

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590637

研究課題名（和文）

表面プラズモン共鳴解析による抗アミロイド抗体などの低親和性自己抗体の検出

研究課題名（英文）

Detection of low affinity autoantibodies like anti-amyloid antibodies by surface plasmon resonance analysis

研究代表者

山田 俊幸 (YAMADA TOSHIYUKI)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：50211636

研究成果の概要（和文）：関節リウマチの主要合併症である AA アミロイドーシスの診断ツールとして、患者血清中に出現する可能性のある抗アミロイド抗体を検出する系を確立することを目的とした。方法論として弱い抗原抗体反応を検出できる表面プラズモン共鳴解析（Biacore）を用いた。モデル系の構築のため、アミロイド成分の SAA に反応するモノクロナル抗体をマウスおよびヒトへ反応するものとしてそれぞれ作製した。特に抗ヒト SAA 抗体はアミロイド化して切断された SAA 断端に反応するもので、その特異性は今後の研究に大いに応用が期待されるものであった。Biacore による抗アミロイド抗体の検出系構築のため、Biacore のセンサーチップへの抗原の結合条件、そのための抗原の可溶化条件の検討を行った。最終的な反応工程として、センサーチップに抗体を固定化し、可溶化したアミロイド抽出物をトラップさせ、試料血清、抗免疫グロブリン抗体の順に反応させた。試料に抗アミロイド抗体を用いたときはレスポンスが確認されたが、トライアルに応用した患者血清では十分なレスポンスが得られず、感度の向上が課題となった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was the development of the method using SPR analysis (Biacore), which could detect low affinity antibodies. As a model, anti-amyloid antibodies, which might appear in AA-amyloidosis, the major complication in rheumatoid arthritis, were targeted. In the process of investigation, we succeeded in establishing monoclonal anti-SAA, either anti-mouse or anti-human, antibodies. Especially, an antibody specific to AA carboxyl-terminus generated from SAA degradation during amyloidogenic process must be useful for the further investigation in fundamental and clinical aspects in AA-amyloidosis. For antibody detection using Biacore, a sensor chip immobilized with anti-AA antibodies was reacted in order with extracted amyloid tissues, patient serum, and anti-human immunoglobulin. The system worked when anti-SAA antibodies were used instead of patient serum. Thus, the system itself is able to be applied for detection of other autoantibodies. However, the trails using patient sera failed to detect the significant antibody activity. To amplify the sensitivity may be the next problem to improve.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：臨床化学

## 1. 研究開始当初の背景

AA アミロイドーシスは関節リウマチをはじめとする慢性炎症性疾患の主要合併症である。その診断は消化管粘膜などの生検組織での病理学的検索に拠っている。生検診断は侵襲的であり、繰り返しの施行が困難であるため血清診断が望まれている。他の型のアミロイドーシスにおいてはアミロイドに対する自己抗体が検出されるとの報告があり、本研究でも抗 AA アミロイド抗体の検出を目指した。方法論として、そのような抗体は結合するものの解離が速い、つまり親和性の弱い抗体であることが想定されるため、この目的で汎用されている ELISA 法などではなく、表面プラズモン解析により分子間結合相互作用を検出する機種である Biacore を使用することとした。

## 2. 研究の目的

Biacore を利用して、おそらく低親和性であろうと思われる、抗 AA アミロイド自己抗体を検出する。その測定条件設定を確立する。

## 3. 研究の方法

まず、検出される抗体のモデルとして使用するための抗アミロイド抗体を作製する。次にマウス由来またはヒト由来のアミロイド組織を可溶化し、Biacore のセンサーチップに直接固定化するか、もしくは固定化した抗体にトラップさせる。Biacore のマニュアルに従って、サンプル血清 (抗体)、抗マウスまたはヒト免疫グロブリンを順次アプライしてレスポンスをみる。

## 4. 研究成果

アミロイド成分であるマウス SAA またはヒト SAA に反応するモノクロナル抗体をラットを免疫動物として使用することで得た、抗マウス SAA モノクロナル抗体は反応性の異なるものを 3 種類作製できた。研究の主目的ではないがこの抗体を利用して、マウス SAA の ELISA 系を構築し、高感度にマウス炎症を検出することが可能になった。また、マウス組織切片での免疫組織化学で抗体の一部は優れた染色性を示した。抗ヒト SAA モノクロナル抗体については、今回 SAA がアミロイド化するさいに蛋白分解を受けて出現する新しい C 末端に対するものを作製することに成功した。これも主目的からは外れるが、この抗体はアミロイド化していない SAA には反応せず、アミロイド特異的に反応することが確認され (図 1)、免疫組織化学などのアミロイド臨床診断に応用が可能であった (図 2)。また、仮に患者血清中に自己

