

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）	
研究期間：2008～2009	
課題番号：20790414	
研究課題名（和文）	臨床検査法として有用な新しいHDL亜分画測定法の開発
研究課題名（英文）	Development of a new and useful method in clinical testing of HDL subfractions
研究代表者	
臼井 真一（USUI SHINICHI）	
岡山大学・大学院保健学研究科・准教授	
研究者番号：50346417	

研究成果の概要（和文）：

本研究ではHDLの亜分画測定法について、2つの異なる抗体を用いた免疫測定法（ELISA法）により検討を行った。その結果、使用抗体として抗アポAII抗体と抗アポE抗体を用いるサンドイッチ法では、反応液組成などの測定条件を工夫することでアポAII-E複合体の定性的な分析が可能であった。さらに、FRETによるホモジニアスな測定系での分析も試みたが、有意なシグナルを検出するまでには至らなかった。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, I studied an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting serum high-density lipoprotein (HDL) subfractions by two different types of antibodies against HDL. Using anti apo E and anti apo A-II antibodies, apoAII-E complex that is contained in HDL particles was qualitatively determined under an optimal analytical condition. I, additionally, tried to detect the complex by fluorescence energy transfer method, but did not detect a significant fluorescent signal.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：臨床化学検査

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：HDL、アポリポタンパク質、ELISA

1. 研究開始当初の背景

生活習慣の変化や高齢者人口の増加に伴い、糖尿病、高血圧、高脂血症などの生活習慣病の罹患率が急速に増加しており、その予防は医療厚生分野において国民的課題となってきた

ている。高脂血症は動脈硬化症の最も重要な危険因子の一つであり、特に高コレステロール血症はその発生・病態において重要な役割を担っていると考えられている。その一方で、

心筋梗塞や狭心症などの動脈硬化性疾患を有する患者でも高脂血症を伴わないケースがあり、これらの患者の発症リスクをより早期にそして正確に予測する新しい生化学的マーカーの確立が期待されている。

2. 研究の目的

コレステロールは水に不溶なため、血中では蛋白質と複合体を形成したリポタンパク質として運搬される。リポタンパク質は、その粒子組成の違いからいくつかの種類に分類されるが、中でも、HDL(高密度リポタンパク質)は末梢の余分なコレステロールを肝臓へ運ぶ役割(コレステロール逆転送系)を担っていることから、抗動脈硬化作用をもつリポタンパク質として知られている。また、このHDLにはいくつかの亜分画が存在しており、強い抗動脈硬化作用を持つHDLあるいは抗動脈硬化作用を持たないHDLを区別して測定することは、冠動脈疾患のリスクを評価する上でより有用な指標になると考えられる。そのためには、目的とするHDLを選択的に定量できる測定法が必要である。本研究では、HDL粒子に含まれるタンパク質組成の違いに注目し、異なる2種の抗体を用いた新しいHDL測定法の確立をめざした。具体的には、

(1) サンドイッチELISA法によるHDL亜分画検出方法の検討。

(2) 蛍光エネルギー移動(Fluorescence resonance energy transfer, FRET)によるホモジニアスなHDL亜分画検出方法の検討

(3) 上記方法によるHDL亜分画測定の臨床応用に関する検討を主目的とした。

3. 研究の方法

(1) サンドイッチELISA法による検討

①異なる2種類の抗体を使用して、特定のHDLが検出できるかを検討した(図1)。抗体は、

HDL粒子内に含まれていると考えられている、apoAI, apoAII, apoE, CETP(コレステロール転送蛋白), PON(パラオキシナーゼ)、PAF-AH(血小板活性化因子水解酵素)などに対する抗体を用いた。

