

## 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25年4月1日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590530

研究課題名（和文） 小麦胚芽蛋白質合成系を活用したレジスチン特異抗体の作成と全自動測定システムの開発

研究課題名（英文） Establishment of anti human monoclonal antibody clones using cell-free protein translation system and development of automatic measurement system of human resistin.

研究代表者

西田 亙（NISHIDA WATARU）

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：80271089

研究成果の概要（和文）：

レジスチンはインスリン抵抗性を惹起するアディポサイトカインであり、糖尿病や動脈硬化において重要な役割を演じていると考えられている。また、その血中濃度は遺伝子に強く支配されているため、遺伝因子と疾病の関連を探る絶好の研究対象でもある。本研究は、血中レジスチンを超高感度で測定するために、マウスモノクローナル抗体を樹立した。一般住民検診2000名の血中レジスチンを測定することで、遺伝因子と環境因子の両面から、糖尿病と動脈硬化の発症を解析することが可能となる。

研究成果の概要（英文）：

Resistin is one of the adipocytokines which induces insulin resistance and is thought to play an important role in diabetes and atherosclerosis. Human resistin serum concentration in the serum is critically determined by genomic polymorphisms, so it is an attractive target studying the relationship between gene and disease. To measure resistin concentration in higher sensitivity, we established anti human resistin monoclonal clones. We can analyze the underlining mechanism of diabetes and atherosclerosis from the point of genetic factor and environmental background.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：糖尿病、レジスチン、インスリン抵抗性、モノクローナル抗体、ELISA

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病、動脈硬化などの病態においては、アディポサイトカインの多量体が臨床的に重要な意味合いを持っている。しかしながら、

現在市販されているレジスチン測定キットは、単量体、多量体を判別できない。

また、現在市販されているヒトレジスチンELISAキットの測定限界は1ng/mL前後で

あり、アッセイには血清 20  $\mu$ L 以上を必要とする。我々は、一般歯科医院受診患者におけるインスリン抵抗性とアディポサイトカインの解析を目指しているが、歯科医院での採血は事実上不可能である。このため、指尖採血サンプルからの解析が必要となるが、橋田らが開発した方法を応用することで、通常の ELISA よりも 1000 倍増感できる点に着目した。超高感度 ELISA 系を確立できれば、指尖血のみならず、歯肉溝浸出液に含まれる微量レジスチンを測定し、慢性歯周炎が全身のインスリン抵抗性に与える影響を解析することが可能となる。

## 2. 研究の目的

本研究は、インスリン抵抗性を惹起するアディポサイトカインとして世界的に注目されているレジスチンの臨床診断に必要な、ポリクローナル抗体と単量体/多量体特異的モノクローナル抗体の作成、およびこれらの抗体を用いた全自動分析装置用超高感度 ELISA キットの開発を目的として立案した。

## 3. 研究の方法

### (1) 無細胞蛋白質合成システムによる転写・翻訳

小麦胚芽発現用ベクターに His 標識もしくは GST 融合蛋白質としてヒトレジスチン cDNA をサブクローニングし、愛媛大学総合科学研究支援センターに設置されている全自動無細胞蛋白質合成システムを用いて、各種蛋白質の転写・翻訳を行った。His 標識蛋白質は Ni-NTA カラムで精製、GST 融合蛋白質は glutathione sepharose 4B カラムで吸着の後、precision protease で目的蛋白質を切断・分離した。

### (2) 単量体・多量体特異的ポリクローナル抗体の作成および特異性の評価

1 で得られた精製レジスチンを用いて、マウスを免疫し、モノクローナルクローン株を樹立した。反応性および競合試験による特異性を市販抗体と比較検討し、優れた抗体クローンを選出する。次に、橋田らの方法(徳島文理大学研究紀要, 第 77 号, 19, 2009)を用いて、超高感度ヒトレジスチン ELISA 測定系を確立する。

### (3) 一般住民健診サンプルの測定およびレジスチンと生理学的パラメータ・環境因子との関連の解析

平成 22 年度から愛媛県東温市において実施されている、一般地域住民を対象にした東温スタディのサンプル、約 1500 名の血清を新規に開発した超高感度ヒトレジスチン ELISA 測定系を用いて測定する。東温スタディでは、受診者全員に、身体測定、血圧、家庭血圧、脈波、家庭血圧、睡眠時無呼吸検査、自律神経検査、加速度計による活動度記録、摂取栄

