

グルカゴン認識ペプチド 並びにグルカゴン検出法

産業技術総合研究所 生命工学領域
健康医工学研究部門 バイオセンシング研究グループ
研究員 重藤 元

2021年9月9日

本発表で紹介する技術

- グルカゴン受容体から抽出したグルカゴン結合ペプチド
- グルカゴン結合ペプチドを用いた簡便かつ特異的なグルカゴン検出方法

背景

- ・ グルカゴンは膵臓の α 細胞から分泌されるペプチドホルモンであり血糖値を上昇させる作用を持つ
- ・ 血糖値のコントロールにはインスリンよりもグルカゴンが重要な役割を担っているとされる「**グルカゴン中心説**」が提唱される等、その重要性は増している

膵島組織の分泌する血糖値制御因子

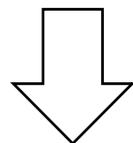


従来技術とその問題点

グルカゴンには類似のアミノ酸配列を有するペプチドホルモンが多数存在しており、抗体を用いたELISAでは正確な測定は困難であった

グルカゴン (血糖値の上昇)	HSQGTFTSDYSKYLDSRR AQDFVQWLMNT	
ミニグルカゴン (不明)	AQDFVQWLMNT	
オキシントモジュリン (食欲の抑制)	HSQGTFTSDYSKYLDSRR AQDFVQWLMNT	KRNRNNIA
グリセンチン (インスリン分泌促進)	RSLQDTEEKSRFSASQADPLSDP	HSQGTFTSDYSKYLDSRR AQDFVQWLMNT	KRNRNNIA

配列の類似性からELISAなどの抗体検出が困難



正確なグルカゴン測定には、特異性が高い検出システムが必要

従来技術とその問題点

保険適応済みグルカゴンELISAキット

2016年12月作成(第1版) 日本標準商品分類番号877449 承認番号22800EZ00083000

この添付文書をよく読んでからご使用下さい。

体外診断用医薬品

グルカゴンキット

Glucagon ELISA 「コスミック」

40100P04 (REF: RB310) 製造販売承認番号 22400AMX01505000

体外診断用医薬品 (放射性)

*2019年4月改訂(第4版)
*2015年10月改訂(第3版)

この添付文書をよく読んでから使用すること。

グルカゴンキット

グルカゴンRIA 「SML」

Glucagon RIA 「SML」

全般的な注意

- 本品は体外診断用医薬品であり、それ以外の目的に使用しないで下さい。
- 本品は再承認品 (RIA法) と比較し測定値が低値であるため、測定値の取扱いには注意して下さい。
- 疾病の診断は、他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断して下さい。
- 添付文書に記載された使用方法以外の使用については、測定値の信頼性を保証しません。
- 操作上で機器を使用する際は、機器の添付文書または取扱説明書をよく読んでから使用して下さい。

測定原理

本品は、ELISA法による血清中のグルカゴンの測定用キットである。抗グルカゴンモノクローナル抗体 (マウス) が予め固相化されたウェルに抗体を入れ、検体中のグルカゴンと反応させる。ペルオキシダーゼ標識抗グルカゴンモノクローナル抗体 (マウス) を加え、固相化された抗体に結合している検体中のグルカゴンと反応させる。洗浄後、基質液 (テトラメチルベンチジン) により発色させ、吸光度を測定することにより検体中のグルカゴン量を測定する。

操作上の注意

- 検体
 - 検体は、EDTA血液 (アプロチニン入り) を用いること。
 - 検体は採血後直ちに冷却適心に室温で分離し、分離後すぐに凍結保存 (-20℃以下) すること。
 - 凍結保存されていた検体は、融解後直ちに使用する

形状・構造等(キットの構成)

No.	構成試薬	96テスト用
1	固相化ウェル: Coated Plate 抗グルカゴンモノクローナル抗体	96ウェル×1包 (96ウェル×12ストライプ)
2	標準	
3	標準	
4	標準	
5	標準	
6	標準	
7	標準	
8	標準	

