

超高感度CRP測定試薬の開発とその臨床的意義

神野 英毅 (応用分子化学科)、小川 真広 (日大・医)
 天木 秀一 (日大・医)、荒川 泰行 (日大・医)

1.はじめに

現在臨床検査は広く日常的に行われており、中でも Latex 凝集反応をはじめとする免疫アッセイの占める割合は日毎に増加している。臨床検査の特性上、測定系には簡便さと共に迅速性が望まれる。しかしこれらの前提として、測定 of 正確性、精密性が必須であり、この精度を重視した技術が最も求められている。

遺伝子組換え技術はバイオテクノロジーの発展の一翼を担っており、臨床検査においても注目されている新規技術である。遺伝子情報をベースとした新たな測定項目の発見や、タンパク質発現過程での情報および疾病発生機構など、臨床検査の要となる診断薬への応用が期待されている。本年度は、遺伝子組換えを利用した抗原の Epitope 解析を行い CRP 測定試薬の更なる高感度・特異性を求めた研究を行ったので報告する。

C 反応性タンパク質 (CRP) は通常ヒト血清中でも微量 (正常値: 0.3~0.5 mg/dl) に存在し、炎症性疾患や組織の変性・壊死が生じると血中濃度が早期に上昇し、病状の回復に伴い速やかに減少する代表的な急性期タンパク質の一つである。

CRP 測定は心筋梗塞、慢性関節リウマチなど様々な病気の炎症マーカー、リスクファクターとして利用されてきた。さらに近年では高感度 CRP が以前より明確な診断や予知ができると注目されており、CRP 高感度測定値が糖尿病、喫煙、加齢、肥満(メタボリックシンドローム)でも上昇することがわかってきた。こうした背景から、新規の臨床的意義を研究するためには測定 of さらなる高感度化、高精度化が必要となっている。

本研究では、CRP 測定試薬の高精度化、具体的には試薬の特異性を向上させるために CRP の Epitope に注目した。Epitope は通常 5~10 残基程度の領域であるが、抗体が直接結合する部

位であるため、Epitope を利用することで今まで漠然としていた試薬の反応部位を明確にできる。また試薬の特異性の向上も期待できる。

2.実験方法

【PCR(Polymerase chain reaction)】

はじめに、ヒト血液中の白血球成分から DNA の抽出を行った。全血に 3 倍量の EDTA 溶液を加え、ガラス繊維マトリックス(GFX)固定カラムに添加し、遠心分離(13200rpm,30sec)を行った。Tris-EDTA 緩衝液で洗浄後、70°C に加熱した TE Buffer でゲノム DNA を抽出した。

次に、CRP の遺伝子配列を検索し、CRP を構成する 5 つの subunit のうち 1 つを部位特異的に増幅するため、7 種類の primer (MKF-01, MKF-02, MKF-03, MKF-04, MKF-05, MKF-06, MKR-01) を設計した (Table 1)。抽出したゲノム DNA を鋳型とし、設計した primer を用いて PCR を行った。得られた 6 種類の PCR 増幅産物 (Fig. 1) をクリスタルバイオレットゲルを用いて精製を行った。

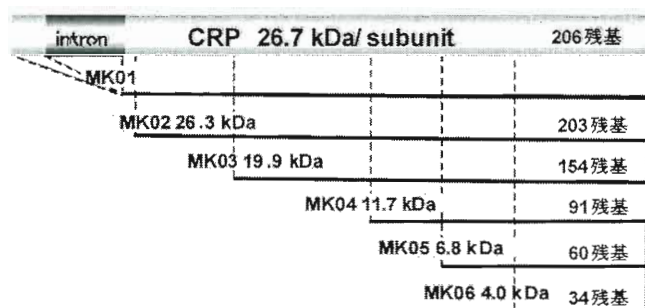


Fig. 1 Human CRP and recombinant CRP

【E. coli (TOP10) の形質転換】

宿主細胞に大腸菌(E. coli)を用いた遺伝子組換えを行った。CRP 遺伝子断片を pET-100/D-TOPO vector [Invitrogen] にそれぞれサブク