抗体が出現するとしたら、おそらくアミロイド特有の分解産物の構造に関連した部位を認識するものと予想される。従ってこの抗体は患者血清中の自己抗体を検出さいのモデルになるものと期待される。

実際の Biacore による検出系では、当歌可溶化したアミロイド組織を直接センサーチップに固定化することを目論んだが、固定化効率は不良であった。次に抗アミロイド抗体をまずセンサーチップに固定化して、可溶化したアミロイド組織を捕捉させたものを結合実験に供した。Biacore の実験ではこのセンサーチップに、試料血清、抗免疫グロブリン抗体を順に反応させた。試料に抗アミロイド抗体を用いたときはレスポンスが確認されたが、トライアルに応用した患者血清では十分なレスポンスが得られず、感度の向上が課題となった。今後は先に得られた抗体との競合反応を利用することで反応の特異性を高め、多段階反応の採用により検出感度を高めるなどの工夫を試したい。今回の抗アミロイド抗体の検出はまだ成功したとはいえないが、この実験系自体は他の自己抗体の検出に応用可能と思われ、その可能性を探っていきたい。

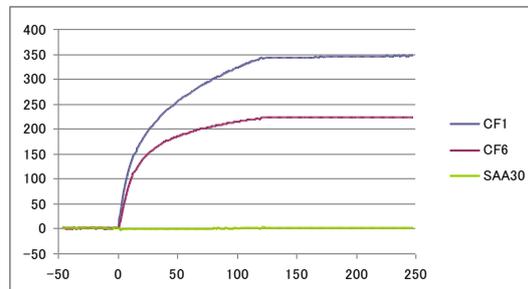


図 1a 新規作製抗ヒト AA 断端抗体 (CF1,CF6) の免疫源ペプチドに対する反応 (Biacore). 対象の抗 SAA30 抗体は反応していない。

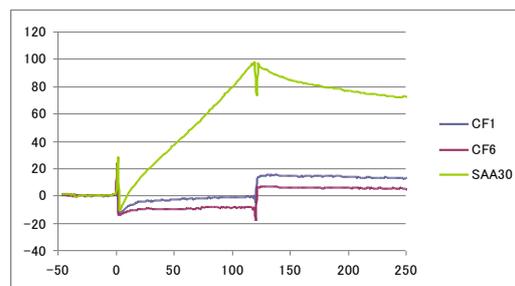


図 1b 新規抗体は SAA 含有 HDL (high density lipoprotein) に反応しない、一方対象

抗体の抗 SAA30 抗体は反応している。

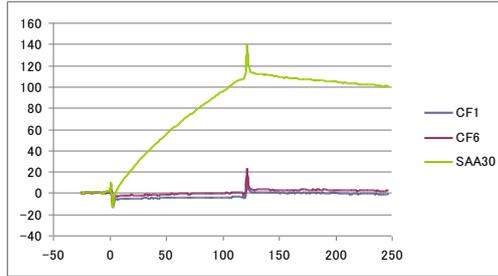


図 1c 新規抗体は intact SAA に反応せず、一方抗 SAA30 抗体は反応する。

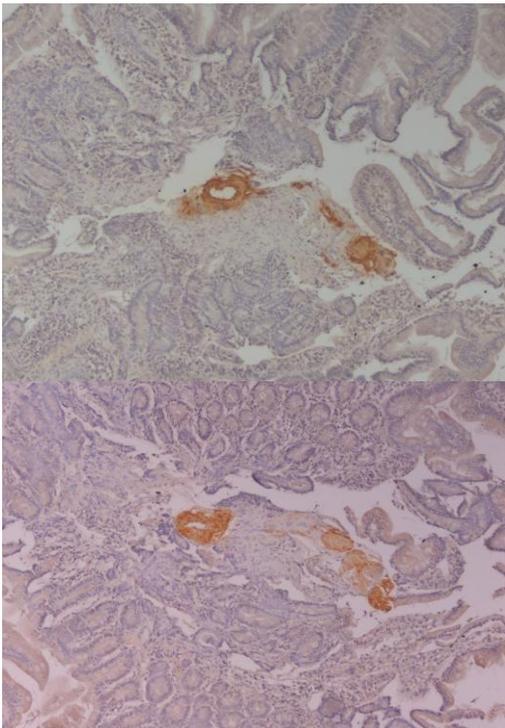


図 2a アミロイド陽性患者の胃粘膜を対象の抗 SAA30 抗体（上）と新規抗体 CF6(下)で免疫染色したもの。両抗体ともアミロイド沈着に反応している。

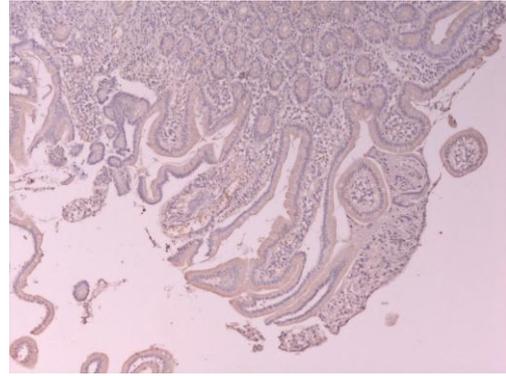
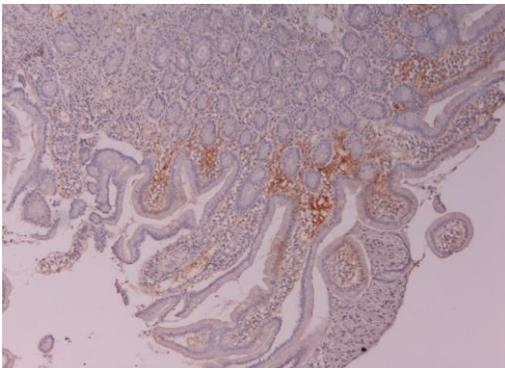


図 2b アミロイド陰性患者の胃粘膜を対象の抗 SAA30 抗体（上）と新規抗体 CF6(下)で免疫染色したもの。SAA30 はアミロイド化していない前駆蛋白 SAA（おそらく流血中のもの）に反応しているが CF6 は反応していない。

### 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 9 件）

1. Kotani K, Satoh N, Yamada T. Bezafibrate and serum amyloid A-low-density lipoprotein complex in patients with type 2 diabetes mellitus and hypertriglyceridemia. *Eur J Intern Med.* 21: e10, 2010
2. 山田俊幸. 全身性アミロイドーシス. *検査と技術* 38: 343-347, 2010
3. 山田俊幸. M 蛋白検出法とその問題点. *臨床病理* 58:397-400, 2010
