

新規脳神経系疾患マーカーの開発

Development of a Novel Marker for Diagnosis of Nervous System Disease

山崎 誠彦*
Yamasaki, Masahiko

沼間 雅之*
Numa, Masayuki

A novel monoclonal antibody MoAb Ac-005 was prepared and characterized. MoAb Ac-005 recognized a novel molecule, which was proved to be a variant of $\alpha 1$ -antichymotrypsin(ACT), and was named "Acta". Sandwich enzyme immunoassay using MoAb Ac-005 was developed for determining values of Acta. Measurement of Acta in serum was of limited value for diagnosis of tumor, because of a number of false-positive results. But Acta in cerebrospinal fluid(CSF) was found to be a better marker than ACT in distinguishing between control groups and Alzheimer's disease(AD) groups.

1 はじめに

体液中にはさまざまな微量物質が存在する。ある種の物質は疾患により特徴的な変化を示し、この物質を測定することにより特定の疾患の診断が可能になる。我々はこの様な疾患の指標となり得る物質（マーカー）の新たな探索と、これを精度良く測定するためのキットの開発を進めている。今回、目的の物質を単離精製することなくこの物質に特異的な抗体を選択できるというモノクローナル抗体作成技術の特徴を生かし、癌の血清診断に有用な新規マーカーの探索を試みた。その結果新たに見い出された物質は、癌よりもむしろ脳神経系疾患のマーカーとしての可能性が示された。この物質の解析と、その臨床的意義について検討の結果を報告する。

2 モノクローナル抗体の作成

人体液よりCA19-9活性を指標にして以下のごとく部分精製を行い、その癌由来の画分に特異的に反応するモノクローナル抗体の作成を試みた。

大腸癌患者腹水を0.6M過塩素酸にて処理し、得られた可溶性画分について6Mグアニジン存在下にゲル濾過を行った。その高分子量画分について4M尿素存在下DEAE-陰イオン交換クロマトグラフィーを行い部分精製癌画分を得た。正常人血清についても同様の操作を行い、部分精製正常画分を得た。100mMの塩濃度にて溶出された部分精製癌画分をフロイントアジュバントと共にBalb/cマウスに免疫感作し、その脾細胞とマウスミエロマ細胞とをポリエチレングリコールを用い、常法に従って融合を行った。部分精製癌画分に強く反応し部分精製正常画分に反応しない抗体を産生するハイブリドマクローンをELISA法にてスクリーニングし、3種のモノクローナル抗体、Ac-005、Ac-006、Ac-013を得た。

*感材生産本部 第二開発センター

3 抗原物質の解析

各モノクローナル抗体に対応する抗原物質は癌に特徴的な物質といえる。それぞれの物質について免疫学的な解析を行った。

部分精製癌画分に対し、電気泳動後に各モノクローナル抗体によるイムノステイニングを行った結果、すべて分子量約65~70kDa、等電点4~5の物質との反応性を有することが判明した。そこで、既知の血清蛋白質のうち分子量及び等電点が該当するものについて各抗体の反応性を検討したところ、Ac-006及びAc-013は $\alpha 1$ -アンチキモトリプシン（ACT）と反応することが判明した。一方、Ac-005はACTそのものとの反応性は示さなかった。

モノクローナル抗体Ac-005と反応する抗原物質の解析をさらに進めた結果、この物質は分子量、等電点ともにACTに類似すること、さらにAc-005とAc-006又はAc-005とAc-013とを用いたサンドウィッチアッセイにより検出が可能であることが明かになった。Ac-006及びAc-013はACTとの反応性を有することを考え合わせると、Ac-005と反応性を有するこの抗原物質とACTとの関連性が強く示唆された。そこでACTとの異同を検討するため、以下の基本的性質¹⁾について比較検討した。

(1) プロテアーゼとの複合体形成能：ACTはキモトリプシン、カテプシンG等の一連のセリンプロテアーゼの活性を、セリンプロテアーゼとの複合体を形成することにより阻害する²⁾。Ac-005の抗原物質のプロテアーゼとの複合体形成能を検討するため、癌患者腹水に直接キモトリプシンを加え、次いでAc-005を結合したイムノアフィニティークロマトグラフィーを行ったところ、Ac-005と反応し、かつACTとキモトリプシンとの複合体と同じ約82kDaの分子量を有する物質が生成した (Fig.1)。この結果より、Ac-005の抗原物質はACTと同様にプロテアーゼとの複合体形成能を有することが確認できた。