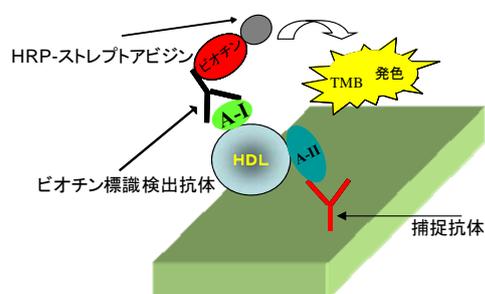


図1 サンドイッチELISA法

②抗原抗体反応を増強させ、かつ、非特異的の反応を抑制させる条件を得るために、各種界面活性剤や化学試薬を反応系に加えて、検出条件を検討した。

(2) FRET法による検討

上記(1)のサンドイッチELISA法で測定できる抗体の組み合わせが見つかったものについて、FRETによるホモジニアスな簡易測定系を検討した。FRETはある蛍光分子(ドナー)から他の蛍光分子(アクセプター)に励起エネルギーが移動する現象であり、ドナーとアクセプターが接近したときに起こる。蛍光物質としてAlexa Fluor 488およびHiLyte Flour 555を標識した抗体を用いて検討を行った。

4. 研究成果

(1) 異なる2種類の抗体の組合せによるHDLの検出(ELISA法)。

①サンドイッチELISA法による検討では、HDL粒子に含まれているとされる、アポAI、アポAII、PON、CETP、PAF-AH、アポDなどに対する抗体の組み合わせで検出を試みた。その結果、反応液に界面活性剤を入れない場合は有

意な反応を確認することができなかった。しかし、Tween20やTyloxapolなどの非イオン系界面活性剤を抗原抗体反応系に加えることで抗アポAII抗体と抗アポE抗体を使う系で検出できた(図2)。

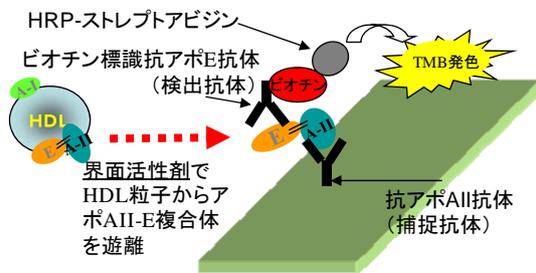


図2 アポAII-E複合体の測定

	apoE-A II ¹⁾	apoA II ^{-E2)}
総コレステロール	-0.204	-0.106
VLDLコレステロール	-0.454(**)	-0.238
LDLコレステロール	-0.317(*)	-0.12
HDLコレステロール	0.381(*)	0.117
LDL 溶出時間 ³⁾	-0.266	-0.17
HDL 溶出時間 ³⁾	-0.495(**)	-0.186
総apoA II	-0.11	-0.029
総apoE	0.519(**)	0.444(**)
HDL-apoE	0.541(**)	0.206

1)補足抗体に抗アポE, 検出抗体に抗アポAIIを用いて測定
 2)補足抗体に抗アポAII, 検出抗体に抗アポEを用いて測定
 3)ゲル濾過HPLCで分析した際の溶出時間。大型LDL(HDL)は早く、小型LDL(HDL)は遅い時間に溶出される。
 ** 相関係数は1%水準で有意
 * 相関係数は5%水準で有意

表1. 各種脂質パラメーターとの相関係数(n=41)

補足抗体に抗アポAII、検出抗体に抗アポE抗体を使用する場合と、逆に補足抗体に抗アポE、検出抗体に抗アポAII抗体を用いる方法を検討すると、両者は $r = 0.56$ ($n=41$, $p < 0.001$)の有意な相関を示したが、HDL-コレステロール濃度など、他の脂質パラメーターに対して両測定法は異なる相関を示した(表

1)。このことから、補足抗体に抗アポAII、検出抗体に抗アポE抗体を使用する場合と、逆に補足抗体に抗アポE、検出抗体に抗アポAII抗体を用いる方法とでは同一物質が測定されていない可能性が生じた。

②ELISA法で強いシグナルが得られたサンプルについてウェスタンブロッティングを行った結果(図3)、抗アポAII抗体と抗アポE抗体の両方に反応する蛋白質が44kDa付近に検出され、また、還元状態ではこのバンドが消失することから、この蛋白質はアポAII-E複合体(ヘテロダイマー)であると推定された。

