

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

研究テーマ	微量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
抗体医薬 Rituximab に対する抗イディオタイプ DNA アプタマーの高親和性化に向けた改変と評価

研究の目的、成果及び今後の展望

【目的】Rituximab は、CD20 陽性の B 細胞性非ホジキンリンパ腫や関節リウマチなどに対する抗体医薬であり、バイオシミラーも含め全世界で広く利用されている。一方で副作用や耐性化による効果減弱も報告されており、適正投与や安全性評価のための信頼性の高い血中薬物濃度分析法が重要である。当研究室では抗体医薬の相補性決定領域（CDR）を特異的に認識する抗イディオタイプ DNA アプタマーを獲得し、これらを捕捉分子とした血中薬物濃度分析法を報告してきた^{1,2)}。しかし、IgG が大量に含まれる血液試料から特異的に Rituximab を捕捉し高感度検出するには、アプタマーの更なる高親和性化が必要であると考えられた。本研究では、Rituximab に対する抗イディオタイプ DNA アプタマーの高親和性化に向け、in silico 解析による配列改変および結合能評価を行った。

【方法】(1) 抗 Rituximab アプタマーの結合情報視覚化 既得の抗 Rituximab aptamer No.126 (24 mer, $K_d = 48$ nM) と Rituximab Fab (PDB 2OSL) について HDOCK³⁾を用いたドッキングシミュレーションを実施。アプタマー各塩基と 3Å 以内の Rituximab Fab アミノ酸残基数、および Fab の各アミノ酸残基と 3Å 以内のアプタマーの塩基数を抽出・視覚化した。(2) アプタマー配列改変 視覚化情報に基づきループ構造中の 16T、17T の塩基置換を行い、ドッキングスコアを算出し結合情報を視覚化した。(3) ELAA 法による結合能評価 変異体配列および元配列について、Enzyme Linked Aptamer Assay (ELAA)¹⁾法の改良法により定量性・感度を評価した。この方法では streptavidin を吸着させたプレートに Biotin 修飾アプタマーを結合後、ブロッキングおよび洗浄しアプタマー固定化プレートを得た。このプレートに Rituximab を含む試料溶液を反応させた後、anti-human IgG 抗体-HRP 複合体を加え、化学蛍光基質を反応させ蛍光強度を測定した。

【結果】ドッキングシミュレーションにより、No.126 は重鎖の全ての CDR と結合することが示唆された。結合情報の視覚化から配列改変の指針を得ることができ、検討した変異体の大部分はドッキングスコアが向上した。変異体 17A ではループ構造に対し近接するアミノ酸残基数が増加し、結合親和性の向上が示唆された。元配列および 17TA 配列を捕捉分子とした ELAA 法を構築したところ、どちらも有効血中濃度範囲での Rituximab 定量が可能となり、バイオアナリシス法への適用可能性を示すことができた。今後、17TA 配列の解離定数を算出し元配列との比較検証を行う。親和性の高いアプタマーにより血液試料中 Rituximab の高感度検出が可能となり、適正投与や安全性評価に貢献できる。

【参考文献】1) T. Yamada *et al.*, *Anal. Chem.*, **91**, 3125 (2019), 2) K. Todoroki, *Chromatography*, **45**, 1 (2024), 3) Y. Yan *et al.*, *Nat. Protoc.*, **15**, 1829 (2020)