

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590680

研究課題名(和文) イムノクロマト法によるシトリン欠損症迅速簡便診断法の開発と臨床応用

研究課題名(英文) Development and clinical application of the immunochromatography for a citrin protein

研究代表者

飯島 幹雄 (IIJIMA, Mikio)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：00305111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：シトリンの欠損は、シトリン欠損による新生児肝内胆汁うっ滞と成人発症II型シトルリン血症の原因となる。シトリン欠損症の確定診断は、遺伝子診断が主として用いられるが、既存の変異が両アレルに検出できない症例が存在する。ウェスタンブロット法もシトリン欠損症に用いられているが、手間が掛かるためその利用は非常にまれである。イムノクロマト法は、近年開発された、手軽で迅速な検出手段である。本研究の目的は、確定診断を補完する、イムノクロマト法による口腔粘膜細胞を用いたシトリンタンパク質の検出である。本研究期間で、シトリンタンパク質に対するイムノクロマト測定系の確立には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Citrin deficiency causes neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency, and adult-onset type II citrullinemia. Diagnosis of citrin deficiency is mainly performed by genetic analysis, although the known mutations are not detected in some cases. Western blot analysis is also performed for citrin deficiency. The use of Western blot analysis is very few because it is time-consuming. Immunochromatography is recently developed detection method, which is easy and quick. The aim of this project is to examine citrin protein in oral mucosae by using immunochromatography as an alternative diagnostic method. In this project, the development of immunochromatography for a citrin protein was not completed.

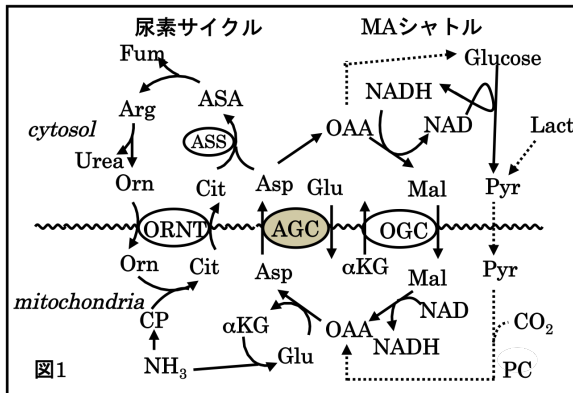
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：イムノクロマト法 ミトコンドリア アスパラギン酸・グルタミン酸輸送体

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、高アンモニア血症を呈し、予後不良で肝臓特異的にアルギニノコハク酸合成酵素 (ASS) タンパク質が低下する成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2) の責任遺伝子 *SLC25A13* を同定し、その転写産物シトルリンがミトコンドリアの内膜に局在する、肝型アスパラギン酸・グルタミン酸キャリアー (AGC) であることを明らかにした。AGC は、ミトコンドリアで生じたアスパラギン酸を細胞質へ輸送し、尿素サイクルに供給すると共に、リンゴ酸・アスパラギン酸 (MA) シャトルの一員として、細胞質 NADH 還元当量をミトコンドリアへ輸送する役割を担っている (図 1)。CTLN2 患者は糖質や



アルコールを嫌い、また飲酒後発症する症例も少なくない。さらに、糖質負荷により、症状が悪化したとの報告もある。糖質やアルコールの摂取は細胞質 NADH を上昇させるため、ヒトシトルリン欠損症の病態の多くは、細胞質 NADH の過剰蓄積に基づくと考えている。

CTLN2 患者の幼児期の病態から、一過性の特発性新生児肝炎として原因不明であった患児に、*SLC25A13* 遺伝子変異を発見し、本新生児疾患を NICCD (neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency) と名付けた。NICCD は、すでに OMIM (online mendelian inheritance in man) に登録され、小児科領域で関心が高まっている疾患の一つである。NICCD 患児では、遷延性黄疸、胆汁うっ滞、多種アミノ酸

血症などの多彩な症状を呈するが、多くの場合、その症状は生後一歳時までに消失する。まれに、肝移植を必要とする症例も存在する。現在申請者らは、シトルリン欠損症は生後 1 歳までに NICCD を発症し、何らかの適応・代償機構により、その後見かけ上健康に過ごし、何らかの機構により成人で重篤な CTLN2 を発症すると考えている (図 2)。