養記録、75g OGTT を実施しており、超高感度で測定した血清レジスチン値と各種生理学検査、環境因子との関連を詳細に解析することができる。

### (4) 一般歯科医院を受診した慢性歯周炎患者の血中および歯肉溝浸出液中におけるレジスチンの解析

平成 23 年度から、愛媛県歯科医師会の協力により、一般歯科医院 20 施設との臨床共同研究を行っている。これまでは、簡易血糖測定器を用いた随時血糖を解析してきた。平成 24 年度からは、指尖穿刺による濾紙採血、およびストリップを用いて歯肉溝浸出液を回収し、超高感度ヒトレジスチン ELISA 測定系を用いて、血中、歯肉溝浸出液中のレジスチン値を測定する。合わせて、インスリンも測定することで、世界で初めて一般歯科外来受診者のインスリン抵抗性とアディポサイトカインの解析が可能となる。

## 4. 研究成果

(1) ヒトレジスチン全長 cDNA を発現ベクターにクローニングし、小麦胚芽を用いて蛋白発現を行った。蛋白合成にはセルフリースアイエンス社の小麦胚芽を用い、医学部コアラボ研究センターの合成装置により自動合成を行った。野生型、GST 融合型の 2 種類で発現を行い、合成・精製条件を種々検討したが、可溶性が低く十分な収量が得られず、また一部蛋白分解も認められた。このため合成方法を当初の計画から変更し、IRES を有した GFP とヒトレジスチンの共発現ベクターをレンチウイルスを用いて、HEK293T 細胞へ遺伝子導入した(レジスチンは N 末端にシグナルペプチドを有しているため、細胞外に分泌される)。導入細胞株に対して、計 4 回の FACS を連続して施行し、GFP 発現強度の高い細胞集団を得た。培養液 DMEM/10%FCS 下で拡大培養した後に、無血清培地へ変更し、3 日間におよぶ培養後にその上清を回収した。レジスチンは野生型および C 末端へキサヒスチジン標識型の 2 種類を発現させ、それぞれイオン交換クロマトグラフィー・ゲルクロマトグラフィー、His TRAP アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

(2) 精製レジスチンをマウスに免疫し、腸骨リンパ節からリンパ球を回収、細胞融合後にヒスチジン標識型レジスチンをコーティングした 96 穴プレート上で、クローニングを施行した。

平成 22 年度に得られたクローンのうち、ELISA のサンドイッチ法に使用可能な組み合わせを検討したが、十分な感度が得られなかった。そこで、再度マウス免疫を実施した。モノクローナル抗体のスクリーニングには、前回の GST 融合ヒトレジスチンではなく、His 標識ヒトレジスチンを固相化した 96 穴プ

レートを用いることとした。十分な吸光度が得られた  $0.3 \mu\text{g/ml}$  の固相化濃度で、ELISA スクリーニングを実施したところ、合計 13 種の陽性クローンを得た。次に、抗体の特異性を確かめるために、競合試験を実施した。競合因子としては、His 標識ヒトレジスチンおよび小麦胚芽にて翻訳した GST 融合ヒトレジスチンを使用した。競合因子による十分な抑制が認められたクローンは、13 クローンのうち 1 クローン(3E11)だけであったが、市販されている抗ヒトレジスチンマウスモノクローナル抗体に比較すると吸光度は低く、3E11 の親和性は優れたものではないことが予想された。

今回の免疫では、マウス 3 匹に免疫を施行したが、第 5 回免疫後にこのうち 2 匹が死亡したため、残り 1 匹はブーストを行うことなく、脾臓細胞を回収し、細胞融合を行った経緯がある。2 匹の死亡原因は明らかではないが、抗レジスチン抗体がマウスに対して何らかの糖代謝異常を引き起こした可能性がある。親和性の高い良質なモノクローナル抗体樹立を目指すため、第三回目のマウス免疫を実施した。今回は、コンプリートアジュバントによる初回免疫の後、インコンプリートアジュバントによる 2 回目の追加免疫、未処理抗原による 3 回目の追加免疫を行い、その後細胞融合を実施するプロトコルに変更している。

