

特異的モノクローナル抗体による 迅速な老化物質の測定技術

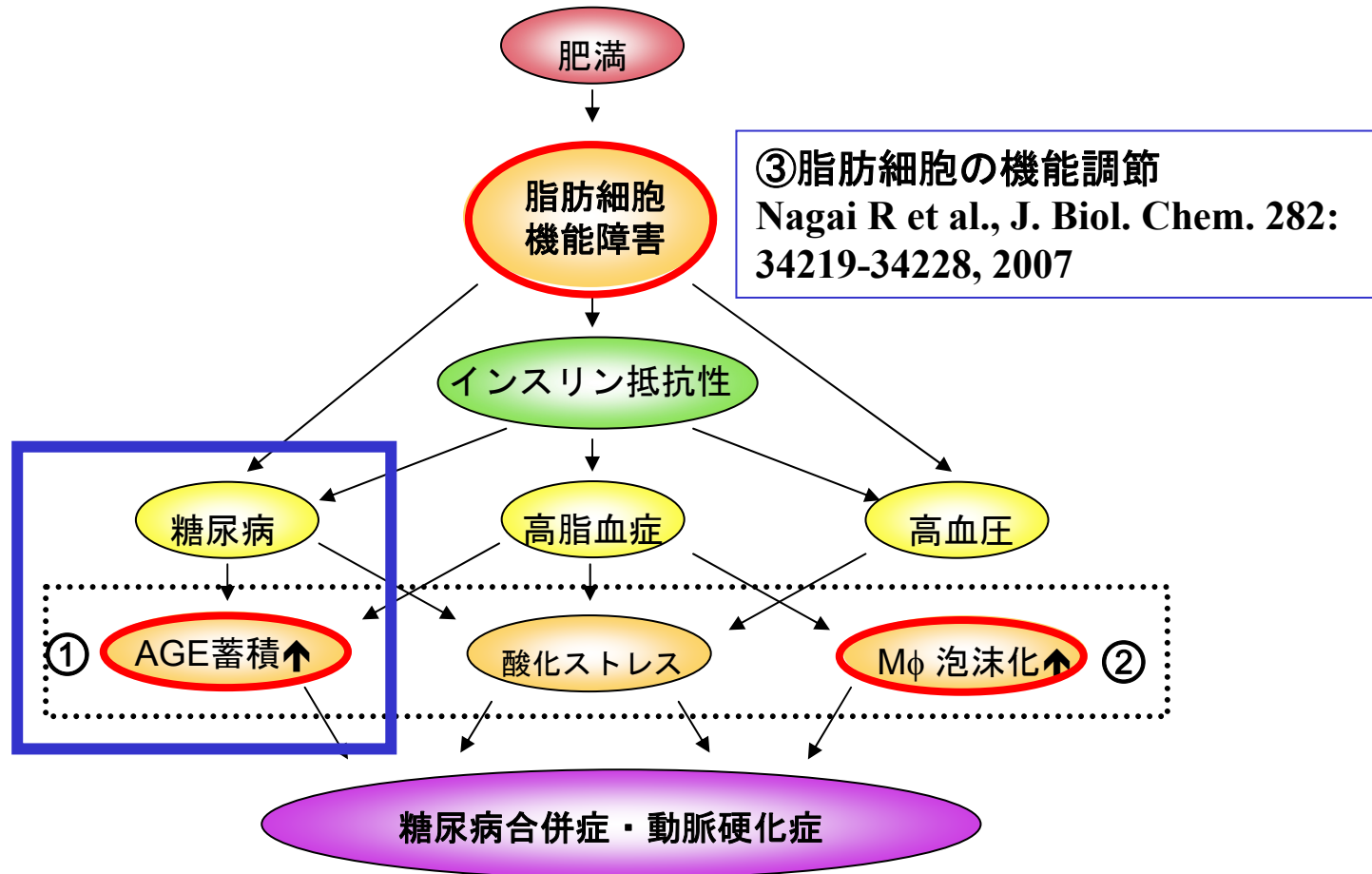
—生活習慣病の予防薬及びその臨床マーカーの開発—

永井 竜児

熊本大学大学院医学薬学研究部
病態生化学分野

研究背景

生活習慣病の発症機構の解明とその予防及び治療



③脂肪細胞の機能調節
Nagai R et al., J. Biol. Chem. 282:
34219-34228, 2007

① AGE蓄積↑

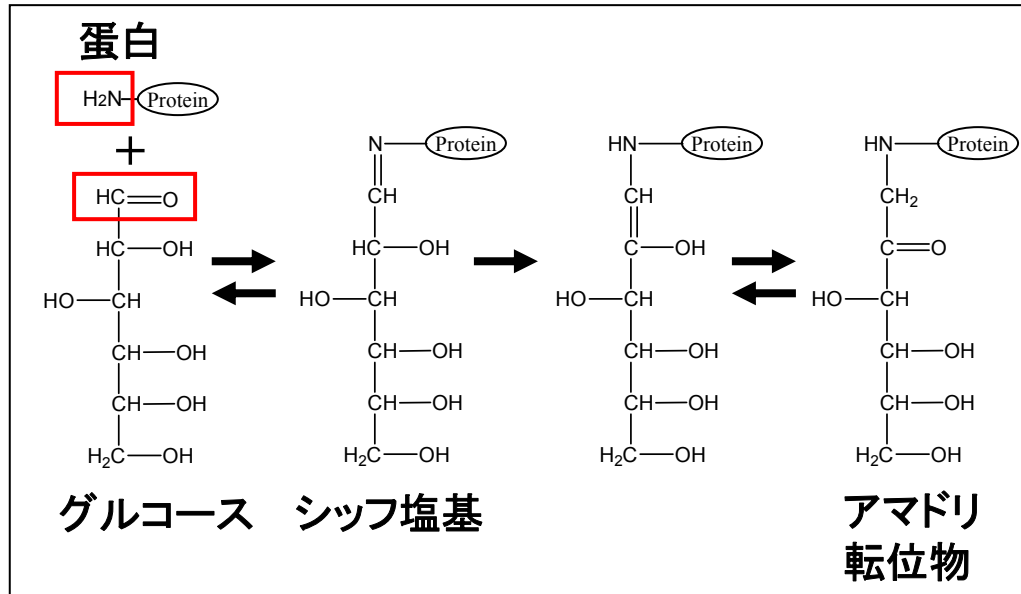
Mφ 泡沫化↑ ②

①AGE生成経路の探索
Nagai R et al., J. Biol. Chem. 277: 48905-
48912, 2002, Diabetes 51: 2833-2839, 2002

