

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

免疫疾患診断用プロテイン・チップの開発に関する研究

平成 18 年度 総括研究報告書

主任研究者 伊藤 嘉浩

平成 19 (2007) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告	
免疫疾患診断用プロテイン・チップの開発に関する研究……………	1
伊藤 嘉浩	
II. 分担研究報告	
1. 免疫疾患診断プロテイン・チップの開発に関する研究……………	15
上阪 等	
2. 免疫疾患診断プロテイン・チップ開発用の抗リボゾーム抗体標準血清確立 に関する研究……………	19
諏訪 昭	
3. 免疫診断用プロテイン・チップ開発用固定化技術の応用に関する研究……………	33
北嶋 隆	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………	37
IV. 研究成果の刊行物・別刷……………	41

I .總括研究報告

厚生労働科学研究研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
総括研究報告書

免疫疾患診断プロテイン・チップの開発

総括研究者 伊藤嘉浩

独立行政法人理化学研究所 伊藤ナノ医工学研究室 主任研究員

研究要旨

自己免疫疾患診断プロテイン・チップの開発において、従来法である ELISA 法との相関性を詳しく調べるとともに、あらたな自己抗原を追加し、検査項目を増やしたマイクロアレイ・チップを作成できるようにした。また、チップを装填し、血清の入った試験管を装填するだけで自動的に検査結果を表示できる自動化装置を開発し、実際に動作すること、1 検体当たりの測定時間を 30 分程度にできること、作成したチップの保存安定性が高いことなどを明らかにした。

分担研究者

上阪 等 : 独立行政法人理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター
自己免疫病戦略研究ユニットリーダー
(東京医科歯科大学大学院 歯学総合研究科 膠原病・リウマチ内科学 助教授)

諏訪 昭 : 東海大学医学部内科学系 リウマチ内科 助教授

北嶋 隆 : 財団法人神奈川科学技術アカデミー
伊藤「再生医療バイオリクター」プロジェクト
プロジェクトサブリーダー

A. 研究目的

自己免疫疾患は免疫系が内因性自己抗原に反応して起こる疾患で、自己細胞成分に対する種々の自己抗体が血清中に産生されることを基本的特徴とする。これらの自己抗体は特定の臨床像と密接に関連し、疾患の診断や病型分類、治療効果判定、生命予後推定など臨床的に極めて重要である。しかしながら、現在の抗体測定法は多数の抗体の解析に適さず、旧来の ELISA 法に基づく方法であるため、測定できる抗原の種類も限られていた。本研究では、我々が開発した抗原マイクロアレイを応用し、細胞内外の分子に対する自己抗体およびこれら分子発現や相互作用を自己免疫疾患患者において解析することを目的としている。この技術の特徴は、

- 1) どのような生体分子も共有結合で安定にマイクロアレイ固定化が可能。
- 2) ランダム配向で固定化でき、固定化物の有効濃度が高い。
- 3) 非特異的吸着を抑制して高い S・N 比を実現。

であり、この技術を用いれば、多数の自己抗体を短期間に検出でき、かつ従来にない自己抗体も検出可能であることから、疾患の早期診断や従来診断が困難だった自己免疫疾患の診断を容易にするものと期待される。かかる研究は、自己免疫疾患の診断や病態の把握、治療効果判定など日常臨床に直ちに应用可能なばかりでなく、病気解明の端緒となる先駆的な技術となることが期待される。

B. 研究方法

自己免疫診断チップの作製は以下のように行った。

- 1) チップ(ハイインパクトポリスチレン)表面の UV、オゾンによる親水化処理。
- 2) 20%PEG methacrylate ポリマーをそれぞれ終濃度 5%となるよう、1%ビスアジドをそれぞれ終濃度 0.25%(ポリマーに対して 5%)になるよう混合し、ポリマーサンプルを調製した。
- 3) スピンコート(5000rpm×30sec)によってチップ上へ調製したポリマーサンプルのプレコートを行った。
- 4) 0.09Mpa で 15 分間減圧乾燥した。
- 5) ブラックライトにて 7 分間 UV 照射した。
- 6) ビスアジドを自己抗原に対して 10%となるように抗原と混合し、抗原サンプルを調製した。
- 7) 調製した抗原サンプルをプレコートしたチップ上にアレイヤーを用いてスポットした。
- 8) 常温常圧で 7 分間乾燥後、ブラックライトにて 7 分間 UV 照射した。

化学発光法による検出は以下のように行った。

- 1) チップを PBS(0.1%Tween20)でミキサーにて 3 分間洗浄した。
- 2) 0.1MPa で 5 分間減圧乾燥した。
- 3) 100 倍希釈した患者血清、あるいはそれぞれの抗体陽性血清を滴下し、ミキサーにて 20 分間反応した。
- 4) PBS(0.1%Tween20)でミキサーにて 3 分間洗浄した。
- 5) 10%BSA 入り PBS で 4000 倍希釈した anti-human IgG(Amasharm 製)および 2000 倍希釈した anti-human IgM(CHEMICON 製)を滴下し、ミキサーにて 20 分間反応した。
- 6) PBS(0.1%Tween20)でミキサーにて 3 分間洗浄した。
- 7) ECL Advance(Amasharm 製)を用いて化学発光法による検出を行った。

(倫理面への配慮)

