



A new enzyme-linked immunosorbent assay with two monoclonal antibodies to specific epitopes measures human lecithincholesterol acyltransferase

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小堀, 樹一郎 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/274

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	医博論第 399号	学位授与年月日	平成16年 3月10日
氏 名	小 堀 樹一郎		
論文題目	A new enzyme-linked immunosorbent assay with two monoclonal antibodies to specific epitopes measures human lecithincholesterol acyltransferase (特定のエピトープを認識する2つのモノクローナル抗体を用いた新規の酵素免疫測定法によるヒト レシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼの測定)		

博士(医学) 小堀 樹一郎

論文題目

A new enzyme-linked immunosorbent assay with two monoclonal antibodies to specific epitopes measures human lecithin-cholesterol acyltransferase.

(特定のエピトープを認識する2つのモノクローナル抗体を用いた新規の酵素免疫測定法によるヒトレシチン-コレステロール アシルトランスフェラーゼの測定)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

コレステロール逆転送系は、コレステロールの末梢細胞への蓄積を抑制して、動脈硬化を防御する機構として近年注目を浴びている。このコレステロール逆転送系において重要な役割をなすのは高比重リポ蛋白(HDL)であり、血中HDLコレステロール(HDL-C)の減少は、冠動脈疾患の危険因子の一つであることが、これまでの多数の疫学的調査によって示され、HDLは抗動脈硬化作用を有するリポ蛋白として広く認識されるようになってきている。

Lecithin-cholesterol acyltransferase(LCAT)はレシチンの β 位の脂肪酸を遊離コレステロールの 3β -OH基に転位し、エステル化する酵素であり、HDL代謝の中心的役割を担っている。コレステロールエステルの低下、臨床症状として角膜輪などを認めた場合には、LCAT欠損症を疑う。また、LCATは肝臓で産生され、肝実質細胞の機能を鋭敏に反映するので、急性肝炎、劇症肝炎、肝硬変などで低下し、肝実質細胞マーカーとして測定される。

LCATの研究は、主に活性測定で行われているが、病態によって一方の測定法で正常なものが他の測定法では異常値を示す場合がある。すなわち、測定法による検査値の違いは、用いられる基質によって異なることに起因する。一方、LCATを免疫学的に測定する方法としては、ヤギやウサギを高純度に精製したLCATで感作した抗血清から得たポリクローナル抗体を用いた競合RIA法が報告されているが、モノクローナル抗体を用いた方法は報告されていない。また、近縁のホスホオリパーゼA2とLCATを認識するモノクローナル抗体は報告されているが、特異的なモノクローナル抗体の報告はない。我々はヒトLCATの精密測定を目的として、抗LCATモノクローナル抗体を樹立し、これを用いた免疫学的LCAT測定系を検討して、臨床応用を試みた。

〔材料ならびに方法〕

約24%の糖を含む糖蛋白質であるLCATを効果的に免疫応答させるため、抗原として精製ヒトLCAT及び合成ペプチドを用い、アジュバントとして界面活性剤を主成分とするRibi adjuvant systemと常法通りFreund's adjuvantを使用して常法に従ってハイブリドーマ細胞を樹立し、そのエピトープ解析を行なった。合成ペプチドは、疎水性解析、動物間のアミノ酸配列種差、2次構造などを指標に抗原性を推定し、8種のペプチドを合成して抗原として用いた。この樹立したモノクローナル抗体を用い2ステップサンドイッチELISA系を構築し、活性測定法との相関性、ゲルろ過分画リポ蛋白との反応性及び定量性について検討した。

〔結果〕

ヒトLCATを認識する抗LCATモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞 5 種(#36487、

#36442、#36454、#36405及び#36486と識別)を得た。それぞれ5種のモノクローナル抗体は、精製LCATとRibi adjuvant systemを用い#36487及び#36486、精製LCATとFreund's adjuvantを用い#36442、ペプチドとFreund's adjuvantを用い#36454及び#36405を樹立した。これらのモノクローナル抗体#36487、#36442、#36454、#36405及び#36486は、それぞれヒトLCATの159～179番目、258～273番目、273～294番目、352～376番目及び415～440番目のアミノ酸配列を認識した。

エピトープの明らかなこれらの抗LCATモノクローナル抗体5種を用い、精製LCATをサンドイッチでできる2種類のモノクローナル抗体の組み合わせをスクリーニングして、固相側抗体にヒトLCATのC末端を認識する#36486、検出側の酵素標識抗体にヒトLCATの159～179番目のアミノ酸配列で示されるペプチドを認識する#36487を用いた2ステップサンドイッチELISA系を構築した。本法と活性測定法との相関性は自己基質法($n=45$ 、 $y=0.079x+1.534$ 、 $r=0.864$ 、 $p<0.001$)及び、リボソーム人工基質法($n=45$ 、 $y=0.019x+0.849$ 、 $r=0.871$ 、 $p<0.001$)で、それぞれ有意な正の相関性を示した。ゲルろ過法で分離したリボ蛋白分画中のLCATを本法で検出した結果、従来の報告通り、ほぼHDL分画に分布し、LDL分画にも存在するLCATをも検出することが可能であった。また、本ELISA系の同時再現性(C.V.<6.1%)、希釈直線性ともに良好な結果が得られた。

