

ヒト敗血症患者の血漿 HRG 動態に関する研究

研究分担者 森 松 博 史 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授
平 田 泰 三 岡山大学病院新医療研究開発センター・准教授
橋 本 和 彦 岡山大学知的財産本部・知的財産マネージャー
桐 田 泰 三 岡山大学新医療創造支援本部
・産学官連携コーディネーター

研究要旨

血漿 HRG 測定のための ELISA 法を確立した。抗 HRG ウサギポリクローナル抗体をマイクロタイタープレートに固相化し検体中 HRG を結合した後、HRP 標識した抗 HRG ラット単クローン抗体で検出した。ELISA 法での測定はウェスタンブロット法での測定結果とよく相関した。ICU 内の敗血症患者の血漿 HRG 測定を実施し、敗血症患者では健常人対照の約 25% に低下していることを明らかにした。

A. 研究目的

動物実験で証明された HRG 補充療法の有効性に関する理論的根拠をヒト敗血症でも得ることが重要である。この目的のために、ヒト敗血症患者の血漿 HRG を測定し、敗血症マーカーならびに重篤度・予後判定マーカーとしての意義を検証する必要がある。本研究では、臨床研究についての倫理審査で承認を得た後、上記の測定を実施する。同時に、血漿 HRG を簡便に測定するための ELISA を開発、確立する。

B. 研究方法

1. ウェスタンブロットによる血漿 HRG の測定

ヒト血漿を 100~500 倍希釈し、その適量を SDS-PAGE 電気泳動と NC 膜に転写後、特異的抗 HRG 抗体を用いて検出し

た。定量の比較対照としてヒト血漿から精製した HRG 標品を用いた。

2. 血漿 HRG 測定のための ELISA の開発

抗 HRG ポリクローナル抗体、単クローン抗体、HRG 親和性の高い Ni-NTA を組み合わせることで、マイクロタイタープレートでの HRG 測定系を確立するための条件検討を実施した。

3. 敗血症患者血漿 HRG の測定

岡山大学病院の ICU に入院する敗血症患者の血漿 HRG を、臨床研究の倫理審査委員会で承認された文書による同意を得た後、ウェスタンブロットあるいは独自に開発した ELISA で測定した。健常人対照ならびに外科手術後の患者についても、同様の手続きを経た後血漿 HRG を測定した。

C. 研究結果

臨床研究倫理審査委員会で承認を得た後、ICU 内の敗血症患者と外科術後患者の血漿 HRG レベルを測定した。現時点での測定患者数は、10 人と 10 人である。

健常人のレベルと比較し、敗血症では約 25%、外科術後では約 40% の値を示し、いずれも有意な低下であった。また敗血症患者と外科術後の患者についても有意差があった。

D. 考察

ICU 内の敗血症患者の血漿 HRG は、健常人のレベルと比較すると約 25%にまで低下していることがわかった。外科術後 1 日目の患者血漿では約 40% であった。現時点では測定患者数が限られているので断定的に結論はできないが、ヒト敗血症患者においても本研究で用いたマウス敗血症モデルと同程度の血漿 HRG 低下が生じている可能性がある。このような敗血症患者の血漿 HRG レベルの報告は世界的に初めてのデータである。ヒト敗血症治療薬として HRG の補充療法を考える上で重要な根拠となるデータである。

E. 結論

ヒト敗血症患者の血漿 HRG 測定で、マウスで観察された血漿 HRG 低下がヒトでも生じることを確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Wake H, Mori S, Liu K, Teshigawara K, Sakaguchi M, Takahashi H, Ohtsuka A, Yoshino T, Nishibori M.
Histidine-rich glycoprotein prevents septic lethality through neutrophil regulation.
(submitted)

2. 学会発表

1) 国際学会

該当なし

2) 国内学会

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- ① 好中球活性化に起因する疾患の治療薬、治療方法及び検査方法
特願 2012-129232 (2012.6.6 出願)
PCT/JP2013/64779 (2013.5.28 出願)

2. 実用新案登録

該当なし

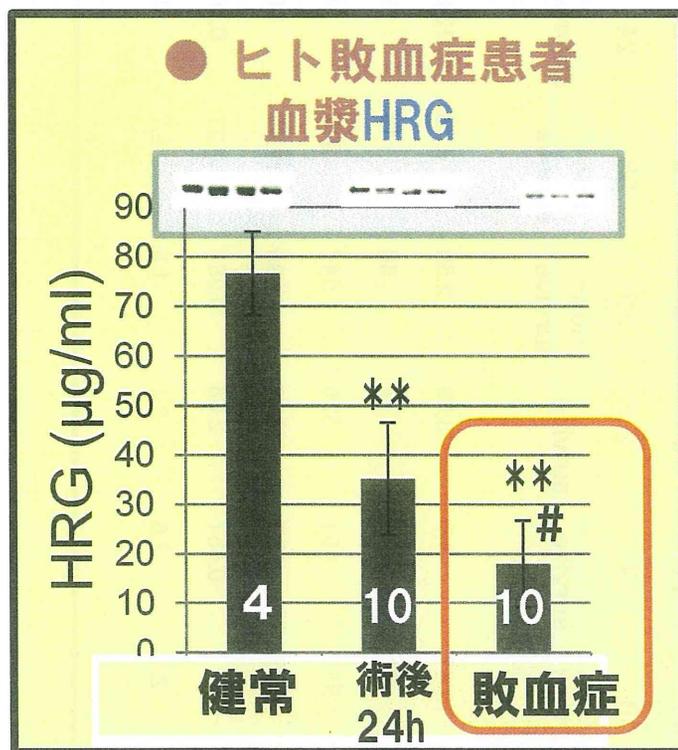
3. その他

該当なし

ヒト敗血症患者の血漿 HRG 動態に関する研究

森松博史、平田泰三、樋之津史郎、和氣秀徳、

岡山大学臨床研究倫理審査委員会で承認を得た(受付番号 1623)ICU 内患者さんの血漿 HRG レベルの測定を実施した。敗血症の診断は臨床診断とし、同時に頭頸部がんならびに食道がん手術後の患者さんの測定を実施した。ICU 入室当日を Day 1 と数えた。