②天然物を用いたマクロファージの抗泡沫化
Fujiwara Y et al., ATVB 27: 2400-2406, 2007

メイラード反応とは

前期反応



後期反応

酸化
脱水
縮合



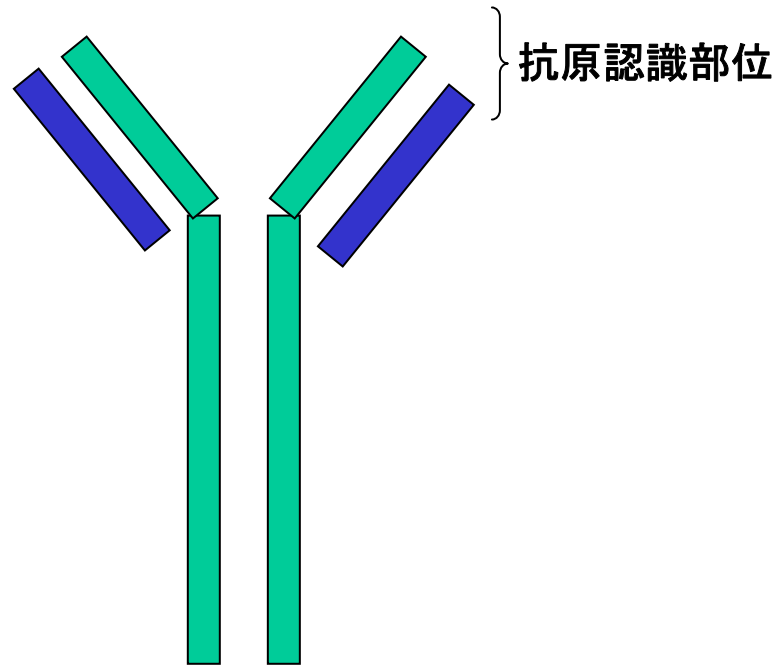
AGE

Advanced Glycation
End products

- 1) 褐色
- 2) 蛍光
- 3) 架橋構造
- 4) AGE受容体による認識

糖と蛋白の非酵素的な反応によって、既に糖尿病のマーカーとして臨床的に用いられているHbA1c（アマドリ転位物）を経て、酸化・脱水・縮合反応によってAGEsが生成します

抗体とは



免疫グロブリンGの基本構造

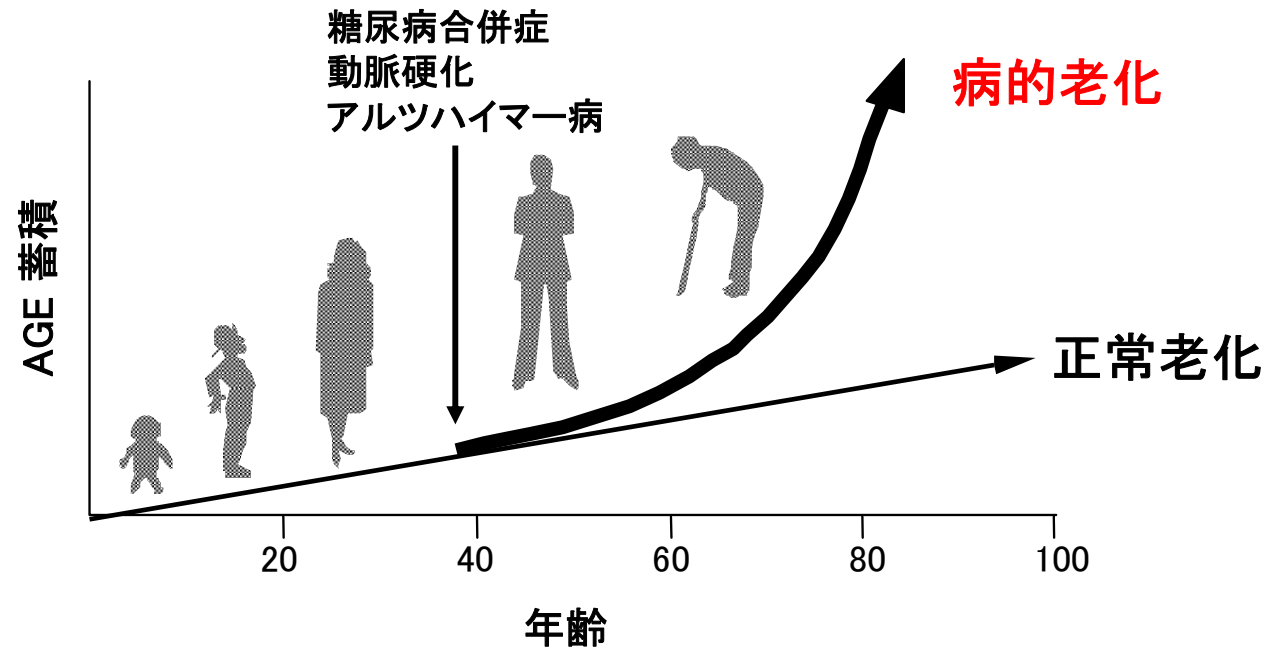
リンパ球のうちB細胞の産生する糖蛋白で、特定の蛋白などの分子（抗原）を認識して結合する働きをもつ。抗体は主に血液中や体液中に存在し、例えば、体内に侵入してきた細菌・ウイルスなどの微生物や、微生物に感染した細胞を抗原として認識して結合する。

抗体利用のメリット

1. 微量な化合物を簡便に測定できる
2. 生体組織での物質の存在部位を調べられる
3. 蛋白に存在するリン酸基の有無なども識別できる
4. 機器分析では測定困難な不安定な化合物も簡便に測定できる
5. 多サンプルの同時測定が可能

