

平成 21 年 4 月 24 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18590644
 研究課題名 (和文) 過酸化脂質の新しい測定法の開発, およびその感染症病態における関与の解明
 研究課題名 (英文) Development of assay methods for lipid peroxidation products as oxidative stress markers, and their applications to clarify the pathophysiological implication in infectious disorders
 研究代表者
 木村 博子 (KIMURA HIROKO)
 順天堂大学・医学部・准教授
 研究者番号：00053299

研究成果の概要：酸化ストレスマーカーである過酸化脂質, 4-Hydroxy nonenal (HNE) やニトロ化物の 3-nitrotyrosine (NT), 6-nitrotryptophan の時間分解蛍光イムノアッセイを開発し, lipopolysaccharide (LPS) 投与ラット (感染症モデルラット) の心臓・大動脈・腎臓・肝臓・腸管などにおける HNE や他の酸化ストレスマーカーの生成量の測定, 酸化ストレス発生源の同定を行い, その感染症病態における関与の解明を行った. また高血圧を発症した自然発症高血圧ラット (SHR) に持続的な運動を行わせて運動がスーパーオキシドジスムターゼ (Mn-SOD) 合成を増加させて酸化ストレスが減少する仕組みを解明した.

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,700,000		1,700,000
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	510,000	3,910,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：4-ヒドロキシ 2-ノネナル, ニトロチロシン, ニトロトリプトファン,
 睡眠時無呼吸症候群, 酸化ストレス, 時間分解蛍光イムノアッセイ

1. 研究開始当初の背景

4-Hydroxynonenal (HNE)は、多価不飽和脂肪酸に酸化ストレスが作用して生じる過酸化物質である。安定な“酸化ストレスマーカー”として有名であるが、HPLC, GC/MSなど特異性の高い方法では、前処理を要し多検体同時測定が不可能である。また従来のELISAの測定域では、血液・組織の通常レベルの測定が不可能であった。私達はELISAの約100倍の感度を有し、再現性に優れたHNEの時間分解蛍光免疫測定法を開発した。この方法は、新規ユウロピウム(Eu)錯体を標識剤として用い、その蛍光強度を時間分解測定することによって、バックグラウンド蛍光をなくし、高感度で特異性の高い測定を可能にする。私達が開発したHNEの高感度測定法(Kimura H et al.: Rapid increase in serum lipid peroxide 4-hydroxynonenal (HNE) in early endo-toxemia. Free Radic Res. 39:845-851, 2005.)によって、はじめて炎症初期の病態における酸化ストレスの微妙な変化を捉えられるようになった。

2. 研究の目的

本研究は、最も高感度の酸化ストレス(過酸化脂質)マーカーであるHNEの測定法を自ら開発した利点を活かして、さらに新たな高感度酸化ストレスマーカーの測定開発を行うと同時に、初期感染症モデルであるLPS投与ラットを用いて、心臓・大動脈・腎臓・肝臓・腸管などにおけるHNEや他の酸化ストレスマーカーの生成量の測定、酸化ストレス発生源の同定を行い、その感染症病態における関与の解明をすることを目的として開始した。

3. 研究の方法

(1) 動物モデルを使った酸化ストレスの関与に関する研究

全ての実験手順は東京大学実験動物委員会および順天堂大学さくらキャンパス実験動物委員会の承認を得、日本生理学会「生理学領域における動物実験に関する基本的指針」に従った。

(1)-① 初期感染症モデルであるLPS投与ラットを用いて、心臓・大動脈・腎臓・肝臓・腸管などにおけるHNEの生成量の測定、酸化ストレス発生源の同定を行った。細菌の粘膜下侵襲モデルとしてLPS(0.5 mg/kg)を腹腔内投与した4週令の雄SDラットを用い、LPS投与後、24時間まで経時的に、ネブタール麻酔下で屠殺し、心臓血、臓器を採取した。腸管は幽門から約3cmの肛門側の小腸を採取しその粘膜を用いた。腸管粘膜はhomogenizeした後、遠心分離によって1000gと100,000gの沈殿と上清に分画し、HNEを時間分解蛍光イムノアッセイ(TR-FIA)で測定した。免疫組織染色は、十二指腸組織切片に抗ラットImmunoglobulin A (IgA)を反応させ、Eu錯体(DTBTa-Eu³⁺)で免疫蛍光染色した。細胞の核はDAPIで染め2つの蛍光物質の蛍光寿命のちがいを利用して時間分解蛍光顕微鏡で観察した。次にこの標本の内因性のペルオキシダーゼを不活化した後、抗HNE抗体を反応させジアミノベンチジン染色をして光学顕微鏡で観察した。また、LPS投与後の腸管粘液タンパクを、抗ラットIgAを結合させたビーズで免疫沈降し、解離し、単離したタンパクを電気泳動し、抗IgA抗体と抗HNE抗体でブロットした。IgAの抗体活性を調べるには大腸菌(E-coli 2131-01型)