患者血清は、慶應義塾大学倫理委員会での承認を経てインフォームドコンセントを得て取得し、独立行政法人理化学研究所での倫理委員会の承認をへて研究を行った。

C. 研究結果

前年度までに、本チップシステムにより高い再現性で測定結果が得られることがわかった。しかし、従来の方法である ELISA 法との相関をとったところ、高い相関が得られたものと、そうでなかったものがあった。この原因には、抗原の入手先や調製法が異なることが考えられた。そこで、今年度は、生物医学研究所 (MBL) より SS-A 抗原、Sm 抗原について提供いただくことが可能となったので、この 2 種の項目と、従来法と同様の抗原を入手することはできなかったが、前回、相関性の低かった抗 Scl-70 抗体について、新たに抗原を調製し直し、評価を行った。また前回、対象検体がなく評価できなかった抗 Jo-1 抗体の項目を除き、新たに慢性関節リュウマチ (RA) の指標である IgM-RF の検出を評価項目として追加した。結果を表 1 に示す。

表 1 ELISA 法による評価結果との相関

Autoantigen	Detected	Correlation(R=)
SS-A antigen	Anti SS-A antibody	0.94
SS-B/La	Anti SS-B antibody	0.92
U1snRNP68kDa	Anti U1RNP antibody	0.83
Smith antigen	Anti Sm antibody	0.92
Scl-70(Topoisomerase)	Anti Scl-70 antibody	0.97
dsDNA(Plasmid)	Anti dsDNA antibody	0.97
Centromere ProteinB(CENP-B)	Anti Centromere antibody	0.89
IgG from goat serum	IgM-RF	0.85

その結果、相関係数が抗 SS-A 抗体検出、Sm 抗体検出、抗 Scl-70 抗体検出において、それぞれ 0.94(前回評価時：0.72)、0.92(前回評価時：0.23)といずれも従来法との高い相関を示した。また、今回新たに追加した IgM-RF の検出でも、0.85 と高い相関を得ることができた。

この評価に加え、自己免疫疾患診断チップを従来法に代わる診断システムとして確立するために、今回、本システムにおける光固定化法と、従来の固定化法として利用される物理吸着との比較を化学発光法に基づき行い、固定化法として本システムが有用性を検討した。結果を図 1、図 2 に示す。