着想のきっかけ

メイラード反応後期生成物 (AGE) は加齢や生活習慣病の発症で蓄積が増加する



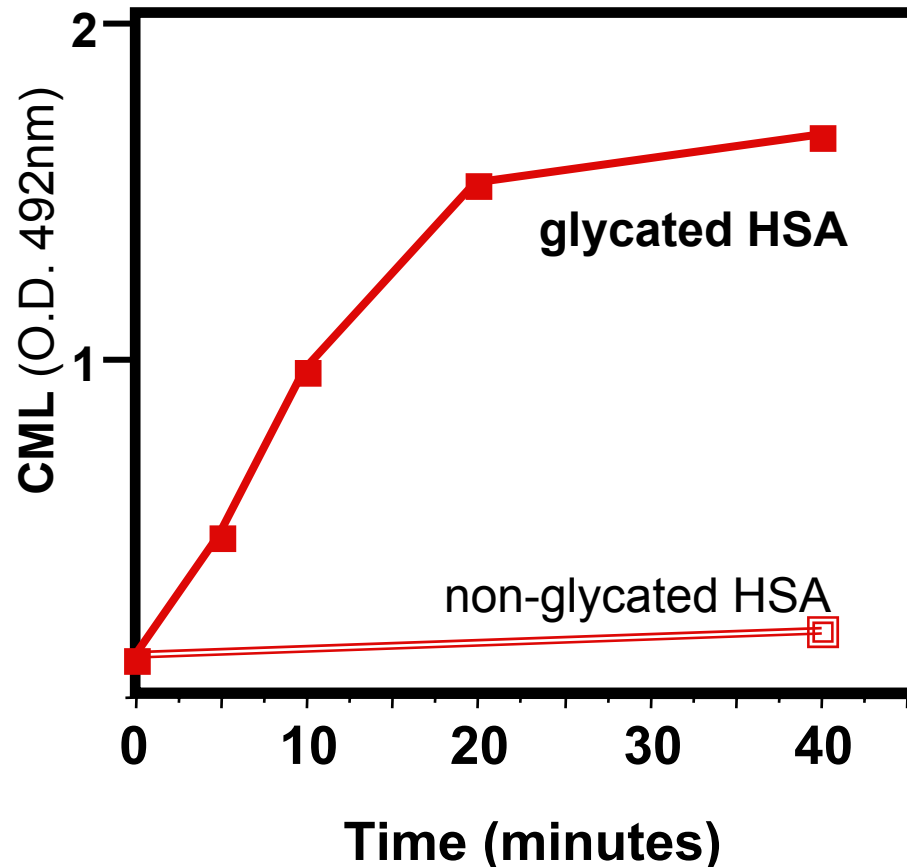
本研究の目標

1. 生活習慣病の発症と関連するAGEを同定・モノクローナル抗体を作製し、新規臨床マーカーを開発する
2. 抗AGE抗体を用いて、AGE生成阻害剤の探索を行う

従来技術の問題点

血中AGEを測定する際に、試料を加熱あるいはアルカリ処理を行っている

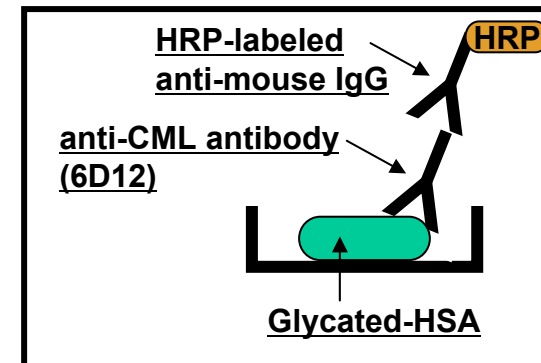
AGE構造体の一つであるCMLは加熱処理によって人工的に生成する



ELISA system

Glycosylated-HSA (= Amadori products)

↓
*Incubation at 100 °C
for 0 ~ 40 min*



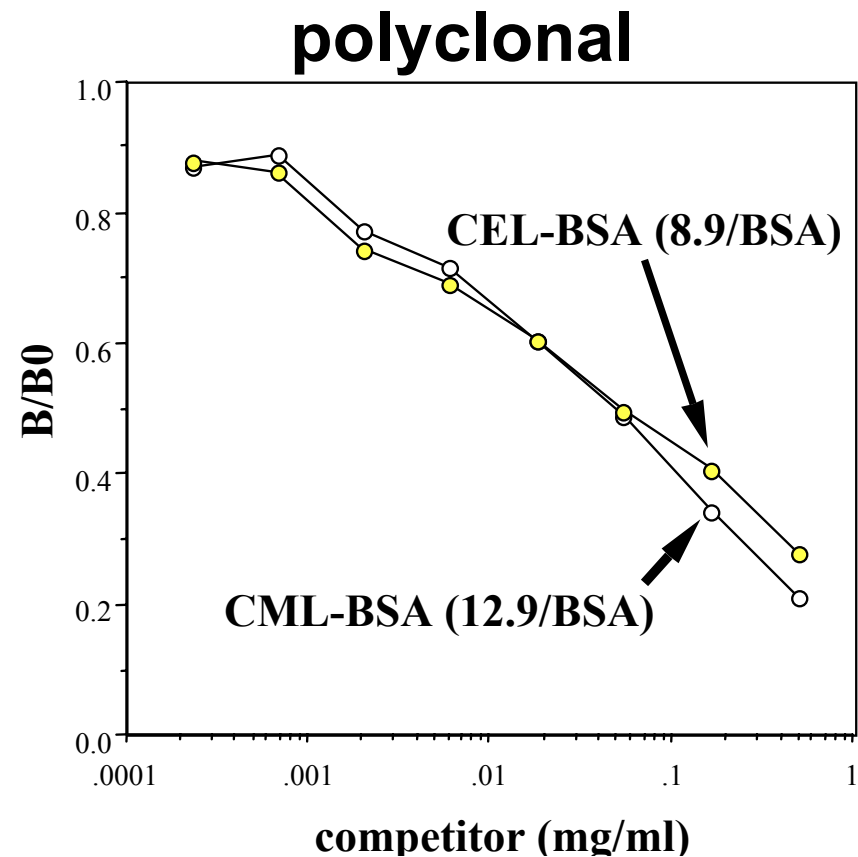
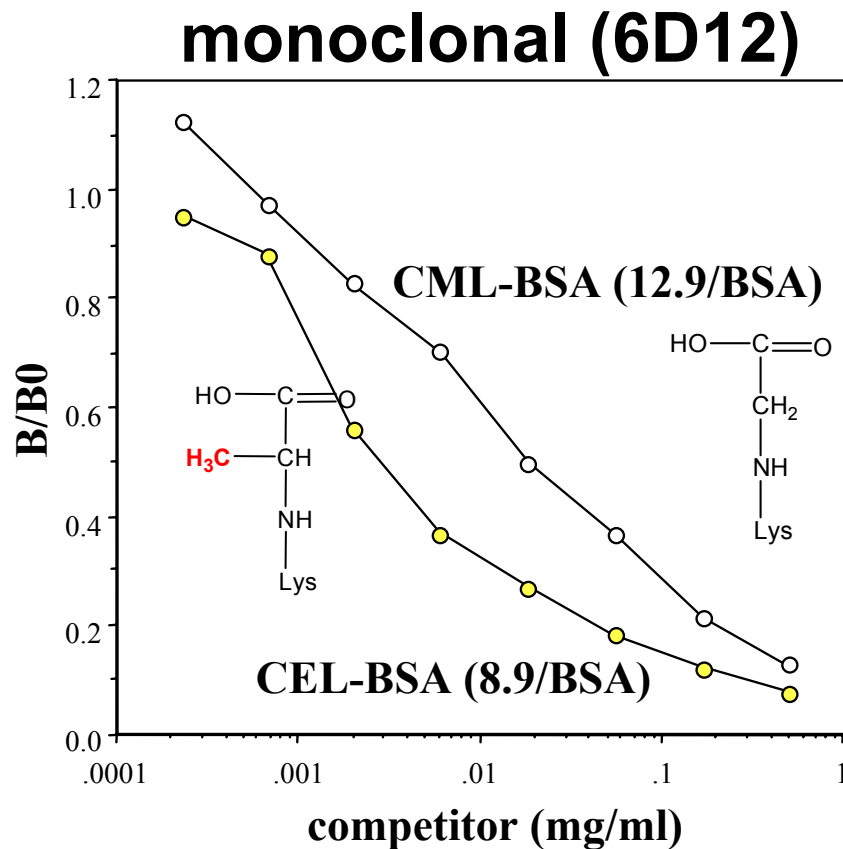
Conventional Antibody against *N*^ε-(Carboxymethyl)Lysine (CML) Shows Cross-Reaction to *N*^ε-(Carboxyethyl)Lysine (CEL): Immunochemical Quantification of CML with a Specific Antibody

Wakako Koito¹, Tomohiro Araki², Seikoh Horiuchi¹ and Ryoji Nagai^{1,*}

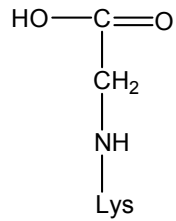
¹Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medical and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, Honjo 1-1-1, Kumamoto 860-8556; and ²Faculty of Agriculture, Kyushu Tokai University, Kumamoto

Received August 17, 2004; accepted October 9, 2004

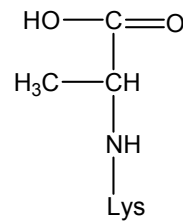
特異性が低い（抗CML抗体はCELと交差反応を示す）



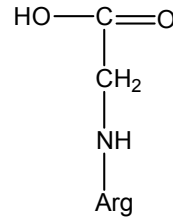
様々なAGE構造体に対する抗体のライブラリーを 製し、生活習慣病との関与を検討する