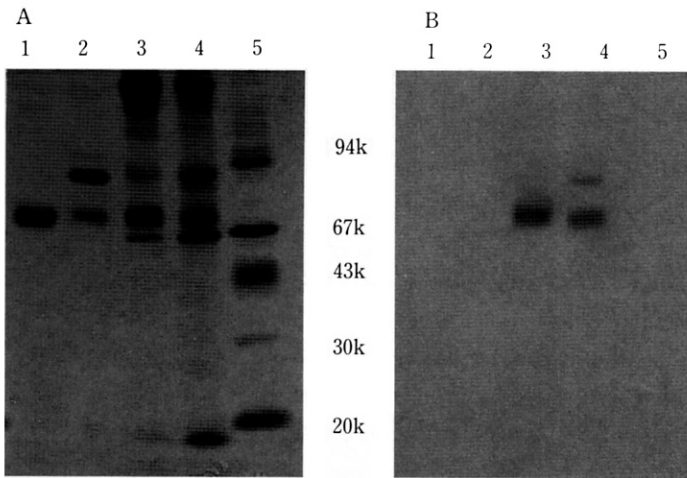


Fig.1 Detection of protease-protease inhibitor complex by SDS-PAGE
Lane 1, ACT standard; lane 2, ACT treated with chymotrypsin; lane 3 and 4, immuno-affinity purified fraction from tumor effusion fluid treated (lane 4) or untreated (lane 3) with chymotrypsin; lane 5, molecular weight markers.
Panel A, silver staining; panel B, immuno-staining with MoAb Ac-005.

(2) DNAへの親和性：ACTはDNAとの親和性を有することが報告されている³⁾。DNAセルロースアフィニティークロマトグラフィーを行ったところ、Ac-005の抗原物質は低い塩濃度でカラムに吸着し200mM以上の高い塩濃度で溶出されDNAへの親和性を有することが認められた。

以上の結果より、この物質はACTと極めて良く似た性質と構造を有するが、Ac-005のエピトープを有するという点でACTとは明らかに異なり特徴的であることが判明した。我々はモノクローナル抗体Ac-005で特異的に検出される新たに見いだされたこの物質を「Acta」と命名した。

4 Actaの測定と臨床評価

ACTは急性期反応蛋白の一種であり、さまざまな生理的变化や疾患で体液中の量変動することが広く知られている⁴⁾。ActaはACTの構造の一部が変化した亜型と考えられ、Actaの量的変動がACTのそれとは異なり、その結果マーカーとして別個の性能を示す可能性は考えられる。我々はActaの測定系を開発し、診断マーカーとしての可能性をACTと比較検討した。

Actaの測定は、モノクローナル抗体Ac-005を固相固定化抗体として用い、ペルオキシダーゼ標識抗ACTポリクローナル抗体を2次抗体として用いるサンドウィッチエンザイム免疫アッセイにより感度、再現性とも良好に行うことができる。Actaの体液中の存在量は、ACTの数百分の一以下と極めて微量であった。

ACTのマーカーとしての意義は炎症マーカーとしての意味合いが強く、偽陽性率の高さゆえ癌のマーカーとしての有用性はそれほど高くない。各種癌関連疾患の血清

中のActaの測定を試みたが、ACTと同様に癌患者で値が上昇する一方で各種炎症疾患においても高値例が見られ、癌マーカーとしてはACTと同様に限界がある。

一方、近年、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease : AD) 患者の脳に特徴的である老人斑にACTが検出された⁵⁾。さらにAD患者体液中のACT濃度が上昇することが報告され、ACTの測定がADの診断に有用である可能性が指摘された⁶⁾。そこでActaのADマーカーとしての可能性についてACTとの比較検討を試みた。検体はAD患者、多発梗塞性痴呆 (multi-infarct dementia : MID) 患者及び

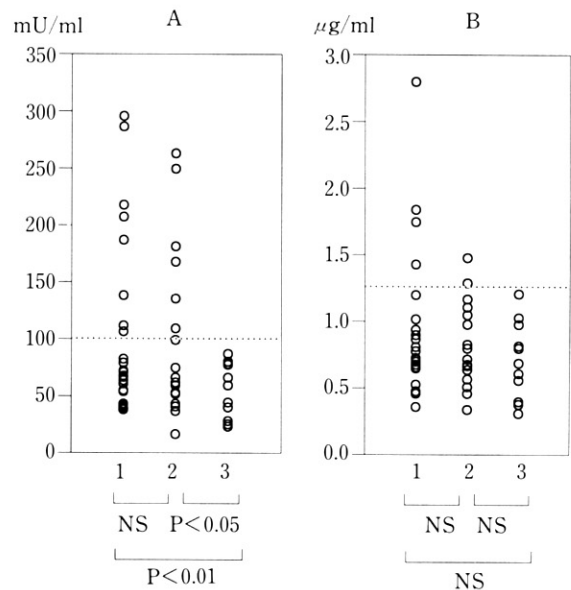


Fig.2 ACT and Acta levels in CSF
Lane 1, patients with AD (n=24); lane 2, patients with MID (n=17); lane 3, normal controls (n=11).
Panel A, Acta values; panel B, ACT values.
Dotted lines show cut-off levels (mean + 2SD of controls).

