

学位論文題名

ヒトオステオポンチンの測定用酵素抗体法の開発に関する研究

- 血清オステオポンチンの分子脆弱性について -

学位論文内容の要旨

オステオポンチンは、骨、腎、血管壁、血清、母乳など様々な組織に存在する酸性リン酸糖蛋白であり、その機能として細胞接着や骨におけるリモデリングへの関与、免疫系への関与など多岐にわたり報告され、また、細胞の悪性化との関連も報告されていることより、臨床マーカーとしての有用性の可能性も示唆される。しかし、これまでに報告されているオステオポンチンの研究において、オステオポンチン蛋白そのものの量を測定したものはほとんど見られない。オステオポンチンを臨床的なマーカーとして利用するには、検体中のオステオポンチンの測定系を確立することが必要であり、わが国でもオステオポンチン測定キットの開発が試みられているが、未だに標準化には至っていない。オステオポンチンの測定を困難にしている理由のひとつにオステオポンチンの脆弱性が関与している可能性について報告する。

ヒト初乳よりバリウム吸着法とクロマトグラフィーにて精製した母乳オステオポンチン(以下mOPN)を、家兎膝窩に免疫し、得られた抗血清のIgG分画を抗オステオポンチン抗体(抗mOPN)とした。血清中のオステオポンチン(以下sOPN)は母乳と同様にバリウム吸着法を基に分画した。mOPNおよびsOPNと抗mOPN抗体との反応を、免疫電気泳動法、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動、Western Blot法、サンドイッチEnzyme Immunoassay(EIA)法、mOPN/抗mOPN抗体-抗原抗体反応阻害試験により検討した。

結果として、1) 抗mOPN抗体はmOPNとゲル内沈降反応を示し、この抗体を固層化したサンドイッチEIAによる測定も可能であったが、sOPNはゲル内沈降反応を示さず、またEIAにおける測定も不能であった。2) この抗体はWestern blot法では両オステオポンチンとの反応を示した。ただし、得られたバンドパターンは両者に大きな差を認めた。3) sOPNはゲル内反応で沈降線を形成しなかったが、mOPNと抗体間の沈降反応形成を阻害し、かつ固相化したmOPNの抗体結合も抑制した。

以上の実験結果から、sOPNは抗mOPN抗体に対し、mOPNと明らかに異なる奇異な反応を示すことが明らかになった。この奇異な反応現象について次のように考察した。sOPNが陽性反応を示したWestern blot法はシート上に吸着した抗原と溶液中の抗体を反応させるシステムである。抗原は蛋白質自体の吸着能でシートに固定され安定しており、仮に蛋白質がシート上で小さなフラグメントに分解され、エピトープが極少になったとし

ても、その残されたエピトープと抗体が結合し陽性反応を得ることが可能である。一方、免疫電気泳動法は、沈降性の免疫複合体を認識する方法であり、サンドイッチEIA法は抗原を固相化抗体および標識抗体との双方を反応させる方法で、いずれも多価のエピトープを有する抗原を検出する方法である。また、どちらの方法も抗原は溶解された状態で長い反応時間を要するため、反応途中で抗原が分解されてしまう可能性は高い。仮にsOPNが反応過程で分解を受け、エピトープの乏しい小さな分子となっていた場合、沈降性の大きな抗原抗体複合体の形成ができず、免疫電気泳動法では沈降線として認識されなくなる。同様に、分解を受けた抗原が複数のエピトープ、即ち固相化抗体と反応するエピトープと標識抗体と反応するエピトープの両方を有しなければ、サンドイッチ法では反応物質として認識されないことになる。免疫電気泳動法でsOPNが沈降線を形成しなかったにもかかわらず、mOPNと抗mOPN抗体間の沈降線形成を阻害するのは次のように解釈できる。すなわち、反応過程で分解されてできたsOPNの小さなフラグメントは、抗mOPN抗体と結合するものの、残されたエピトープが乏しいため、沈降線を示すほどの十分な免疫複合体の形成が出来ず、結果として沈降線が認識されない。一方、このフラグメントはエピトープが少ないとはいえ、抗mOPN抗体と反応する抗原活性があるため、mOPNと抗mOPN抗体反応系に加えられると抗原過剰状態（抗体量に比べ抗原量が過剰）になり沈降線は形成されなくなったと考えることが出来る。なお、固相化mOPNプレートを用いたmOPN/抗mOPN抗体阻害試験(EIA)で高濃度のsOPNが阻害活性を示したことは、sOPNとその分解産物には抗mOPN抗体と反応し、それを消費するエピトープがあることを示している。事実、mOPNに比較し、sOPNは短時間の保存、溶血、凍結融解などで容易に小分子が出現し、非常に分子的脆弱性が高いことが、Western blot法およびゲル濾過上で観察される。即ち、このsOPNの脆弱性がEIAによるsOPN測定を困難にする要因、要素と考えられる。またWestern blot法で示したように、分解様式にもmOPNとsOPN間に差を認めた。以上からmOPNとsOPNでは、抗原性、蛋白の安定性において異なった性質を持つと結論した。オステオポンチンは母乳や血液の他にも骨、尿、血管壁と様々な組織に局在しており、今後の測定系の確立において各組織間のオステオポンチンの差異に注目し解析することが必要と考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦