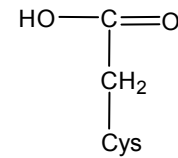
CML



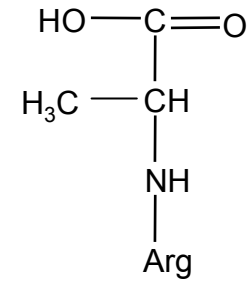
CEL



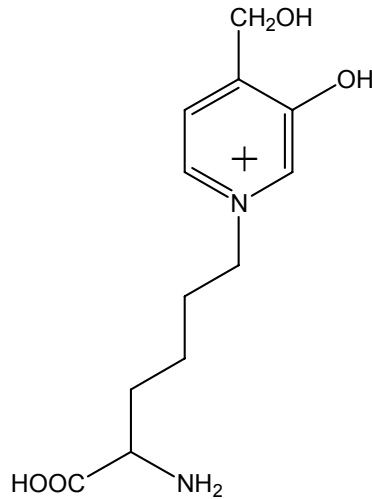
CMA



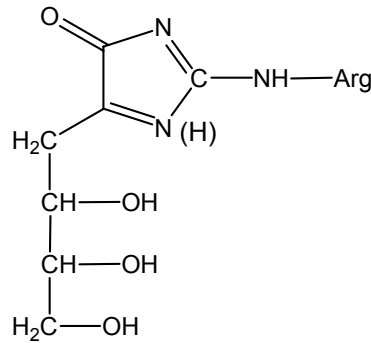
CMC



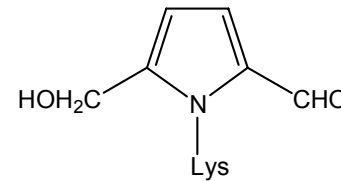
CEA



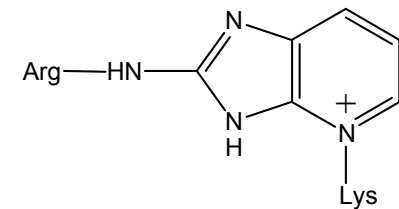
GA-pyridine



3DG-imidazolone



Pyrraline



Pentosidine

メチルグリオキサルからAGEが生成する

Prevention of Incipient Diabetic Nephropathy by High-Dose Thiamine and Benfotiamine

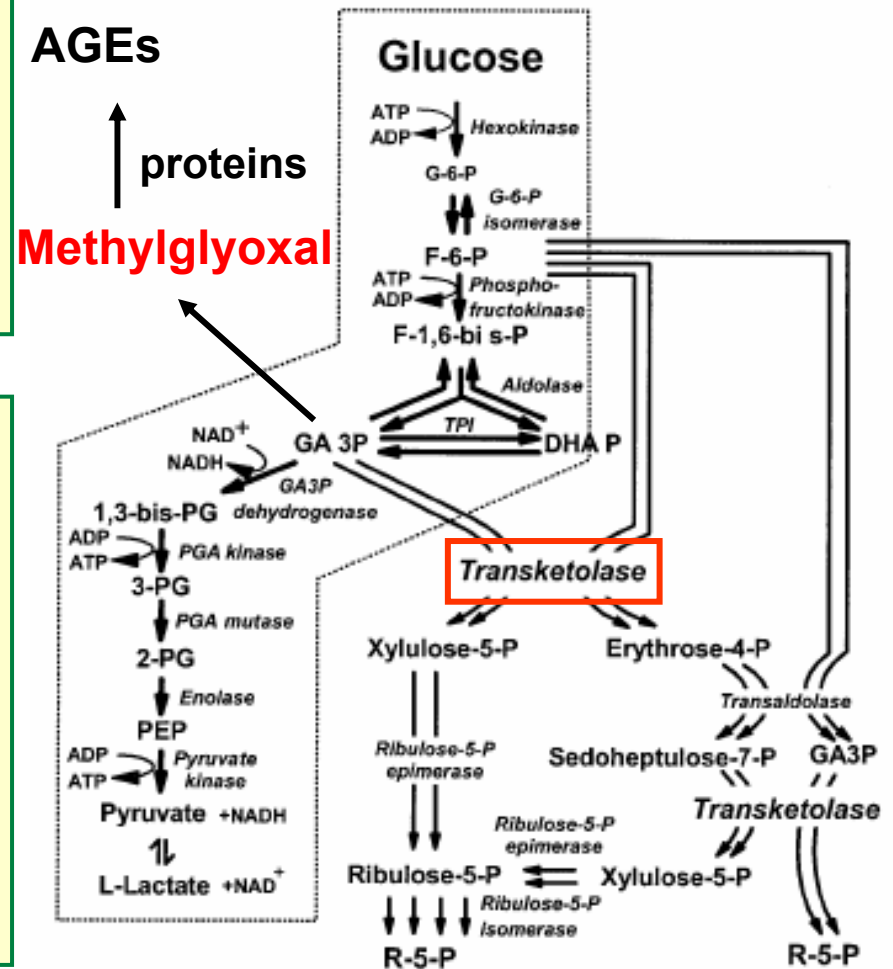
Roya Babaei-Jadidi, Nikolaos Karachalias, Naila Ahmed, Sinan Battah, and Paul J. Thornalley

Diabetes 52:2110–2120, 2003

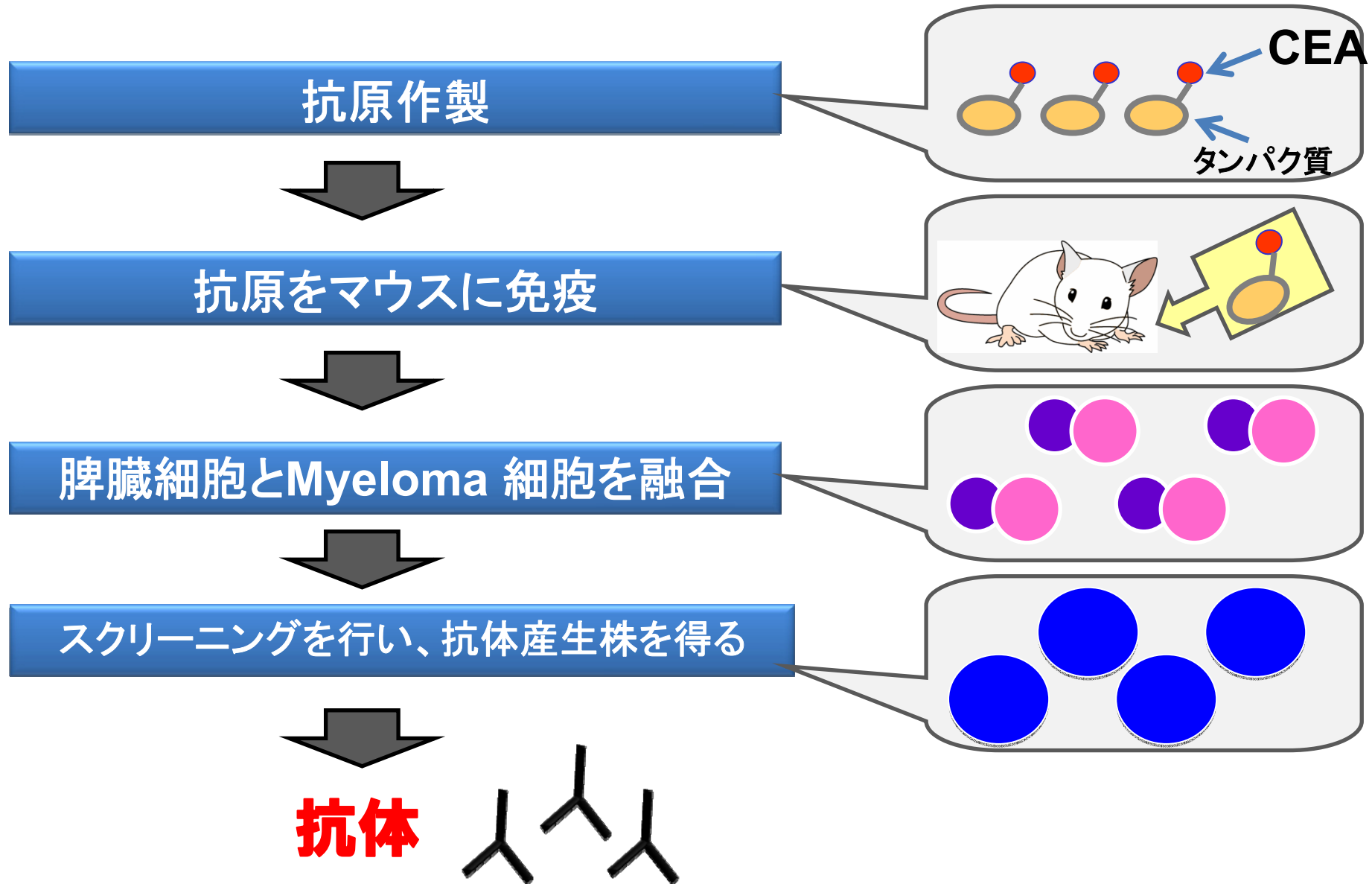
High Glucose Increases Angiopoietin-2 Transcription in Microvascular Endothelial Cells through Methylglyoxal Modification of mSin3A