ローニングし、氷上で TOP10 cell と混合した。ヒートショックにより組換え plasmid を TOP10 cell に導入し、Ampicillin 入り LB Plate に展開後 15h 培養した(37°C)。

【コロニーPCR】

組換え Plasmid が導入されている cell のみを選択するため、コロニーを鋳型とした PCR を行った。また、plasmid の DNA 挿入部位に目的 DNA 配列が導入されているかを確認するため、plasmid の T7 promoter に相補的な primer を用いた PCR を合わせて行った。

PCR で陽性反応を示したコロニーのみを Ampicillin 入り LB 培地に継代し、15h 攪拌培養した(200rpm,37°C)。培養液から組換え plasmid を抽出した。

【*E. coli* (BL21) の形質転換】

抽出した plasmid からタンパク質を発現させるため、*E. coli* (BL21) の形質転換を行った。氷上で BL21 cell と plasmid を混合し、ヒートショックにより BL21 cell に plasmid を導入した。Ampicillin 入り LB 培地に全ての形質転換物に加え、15 h 攪拌培養した (200 rpm,37°C)。

【IPTG による発現の誘導】

IPTG は β -ラクトースと構造がよく似ており、*E. coli* のラクトース(lac)オペロンの転写制御に大きく関わる物質である。ラクトースと異なり β -ガラクトシダーゼで分解されないため、持続的にタンパク質の発現が増大する。

15 h 培養した培養液を新たな LB 培地に継代し、600 nm における吸光度が 0.5 になった時点で培養液を 2 つに分けた。一方の培養液にのみ IPTG を終濃度 1.0mM になるように加え、それぞれ 1 時間おきに培養液を採取した(0~5 h)。採取した培養液は遠心分離(16,000×g,1 min)を行い、得られたペレットを凍結した。

【発現の検出】

IPTG 誘導実験で採取したペレットを Lysis Buffer に溶解し、液体窒素を用いて凍結融解を繰り返した。遠心分離 (16,000×g,10 min) を行い、得られたペレットと上清を SDS-PAGE 電気泳動により確認した。

【Epitope 解析】

Lysis Buffer に溶解したペレットを各種 Immunoassay 法(ELISA, Western Blot, Latex 凝集反応)による検出および定量を行った。各種

Table 1 Primer for recombinant CRP

Primer	Sequence(5'-3')	Tm(°C)	Length(bp)
MKF-01	CACCCAGACAGACATGTCGAGGAAGGTT	75.0	618
MKF-02	CACCATGTCGAGGAAGGCTTTTG	70.5	612
MKF-03	CACCTCGTATGCCACCAAGAGACA	71.1	465
MKF-04	CACCAGGGTGAGGAAGAGTCTGAAG	70.1	276
MKF-05	CACCGAAGGAAGCCAGTCCCT	70.6	183
MKF-06	CACCACCATCTATCTTGGCGGG	71.3	105
MKR-01	AAACCCAGCTGTGGCCCTGA	73.9	—

Immunoassay 法には、作製した4種類の抗 CRP モノクローナル抗 (MoAb) (No.4, 5, 7, 8) を使用し、各抗体の Epitope を解析した。

【Latex 凝集反応による臨床的意義の検討】

1%カルボキシル基修飾 Latex 懸濁液に WSC (Water soluble Carbodiimide) 溶液と NHS (N-Hydroxysuccinimide) 溶液を順に加えて懸濁し、Latex 表面のカルボキシル基を活性化させた。4種類の抗 CRP MoAb をそれぞれ加え、抗体を結合させた。さらに変性 BSA を加え、Latex 表面上の抗体未結合部位をブロッキングした。Tris-HCl Buffer に懸濁し未反応の活性化カルボキシル基を加水分解した。再び Tris-HCl Buffer に懸濁し、抗 CRP MoAb 感作 Latex 試薬とした。