一般正常日本人を対象に行った

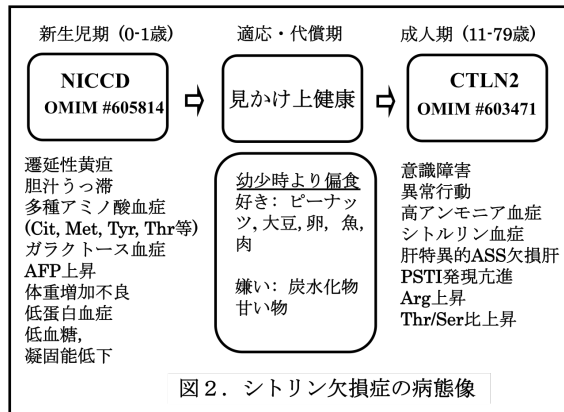


図 2. シトルリン欠損症の病態像

SLC25A13 遺伝子変異解析の結果から、60 人から 70 人に一人の保因者がいることが分かった。この保因者頻度から計算すると、日本人では 14,000 人から 20,000 人に一人のシトルリン欠損症 (CTLN2 あるいは NICCD) 患者がいると推定される。

SLC25A13 遺伝子の発見から NICCD の病態を明確にしたことにより、予後不良で、肝移植のみが治療手段であったシトルリン欠損症に対する新たな治療法が分かってきた。すなわち、細胞質 NADH の過剰蓄積を防ぐためのピルビン酸投与や糖質を減らした食生活である。このような治療戦略により、シトルリン欠損症は、発症を予防できる疾患になつつある。

2. 研究の目的

申請者らは、シトルリン欠損症の分子遺伝学的ならびに生化学的解析をおこなってきており、臨床的にも高く評価されている。そのため、生検肝、末梢血、初代培養線維芽細胞を用いた生化学的診断もおこなってきた。しかしながら、いずれの場合にも患者への負担や、検出までに多くの時間と手間がかかるた

め、その利用はあまり進んでいない。そこで、POCT (point of care test) への適用を考えた迅速簡易診断法の確立をおこなう。

1) 低侵襲で得られる検体の選定と、処理方法の確立

2) シトリン検出抗体の作製と低侵襲検体有用性の確立

3) イムノクロマト法によるシトリン迅速簡易診断法の開発と信頼性の検証

3 . 研究の方法

(1) 低侵襲で容易に得られる検体の選定と処理方法の検討

従来、成人発症 2 型シトルリン血症原因遺伝子産物シトリンの検出には、生検肝、初代培養線維芽細胞や末梢血を検体として用いた Western blot 法をおこなってきた。肝臓組織は、シトリンタンパク質の発現量が最も高いため検出も最も容易であるが、ヒトから採取するのは容易でない。初代培養線維芽細胞は、安定して利用できる検体であるが、臨床現場に採取技術が必要であり、利用された例は多くない。末梢血の利用は、臨床での対応が容易であるが、採血から検体処理までの時間が長くなると、シトリンタンパク質の安定性が損なわれ、判定が困難になる欠点がある。本研究は、口腔粘膜でシトリンタンパク質が Western blot 法で検出できたことを契機に計画された。

初年度は、口腔粘膜でのシトリンタンパク質と類縁なアララータンパク質の発現、それぞれの mRNA 発現量やミトコンドリア膜タンパクであるシトリンタンパク質の可溶化法を検討する。また、検体採取から検体処理まで、シトリンタンパク質を安定的に保存させる方法を確立する。検出には、従来の Western blot 法を用いる。乳児や成人を対象にシトリンタンパク質の発現変化に関する基礎データを得て、臨床において低侵襲で容易に得られる検体の確立をおこなう。

(2) 抗体作製と抗体精製のための組換えタンパク質の作製

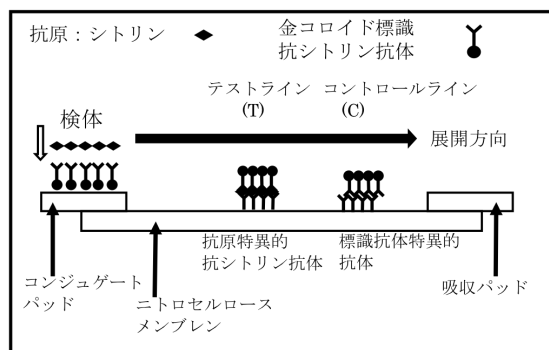
申請者らは、シトリンタンパク質に対するウサギ由来ポリクローナル抗体を作製した経験があるが、イムノクロマト法に利用可能な抗体を得るため、シトリンタンパク質の N 末側や C 末側のミトコンドリア膜外領域の組換えタンパク質を作製する。また、抗体精製のため、シトリンタンパク質とアミノ酸配列が 75%一致するアララータンパク質についても作製する。

(3) 抗体の作製と選定

抗シトリン抗体は、ウサギ由来ポリクローナル抗体とマウス由来モノクローナル抗体の二種類を作製する。得られた抗体のうち、イムノクロマト法で発色粒子である金コロイドで標識する抗体として高感度が期待されるポリクローナル抗体一種とメンブレン上に固定化する固相抗体として反応特異性を高めた (類縁なアララーに反応する抗体を除去した) モノクローナル抗体一種を選別する。