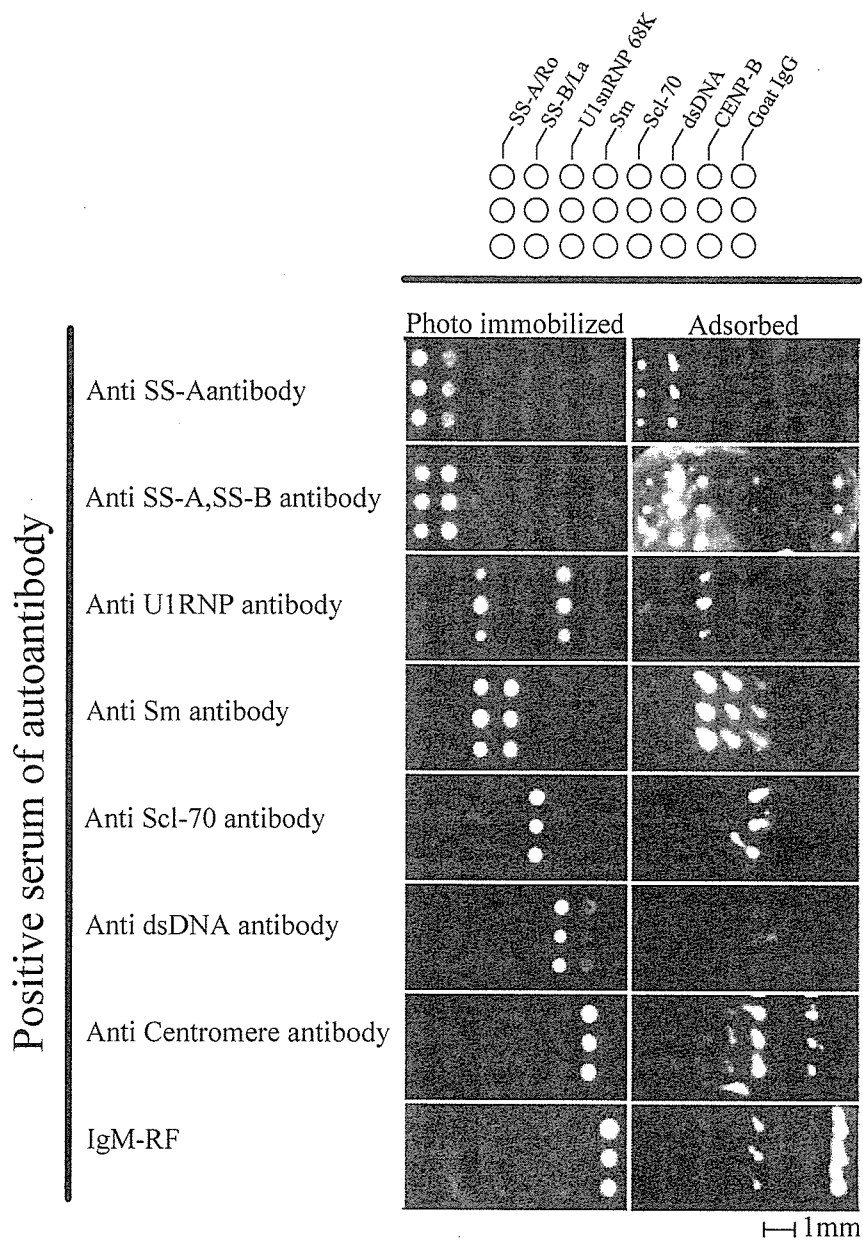


図1 光固定化法と物理吸着の比較

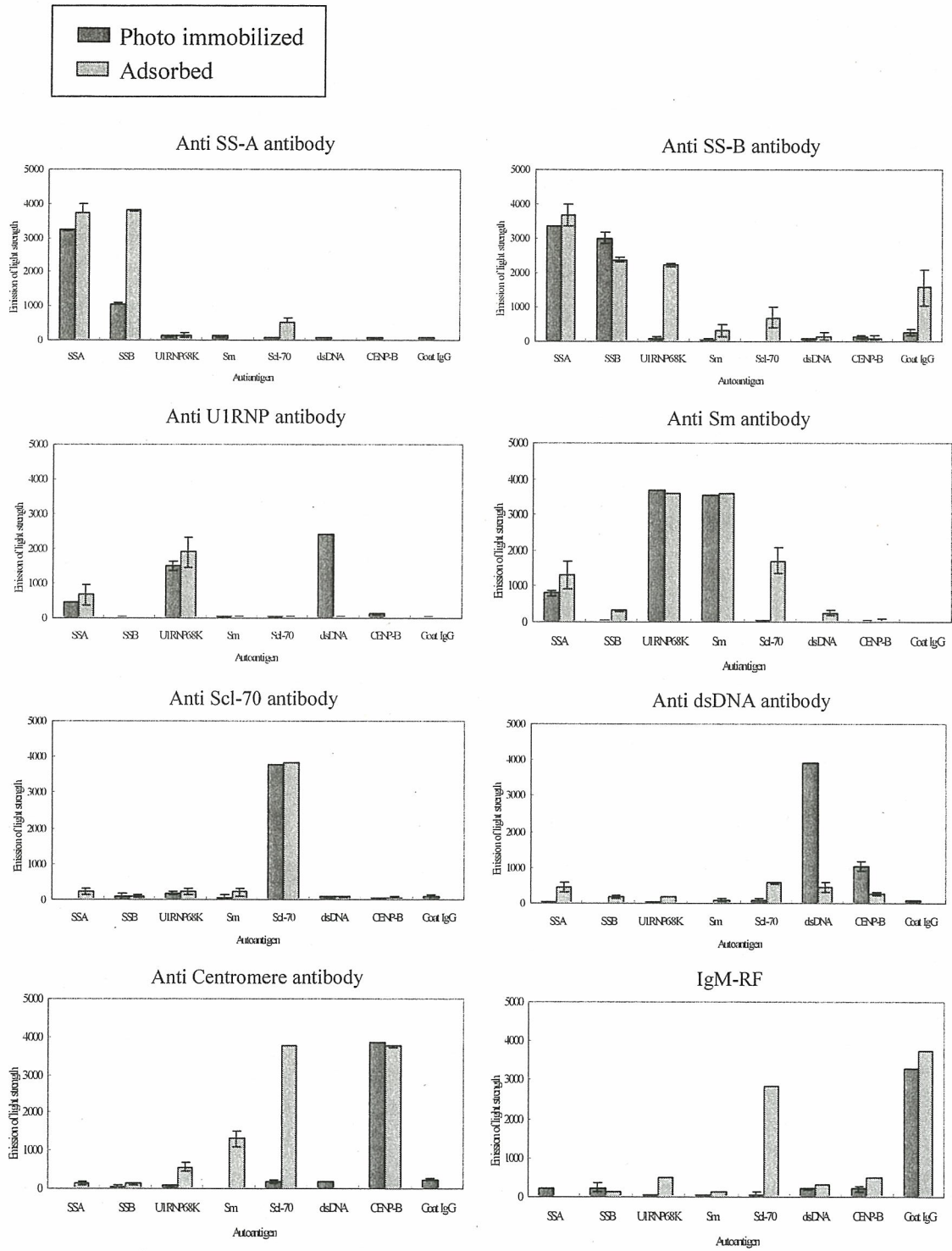


図2 光固定化法と物理吸着の比較

まず、物理吸着によって固相化したチップを評価すると、グラフから各陽性血清に依存して発光強度が確認された。しかし抗 dsDNA 抗体陽性血清ではわずかな発光しか検出することができなかった。また抗セントロメア抗体陽性血清で見ると、むしろ抗 Scl-70 抗体の結合を示す発光が高かった。この血清について、ELISA での抗 Scl-70 抗体の評価結果は、陰性であり、高い相関性は得られなかった。さらに写真から、物理吸着の場合は、スポットの乱れがほとんどの抗原で見られ、また基板上への非特異的吸着を示す顕著なバックグラウンドが観測された。それらに対して、光固定化法は、グラフで見ると、各陽性血清に依存した発光強度が確認され、抗 dsDNA 抗体陽性血清でも、抗体結合を示す顕著な発光を確認することができた。また写真で見ると、物理吸着のチップで見られたようなスポットの乱れが見られなかった。

この光固定化バイオチップの開発とともに抗原抗体反応とその検出を自動的に行う抗原抗体反応自動測定装置(以下、自動装置)を株式会社モリテックス社との協同で開発した。装置写真および手順を図 3 に示す。流路を彫ったシリコン樹脂製シートを、流路が基板上のタンパク質スポット部分に一致するように貼り付けフローセルとし(1)、これを装置に設置する(2)。次に試薬を設置(3)し、PC 上でスタートを行うと、フローセル内に試薬が供給され、反応が開始される。フローセルは装置内の CCD カメラによって PC 上でモニタリングすることができる(4)。CCD カメラによって撮影された画像は PC へ送られ、画像解析を行うことができる (5,6)。