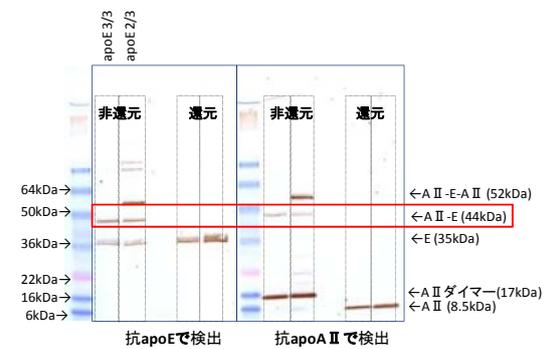


図3. ウェスタンブロッティングによる検出

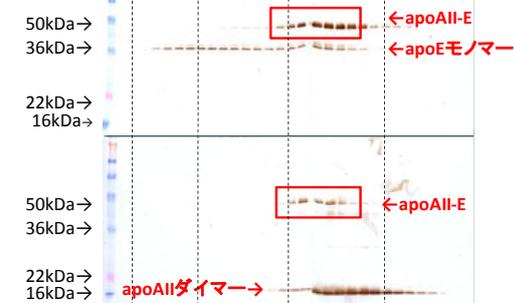
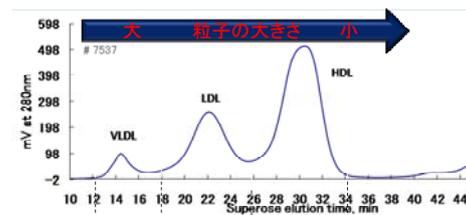


図4. アポAII-E複合体の分布

③ゲルろ過HPLC法で分離・分取したフラクションをウエスタンブロッティングで分析し、どのリポタンパク質分画にアポAII-E複合体が含まれているかを確認した。図4に示すように、抗アポE抗体と抗アポAII抗体の両方に反応する蛋白質がフラクション26～30分で主に検出されたことから、HDLの中でも比較的粒子径の大きいHDLにアポAII-E複合体が分布していることが確認された。

④ELISA法による測定についてさらに検討を進めるために、血清からアポAII-E複合体を精製し、精製アポAII-E複合体を用いた実験を試みた。抗アポAII抗体または抗アポE抗体を結合させたアフィニティゲル(Sepharose 4B、GEヘルスケアバイオサイエンス社)を用いた精製では、超遠心法で分離したリポ蛋白分画と抗アポAII抗体ゲルとを反応させると(一段階目)、目的の蛋白であるアポAII-E複合体がその結合分画に含まれていることが電気泳動後の銀染色で確認できた。しかし、一段階目で回収した蛋白を二段階目の抗アポE抗体ゲルと反応させると、結合分画には銀染色で検出できる蛋白質が含まれていなかった。同様に抗アポE抗体ゲル、抗アポAII抗体ゲルの順にも精製を行ったが、結果は同じだった。次に、ヘパリンカラムと免疫沈降法の組合せにより精製を試みた。その結果、ウエスタンブロッティングでは抗アポAII抗体と抗アポE抗体の両方に反応するバンドが検出され、アポAII-E複合体が粗精製されていることが確認できた。この精製蛋白を用いてサンドイッチELISA法で添加試験を行った結果、添加濃度に比例した有意なシグナルを得ることができたが添加回収率が38-53%と予想より小さな値となった。この原因としては、血清に存在する他の成分がELISAでの測定系に影響していることが一番に考えられた。したがって、

HDLに含まれるアポAII-E複合体は異なる2種の抗体を使ったELISA系では定性的には検出可能であると考えられるが、定量的な目的で分析するためには測定条件を今後改善していく必要がある。

(2) FRET法による検討

①ELISA法で反応が確認された抗アポE抗体と抗アポAII抗体の組合せを使用して、FRET法によるアポAII-E複合体の検出を試みた。ELISA法で強いシグナルが得られたサンプルについて、蛍光標識二次抗体(Alexa488, 555)を用い検討を行ったが有意なシグナルは得られなかった。

②蛍光標識された二次抗体を用いたことが検出できなかった一因である可能性を考え、抗アポE抗体および抗アポAII抗体をそれぞれ、Alexa Fluor 488 およびHiLyte Flour 555で直接標識して用いた。しかし、全血清および精製アポAII-E複体のいずれに対してもシグナルは小さく、ブランク付近の値で検出することができず改善されなかった。FRETでの検出では接近する2つの蛍光物質の距離が重要であるため、用いる抗体やアポAII-E複体の大きさ(分子量)が問題となっている可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白井 真一 (USUI SHINICHI)

岡山大学・大学院保健学研究科・准教授

研究者番号：50346417