

令和元年6月20日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01707

研究課題名（和文）糖尿病合併症の早期マーカーに対する臨床現場即時検査法の開発

研究課題名（英文）Development of point-of-care testing for an early maker of diabetes complications

研究代表者

海老原 章郎（Ebihara, Akio）

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：60415099

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：血圧調節酵素レニンの前駆体プロレニンが糖尿病合併症を予見する早期マーカーである。本研究の目的はプロレニンを検出する臨床現場即時検査法の開発である。検査法開発にはプロレニンの別々の箇所に結合する2種類の抗体が必要である。選別の結果、抗体の組み合わせを複数発見し、酵素結合免疫吸着検定法を確立した。さらに即時検査法の試作品を作成した。試作品の検出感度は臨床現場で利用可能な感度には達していないが、本研究で見出した課題に基づき実応用に向けた研究をさらに進める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、社会環境や生活習慣の変化により世界の糖尿病人口は爆発的に増加している。自覚症状が乏しいまま糖尿病が進行し合併症（網膜症や腎症）を併発すると、患者は失明や透析治療を余儀なくされる。本研究は合併症の早期発見を目標とし、合併症早期マーカーであるプロレニンに対する即時検査法の開発を目指した。本研究で発見したプロレニン認識抗体を活用した現在の試作品を改良することで、糖尿病合併症の予見を実現し、人々の生活の質の向上と医療費削減に貢献する。

研究成果の概要（英文）：Prorenin is the inactive precursor of renin, a key enzyme for regulating blood pressure and electrolyte balance. Prorenin is known as an early marker of diabetic complications. This study aims to develop point-of-care testing (POCT) for prorenin. Through antibody screening, we identified the pairs of antibodies that simultaneously bind to two independent part of prorenin. With these antibodies, we established an enzyme-linked immunosorbent assay and POCT prototypes. Although the detection limit of prototypes is not enough to detect plasma prorenin, we shall create a POCT device for prorenin by solving the difficulties we found in this study.

研究分野：応用健康科学、応用生物化学

キーワード：プロレニン 糖尿病 臨床現場即時検査法 抗体 SDGs

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は、血中グルコース濃度の上昇状態が長期継続する病気である。自覚症状が乏しいまま糖尿病が進行し、血管障害に起因する合併症(網膜症、腎症、アルブミン尿)を併発すると、患者は失明や透析治療を余儀なくされる。合併症になる可能性を予見できれば、悪化の前に効果的な治療法を施すことが可能となる。

これまでの糖尿病に関する疫学的研究から、合併症を有す糖尿病患者において血中プロレニン濃度が2~4倍上昇すること(Luetscher et al., *N. Engl. J. Med.* **312**, 1412-1417, 1985)、さらに血中プロレニン濃度が高いとその約5年後に微量アルブミン尿や網膜症の発症率が高いこと(Allen et al., *Kidney Int.* **50**, 902-907, 1996; Deinum et al., *Diabetologia* **42**, 1006-1010, 1999)が報告されている。そのためプロレニンは、糖尿病合併症を予見できる優れた早期マーカーと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病合併症を予見する早期マーカー「プロレニン」に対する臨床現場即時検査法(point-of-care testing, POCT)を開発することである。この方法が開発できれば、特別な装置や技術を必要とせず、短時間、低コストで糖尿病合併症を予見することが可能となる。本研究は、世界中の人々が糖尿病合併症を回避するための診断法を作り、健康と生活の質の向上に貢献できる。

3. 研究の方法

(1) 抗体選別試験

本研究の実施に向けて、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)を利用してプロレニンに結合する抗体を同定した。候補抗体として、プロセグメント部分の一部を抗原とした抗ペプチド抗体7種類、レニン部分の一部を抗原とした抗ペプチド抗体12種類、および抗レニン抗体1種類(合計20種類)を利用した。動物細胞で生産した組換え型ヒトプロレニンを0.1-300 ng/100 μ L(8段階)に希釈後、96穴ELISAプレートに分注し、4℃で静置した(コーティング)。同ELISAプレートをブロッキング処理した後、各抗体(抗血清)を反応させた。洗浄後、Horseradish Peroxidase(HRP)標識-抗Rabbit抗体を反応させた。標準的な方法に従って発色反応を行い、マイクロプレートリーダーにて450 nmにおける吸光度を測定した。