(4) イムノクロマト測定系の開発

下図に示したようなイムノクロマト測定系を開発するため、(3) で選定した抗体に加え、メンブレンの選定、コンジュゲートパッドならびに吸収パッドの選定、緩衝液の選定をおこなう。



開発したイムノクロマト測定系を利用して、今までに得た検体を利用して、シトリンタンパク質検出の特異性、感度や相関性など

の品質特性を Western blot 法と比較検討する。

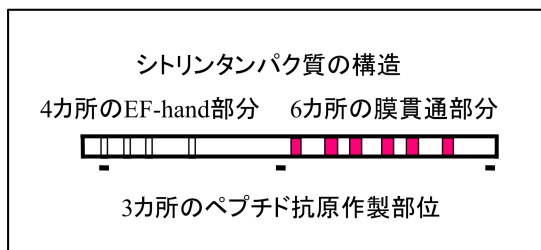
4. 研究成果

(1) 低侵襲で容易に得られる検体の選定と処理方法の検討

当初の計画に従って、口腔粘膜細胞の有用性を検討した。口腔粘膜細胞でのシトリンタンパク質の発現は、高発現している肝臓細胞より少なかったが、線維芽細胞と同程度以上であった。そこで、口腔粘膜に含まれるミトコンドリア内膜局在タンパク質である、シトリンタンパク質の可溶性条件を、種々の界面活性剤を用いて検討した。その結果、sarcosyl による可溶性が最も良好だった。

(2) ウサギ由来ポリクロナール抗体の作製

シトリンタンパク質の構造の模式図を下図に示した。シトリンタンパク質と類縁なア



ララータンパク質 (SLA25A12 遺伝子産物) とのアミノ酸配列を比較し、シトリンタンパク質に特異的な抗原配列を解析した。その結果、図に示した3カ所の部位 (N 末端側の EF-hand 部位、最初の膜貫通部位の N 末側部位、C 末膜外部の C 末端部位) が抗原配列候補となった。これら3カ所のペプチドを作製し、常法に従い、それぞれをウサギに免疫した。得られた抗血清を用いた Western blot 法の結果、シトリンタンパク質との反応性が確認できた。

(3) イムノクロマト測定系の試作

ウサギポリクロナール抗体が3種類得られたので、テストラインのみのイムノクロマト測定系を試作した。ウサギポリクロナール抗

体を金コロイドで標識し、組換えシトリンタンパク質と混合した。ニトロセルロースメンブレンには、金コロイド標識ウサギポリクロナール抗体と異なる、ウサギポリクロナール抗体を塗布することにより、テストラインを作製した。このイムノクロマトの試作品を用いて、全長シトリンタンパク質あるいは、すでに報告されている変異シトリン遺伝子由来する変異シトリンタンパク質の検出を試みた。その結果、全長シトリンタンパク質は、3種類のウサギポリクロナール抗体の組合せのうち、一つの組合せで検出できた。しかしながら、この一つの組合せにおいても、変異シトリンタンパク質が検出される擬陽性が認められた。そこで、反応特異性の高いマウスモノクロナール抗体の作製を試みた。

(4) マウスモノクロナール抗体の作製

大腸菌で発現した、全長の組換えシトリンタンパク質を抗原として、マウスモノクロナール抗体の作製を試みた。抗原として用いたシトリンタンパク質に対する ELISA 法によるスクリーニングにより、69 サンプルの陽性ハイブリドーマが得られた。この69 サンプルの陽性ハイブリドーマから得た培養上清を用いて、全長あるいは変異シトリンタンパク質ならびにアララータンパク質に対する反応性を Western blot 法で確認し、5種類の反応性の異なるクローンを選択した。

5) 今後の展望

イムノクロマト測定系を用いたシトリンタンパク質の検出という当初の目標を、研究期間内に達成できなかった。シトリンタンパク質は、ミトコンドリア内膜に局在する膜タンパク質であるため、抗体と反応させるためには、膜の可溶性が不可欠である。そのため、通常のイムノクロマト測定系と異なり、反応液中の可溶化剤の影響が無視できなかった。また、シトリンタンパク質と反応する抗体の

うち、イムノクロマト測定系に利用可能な抗体を得ることが困難であったことが、目標達成を難しくした。しかしながら、反応特異性が高いと推定できるマウスモノクローナル抗体が作製できたので、今後、この抗体を用いてイムノクロマト測定系の確立を目指したい。

5. 主な発表論文等

研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~biochem1/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

飯島 幹雄 (IIJIMA MIKIO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：00305111

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし