



Development of region-specific antisera and immunoassay for human prostate-specific antigen (PSA) with use of purposely designed synthetic peptides

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 青木, 雅信 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1240

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 387号	学位授与年月日	平成15年 3月26日
氏 名	青 木 雅 信		
論文題目	Development of region-specific antisera and immunoassay for human prostate-specific antigen(PSA)with use of purposely designed synthetic peptides (合成ペプチドを用いたヒト PSA(prostate-specific antigen)部位特異抗体の作製とエンザイムイムノアッセイ系の確立)		

博士(医学) 青木雅信

論文題目

Development of region-specific antisera and immunoassay for human prostate-specific antigen (PSA) with use of purposely designed synthetic peptides

(合成ペプチドを用いたヒト PSA (prostate-specific antigen) 部位特異抗体の作製とエンザイムイムノアッセイ系の確立)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

prostate-specific antigen (PSA) は、237のアミノ酸残基からなる分子量 28.5-34kDa の単鎖の糖蛋白である。臨床的には前立腺癌の診断、治療において腫瘍マーカーとして広く用いられている。しかし、血液中での PSA の分子形態は多種多様であり、抗体の特異性や交差反応性によって測定値に変動が生じるところから、PSA イムノアッセイ系における標準化が必要とされている。一方、ある蛋白を抗原とする場合、特定のエピトープ(部位特異性)をもつ抗体を作製することは不可能である。そこでわれわれは合目的的に作製した合成ペプチドを用いて部位特異抗 PSA 抗体を作成し、新しい酵素イムノアッセイ法(EIA)の確立とその免疫学的特性について検討した。

〔方法〕

- 1) 6種類の PSA 関連ペプチド、PSA(42-92)、(53-92)、(50-70)、(76-92)、(174-184)、(199-210)とそれぞれの標識化体を continuous flow solid methodology に従って作成した。これらを雄のウサギに注射免疫し、17種類の抗血清を得た。ついで、そのそれぞれについて天然 PSA に対する力価を測定した。
- 2) ヒト前立腺組織に対して、抗合成ペプチド抗血清を用いて avidin biotin complex (ABC) 法で免疫染色を行った。
- 3) ヒト精漿と2種類の市販天然 PSA 製品について、抗 PSA (53-92) 抗血清 RY756 でイムノプロットを行った。
- 4) 抗血清をマイクロプレートのウェルに固定し、合成ペプチド標準抗原、検体、合成ペプチド標識化体間の競合法を用いて EIA 系を確立した。
- 5) ヒト精漿、血清、市販天然 PSA についてゲルクロマトグラフィを行い、確立した EIA 系で各フラクションの PSA 免疫活性 (PSA-IR) を測定した。
- 6) 確立した EIA 系でヒト血清検体 (n=14) を測定し、市販の free PSA キットで測定した値と比較した。

〔結果〕

- 1) 17種類の抗血清のうち、3種類の抗 PSA (42-92) 抗血清、2種類の抗 PSA (53-92) 抗血清、4種類の抗 PSA (50-70) 抗血清は天然 PSA に対し顕著な結合活性を示した。
- 2) 抗 PSA (53-92) 抗血清 RY756、RY757 (いずれも 4000倍希釈)、抗 PSA (50-70) 抗血清 RY610 (3000-4000倍希釈) を用いた免疫染色では、前立腺上皮細胞が鮮明に染色された。
- 3) 天然 PSA に対するイムノプロットにおいて、分子量 29kDa に一致するバンドを検出した。一方、精漿に関しては分子量 29、77、135kDa に一致する3つのバンドを認めた。
- 4) 確立された EIA 系において抗体としては抗 PSA (53-92) 抗血清 RY756 を、標準抗原として PSA (42-92) を、標識抗原として biotinyl-Gly-Gly-PSA (42-92) を使用した。最小検出感度は 100pg/mL、測定内誤

差、測定間誤差はそれぞれ7.4%、9.6%であった。ヒト血清に添加した PSA(42-92)の回収試験の結果も良好であった。ヒト精漿の希釈曲線は標準曲線と平行であった。

- 5) ゲルクロマトグラフィでは、ヒト精漿、血清ともに PSA-IR は単一のピークを示しいずれも天然PSAと一致した。
- 6) 市販キットによる free PSA 値と本研究の EIA による PSA-IR 値の間に相関係数 0.891 と有意な正の相関を認めた。本 EIA による PSA-IR 値の方が free PSA 値よりも高値を示した。

〔考察〕

PSA は2種類の kallikrein とアミノ酸配列において高い相同性を持っているため、これらと比較的相同性が低い部位、さらに親水性、二次構造解析の面から抗体作製に有利な部位を選択し、それらを対象として抗原ペプチドを合成した。得られた17種類の抗血清の中で、高力価でしかも免疫染色で強く染まった RY756 を次の免疫学的実験に適用した。PSA はアミノ酸配列85-86の部位で切断されることが知られている。PSA(42-92)、(53-92)、(50-70)に対する9種類の抗血清には天然 PSA との高い結合活性を認めたが、抗 PSA(76-92)抗血清には認められなかった。この事実から9種類の抗血清は85-86の切断部位からより離れた部分を認識し、完全型、切断型の両 PSA に特異的である可能性が示唆された。また、ヒト精漿のイムノブロットにおいて検出された 77kDa のバンドは、PSA と protein C inhibitor (PCI) の複合体と推定された。135kDa のバンドについては、PSA と他の蛋白との複合体とも考えられるが、重合体である可能性も否定できない。

