

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05188

研究課題名(和文)うつ病バイオマーカーであるエタノールアミンリン酸の酵素免疫測定法の開発研究

研究課題名(英文) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for depression biomarker ethanolamine phosphate

研究代表者

齋田 哲也 (Saita, Tetsuya)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：80419621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ベンゾイル化エタノールアミンリン酸(EAP)に対する抗体を用いて、EAPに特異的な競合型酵素免疫測定法(ELISA)を開発することに成功した。このELISAは、ヒト血漿中の $0.3\mu\text{M}$ 以下のEAP濃度を測定するのに十分な感度を有していた。血中のEAP濃度は $2.0\sim 3.0\mu\text{M}$ で、うつ病発症時には $1.5\mu\text{M}$ まで低下することが報告されている。それゆえ、本ELISAは、うつ病の診断におけるEAPの定量化に十分な感度を持つと考えられる。さらに、抗EAP抗体は、ベンゾイル化EAPに高い親和性を示した。したがって、本ELISAは、ヒト血漿中におけるEAPの定量法として貴重な新しい分析法となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EAPは低分子のため、EAPそのものの抗体を作製することは不可能である。それゆえ、これまでEAPの抗体は作製されていない。本研究では、EAPをベンゾイル化し、ベンゾイル化EAPを強く認識する特異抗体を作製することで、EAPに特異的なELISAの開発に成功した。このような手法によって、免疫測定法を開発された例はない。従って、本法はEAPのような単独ではハプテン抗原にはなりえない低分子化合物の免疫測定法の開発に有用な手法になる。本ELISAをキット化することができれば、多くの施設で繁用され、うつ病の早期発見と再発防止に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we successfully developed a competitive ELISA specific for EAP using antibody against benzoyl EAP. This ELISA was reproducible and sensitive enough to measure EAP concentrations of less than  $0.3\mu\text{M}$  in human plasma. The level of EAP in the blood ranges from  $2.0$  to  $3.0\mu\text{M}$ , but is reported to drop to  $1.5\mu\text{M}$  upon onset of depression. Therefore, this ELISA could be sufficiently sensitive for the quantification of EAP in diagnosis of depression. The anti-EAP antibody showed high affinity for benzoyl EAP. The presented ELISA should provide a valuable new tool for the quantification of EAP in human plasma.

研究分野：免疫化学

キーワード：酵素免疫測定法 うつ病 バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

うつ病は気分障害の一種であり、「抑うつ気分」と「興味・喜びの喪失」を主な症状とする。その原因として脳の機能障害、消失体験、本人の性格のほかストレスが主な原因となっている。特にうつ病は自殺率が高く、先進国で多発する疾患であり、現在大きな社会問題となっている。厚生労働省が実施している患者調査によれば、日本の気分障害患者数は2014年現在111.6万人とされているが、未受診患者を含めると全うつ病患者は400万人に達すると言われている。しかし、現在のうつ病診断は専門医による問診しか手段がなく、健康診断や専門外の診療科においてうつ病を発見するのは困難であると言われている。一方でうつ病は適正な治療によって治癒し、早期の発見が予後改善と再発防止に有効な疾患であるため、専門医でなくても診断できる客観的な判断基準であるバイオマーカーの早期開発が望まれている。そんな中、近年うつ病を血液検査で判定できる物質としてエタノールアミンリン酸 (EAP) が注目されている。<sup>1),2)</sup>

EAPは、脳内に多く存在するリン酸アナンダミドから生成される物質である。リン酸アナンダミドは、それ自体は生理活性を持たない物質であるが、アナンダミドとEAPに分解され、アナンダミドは主に脳の神経伝達物質の1つとして、「快感」「喜び」などといった感情に関わる物質として作用していることが知られている。アナンダミドはカンナビノイドに似ている物質であることから、「脳内麻薬」とも呼ばれている。このアナンダミドが脳内で作られる過程において同時にEAPも作られ、アナンダミドは主に脳で作用し、EAPは血液を通じて末梢に移行する。EAPの血中濃度は2.0~3.0 $\mu$ Mで推移していることが知られているが、うつ病に罹患するとこれが低下し、1.5 $\mu$ M以下になることが報告されている。EAPは血液検査にて測定することができることから、うつ病を判定する検査として使えるのではないかと期待され、現在研究・試験が進められている。しかし、EAPの分子量は141.06 Daと非常に低分子であり、特異的な吸光度波長や蛍光波長を有していないため、現在EAPの測定は、CE-TOFMS装置を用いる測定方法に限られている。CE-TOFMSでの測定は時間がかかり、また装置が高価で精密な分析機器のため限られた大学や分析機関などが所有するにとどまっており、地方の病院や診療所などでも、EAPをうつ病のバイオマーカーとして利用するための、より短時間かつ簡便な測定方法が求められている。抗体を用いる免疫測定法は、簡易かつ迅速な測定法として、多くの生体内物質や薬物などの測定法として臨床の現場で広く利用されている。それゆえ、臨床応用可能な特異的かつ簡便なEAPの酵素免疫測定法を開発することを試みる。

