

微量迅速測定系開発に関連する研究開発

担当責任者 佐藤 隆 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 主任研究員
 姆谷内 晶 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 主任研究員
 調 憲 九州大学大学院 医学研究院 消化器・総合外科学分野 准教授

研究要旨：肝硬変・肝細胞がんの血清バイオマーカーとして開発した *Wisteria floribunda* agglutinin (WFA)⁺-Colony Stimulation Factor Receptor-1 (CSF1R)の微量迅速測定 ELISA 系構築のための試薬開発を行った。本キットは血清中の CSF1R タンパク質上の糖鎖構造変化を検出するものであり、測定キットの精度管理のためには、アッセイキャリアプレートとなるリコンビナント糖タンパク質が必要である。WFA⁺-CSF1R の作製のために、CSF1R の糖鎖が付加している細胞外領域を発現ベクターにクローニングし、この遺伝子を WFA シグナル陽性の培養細胞で発現、精製した。作製した WFA⁺-CSF1R は市販の rCSF1R に比べて高い WFA 結合性を有し、現行の ELISA 系において、アッセイキャリアプレートとして使用可能であった。さらに、WFA⁺-CSF1R の大量生産のための安定発現系の構築も行った。

A. 研究目的

現在、血清マーカー(AFP、AFP-L3、PIVKA-II)を用いた血清診断による肝がんの正診率は 7-8 割に留まり、がんおよび前がん病変を検知するために高価な CT、MRI、超音波機器に変わる感度・特異度の高い血清バイオマーカーの開発が望まれている。申請者らは、肝疾患において特定の血清タンパク質上の糖鎖に生じる構造変化に着目し、肝線維化や肝硬変のバイオマーカーを開発することに成功してきた。

本課題では、先のプロジェクトにおいて肝硬変を含む肝疾患の血清糖タンパク質マーカーとして見出された WFA⁺-CSF1R の微量迅速測定キットの開発を行う。測定キットは、CSF1R タンパク質を検出するモノクローナル抗体、CSF1R 上の糖鎖変化を検出する WFA レクチン、アッセイのキャリアプレートとなる標準糖タン

パク質の 3 点から構成されが、現状の測定ではすべて市販試薬を用いている。本研究目的は、測定キットを構成するモノクローナル抗体とキャリアプレート糖タンパク質の自家製試薬を開発し、in house の測定キットを作成することである。本年度は、キャリアプレート糖タンパク質の生産系構築の検討を行った。

B. 研究方法

測定キットは抗体 - レクチン・サンドイッチ検出系であるため、糖タンパク質標準品には、抗体とレクチンのそれぞれに反応するエピトープが必要となる。WFA に結合する糖鎖を持つ糖タンパク質の発現は、すでに肝線維化マーカー WFA⁺-M2BP の発現において確立しており、今回もそれに倣い HEK293 細胞で CSF1R の細胞外領域のタンパク質発現・精製を行い、キャリ

プレーターとしての力価を評価した。

(倫理面への配慮)

本項目では現時点では患者由来の臨床検体を直接に取り扱ってはいないが、産業技術総合研究所においては、(班員らの臨床検体以外の)市販されているヒト由来試料・ヒト細胞株を用いる実験についても、ヒト由来試料上で使用している。本倫理委員会は、厚生労働省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」あるいは「臨床研究に関する倫理指針」に準ずるものとして運営されているものである。

また、組換え DNA 実験、動物実験(「動物実験等の実施に関する基本指針」に準ずる)を行う場合にも、産業技術総合研究所ライフサイエンス実験に関する倫理及び安全管理規程に従い、関連する委員会の承認を得た上で実施する。

C. 研究結果

CSF1R タンパク質は 972 アミノ酸からなる膜タンパク質であり、1-19 アミノ酸がシグナル配列、20-517 アミノ酸が細胞外領域、518-538 アミノ酸が膜貫通領域、539-972 アミノ酸が細胞内領域である。細胞外領域には 11 箇所の N 結合型糖鎖付加のコンセンサス配列が存在し、これらのすべてあるいは一部に N 結合型糖鎖が結合していることが考えられる。これらの情報を基に、リコンビナント CSF1R(rCSF1R)は、自身のシグナル配列と細胞外領域である 1-489 アミノ酸、1-512 アミノ酸の領域を発現させることとした。それぞれの領域をコードする cDNA を pCRII-Blunt ベクターにサブクローニングした後、両端の EcoRI で切断した領域を発現ベクター pcDNA3.1neo(+)FLAG の FLAG-tag 配列前の EcoRI 部位に挿入し、pcDNA3.1-CSF1R-FLAG-1 (1-489) と pcDNA3.1-CSF1R-FLAG-2 (1-512)を構築した。これらのベクターから発現する rCSF1R は C 末