(2) サンドイッチ型ELISAの確立

次いで、プロレニン上の別々の2箇所と同時に結合する抗体の組み合わせをサンドイッチ型ELISA(別々の2種類の抗体で抗原を挟み込み抗原を検出するELISA)によって同定することを計画した。方法(1)によって抗原濃度依存的な吸光度の上昇が見られる抗ペプチド抗体を含む抗血清に対し、硫酸ナトリウムによる塩析と抗原ペプチドアフィニティー精製を行い、抗原ペプチドに特異的なIgGを得た。その後、標準的な方法に従ってHRP標識を行い、サンドイッチ型ELISAによって抗体の組み合わせを決定した。

(3) 臨床現場即時検査法(POCT)の試作品開発

本研究では、POCTとして広く利用されているイムノクロマト法と新しいPOCTとして近年開発された電気化学イムノセンサーを導入した。

イムノクロマト法(ハーフ・ストリップ法)による試作品

方法(2)で決定した抗体の組み合わせのうち、一方の抗体にペプシン消化を施しF(ab)₂断片を得た。次に、pHと最小被覆タンパク質量の最適化を経たのち、金コロイド(40 nm、BBI Solutions社製)を用いて金コロイド標識抗体を調製した。もう一方の抗体(テストライン抗体)および抗ウサギ抗体(コントロールライン抗体)をメンブレンに固相化した。ブロッキングおよび乾燥の後、メンブレンをバックグランドシートに貼り付け、吸収パッド、サンプルパッドを組み合わせた後、組み立てたカードを5 mm幅に裁断した(ストリップ作成)。各濃度に調製した組換え型ヒトプロレニンと金コロイド標識抗体を混合した溶液をELISAプレートに分注した後、各濃度のプロレニン溶液に上記のストリップを一枚ずつ浸してプロレニンに対する検出感度を調べた。

電気化学イムノセンサーによる試作品

方法(3)の で用いたテストライン抗体を Disposable Electrochemical Printed (DEP) Chip(バイオデバイステクノロジー社製)の作用極へ固相化した後、ブロッキングを行った。各濃度に調製した組換え型ヒトプロレニンと金コロイド標識抗体を混合した溶液を、乾燥後の作用極で反応させた。洗浄後、得られたDEP Chipを検出器(BDTminiSTAT100、バイオデバイステクノロジー社製)につなぎ、DPV(differential pulse voltammetry)モードによってプロレニンを定量化した。

(4) レニン濃度測定系の確立

酵素活性に基づきレニン濃度を測定する方法を開発した。大腸菌で生産した組換え型ヒトアンジオテンシノーゲンに対し各濃度に調製したヒトレニン標準品を反応させ、生成したアンジオテンシンをアンジオテンシンに対するELISA(Suzuki et al., *Clin. Exp. Hypertens.*,

A12, 83-95, 1990) にて定量化した。そして、ヒトレニンの濃度とレニン活性(反応初速度)の関係性を調べた。

4. 研究成果

(1) 抗体選別試験

プロレニンは血圧調節酵素レニンの前駆体タンパク質である。プロレニンは、そのプロセグメントが酵素レニンの触媒残基を覆い、不活性状態になっている。方法3の(1)に示した20種類の抗体を用いて、抗原となるプロレニンの濃度を变化させて抗体結合の濃度依存性をELISAにより解析した。その結果、プロセグメントの一部の配列に対する抗ペプチド抗体から4種類、レニン部分の一部の配列に対する抗ペプチド抗体から2種類のプロレニン結合抗体を同定した。この抗体結合性に関する結果を学会にて発表した(学会発表3)。

