

表面プラズモン共鳴 (SPR) イムノアッセイによるフォリスタチンの迅速定量

日向昌司*・川崎ナナ・日向須美子・太田美矢子・伊藤さつき・早川堯夫

Rapid quantitation of follistatin by surface plasmon resonance (SPR) immunoassay.

Masashi Hyuga*, Nana Kawasaki, Sumiko Hyuga, Miyako Ohta, Satsuki Itoh, and Takao Hayakawa

A simple, rapid, and accurate assay using surface plasmon resonance (SPR) apparatus with anti-follistatin antibody (SPR immunoassay) has been developed for the quantitation of recombinant follistatin. This assay can be performed with a direct injection of conditioned medium; results were obtained within 10 min. The quantitation component of this assay was precise and accurate with a limit of quantitation of 62.5 ng/ml in Ham's F12 medium containing 2% fetal bovine serum. These results demonstrate that SPR immunoassay is a powerful technique for several researches, especially for screening of gene transfectant and monitoring of protein production.

Keywords: follistatin, surface plasmon resonance immunoassay, biotechnology-derived pharmaceuticals, quality evaluation

結 言

組換えタンパク質性医薬品は、その活性発現に糖鎖付加などの翻訳後修飾を必要とするものが少なくなく、翻訳後修飾がされるタンパク質発現系として CHO (Chinese hamster ovary) 細胞などの動物細胞株が宿主細胞として利用されている。組換えタンパク質の安定発現細胞株を樹立するためには、組換えタンパク質発現ベクターを宿主細胞へリポフェクション法などの物理的手法で導入し、染色体内に組み込まれたクローンを選別することが要求される。そのようなクローンが生じる確率は極めて低いが、ベクターに薬剤耐性遺伝子を組み込むことで、組換えが起こったクローンを薬剤耐性クローンとしてスクリーニングすることが可能である。しかし、ランダムに染色体へ組み込まれた結果、完全な組換えタンパク質発現単位を含んでいないことがありうる。さらに、組換えタンパク質発現単位のコピー数や挿入領域は、各クローンにおいて異なるため、導入遺伝子の発現量は、各クローンにおいて著しく異なる。したがって、薬剤耐性クローンから目的の組換えタンパク質高発現クローンのスクリーニングは、重要なステップとなる。

組換えタンパク質高発現クローンのスクリーニングにおいてバイオアッセイは必須であるが、動物個体を必要とするなど、バイオアッセイによる大規模なスクリーニングは容

易でない。したがって、高発現クローンのスクリーニングの初期段階においては、イムノアッセイによる培養上清中の組換えタンパク質の定量が適当な手法である。とりわけ、ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) は、比較的簡便かつ検出感度に優れた方法であるため汎用されてきたが、1) 操作は煩雑で、時間を要する、2) 再現性を得るには、マニュアル操作の場合、ある程度技術的な熟練を要する、3) 自動化するためには、大がかりな装置構築がともなう、4) 培養上清中の濃度測定が可能なサンドイッチ ELISA には、エピトープを異にする 2 種類のモノクローナル抗体もしくはサンドイッチ ELISA が可能なポリクローナル抗体を必要とするなど、いくつかの制限があった。

最近、ELISA の特異的定量法の利点に加え、簡便かつ迅速なアッセイとして、抗体を適用した表面プラズモン共鳴 (SPR) 装置を利用したアッセイ (SPR イムノアッセイ) が注目されはじめた¹⁻³⁾。このアッセイは、リアルタイムに結合量が解析でき、極めて高い再現性を有する。さらに、一種類かつ少量の抗体でセンサーチップを作製でき、一度センサーチップに固定した抗体は繰り返し使用可能で、自動的に解析を行わせることも容易である。しかし、培養上清中のタンパク質を標的とする SPR イムノアッセイの報告は少なく、培養上清を用いた定量の有効性は明確でなかった。

本論文では、肝再生促進薬の候補分子として注目されているフォリスタチン⁴⁻⁵⁾をモデル分子として取り上げ、組換えフォリスタチン産生細胞の培養上清中フォリスタチンを簡便かつ迅速に定量する SPR イムノアッセイを確立した。