作製した抗 CRP MoAb 感作 Latex 試薬で検量線を作成した。この検量線を基に各試薬で肝疾患検体、II型糖尿病検体の測定を行った。この測定値を抗 CRP ポリクローナル抗体(PoAb)感作 Latex 試薬、抗 CRP PoAb F(ab')₂ 抗体感作 Latex 試薬の測定値と比較検討を行った。

3.結果および考察

【ゲノム DNA の精製】

全血から抽出した DNA の吸光度は 260nm の時 0.13, 280nm の時 0.08, よって OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1.63 であった。一般に純粋な核酸の DNA は OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1.8~2.0 であるとされるので、多少他のタンパク質が混入してしまったと考えられる。しかしながら、抽出した DNA をアガロース電気泳動で確認した所、複数のバンドは検出されなかったので鋳型として使用するには問題ないと判断した。また、一般的な DNA 1 μ g/ml は OD₂₆₀ = 0.02 なので、今回抽出した DNA 濃度は 6.5 μ g/ml であることがわかった。

【PCR】

抽出した DNA を鋳型とし、設計した 6 組の primer を用いて PCR を行った結果、いずれも目的部位の増幅に成功した(Fig. 2)。陽性率の高いコロニーを選択するためのコロニー PCR と plasmid の T7 promoter 領域と相補的な T7 primer を用いた PCR の結果、各々目的の増幅位置にバンドが確認できた。さらに、確認のために遺伝子解析システム CEQ8800 を用いた plasmid の DNA sequence の解析(Fig. 4)を行った。DNA sequence においても確認ができたため、6 種類の組換え plasmid の作製に成功したと言える。

【SDS-PAGE】

IPTG 誘導実験後の発現タンパク質を SDS-PAGE で検出した結果、6 種類全ての発現タンパク質において目的位置にバンドを検出することができた。これにより、全ての遺伝子組換えに成功したと言える。

【Epitope 解析】

Western Blot, ELISA による発現タンパク質の検出結果を Table 1 に示す。この 2 つの結果より、MoAb No. 4, 7, 8 の Epitope はいずれも CRP の MK06 領域(173~206 残基)に存在することが分った。MoAb No. 5 は MK06 領域と反応を示さなかったことから、Epitope は他の 3 種類とは異なり、CRP の 147~172 残基に存在することが分かった(Table 2)。

【Latex 凝集反応】

抗原決定基が Fig. 4 の A の部位であるモノクローナル抗体 (MoAb) No. 5 と B の部位である MoAb No. 7, No. 8 を用いて 3 種類のラテックス試薬を作製し、その反応性を Fig. 6 に示した。最も良好な反応性を示した抗体は MoAb No. 5

であり、MoAb No. 8 は、MoAb No. 5 の約 1/6 の反応性であった。

さらに、これらの 3 種の抗体を 2 種類ずつ混合し、ラテックス試薬を作製した。その反応性を Fig. 7 に示した。抗原決定基の異なる抗体を混合した場合 (No. 5 と No. 7 または No. 5 と No. 8)、最も反応性の良好だった MoAb No. 5 のみの場合と比較し、反応性はやや低下してしましたが、No. 7 や No. 8 のみ

で作製したラテックス試薬より、2 倍以上に反応性が高くなった。また、抗原決定基が同じと分析されている No. 7 と No. 8 のカクテル抗体の試薬においては、それぞれを単独で用いた反応性よりも 2 倍以上の感度の上昇が見られた。