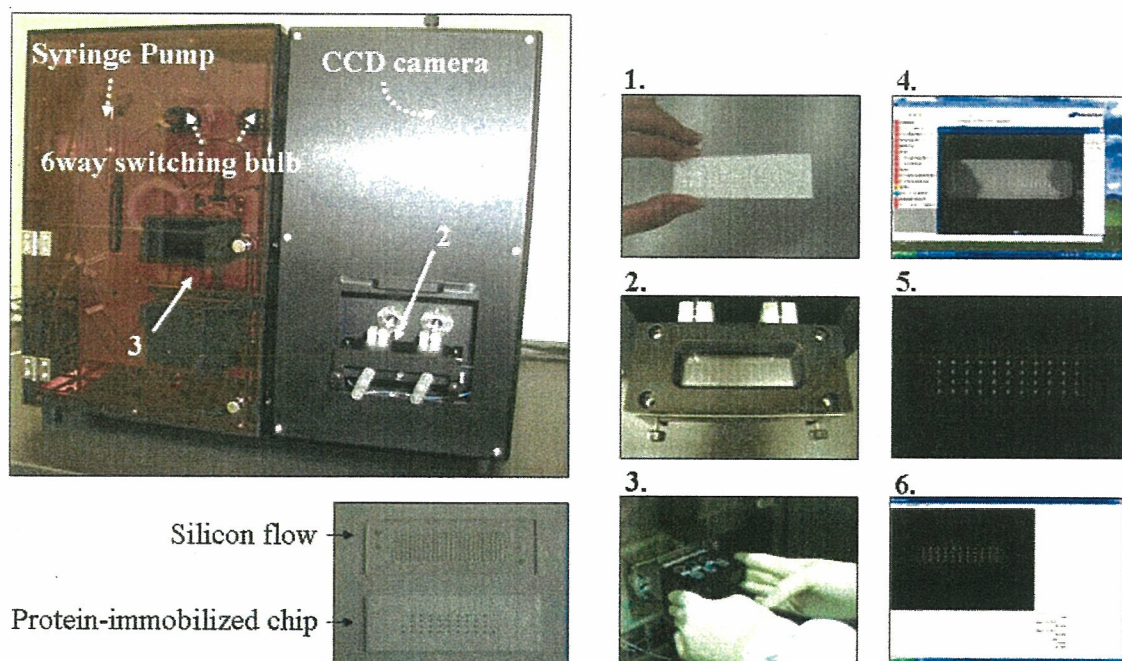


図 3 抗原抗体反応自動測定装置

この装置は診断用チップをセットして、測定したい溶液（血液あるいは血清）をチューブ（試験管）に入れて装填するだけで自動的に測定データを得ることができるため、診断の効率化、簡便化を図ることができる。今回はまず、作製した自己免疫診断チップを用いて、実際に自動装置における血清評価が可能であるかどうかを検討した。結果を図4、図5に示す。

