

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 本研究では、ヒトプリオン病における H-FABP (FABP3) 髄液検査の標準化と新たなバイオマーカーとして B-FABP (FABP7) に着目し、H-FABP の感度と特異度を明確にし、B-FABP の動態を解析することを目的とした。その結果、H-FABP の髄液検査での感度は、t-tau や 14-3-3 タンパク質の検出及び RT-QUIC と比較して最も高いことがわかった。しかし、その特異度は他の 3 の検出系の中で最低であった。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、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 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 年度には、ヒト B-FABP 特異的マウスモノクローナル抗体 (mAb, HUM2-9) を作製し、平成 28 年度には、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、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。

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おり、H-FABP 髄液検査の標準化が求められていた。また脳に特異

的に発現する B-FABP の神経疾患における動態は不明であり、CJD の新たなマーカーとしても期待されている。

そこで本研究では、H-FABP 髄液検査の標準化を目指すことを目的に、髄液検査における H-FABP の感度・特異度を測定し、他の検出法との比較を行なった。また B-FABP の動態を検査することを目的に B-FABP に対するモノクローナル抗体 (mAb) の作出を行い、B-FABP の高感度検出系の構築に取り組んだ。

B. 研究方法

1. ヒトプリオン病における H-FABP 髄液検査

プリオン病 100 症例と非プリオン病 100 症例を対象に、髄液中の H-FABP、t-tau 及び 14-3-3 を ELISA 法により定量した。また同時に、RT-QUIC 法にも供試し、それぞれの検出結果をもとに髄液検査における感度と特異度を比較した。

2. 抗 B-FABP 市販抗体の評価

B-FABP の検出に利用可能な抗体が既にいくつか市販されている。マウス mAb は、クローンナンバー AT1D1 由来のものが複数社から市販されている。またウサギ mAb は、EPR4000 由来として GeneTex 社から販売されている。そこで、この 2 種の mAb の反応性をリコンビナント B-FABP (rB-FABP) と rH-FABP をもちいてウエスタンブロッティング (WB) 法と ELISA で評価した。

3. 新規抗 B-FABP mAb の作出試験

rB-FABP をマウスに免疫し、十分な抗体価の上昇が確認されたマウス脾細胞を用いて、細胞融合法により mAb 産生ハイブリドーマの作出試験を行なった。作出したハイブリドーマは、ELISA によるスクリーニング並びに限界希釈法によるクローニングを行ない、WB 法により特異性の解析を行なった。

4. 定量サンドイッチ ELISA の構築

新たに作出した抗 B-FABP ウサギポリクローナル抗体 (pAb) とマウス mAb 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 かもしくはマウス mAb 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。

5. 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、作出した mAb 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. ヒトプリオン病における H-FABP 髄液検査

H-FABP の髄液検査における感度は、孤発性プリオン病で 98.75%、遺伝性プリオン病 (V180I) で 78.9%、獲得性プリオン病で 100%、計 94% となり、14-3-3、t-tau、RT-QUIC 法と比較して、いずれも最も高い感度を示した (表 1)。一方、特異度では、RT-QUIC 法が 100% と最も高く、H-FABP は 72% と最も低い結果となった (図 1)。H-FABP の特異度が低い理由は、症候性てんかんで擬陽性を多く検出したためであった (結果は示していない)。

2. 抗 B-FABP 市販抗体の評価

市販抗体 2 種を WB 法並びに ELISA 法により評価を行なった。その結果、B-FABP に対するマウス mAb は、H-FABP と交差反応することがわかった (図 2)。またウサギ mAb は B-FABP を WB 法により特異的に検出するものの検出感度が低いことがわかった (図 2)。ELISA 法では、マウス mAb が B-FABP と十分な反応性を示すものの H-FABP と交差すること、またウサギ mAb は、ELISA に供試できないこともわかった (結果は示していない)。

3. 新規抗 B-FABP mAb の作出

細胞融合法による B-FABP 特異的マウス mAb 産生ハイブリドーマの作出試験を行なった。そ

の結果、ヒト B-FABP 特異的なマウス mAb (HUM2-7) の作出に成功した。また HUM2-7 は、ELISA 及び WB 法による解析から、市販抗体よりも高い反応性を示すことがわかった (図 3)。HUM2-7 のサブクラスは、IgG1 であり、L 鎖はκ鎖であった。

4. 定量サンドイッチ ELISA の構築

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 4 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 (結果は示していない)。

5. 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 5)。

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

H-FABP のプリオン病における髄液検査の感度・特異度を調査し、感度は既存の検出系の中で最も高く (94%)、特異度は最も低かった (72%)。B-FABP の検出系において、市販の抗体は、交差反応性、検出感度、検出手法への適合性の面で利用できないことがわかった。新規

に作出した HUM2-7 は、B-FABP に特異的であり、市販抗体よりも高感度かつ ELISA の検出系にも利用可能であることがわかった。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。

[参考文献]

- 1) Satoh K, Shirabe S, Eguchi H, Tsujino A, Motomura M, Satoh A, Tsujihata M, Eguchi K. Chronological changes in MRI and CSF biochemical markers in Creutzfeldt-Jakob disease patients. *Dement Geriatr Cogn Disord* 23:372-381, 2007.
- 2) Steinacker P, Mollenhauer B, Bibl M, Cepek L, Esselmann H, Brechlin P, Lewczuk P, Poser S, Kretschmar H a, Wiltfang J, Trenkwalder C, Otto M. Heart fatty acid binding protein as a potential diagnostic marker for neuro- degenerative diseases. *Neurosci Lett* 370:36-39, 2004.
- 3) 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, 2003.
- 4) Sharifi K, Morihito 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.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) Tanaka Y, Ezaki R, Frusawa S, Nishida N, Matsuda H, Satoh K, Horiuchi H. Establishment of high-sensitivity detection method of FABP3 in cerebrospinal fluid of CJD patients. PRION2016, Tokyo, May 10-13, 2016.
- 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.