Yao D, Taguchi T, Matsumura T, Pestell R, Edelstein D, Giardino I, Suske G, Rabbani N, Thornalley PJ, Sarthy VP, Hammes HP, Brownlee M.

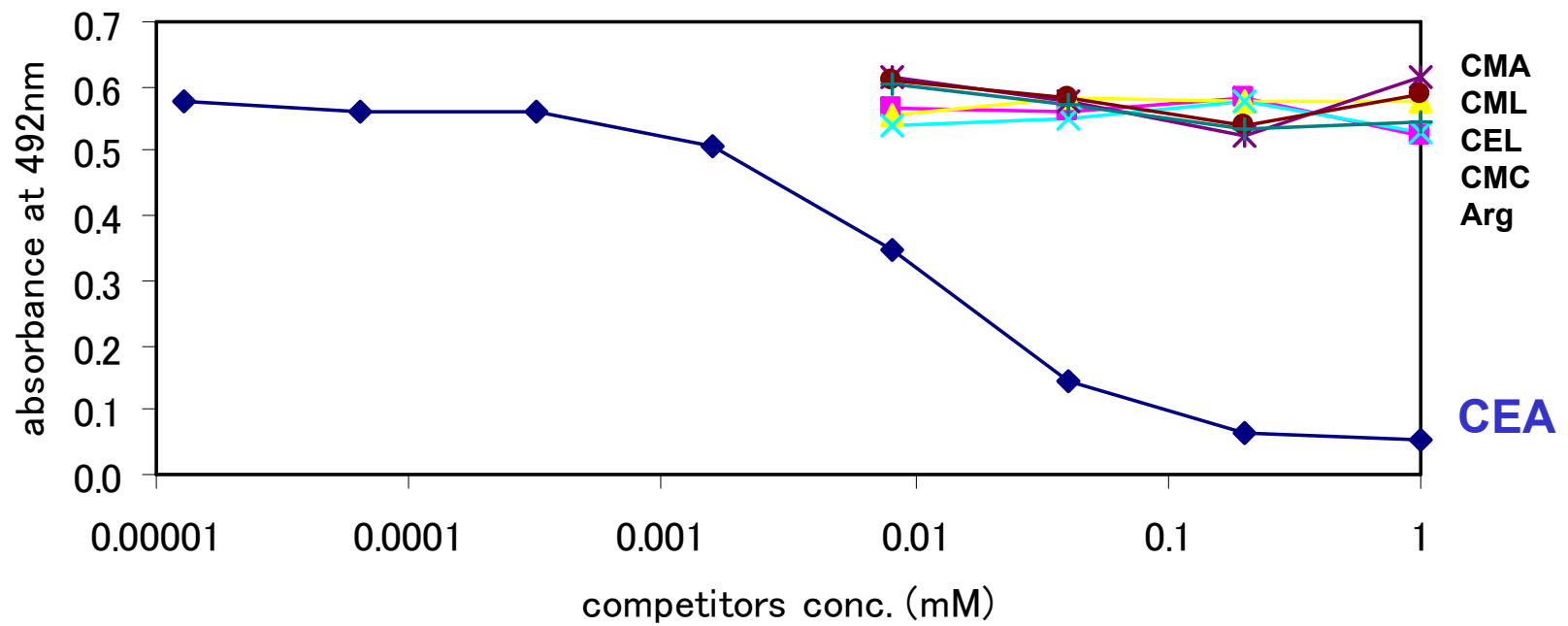
J. Biol. Chem. 282: 31038-31045, 2007



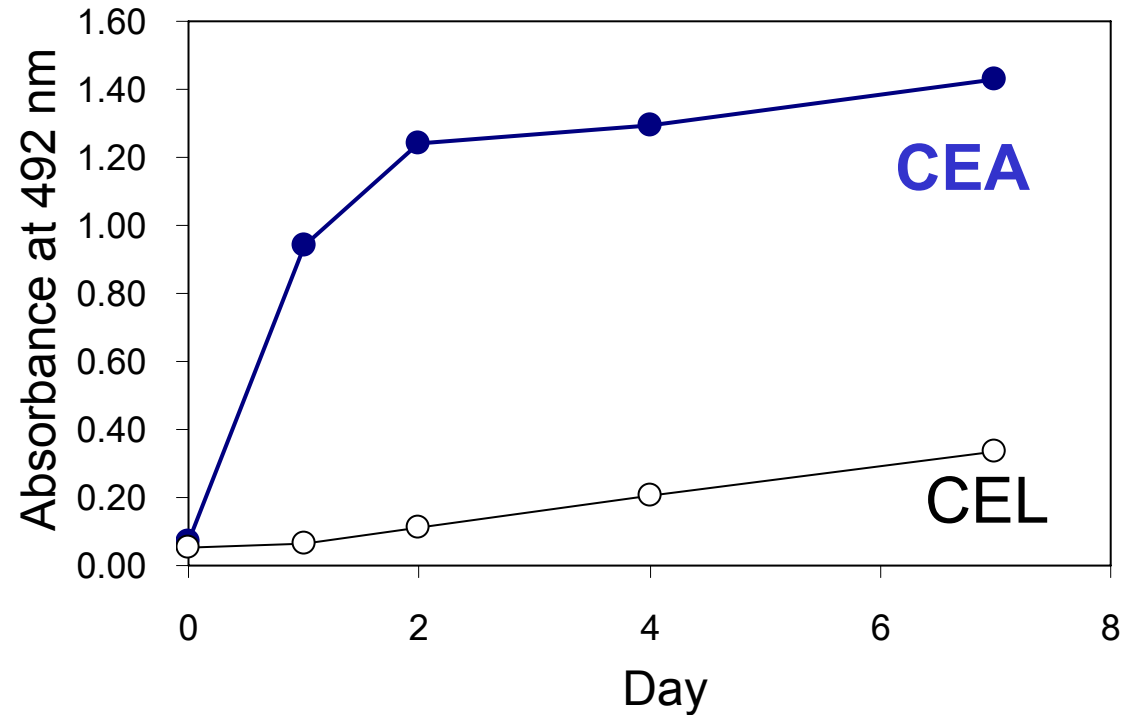
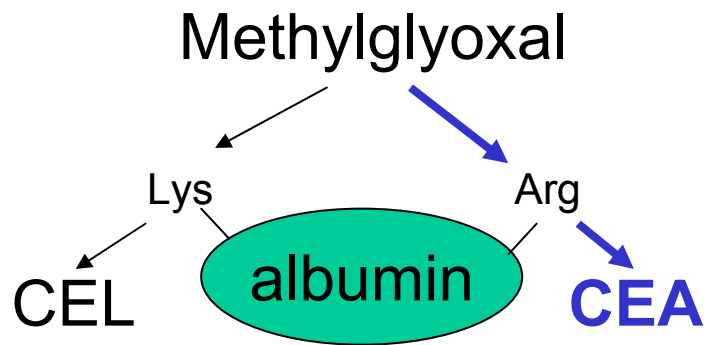
モノクローナル 抗CEA抗体の作製法



