

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患実用化研究事業）
分担研究報告書

脂肪細胞トリグリセリドリパーゼ(Adipose triglyceride lipase: ATGL)活性測定系の
開発のための ATGL 活性抑制抗体の作成

研究分担者 高木敦子 国立循環器病研究センター研究所 分子薬理部 室長

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症 (triglyceride deposit cardiomyovasculopathy: TGCV)の早期発見、早期治療を可能とするため、ATGL活性測定系を開発することを目的とする。細胞内の測定されたリパーゼ活性のうち、ATGLが寄与する部分を決定するためには、ATGL活性を抑制できる抗ヒトATGLポリクローナル抗体が必要である。単一バンドまで精製したCOS1細胞で発現させたHis6-ATGLを抗原とし、ウサギに免疫することで、ATGL活性を抑制する抗体を作成することに成功した。

A. 研究目的

ATGL 活性測定系を開発し、臨床検体に応用することで、TGCV の早期発見、早期治療を可能とすることを最終目的とする。臨床検体を測定していく上で問題となるのは他のリパーゼの混在であり、測定されたリパーゼ活性のうち、ATGL が寄与する部分を決定するためには、ATGL 活性を抑制できる抗ヒト ATGL ポリクローナル抗体が必須である。ATGL 抗体を調製し、その存在下と非存在下で活性を比較する必要がある。そこで先ず、活性を保持した状態で、単一バンドまで精製した COS1 細胞で発現させた His6-ATGL を抗原とし、ウサギに免疫することで、ATGL 活性を抑制する抗体を作成することを、平成 26 年度の目的とする。

B. 研究方法

組換えヒト ATGL cDNA はヒト白血球から得て、His6 tag を N 末端にもつ pcDNA4/HisMax C ベクター (Invitrogen 社)にクローン化されたものを、小林邦久先生(福岡大学 筑紫病院 内分泌・糖尿病内科 教授)から譲渡いただいた。アフリカミドリザルの腎臓由来株化細胞である COS1 にエレクトロポレーション法あるいは Lipofectamine (Life Technologies) 試薬によりプラスミドを導入し、2 日間培養後、細胞を界面活性剤で可溶化した。これを出発材料として、HisTrap カラム(GE Healthcare)クロマト法にて His6-ATGL の精製を行った。リパーゼ活性は ^3H -トリオレインを含むトリオレイン/リン脂質粒子を基質として、ウシ血清アルブミン存在下で測定された。

(倫理面の配慮)

本研究は、一般化した株化動物細胞を利用するものであるため、臨床研究に関する倫理面の問題は無いと判断した。ウサギでのポリクローナル抗体作成に関しては、所属機関から動物実験の承認を得ている。組換え DNA 及び放射性同位体使用の実験の許可は得ている。

C. 研究結果

SDS-PAGE 電気泳動後の CBB 染色により His6-ATGL タンパクは ATGL 活性を保持したまま、単一バンドとして純化できた。

精製 His6-ATGL の pH 依存性を調べたところ、pH7 から pH 8.5 が ATGL の至適 pH 領域と考えられた。

精製 His6-ATGL を抗原とし、ウサギ 1 匹に、1 回につき約 100 μ g ずつ、免疫した。第 5 回目の免疫の 1 週間後、試採血を行い、ATGL 活性抑制を調べた。抗血清 20 μ L で、精製ヒト His6-ATGL 活性 (160 nmole/h/mL) を 80% 抑制できた。さらに、100%抑制をめざすため、第 6 回目の免疫を行なう予定である。

D. 考察

精製 His6-ATGL の pH 依存性から調べられた pH7 から pH 8.5 おけるリパーゼ活性が ATGL に由来するものであることが、推測される。しかし、この pH 域のすべてのリパーゼ活性が ATGL に由来するかどうかは不明である。それ故、ATGL 抗体の有りと無しで、リパーゼ活性を測定し、ATGL の寄与分を知る必要がある。今回、精製ヒト His6-ATGL 活性

(160 nmole/h/mL) を 80% 抑制できる抗体が作成できているが、測定精度をあげるためには、100%抑制をめざす必要があり、第 6 回目の免疫後の抗体価を期待したい。

E. 結論

TGCV の早期発見、早期治療を可能とするため、ATGL 活性測定系開発に必須の ATGL 活性(160 nmole/h/mL)を 80%抑制する抗体の作成に成功した。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Development of human adipose triglyceride lipase (ATGL) specific measurement system: production of rabbit anti-human ATGL antibody neutralizing ATGL activity. Atsuko Takagi, Yasuyuki Ikeda, Kuniyoshi Kobayashi, Ken-ichi Hirano The 3rd International Symposium on Triglyceride Deposit Cardiomyovascularopathy and Neutral Lipid Storage Disease (Tokyo, JAPAN : 2015.3.14)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし