

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業）
 プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班 分担研究報告書

ヒトプリオン病における H-FABP 髄液検査の標準化と B-FABP の動態

研究分担者：堀内浩幸 広島大学大学院生物圏科学研究科
 研究協力者：田中祐美 広島大学大学院生物圏科学研究科
 研究協力者：佐藤克也 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
 研究分担者：西田教行 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

研究要旨 ヒトプリオン病における H-FABP (FABP3) 髄液検査は、これまでの解析から従来法に比べ高感度ではあるが特異度が低いことが明らかとなった（平成 26 年度）。この特異度が低い理由は、H-FABP が脳組織以外にも心臓を中心に広く存在し、他の疾患でも検出されてしまうことにある。そこで本研究では、新たなプリオン病のマーカーとして脳組織に特異的に発現する B-FABP (FABP7) に着目し、B-FABP の動態の解析に有効な検出系の構築に取り組んだ。平成 27 年度に作製したヒト B-FABP 特異マウスモノクローナル抗体 (mAb, HUM2-9) に続き、ヒト B-FABP を認識するウサギポリクローナル抗体 (pAb) を作出した。作出した HUM2-9 をキャプチャー抗体に pAb を検出抗体にサンドイッチ ELISA の定量系を構築し、CJD 患者の髄液及び血清中の B-FABP の定量を試みたが、検出感度が低く、定量には至らなかった。そこで CJD 患者と健常者の脳抽出液を試料に、HUM2-9 を用いたウエスタンブロッティング (WB) 解析を行なったところ、CJD 患者の脳抽出液で B-FABP が増加していることがわかった。なお、本研究はプリオン病診療ガイドラインの策定・改訂に資するものである。

A. 研究目的

我国における CJD, なかでも医原性 CJD の発生頻度は世界で最も高く、その治療法の確立と CJD 診断法の充実が医療現場並びに医療行政から強く求められている。

CJD の髄液中のマーカーとして診断に利用されているものには、t-tau と 14-3-3 タンパク質があるが、CJD に経過に伴い t-tau は変動が大きいことや両タンパク質共に陰性である患者も存在する。そこで近年、CJD の髄液中の新たなマーカータンパク質として H-FABP (心臓型脂肪酸結合タンパク質) が注目されている。

本研究グループでは、これまでに H-FABP の高感度検出系を作出し、CJD の髄液中の H-FABP を測定することで、t-tau ネガティブ、14-3-3 ネガティブのプリオン病患者も CJD と診断できることを報告してきた。平成 26 年度には、H-FABP 髄液検査の感度と特異度を他の検出方法と比較することで明確化したところ、H-FABP のプリオン病の診断において、感度は最も高い (94%) が判明した。しかし、H-FABP はいろいろ

な組織にユビキタスに発現するタンパク質であり、他の疾患 (例えば心筋梗塞) でも検出されてしまい、特異度は最も低い 72%であった。

そこで本研究では、同じ FABP ファミリーであり、その発現が主に脳に限局している B-FABP に着目し、B-FABP の検出系の構築と CJD における B-FABP の動態を明らかにし、B-FABP のマーカーとしての有用性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. 抗 B-FABP ウサギ pAb の作製

試料中の B-FABP を定量するために、抗 B-FABP ウサギ pAb を作製した。抗原は、リコンビナントヒト B-FABP (rB-FABP) を使用し、ウサギに高度に免疫後、抗血清を得た。得られた抗血清は、rB-FABP をカップリングしたアフィニティークロマトグラフィー法に供試し、抗 B-FABP ウサギ pAb を精製した。得られた B-FABP ウサギ pAb は、ELISA 及び WB 法を用いてヒト B-FABP に対する特異性を確認した。