これらの結果より、抗体の力価の低いモノクローナル抗体であっても、それらを組み合わせることにより、感度の向上が期待できることが

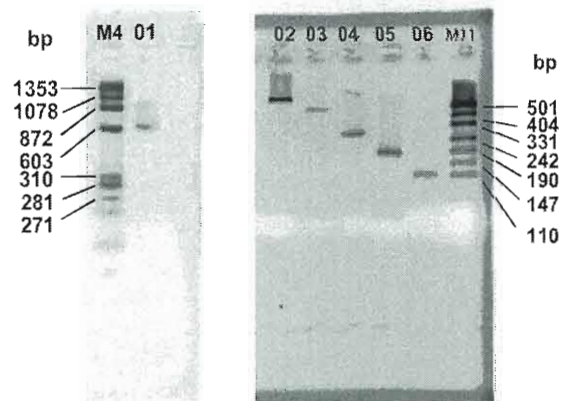


Fig. 2 Result of PCR Maker4&Maker11 [Wako]

01 : MK01 618bp, 02 : MK02 612bp, 03 : MK03 465bp, 04 : MK04 276bp, 05 : MK05 183bp, 06 : MK06 105bp

Table 2 Result of Western Blot and ELISA with Cell line anti CRP IgG monoclonal antibodies

Mo Ab	Isotype	Reactivitu with Recombinant CRP					
		Western Blot					
		MK 01	MK 02	MK 03	MK 04	MK 05	MK 06
No. 4	IgG2ak	+	+	+	+	+	+
No. 5	IgG1k	+	+	+	+	+	-
No. 7	IgG1k	+	+	+	+	+	+
No. 8	IgG1k	+	+	+	+	+	+

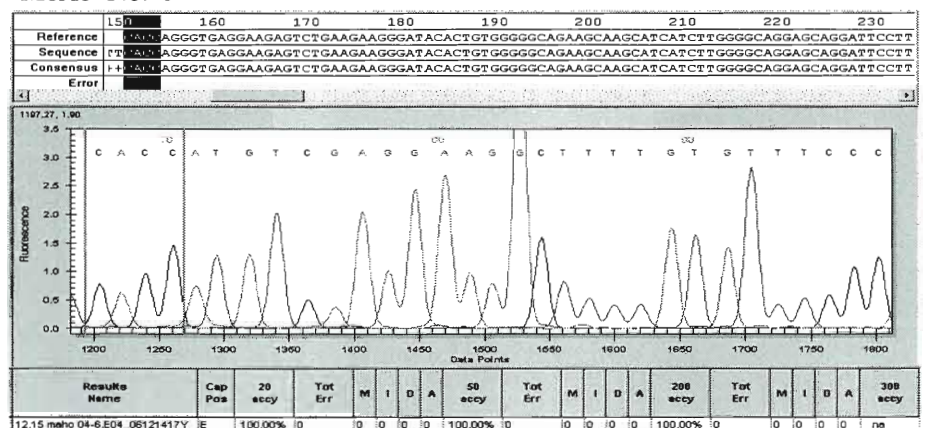


Fig. 3 Sequence of recombinant plasmid by CEQ8800

わかった。また、その組み合わせは、抗原決定基の距離が異なっているほど有効であると示唆される。

【臨床検体測定における抗体特性の検討】

肝疾患検体とⅡ型糖尿病検体の2種類の臨床検体中のCRP濃度を測定した。測定値は、市販測定キットでのCRP値との比較を行った。比較した試薬は、PoAb、PoAb F(ab')₂、MoAbを用いて作成した試薬を使用した。肝疾患検体を測定した結果、MoAb試薬の測定値はいずれも市販試薬との相関性が見られなかったが、PoAb F(ab')₂試薬と1:1の相関性が見られた。また、MoAb試薬においても良好な相関性が確認できた。Ⅱ型糖尿病検体においても同様の結果が得られた。現在広く行われている検体測定において、試薬の非特異的反応を防ぐためにPoAb F(ab')₂試薬を使用するのが主流となっている。しかし、臨床検体を用いた測定でMoAb試薬においても非特異性が確認されず、PoAb F(ab')₂試薬と同様の結果が得られることが確認できた。さらに、今後MoAbのFc部位を処理することで、試薬の特異性の向上が期待出来ると言える。