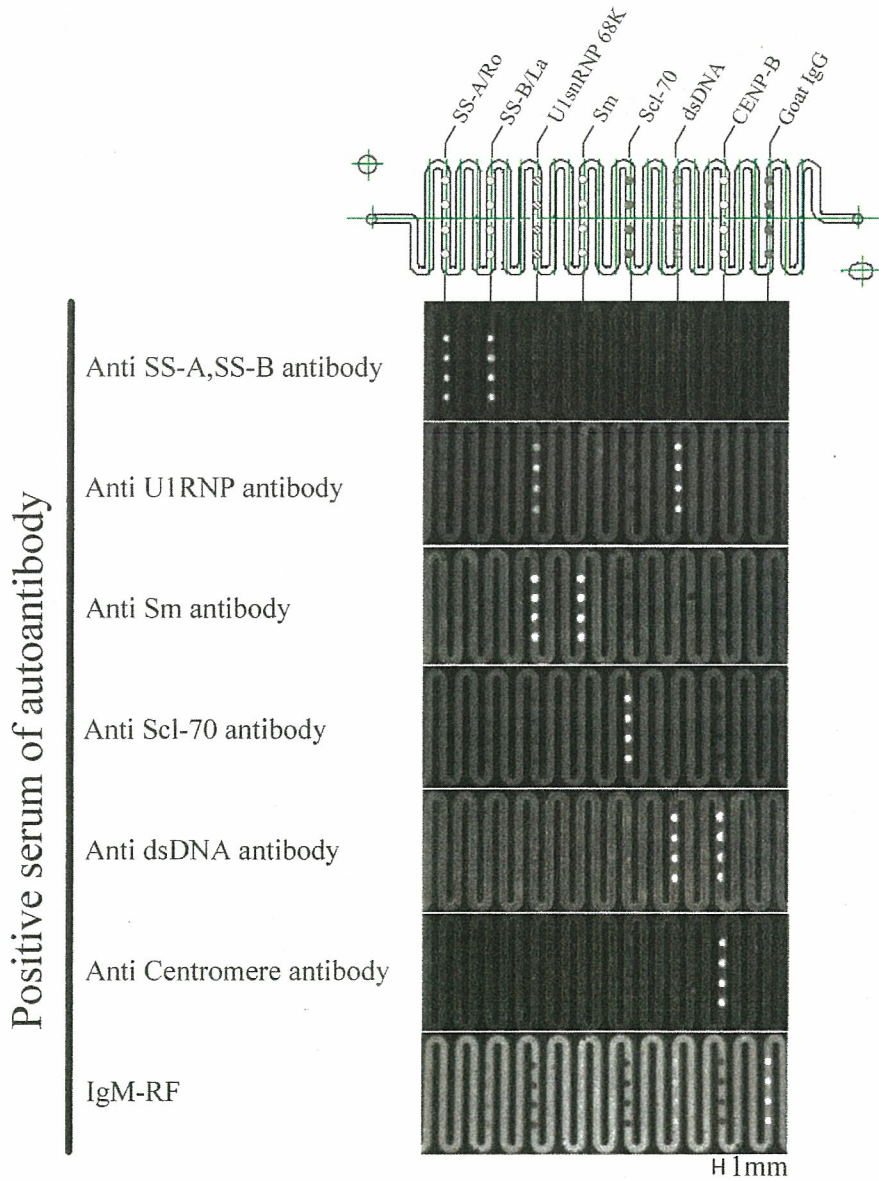


図4 抗原抗体反応自動測定装置による自己免疫疾患陽性血清中の自己抗体の検出

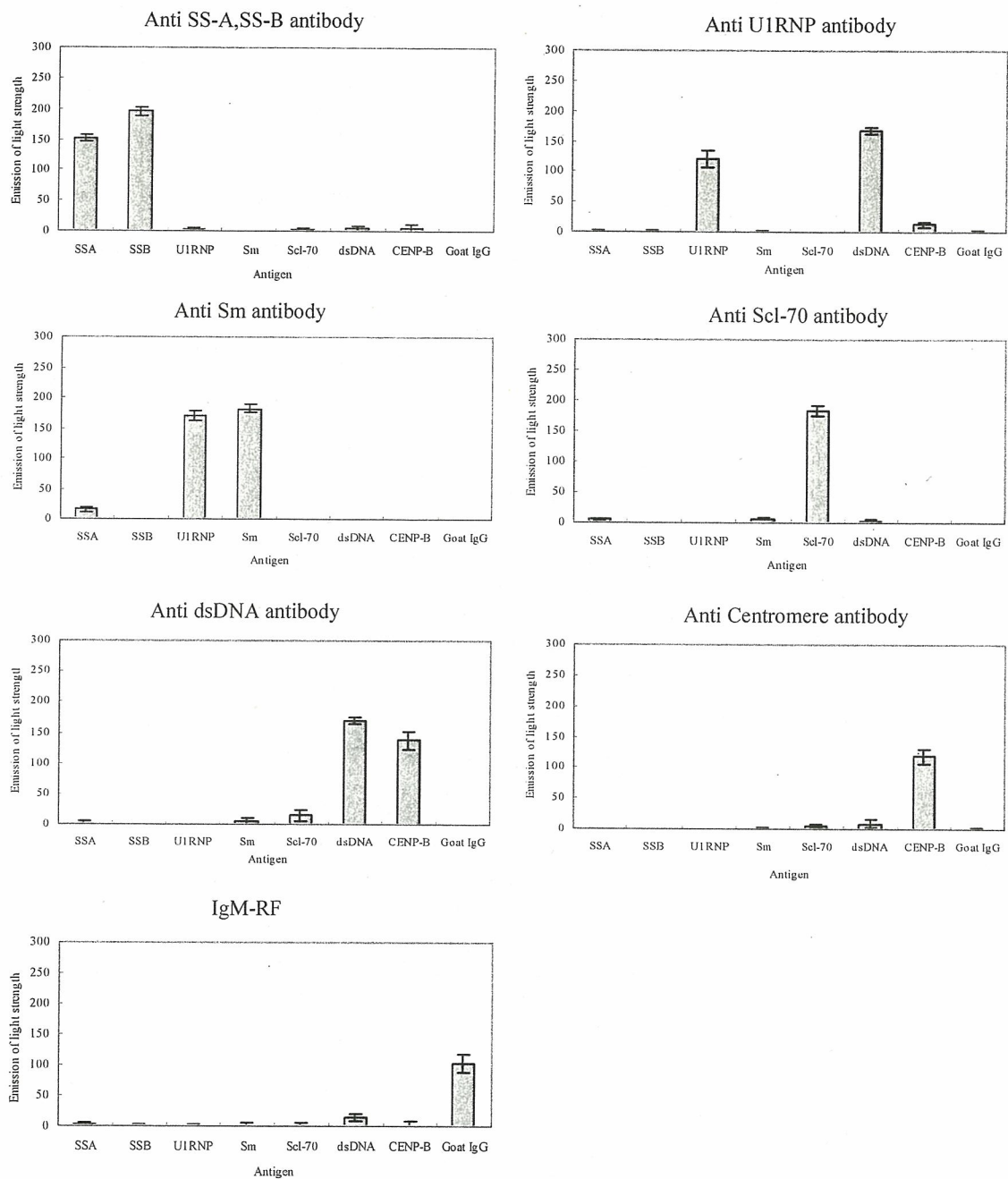


図 5 抗原抗体反応自動測定装置による自己免疫疾患陽性血清中の自己抗体の検出

その結果、CCD カメラの画像処理、及び解析装置が図 3 の実験で使用したものと異なっており、発光強度の解析値の範囲が異なるが、それぞれ陽性血清に依存した特異的な発光が認められ、自動装置で血清を使用する評価が可能であることが確認された。

さらにこの自動装置について測定処理時間の短縮化を目的として検討を行った。この検討で表 2 に示す通り、検体の供給から、化学発光の撮影まで 1 検体 30 分以内で行うことができるまでに至っており、装置による短期間での疾患診断も可能であることが示されている。