3. 交差反応性²⁾

物質	反応率 (%)	グルカゴン	反応率 (%)
Glucagon	100%	GIP	N.D.
Glucagon(19-29)	N.D.	GLP-1 (7-36 amide)	N.D.
Oxyntomodulin	10.2%	GLP-1 (1-37)	N.D.
Glicentin (1-61)	22.7%	GLP-2	N.D.
Glicentin (1-69)	17.3%		

体外診断用医薬品
承認番号22800EZ00083000
http://www.cosmic-jpn.co.jp/data/up_img/1485318365-156776.pdf

【全般的な注意】

- 本キットは、体外診断用医薬品でありそれ以外の目的には使用しないこと。
- 診断は他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断すること。
- 添付文書以外での使用方法については保証できない。
- 抗グルカゴン抗血清、¹²⁵I-グルカゴン、希釈液及び標準グルカゴンには、HIV抗体、HBs抗原及びHCV抗体が陰性であることを確認したヒト由来成分が含まれているが、感染の危険性を完全に否定できないので、感染性のあるものとして取り扱うこと。
- 本製品には、保存剤としてアジ化ナトリウムが含まれており、皮膚等を刺激する可能性がある。もし、皮膚や衣服についた時は速やかに水で洗い流すこと。皮膚に炎症を生じた場合は、医師の手当てを受けること。
- RIAを使用する場合は、管理区域内で使用すること。

【形状・構造等 (キットの構成)】

- 抗グルカゴン抗血清 (凍結乾燥品) 52mL用 1本
抗グルカゴンウサギ血清 (ウサギポリクローナル抗体)
- ¹²⁵I-グルカゴン (凍結乾燥品) 52mL用 1本
ヨウ化グルカゴン (H¹²⁵) 28kBq (検定日において)
- 固相第二抗体 11mL 1本
セルロース結合抗ウサギイムノグロブリン (ヤギポリクローナル抗体)
- 希釈液 50mL 1本
- 標準グルカゴン (凍結乾燥品) (1.044pg/mL) 5mL用 1本
- コントロール1 (凍結乾燥品) 2mL用 1本
- コントロール2 (凍結乾燥品) 2mL用 1本

【使用目的】

血清中のグルカゴン量の測定

【測定原理】

グルカゴンRIA 「SML」は、B/F分離に用いたRadioimmunoassayの原理に基づく血清中のグルカゴン量の測定用キットである。グルカゴン抗血清に対してグルカゴンと、検体中のグルカゴンとを競合させ、固相第二抗体を加えてB/F分離を行う。標準品を用いて作成した標準曲線から検体中のグルカゴン量を求める。

【操作上の注意】

- 測定試料の性質、採取法
 - 血液 1mL に対してアプロチニン500KIU及び1.2mgEDTAを含む試験管に血液を採取した後、軽く攪拌し、直ちに冷却適心によって、血漿分離を行う。得られた血漿は凍結保存する。なお、融解後はすみやかに測定に使用すること。
 - 検体の凍結融解は繰り返さない。
 - グルカゴン濃度が522pg/mLを超えることが予想される検体は、あらかじめ希釈液にて希釈して測定する。
- 妨害物質・妨害薬剤

溶血ヘモグロビン及びビリrubinについては測定値への影響が認められるため、溶血血漿、高脂血漿は測定に用いないこと。

ビリrubin - F、ビリrubin - C及びリウマチ因子は下記の濃度まで測定値への影響は認められなかった。

ビリrubin - F: 20mg/dLまで、
ビリrubin - C: 20.3mg/dLまで、
リウマチ因子: 500IU/mLまで
- 交差反応性
 - 国内で実施した交差反応試験*