4. 山田俊幸. 広義のアポリポ蛋白. SAA. *臨床検査* 54:395-400, 2010 山田俊幸: 免疫グロブリン (IgG, IgA, IgM). *検査と技術* 38 (増): 902-904, 2010
5. Okuda Y, Yamada T, Matsuura M, Takasugi K, Goto M, Ageing: a risk factor for amyloid A amyloidosis in rheumatoid arthritis. *Amyloid: J Prot Fold Dis* 18: 108-111, 2011
6. 山田俊幸. 非特異炎症マーカー、主要マーカーとしての  $\beta$  2-ミクログロブリン. *臨床検査* 55:395-400, 2011
7. 山田俊幸. 緊急報告すべき検査結果のすべて、CRP. *検査と技術* 39 (増): 795-797, 2011
8. Yamada T, Okuda Y. AA amyloid quantification in biopsy samples from stomach. *Ann Clin Lab Sci* 42:3-6, 2012
9. 山田俊幸. AA アミロイドーシスの病態と SAA. *臨床化学* 41:16-21, 2012

〔学会発表〕（計 5 件）

1. 山田俊幸、奥田恭章: SAA 1 と HDL の親和

- 性. 第 54 回日本リウマチ学会学術集会.  
2010 年 4 月 23 日. 神戸
2. 山田俊幸、小谷和彦、佐藤純司：実験 AA アミロイドーシスにおける SAA とアポ E の動態. 第 51 回日本臨床化学会年次学術集会. 2011 年 8 月 26 日. 札幌
  3. 山田俊幸. AA アミロイドーシスモデルマウスにおける SAA、apoE の動態. 第 55 回日本リウマチ学会学術集会 2011 年 7 月 18 日、神戸
  4. 老沼弘俊、山田俊幸. 免疫固定法システム Hydrasys による非濃縮尿における Bence Jones 蛋白の検出. 第 36 回日本骨髄腫研究会総会. 2011 年 11 月 12 日、東京
  5. 老沼弘俊、小谷和彦、篠瀬直穂美、山田俊幸. 免疫固定法システム Hydrasys による非濃縮尿における Bence Jones 蛋白の検出. 第 58 回日本臨床検査医学会総会. 岡山. 2011 年 11 月 20 日

[図書] (計 2 件)

1. 山田俊幸. 検査と適応疾患 (櫻林郁之介監). 社会保険研究所、分担編集, 2010
2. 山田俊幸. 今日の臨床検査 (櫻林郁之介監). 南江堂 分担編集, 2010

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況 (計 0 件)

なし

[その他]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 俊幸 (YAMADA TOSHIYUKI)  
自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号：50211636

### (2) 研究分担者

佐藤 純司 (SATO JUNJI)  
自治医科大学・医学部・研究員  
研究者番号：90536301

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