〔結論〕

精製LCAT及びペプチドを抗原とした効果的な免疫感作により、エピトープが明らかな抗LCATモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞5種を得た。これらの抗体のエピトープは合成ペプチドとの反応性から確認できた。また、本ELISA法は簡便かつ再現性にも優れており、脂質代謝の基礎的・臨床研究に有用であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

コレステロール逆転送系は、コレステロールの末梢細胞への蓄積を抑制して動脈硬化を防御する機構であり、高比重リボ蛋白(HDL)は抗動脈硬化作用を有するリボ蛋白としてその中で重要な役割を果たす。本研究はHDL代謝の中心的役割を担うLecithin-cholesterol acyltransferase(LCAT)に対する単クローン抗体を複数樹立し、その抗原量精密測定系の確立を目指したものである。LCATはレシチンの β 位の脂肪酸を遊離コレステロールの 3β -OH基に転位し、エステル化する酵素である。現在LCATの血中濃度は主に活性で測定されているが、検体中の脂質の変動の影響を受ける等、測定系の安定性に難がある。一方、LCATを免疫学的に測定する方法としては、精製LCATによる免疫で得たポリクローナル抗体を用いた競合RIA法が報告されているのみである。申請者等はヒトLCATの精密測定を目的として、精製LCATおよび数種の合成ペプチドを用いて抗LCAT単クローン抗体を樹立し、免疫学的LCAT測定系の確立を試みた。

〔材料ならびに方法〕

抗原として精製ヒトLCAT及び合成ペプチドを用いた。合成ペプチドは、疎水性解析、動物間のアミノ酸配列種差、2次構造などを指標に8種類作成し抗原として用いた。また得られた単クローン抗体のエピトープ解析にも用いた。LCATは約24%の糖を含む糖蛋白質であるため、効果的な免疫応答を得るために、通常用いられるFreund's adjuvantの他に界面活性剤を主成分とするRibi adjuvant systemも用いた。常法通りハイブリドーマ細胞を樹立し、得られた単クローン抗体のエピトープを同定すると共にELISA系を構

築した。これを用いて従来の活性測定法との相関性、ゲルろ過分画リボ蛋白との反応性及び定量性について検討した。

〔結果〕

ヒトLCATを認識する抗LCAT単クローン抗体を産生するハイブリドーマ細胞 5 種(#36487、#36442、#36454、#36405及び#36486と識別)を得た。精製LCATを用い#36487及び#36486(Ribi adjuvant system)及び#36442(Freund's adjuvant)を、合成ペプチドとFreund's adjuvantを用い#36454及び#36405を樹立した。これらの単クローン抗体#36487、#36442、#36454、#36405及び#36486は、それぞれヒトLCATの159～179番目、258～273番目、273～294番目、352～376番目及び415～440番目のアミノ酸配列を認識した。種々の抗体の組み合わせをスクリーニングした結果、固相抗体にヒトLCATのC末端を認識する#36486、検出酵素標識抗体にヒトLCATの159～179番目のアミノ酸配列を認識する#36487を用いたELISA系を構築した。本法は自己基質法($n=45$, $y=0.079x+1.534$, $r=0.864$, $p<0.001$)及び、リボソーム人工基質法($n=45$, $y=0.019x+0.849$, $r=0.871$, $p<0.001$)の活性測定法と有意な正の相関を示した。ゲルろ過法で分離した血清リボ蛋白分画中のLCATを本法で検出した結果、LCATはほぼHDL分画に分布し、LDL分画にも微量存在することがわかった。また本ELISA系は同時再現性(C.V.<6・1%)、希釈直線性ともに良好な結果が得られた。申請者等は本ELISA法は簡便かつ再現性にも優れており、脂質代謝の基礎的・臨床研究に有用であるとしている。

審査委員会では、適切な手法を用いてエピトープが明らかな単クローン抗体を得、また今後のLCATの研究に欠かせないELISAを確立した点を高く評価した。

以上の申請者の研究内容について審査委員会では以下のような質問および議論があった。

- 1) 合成ペプチドによる免疫方法
- 2) 免疫に用いたペプチド配列を選択した理由
- 3) 免疫に用いたアジュバントの利点
- 4) capture抗体の選択方法
- 5) 単クローン抗体を用いたELISAの利点
- 6) LCATの活性測定法
- 7) LCAT標準品の調整方法と標準曲線の信頼性
- 8) 検体調製方法の妥当性
- 9) 測定系に及ぼす血清脂質の影響
- 10) 抗原量と活性の相関
- 11) 抗原量と疾患の関連
- 12) 測定の自動化あるいは簡易測定法への応用の可能性
- 13) 各種病態とLCAT値の関係

これらの質問に対する申請者の解答は適切であり、問題点もよく把握しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者

主査

浦野哲盟

副査

金山尚裕

副査

沖

隆