〔結論〕

合目的的な計画により合成したペプチドを用い部位特異 PSA 抗血清を作製するとともに新しいタイプの PSA EIA 系を開発した。本 EIA は血中 PSA の測定に利用可能であるばかりでなく PSA の血中での分子存在様式とそれに対する抗体の特異性との関係をより明確にする上で有用であり、さらに本研究の手法は血中 PSA 測定法の標準化に役立つものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

Prostate specific antigen (PSA) のイムノアッセイは、前立腺がんの腫瘍マーカーとして臨床検査で用いられている。しかしながら、PSA が血中で他の血漿タンパクと結合しているものと結合していないものが混在していることから、用いる抗体によって PSA の測定値に影響を及ぼし、市販されている測定試薬によって測定値が異なるという現象が、臨床評価上問題になっている。そこで、特定の領域の合成ペプチドに対する抗体を作成しイムノアッセイを構築することで、抗体の特異性を標準化することを試みた。

PSA は2種類のヒトカリクレインとの相同性が高いため、免疫交叉性が生じにくく、親水性に富み、複雑な二次構造をとらない部位を選択し、6種類のペプチド(42-92)、(53-92)、(50-70)、(76-92)、(174-184)、(199-210)を合成した。それらをウサギに免疫し、ポリクローナル抗体を得た。これらの抗ペプチド抗体を用いて、免疫組織染色、イムノブロットを行うと共に、競合法 EIA を確立し方法の評価、臨床症例の血清を測定した。

計17種類の抗血清はいずれも合成ペプチドに対して十分な結合活性を示したが、そのうち3種類の抗 PSA(42-92)抗血清、2種類の抗 PSA(53-92)抗血清、4種類の抗 PSA(50-70)抗血清は、天然 PSA に対して顕著な結合活性を示した。また、抗 PSA(53-92)抗血清、抗 PSA(50-70)抗血清を用いて前立腺組織を材

料として免疫組織染色を施行した結果、前立腺上皮細胞が他の抗血清に比較して鮮明に染色された。免疫染色で高感度に特異性高く染色できた抗 PSA (53-92) 抗血清をその後の実験に用いた。イムノブロット法では、天然 PSA に対しては、分子量 29K のシングルバンドを認めたが、精漿に対しては 29K、77K、135K の 3 本のバンドが認められた。77K は Protein C との複合体と考えられ、135K は他のタンパクとの複合体か重合化と考えられた。次いで、合成ペプチドをビオチン化標識して競合イムノアッセイを構築して、合成ペプチドを標準物質として検量線をたてた。最小検出感度は 100pg/ml、Within-run、Between-run precision はそれぞれ 7.4、9.6% であった。合成ペプチドをヒト血清に添加して回収率を求めたが、95-124% であった。ヒト精漿の希釈直線は標準物質のそれと平行になった。以上より、本 EIA は PSA 測定の基本的条件を備えていると考えられた。Sephadex G-75 Superfine を充填したカラムゲルクロマトグラフィによりヒト精漿、血清を分画し、各フラクションを EIA で測定したところ、ともに PSA 免疫反応性は単一のピークを示し、天然 PSA と一致した。前立腺がん・前立腺肥大患者の血清を試料として、本 EIA と市販の PSA 測定試薬(イムライズ)とで測定し 2 法の相関性について検討したところ、相関係数は 0.891 とほぼ良好な相関性を得た。しかし、本 EIA ではペプチドの重量濃度から換算した PSA 抗原濃度を表示させているため、濃度として市販試薬より約 5 倍の高い数値となった。

部位特異的な抗血清を使用することにより PSA の新しい測定系を構築することができた。分子まるごとを抗原として得た抗体のエピトープ解析も必要なく、測定法の標準化もしやすいかもしれないとの考察であった。今後、臨床試料の分析を行い、本 EIA の臨床的意義についても調べていきたいということである。

審査委員会では、以上の検討結果、今後の PSA 研究・多領域への発展性を評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) カリクレインと PSA について
- 2) 他のタンパクと複合体を形成する PSA の領域
- 3) 合成したペプチド部分の機能
- 4) 免疫時のキャリアープロテインの有無による影響
- 5) ポリクローナル抗体を作成した理由
- 6) ウェスタンブロットで高分子化したバンドの性状
- 7) 血清を試料にしたときの希釈直線性
- 8) 最小検出感度の求め方
- 9) 回収率の求め方
- 10) ゲル濾過の方法と分子量の求め方
- 11) 前立腺がん、前立腺肥大患者血清における日常検査法との相関性
- 12) PSA の存在様式(フリーと複合型)
- 13) ペプチドを抗原として得た抗体を測定法に導入する場合の利点と欠点

これらの質問に対して申請者の解答は概ね適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査委員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 前 川 真 人

副査 中 村 浩 淑 副査 小 出 幸 夫