GLP-1 (1-37)	< 1 × 10 ⁻⁴ %
GLP-1 (7-37)	< 1 × 10 ⁻⁴ %
GLP-1 (7-36amide)	< 1 × 10 ⁻⁴ %
GLP-2	< 1 × 10 ⁻² %
GIP	< 1 × 10 ⁻⁴ %
 - 海外で実施した交差反応試験
 - 腸管ホルモンの交差反応²⁾

豚グルカゴン	100.0%
Gut GLI	< 0.1%
Secretin	< 0.02%
Cholecystokinin-39	< 0.02%
Vasoactive intestinal peptide	< 0.02%

体外診断用医薬品

承認番号22400AMX01505000

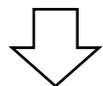
https://www.info.pmda.go.jp/downfiles/ivd/PDF/670977_22400AMX01505000_A_01_04.pdf

ELISAによる測定では類似体への交差性が10-20%程度見られる

グルカゴン結合ペプチドの設計

グルカゴン結合ペプチドの探索とグルカゴン検出プローブの設計

目標：抗体を超える特異性、かつ同等の検出感度



- ・ 類似誘導体との交差性がない
- ・ 抗体と同程度のアフィニティ
- ・ 細胞・生体内での安定性

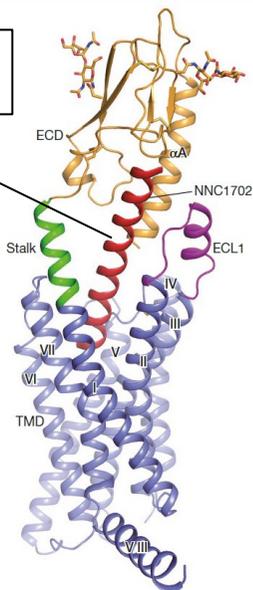


グルカゴン受容体

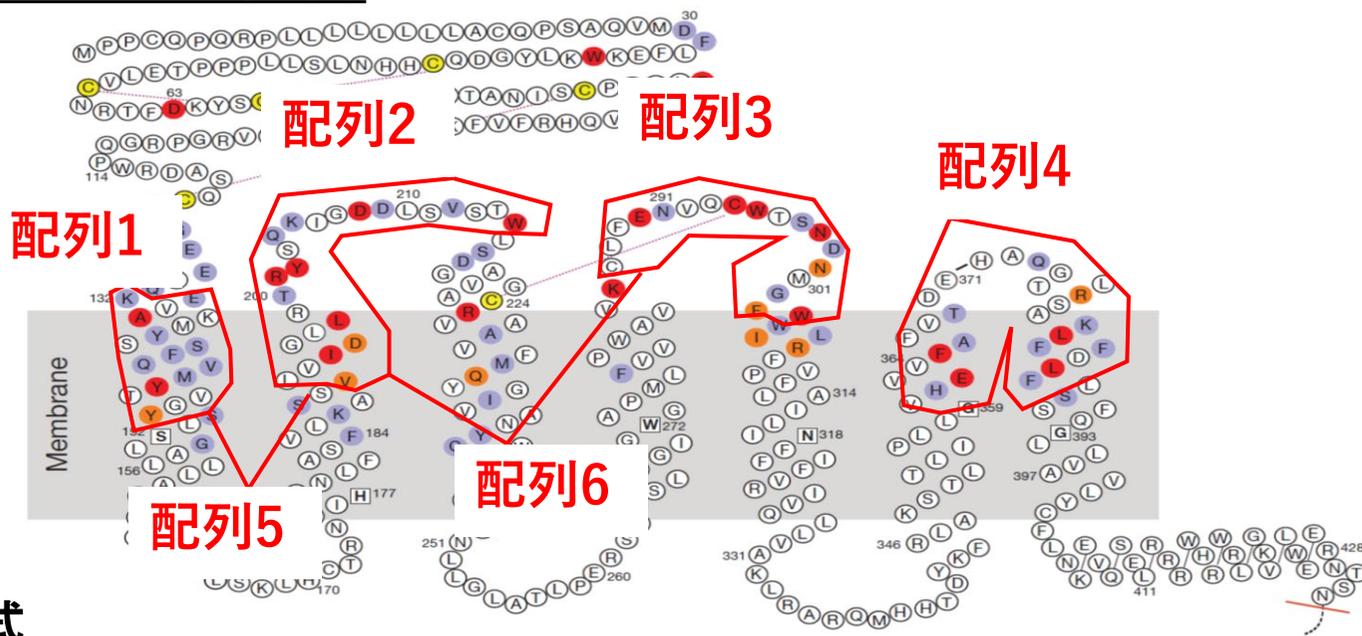
- ・ 生体内において各類似体の特異的に検出
- ・ 生体内 (*in situ*) イメージングに対応可能

