y 標識抗体 Y キャプチャー抗体



検出ライン

control



がん陽性

特定の抗原に対して親和性を持つ
次世代抗体(ペプチドアプタマー)

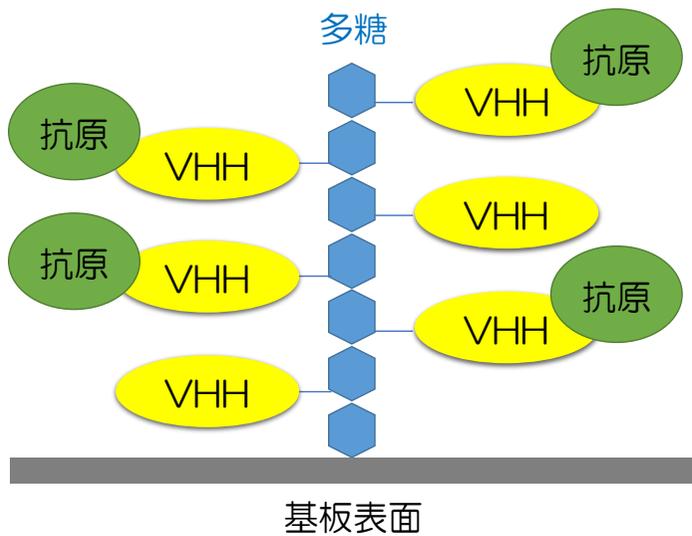
コスモバイオ株式会社HPより抜粋

実用化に向けた課題

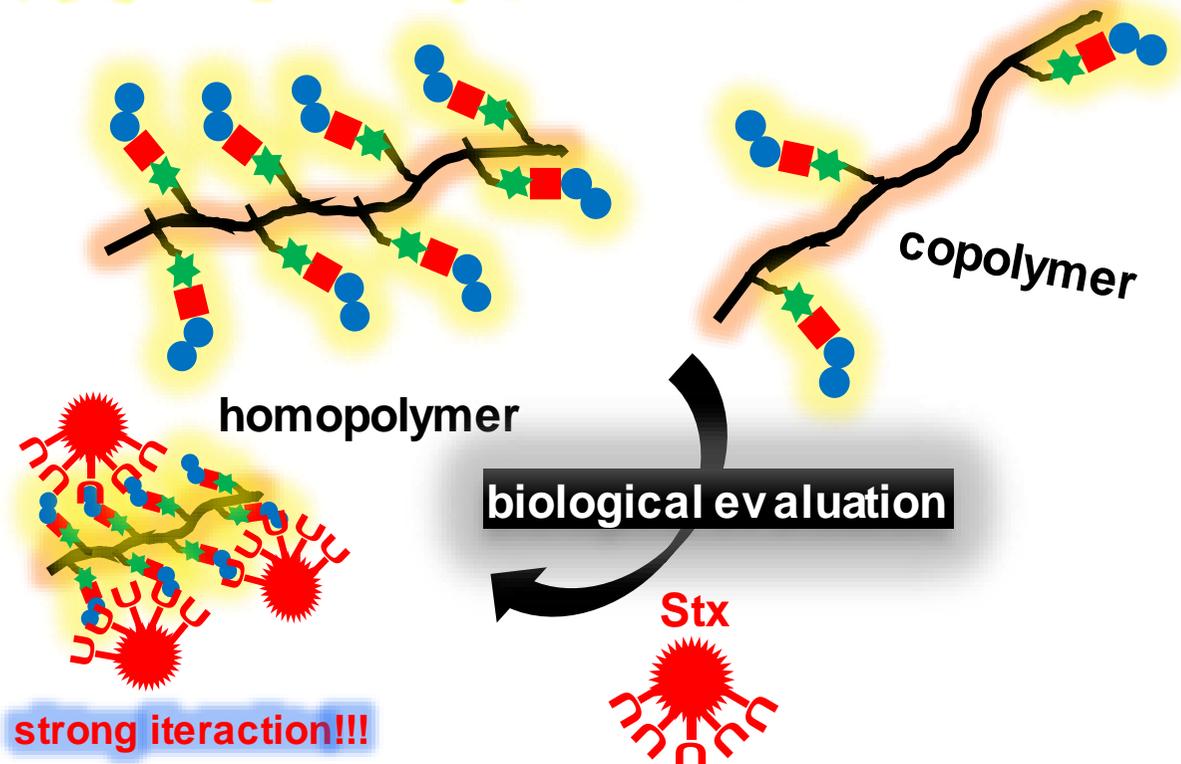
- 現在、親和性についてビアコアを用いた解離定数の決定まで開発済み。しかし、基盤等への固定化の点が未解決である。
- 今後、活性の向上について多価化データを取得し、体外診断薬に適用していく場合の条件設定を行っていく。
- 実用化に向けて、nMの精度を10倍向上できるように技術を確立する必要もあり。

実用化に向けた課題解決案

- 多価化による感度の飛躍的な向上
⇒有機化学とタンパク質工学のコラボレーション



多価抗体の例
特願2017-008331



Bioorg. Med. Chem. **26**, pp. 5792–5803, 2018.

企業への期待

- 未解決の基盤等への固定化技術については、我々の先行技術により克服できると考えている。
- 体外診断薬の技術を持つ、企業との共同研究を希望。
- また、簡易キットを開発中の企業、がん検出分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : ミットカイン結合性ペプチドアプタマーおよびその使用
- 出願番号 : 特願2016-14248
- 出願人 : 埼玉大学
- 発明者 : 松岡浩司、新井秀直、根本直人

産学連携の経歴

- 2014年-2016年 埼玉県先端産業創造プロジェクトに採択
- 2016年 本件特許出願 (2016年1月28日)
- 2019年 JSTイノベーションジャパンに採択

共同研究を広く募集しています。



- 企業
- 研究所
- 公設試など

お問い合わせ先

埼玉大学 研究機構
オープンイノベーションセンター

TEL 048-858-3849

FAX 048-858-9419

e-mail coic-sangaku@ml.saitama-u.ac.jp