表 2 抗原抗体反応自動測定装置における各項目ごとの処理時間

項目	時間
初期設定	0
システム液供給管チャージ	1'00"
PBS供給管チャージ	0'50"
検体供給管チャージ	0'50"
検体反応	7'35"
洗浄1	1'45"
二次抗体供給管チャージ	0'50"
二次抗体反応	7'35"
洗浄2	1'45"
化学発光試薬供給管チャージ	0'55"
化学発光反応	7'45"
洗浄3	5'45"
フローセル液抜き	5'10"
試薬供給管洗浄	7'45"
サンプルループ液抜き	3'00"

} 29' 00"

最後に保存温度を -20°C 、保存期間を3ヶ月間とし、抗SS-A,SS-B抗体、抗Sm抗体、抗Centromere抗体陽性血清を用いて、保存安定性の評価を行った。結果を図6、図7に示す。

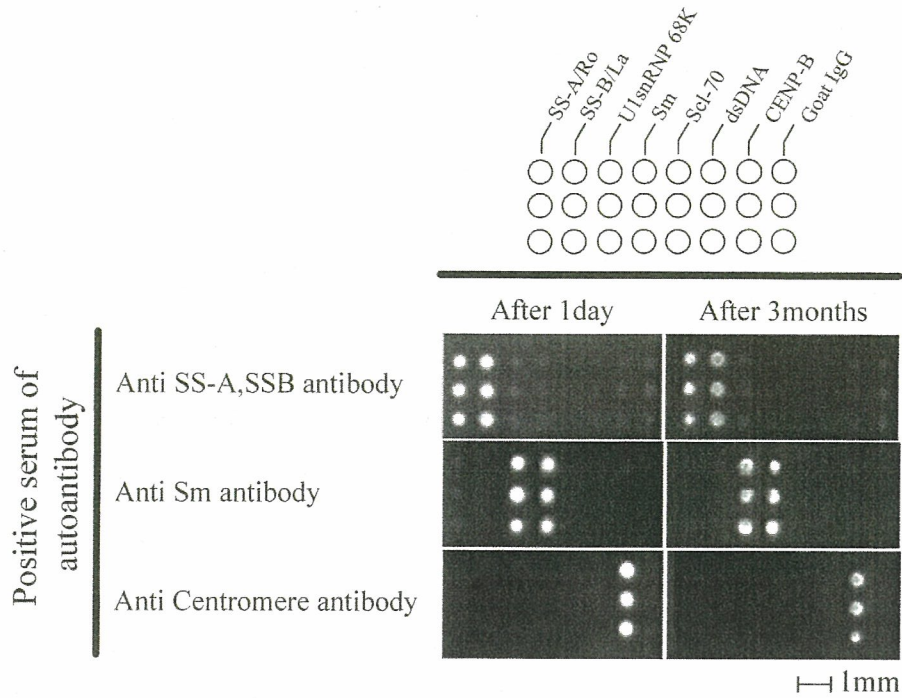


図6 保存安定性評価

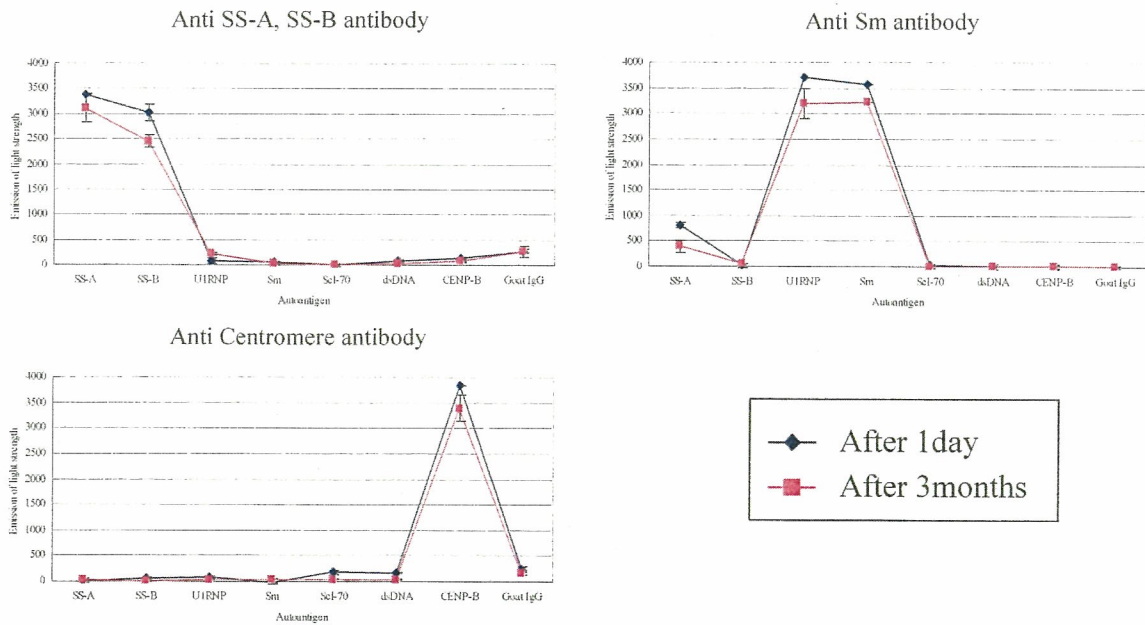


図7 保存安定性評価

わずかな発光の低下は見られるが、全体的に3ヶ月前と発光強度に顕著な変化は見られず、保存安定性を示すことができた。

D. 考察

自己免疫疾患は複数の抗体の組み合わせで起こる疾患であることは知られており、多項目同時測定チップである本チップシステムで、抗体を検査することは重要であると考えられる。ただ一方で、医療分野で多く求められるのは、多検体を同時に測定する方法であり、現在の装置ではそれが難しい。また、検査法として確立するためにはさらに多検体での評価及び従来法との比較が必然と考えられる。これらを今後の課題とし、検討していきたいと思う。