上のグラフは、これまで Elisa で測定したそれぞれ 10 名の患者さんのデータと、健常ボランティアの測定結果である。外科術後の患者さんにおいても健常人と比較し血漿 HRG レベルは有意に低下していた。敗血症患者さんでは低下はさらに著しく、外科術後患者さんと比べても有意の低下と判定された。各群 3~4 症例のウェスタンブロット解析結果を上を示した。上記の 10 例の敗血症患者さんの経時的な血液生化学データを次頁に掲載する。

Clinical Data on Day 1 and Outcomes

	all patients	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9	No.10
age (years)	61.9±16.1	80	77	62	44	80	63	36	73	60	44
sex (M/F)	6 / 4	M	M	F	M	M	F	F	M	M	F
APACHE II score	23.2±8.69	42	25	18	17	35	18	19	21	15	22
SOFA score	10.2±3.70	17	11	5	8	12	12	9	14	6	8
duration of ICU stay (days)	22.7±15.4	10	19	12	35	58	24	28	9	7	25
ICU mortality	40.0%	survive	survive	survive	non-survive	non-survive	survive	non-survive	survive	survive	non-survive
WBC (×1000)		15.27	9.9	3.09	2.55	3.58	13.69	0.02	19.22	17.11	0.32
Platelet (×1000)		87	108	74	86	143	57	15	49	317	33
Fibrinogen (mg/dL)		554	861	525	547	377	142	1135	297	477	567
CRP (mg/dL)		18.65	27.7	14.58	15.85	11.25	1.09	21.09	12.89	2.66	0.95
Procalcitonin (ng/mL)		—	0.451	2.68	0.981	3.31	0.368	2.52	84.87	4.85	0.617
Albumin (g/dL)		2.1	2.6	2.1	1.8	2.7	3.2	3	2.5	3	2.6

Clinical Data on Day 3

Patient	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9	No.10
WBC (× 1000)	15.16	12.61	0.87	3.61	26.08	15.47	0.06	16.33	10.95	0.2
Platelet (× 1000)	93	58	14	89	40	43	17	35	209	25
Fibrinogen (mg/dL)	449	717	471	550	479	174	1394	178	1007	460
CRP (mg/dL)	17.67	15.27	12.66	14.62	21.75	0.77	28.58	6.94	16.26	1.68
Procalcitonin (ng/mL)	34.83	0.369	1.33	0.7	-	-	8.54	35.95	1.78	0.322
Albumin (g/dL)	2	2.6	2.6	2	2.6	3.5	2.8	2.9	2.3	2.4
SOFA score	15	13	8	9	16	14	8	12	1	5

Clinical Data on Day 7

Patient	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9	No.10
WBC (× 1000)	10.6	11.6	2.84	5.57	24.06	9.64	0.02	9.05	3.66	0.24
Platelet (× 1000)	56	164	30	131	32	189	5	34	220	36
Fibrinogen (mg/dL)	210	312	458	545	458	244	512	107	822	646
CRP (mg/dL)	1.92	1.46	4.74	14.5	12.85	1.36	9.22	1.76	1.65	1.23
Procalcitonin (ng/mL)	6.87	0.066	-	0.78	3.85	4.23	3.65	3.21	0.144	0.408
Albumin (g/dL)	1.8	2.6	2.2	1.9	2	4	2.6	2.6	2.8	2.2
SOFA score	11	7	12	8	15	4	12	5	1	5

生化学データのうち、白血球数、CRP 値、フィブリノーゲン値の経時的変動が、予後の判定に重要である可能性が示唆された。したがって、本研究における血漿 HRG 値の測定が、これら既存の敗血症臨床データとどのような関係にあるかを今後の研究で明らかにしていく必要がある。

ヒト組換え HRG の哺乳動物細胞発現系の確立

研究分担者 阪口政清 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授
和氣秀徳 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・助教
西村多美子 就実大学薬学部・教授

研究要旨

ヒト組換え HRG の哺乳動物細胞を用いた発現系を確立した。3 種類の哺乳動物細胞、HEK293、CHO、HepG2 と 4 種類のプラスミドベクターを用いてヒト組換え HRG の発現条件について検討した。CHO の付着/浮遊細胞ならびに HEK293 細胞を用いて一過性発現に成功し、回収された細胞培養上清から NiNTA-アガロースビーズによるアフィニティ精製に成功した。

A. 研究目的

これまでの研究では、ヒト凍結新鮮血漿から Ni-NTA アフィニティクロマトグラフィーならびに陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製 HRG 標品を得てきた。この精製品を用いて、ヒト好中球に対する構造と機能にわたる基本的な鎮静化作用とマウス敗血症モデルにおける治療効果を明らかにしてきた。

本治療法をヒト敗血症やそれに続発する多臓器不全の治療法とするために、ヒト HRG タンパクを安全な製品として大量に製造する方法を確立する必要がある。この目的のために、哺乳動物細胞にヒト HRG 遺伝子を導入することで組換えヒト HRG タンパクを産生させる。基本的な発現条件について検討し、発現タンパクの生物活性を Native HRG との比較で明らかにする。