を含んだ液体培地に抗血清や HNE 化された IgA の検体を滴下した後、補体を加えて反応させて、520 nm の吸光度を測定することにより、濁度を測定した。LPS 投与されたラットの肝臓の HNE 化タンパクの同定はカラムクロマトグラフィーによる精製、免疫沈降、ウエスタンブロット法などを用いておこなった。

HNE の測定は時間分解蛍光イムノアッセイで行った。

(1)-② 高血圧を発症した自然発症高血圧ラット (SHR) に 10 週間の持久的運動トレーニングを行わせ同週齢の SHR と、3-ニトロチロシン (NT) 濃度、HNE 濃度の比較検討をおこなった。

1 週間の予備飼育を行った後、SHR の体重および tail-cuff 法による安静時収縮期血圧 (BP98A: ソフトロン, 東京) を測定した。

5 週齢 SHR (5wk 群, 体重 136 ± 6 g, 血圧 149 ± 7 mmHg) および 15 週齢 SHR (15wk 群, 体重 322 ± 9 g, 血圧 198 ± 11 mmHg) 各 10 匹にペントバルビタールナトリウムを体重 1 kg あたり 50mg 腹腔内投与して麻酔し、血液、心臓および足底筋を採取した。他の 15 週齢 SHR は無作為にコントロール群 (25wk Cont 群, 体重 320 ± 10 g, 血圧 196 ± 10 mmHg) および持久的運動トレーニング群 (25wk Ex 群, 体重 318 ± 8 g, 血圧 194 ± 10 mmHg) に 10 匹ずつ分けた。持久的運動トレーニング群の飼育ケージには一周 1 m のカウンター付き回転ホイールが取り付けられており 24 時間自由に運動することができた。持久的運動トレーニング期間は 10 週間とした。

2 日毎に記録した平均走行距離は 4,615m/day であった。トレーニング期間終了後、25wk Cont 群および Ex 群の SHR を麻酔し、血液、心臓および大動脈を採取した。血液サンプルは $3,000 \times g$ で 10 分間遠心し血漿を -80°C で保存した。心臓および大動脈

は液体窒素で急速凍結した後 -80°C で保存した。

(2) 新しい酸化ストレスマーカーの開発および測定装置に関する研究

ニトロトリプトファンの抗体の供与を受け、時間分解蛍光イムノアッセイの開発をおこなない、新しい酸化ストレスマーカーとして使えるかどうかの見当を行った。

また、時間分解蛍光顕微鏡装置を試作し、Eu 蛍光錯体をラベルした抗体を用いて、免疫染色をおこなって酸化ストレスマーカー (ニトロチロシン) を検出した。従来の蛍光物質との差を比較検討した。

体重 1Kg あたり 60 mg のストレプトゾトシンを雄 7 週令 SD ラットに腹腔内投与後、1, 3, 5, 7, 14 日後に腎臓を摘出した。ストレプトゾトシン投与 3 日後と sham の腎臓切片を抗ニトロチロシンウサギ IgG, ビオチン化抗ウサギ IgG 抗体を介して、ストレプトアビジン (SA) 結合 DTBTA-Eu³⁺ および、ストレプトアビジン結合 Alexa Fluoro®488 を用いて免疫蛍光染色した。自製の時間分解蛍光顕微鏡装置用い、時間分解と比較のためには通常の蛍光顕微鏡モードで観察した。

4. 研究成果

(1)-① 初期感染症モデルである LPS 投与ラットを用いて、心臓・大動脈・腎臓・肝臓・腸管などにおける HNE の生成量の測定、酸化ストレス発生源の同定を行った。この結果、(1) 腸管粘膜では形質細胞から分泌される IgA が HNE 化を受け、これによって IgA はポリマー化していること、また、この作用によって大腸菌に対する溶菌能が低下していることがわかった。これは一部、前科学研究費補助金によって研究を行い、

引続き本研究費補助金でも研究を継続した成果である。(発表論文⑨)

一方、肝臓ではLPSによるHNEの産生はNADPH oxidaseの阻害剤であるapocyninや、lipoxygenase, CYP2E1によって阻害された。主に小胞体で酸化ストレスが生じており、GRP 78が52kDaにfragment化し、HNE化を受けていることが推測された。(投稿準備中)

