

《様式B》

研究テーマ 「胆道閉鎖症早期発見のための MMP-7 の ELISA キット開発を目指した新規抗体作製」

研究責任者 所属機関名 名古屋大学医学部附属病院 小児がん治療センター
官職又は役職 医員
氏 名 加藤 大幾 メールアドレス katodk@med.nagoya-u.ac.jp

共同研究者 所属機関名 名古屋大学大学院医学系研究科小児外科
官職又は役職 教授
氏 名 内田 広夫

共同研究者 所属機関名 名古屋大学医学部附属病院小児外科
官職又は役職 講師
氏 名 城田 千代栄

共同研究者 所属機関名 名古屋大学大学院医学系研究科 希少性・難治性がん解析研究講座
官職又は役職 特任教授
氏 名 檜 顕成

共同研究者 所属機関名 名古屋大学大学院医学系研究科 希少性・難治性がん解析研究講座
官職又は役職 特任講師
氏 名 天野 日出

共同研究者 所属機関名 名古屋大学医学部附属病院 総合周産期母子医療センター 新生児部門
官職又は役職 病院准教授
氏 名 佐藤 義朗

共同研究者 所属機関名 Blue Industries 株式会社
官職又は役職 代表取締役
氏 名 久慈 知明

(令和5年度募集) 第36回 助成研究 完了報告書

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要（1,000 字程度）

※ 産業技術として社会実装の可能性や特許出願（予定も含む）の有無についてもご記載ください。

本研究では、まず、ELISA スクリーニングを行い、抗原および患者血清への反応性を検討した結果、脾臓リンパ球では 14/32 個、リンパ節リンパ球では 6/32 個の陽性クローンが得られた。これら 20 クローンの個体遺伝子を発現ベクターに組み込み、そのプラスミドをトランスフェクションした 293 細胞の培養上清を ELISA でスクリーニングし、MMP-7 を特異的に認識する高親和性のラビットモノクローナル抗体の樹立に成功した。

本研究により既存抗体よりも高精度の抗体が作製できれば、小型検査キットの開発に繋げることができ、微量の血液から手術の必要性を判定できるようになり、60 年以上大きな変化がなかった診断方針を変化させることが可能となる。遠心分離等の大型の検査装置が不要なため、全国のクリニック等で迅速に胆道閉鎖症のスクリーニングが行える。2 週間健診や 1 ヶ月健診で活用されれば、胆道閉鎖症の患児を見落とすことなくスクリーニング可能となり、新ガイドラインが推奨する生後 30 日以内の手術に繋がられ、早期発見・早期治療による予後改善および自己肝生存率の向上が実現できる。患者や家族の生活の質の向上のみならず、診断の遅れによる合併症や肝移植などの追加の医療費を削減できる。また、遠心分離不要な血漿分離技術により MMP-7 を遠心分離せずに全血から測定する手法は独自性が強く、革新的な小型検査技術や分析方法の創出につなげ、東海発の世界的な早期診断可能な医療環境の構築を目指す一歩となる。

MMP-7 新規抗体を用いた ELISA キットが開発できれば、迅速かつ客観的に診断でき、予後改善および自己肝生存率の向上、さらには過疎地を含めた全国でのスクリーニング検査が安価に簡便に実現できると考えられる。

2. 実施内容および成果の説明（A4で、5ページ以内）

【背景】

胆道閉鎖症の予後改善および自己肝生存率の向上には、早期診断、治療が重要である。現在のガイドラインでは、生後30日以内の肝門部空腸吻合術が推奨される。早期発見には淡黄色便に気付くことが重要とされ、母子手帳に便色カラーカードが掲載されているが、これを用いても以前のガイドラインで推奨されている生後60日以内に手術を受けられる患児は全体の約40%に過ぎない。そのため主観的な便色ではなく、低侵襲なバイオマーカーによる客観的なスクリーニング法の開発が喫緊の課題である。

血清 matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) は胆道閉鎖症を感度98%、特異度95%でスクリーニング可能なバイオマーカー候補として注目されているが、正確な測定法が確立されておらず、基準値の検証も十分ではないため実用化には至っていない。

