

平成21年5月20日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590564

研究課題名（和文） 新規抗体を用いた臨床応用可能な小胞体ストレス検査法の確立

研究課題名（英文） Established the measurements methods of ER stress levels by using our new antibody.

研究代表者

内村 友則（UCHIMURA TOMONORI）

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：20363616

研究成果の概要：

*In vitro* の細胞培養系において、細胞に対する諸ストレス（熱刺激、浸透圧刺激、酸化ストレスなど）負荷により、小胞体ストレスが上昇することを確認した。そのとき、小胞体ストレスの度合いに応じて、細胞表面上に“折れ畳み異常のβ2-ミクログロブリン”の発現の発現上昇がフローサイトメーター、immuno-blot 法により確認された。

*In vivo* の系においても、アデニン負荷、あるいは3/4腎摘出による腎不全モデルマウスにおいて小胞体ストレスが上昇していることを確認し、白血球上に折れ畳み異常のβ2-ミクログロブリンの発現上昇がみられた。

さらに透析など臨床の病態下においても、β2-ミクログロブリンの発現上昇を確認した。

これらの観察は、透析など小胞体ストレスの強い病態における疾患の慢性化、動脈硬化、アミロイド蛋白の蓄積などの病態に関与する可能性が示唆され、新たな診断法や治療法の開発に糸口を与えるものと考えられた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度			
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：小胞体ストレス、酸化ストレス、β2-ミクログロブリン、蛋白折り畳み異常

## 1. 研究開始当初の背景

$\beta 2$ -ミクログロブリンの N 末端 92-99 にあたるペプチドを合成し、これを認識する単クローン抗体を作成した。この抗体を用いてフローサイトメーターで解析したところ、培養細胞や健康人の末梢血白血球の細胞表面上にはこの抗体で認識される  $\beta 2$ -ミクログロブリンは発現が低いものの、特殊な病態下、特に細胞小胞体にストレスとなる細胞刺激でこの抗体で認識される  $\beta 2$ -ミクログロブリン ( $\beta 2$ MG) の発現が細胞表面に増えることをプレリミナリーな実験で観察していた。

## 2. 研究の目的

① “N 末端 92-99 が細胞表面にむき出しになっている  $\beta 2$ MG は、細胞内で蛋白質が生合成される段階における折れ畳み異常が関係しているのではないか”、という作業仮説をたて、それを証明することを目的とした。具体的には、細胞がどのようなストレス、刺激に置かれたときに、折れ畳み異常の  $\beta 2$ MG 発現が見られるかを検討した。

② また、一般的に折れ畳み異常は小胞体ストレス上昇と相関することが報告されていることから、小胞体ストレスの度合いと、折れ畳み異常の  $\beta 2$ -MG の発現の程度に関して検討したい。

③ さらに、動脈硬化、腎不全、糖尿病など種々の疾患において、小胞体ストレス病態の関与の報告があることから、これらの疾患において異常  $\beta 2$ -MG の発現が上昇しているかについて臨床検体（末梢血白血球）を用いて検討した。

## 3. 研究の方法

1) 抗体作製：折れたたみ異常の  $\beta 2$ MG を認識する抗体の作成、並びにこれを利用した細胞実験 i) 抗体作成

N 末端 92-99 のペプチドを免疫し、作成したハイブリドーマから、抗体を精製した (mAb  $\beta 2$ MG92-22 と命名)。

### 2) 白血球刺激

まず、白血球系の細胞株である THP-1 を培養し、ホルボールエステルなどによる酸化ストレス、浸透圧刺激後の mAb  $\beta 2$ MG92-22 に反応するいわゆる折れたたみ異常の  $\beta 2$ MG が増加するかを、フローサイトメーターを用い解析した。

### 3) 小胞体ストレス

小胞体ストレスの増加の程度を GRP78 などの小胞体シャペロンの発現 (蛋白レベル、および、mRNA レベル) で観察した。

### *in vitro* 実験

### 4) 動物モデル

i) 3 腎不マウスにおける異常  $\beta 2$ MG の検出

腎不全モデル (アデニン投与、3/4 腎臓摘出) を作成し、このマウスにおける小胞体ストレスの程度を解析した。小胞体ストレスは、GFP 蛋白を発現する ERAI を使い、血球細胞および、肝臓など種々の臓器の細胞における GFP 蛋白の発現を ELISA で検討した。