(1)-② 新たにニトロチロシン(NT)とニトロトリプトファンの時間分解蛍光イムノアッセイを開発した。これを用いてHNEの他にNTも新たな酸化ストレスマーカーとして有用であることを以下の研究成果で確認した。自然高血圧発症ラットを用いた実験で、高血圧発症後に運動がどのような効果をもたらすかについて、HNEとNTの測定を行ったところ、心筋、胸部大動脈、運動に関係した骨格筋などで運動後にHNEやNTが下がることが認められた。運動によって酸化ストレスが抑制される現象の一つの理由として、運動に伴う活性酸素除去酵素であるスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)活性の上昇が推測されたので、ウエスタンブロット法でそのタンパクの発現量を調べた。胸部大動脈中のMn-SODは5週令より25週令で減少したが、運動によって回復していることがわかった。心臓でも同様な事実が認められた。またCu, Zn-SODでも同様な変化が認められた。したがって、高血圧発症後の自発走トレーニングはSHRの活性酸素消去能力を向上させることにより、高血圧発症に伴って生じる酸化ストレスおよびニトロ化ストレスを軽減している事が示唆された。今までに、高血圧を発症したSHRにおける運動前後のNTやHNEの測定は報告がなく、私たちの結果はNTやHNEの測定が運動効果の指標として有用であると思われる。今後、運動量や運動の強さとの

解析をおこない、血液中でのHNEの測定が高血圧症のヒトに適切な運動量を示唆できる目安になるように検討をすすめていきたいと考えている。(発表論文⑥およびLife Sci投稿中)

(1)-③ ラット胃潰瘍における酸化ストレス発生の機序についての研究(和歌山県立医大の上山敬司准教授との共同研究) 酸を投与して胃潰瘍を生じさせたラットの胃粘膜での酸化ストレスはHNE-NF-E2-related factor(Nrf2)-Heme oxygenase(HO-1)のpathwayで防御されている仕組みを明らかにした。またたこつば心筋症におけるHO-1とHNE-Nrf2の関連を明らかにした(発表論文①②)

(2) 酸化ストレスが関連しているとされる種々の疾患における酸化ストレスマーカーの測定

(2)-①健康な人(30歳代から70歳代)の血清170検体についてのHNE, NT, ニトロトリプトファンの測定(国立循環器病センターとの共同研究で提供されたヒト血清で酸化ストレスマーカーの測定をおこない、これらのマーカーの男女差, 年代による値の変化を知ることができた。

(2)-② 女性の性周期と精神的なストレスとの関連(奈良女子大の森本恵子教授との共同研究)

若年女性の月経期(late follicular phase, LF-phase)と排卵前期(early follicular phase, EF-phase)では安静時血圧に有意な差がなかったが、心拍数はEF-phaseで高い傾向がみられた。血漿ノルエピネフィリン(NE)濃度はLF-phaseで有意に高かった。NOxは閉経女性で有意に高かった。Stroop Color Word Test(CWT)10分間の負荷時、若年女性、閉経

期女性ともに血圧が上昇したが、閉経女性では拡張期血圧が有意に増加し、安静レベルまで回復するのに時間を要した。心拍数はCWT, HG負荷後上昇したが、若年女性、閉経女性に有意な差はなかった。NEはCWT, HG負荷後、若年女性、閉経女性で上昇し、終了後は安静値にもどった。酸化ストレスの指標としての、HNE濃度は閉経女性の回復期に増大した。これらの結果から、CWTのような精神性ストレス負荷による血圧上昇反応や酸化ストレスの増加は閉経女性の方が若年女性よりも強く、エストロゲンが精神ストレスによる酸化ストレスに深く関与していることが示唆された。(発表論文④)

(3)-① 希土類ラベルと時間分蛍光顕微鏡による生体組織のイメージング
時間分解蛍光顕微鏡とEu蛍光ラベル剤を用いて、ストレプトゾトシン投与ラット腎臓のニトロチロシンを視覚化し、他の蛍光ラベル剤より特異性が非常に優れていることを見いだした。(発表論文⑤)

(3)-② Invader immunoassay の開発
conventional sandwich immunoassay と高感度な DNA detection method を組み合わせた Invader method を開発した。炎症関連マーカーの TNF- α を高感度に測定できた(発表論文③)

5. 主な発表論文等(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

【木村博子】

① Ueyama T, Kawabe T, Hano T, Tsuruo Y, Ueda K, Ichinose M, Kimura H, Yoshida K. Upregulation of Heme Oxygenase-1 in an Animal Model of Takotsubo Cardiomyopathy. *Circ J*. 2009 73:1141-1146. 査読・有.