端に精製と検出のための FLAG tag 配列を持つことになる。

これらのプラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクションし、48 時間培養後の培養上清を 3 回繰り返し、合計およそ 30mL 回収し、これら上清から抗 FLAG 抗体カラムを用いて rCSF1R タンパク質を精製した。さらに、Amicon 10K を用いて、溶出に用いた FLAG peptide を除去し、タンパク質を濃縮して、rCSF1R-1 と rCSF1R-2 をおよそ 100 µg それぞれ精製した。これらの rCSF1R は SDS-PAGE 後の CBB 染色にて 75-100 KDa の大きさにスメアのバンドとして検出された。これらのうち、rCSF1R-1 を用いて、WFA+-CSF1R 濃度を現行の ELISA 系により測定した結果、rCSF1R-1/HEK293 は市販のリコンビナントタンパク質に比べて、7.76 倍 WFA との結結合値が高く、糖タンパク質標準品として使用可能なことが確認された。

続いて、rCSF1R を安定的に大量生産するため、安定発現培養細胞株の樹立と精製法の改良を行った。まず、精製のタグを FLAG tag からより汎用性の高い HIS tag に変更した。1-489 アミノ酸をコードする cDNA を発現ベクター pcDNA3.1neo(+)HIS の HIS tag 配列前の EcoRI 部位に挿入し、pcDNA3.1-CSF1R-HIS (1-489)を構築した。このベクターから発現する rCSF1R は C 末端に精製と検出のための HIS tag 配列を持つことになる。このプラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクションし、24 時間後に 1 mg/ml 濃度の G418 を添加して安定発現株を選択した。死細胞を除去しながら、3 週間 G418 添加培地で継代培養を継続し、安定発現株を樹立した。安定発現株は 10%FCS と抗生物質を含む DMEM 培地で培養され、3 日毎に培地を交換しながら 3 週間にわたって培養上清を回収した。この上清から抗 HIS 抗体カラムを用いて rCSF1R タンパク質を精製した。

D. 考察

WFA シグナル陽性であるヒト培養細胞株 HEK293 を宿主細胞に用いて、CSF1R の細胞外領域をリコンビナントタンパク質として発現させることで、WFA⁺-CSF1R ELISA 系のキャリアプレートとして使用可能な rCSF1R 発現・精製に成功した。この rCSF1R は市販のリコンビナント CSF1R に比べて 7.76 倍高い WFA 反応性を有したが、これは両者の糖鎖構造の違いに起因するものと考えられる。実際に、両者の糖鎖構造に関しても質量分析装置を用いて解析を進めており、反応性の違いに関わる糖鎖構造の違いも検出されつつある。WFA⁺-CSF1R の発現系に関しては、既に、安定発現株の取得も行っており、大量生産への道筋もできつつある。次年度は、WFA⁺-CSF1R 精製の簡便化を行うとともに、CSF1R タンパク質に対するモノクローナル抗体の取得を進め、in house の ELISA 系の構築を行い、少数の患者サンプルセットを用いてキットの有効性を確認する予定である。

E. 結論

HEK293 細胞を用いて rCSF1R の発現系を構築し、この rCSF1R が WFA⁺-CSF1R 測定系のキャリアプレートとして使用可能なことを確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 雄長 誠、榎谷内 晶. 肝疾患血清糖鎖バイオマーカーの開発 - グライコプロテオミクス技術の疾患糖鎖バイオマーカー開発への応用例 (Development of glycobiomarker for liver disease). 週刊 医学のあゆみ, 249巻8号, 661-665, 医歯薬出版(株).

2. 学会発表

- 1) 榎谷内晶、梶裕之、久野敦、久保田智己、雄長誠、曾我部万紀、池原謙、成松久：グライコプロテオミクス技術を基盤とした血清糖鎖バイオマーカー開発戦略、日本プロテオーム学会2014年会、1L-p グライコプロテオミクスとその応用 / Glycoproteomics and Applications、筑波、2014年7月
- 2) 雄長誠、榎谷内晶、梶裕之、久野敦、飯尾悦子、曾我部万紀、是永匡紹、後藤 雅式、田中靖人、池原謙、溝上雅史、成松久：グライコプロテオミクスを基盤とした肝硬変血清バイオマーカー “WFA(+)-CSF1R” の開発、日本プロテオーム学会2014年会、つくば、2014年7月
- 3) Togayachi A, Ocho M, Kaji H, Kuno A, Iio E, Sogabe M, Tanaka Y, Ikehara Y, Mizokami M, Narimatsu H. Glycoproteomic Discovery of Serological Biomarker for Hepatitis Virus Infection-associated Chronic Liver Disease. 2014 TASL-Japan Hepatitis B Workshop (Second). Taipei (Academia Sinica), 19-20 Apr. 2014.
- 4) 佐藤隆、館野浩章、梶裕之、千葉靖典、久保田智己、平林淳、成松久：ノダフジレクチンの遺伝子同定と糖鎖結合特異性解析、日本生化学会、京都、2014年10月
- 5) 佐藤隆、館野浩章、梶裕之、千葉靖典、久保田智己、平林淳、成松久：バイオマーカー検出プローブの開発～ノダフジレクチンの遺伝子同定と糖鎖結合特異性解析～、LS-BT、つくば、2015年2月

G. 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