1. 受容体配列を利用したプローブ設計

グルカゴン



グルカゴンーグルカゴン受容体結合様式



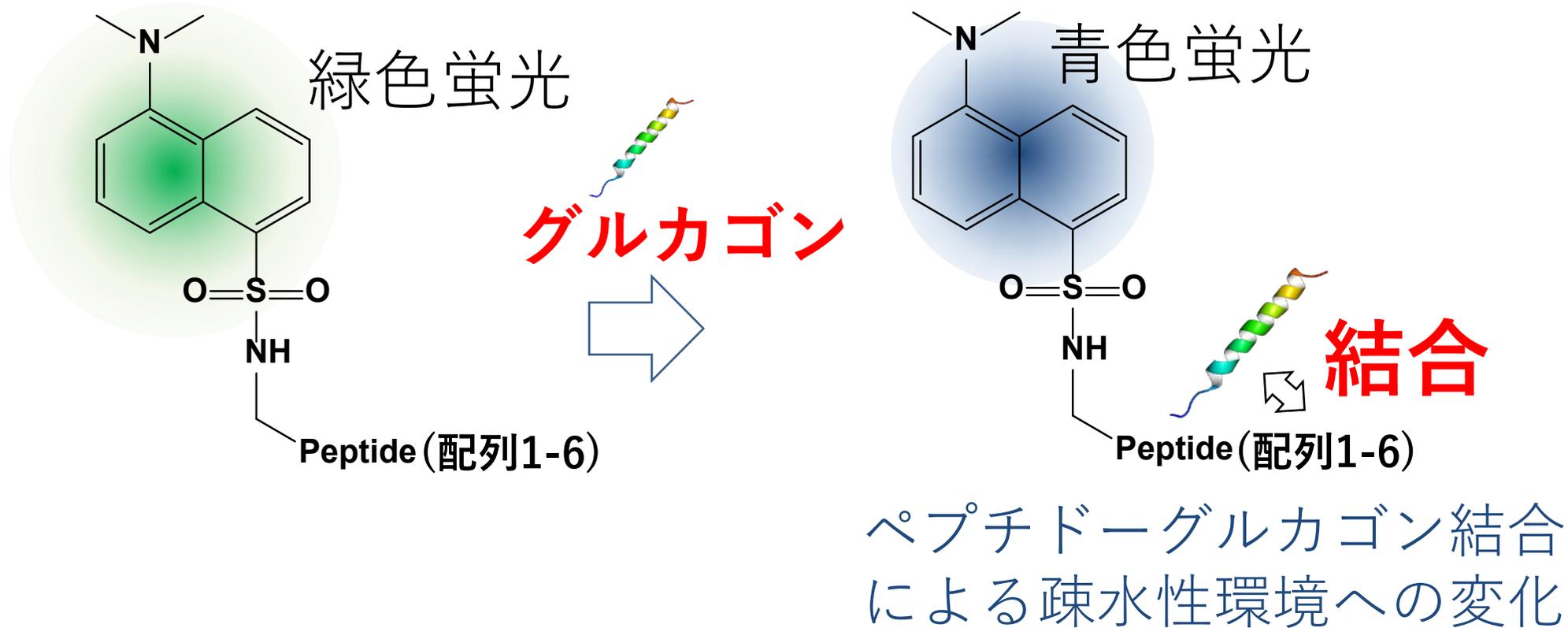
本研究で用いたグルカゴン結合ペプチド候補

	ペプチド配列	AA数
配列1	AEVAAMYSSFQVMYTVGY	18
配列2	VLVIDGLLRTRYSQLAIGDDLSVSTW	25
配列3	KCLFENVQCWTSNDNMGFWWILR	23
配列4	HEVVFAFVTDEHAQGTLRSAALFFDLF	27
配列5	YTVGYIDGLLRTRYSQLAIGDDLSVSTW	27
配列6	KCLFENVQCWTSNDNMGFWDGLLRTRY	28
グルカゴン	HSQGTFTSDYSKYLDNRRAQDFVQWLMNT	29

- ・ 既知のアミノ酸配列からのスクリーニング
- ・ 幾つかの異なる配列の組合せ（3次元的な結合を考慮）
- ・ **グルカゴンのみを検出するための特異性が期待できる**
- ・ 血中の測定のための細胞・生体内における安定性が期待できる
- ・ イメージングで十分に解析可能な高いS/N比が期待できる