B. 研究方法

哺乳動物細胞を用いたヒト組換え HRG の発現と精製

HepG2、HEK293、CHO の 3 種類の哺乳動物細胞と 4 種類のプラスミドベクターを用いて、まず各種条件下におけるヒト組換え HRG の一過性発現について検討した。培地中に分泌された HRG を Ni-NTA アフィニティクロマトグラフィーで精製した。得られた一部精製タンパクの活性を単離ヒト好中球の正球化活性で Native タンパクと比較した。

C. 研究結果

HEK293、CHO、HepG2 の 3 種類の哺乳動物細胞と 4 種類の一過性発現用プラスミドベクターを用いて 10 cm ディッシュでの発現条件を検討した。その結果、HepG2 細胞ではいずれのプラスミドベクターを用いた場合でも HRG タンパクの発現量が極めて

少ないことがわかった。それに対し、HEK293、CHO 細胞では、2 種類のベクターで一定量の HRG タンパクを培地中に分泌することがわかった。分泌は 5 日間持続することがわかったので、この期間に回収された培地から、組換え HRG の Ni-NTA アガロースによるアフィニティ精製を試みた。その結果、組換え HRG は Ni-NTA アガロースによるアフィニティ精製においてヒト Native HRG と略同じ挙動を示すことがわかった。HEK293、CHO それぞれ 10 cm ディッシュの培養細胞より約 20~30 µg の精製品が得られた。

HEK293細胞で作製した組換え HRG の活性をヒト単離好中球形態に対す正球化作用で評価した。精製品に限りがあったので高濃度域の濃度・作用曲線を描くことができなかったが、Native HRG より効力が低い可能性が示唆された。

D. 考察

3 種類の哺乳動物細胞、HEK293、CHO、HepG2 細胞の内、HepG2 細胞では殆ど組換えヒト HRG の発現は得られなかった。今後の治療用組換え HRG タンパクの作製細胞候補から除外すべきであることがわかった。HEK293 で作製されたヒト HRG の生物活性は、Native HRG より低いかもしれない。付加糖鎖の構造解析を含め、その原因を追究する必要がある。

E. 結論

組換え HRG の作製細胞として、HEK293 と CHO 細胞が選択された。大量産生条件、安定発現細胞株の確立、生物活性の向上を目指して研究を進める必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1) 国際学会

該当なし

2) 国内学会

- ① 西堀正洋、和氣秀徳、森秀治。
血漿蛋白 HRG による好中球制御と敗血症治療薬開発。
第 87 回日本薬理学会年会, 仙台, 2014
- ② 和氣秀徳、森秀治、高橋英夫、劉克約、勅使川原匡、西堀正洋。
高ヒスチジン糖タンパク質 (HRG) による敗血症治療の可能性。
第 87 回日本薬理学会年会, 仙台, 2014.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- ① 好中球活性化に起因する疾患の治療薬、治療方法及び検査方法
特願 2012-129232 (2012.6.6 出願)
PCT/JP2013/64779 (2013.5.28 出願)

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

HEK293 細胞、HepG2 細胞を用いた rHRG 一過性発現株、安定発現株の作製

阪口政清、和氣秀徳、森秀治

第一節 HEK293 細胞、HepG2 細胞の培養

2-1-1 実験材料

- DMEM/F12 : SIGMA
- Fetal Bovine Serum(FBS) : Gibco
- Sodium pyruvate solution : SIGMA
- L-Glutamine : Gibco
- Minimum Essential Medium Eagle(MEM) : SIGMA
- ペニシリン・ストレプトマイシン : Gibco
- Non-essential Amino Acid Solution(100x) : SIGMA
- トリパンプルー : ナカライテスク
- Trypsin : Gibco
- EDTA : ナカライテスク
- Dulbecco's-PBS(-)(PBS(-)): SIGMA
- ウォーターバス : タイテック
- 血球計算盤 : SLGC
- 37 °C、5 %CO₂インキュベーター : 山陽
- 顕微鏡 : オリンパス
- 養用 5 mL フラスコ(5 mL フラスコ) : SIGMA
- 細胞培養用 10 cm dish(10 cm dish) : BD Falcon

2-1-2 試薬調整

• HEK293 細胞用培地

無菌、常温の条件下で 500 mL DMEM/F12 から 50 mL 分取し、残った 450 mL DMEM/F12 に 50 mL の FBS を添加した。そして、12.5 mL の L-Glutamine-200 mM、5 mL の Penicilin-Streptomycin を添加した。

• HepG2 細胞用培地

無菌、常温の条件下で 500 mL の MEM から 50 mL 分取し、残った 450 mL の MEM に 50 mL の FBS を添加した。そして、5 mL の Non-essential Amino Acid Solution(100x)、5 mL の L-Glutamine-200 mM、5 mL の Sodium pyruvate solution、5 mL の Penicilin-Streptomycin を添加した。

2-1-3 実験方法

2-1-4

[HEK293 細胞の培養実験]

37 °Cで解凍した細胞を 10 mL の培地に添加後、常温、1000 rpm で 3 分間遠心した。上清を破棄し、細胞沈渣を 10 mL の培地に再懸濁して 5 mL フラスコに播種し 37 °C、5 %CO₂で培養した。

細胞が 80 %コンフルエントになったら 5 mL の PBS(-)で洗浄し、細胞を 5 mL の培地でフラスコ底から細胞を剥がした。この細胞懸濁液を回収し、さらに、フラスコに 5 mL の培地を加え、細胞を剥がした後に細胞懸濁液を回収した。