【結論】

1. Epitopeを分析することにより、より反応性のあるLatex試薬の作製が可能となる。
2. Epitopeの異なるモノクロナール抗体をカクテルすることにより、反応性の向上が示唆された。

【今後の検討】

さらに詳細なEpitopeの解析と超遠心分離解析装置を利用した抗原抗体複合体分子量の測定を行い、反応性とEpitopeの距離の関係の考察し、高感度かつ特異的なLatex試薬の作製を試みる。

【参考文献】

- 1) Ke-Jian Lei, Teresa Liu : Genomic DNA sequence for human C-reactive protein, *Biochem.J.*, 206-24 (1985), 13377-13383
- 2) Toshio Tanaka, Takekazu Horio: Secretory production of recombinant human C-reactive protein in *Escherichia coli* capable of binding with phosphorylcholine and its characterization, *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 295(2002), 163-166
- 3) Ranhy Bang, Lorraine Marnell: Analysis of binding sites in human C-reactive protein for FcR I, FcR II A,

Clq by site-directed mutagenesis, *J. Biolog. Chem* 280-26(2005)25095-25102

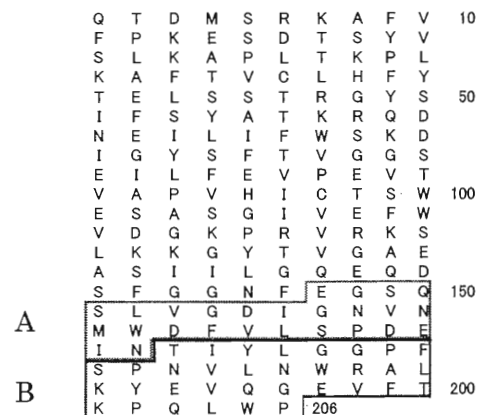
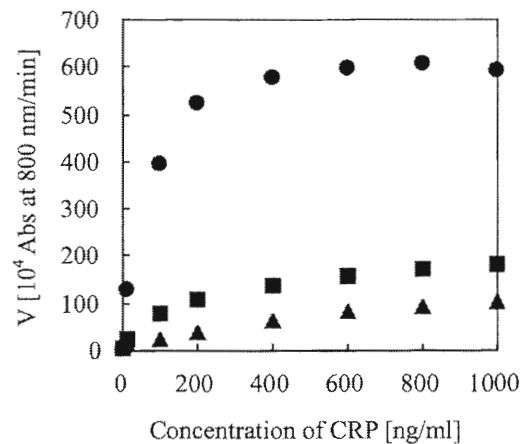
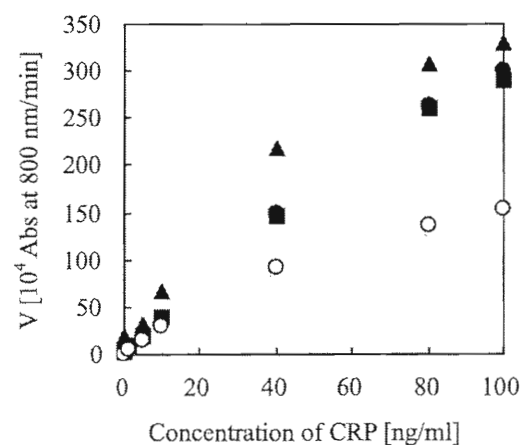


Fig. 4 Amino acid sequence of CRP and epitope of monoclonal antibody No. 5 (A), No. 7 (B) and No. 8 (B).



● MoAb No. 5 ▲ MoAb No. 7 ■ MoAb No. 8

Fig. 5 Comparison of reactivity in various types of Monoclonal antibody.



● No.5+7 ▲ No.5+8 ■ No.7+8 ○ No.5+7+8

Fig. 6 Comparison of reactivity in some cocktail of monoclonal antibody.