

平成21年4月15日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590548

研究課題名（和文） 粥状硬化症のバイオマーカーの開発

研究課題名（英文） Development of novel biomarkers for atherosclerosis

研究代表者

戸塚 実 (TOZUKA MINORU)

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究科・教授

研究者番号：60431954

研究成果の概要：HDL の主要アポ蛋白である apoA-I は抗動脈硬化作用を有するが、一部の apoA-I はキマーゼによって切断され、その機能を失うと考えられる。

切断された apoA-I にのみ反応する抗体を作製し、遺伝子技術によって合成した蛋白を用いてその特異性を確認した。次に、健常者血漿中に切断された apoA-I が存在することを証明した。この抗体を用いて切断された apoA-I の測定法を構築し、それが機能することを確認したが、更なる高感度化の必要性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：粥状硬化症, HDL, apolipoprotein A-I, キマーゼ, truncated apoA-I, ELISA 法, モノクローナル抗体, バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

現在、非常に効果的と思われる生活習慣の改善メニューを用いても、特にハイリスクな個人に関しては依然として冠動脈疾患由来の心臓発作を防ぐことはできない。したがって、粥状硬化症のスクリーニング（危険の予知）、診断、治療の経過観察に共通して使用

できる有用な可溶性バイオマーカーが必要とされている。さらに、求められる可溶性バイオマーカーは、単に冠動脈疾患発症の危険予知や診断だけでなく、新たに開発される可能性のある治療法を適正に評価する道具として不可欠である。

しかし、現時点で可溶性バイオマーカーと

して認知されているのは低比重リポ蛋白コレステロール (LDL-C) および C-反応性蛋白 (CRP) などであり、感度、特異度の点で満足の行くものではない。一方、イメージング検査として B モード超音波断層法による頸動脈内中膜複合壁厚 (IMT) 測定、電子ビーム CT (EBCT) による冠動脈石灰化定量、血管超音波検査 (IVUS) などが粥状硬化症の診断あるいは治療の経過観察に利用されているが、これらの検査は侵襲性が大きいこと、高い技術が必要とすること、汎用性に乏しいこと、およびランニングコストが高いことを考慮するとスクリーニング等に使用することには限界がある。また、動脈硬化治療薬の開発においては、その効果や安全性の迅速な評価、投与量の決定、適応患者の決定などのために病態解析が必須であるが、可溶性バイオマーカーは測定にあたって検体採取が比較的容易なうえに、保存が可能である点でイメージング検査に比べてはるかに汎用性が高い。

2. 研究の目的

近年 reverse cholesterol transport の詳細なメカニズムが明らかにされ、粥状硬化症の発症と強い相関があることがあらためて見直されてきた。reverse cholesterol transport には HDL の主要アポ蛋白である apoAI (分子量: 約 28,000) が関与しており、粥状硬化層のマクロファージからコレステロールを効率よく引き抜くことが可能である。しかし、この際、同じく粥状硬化層に存在する肥満細胞から放出されたキマーゼによって一部の apoA-I の C 末端 (18 アミノ酸残基) は truncate され、その結果 apoA-I はコレステロールを引き抜く能力を失う。

本研究では肥満細胞由来キマーゼによって C 末端を切断されたアポリポ蛋白 AI (truncated apoAI) が粥状硬化症の可溶性バイオマーカーとして有用であることを明らかにするために、その血漿中濃度の測定法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 抗truncated apoAIモノクローナル抗体作製を試みた。whole apoAI (243アミノ酸) に反応せず、truncated apoAI (225アミノ酸) にのみ反応する抗体を得るため、truncated apoAIのC末端の10アミノ酸と同配列のペプチドを合成し、抗原とした。モノクローナル抗体の作製は、既に確立された一般的な方法によって実施した。各段階での抗体のチェックにはwhole apoAIのほか、免疫に用いたペプチドを使用した。

(2) 得られたモノクローナル抗体の特異性を評価するため、chymase処理した精製apoAI、あるいはCOS細胞を用いて作製した

recombinant apoAI および recombinant truncated apoAIのイムノブロッティングを実施した。

(3) 血清中に極微量存在すると考えられる truncated apoAIを作製したモノクローナル抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製し、イムノブロッティングによりその存在を確認した。

(4) 測定法の基本は競合法を用いたELISA法とした。96穴ELISA用プレートに免疫に用いたペプチドをコーティングし、検体 (血漿) および作製した抗truncated apoAIモノクローナル抗体を加えて競合反応を行なった。洗浄後、市販のペルオキシダーゼ標識抗マウスIgM抗体を反応させ、TMBを加えて発色させ、硫酸で反応を停止後比色定量することとした。