グルカゴン結合ペプチドに修飾した、結合環境により波長の変化する蛍光色素

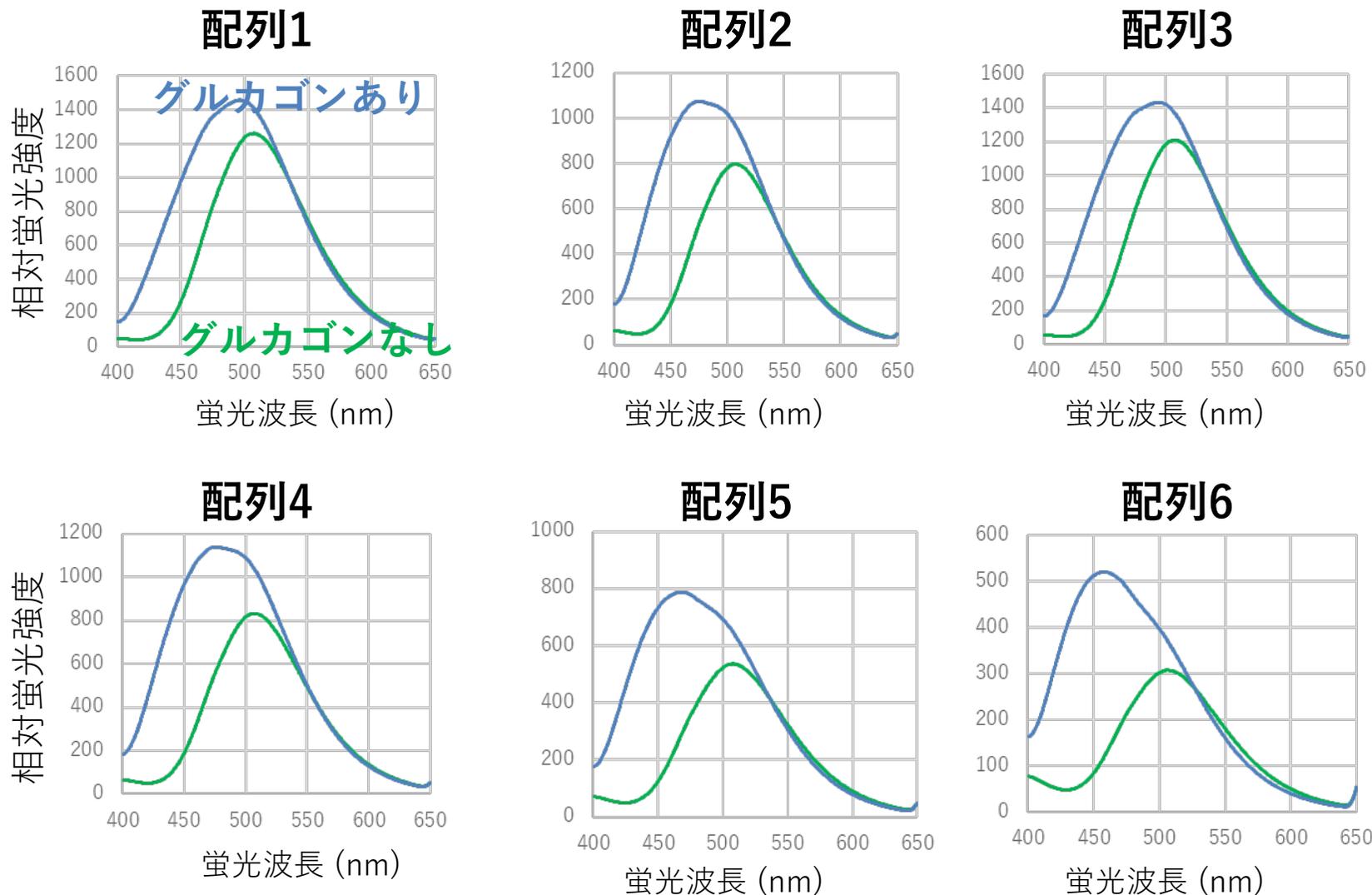
2. 結合環境にตอบสนองする蛍光色素の検討



受容体ペプチドと環境応答性蛍光色素の融合による