モノクローナル抗CEA抗体(3A7)の反応性



CEAとCELの生成量の比較



CEAは既知AGE構造体であるCELより生成量が高い

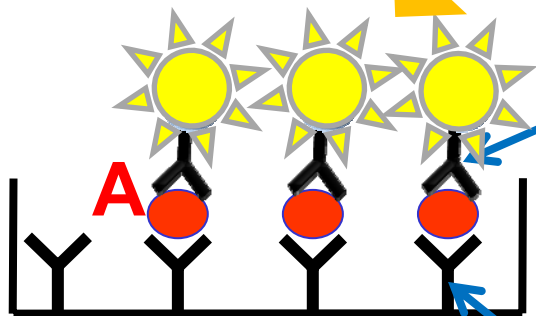
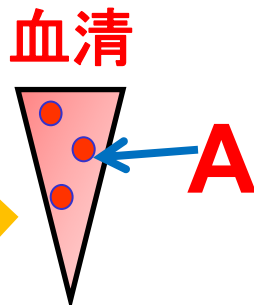
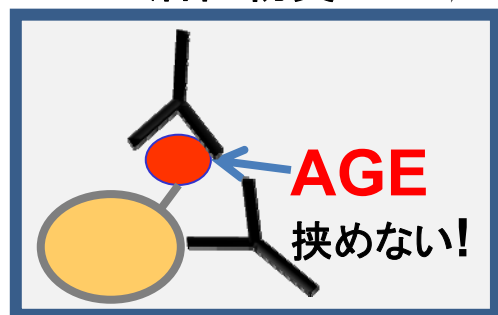
ELISA による血中 AGEs の測定

サンドイッチ ELISA

最も一般的で正確な ELISA 法。

血中タンパク質
ホルモン
生理活性物質

定量



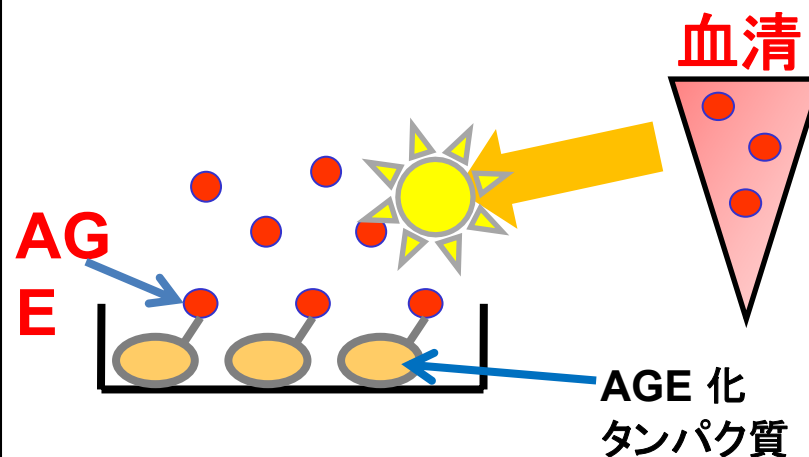
A に対する
ポリクローナル
抗体

A に対する
モノクローナル
抗体

競合 ELISA

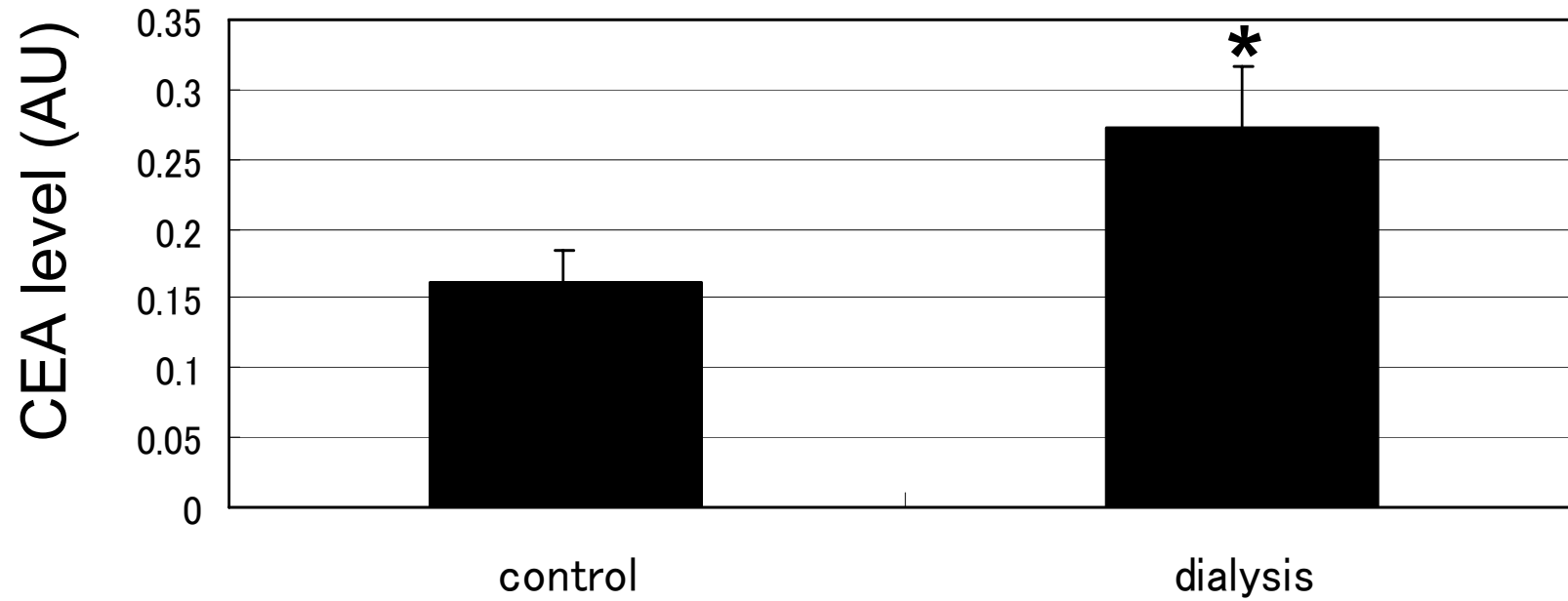
正確な ELISA 法の一つ。
1種類の抗体で測定可能。

AGE 抗
体



serum 中 AGE を測る!