回収した 10 mL の細胞懸濁液は常温、1000 rpm で 3 分間遠心した。上清を破棄し、細胞沈渣は 10 mL の培地に再懸濁して 10 cm dish に播種し 37 °C、5 %CO₂で培養した。

細胞が 80 %コンフルエントになったら 5 mL の PBS(-)で洗浄し、10 mL の培地で細胞を回収した。

回収した 10 mL の培地は常温、1000 rpm で 3 分間遠心した。上清を破棄し、細胞沈渣を 10 mL の培地に再懸濁した細胞溶液 5 μl とトリパンブルー 45 μl を混和し血球計算盤で細胞数を数え、細胞溶液の濃度を算出した。そして、10 cm dish に 1x10⁶ cells 播種し、37 °C、5 %CO₂で培養した。

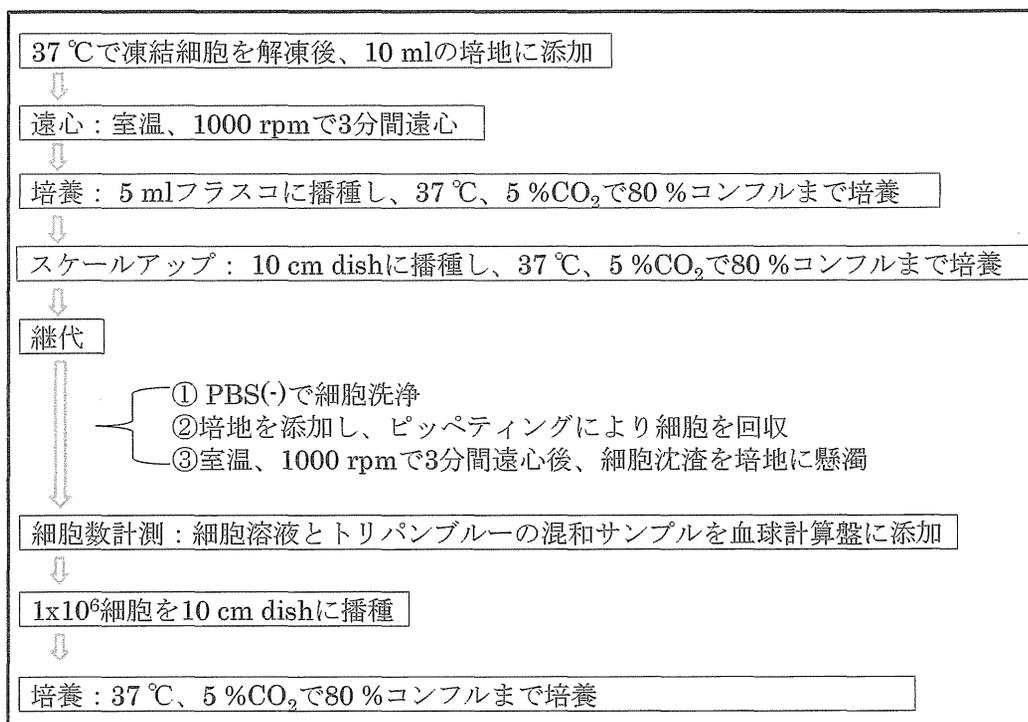


表4.HEK293細胞の培養実験プロトコール

[HepG2 細胞の培養実験]

37℃で解凍した細胞を 10 cm dish 中の 20 mL の培地に添加し、37℃、5%CO₂で培養した翌日、培地を交換した。

細胞が 80%コンフルエントの状態になったら継代を行った。5 mL の PBS(-) で洗浄した細胞に 1 mL の 0.25% Trypsin/EDTA を添加し、37℃、5%CO₂で 1 分間処理した。処理後、4 mL の培地を添加し、7-8 回ピペッティングし細胞抱懸濁液を回収した。さらに、dish に 5 mL の培地を加え、細胞を剥がした後に細胞抱懸濁液を回収した。回収した細胞懸濁液は常温、700 rpm で 3 分間遠心した。

上清を破棄し、細胞沈渣を 10 mL の培地に再懸濁した細胞溶液 5 μl と 45 μl のトリパンプルを混和した。混和液を血球計算盤で、細胞数を数え、細胞溶液の濃度を算出した。そして、細胞培養 10 cm dish に 1x10⁶ cells 播種し、37℃、5%CO₂で培養した。