特異性の高い、高感度なプローブの開発

新規グルカゴン検出プローブのグルカゴン結合時の蛍光スペクトル

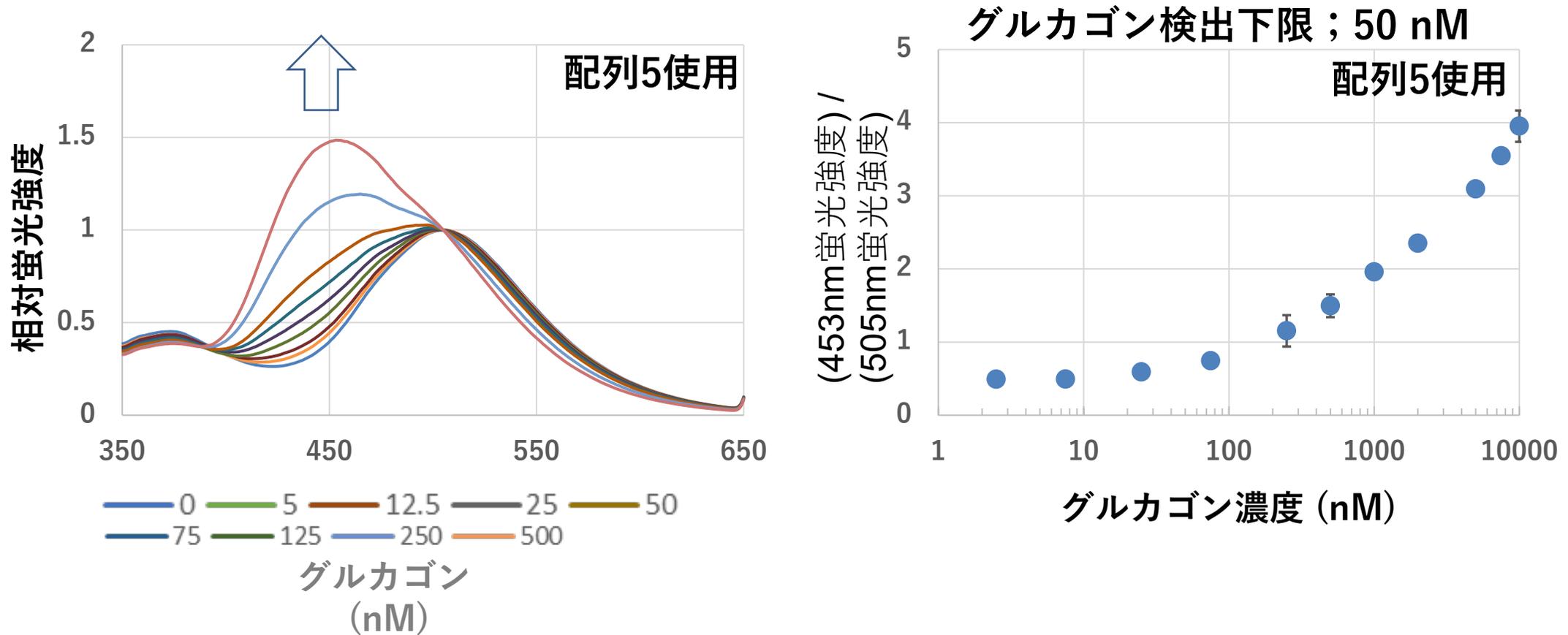
グルカゴンとプローブ反応後の蛍光スペクトル解析結果 (327nm励起)



