

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05907

研究課題名(和文)電気泳動による新しい免疫応答マーカーの開発(T細胞受容体クローナリティアッセイ)

研究課題名(英文)Development of a new immune-response marker using electrophoresis

研究代表者

志村 清仁(Shimura, Kiyohito)

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：30130008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：T細胞クローナリティアッセイの技術的基盤となる等電点電気泳動用キャピラリーと結合するマイクロアフィニティーカラムを中心に研究開発を行った。その結果、T細胞レセプターを捕捉するアフィニティーカラムとしては、メタクリル酸グリシジルとジメタクリル酸エチレングリコールとの共重合型モノリスカラムを内径0.1-1.0 mm のガラス管内に作成し、グリシジル基のタンパク質との結合反応を利用して抗TCR抗体などのアフィニティーリガンドを固定化することが適当であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫応答で中心的な役割を果たすT細胞は、表面に抗原認識分子であるT細胞受容体(TCR)を発現している。体内に異物が出現すると、それに結合するTCRをもつT細胞クローンが増殖し、際立って高い割合を占めるようになる。このクローナリティ(clonality)の変化は免疫応答の強弱を示す重要なマーカーとなる。キャピラリー等電点電気泳動を用いて、TCRの等電点スペクトルを取得することにより、T細胞クローナリティを容易にかつ正確に測る方法を完成することにより、効果的な治療方針の決定に寄与する重要な情報を医療に提供することが可能になる。

研究成果の概要(英文)：The research was focused on the development of the coupling of a micro antibody column and the capillary for isoelectric focusing that provide the technical basis for T-cell clonality assays. As a result, the antibody column for capturing T-cell receptors can be made of a monolithic packing prepared by copolymerization of glycidyl methacrylate and ethylene glycol diglycidylmethacrylate in glass tubes with an inner diameter of 0.1 to 1 mm. The reaction between the epoxy group and proteins was used to immobilize anti-TCR antibodies as affinity ligands.

研究分野：バイオ分析

キーワード：等電点電気泳動 キャピラリー電気泳動 クロマトグラフィー T細胞受容体 免疫応答

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫系は細菌やウイルス、またがん細胞を排除するという生体に欠かせない機能を果たしている。T細胞は免疫系において中心的な役割をもち、各T細胞は抗原特異的なT細胞受容体(TCR)を細胞表面に発現して、体内での異物の出現を監視している。ウイルス感染や発がんが起これば、T細胞はTCRを介してそれらを異物として認識するとともに活性化され、増殖し、感染細胞やがん細胞を攻撃して排除する。一方、腫瘍はT細胞の活性化を抑制して、免疫系からの攻撃を免れていることもわかってきた。抗原に結合するTCRをもつ一部のT細胞が増殖すると、体内のT細胞全体の中でごく少数のクローンが高い割合を占めるようになり、クローナリティが上昇する。したがって、T細胞クローナリティは免疫応答の強弱を示す有用なバイオマーカーになると考えられる。

クローナリティは、TCRレパートリーの多様性と重複性をプロファイリングすることによっても測定可能である。TCRレパートリーのプロファイリングには、T細胞のcDNAを鋳型としてPCRによってTCRの可変部位を増幅し、次世代シーケンサーによって塩基配列を決定する方法がある。この方法は情報量が多いが、1～2か月も時間がかかり、それに要する労力と費用も多大である。

2. 研究の目的

免疫応答で中心的な役割を果たすT細胞は、表面に抗原認識分子であるT細胞受容体(TCR)を発現している。体内に異物が出現すると、それに結合するTCRをもつT細胞クローンが増殖し、際立って高い割合を占めるようになる。このクローナリティ(clonality)の変化は免疫応答の強弱を示す重要なマーカーとなるはずである。しかし、これを容易に測る方法はまだ無い。本研究ではキャピラリー等電点電気泳動を用いて、TCRの等電点スペクトルを取得することにより、T細胞クローナリティを容易にかつ正確に測る方法を開発する。これにより、効果的な治療方針の決定に寄与する重要な情報を医療に提供することを目指す。

3. 研究の方法

TCRクローナリティはTCR鎖に着目し、抗TCR抗体を固定したマイクロカラムにT細胞膜画分を可溶化した試料を通すことによって、TCRのみを分離回収する。回収したTCRにSH基標識用蛍光試薬を反応させて蛍光標識する。この試料を、等電点電気泳動用キャピラリーを下流に結合したマイクロ抗体カラムに流し、蛍光標識TCRを抗体カラムに捕捉する。ついで、カラムとキャピラリーを等電点電気泳動用両性担体液で満たした後、抗体カラム部分に陽極液を充填して標識TCRをカラムから溶離し、そのまま等電点電気泳動を行って、TCRの等電点スペクトルを測定する。このために必要な抗体マイクロカラムを作成し、等電点電気泳動キャピラリーとの結合を可能にする。