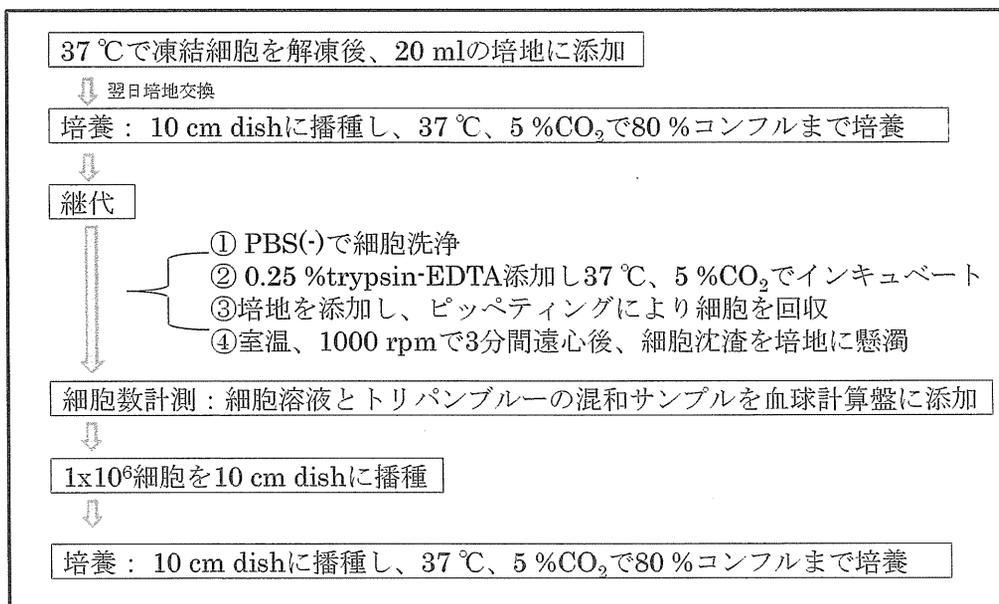


表5.HepG2細胞の培養実験プロトコール

第二節 HEK293 細胞、HepG2 細胞への rHRG 発現ベクター PCMV_i-R-TSC-HRG の導入と rHRG 発現の確認

2-2-1 実験材料

rHRG 発現ベクター-PCMV_i-R-TSC-HRG は、阪口 政清 が作製した。

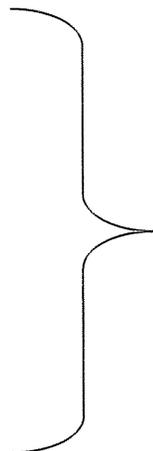
- Fu-GENE HD : Roche
- OPTI-MEM : Gibco
- HEK293 細胞 : 岡山大学大学院・医歯薬総合研究科・薬理学
- HepG2 細胞 : 岡山大学大学院・医歯薬総合研究科・薬理学
- M-PER : Thermo Scientific
- プロテアーゼインヒビターカクテル(PI カクテル) : SIGMA
- 酢酸 : 和光純薬工業
- グリシン : SIGMA
- N,N'-メチレンビスアクリルアミド(BIS) : 和光純薬工業
- アクリルアミド : ナカライテスク
- N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) : BIO RAD
- トリスヒドロキシメチルアミノメタン(Tris) : SIGMA
- メタノール : ナカライテスク
- Sypro Ruby Blot Stain: Life Technologies
- スキムミルク : 雪印
- ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) : BIO RAD
- 2-メルカプトエタノール(2-ME) : 和光純薬工業
- Anti-human HRG polyclonal antibody(α -hHRG pAb) : 岡山大学大学院・医歯薬総合研究科・薬理学
- TritonX-100 : ナカライテスク
- Bovine Serum Albumin (BSA) : SIGMA
- Anti-Rabbit IgG HRP : MBL
- Super Signal West Dura Extended Duration Substrate : Thermo Scientific
- Precision Plus Protein Dual Color Standards(分子量マーカー) : BIO RAD
- ニトロセルロース膜 : BIO RAD
- Image Quant Las 4000mini : GE healthcare
- 泳動槽 : BIO RAD
- 細胞培養用 10 cm dish(10 cm dish) : BD Falcon

2-2-2 試薬調整

・ M-PER 液

無菌、常温の条件下で 540 mL の M-PER に 10 mL の PI カクテルを溶かした。

- ・ アクリルアミド/Bis
- ・ 0.5 M Tris-HCl pH6.8
- ・ 1.5 M Tris-HCl pH8.8
- ・ 10 %APS
- ・ サンプルバッファー
- ・ 10x 泳動バッファー
- ・ 1x 泳動バッファー
- ・ 泳動サンプル
- ・ 濃縮ゲル
- ・ 分離ゲル



2-2-3 実験方法

導入ベクターと導入試薬の複合体であるリポプレックスを作製した。常温、無菌の条件下で 450 μ L の OPTI-MEM に 50 μ L の Fu-GENE HD を添加し、また、475 μ L の OPTI-MEM に 25 μ L の PCMV_i-R-TSC-HRG を添加してタッピングした。そして、PCMV_i-R-TSC-HRG 液を Fu-GENE HD 液に添加してタッピングし室温で 15 分間静置した。

80 %コンフルエントの細胞を PBS(-) で洗浄し、9 mL の OPTI-MEM を添加後、1 mL のリポプレックスを添加した。そして、37 °C、5 %CO₂ で 48 時間培養した。

48 時間後、培養上清を回収し、4 °C、14000 rpm で 10 分間遠心し上清を培養上清画分とした。

また、PBS(-) で洗浄した細胞に細胞溶解液である M-PER を添加し、室温、無菌の条件下で 10 分間ピペティングした。

その後、細胞破碎液を 4 °C、14000 rpm で 10 分間遠心した。上清を M-PER 可溶性画分、沈渣を PBS(-) に再懸濁し M-PER 不溶性画分とした。Western Blotting は氷中、100 V、90 分の条件で転写を行った。以降の操作は第一章 1-3-3 [実験方法] と同様に行った。また、Western Blotting により得られたバンドの発

光強度の測定はソフトウェア Image Quant TL を使用した。そして、各細胞の rHRG 分泌効率 $\text{は「分泌された rHRG 量} \div \text{産生された全 rHRG 量} \times 100$ 」から算出し、細胞内 rHRG 発現率は「分泌されずに細胞内に残った rHRG 量 \div 産生された全 rHRG 量 $\times 100$ 」から算出した。