これまで抗核抗体を中心とした検査項目を搭載し、評価を行ってきたが、今後は、臓器特異的な自己免疫疾患に関与する自己抗体もあらたなコンテンツとして追加する予定であり、測定用抗原もすでに入手済みである。これらを加え、より多項目を同時に検査できる自己免疫疾患診断チップの確立を目指す。また、評価検体の数をさらに増やし、従来法の評価結果との相関性を同定し、自己抗体の陰性、陽性基準を明らかにしていく。さらに、多項目同時測定かつ多検体同時測定の可能な抗原抗体反応自動測定装置として改善していく。

E. 結論

8種類の自己抗原をマイクロアレイした保存安定性の高いプロテイン・チップを作製することができ、自動測定によって患者血清から測定できた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. T. Matsudaira, A. Wada, A. Suwa, H. Kohsaka, and Y. Ito, "Diagnosis of autoimmune diseases by photo immobilized autoantigen assay", in preparation
2. T. Ishii, A. Wada, S. Tsuzuki, M. Casolaro, and Y. Ito, "A new nonbiofouling polyzwitterion including L-histidine", *Biomacromolecules*, under revision
3. M. Casolaro, T. Ishii, Y. Ito, E. Paccagnini, F. Saperi, and R. Mendichi, "Vinyl polymers based on L-histidine residues. Part 3. The protonation thermodynamics of metacrylic poly (ampholyte)s", *Polymer*, under revision
4. Y. Ito, H. Hasuda, M. Sakuragi, "Surface modification of plastic, glass and

titanium by photoimmobilization of polyethylene glycol for antibiofouling”, *Acta Biomater.*, under revision

5. H. Mojgan, H. Hasuda, M. Sakuragi, Y. Yoshida, K. Suzuki, and Y. Ito, “Modification of the titan surface with photoreactive gelatin to regulate cell attachment”, *J. Biomed. Mater. Res.*, in press
6. Y. Ito, M. Heydari, A. Hashimoto, T. Konno, A. Hirasawa, S. Hori, K. Kurita, and A. Nakajima, “The movement of a water droplet on a gradient surface prepared by photodegradation”, *Langmuir*, **23**, 1845-1850 (2007)
7. Y. Ito, “Photoimmobilization for microarrays,” *Biotechnol.Prog.*, **22**(4), 24-932 (2006)
8. 阿部洋、和田章、伊藤嘉浩。「新機能性核酸・蛋白質を生み出すコンビナトリアル・エンジニアリング」、日本生物工学会誌、**84**(8), 310-312 (2006)
9. 伊藤嘉浩、大村馨、「なんでも固定化バイオチップ」、アレルギーと臨床、**26**(7), 557-560 (2006)
10. 伊藤嘉浩、大村馨、「なんでも固定化バイオチップの医療応用」、バイオインダストリー、**23**(6), 27-34 (2006)
11. 伊藤嘉浩、「マイクロコンタクトプリンティング」「ナノバイオ辞典」、山根恒夫、松永是、民谷栄一監修、テクノシステム、p. 539 (2006)
12. 伊藤嘉浩「マイクロパターン技術」「再生医療」田畑泰彦、赤池敏宏編集、コロナ社、p.221-235 (2006)

2. 学会発表

伊藤嘉浩、松平崇弘、続佐紀「アレルギー・免疫診断用チップの開発」、バイオマテリアル学会、2006年11月

3. その他

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

1件

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告

厚生労働省科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進 研究事業）
分担研究報告書

免疫疾患診断用プロテインチップの開発に関する研究

分担研究者 上阪 等

独立行政法人理化学研究所 免役・アレルギー科学総合研究センター

自己免疫病戦略研究ユニットリーダー

（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科膠原病・リウマチ内科学 助教授）

研究要旨

プロテインチップを応用したタンパクの代わりに peptide を用いて自己抗原の epitope mapping を行うために、自己抗原の common epitope peptide をチップ上に固相化して患者血清と反応させたところ、反応性が低い結果が得られた。そこで、プロテインチップを用いたことで反応性が低かったのかを確かめるため、使用した peptide と患者血清の反応性を、従来法である ELISA を用いて確認した。[方法] 従来方法である ELISA を用いた。プロテインチップの実験に用いた peptide, 患者血清と同様のものを、抗原としてプレートにコーティングし、あらかじめ U1RNP タンパク抗原に対して陽性が確認されている患者血清と反応させた。[結果] 従来法の ELISA においても peptide の固相化は容易ではないが、プロテインチップにおいてはさらに困難であると考えられた。[結論] 今後、peptide を用いた自己抗原の epitope mapping を行うためには、プロテインチップの固相化改善が必要と考えられる。

A. 研究目的

膠原病各疾患の患者血清中には、その疾患特有な自己抗体群が検出される。そして、自己抗体によって認識される epitope も各疾患や患者の症状に関連性が高いことが多い。

そこで、プロテインチップを応用したタンパクの代わりに peptide を用いた自己抗原の epitope mapping の開発を試みた。症状・疾患特異的な epitope を見つけることは、予後のある程度予測することや診断・治療に役立つと考えられる。

タンパクの代わりに自己抗原の common epitope peptide をチップ上に固相化して患者血清と反応させたところ、反応性が低い結果が得られた。プロテインチップを用いたことで反応性が低かったのかを確かめるために、使用した peptide と患者血清の反応性を、従来法である ELISA を用いて確認した。