2. 定量サンドイッチ ELISA の構築

得られた抗 B-FABP ウサギ pAb と HUM2-7 の 2 種の抗体を用いて、定量サンドイッチ ELISA の構築を行なった。キャプチャー抗体には、ウサギ pAb かもしくは HUM2-7 の使用し、検出抗体には、キャプチャー抗体とは異なる抗体を組合わせて行なった。規定量の rB-FABP をもとに、検量線を作成し、B-FABP の検出濃度を確定させ、その後 CJD 患者を含む各種脳疾患患者 [アルツハイマー病 (AD), 皮質基底核変性症 (CBD), 痙攣疾患 (convulsion)] の脳脊髄液 (CSF) と血清中の B-FABP 濃度を測定した。

3. 脳抽出液を用いた WB 解析

脳中の B-FABP を検出するために、CJD 患者及び健常者の脳抽出液を試料に WB 解析を行なった。検出抗体には、HUM2-3 を使用し、SDS-PAGE の試料には、1% (v/w) の濃度になるように脳抽出液を準備した。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験に関しては、カルタヘナ法のもと、広島大学が定める組換え DNA 実験安全管理規則に従い、研究計画書を提出し、機関承認実験として広島大学長から承認を得て実施した (承認番号: 26-212)。

動物使用実験に関しては、広島大学動物実験実施規則に従い研究計画を提出し、広島大学長からの承認 (承認番号: C15-4) を受け、この規則に従い研究を実施した。

ヒトプリオン病や他の脳脊髄液及び血清の使用は、研究協力者が所属する長崎大学で実施し、実験に当たっては、長崎大学倫理委員会の規定に従った。

研究倫理教育は、平成 27 年 12 月 21 日 (月) に広島大学において開催された理工農系の研究者を対象とした研究倫理教育 FD を受講するとともに、CITI JAPAN の基本コース B を e-learning により受講し、平成 28 年 10 月 29 日に全てのカリキュラムを修了した。

C. 研究結果

1. 抗B-FABPウサギpAbの作製

抗B-FABPウサギpAbは、rB-FABPを高度に免疫したウサギ血清から精製した。精製した抗B-

FABP ウサギ pAb は、rB-FABP を抗原とした ELISA 及び WB 法により、ヒト B-FABP と反応することを確認した (結果は示していない)。

2. 定量サンドイッチ ELISA の構築

サンドイッチ ELISA では、まず特異性と検出感度を考慮し、キャプチャー抗体にウサギ pAb を検出抗体に HUM2-7 (間接法) もしくは HRP 標識 HUM2-7 (直接法) を使用した。抗原には、規定量の rB-FABP を用いて検量線の作成を試みたが、全ての反応系での値がバックグラウンドの値と同じになり、検量線を作成することができなかった (図 1)。この結果は、ウサギ pAb を ELISA 用 plate に固相化することで、pAb が B-FABP と反応できなくなったか、もしくは pAb が HUM2-7 のエピトープを阻害しているかのどちらかが原因であると推察された。そこでまず、検出抗体に市販の抗 B-FABP 抗体を用いてサンドイッチ ELISA を実施したとこと、低感度ではあるが、検量線を作成することが可能 (図 2) であり、固相化した pAb が機能する事がわかった。そこで次に、競合阻害試験により pAb が HUM2-7 のエピトープを阻害しているかを調べたところ、競合阻害は認められなかった (結果は示していない)。以上の結果から、HUM2-7 のエピトープは、固相化した pAb に B-FABP が結合することで立体的に隠覆されるのではないかと考えられた。

そこで次に、キャプチャー抗体に HUM2-7 を検出抗体にウサギ pAb を使用したサンドイッチ ELISA を実施した。その結果、図 3 に示したように、31-2,000 ng/mL の範囲 ($R^2=0.99399$) で B-FABP が検出できることがわかった。そこで、CJD 患者を含む各種脳疾患患者の CSF と血清を、このサンドイッチ ELISA に供試したが全て陰性対象のバックグラウンドの値と同じになり、試料中の B-FABP の検出には至らなかった。

3. 脳抽出液を用いた WB 解析

CJD 患者及び健常者の脳抽出液を用いた WB 解析では、HUM2-7 により、CJD 患者の脳抽出液から健常者よりも多くの B-FABP が検出された (図 4)。