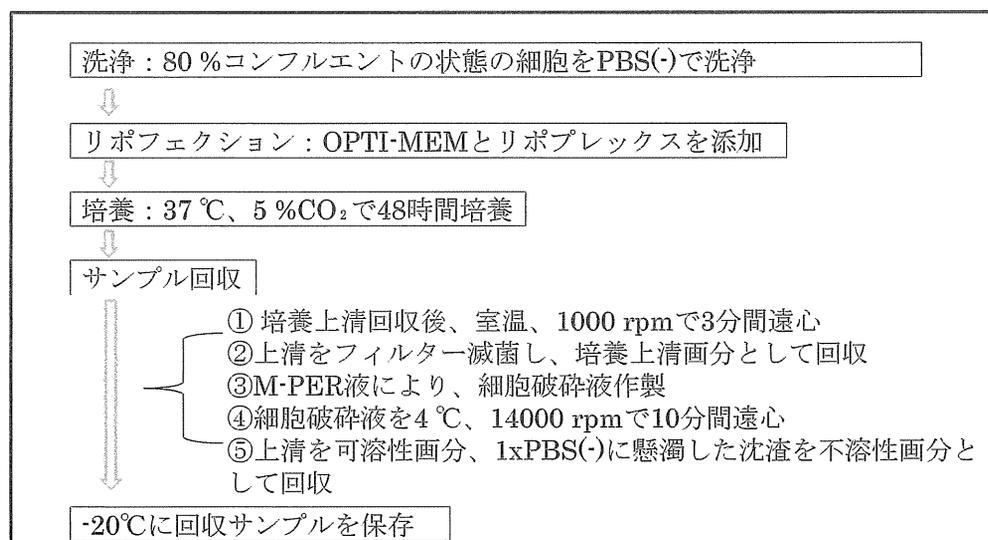


表6. HEK293細胞、HepG2細胞へのrHRG発現ベクターPCMVi-R-TSC-HRGの導入とrHRG発現の確認実験プロトコール

2-2-4 結果

本実験は HRG 発現ベクターPCMVi-R-TSC-HRG を HEK293 細胞、HepG2 細胞に導入する事で各細胞において rHRG 発現の確認、細胞内での rHRG 産生量と培養上清への rHRG 分泌量の確認、細胞間での rHRG 発現量の比較を目的としている。

各細胞にベクターを導入した後、培養上清画分、可溶性画分、不溶性画分を得た。これらの画分を用いて Western Blotting を行った結果、各細胞は rHRG を発現し、培養上清へ分泌している事が分かった(図 2-1)。

また、Image Quant TL を用いて得られた各バンドの発光強度とヒト血漿 HRG 精製標品(50 ng)の発光強度を比較する事でロードサンプル中に含まれる rHRG 量をヒト血漿 HRG 相当量として算出すると、培養上清 10 ml への rHRG 分泌量は HEK293 細胞では 1067.8 μg 、HepG2 細胞では 230 μg であり、

HEK293 細胞が HepG2 細胞に比べ約 4.6 倍多く rHRG を分泌している事が分かった(図 2-2)。

さらに、全 rHRG 量は HEK293 細胞では 1707.8 μg 、HepG2 細胞では 292.2 μg であり、HEK293 細胞が HepG2 細胞に比べ約 5.8 倍多く rHRG を発現している事が分かった(図 2-2)。

HEK293 細胞、HepG2 細胞における rHRG 分泌効率を算出すると、HEK293 細胞では約 97 %、HepG2 細胞では約 99 %であった(図 2-2)。



図2-1：Western Blotting法によるHRGの溶出確認結果
各溶出画分は約6.67 μL 、ヒト血漿HRG精製標品は50 ng

	HRG濃度($\text{ng}/6.67 \mu\text{L}$)	全サンプル量(mL)	全HRG量(μg)
HepG2細胞培養上清	230	10	345
HEK293細胞培養上清	1067.8	10	1601.7
HepG2細胞破碎上清	62.2	0.56	5.2
HEK293細胞破碎上清	640	0.56	53.8

図2-2：培養上清中へのHEK293細胞・HepG2細胞由来rHRG量と
各細胞内因性rHRG量の比較

第三節 Ni-NTA アフィニティー精製法による培養上清からの rHRG の精製

2-3-1 実験材料

- ・イミダゾール：ナカライテスク
- ・酢酸：和光純薬工業
- ・グリシン：SIGMA
- ・トリスヒドロキシメチルアミノメタン(Tris)：SIGMA
- ・メタノール：ナカライテスク
- ・ Sypro Ruby Blot Stain : Life Technologies
- ・スキムミルク：雪印
- ・TritonX-100：ナカライテスク
- ・Bovine Serum Albumin (BSA)：SIGMA

- Precision Plus Protein Dual Color Standards(分子量マーカー) : BIO RAD
- Anti-Rabbit IgG-HRP : MBL
- Super Signal West Dura Extended Duration Substrate : Thermo Scientific
- ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) : BIO RAD
- 2-メルカプトエタノール(2-ME) : 和光純薬工業
- N,N'-メチレンビスアクリルアミド (BIS) : 和光純薬工業
- アクリルアミド : ナカライテスク
- N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) : BIO RAD
- Anti-human HRG polyclonal antibody(α -hHRG pAb) : 岡山大学大学院・医歯薬総合研究科・薬理学
- Ni-NTA agarose gel : Qiagen
- Image Quant Las 4000mini: GE healthcare
- ディスポーザルポリプロピレン 10 cm カラム(製品番号 29924) : Thermo Scientific
- ナノドロップ(ND-2000) : Thermo Scientific
- 10 cm ミニカラム : 生化学工業
- ニトロセルロース膜(162-0112) : BIO RAD
- 電気泳動槽 (MODEL BE-222) : BIO CRAFT