* To whom correspondence should be addressed: Masashi Hyuga; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan; Tel:+81-3-3700-9074; Fax:+81-3-3700-9084; E-mail: mhyuga@nihs.go.jp

実験方法

1. 試薬と装置

フォリスタチンは、ヒト組換えフォリスタチン産生CHO細胞から、精製したものをを用いた。抗ヒトフォリスタチン抗体は、R&D systemsより購入した。HBS-EP buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 0.15M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% (v/v), Tween 20), N-hydroxysuccinimide (NHS), N-ethyl-N'-(3-diethylamino propyl)-carbodiimide (EDC), ethanolamine hydrochloride (pH 8.5), およびCM5センサーチップは、BIAcore ABから購入した。

SPRイムノアッセイは、BIAcore2000 (BIAcore AB)を用い、解析はすべて25°Cで行った。

2. センサーチップの作製と評価

NHS (50 mM)/EDC (200 mM) 溶液 (50/50) で10分間活性化させたCM5センサーチップに10 mM 酢酸緩衝液 pH 5に溶解した抗ヒトフォリスタチン抗体をインジェクトし、固定化量を10,000 resonance unit (RU)とした。残存活性基は、ethanolamine (1M) でブロッキングした。

作製したセンサーチップは、フォリスタチンとの結合速度論的解析により評価した。センサーグラムを非線形最小二乗法により curve fitting させ、結合速度定数 (k_{ass}) 及び解離速度定数 (k_{diss}) から、KD (k_{diss}/k_{ass}) を算出した (BIA evaluation software Ver. 3.1, BIAcore AB)。

3. 測定条件

ランニング液: HBS-EP buffer

流速: 100 μl/min

試料量: 250 μl

結合量 (RU): [試料の注入終了1分後のRU] - [試料の注入開始10秒前のRU]

センサーチップの再生: 30 μl の 10 mM HCl-Gly buffer pH 1.5, 1 M NaCl を注入した。

4. 流速の決定

流速 20, 40, 60, 80, 及び 100 μl/ml において、フォリスタチン溶液 (500 ng/ml) を 2.5 分間注入し、結合量を測定した。

5. 検量線の作成

フォリスタチン溶液の2倍希釈系列 (7.8~1,000 ng/ml) をウシ胎児血清含有 Ham's F12 培地を用いて調製した。3系列について結合量を測定し、各フォリスタチン濃度における結合量からフォリスタチンを含まない溶液の結合量を差し引いた値によって検量線を作成するとともに、平均値 (Mean), 標準偏差値 (SD), 回収率 (Mean/調製濃度 x 100), 及び %CV 値 (SD/Mean x 100) を求めた。

6. 培養上清中の濃度測定

ヒトフォリスタチン遺伝子導入CHO細胞株 (CHF2.27株) を 10cm 培養ディッシュにコンフルエントまで増殖させた後、6 ml の 2% ウシ胎児血清含有 Ham's F12 培地で 3 日間培養した培養上清を回収した。0.2 μm フィルターでろ過後、SPR イムノアッセイ及びバイオアッセイに供した。

7. フォリスタチンのバイオアッセイによる定量

フォリスタチンは、アクチビンと複合体 (2:1) を形成することでアクチビンの活性抑制を引き起こすので、アクチビン活性測定系にフォリスタチンを添加し、中和活性をもってフォリスタチン量を求めた。

アクチビン活性は、K562 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイによって測定した⁶⁾。

結 果

1. フォリスタチンセンサーチップの評価

本研究で作製した抗フォリスタチン抗体固定化センサーチップの機能評価を目的とし、速度論的解析を行った結果、解離定数 KD は、 1.72×10^{-9} M と算出された。一般的な抗原抗体間の解離定数は、 10^{-8} M ~ 10^{-10} M であることから、抗フォリスタチン抗体が機能的に固定化されていることが確認された。また、センサーグラムの curve fitting において、結合様式はマストランスファーに適合したことから、十分量の抗フォリスタチン抗体が結合していることが示唆され、作製したセンサーチップは、SPR イムノアッセイを行うのに適当であると評価した。