② Ueda K, Ueyama T, Yoshida KI, Kimura H, 他6名. Adaptive HNE-Nrf2-H01 pathway against oxidative stress is associated with acute gastric mucosal lesions. *Am J Physiol*. 295:460-469;2008. 査読・有.

③ Xie MJ, Fukui K, Horie M, Kimura H, 他3名. A novel sensitive immunoassay method based on the Invader technique. *Anal Biochem*. 374:278-284;2008. 査読・有.

④ Morimoto K, Morikawa M, Kimura H, 他5名. Mental stress induces sustained elevation of blood pressure and lipid peroxidation in postmenopausal women. *Life Sci*. 82:99-107;2008. 査読・有.

⑤ Kimura H, Mukaida M, Watanabe M, 他5名. Quantitative evaluation of time-resolved fluorescence microscopy using a new europium label: Application to immunofluorescence imaging of nitrotyrosine in kidneys. *Anal Biochem*. 372:119-121;2008. 査読・有.

⑥ 古川寛, 木村博子, 向田政博, 他3名. 高血圧発症後の持久的運動トレーニングが自然発症高血圧ラット心臓のニトロ化ストレスに及ぼす影響. *順天堂医学*. 54:308-317;2008. 査読・有.

⑦ Miyaguchi H, Kakuta M, Iwata YT, Kimura H, 他3名. Development of a micropulverized extraction method for rapid toxicological analysis of methamphetamine in hair. *J Chromatogr A*. 1163:43-48;2007. 査読・有.

⑧ Kimura H, Shintani-Ishida K, Nakajima M, 他3名. Ischemic preconditioning or p38 MAP kinase inhibition attenuates myocardial TNF α production and mitochondria damage in brief myocardial

ischemia. Life Sci. 78:1901-1910;2006. 査読・有.

- ⑨ Kimura H, Mukaida M, Kuwabara K, Uchida K, 他4名. 4-Hydroxynonenal modifies IgA in rat intestine after lipopolysaccharide injection. Free Radic Biol Med. 41:973-978;2006. 査読・有.

【内田浩二】

- ① Uchida K. A lipid-derived endogenous inducer of COX-2: a bridge between inflammation and oxidative stress. Mol Cells. 25:347-51;2008. 査読・有.
- ② Uchida K. Lipid peroxidation and redox-sensitive signaling pathways. Curr Atheroscler Rep. 9:216-21;2007. 査読・有.

〔学会発表〕(計 13 件のうち主なもの)

- ① Kimura H, Mukaida M, Mizukami Y, Matsumoto K, Yoshida K, Kon N. Quantification of 4-hydroxynonenal(HNE) induced by lipopolysaccharide in rat liver and identification of the HNE-modified protein, a fragment of GRP78. Biomarkers of Oxidative Stress in Health and Diseases. HSSRC/AIST/NIH Joint International Symposium. January 16-19, 2008. Osaka.
- ② Kimura H, Mukaida M, Mizukami Y, Matsumoto K, Yoshida K, Kon N. Quantification of 4-hydroxynonenal(HNE) induced by lipopolysaccharide in rat liver and identification of the HNE-modified protein, a fragment of GRP78. 7th International Symposium "Advances in LEGAL MEDICINE". Jpn J Legal Med.

62(Suppl):p126;2008. September 1-5, 2008. Osaka.

- ③ Furukawa S, Kimura H, Mukaida M, Kohno H, Ikeda K, Naito H, Kakigi R, Yamakura F. Effect of endurance exercise training after emergence of hypertension on nitrate stress for heart of spontaneously hypertensive rat. 7th World Congress on Aging and Physical Activity. July 26-29, 2008. Tsukuba.
- ④ Morimoto K, Uji M, Morikawa M, Hara Y, Kohno T, Takamata A, Kimura H, Ueyama T, Yoshida K. Function of sex hormones: their roles in the physiological responses to environmental stresses. The 84th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. J Physiol Sci. 57(Suppl): S53; 2007. March 20-22, 2007. Osaka.
- ⑤ Kimura H, Mukaida M, Hashino K, Matsumoto K, Yoshida K. 4-hydroxynonenal(HNE) modifies IgA in rat intestine lipopolysaccharide(LPS) injection. XXth Congress of International Academy of Legal Medicine. August 23-26, 2006. Budapest.

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
木村 博子 (KIMURA HIROKO)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号: 00053299
- (2) 研究分担者
内田 浩二 (UCHIDA KOJI)
名古屋大学大学院・生命農学研究科・准教授
研究者番号: 40203533