

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K11690

研究課題名(和文)血管障害マルチマーカーの「その場」同時分析法の開発と糖尿病合併症予見への展開

研究課題名(英文) Simultaneous on-site measurement of multi-markers associated with microvascular complications and its applications to prediction of diabetic 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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、糖尿病合併症の主要因である血管障害に関連する複数のマーカー分子(マルチマーカー)を臨床現場で同時に分析可能な方法を開発し、合併症予見への活用を目指した。分析には金ナノ粒子標識抗体を活用した電気化学的免疫測定(GLEIA)を採用した。この測定法は、安価で使い捨て可能なセンサーチップと手のひらサイズの検出器を用いる点の特徴である。測定対象として糖尿病合併症早期マーカー・プロレニンと血管障害マーカー・カルボキシメチルリジンに着目し、GLEIA構築を試みた。モデル分析物に対し高い再現性でGLEIAデータを取得できる条件を特定したのち、上記マーカーに対し検量線獲得のための条件を見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではGLEIAを用いてプロレニンに対する検量線を獲得し、その研究過程で、抗体によるプロレニンの構造変化を考慮して定量することが重要であることを見いだした。糖尿病合併症は腎臓や眼などの血管に様々な障害を与える。合併症が進行すると、患者は失明や人工透析を余儀なくされる。合併症予見は、発症前の効果的な治療、人々の生活の質の向上、医療費削減につながる。それゆえ本研究は、世界中の人々から糖尿病合併症発症のリスクを減らし、生活の質の向上ならびに健康・未病社会に貢献できる点から、国連の「持続可能な開発目標SDGs」の3番目のGoal「すべての人に健康と福祉を」の実現につながる。

研究成果の概要(英文)：Diabetes are a group of metabolic disorders characterized by hyperglycaemia (high blood glucose levels). If left unchecked over the long term, it can cause life-threatening damages to various body organs called diabetic complications. To develop a point-of-care testing for diabetic complications, we utilized a gold-linked electrochemical immunoassay (GLEIA) as a potential point-of-care testing and determined the experimental conditions and procedures needed for acquisition of reproducible GLEIA data and standard curves of prorenin (an early marker of diabetic complications) and a glycoxidation compound carboxymethyl-lysine (a risk marker for microvascular complications), which are the typical multi-markers involved in the complications.

研究分野：酵素科学

キーワード：プロレニン 糖尿病合併症 臨床現場即時検査法 SDGs

1. 研究開始当初の背景

糖尿病に伴う高血糖状態ならびに酸化ストレス状態が長期間続くと、血中の生体分子は非酵素的糖化反応を受ける。その結果、生体分子の機能が損なわれた最終糖化産物が形成され、血管障害が発生する。障害を受けた血管は高血圧症でさらに損傷が悪化し、糖尿病合併症の発症を早める。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、患者は失明や人工透析を余儀なくされる。合併症を予見できれば、発症前に効果的な治療を施すことが可能となり、人々の生活の質の向上と医療費削減が実現できると考えられる。

血管障害を反映するマーカー、障害促進マーカー、糖尿病合併症の早期マーカーが報告されているが、それらの測定は時間のかかる精密測定に委ねられ、臨床現場で実行可能な測定法は未発達である。

2. 研究の目的

本研究では、糖尿病合併症の主要因である血管障害に関連する複数のマーカー分子（マルチマーカー）に着目し、マルチマーカーを臨床現場で同時に分析可能な方法を開発、その方法を糖尿病合併症の予見に活用することを狙う。本研究は、世界中の人々から糖尿病合併症発症のリスクを減らし、生活の質の向上ならびに健康・未病社会に貢献できる点から、国連の「持続可能な開発目標 SDGs」の3番目のGoal「すべての人に健康と福祉を」の実現につながる。

3. 研究の方法

分析には金ナノ粒子標識抗体を用いた電気化学的免疫測定法である Gold-Linked Electrochemical Immunoassay (GLEIA)を用いた。この測定法は、安価で使い捨て可能なセンサーチップと手のひらサイズの検出器（タブレット端末で制御）を用いる点が特徴である。この方法なら持ち運びも容易で、サンプルが取れる場所なら“いつでもどこでも”測定でき、臨床現場即時検査法としての潜在性がある。

糖尿病の疫学研究から、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倍上昇していること（*N. Engl. J. Med.* 1985）、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（*Kidney Int.* 1996; *Diabetologia* 1999）が報告されている。プロレニン（血圧調節酵素レニンの不活性な前駆体）は糖尿病合併症の早期マーカーである。一方、最終糖化産物は毛細血管に血管障害（細小血管障害）を招くことが知られており、細小血管障害マーカーとしてカルボキシメチルリジン(CML)が報告されている（*Diabetes Metab.* 2003）。本研究では、プロレニン及びCMLを測定対象マルチマーカーとして電気化学測定法の基礎研究を行った。