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

表1 各種プリオン病検出系の感度

	14-3-3蛋白	総タウ蛋白	RT-QUIC法	H-FABP
孤発性プリオン病	90 % (72/80)	88.75 % (71/80)	75 % (60/80)	98.75 % (79/80)
遺伝性プリオン病 (V180I)	63 % (12/19)	68 % (13/19)	74% (14/19)	78.9 % (15/19)
獲得性プリオン病	100 % (1/1)	100 % (1/1)	0 % (0/1)	100 % (1/1)
総計	85 % (85/100)	89 % (85/100)	74 % (74/100)	94 % (94/100)

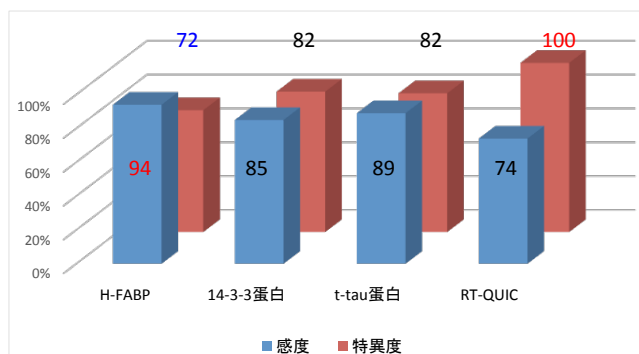


図1 各種プリオン病検出系の感度と特異度

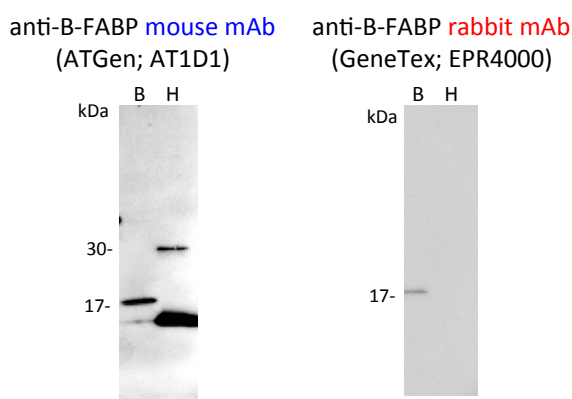


図2 B-FABPに対する市販抗体の反応性
B: rB-FABP H: rH-FABP

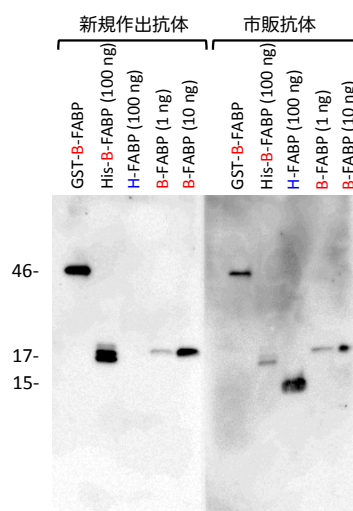


図3 新規作出抗体(HUM2-7)と市販抗体の特異性解析

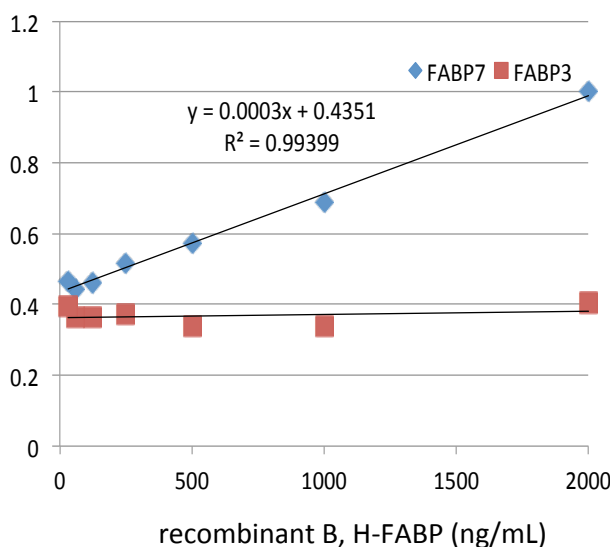


図4 サンドイッチELISAによるB-FABPの検量線

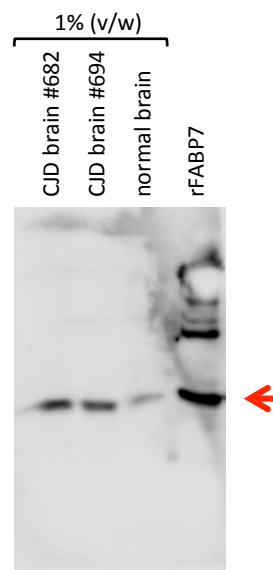


図5 脳抽出液中のB-FABP