2-3-2 試薬調整

- 500 mM イミダゾール in 1xPBS(-) pH7.4
 常温で 20 mL の Milli-Q 水に 8.3 mL の 3 M イミダゾール溶液、5 mL の 10xPBS(-) pH7.4 を溶かした。そして、HCl を用いて pH8.0 に調製後、Milli-Q 水で 50 mL にメスアップした。50、75、100、150、200、250mM イミダゾール in 1xPBS(-) pH7.4 も同様にして調整した。
- Ni-NTA agarose gel
 常温で約 2 mL の Ni-NTA agarose gel を 30 mL の 10 mM 1xPBS(-) pH7.4 で平衡化した。
- 洗浄液 2(10 mM Phosphate Buffer(PB) pH7.4 + 1M NaCl)
 常温で 20 mL の Milli-Q 水に 2.5 mL の 200 mM PB、10 mL の 5 M NaCl を加え pH を 7.4 に調整後、Milli-Q 水で全量を 50 mL にメスアップした。
- 洗浄液 3(1xPBS(-))
 常温で 10xPBS(-) を 10 倍希釈し、オートクレーブにかけた。

2-3-3 実験方法

0.5 mL の Ni-NTA agarose gel と第二節で得られた培養上清を 4 °C で 1 時間回転混和した後、4 °C、1500 rpm で 15 分間遠心した。

そして、10 cm ミニカラムに添加して素通り画分を回収し gel を洗浄液 1、洗浄液 2、洗浄液 3 の順に洗浄し各洗浄液を回収した。

次に、4 °C、5 秒/1 滴の条件で 75 mM、100 mM、150 mM、200 mM、250 mM、500 mM イミダゾール in 1xPBS(-)pH7.4 各 5 mL で溶出し、1 mL ずつの溶出画分 30 本を回収し、Nano drop にてタンパク質濃度を測定した。

Western Blotting は水中、100 V、90 分の条件で転写を行った。以降の操作は第一章 1-3-3 [実験方法]と同様に行った。また、Western Blotting により得られたバンドの化学発光強度の測定はソフトウェア Image Quant TL を用いた。

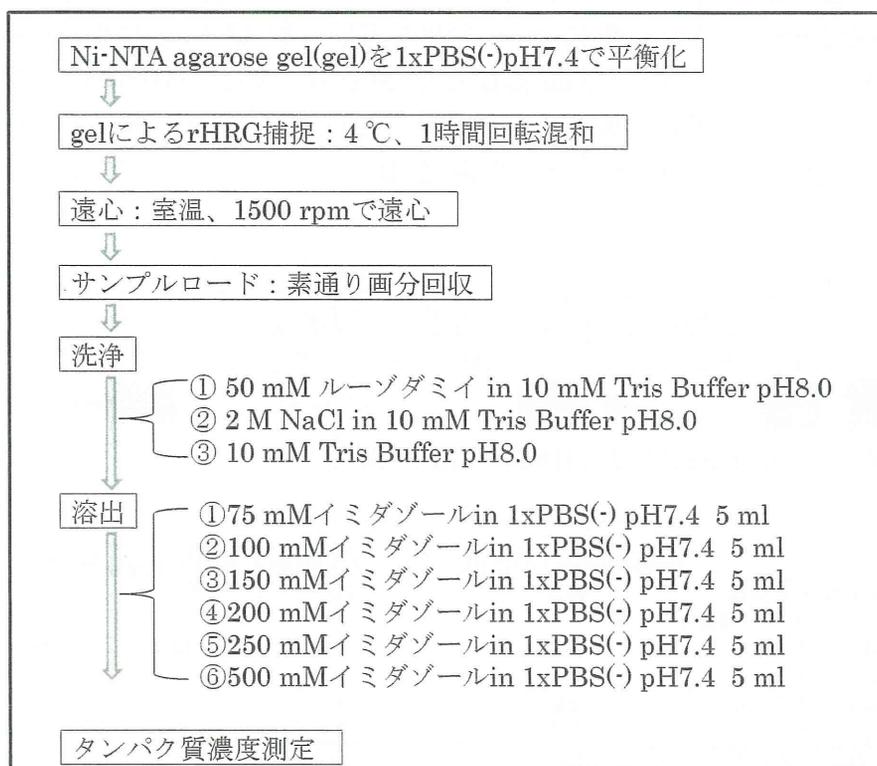


表 7. Ni-NTA アフィニティー精製法による培養上清からの rHRG の精製プロトコール

2-3-4 結果

0.5 mL の Ni-NTA agarose gel と第二節で得られた培養上清を 4 °C で 1 時間回転混和した gel を洗浄液 1、洗浄液 2、洗浄液 3 の順に洗浄し 200 mM～500 mM イミダゾールで rHRG の溶出を試みた(図 2-3)。

Western Blotting 法は一次抗体 α -hHRG pAb、二次抗体は Anti-Rabbit IgG-HRP (1000 倍希釈)を用いた。

各泳動サンプルは 10 μ L、HRG 精製標品は 50 ng ロードした。各バンドの発光強度と HRG 精製標品 (50 ng)の発光強度を比較する事でヒト血漿 HRG 相当量として各画分中の rHRG 量を算出した。

また、Image Quant TL で得られた各バンドの発光強度とヒト血漿 HRG 精製標品(50 ng)の発光強度を比較する事でロードサンプル中に含まれる HRG 量を算出した(図 2-4)。HEK293 細胞の培養上清 10 ml へ分泌している 62.3 μ g の全 rHRG 量の内 250mM～500 mM イミダゾール in 1xPBS(-) pH7.4 で約 61.8 μ g 溶出し、HepG2 細胞の培養上清 10 ml へ分泌している約 43.4 μ g の全 rHRG 量の内 500 mM イミダゾールで 1.9 μ g 溶出した(図 2-4)。また、HEK293 細胞の培養上清 10 ml 中の全 rHRG 量に対する精製 rHRG 量の収率は 99 %であったが、HepG2 細胞の収率は 4.4 %であった(図 2-4)。