4. 研究成果

T細胞レセプターを捕捉するアフィニティーカラムとしては、メタクリル酸グリシジルとジメタクリル酸エチレングリコールとの共重合型モノリスカラムを内径0.1～1.0 mmのガラス管内に作成し、エポキシ基のタンパク質との結合反応を利用して抗TCR抗体などのアフィニティーリガンドを固定化することが適当であることが明らかになった。エポキシ基とタンパク質の反応は速度が遅く、また高いpHの条件を必要とするという欠点もある。この問題を回避するには、作成したモノリスカラムにアンモニアを反応させ、一旦アミノ基を導入した後、このアミノ

基をジスクシニミジルカーボネート等で活性化するなどして、タンパク質との反応性を高めることができる。マイクロカラムの体積は 1 μL 以下であるが、レーザー励起蛍光検出の感度は十分に高いため、抗体カラムの結合容量は十分である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 志村清仁
2. 発表標題 免疫キャピラリー等電点電気泳動：タンパク質電荷バリエーション構成比に基づく新規バイオマーカー開発に向けて
3. 学会等名 第25回クロマトグラフィーシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 志村清仁、風間健太郎、安達 隆
2. 発表標題 ペプチドの等電点予測のためのアミノ酸残基pKa値の最適化
3. 学会等名 第69回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長井俊彦、志村清仁
2. 発表標題 走査型検出系を有する自動キャピラリー等電点電気泳動装置の再現性評価
3. 学会等名 第69回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kiyohito Shimura
2. 発表標題 Immunoaffinity Capillary Isoelectric Focusing: Two micro platforms for charge variant analysis of protein
3. 学会等名 ITP 2018, 25th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kiyohito Shimura
2. 発表標題 Immunoaffinity Capillary Isoelectric Focusing: Two facile micro analytical platforms for charge variants of protein pharmaceuticals
3. 学会等名 ISPPP 2018, International Symposium on the Separation of Proteins, Peptides and Polynucleotides (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 志村清仁
2. 発表標題 キャピラリー等電点電気泳動とバイオアフィニティーの結合分析
3. 学会等名 第38回キャピラリー電気泳動シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kiyohito Shimura
2. 発表標題 Capillary isoelectric focusing coupled with immunoaffinity: Two micro platforms for analysis of charge variants produced by post translational modifications
3. 学会等名 MSB 2018: The 34th International Symposium on Microscale Separation and Bioanalysis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 志村清仁
2. 発表標題 新規バイオマーカーのための免疫電気泳動装置
3. 学会等名 JST新技術説明会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 志村清仁、長井俊彦
2. 発表標題 APCIEFによるエリスロポエチン電荷バリエーション分析の問題点とその解決
3. 学会等名 SCE 2017: 第37回キャピラリー電気泳動シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 志村清仁、長井俊彦
2. 発表標題 APCIEFによるエリスロポエチン等電点バリエーション分析の最適化
3. 学会等名 第68回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長井俊彦、志村清仁
2. 発表標題 PDMAコートキャピラリーを用いた紫外外部吸収検出によるIEF条件の基礎検討
3. 学会等名 第68回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 志村清仁
2. 発表標題 タンパク質医薬分析における免疫抽出とキャピラリー等電点電気泳動の直接結合
3. 学会等名 日本分析化学会第66年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 志村清仁
2. 発表標題 免疫抽出とキャピラリー等電点電気泳動を一体化した分離法のタンパク質医薬分析における可能性
3. 学会等名 第67回日本電気泳動学会シンポジウム バイオ医薬÷電気泳動：電気泳動でみるバイオ医薬品の特性
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kiyohito Shimura	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Elsevier Science	5. 総ページ数 21
3. 書名 "Capillary Isoelectric Focusing", in Handbook in Separation Science: Capillary Electromigration Separation Methods (Ed. Colin F. Poole)	

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 分離分析用キャピラリーデバイス、分離分析用マイクロ流体チップ、タンパク質又はペプチド分析方法、電気泳動装置、及び分離分析用マイクロ流体チップ電気泳動装置	発明者 志村清仁、長井俊彦、福原修一、瀬戸善一	権利者 福島県立医科大学、日栄工業株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、第6422131号	取得年 2018年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 CAPILLARY DEVICE FOR SEPARATION AND ANALYSIS,	発明者 Kiyohito Shimura et al.	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、U.S. Pat. No. 9927399	取得年 2018年	国内・外国の別 外国

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鈴木 弘行 (Suzuki Hiroyuki) (30322340)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	長井 俊彦 (Nagai Toshihiko) (90180447)	福島県立医科大学・医学部・助教 (21601)	