血中CEA含量の変化



健常者8検体、透析患者32検体の平均

$P < 0.00000005$

本技術に関する知的財産権

- ・発明の名称：カルボキシエチルアルギニンに対する抗体
- ・出願番号：特願2007-115300
- ・出願人：熊本大学
- ・発明者：永井 竜児

想定される業界

- ・ 想定されるユーザー
臨床検査試薬製造メーカー
医歯薬系研究所等

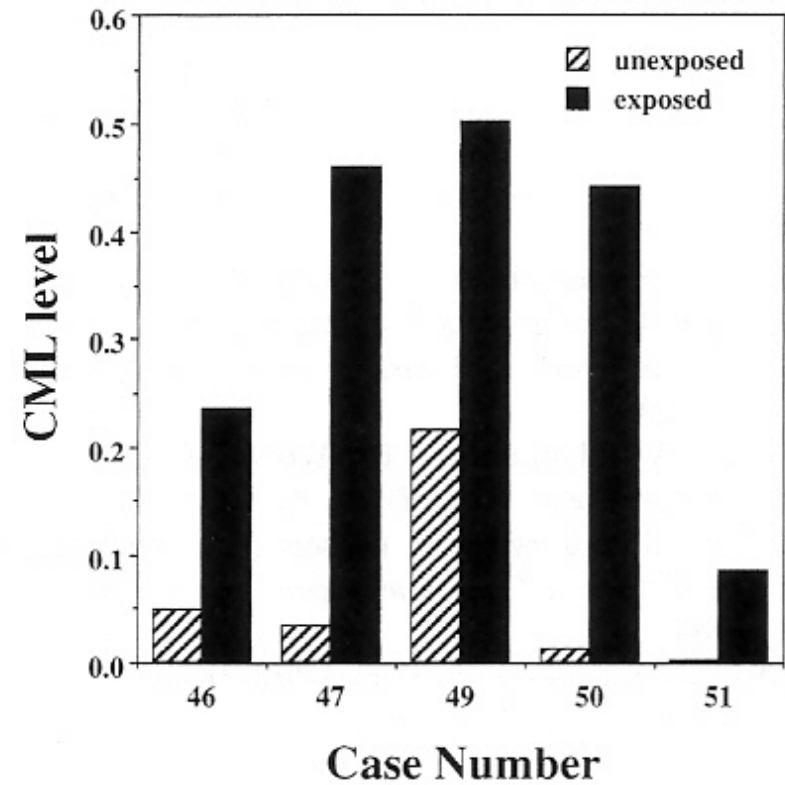
実用化に向けた課題

- ・ 現在、一次抗体を直接HRP標識して、血中CEA値を1時間程度で測定可能。CEAの測定系をキット化し、10分程度で測定できるようにしたい。

日光老化とAGE蓄積



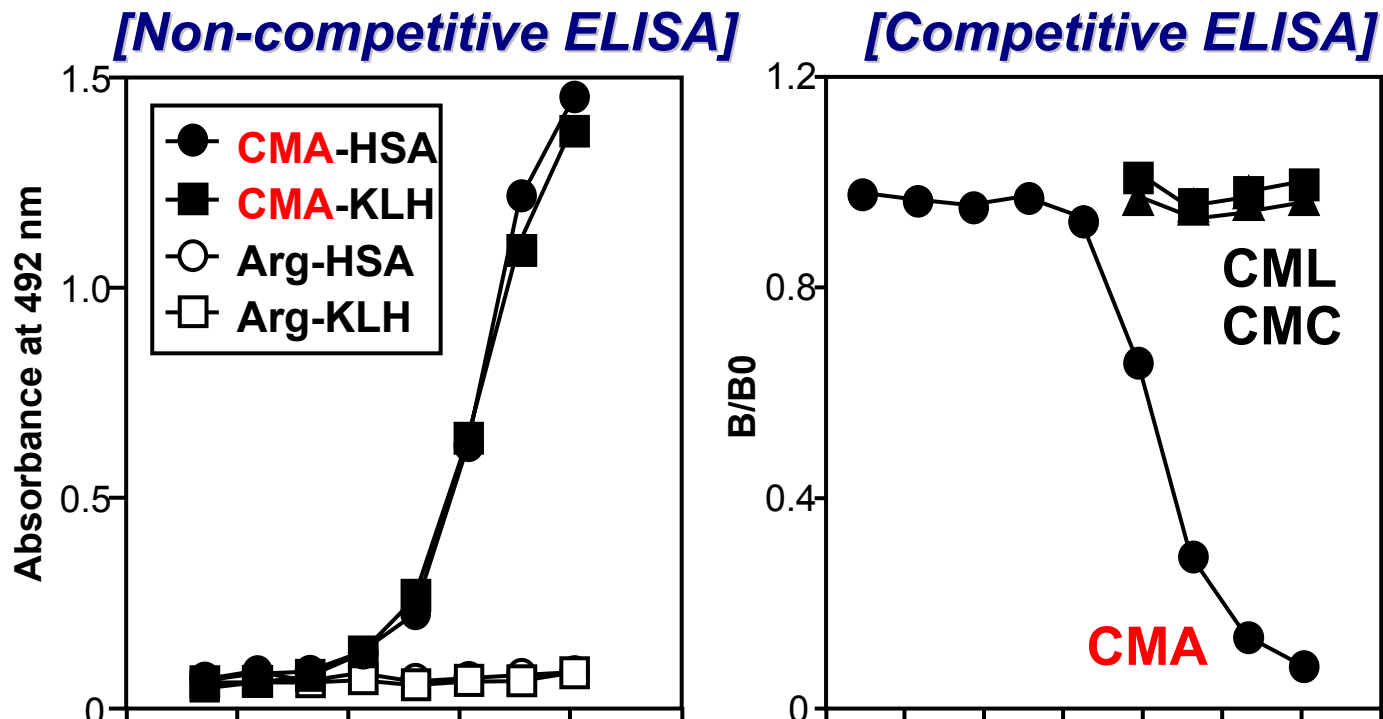
日光性弾性線維症



モノクローナル抗CMA抗体(3F5)の反応性

Monoclonal anti-CMA Antibody (3F5) →

CMAの生成経路と組織における局在の検討



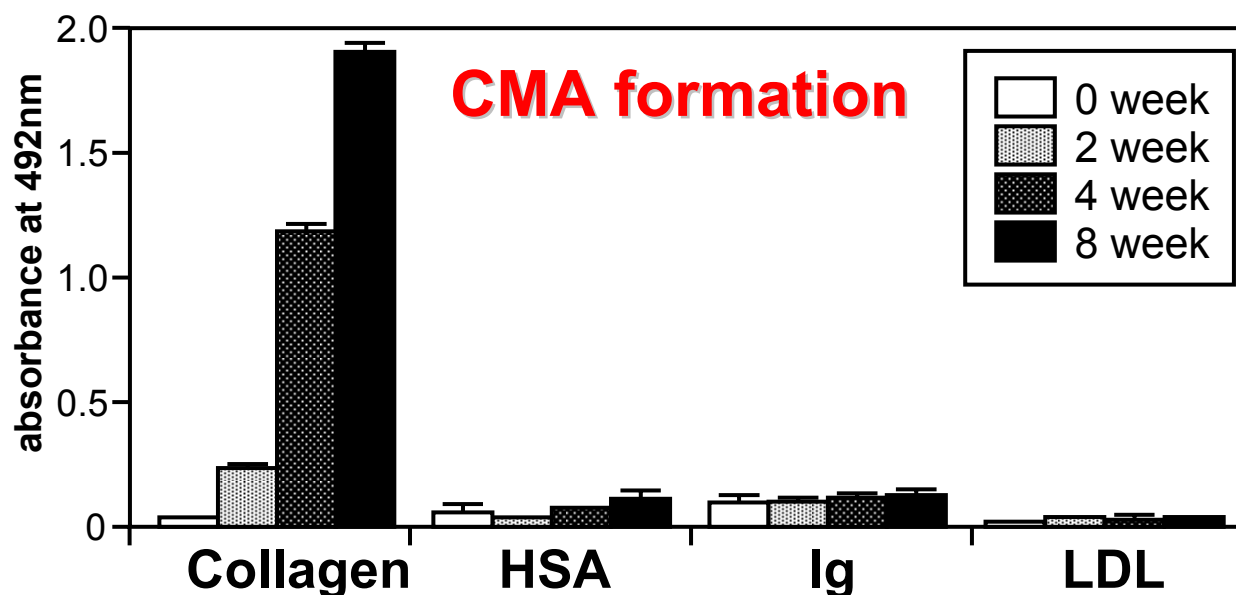
3F5はCMAを特異的に認識する

糖化蛋白におけるCMAの生成

Collagen
HSA
Ig
LDL
+
200 mM glucose
↓
37°C
0 - 8 weeks

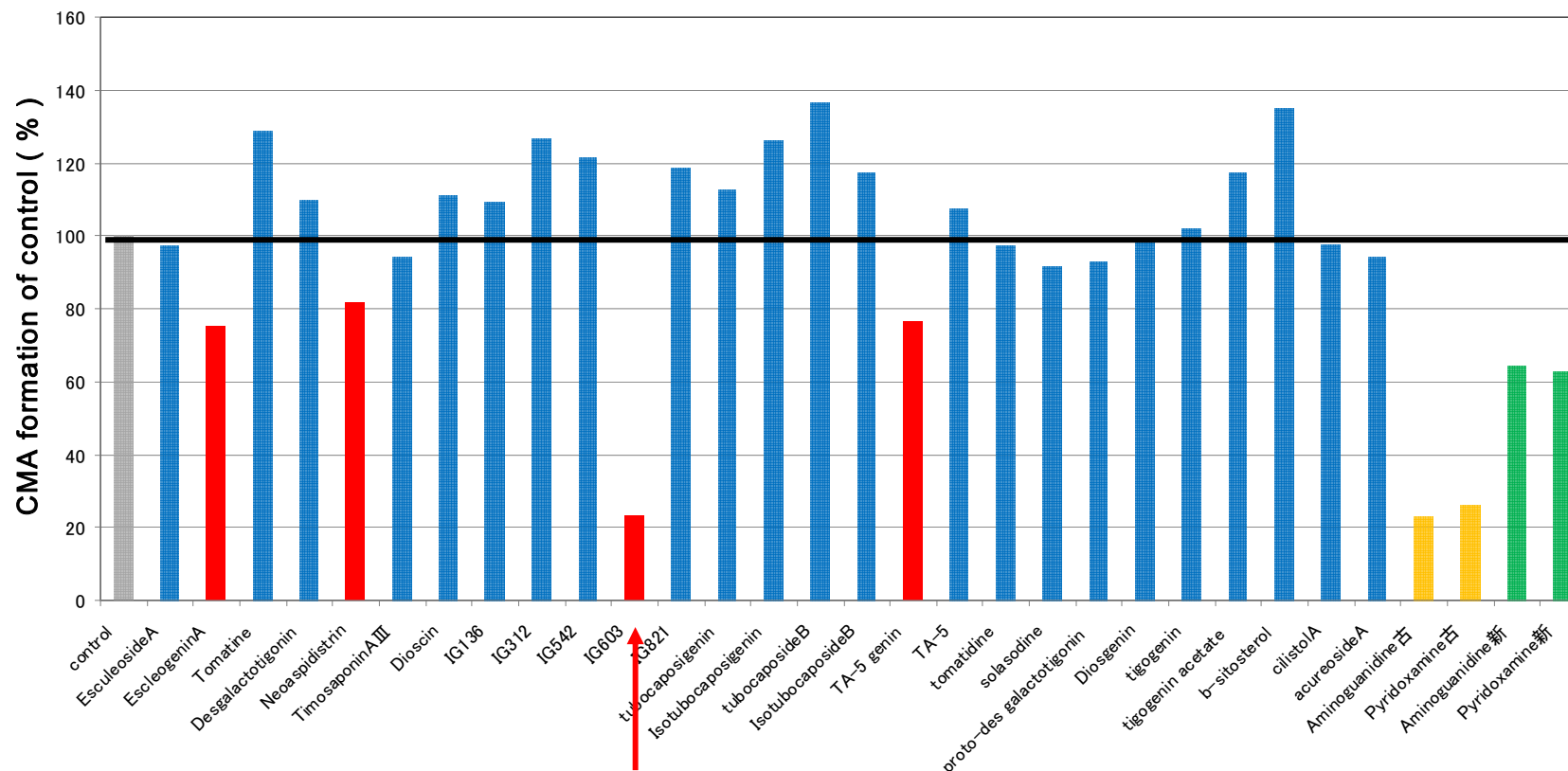
ELISA

Anti-**CMA** antibody (3F5)