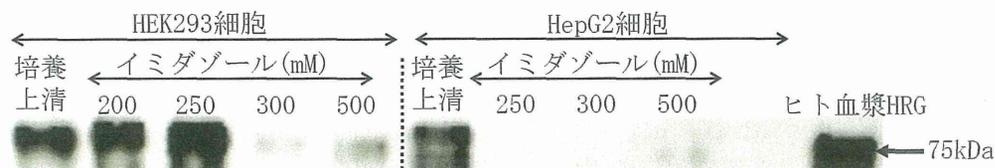


図2-3：Western Blotting法によるHRGの溶出確認結果

	HRG濃度(ng / 6.67 μ L)	全サンプル量(mL)	全HRG量(μ g)	収率(%)
HEK293細胞培養上清	41.5	10	62.3	
Ni-NTAアフィニティー精製				
200 mMイミダゾール	49.3	3	22.2	35.6
250 mMイミダゾール	77.5	3	34.9	56.0
300 mMイミダゾール	2.8	3	1.3	2.1
500 mMイミダゾール	7.7	3	3.4	5.5
HepG2細胞培養上清	28.9	10	43.4	
Ni-NTAアフィニティー精製				
250 mMイミダゾール	0	3	0	0
300 mMイミダゾール	0	3	0	0
500 mMイミダゾール	4.2	3	1.9	4.4

図2-4: Ni-NTAアフィニティー精製法によりHEK293細胞、HepG2細胞培養上清からの精製されたrHRG量の比較

第四節 HEK293 細胞への 4 種類の rHRG 発現ベクター(PRET-CMVi-C-HRG、PCMVi-C OriP-HRG、PRET MVi-R-TSC-HRG、PCMVi-R-TSC-HRG)の導入と rHRG 発現量の比較

2-4-1 実験材料

rHRG 発現ベクター(pRet CMVi-C-HRG、PCMVi-C-OriP-HRG、PRET CMVi-R-TSC-HRG、PCMVi-R-TSC-HRG)は岡山大学大学院・医歯薬学総合研究科・細胞生物学分野所属 阪口 政清 が作製した。

2-4-2 試薬調整

先述。

2-4-3 実験方法

先述。

2-4-4 結果

HEK293 細胞に対して 4 種類のベクターを導入しベクター間の rHRG 発現量を比較した結果、ベクターPCMVi-R-TSC-HRG、PCMVi-C-OriP-HRG、PRET-CMVi-C-HRG で rHRG の分泌、発現を確認できた。さらに、細胞洗浄後の PBS(-)中にも rHRG が確認できた(図 2-5)。

また、各ベクターにおける rHRG 発現量を比較した結果、ベクターCMVi-C-OriP-HRG が最大となった(図 2-6)。



図2-5 : HEK293細胞のへ4種類のrHRG発現ベクター(PRET-CMVi-C-HRG、PCMVi-C OriP-HRG、PRET MVi-R-TSC-HRG、PCMVi-R-TSC-HRG)の導入と rHRG発現量の比較結果

各泳動サンプルは13.3 μl、HRG精製標品は25 ng

	rHRG濃度(ng/13.3 µg)	全サンプル量(mL)	全rHRG量(µg)
PRET-CMVi-C-HRG			
培養上清	91.2	10	68.6
洗浄液	3.7	2	0.56
細胞破碎 上清	80.6	0.7	2.3
細胞破碎 沈殿	42.6	0.7	
PRET-CMVi-R-HRG			
培養上清	0	10	0
洗浄液	0	2	0
細胞破碎 上清	0	0.7	0
細胞破碎 沈殿	0	0.7	0
PCMVi-C-OriP-HRG			
培養上清	29.4	10	22.1
細胞破碎 上清	10.1	0.7	1.5
細胞破碎 沈殿	29	0.7	4
PCMVi-R-TSC-HRG			
培養上清	8.1	10	6.1
洗浄液	1	2	0.2
細胞破碎 上清	2	0.7	0.1
細胞破碎 沈殿	0	0.7	0

図2-6：HEK293細胞の4種類のrHRG発現ータクベ(PRET-CMVi-C-HRG、PCMVi-C OriP-HRG、PRET MVi-R-TSC-HRG、PCMVi-R-TSC-HRG)の導入とrHRG発現量の比較結果

第五節 HEK293細胞とrHRG発現ベクターCMVi-C-OriP-HRGを用いたrHRG安定発現株の作製

2-5-1 実験材料

- ・ DMEM/F12(1:1)(1x)：Gibco
- ・ 10 mg/ mL ピューロマイシン：
Invivogen
- ・ 酢酸：和光純薬工業
- ・ ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)：
BIO RAD
- ・ 2-メルカプトエタノール(2-ME)：
和光純薬工業
- ・ N,N'-メチレンビスアクリルアミ
ド(BIS)：和光純薬工業
- ・ アクリルアミド：ナカライテスク
- ・ N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジ
アミン (TEMED)：BIO RAD
- ・ グリシン：SIGMA
- ・ トリスヒドロキシメチルアミノメ
タン(Tris)：SIGMA
- ・ メタノール：ナカライテスク
- ・ Sypro Ruby Blot Stain：Life
Technologies
- ・ Precision Plus Protein Dual Color
Standards(分子量マーカー)：BIO
RAD
- ・ スキムミルク：雪印
- ・ TritonX-100：ナカライテスク
- ・ Bovine Serum Albumin (BSA)：
SIGMA
- ・ Anti-Rabbit IgG HRP：MBL