D. 考察

現在、CJD の髄液における検査系は、14-3-3 タンパク質、t-tau 及び RT-QUIC 法により、国際的な標準化が行なわれようとしているが、いずれの手法も陰性を示す CJD 試料が存在する。本研究グループが行なった H-FABP の検出系を利用すれば、CJD 検出の感度が 90%以上であり、また RT-QUIC 法の特異度は 90%以上であることから、H-FABP の検出と RT-QUIC 法の組み合わせが CJD の検出に最も適していると考えられた。しかし、この組み合わせにおいても検出できない CJD の髄液試料は存在しており、さらに高感度かつ高特異度をもつバイオマーカーの発見は、CJD の診断に重要である。そこで本研究グループでは、H-FABP と同じファミリータンパク質であり、主に脳組織で特異的に発現する B-FABP に着目した。

平成 28 年度は、新たに抗 B-FABP ウサギ pAb を作出し、抗 B-FABP マウス mAb (HUM2-7) と組み合わせ高感度で定量可能なサンドイッチ ELISA の構築を試みた。当初予定していた抗体の組み合わせ(キャプチャーを pAb, 検出を mAb)では、B-FABP の定量ができなかったが、抗体を入れ替えることで、31-2,000 ng/mL の範囲で B-FABP の定量が可能であった。しかしながら、この検出系では CSF や血清中の B-FABP を検出することができなかった。もちろん、CJD 患者の CSF や血清中に B-FABP が存在しないことも考えられるが、先に本研究グループで構築した H-FABP の検出系では、10 ng/mL 以下の H-FABP が検出可能であり、健常者と CJD 患者間では 1-10 ng/mL の範囲で H-FABP の濃度が変化する。これらの点を踏まえると、本研究で構築した B-FABP の検出系は低感度であり、B-FABP 検出系の高感度化が課題である。一方、作出した HUM2-7 のモノクローナル抗体は、天然型の B-FABP を認識できないのではないかと共同研究者から指摘を受けた。この点は、HEK293 細胞に天然型 B-FABP を発現させて、免疫染色により解析した結果、HUM2-7 が天然型の B-FABP を認識することを確認した(結果は示していない)。

脳抽出液を用いた WB 解析では、CJD 患者の脳で健常者よりも多くの B-FABP が検出された。各種脳疾患で損傷を受けた脳では、グリア細胞が増加することが知られているが、B-FABP は

グリア細胞に局在している。CJD 患者の脳抽出液中に B-FABP が多く検出されたことは、グリア細胞の増加に関連しているものと考えられる。

本研究では、B-FABP の高感度検出系の構築にまでは至らなかったが、HUM2-7 はこれまでにない高特異性の高い抗体であり、今後、本抗体を活用した検出系の改善や脳組織における B-FABP の局在解析を行なうことで、プリオン病と B-FABP の関連が明らかになるものと考えられる。

E. 結論

本研究では、B-FABP に特異的な抗体である HUM2-7 を用いて、B-FABP の高感度検出系の構築を試みたが、最終的に CSF や血清の試料中の B-FABP を定量するには不十分であることがわかった。また、脳抽出液の解析から、CJD 患者の脳抽出液から健常者よりも多くの B-FABP が含まれることが明らかとなった。今後は、検出系の高感度化と脳組織の解析が必要であることがわかった。

[参考文献]

- 1) Liu RZ, Denovan-Wright EM, Wright JM. Structure, mRNA expression and linkage mapping of the brain-type fatty acid-binding protein gene (FABP7) from zebrafish (*Danio rerio*). *Eur J Biochem* 274:715-725, 2013.
- 2) Matsumata M, Sakayori N, Maekawa M, Owada Y, Yoshikawa T, Osumi N. The effects of Fabp7 and Fabp5 on postnatal hippocampal neurogenesis in the mouse. *Stem Cells* 30:1532-1543, 2012.
- 3) Sharifi K, Morihiro Y, Maekawa M, Yasumoto Y, Hoshi H, Adachi Y, Sawada T, Tokuda N, Kondo H, Yoshikawa T, Suzuki M, Owada Y. FABP7 expression in normal and stab-injured brain cortex and its role in astrocyte proliferation. *Histochem Cell Biol* 136:501-513, 2011.
- 4) 北村忠久. 脳病変におけるグリア細胞の反応, 電子顕微鏡 28(1):43-48.