(2) サンドイッチ型 ELISA の確立

サンドイッチ型 ELISA の構築では次の4項目を変数とした。

(ア) 固相化抗体(抗血清あるいは精製品): 20種類

(イ) HRP 標識検出抗体: 4種類

(ウ) ブロッキングバッファー: 2種類(カゼインあるいはBSA)

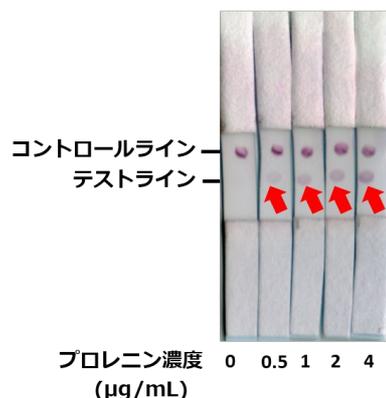
(エ) 抗原抗体反応の反応条件(反応温度4、25、37ならびに反応時間1時間、2時間、一晚)

上記4項目を適宜組み合わせ合わせた合計80種類の反応条件にて、プロレニンに同時に結合できる抗体の組み合わせを解析した。その結果、「プロセグメント部分対プロセグメント部分」の組み合わせを1つ、「プロセグメント部分対レニン本体部分」の組み合わせを1つ見出した。

(3) POCT 試作品開発

研究成果(2)で同定した抗体の組み合わせを用いて、POCT 試作品を作製した。その結果、イムノクロマト法(ハーフ・ストリップ法)では500 ng/mL、電気化学イムノセンサーでは350 ng/mL までのプロレニンが検出可能であった。糖尿病合併症患者の血中プロレニン濃度は約200-400 pg/mLである(Yokota *et al.*, *Br. J. Ophthalmol.*, **89**, 871-873, 2005)。検出感度の上昇が必要である。

A



B

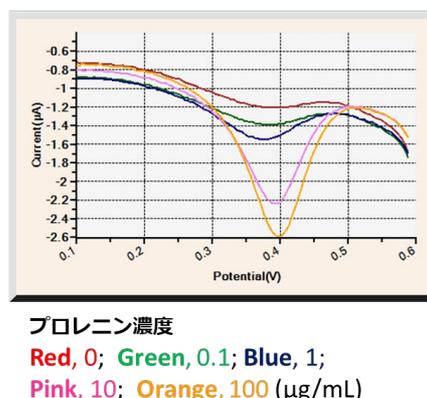


図. POCT 試作品の結果。(A) イムノクロマト法、(B) 電気化学イムノセンサー。

(4) レニン濃度測定系の確立

血漿レニン濃度は高血圧患者の臨床診断に有用である。これまでの酵素化学研究から、ヒツジアンジオテンシノーゲンがヒトレニンに対する優れた基質(高い親和性ならびに高い触媒活性を示す基質)であり、血漿レニン濃度測定に利用されてきた(Campbell *et al.* *Clin. Chem.* **55**, 867-877, 2009)。我々はこれまでの研究(科研費課題番号 24658092)のなかで、大腸菌を用いて組換え型ヒツジアンジオテンシノーゲンを生産することに成功し、本研究費の支援を得て、学会発表(学会発表1,2,4)ならびに論文出版を行った(雑誌論文1)。我々が今回確立した生産系は、従来確立していた動物細胞を用いた生産系と比べ時間対効果が26倍高い。そこで、この組換え型基質を利用して、酵素活性に基づきレニン濃度を定量する方法を新たに開発し、論文として出版した(雑誌論文2)。この新方法は血漿レニン濃度測定に応用することができる。

プロレニンは、試験管内のタンパク質分解反応によってプロセグメントを除去することができ、レニンへと変換される。タンパク質分解反応の実施時および非実施時における酵素レニンの活性を測定、両条件におけるレニン濃度を定量して、同タンパク質分解反応に伴うレニン濃度の増加量を計算すれば、プロレニン濃度を見積もることができる。雑誌論文2で報告した方法は、血漿レニンの定量のみならず、プロレニンの定量にも活用できる。