4. 研究成果

(1) whole apoAI には反応せず、truncated apoAI にのみ反応すると思われる抗体を1種類だけ得ることができた。スクリーニングの過程では、抗原として用いた10個のアミノ酸からなるペプチドと反応するが、whole apoAI とは反応しないクローンをターゲットとした。本抗体種はIgMであった。

(2) イムノブロッティングによって血清あるいは精製HDL中に得られたモノクローナル抗体と反応する蛋白は検出されなかった。しかし、精製apoAIをchymase処理したところ、whole apoAIより分子量が2,000程度小さな位置 (分子量約26,000) にモノクローナル抗体と反応するバンドが認められた (図1)。

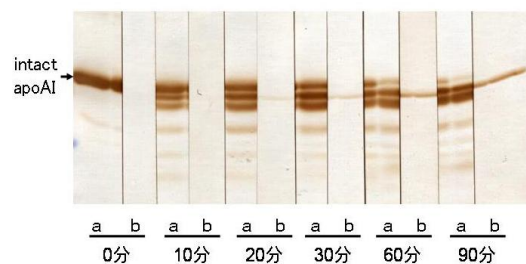
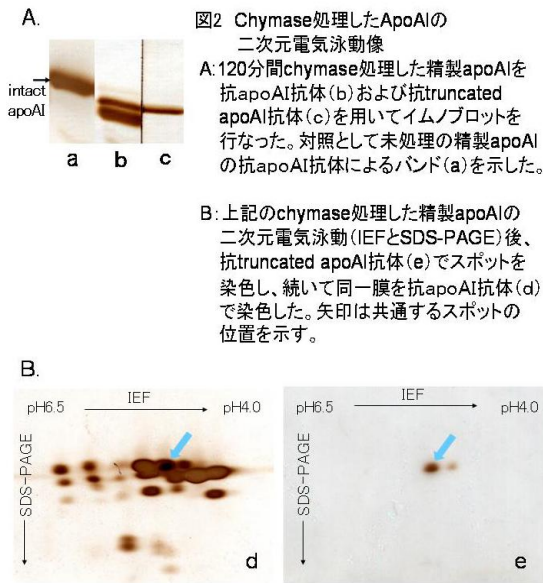


図1 ApoAIのchymase処理によるイムノブロット像の変化
精製apoAIを0~90分間chymase処理後、抗apoAI抗体(a)
および抗truncated apoAI抗体(b)を用いてイムノブロットを
行なった

しかし、分子量約26,000のバンドのすべてがモノクローナル抗体と反応するわけではないことが、二次元電気泳動を用いたイムノブロッティング法によって確認された (図2)。これは、chymaseにより複数箇所での水解が起こっていることを示している。

(3) 本モノクローナル抗体がwhole apoAIのC末端の18アミノ酸がtruncateされたフラグメント (truncated apoAI) にだけ反応することを確認するため、recombinant



truncated apoAI を作成した。モノクローナル抗体は recombinant truncated apoAI に反応したが、同様に作成した recombinant whole apoAI とは反応しなかった (図 3)。この結果より、本研究で得られたモノクローナル抗体が目的とする truncated apoAI と特異的に反応することが確認された。また、recombinant apoAI の一部は full length および truncated のいずれにおいても His-Tag およびシグナルペプチドが外れて、培養液中に分泌されることが示された。

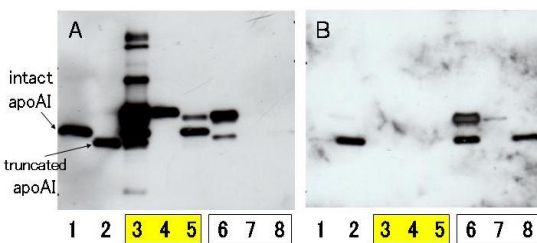


図3 Recombinant apoAI および recombinant truncated apoAI のイムノブロット像
Recombinant apoAI (No.3~5) および recombinant truncated apoAI (No.6~8) は His-Tag をターゲットとして培養液より精製した。SDS-PAGE 後、抗 apoAI 抗体 (A) および 抗 truncated apoAI 抗体 (B) でイムノブロットを行った。lane 1: 精製 apoAI, lane 2: chymase 処理した精製 apoAI, lane 3: full length apoAI 培養液, lane 4: His-Tag 結合カラムで精製した full length apoAI, lane 5: His-Tag 結合カラムに未結合の full length apoAI, lane 6: truncated apoAI 培養液, lane 7: His-Tag 結合カラムで精製した truncated apoAI, lane 8: His-Tag 結合カラムに未結合の truncated apoAI