(1) 再現性構築

GLEIAでpg/mlの濃度域を測定した報告例のあるヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)をモデル分析物として、再現性構築のための測定条件を検討した。hCGに対しイムノクロマト法を構築した論文（*Colloids Surf. B. Biointerfaces* 2017）を参考に、同様の抗原hCG、標識抗体としてhCGモノクローナル抗体、固相化抗体としてhCGポリクローナル抗体を利用した。測定に用いる電極 Disposable Electrochemical Printed-Chip (DEP-Chip) 及び測定装置 BDTminiSTAT100は株式会社バイオデバイステクノロジーから購入した。金コロイド(BBI Solutions EMGC40)に標識抗体を結合させるため、同論文を参考に金コロイドへ抗体標識を行なった。GLEIAは(1)DEP-Chipの作用極への抗体の固相化、(2)ブロッキング、(3)金コロイド標識抗体とhCGの混合溶液の作製、(4)作用極への混合溶液の添加、(5)DEP-Chipの洗浄、(6)測定(Differential Pulse Voltammetryによる金の還元電流測定)の6段階からなる。初めにhCG濃度5条件(0, 5, 50, 500, 5000 pg/ml)で測定を行い、実験操作の改善や測定条件のブロッキング剤を検討した。さらにhCG濃度(0~100 ng/ml)8条件を3連で測定、検出限界を求めた。

(2) プロレニン GLEIA

先行研究(基盤研究C:15K01707)で見いだした課題(抗体と金コロイドとの標識効率の向上、並びに感度向上の鍵となるより親和性の高い抗体の選別)に重きを置き、研究を実施した。具体的には、抗体と金コロイドとの標識効率の向上を狙い、化学結合法による標識を行った。加えて、より親和性の高い抗体を選別するため、抗プロレニン抗体として、プロセグメント配列を認識するポリクローナル抗体2種とモノクローナル抗体7種(本研究で新たに検討)、レニン配列を認識するポリクローナル抗体3種(2種は本研究で新たに検討)を用いた。その際、抗体との組合せ並びに抗体とプロレニンを結合させる順序を変え、合計52条件でGLEIAシグナルを取得し、シグナルノイズ比とシグナルの抗原濃度依存性をそれぞれ評価した。GLEIAは(1)の条件に基づき実施した。

(3) カルボキシメチルリジン(CML)に対する GLEIA

CML-BSAを抗原とし、CMLを認識する抗CML抗体(マウス由来)を用いて間接ELISAを構築した。次いで、CMLに対するGLEIAを(1)の条件に基づき実施した。まずCML-BSAを電極DEP-Chipに固相化したのち、一次抗体として抗CML抗体を、二次抗体として金コロイド標識した抗マウス抗体を同電極に逐次的にのせて反応させ、GLEIAシグナルを測定した。

4. 研究成果

(1) 再現性構築

実際に GLEIA 測定を進めると、複数回の測定値間でのばらつきが大きいことに直面した。加えて抗原非存在下で電気化学的シグナルが観測された。「研究の方法」に示した操作段階(4)で DEP-Chip が乾燥していたのが原因と考え、段階(1)から(4)を湿潤環境下で操作したところ、抗原非存在下での電気化学的シグナルの発生を抑えることができた。さらにブロッキング剤をスキムミルクから BSA に変更することで安定したシグナルが得られるようになった。hCG 濃度を変えて測定を行い、図 1 のようなミカエリス・メンテン型の検量線を得た。検量線から検出限界は 1.4 ng/ml であった。これらの結果から、GLEIA を用いた正確な定量測定の実験的基礎を得ることができた。

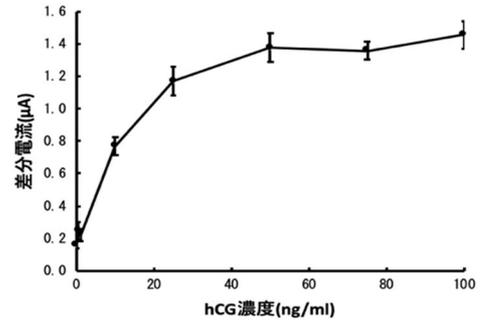


図 1 . hCG 検量線 (0~100 ng/ml)

(2) プロレニン GLEIA

抗レニン抗体を電極に固相化し、抗プロセグメント標識抗体金コロイドとプロレニンを premix (両者を事前に混合) する条件で行ったサンドイッチ GLEIA において、プロレニン濃度 500~5,000 ng/ml の濃度域で直線性を示す検量線を得た (図 2A)。一方、抗プロセグメント抗体を固相化、抗レニン抗体標識金コロイドとプロレニンを premix した測定や、異なる抗体の組み合わせを含めた他の測定では同様の結果が得られなかった。レニンの活性部位を覆うプロセグメントへ抗体が結合することによりプロセグメントが開くという研究代表者らの報告 (*J. Biol. Chem.* 2003) を踏まえると、抗プロセグメント抗体により構造変化が誘起されたプロレニンが抗レニン抗体に結合しやすくなったと考えられる。

