

平成28年9月6日

本学教員が国際共同研究グループのメンバーとして アジアから唯一招かれ、抗体の特異性や再現性の 信頼性を検証する方法を全世界に提言しました。

抗体は、医学・生物学分野などの研究に重要なツールとして世界的に多く作製・使用されていますが、近年それらの抗体の特異性や再現性の信頼性が揺らぎ、現在の医療や治療方法への影響も懸念されています。

このことを受け、抗体の信頼性を検証する手段についてを議論する International Working Group on Antibody Validation (IWGAV) が招集され、本学地域創生推進機構生体液バイオマーカーセンターの山本格特任教授がアジア地区から唯一招聘され、2015年9月のカナダのバンクーバーでの第1回会議から議論を重ね、本年6月に IWGAV としての抗体の信頼性の検証についての提言をまとめ、Nature Methods (Impact Factor 25.328) に投稿し、その内容が電子版で9月6日に公開されました。

この提言は、抗体作成者（企業）や抗体利用者（研究者）、ジャーナル編集者に対して、現時点でその緊急性と必要性からすぐに実行可能な抗体の信頼性を担保する検証法や方法を示したものです。研究者や臨床の現場で、抗体を使う際に考慮すべきものとなり、今後の医療にも大きな影響を与えることが予想されます。

■提言のポイント

OIWGAV は一般的な抗体の使用、応用における抗体の特異性の最適な検証法を明確にし、抗体の再現性を保証するガイドラインを提供するために国際的、アドホック的に招集された。

OIWGAV は抗体の使用、応用ごとに抗体を検証する5つの方法（Pillars、柱）を提唱、推薦した（表1参照）。

■研究の背景

抗体は基礎及び臨床研究において最も使われてきたツールである。しかし、抗体が幅広く応用されるようになったにもかかわらず、その応用における抗体の包括的、科学的な信頼性の検証が欠けており、そのことが科学の厳格性と再現性を損なう結果となっていた。

Antibodypedia (<http://www.antibodypedia.com/>) によれば、抗体の応用で最も使われているのが Western blot 法で、ついで 免疫組織化学法、免疫細胞化学法である。ELISA (enzyme-linked sandwich assay) 法はあまり多く占めてはいないが、臨床的には重要



な応用である。さまざまな応用法で抗体と反応する対象としてのタンパク質が、自然の状態であるのか (native)、変性した状態なのか (denatured) が異なっているため、抗体の結合性、信頼性の検証はそれぞれの応用法に応じて行う必要がある。

IWGAV は抗体に関するさまざまな研究者が集まり、議論し、抗体の検証には、(i) Genetic strategies, (ii) Orthogonal strategies, (iii) Independent antibody strategies, (iv) Expression of tagged proteins, and (v) Immunocapture followed by mass spectrometry (MS) の5種類 (柱) が基本的手法であると提言することになった。

■研究の概要

1) 抗体の特異性の検証の主な5手法

- (i) Genetic strategies では抗体が結合するタンパク質の遺伝子の発現を knock-out、knock-down、genome editing で抑制、あるいは無くすることで、抗体が反応しなくなることを確認する。
- (ii) Orthogonal strategies では抗体以外のものを使う方法、例えば、質量分析装置による抗体の標的タンパク質の同定、定量など、で抗体と反応するタンパク質の存在を確認する。
- (iii) Independent antibody strategies ではある抗体の標的タンパク質に対する反応が、同じ標的タンパク質に結合する別の抗体でも得られるかを確認する。
- (iv) Expression of tagged proteins では抗体と反応するタンパク質に FLAG などのタグをつけ、標的タンパク質に対する抗体の反応とタグに対する抗体の反応が同じであることで確認する。
- (v) Immunocapture followed by mass spectrometry (IMS) では抗体と標的タンパク質を結合させ、免疫沈降法で抗原-抗体結合物を分離し、それを質量分析装置で解析し、予想されるタンパク質が同定されるかどうかで確認する。

2) 抗体使用者、抗体製造者への提言

- (i) 抗体の反応は使用方法と使用対象 (細胞や組織) の状態により異なるので、ある状況で機能しても、それを普遍化できるとは限らない。そのため、抗体使用者は別の対象でも機能するかを確認することや上述の5種類の確認法のうち、少なくとも一つで信頼性を検証することを勧める。また、発表に際しては、抗体の出所が特定できるように、抗体の作製会社やカタログ番号、ロット番号、RRID (Research Resource Identifiers, Bandrowski, A. *et al.* The Resource Identification Initiative: a cultural shift in publishing. *Neuroinformatics* 14, 169-182, 2016) などを記載する。
- (ii) 雑誌の出版社は論文の記載方法として、方法のところ “抗体の特徴” という項を設け、著者に使った抗体をどのように検証したかを記載するようにさせる。
- (iii) 抗体製造者は上述の5種類の検証法のうち、抗体使用の応用法それぞれに少なくとも1つの検証をできるだけ多くの対象 (細胞や組織) で行うことが望ましい。また、抗原や抗体に関する情報をできるだけ多く提供し、標準的使用法の詳細な提示やロットごとの検証などが勧める。

表 1. Proposed conceptual pillars for validation of antibodies.

Validation strategy	Genetic	Orthogonal	Independent antibody	Tagged protein expression	IMS
Validation principle	The expression of the target protein is eliminated or significantly reduced by genome editing or RNA interference	Expression of the target protein is compared with an antibody-independent method	Expression of the target protein is compared using two antibodies with non-overlapping epitopes	The target protein is expressed using a tag, preferably expressed at endogenous levels	The target protein is captured using an antibody and analyzed using mass spectrometry
Validation criteria	Elimination or significant reduction in antibody labeling after gene disruption or mRNA knockdown	Significant correlation of protein levels detected by an antibody and an orthogonal method (eg, MS)	Significant correlation of protein levels detected by two different antibodies recognizing independent regions of the same target protein	Significant correlation between antibody-labeling and detection of the epitope tag	Target protein peptides among the most abundant detected by MS following immunocapture
Suitable for these applications	WB, IHC, ICC, FS, SA, IP/ChIP, RP	WB, IHC, ICC, FS, SA, RP	WB, IHC, ICC, FS, SA, IP/ChIP, RP	WB, IHC, ICC, FS	IP/ChIP

The abbreviations are Immunocapture mass spectrometry (IMS), Western blot (WB), immunohistochemistry (IHC), immunocytochemistry, including immunofluorescent microscopy, (ICC), flow sorting and analysis of cells (FS), sandwich assays, including ELISA, (SA), immunoprecipitation (IP), chromatin immunoprecipitation (ChIP), and reverse phase protein arrays (RP).

本件に関するお問い合わせ先

新潟大学地域創生推進機構

生体液バイオマーカーセンター

特任教授 山本 格

Mail: tadashiy-bbc@ccr.niigata-u.ac.jp