副 査 教 授 西 信 三

副 査 教 授 上 出 利 光

## 学位論文題名

### ヒトオステオポンチンの測定用酵素抗体法の開発に関する研究

#### －血清オステオポンチンの分子脆弱性について－

オステオポンチンは、骨、腎、血管壁、血清、母乳など様々な組織に存在する酸性リン酸糖蛋白であり、その機能として細胞接着や骨におけるリモデリングへの関与、免疫系への関与など多岐にわたり報告され、また、細胞の悪性化との関連も報告されていることより、臨床マーカーとしての有用性の可能性も示唆される。しかし、オステオポンチンを臨床的なマーカーとして利用するには、検体中のオステオポンチンの測定系を確立することが必要であり、わが国でもオステオポンチン測定キットの開発が試みられているが、未だに標準化には至っていない。オステオポンチンの測定を困難にしている理由のひとつにオステオポンチンの脆弱性が関与している可能性について報告する。

ヒト初乳よりバリウム吸着法とクロマトグラフィーにて精製した母乳オステオポンチン（以下mOPN）を、家兎膝窩に免疫し、得られた抗血清のIgG分画を抗オステオポンチン抗体（抗mOPN）とした。血清中のオステオポンチン（以下sOPN）は母乳と同様にバリウム吸着法を基に分画した。mOPNおよびsOPNと抗mOPN抗体との反応を、免疫電気泳動法、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動、Western Blot 法、サンドイッチ Enzyme Immunoassay(EIA)法、mOPN/抗mOPN抗体-抗原抗体反応阻害試験により検討した。結果：1) 抗mOPN抗体はmOPNとゲル内沈降反応を示し、この抗体を固層化したサンドイッチEIAによる測定も可能であったが、sOPNはゲル内沈降反応を示さず、またEIAにおける測定も不能であった。2) この抗体はWestern blot法では両オステオポンチンとの反応を示した。ただし、得られたバンドパターンは両者に大きな差を認めた。3) sOPNはゲル内反応で沈降線を形成しなかったが、mOPNと抗体間の沈降反応形成を阻害し、かつ固相化したmOPNの抗体結合も抑制した。

以上の実験結果から、sOPNは抗mOPN抗体に対し、mOPNと明らかに異なる奇異な反応を示すことが明らかになった。この奇異な反応現象について次のように考察した。

sOPNが陽性反応を示したWestern blot法はシート上に吸着した抗原と溶液中の抗体を反応させるシステムで、抗原は蛋白質自体の吸着能でシートに固定され安定しており、

仮に蛋白がシート上で小さなフラグメントに分解され、エピトープが極少になったとしても、残ったエピトープと抗体が結合し陽性反応を得ることが可能である。一方、免疫電気泳動法は、沈降性の免疫複合体を認識する方法であり、サンドイッチEIA法は抗原を固相化抗体および標識抗体との双方を反応させる方法で、いずれも多価のエピトープを有する抗原を検出する方法である。また、どちらの方法も抗原は液相で長い反応時間を要するため、反応途中で抗原が分解されてしまう可能性は高い。仮にsOPNが反応過程で分解を受け、エピトープの乏しい小さな分子となった場合、沈降性の大きな抗原抗体複合体の形成ができず、免疫電気泳動法では沈降線として認識されなくなる。同様に、分解を受けた抗原が複数のエピトープ、即ち固相化抗体と反応するエピトープと標識抗体と反応するエピトープの両方を有しなければ、サンドイッチ法では反応物質として認識されないことになる。免疫電気泳動法でsOPNが沈降線を形成しなかったにもかかわらず、mOPNと抗mOPN抗体間の沈降線形成を阻害するのは次のように解釈できる。すなわち、反応過程で分解されてできたsOPNの小さなフラグメントは、抗mOPN抗体と結合するものの、残されたエピトープが乏しいため、沈降線を示すほどの十分な免疫複合体の形成が出来ず、結果として沈降線が認識されないが、このフラグメントはエピトープが少ないとはいえ、抗mOPN抗体と反応する抗原活性があるため、mOPNと抗mOPN抗体反応系に加えられると抗原過剰状態になり沈降線は形成されなくなったと考えることが出来る。なお、固相化mOPNプレートを用いたmOPN/抗mOPN抗体阻害試験(EIA)で高濃度のsOPNが阻害活性を示したことは、sOPNとその分解産物には抗mOPN抗体と反応し、それを消費するエピトープがあることを示している。事実、mOPNに比較し、sOPNは短時間の保存、溶血、凍結融解などで容易に小分子が出現し、非常に分子的脆弱性が高いことが、Western blot法およびゲル濾過上で観察される。即ち、このsOPNの脆弱性がEIAによるsOPN測定を困難にする要因、要素と結論できる。またWestern blot法で示したように、分解様式にもmOPNとsOPN間に差を認めた。以上からmOPNとsOPNでは、抗原性、蛋白の安定性において異なった性質を持つと結論した。オステオポンチンは母乳や血液の他にも骨、尿、血管壁と様々な組織に局在しており、今後の測定系の確立において各組織間のオステオポンチンの差異に注目し解析することが必要と考えられる。

公開発表に際し、副査の西教授から、母乳におけるオステオポンチン量と精製における回収量について、EIAにおける蛋白量および単クローン抗体についての質問、ついで副査の上出教授から母乳に存在するオステオポンチンの意義、実験結果の解釈の是非について、特に用いた抗体と抗原の立体構造との関係について、抗原の脱リン酸化を行う理由と意義、血清と血漿での反応の差についての質問があった。また、主査の小林教授から、抗体のquality、特に認識エピトープや抗体の力価と反応性の関係、今後の研究の進展方法についての質問、さらにフローから他の抗体で行った場合の結果についての質問があったが、申請者は、自らの実験結果と文献を引用して概ね妥当な回答をした。

審査員一同は、申請者が多種類の生化学的、免疫的な手法を駆使して、オステオポンチン測定系における奇異な反応現象を解明した点を高く評価し、博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。