CMAは糖化コラーゲンで顕著に生成する

AGE構造体の一つであるCMAの生成阻害剤探索の一例



モノクローナル抗体を用いた AGE測定の特長

- ・抗体の品質が一定 → 測定結果が安定
- ・多サンプルの同時測定が可能
- ・酸加水分解に不安定など、常法では測定が困難なAGEの測定が可能

まとめ

CEA、CMAは酸加水分解に不安定なため、機器分析で測定することが困難であるが、これら構造体に対する特異的なモノクローナル抗体を作製したことによって、腎症の新規臨床マーカーとしての応用性や、皮膚老化ならびに生活習慣病の予防薬の迅速な探索が可能となった

本技術に関する知的財産権

- ・発明の名称：カルボキシメチルアルギニンの生成阻害剤
- ・出願番号：特願2007-267547
- ・出願人：熊本大学
- ・発明者：永井竜児、藤原章雄、池田剛、野原稔弘

想定される業界

- ・ 想定されるユーザー
化粧品メーカー
医薬品メーカー

実用化に向けた課題

- ・ 現在、CMA生成阻害化合物が繊維芽細胞に対して毒性がないことを確認している。今後、化粧品へ応用するには、皮膚への浸透度評価、あるいは、サプリメントとして摂取するには、吸収性を確認する必要がある。

お問い合わせ先

- ・熊本大学
- ・コーディネーター：津田弘久
- ・TEL：096-342-3145
- ・FAX：096-342-3239
- ・E-mail: tsuda@kcr.kumamoto-u.ac.jp