2. 解析条件の検討

検出感度および解析時間を最適化するために、単位時間あたりの結合量と流速の関係について検討した結果、流速に比例して結合量の増加が観察され、本研究で用いた装置における結合解析時の最高流速である 100 μl/ml において、最も多くの結合量が観察されたので、以降の解析は、流速 100 μl/ml で行うこととした (Fig. 1)。また、注入量は、解析用注入法 (KINJECT) の最大試料量である 250 μl とした。この条件の場合、結合時間は、2.5 分間、試料あたりの解析時間は、センサーチップの再生過程を含め、約 10 分間であった。

これまで報告されている SPR イムノアッセイにおける流速は、5~20 μl/ml 程度で行なわれており、流速の影響は検討されていなかった。最適流速は、固定化した抗体の性質に依存する可能性も排除できないが、高流速によって解析時間あたりの検出感度は増加すると結論付けた。

3. 検量線の作成

血清中には、SPR イムノアッセイで用いるセンサーチップに非特異的に結合する物質が存在し、解析結果に影響を与える。理論上は、抗体を固定化していないチップをブランクと

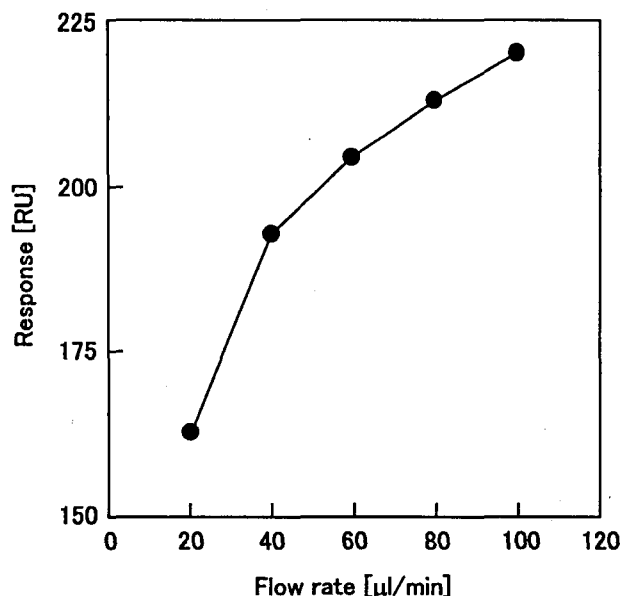


Fig. 1. Effect of flow rate for binding response
Binding responses were determined with 500 ng/ml follistatin in HBS-EP buffer for 2.5 min injection.

し、差し引くことで解消することが期待されるが、実際の結合特性は、抗体を固定化した場合とブランクでは明らかに異なるため、個別の補正が必要となった。

2%ウシ胎児血清含有 Ham's F12 培地を用いて調製したフォリスタチンの 2 倍希釈系列溶液 (7.8 ~ 1,000 ng/ml) について各結合量を測定した。各フォリスタチン濃度における結合量から 2%ウシ胎児血清含有 Ham's F12 培地の結合量 (43 RU) を差し引いた値について解析した結果、各濃度の測定値を基に相関係数 0.997 の検量線が作成された (Fig. 2)。また、定量限界 (CV 値が 20% 以下の最小濃度) は 62.5 ng/ml となり、極めて高い再現性を示し、回収率もほぼ 100% であった (Table 1)。

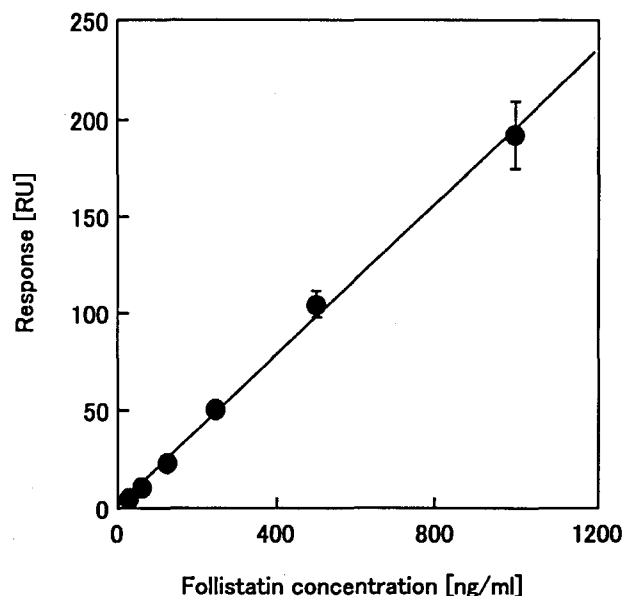


Fig. 2. The standard curve of human follistatin quantitated with SPR immunoassay
Binding responses were subtracted with blank (43 RU). The curve was fitted with a simple fitting (mean \pm SD, $n=3$, $r^2=0.998$).