グルカゴンに対する結合能を有する6種類のペプチド配列による新規プローブを開発

新規グルカゴン検出プローブのグルカゴン検出感度測定

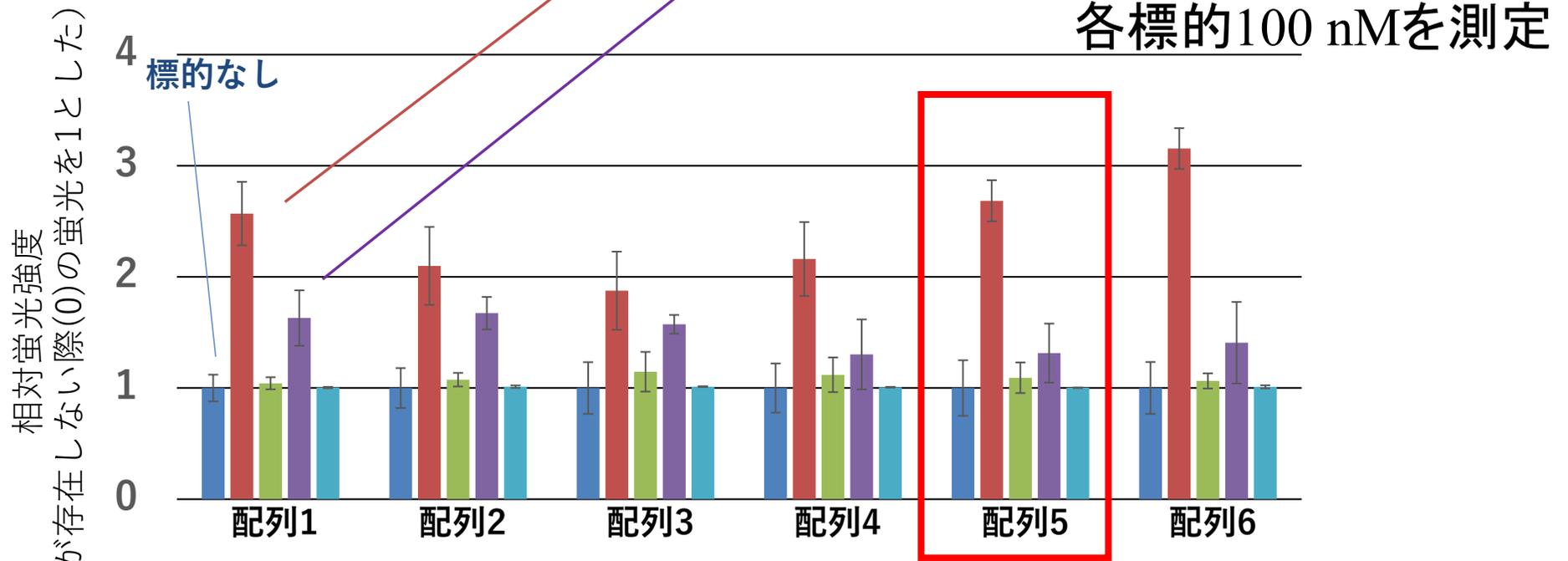
グルカゴンとプローブ反応後の蛍光強度測定結果 (327nm励起)