B. 研究方法

自己抗原である U1RNP 70K タンパク, U1RNP A タンパク, U1RNP C タンパク, それぞれの common epitope peptide (70K peptide, A-1 peptide, A-2 peptide, C peptide)

とポジティブコントロールの U1RNP protein, U1RNP 70K protein, U1RNP A protein, U1RNP C protein, ネガティブコントロールの CENP-B protein を抗原としてプレートにコーティングし、あらかじめ U1RNP タンパク抗原に対して陽性が確認されている患者血清と反応させた。血清のネガティブコントロールとしては、健常者血清、CENP-B 陽性血清を用いた。

これらの実験にはプロテインチップの実験に用いた peptide, 患者血清と同様のものを用いた。

また、今回用いた common epitope peptide は過去の文献をもとに選んだ配列で、多くの U1RNP タンパク抗原陽性の患者血清が反応することが確かめられていた。A-1 peptide, A-2 peptide は、同じ合成 peptide を用いた ELISA によって患者血清との反応性が確認されたもの、70K peptide, C peptide は、recombinant タンパクを用いた ELISA により患者血清との反応性が確認された配列である。

- ・ 70K peptide

(配列 NYDTTESKLRREFEVYGPDK)

U1 RNP 陽性 MCTD 患者血清の多くが反応すると報告があった epitope

- ・ A-1 peptide

(配列 SQFGQILDILVSRSLKMRGQAFV)

U1 RNP 陽性 MCTD 患者血清の 94%が反応すると報告があった epitope

- ・ A-2 peptide

(配列 AGAARDALQGFKITQNNAMKISFAKK)

同様に反応性が高いと報告のあった epitope

- ・ C peptide

(配列 MMPMMGPPPPGMMPVGPAPKK)

SLE, MCTD の U1RNP 陽性患者でも反応あり、反応なしのものが混在していた epitope

C. 研究結果

U1RNP C common epitope peptide に関しては患者血清間のばらつきがあったが、反応した患者血清においては強い反応がみられた。同じ peptide を固相化したプロテインチップを用いた解析では、ELISA において反応性が強かった患者血清でも反応性が低かった。

その他の自己抗原の common epitope peptide に関しては、コントロールと比較して反応が見られるものも多くあったが、反応性が非常に低かった。

また、これらの実験に関しては再現性が認められた。

D. 考察

少なくとも U1RNP C peptide に関してはプロテインチップを用いた実験では陰性だった血清の一部が ELISA では陽性を示した。これらの結果から、今回用いた患者血清は U1RNP C peptide の配列を認識する自己抗体を含んでいると確認できた。

従来法である ELISA においても peptide の固相化は容易ではないが、プロテインチップにおいては、タンパクの代わりに peptide を固相化することが、さらに困難であると考えられる。

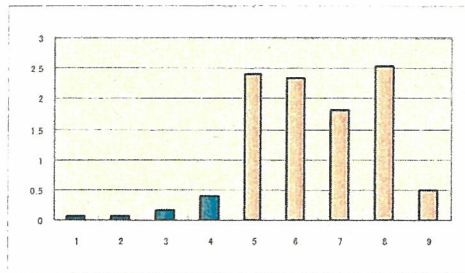
E. 結論

peptide を用いた自己抗原の epitope mapping を行うためには、プロテインチップ上にタンパクの代わりに peptide を固相化できる必要がある。そこで Peptide を安定して固相化するために、固相化方法の改善が必要と考えられる。

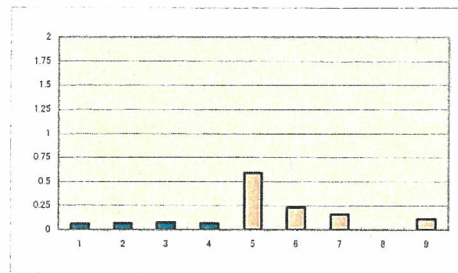
今回用いた peptide は過去の文献をもとに選んだ配列で、多くの患者血清が反応することが確かめられていた。プロテインチップにおいても、過去の文献における方法と同様の反応性を検出できるように改良する必要が考えられる。

MC T D 患者血清 (x500)

患者 No.1

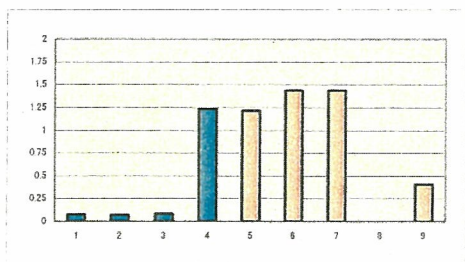


患者 No.2

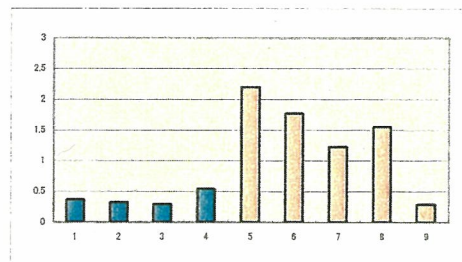


SLE 患者血清 (x500)

患者 No.1

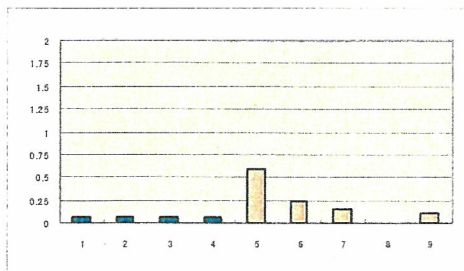


患者 No.2



健常者血清 (x500)

No.1



CENP-B 陽性血清 (x500)

No.1