(5) 展望

今回、プロレニンを検出できる抗体を見出し、POCTの試作品を作製した。試作品の検出感度は臨床現場で利用可能な感度には達していないが、本研究で見出した課題に基づき実応用に向けた研究をさらに進める。具体的な解決策には以下が挙げられる。

プロレニンに対し抗体を作用させる順序を変える

抗体標識の方法を金コロイドから蛍光に変え、新たな検出器を開発する

POCT実験を実施する前のサンプル処理を工夫する(精製と濃縮を行う)

本研究を発展し世界で最初のプロレニンに対するPOCTを創出することで、我々は糖尿病合併症の予見を実現し、人々の生活の質の向上と医療費削減に貢献する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

(1) J. Akther, A. N. Nabi, S. Ohno, T. Yokogawa, T. Nakagawa, F. Suzuki and A. Ebihara: Establishing a novel assay system for measuring renin concentration using cost effective recombinant ovine angiotensinogen. *Heliyon* 5, e01409 (2019) doi:10.1016/j.heliyon.2019.e01409 【査読あり】

(2) S. Yamashita, N. Shibata, A. Boku-Ikeda, E. Abe, A. Inayama, T. Yamaguchi, A. Higuma, K. Inagaki, T. Tsuyuzaki, S. Iwamoto, S. Ohno, T. Yokogawa, K. Nishikawa, K. B. Biswas, A. H. Nabi, T. Nakagawa, F. Suzuki and A. Ebihara: *Escherichia coli*-based production of recombinant ovine angiotensinogen and its characterization as a renin substrate. *BMC Biotechnol.* 16, 33 (2016) doi:10.1186/s12896-016-0265-x 【査読あり】

[学会発表](計5件)

(1) 由井翠, 寺本好邦, 中川寅, 海老原章郎. 誰でも簡単に特別な装置なしで抗体を保存する: プルランフィルムに関する研究. 日本農芸化学会中部支部第183回例会(名古屋大学豊田講堂 2018年9月15日)

(2) Akio Ebihara, Tsutomu Nakagawa, and Fumiaki Suzuki. Biotechnological production of protein and structure-based evaluation of protein quality. BIOPROCESSING INDIA 2017 (5th BPI conference, 9-11 Dec, 2017, IIT Guwahati)

(3) 由井翠, 北川まなか, 山下晋司, 中川寅, 鈴木文昭, 海老原章郎. 抗体結合性を指標とした糖尿病合併症早期マーカータンパク質プロレニンの構造探索. 第17回日本蛋白質科学会年会(仙台国際センター 2017年6月20日~21日)

(4) 田原成康, 竹生和代, 柴田直哉, 鈴木文昭, 中川寅, 海老原章郎. 大腸菌発現系を用いた組換えタンパク質の自動発現誘導を促進する添加剤の検討. 第16回日本蛋白質科学会年会(福岡国際会議場 2016年6月7日~9日)

(5) 柴田直哉, 山下晋司, 朴明宣, 大野敏, 横川隆志, 西川一八, 鈴木文昭, 中川寅, 海老原章郎. 大腸菌発現系を用いた組換え型ヒツジアンジオテンシノーゲンの生産: 通気培養槽と自動発現誘導による高収量化. 2015年度日本農芸化学会中部・関西支部合同大会(富山県立大学 2015年9月19日)

[その他]

(1) 研究室ホームページ: <http://www.abios.gifu-u.ac.jp/nakagawa/>

(2) NHKスペシャル シリーズ「人体」第1集「腎臓が寿命を決める」の番組制作に協力した。下記が関連ホームページである。

<https://www6.nhk.or.jp/special/detail/index.html?aid=20171001>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 北川 まなか

ローマ字氏名 Manaka Kitagawa

研究協力者氏名: 由井 翠

ローマ字氏名 Midori Yui

研究協力者氏名：山下 晋司
ローマ字氏名 Shinji Yamashita

研究協力者氏名：柴田 直哉
ローマ字氏名 Naoya Shibata

研究協力者氏名：田原 成康
ローマ字氏名 Nariyasu Tahara

研究協力者氏名：Jobaida Akther
ローマ字氏名 Jobaida Akther

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。