F. 健康危険情報

なし

断におけるバイオマーカーに関する研究. 第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜, 11.30, 2016.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

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. 学会発表

1) Tanaka Y, Ezaki R, Furusawa S, Nishida N, Matsuda H, Satoh K, Horiuchi H. Establishment of high-sensitivity detection method of FABP3 in cerebrospinal fluid of CJD patients. PRION 2016, Tokyo, May 13, 2016.

2. 実用新案登録

なし

2) 田中祐美, 江崎 僚, 古澤修一, 西田教行, 松田治男, 佐藤克也, 堀内浩幸. プリオン病診

3. その他

なし

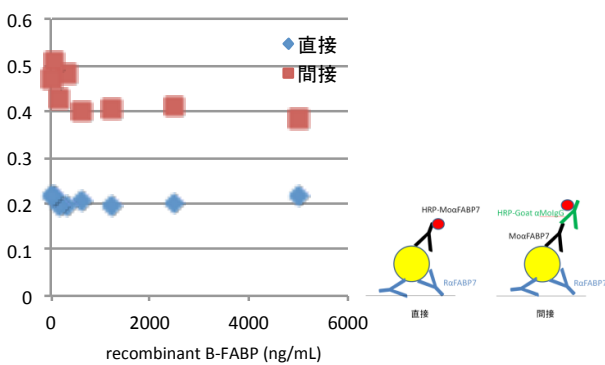


図1 HUM2-7を用いたB-FABPの定量

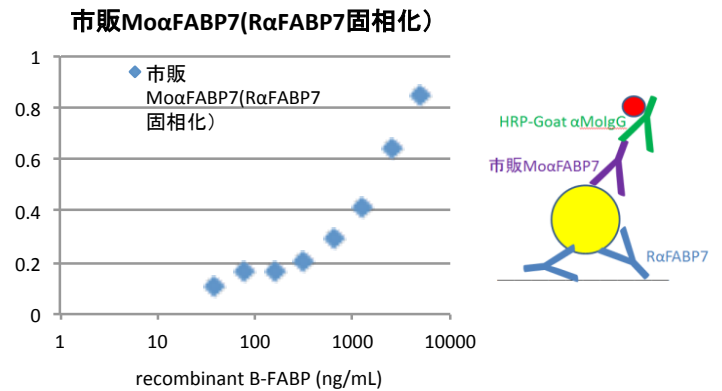


図2 市販抗体を用いたB-FABPの定量

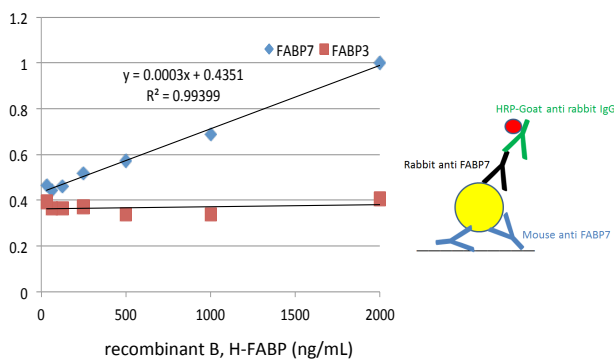


図3 構築したB-FABPの定量検量線

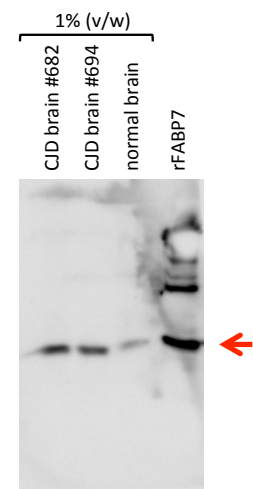


図4 脳抽出液中のB-FABP