抗プロセグメント抗体のプロセグメント結合特性について、プロレニンへの温度処理によりプロレニンの構造が変化した結果、抗体結合効率が増加することを明らかにした。

(3) CML に対する GLEIA

CML に対する間接 ELISA を構築し、CML 濃度 10~75 ng/ml で直線性を示す検量線を得た。次いで GLEIA を構築し、1,000~10,000 ng/ml の CML-BSA 濃度で直線性を示す検量線を得た (図 2B)。

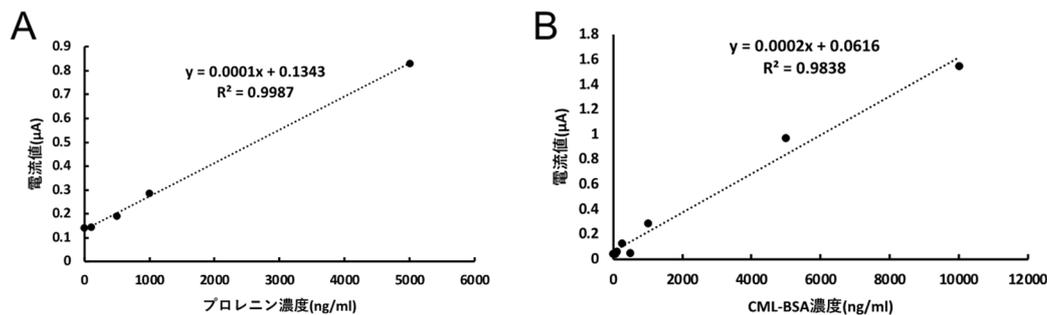


図 2 . GLEIA 検量線。(A) プロレニン 及び (B) カルボキシメチルリジン (CML)

(4) 展望

本研究課題において、血管障害に関連するマルチマーカーの代表として、糖尿病合併症の早期マーカーであるプロレニンと細小血管障害マーカーであるカルボキシメチルリジン (CML) に対し、金ナノ粒子標識抗体を用いた電気化学的免疫測定法 GLEIA の構築を行った。両マーカーに対し検量線獲得のための条件を特定した。現時点で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、高感度化に向けた課題解決のためさらに研究を進める。具体的な解決策には以下が挙げられる。

GLEIA 電極上への抗原検出部位の細密化

抗プロセグメント抗体を用いた抗原 (プロレニン) の特異的捕集・濃縮

プロレニンと CML の同時測定

研究代表者はバングラデシュ・ダッカ大学で開催された国際会議において本研究課題に関連する研究発表を行った。発表に関する質疑では、同国で糖尿病患者の増加が問題となっていることを背景に、本研究で開発する分析法への関心や期待が寄せられた。さらに研究代表者は、ダッカ大学生物化学分子生物学科の A.H.M. Nurun Nabi 教授とともに、糖尿病と血圧調節機構レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系との関連性についての病理学的ならびに遺伝学的な知見を書籍へ分担執筆した (*IntechOpen* 2021)。糖尿病と血圧調節機構に関する遺伝子多型と病態との関連性を俯瞰した上記知見に基づいて、本研究の解析対象であるマルチマーカーの生体内の役割に更なる洞察を加え、予防医療の技術基盤の充実に貢献したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nurun Nabi A.H.M., Ebihara Akio	4. 巻 Chapter 2
2. 論文標題 Diabetes and Renin-Angiotensin-Aldosterone System: Pathophysiology and Genetics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 IntechOpen	6. 最初と最後の頁 21-51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5772/intechopen.97518	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 家城孝幸, 島田敦広, 海老原章郎
2. 発表標題 ELISA測定における抗原への処理が抗体結合効率に与える影響 - 糖尿病合併症早期マーカープロレニン为例として -
3. 学会等名 日本農芸化学会 中部支部 第193回例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akio Ebihara
2. 発表標題 Development of novel assay systems for non-communicable diseases prevention
3. 学会等名 4th International Conference of Biotechnology on Health and Agriculture as a joint conference with Innovation in Plant and Food Sciences, IPFS-ICBHA 2019-GNOBB Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

(1) 岐阜大学応用生物科学部 生体分子機能学研究室
<http://www.abios.gifu-u.ac.jp/sbk/>

(2) インド工科大学グワハティ校化学工学科客員教員 (Visiting Professor)
<https://www.iitg.ac.in/chemeng/faculty.php>

(3) researchmap
<https://researchmap.jp/read0117842>

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
研究協力者	高坂誠 (Kousaka Makoto)	岐阜大学・自然科学技術研究科・大学院生 (13701)	
研究協力者	家城孝幸 (Ieki Takayuki)	岐阜大学・自然科学技術研究科・大学院生 (13701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
バングラデシュ	ダッカ大学		