【目的】

本研究では、高親和性の新規MMP-7抗体を用いたELISA（Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay）法を確立し、基準値を設定することでスクリーニング検査法として実用化を目指すことであった。MMP-7の精度を前向きに検証し、スクリーニングマーカーとしてのエビデンスを創出することで、胆道閉鎖症の簡便なマススクリーニング法を開発することを目的とした。

【方法】

本研究では、より特異性の高いキットを開発するために、サンドイッチELISA法を基礎原理とし、高親和性の新規MMP-7ラビットモノクローナル抗体を作製し、抗体ペアを用いた精度の高い測定法を構築中である。

健常児および胆道閉鎖症患児の血清MMP-7を測定し、スクリーニングマーカーとしての精度を前方視的に検証する。

1. 検体の収集

名古屋大学医学部附属病院新生児室及び小児科小児外科病棟に入院中の非胆道閉鎖症患児（出生後10日以内、生後1ヶ月、生後2ヶ月）と胆道閉鎖症患児から血清（採血量500μl/回）および臨床情報を取得する。

2. ELISAアッセイ系の構築

サンドイッチ法では2種類の新規抗体を用いる。片方の抗体（捕捉抗体）をビオチンで標識し、もう片方の抗体（検出抗体）は酵素（ワサビペルオキシダーゼ、富士和光純薬工業株式会社製）で標識する。ビオチン・ストレプトアビジン反応を利用して捕捉抗体をウェルに固相化する。固相化されたウェルに検体を添加し、抗原（MMP-7）を捕捉する。検出抗体を添加し、抗原と反応させる。酵素基質を添加し、発色させ、吸光度を測定して検体中の抗体量を算出する。

3. スクリーニングマーカーとしての有効性の前方視的検討

高親和性のMMP-7新規抗体を用いて構築したELISA法にて、健常児および胆道閉鎖症患児のMMP-7を測定する。基準値を設定し、精度を検討する。

【結果】

1. 非胆道閉鎖症患児 31 検体、胆道閉鎖症患児（葛西手術後で外来通院中も含む）70 検体の血清を収集した。非胆道閉鎖症患児 7 検体、胆道閉鎖症患児 23 検体で、市販のキットを使用して血清 MMP-7 値を測定した。中央値はそれぞれ、非胆道閉鎖症患児 6.93、胆道閉鎖症患児 5.80 であった。

2. 高親和性の MMP-7 新規抗体を用いた ELISA 法の開発状況は下記の通りである。

MMP-7 を高感度で検出するためには、高親和性のモノクローナル抗体が必要である。ラビット抗体は免疫システムと抗体の構造の特徴から、他の動物抗体に比べて非常に高特異性・高親和性であることが知られているため、本研究では MMP-7 に対するラビットモノクローナル抗体を作製することとした。しかし、技術的な問題で融合法ではラビットモノクローナル抗体を作製するのは困難であることから、シングルセル法を用いて抗体作製を進めた。

まず、ラビットに抗原(Human MMP-7 His Tag)を単回免疫し、リンパ節リンパ球の回収を行った。また、複数回免疫後に脾臓リンパ球および末梢血単核細胞の回収を行った。次に免疫前後で回収したラビットの血清サンプル及び各種リンパ球を培養して得た培養上清サンプルを用いて、ラビット個体の免疫応答を確認した。

続いて、セルピッキングシステムにより、抗原を固相化したマイクロチャンバー上でラビットリンパ節リンパ球および脾臓リンパ球をそれぞれ 1 細胞ずつ培養し、分泌された抗体を蛍光標識した 2 次抗体で検出し、それぞれ 20 万個のリンパ球から陽性リンパ球を 32 個ずつ選抜・回収した。この採取した陽性シングルクローンについてシングルセル PCR 法で抗体遺伝子を取得した。全 64 クローンの PCR 産物を 293 細胞にトランスフェクションし、分泌抗体が含まれる培養上清を回収した。

ELISA スクリーニングを行い、抗原および患者血清への反応性を検討した結果、脾臓リンパ球では 14/32 個、リンパ節リンパ球では 6/32 個の陽性クローンが得られた。これら 20 クローンの個体遺伝子を発現ベクターに組み込み、そのプラスミドをトランスフェクションした 293 細胞の培養上清を ELISA でスクリーニングし、MMP-7 を特異的に認識する高親和性のラビットモノクローナル抗体の樹立に成功した。

3. **今後は**、スクリーニングマーカーとしての有効性の検討を行う予定である。