対照として脳神経疾患を示さない症例の各髄液を用いた。各検体のACT濃度及びActa濃度を測定した結果、Acta濃度はAD群において正常群と比して有意に増加しており、一方ACT濃度についてはAD群において増加傾向は見られたが、正常群との統計的な有意差は見い出されなかった。(Fig.2)。

5 むすび

我々は、癌血清診断に有用な新規マーカーを探索する過程で、急性期反応蛋白として知られるACTに関連した物質「Acta」を見いだした。ActaはACTと同様にプロテアーゼとの複合体形成能とDNA親和性を有するが、モノクローナル抗体Ac-005のエピトープを有する点で異なり、ACTの亜型と推察される。

ActaとACTとの質的な差違の背景については明かではない。ACTの質的変動については、Con-Aに対する親和性の変化という面から糖鎖異常の形で報告された例があり⁷⁾、また、N末端から15個のアミノ酸の切断された形のものも報告されている⁸⁾。Ac-005のエピトープは、過ヨウ素酸処理により反応性は変化しない事から糖鎖である可能性は乏しい。また、報告された末端アミノ酸の切断以外にACTのアミノ酸レベルにおける質的変化である可能性も考えられる。現在、Ac-005のエピトープについて詳細な解析を進めている。

ACTは近年、アルツハイマー病 (AD) のマーカーとしての可能性が示され注目を集めている。平均寿命の向上に伴い老人期の痴呆症が増加の一途をたどっているが、痴呆症の内の約半数は多発梗塞性痴呆 (MID)、約3分の1はADと推定されており、その治療薬の開発と関連してADの診断意義は高い。現状のADの診断は主として神経心理学検査や画像診断で行われるがそれだけでは充分とはいえず、定量性、簡便性に優れる生化学的診断マーカーの必要性は大きいといえる。今回の臨床評価の結果、AD患者の髄液中のActa濃度は有意な上昇が認められた。

さらにADと正常対照群との識別能についてはActaはACT以上の性能を示し、ActaのADマーカーとしての可能性が示された。MID群においてもActaの高値例がみられたが、ADとMIDとの臨床上の鑑別が現状では極めて困難であり今回MIDとされた症例においてもADの混在がかなり考えられることから、実際にMIDにActa高値例が存在するかについては単純に結論づけられない。Acta測定によるADとMIDとの鑑別の可能性については今後明らかにしていく必要がある。

ADは β -アミロイド前駆体のプロテアーゼによる切断の異常によるアミロイドの異常蓄積により発症するという報告が最近なされた⁹⁾。Actaの性状とADとの関連は不明であるがACTと同様にプロテアーゼ阻害活性を有することから、Acta発現の亢進が何らかの形でADの発症起序に関与する可能性も否定できない。

今後、Actaの生理的意義について知見を得るとともに、臨床診断上の有用性についてさらに詳細に検討を進めていきたい。

最後に、この研究を進めるにあたりまして貴重な検体をご提供くださるとともに、ご指導いただきました東海大学 神経内科の篠原先生、山本先生、分子生命科学教室の山村先生、津田先生、共同利用研究室の神口先生に感謝いたします。

●参考文献

- 1) 高田繁生他：最新医学, **45**(5), 992-1007(1990)
- 2) M.Davril et al. : Biochem.J., **245**, 699-704(1987)
- 3) M.Abdullah et al. : Arch. Biochem. Biophys., **225**, 306-312(1983)
- 4) J.Travis et al. : Ann. Rev. Biochem., **52**, 655-709(1983)
- 5) C.R.Abraham et al. : Cell, **52**, 487-502(1988)
- 6) 篠原幸人他：医学のあゆみ, **157**(10), 611-612(1991)
- 7) E.Hachulla et al. : Clin. Chem., **34**, 911-915(1988)
- 8) M.Morii et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., **111**, 438-443(1983)
- 9) D.J.Selkoe : Scientific American, **265**(5), 40-47(1991)