(3) 平成 21 年度から、東温市で実施している臨床疫学前向き調査「東温スタディ」では、平成 23 年度までに 1500 名のサンプル回収が終了し、今夏で合計約 2000 名の血清サンプルと各種血液生化学、循環器検査、睡眠時無呼吸検査、ライフコーダによる活動度評価、自律神経検査、栄養調査、生活習慣アンケート結果が揃う予定である。これらのサンプルを用いて、超高感度 ELISA による血中レジスチン測定、およびインスリン抵抗性と環境因子との関連性の解析が可能となる。

(4) 平成 22 年度から実施している、愛媛県歯科医師会との共同臨床研究では、県内 20 施設の歯科医院の協力により、研究が進んでおり、これまでに 720 名の外来患者の随時血糖値測定を実施した。これらの患者を対象に、指尖部からの濾紙採血、歯肉溝浸出液を回収し、空腹時血糖、空腹時血中インスリン、血中レジスチン、歯肉溝浸出液レジスチンを定量することで、慢性歯周炎進行度とインスリン抵抗性の関連を解析する。

## 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 1 件)

① Tabara Y, Saito I, Nishida W, Kohara K, Sakurai S, Kawamura R, Onuma H, Takata Y, Osawa H, Miki T, Tanigawa T, Relatively lower central aortic pressure in patients with impaired insulin sensitivity and resistance: the Toon Health Study, J Hypertens., 29:1948-1954, 2012

[学会発表] (計 4 件)

① 西田 互, 川村良一, 高田康徳, 相引真代, 芝真希, 能美幸信, 門田優子, 岡本愛, 西宮達也, 田原康玄, 三木哲郎, 斉藤功, 谷川武, 大沼裕, 大澤春彦, 血中レジスチンは OGTT 正常型かつ  $21 \leq \text{BMI} < 23$  の一般住民において各種インスリン指標と関連する【東温スタディ】, 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2012 年 5 月 19 日, 神奈川県パシフィコ横浜

② 原瀬忠広, 西田 互, 重松健司, 小林悟, 佐古弘文, 伊藤史郎, 村上始, 西田圭, 井上洋, 藤澤雅人, 吉津宏, 川村良一, 高田康徳, 大沼裕, 清水恵太, 浜川裕之, 大澤春彦, 一般歯科医院における血糖モニタリングの有用性【愛媛 Dental Diabetes スタディ】, 第 55 回日本糖尿病学会年次学術, 2012 年 5 月 19 日, 神奈川県パシフィコ横浜

③ 西田 互, 川村良一, 高田康徳, 門田優子, 星衛かよ子, 大森悠史, 荒川愛, 谷口裕美, 西宮達也, 松下由美, 相引真代, 田原康玄, 三木哲郎, 斉藤功, 櫻井進, 谷川武, 大沼裕, 大澤春彦, 地域一般住民において血中レジスチンは OGTT 正常型かつ非肥満群のインスリン抵抗性/感受性指数と関連する 東温スタディ, 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2011 年 5 月 19 日, 北海道札幌市

④ 西田 互, 森山啓明, 永田正男, 中村舞, 今川彰久, 花房俊昭, 高橋健二, 末廣正, 山田祐也, 中條大輔, 川村良一, 高田康徳, 大沼裕, 大澤春彦, 牧野英一, インスリン投与を契機に 2 型から 1 型糖尿病に転換した 6 症例のインスリン遺伝子と隣島関連ペプチドに対する T 細胞反応性の解析, 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2010 年 5 月 28 日, ホテルグランピア岡山

[図書] (計 2 件)

① 西田 互, 大澤 春彦, 検査 ONE POINT インスリン抵抗性の評価検査, SRL 宝函,

32:43-46, 2012

② 西田互, 大澤春彦, 血糖自己測定の指導法, 糖尿病最新の治療 2010～2012, 南江堂, 2010年, 4: 273-276

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西田 互 (NISHIDA WATARU)

愛媛大学・学院医学系研究科・講師

研究者番号：80271089

### (2) 研究分担者

大澤 春彦 (OSAWA HARUHIKO)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90294800

大沼 裕 (ONUMA HIROSHI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00294794