## 2. 研究の目的

本研究では、うつ病のバイオマーカーとして期待されているEAPの特異的かつ簡便な酵素免疫測定法を開発する。EAPはうつ病のバイオマーカーとして期待されているが、その測定は、CE-TOFMS (キャピラリー電気泳動時間飛行型質量分析) 装置を用いる測定方法に限られている。しかし、CE-TOFMSでの測定は時間がかかり、また装置が高価で精密な分析機器のため限られた大学や分析機関などが所有するにとどまっており、地方の病院や診療所などでも、EAPをうつ病のバイオマーカーとして利用するための、より簡便な測定方法が求められている。そこで本研究では、多くの臨床現場で使用可能な特異的かつ簡便なEAPの酵素免疫測定法を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 抗原の作製 (EAP-MBS-BSA 複合体)

EAP 2.693 mg を 0.1 M リン酸緩衝液 0.5 ml に、*m*-Maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysuccinimide ester (MBS) 3 mg を *N,N*-Dimethylformamide (DMF) 0.1 ml にそれぞれ溶解し、これらを室温で1時間反応させEAP-MBSを作製した。次に、Acetylmercaptosuccinyl-BSA (AMS-BSA) 10 mg を 0.1 M リン酸緩衝液 0.3 ml に溶解し、0.5 M Hydroxylamine (pH 7.4) 0.1 ml を添加し、10分間攪拌し脱アセチル化を行いMS-BSAを作製した。これをEAP-MBS溶液に加え室温で1時間反応させた。これら複合体を10 mM リン酸緩衝液で平衡化したSphadex G-75 カラムクロマトグラフィーで精製し、フラクションコレクターで回収した。複合体の濃度はModified Lowery Protein Assayにより算出した。

### (2) 抗EAP血清の作製

5週齢メスのBALB/cマウス5匹に、complete Freund's adjuvantと共に乳化したEAP-MBS-BSA複合体100 $\mu$ gを腹腔内に投与した。その後2週間間隔で、in complete Freund's adjuvantと共に乳化した複合体50 $\mu$ gを3回投与した。3回目の投与後、抗血清を採取しELISAにより目的とする抗体を含んでいることを確認し、4回目の投与を行った。得られた抗血清を20 mMのリン酸ナトリウムbuffer (pH 7.0) で透析し、Hitrap Protein G カラム (GE healthcar, Sweden) に添加した。さらに、Hitrap Protein G カラムに溶離緩衝材 0.1 M glycine-HCl (pH 2.7) を流し、溶出されたタンパク部分、すなわちIgG分画を集めて固相抗体に使用した。

### (3) 酵素標識体の作製 (EAP-HRP 複合体)

酵素標識体は抗原と同様の方法で作製した。1 mg の Horseradish peroxidase (HRP) を 0.1 M

リン酸緩衝液 0.25 ml に、0.4 mg の *S*-acetylmercaptosuccinic anhydride (2.5  $\mu\text{mol}$ ) を DMF 0.1 ml にそれぞれ溶解し、これらを 37 で 30 分間反応させ AMS-HRP を作製した。そこへ 0.1 M の Tris-HCl (pH 7.5) 50  $\mu\text{l}$ , 10 mM の EDTA 50  $\mu\text{l}$ , 1 M の Hydroxylamine 100  $\mu\text{l}$  を加え 37 で 5 分間脱アセチル化を行い MS-HRP とした。作製した MS-HRP は PD-10 カラムを用いて、未反応の *S*-acetylmercaptosuccinic anhydride を除去した。カラムより精製された MS-HRP 1 ml と EAP-MBS 400  $\mu\text{l}$  を室温で 1 時間反応させ、Sephadex G-100 で精製を行い、酵素活性のピーク分画を酵素標識体 (EAP-MBS-HRP) として用いた。

#### (4) EAP のベンゾイル化

予め EAP 濃度 0.1~27  $\mu\text{M}$  の希釈系列を全量 50  $\mu\text{l}$  でエッペンに作り、それぞれに Benzoyl Chloride を 2  $\mu\text{l}$  加え 30 秒攪拌しそこへ 5 N NaOH 8  $\mu\text{l}$  を加え、室温で 10 分間反応させた。反応後 0.5 M Tris-HCl (pH 7.0) 50  $\mu\text{l}$  を加え、反応の停止を行った。反応停止後、遠心分離機で沈殿物を取り除き、その上清を直接 ELISA で測定した。