4. 培養上清中の濃度測定

ヒトフォリスタチン遺伝子を導入した CHO 細胞 (CHF2. 27 株) の培養上清について、SPR イムノアッセイによるフォリスタチン濃度の測定を試みた結果、バイオアッセイから予想された値とほぼ同じ値となった (Table 2)。

以上の結果を総合すると、本研究で確立した SPR イムノアッセイは、組換えタンパク質高発現細胞株のスクリーニングに適用しうる、簡便、迅速かつ正確な手法であることが確認された。

Table 1 Evaluation of the follistatin standard curve

Follistatin [ng/ml]	Response [RU]	Calculated [ng/ml]	%Recovery	%CV
1,000	191.5 \pm 17.6	982.1 \pm 95.2	98.2	9.7
500	103.2 \pm 6.9	531.8 \pm 40.7	106.3	7.7
250	49.6 \pm 2.6	258.4 \pm 18.7	103.4	7.2
125	22.0 \pm 1.1	117.7 \pm 11.1	94.2	9.4
62.5	9.4 \pm 0.4	53.4 \pm 7.5	85.4	14.0
31.3	3.9 \pm 0.2	25.4 \pm 6.5	81.3	25.6

Table 2 Quantitation of recombinant human follistatin in conditioned medium with SPR immunoassay

Measurement	Follistatin [ng/ml]
Bioassay	600
SPR immunoassay	748

考 察

本研究では、フォリスタチンをモデル分子としてSPRイムノアッセイを確立した。SPRイムノアッセイは、ELISAの制限事項であった簡便性、迅速性を克服しており、とりわけ解析時間は、ELISAの数時間～数日間に対し、10分間程度で行えることが可能であった。したがって、組換えタンパク質高発現株のスクリーニング等、従来ELISAで解析されていたことはもとより、培養上清中へ分泌される組換えタンパク質をリアルタイムでモニターすることも可能な方法であると評価される。

SPRイムノアッセイは、基礎的研究にとどまらず、バイオテクノロジー応用医薬品の開発・製造過程における評価⁷⁾、臨床における有効性評価法のひとつとして期待される。すなわち、組換えタンパク質性医薬品やトランスジェニック動物

由来医薬品製造における、高発現株のスクリーニング及び製造過程における恒常性評価、培養・精製・加工等製造工程の恒常性評価、細胞治療薬製造における、治療用細胞の産生する生理活性物質の定量、分泌性タンパク質を分化マーカーとした分化形質の評価等に適した方法であり、さらには、投与後の医薬品の血中や体液中濃度をリアルタイム解析にも発展しうるものと期待される。

文 献

- 1) Wong, R.L., Mytych, D., Jacobs, S., Bordens, R., and Swanson, S.J.: *J. Immunol. Methods*, **209**, 1-15 (1997)
- 2) Deckert, F., and Legay, F.: *Anal. Biochem.*, **274**, 81-89 (1999)
- 3) Zhu, G., Yang, B., and Jennings, R.N.: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **24**, 281-290 (2000)
- 4) Kogure, K., Omata, W., Kanzaki, M., Zhang, Y.Q., Yasuda, H., Mine, T., and Kojima, I.: *Gastroenterology*, **108**, 1136-1142 (1995)
- 5) Kogure, K., Zhang, Y.Q., Kanzaki, M., Omata, W., Mine, T., and Kojima, I.: *Hepatology*, **24**, 361-366 (1996)
- 6) Hashimoto, O., Kawasaki, N., Tsuchida, K., Shimasaki, S., Hayakawa, T., and Sugino, H.: *Cell Signal.*, **12**, 565-571 (2000)
- 7) Hayakawa, T.: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **117**, 1-38 (1999)