#### 5) 臨床病態での解析

小胞体ストレスの関与が報告されている種々の疾患において、患者の末梢白血球細胞表面の折りたたみ異常の $\beta$ 2MGの発現を測定した。方法としては、 $\beta$ 2MGのN末端合成ペプチドに対して作成した単クローン抗体を用いてフローサイトメーター法で解析した。

この異常の $\beta$ 2MGの発現と、小胞体ストレスシャペロン蛋白の発現の程度と比較検討した。

#### 6) 腎不全マウスにおける検討

ERAIマウスを用いて、腎不全モデルを作成し、腎不全において、白血球のほか肝臓、脾臓、筋肉等のGFP発現の上昇がみられ、腎不全において、小胞体ストレスが上昇することを確認した。また、そのときに白血球上のmAb $\beta$ 2MG92-22反応性 $\beta$ 2ミクログロブリンも確認され、両者に関連性があることが示唆された。

### 4. 研究成果

1) 折りたたみ異常の $\beta$ 2MGを認識する単クローン性抗体の作成とその性質：

ハイブリドーマから得られた単クローン性抗体(mAb $\beta$ 2MG92-22)は、正常の $\beta$ 2ミクログロブリンとは反応せず、酸化変性された $\beta$ 2ミクログロブリンに反応性が高いことを確認した。

2) 細胞刺激による折りたたみ異常 $\beta$ 2MGの発現誘導：

THP-1を用いた培養細胞系において、種々の酸化刺激、化学的な小胞体刺激、浸透圧刺激、温熱刺激において細胞内小胞体ストレス関連シャペロンのmRNAおよび蛋白レベルの上昇が認められ、同時に細胞表面の $\beta$ 2ミクログロブリンにおいて、mAb $\beta$ 2MG92-22との反応性が上昇しているのが確認された。

3) 腎不全マウスにおける異常 $\beta$ 2MGの発現上昇と小胞体ストレス

腎不全マウスにおいて末梢白血球上に異常 $\beta$ 2MGの発現をフローサイトメーターで確認しえた。

またこのマウスにおいて白血球のほか、肝臓、腎臓、脾臓、骨格筋においてGFPの発現が上昇しており、小胞体ストレスが亢進していることが示唆された。

#### 4) 臨床患者における解析

腎不全、心筋梗塞、心不全、担癌患者など種々の疾患において、小胞体ストレスが白血球に反映されていないかの確認を行ったところ、GRP78のmRNAレベルで上昇傾向にあることが確認された。また、mAb $\beta$ 2MG92-22反応性の $\beta$ 2ミクログロブリンは、透析者では高いものも確認できたが、その他の疾患では、一定の傾向は今回確認しづらかった。

mAb $\beta$ 2MG92-22反応性の $\beta$ 2ミクログロブリンと、ERストレスの相関性は今後のさらなる検討が必要と思われる。

#### 5) 考察

以上の *in vitro*, *in vivo* (マウス実験と

臨床患者解析) から種々の小胞体ストレス時には、細胞内での $\beta$  2 MGの合成で折れたたみ異常がおき、それが細胞表面に発現することが示唆された。これは透析合併症やアミロイドーシスにおける諸病態(動脈硬化など)の発現、病態の慢性化、続発性炎症などに関係するものと考えられた(図1)。

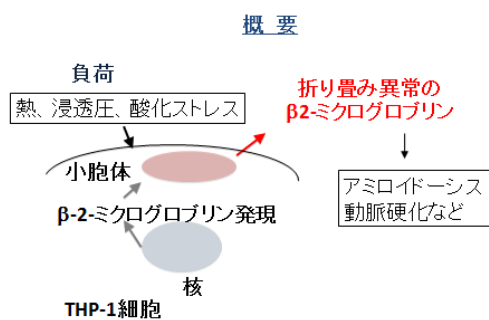


図1

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Sato F, Maruyama S, Hayashi H, Uchimura T et. al High mobility group box chromosomal protein 1 in patients with renal diseases. Nephron Clin Pract. 108. 194-201. 2008

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内村 友則 (UCHIMURA TOMONORI)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教  
研究者番号: 20363616

### (2) 研究分担者

丸山 征郎 (MARUYAMA IKURO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 20082282

橋口 照人 (HASHIGUCHI TERUTO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号: 70250917

### (3) 連携研究者

なし