#### (5) ELISA

Microtiter plate のウェルに抗 EAP-IgG 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.5) 100  $\mu\text{l}$  を加え、4 で一晩置いて固相化したのち、1 % の skim milk (10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0) を加え、37 で blocking を行った。PBS-BSA 0.1% 100  $\mu\text{l}$  で 3 回洗浄を行ったのち、PBS-BSA 0.1% で 100 倍希釈した EAP-MBS-HRP と誘導化 EAP サンプルを各ウェルに 50  $\mu\text{l}$  ずつ加え 4 で一晩反応させた。再び PBS-BSA 0.1% 100  $\mu\text{l}$  で 3 回洗浄を行い、0.42 mM 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) 基質溶液を 100  $\mu\text{l}$  加え室温で 30 分反応させた。酵素反応は 2 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液を 100  $\mu\text{l}$  加えて停止させ、450 nm における吸光度を測定した。

## 4. 研究成果

EAP の ELISA を開発するためには、EAP に対する抗体が必須であるが、EAP は非常に低分子化合物であるため、架橋剤を用いて架橋剤の一部までを認識する抗体を作製した。架橋剤には MBS を用いて *N*-hydroxysuccinimide 法により BSA と反応させることで、EAP-MBS-BSA 複合体すなわち EAP 抗原を得た。得られた抗原を 5 匹のマウスに免疫し、EAP の特異抗体を得た。EAP-MBS-HRP 複合体すなわち酵素標識体も同様の方法で作製した。この複合体は、pH 7.0 の buffer 中で 4 保存下で 6 か月以上安定な免疫活性を示した。

抗 EAP 抗体は、EAP と架橋剤である MBS のベンゼン環の周辺までを含めた部分を認識していることが推測されたため、ベンゾイル化の誘導化剤である Benzoyl Chloride を用いて EAP をベンゾイル化し、ELISA 分析を行った。

本 ELISA の至適条件を確立し、標準血漿中での検量線を作成した (図 1)。その結果、図 1 に示すように、EAP 濃度 0.1~27  $\mu\text{M}$  の検量線が得られ測定範囲は 0.3~9  $\mu\text{M}$  であった。健常者の血清中での EAP 濃度は 2~3  $\mu\text{M}$  で推移しており、うつ病に罹患すると 2  $\mu\text{M}$  以下になるといわれている。本 ELISA での EAP 濃度の測定限界は 0.3  $\mu\text{M}$  であったため十分な測定感度と精度であった。

本 EAP 抗体の交差反応性は、EAP の構造類似体との競合反応により検討し、50% 阻害率により検討した。EAP 抗体は、誘導化 EAP との反応性を 100% したとき、類似化合物である Sphingosine-1-phosphate、2-Phenylethyl Alcohol、*O*-Phospho-*L*-tyrosine、*D*-Glucose 6 Phosphate 及び Benzoyl 2-Aminoethanol には、殆ど交差反応性 (0.3% 以下) を示さなかった。これらの結果から、本抗体は誘導化した EAP に対して非常に特異的であることが示唆された。

以上のことから、本 ELISA は、高感度で特異的であることから、うつ病のバイオマーカーとしての EAP 定量法として有用であることが示された。

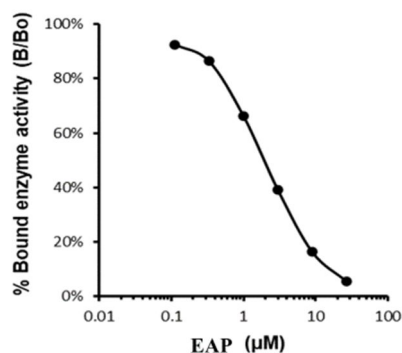


図1. 標準ヒト血漿中におけるEAPの検量線

#### < 引用文献 >

1) Josephine S. Modica-Napolitano, Perry F. Renshaw, Ethanolamine and phosphoethanolamine inhibit mitochondrial function in vitro: implications for mitochondrial dysfunction hypothesis in depression and bipolar disorder, *Biol. Psychiatry.*, **55**, 2004, 273-277.

2) N. Kawamura, K. Shinoda, H. Sato, K. Sasaki, M. Suzuki, K. Yamaki, T. Fujimori, H. Yamamoto, D. Osei-Hyiaman, Y. Ohashi, Plasma metabolome analysis of patients with major depressive disorder *Psychiatry, Clin. Neurosci.*, **72**, 2018, 349-361.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齊田哲也、祖川倫太郎、野中竜稀、巴山忠、富田陵子、片岡裕登、門司晃、溝口義人、島ノ江千里、進正志
2. 発表標題 うつ病バイオマーカーであるリン酸エタノールアミン(PEA)の酵素免疫測定法
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------