- ・ グルカゴン濃度依存的なシグナルが観察された
- ・ 検出感度は現状ELISAに及ばない

新規グルカゴン検出プローブのグルカゴン類似体検出 (特異性検討)

- **グルカゴン** (血糖値の上昇)
 - **ミニグルカゴン** (不明)
 - **オキシントモジュリン** (食欲の抑制)
 - **グリセンチン** (インスリン分泌促進)
- HSQGTFTSDYSKYLDSRR AQDFVQWLMNT
 AQDFVQWLMNT
 HSQGTFTSDYSKYLDSRR AQDFVQWLMNT KRNRNNIA
 HSQGTFTSDYSKYLDSRR AQDFVQWLMNT KRNRNNIA



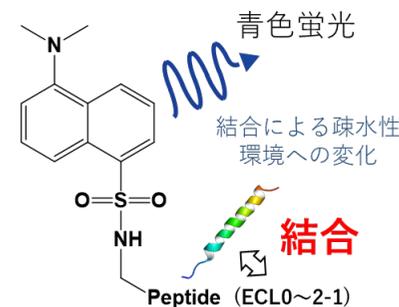
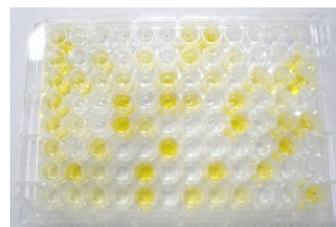
本プローブの交差性 グルカゴン: 100% ミニグルカゴン: 5.4% オキシントモジュリン: 18.6% グリセンチン: 0.1%	ELISAキットの交差性 グルカゴン: 100% ミニグルカゴン: 18% オキシントモジュリン: 24% グリセンチン: 14%
---	--

既存法(ELISA)と比較して**特異性の高いグルカゴン検出が可能**

新技術の特徴・従来技術との比較

- グルカゴンとの結合能を有するペプチドの開発
- 従来法では1日～の測定時間が必要であったが、サンプルとプローブを混合するだけで迅速かつ特異的にグルカゴンを測定が可能

グルカゴン検出方法の比較



	LC-MS/MS	ELISA	プローブによる イメージング
感度	◎	○	△
特異性	◎	△	◎
解析速度	×	△	◎
簡便性	×	△	◎
コスト	×	△	◎

想定される用途

- 簡便なグルカゴン検査
- 健康診断などにおける血液検査の検査項目にグルカゴンを追加
- 研究ツールとして血中グルカゴンのリアルタイムモニタリング

実用化に向けた課題

- 現状検出感度がELISAに及ばないため、より強力にグルカゴンに結合するペプチド配列を検討中
- 血液サンプルなどでも安定的に測定可能な測定条件の最適化
- 蛍光以外の手法(発色など)でも検出可能となるようシグナル産生部位の改良

企業への期待

- 現在医療機関とも共同研究を開始しているが、企業との連携は実現していない。そのためホルモン検査技術に関する製品化の経験(薬事承認など)や、技術を持つ企業との共同研究を希望。
- 研究ツールとしての応用も期待できるため、糖尿病やホルモンの機構解明に興味を持つ企業との共同研究を希望。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : グルカゴン認識ペプチド並びにグルカゴン検出法
- 出願番号 : 特願2019-189244
- 出願人 : 国立研究開発法人産業技術総合研究所
- 発明者 : 重藤 元、鈴木 祥夫、山村 昌平

お問い合わせ先

産業技術総合研究所
知的財産部 技術移転室

TEL 029-862-6158

FAX 029-862-6159

e-mail aist-tlo-ml@aist.go.jp