(4) 前述のように、ヒト血清のイムノブロットングによって直接 truncated apoAI の存在を証明することはできなかったが、これは含まれる量が極めて少ないためであることを考慮し、モノクローナル抗体を用いたア

フィニティークロマトグラフィーで truncated apoAI を精製し、続いてイムノブロットング法で同定を行なった。その結果、分子量約 26,000 のバンドが検出され、ヒト血清中に truncated apoAI が存在することが確認された (図 4)。結合分画に intact apoAI も認められたが、これは truncated apoAI に比べて血清中に極めて多量に含まれる apoAI の非特異結合によるものと思われた。

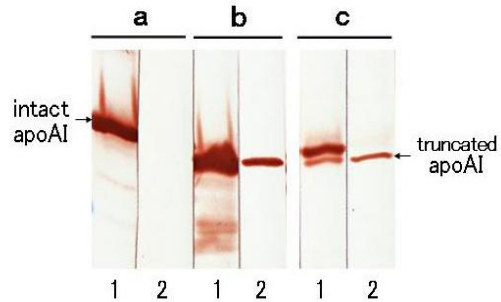


図4 ヒト血清中 truncated apoAI の同定
PBS で 5 倍に希釈したヒト血清を試料とし、抗 truncated apoAI 抗体を結合させた Sepharose 4B カラム (1 mL) でアフィニティークロマトグラフィーを行なった。結合分画 (c)、および対照として精製 apoAI (a)、chymase 処理した精製 apoAI (b) を SDS-PAGE で分離し、抗 apoAI 抗体 (1) および 抗 truncated apoAI 抗体を用いてイムノブロットを行なった。

(5) 競合 ELISA 法を構築し、キマーゼ処理した精製 apoAI の希釈系列の測定を行なった。コーティングしたペプチドそのものを試料として用いた対照と同様に、濃度依存的な検量曲線が得られた (図 5)。しかし、健常者血清中の truncated apoAI を測定するためには感度が不十分であった。現在、高感度法の開発中である。

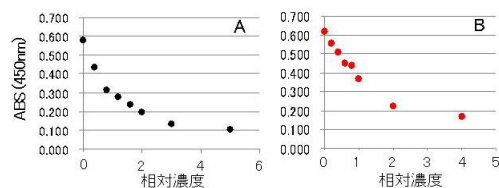


図5 Truncated apoAI の ELISA 法
抗体作製に用いた 10 アミノ酸からなるペプチドをプレートにコーティングし、同ペプチド (A) あるいは chymase 処理した apoAI (B) と抗 truncated apoAI 抗体の混合液を添加し、競合 ELISA 法を行なった。Chymase 処理した apoAI の希釈系列においてペプチドを試料としたときと同様の競合曲線が得られた。(注: それぞれの相対濃度は互換性がない)

(6) 以上、truncated apoAI にも反応する特異抗体を得られたことから、apoAI の抗動脈硬化作用に及ぼす chymase の影響についての研究の更なる進展が期待される。また、血清中 truncated apoAI 測定の可能性が示され、冠動脈疾患のバイオマーカーとしての有用性が明らかになることが期待される。本抗体

の組織化学的応用も病態解明への一助になると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Sugano M, Yamauchi K, Kawasaki K, Tozuka M, Fujita K, Okumura N, Ota H. Sialic acid moiety of apolipoprotein E3 at Thr(194) affects its interaction with beta-amyloid(1-42) peptides. (2008) Clin Chim Acta. 388: 123-129. (査読有)
- ② Ohkawa R, Nakamura K, Shigeo Okubo, Hosogaya S, Ozaki Y, Tozuka M, Osima N, Yokota H, Ikeda H, Yatomi Y. Plasma sphingosin-1-phosphate measurement in healthy subjects: close correlation with red blood cell parameters. (2008) Ann Clin Biochem 45: 356-363. (査読有)

[学会発表] (計3件)

- ① 石嶺南生. N-ホモシステイン化 apolipoprotein AI の検出. 第55回日本臨床検査医学会学術集会, (2008年11月29日) 名古屋

- ② 嶋田早紀. Apolipoprotein AI-AII heterodimer の定量と臨床的意義. 第48回日本臨床化学会年次学術集会, (2008年8月30日) 浜松

- ③ 栗原由利子. Cathepsin Dによる Amyloid β 分解に及ぼす apolipoprotein E isoform の影響. 第54回日本臨床検査医学会学術集会, (2007年11月24日) 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸塚 実 (TOZUKA MINORU)

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究科・教授

研究者番号: 60431954

(2) 研究分担者

栗原 由利子 (KURIHARA YURIKO)

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究科・助教

研究者番号: 70291341

(3) 連携研究者