

機関番号 : 13201
 研究種目 : 基盤研究 (C) 一般
 研究期間 : 2008~2010
 課題番号 : 20590559
 研究課題名 (和文) 一分子蛍光相関法による転写因子 NF- κ B 高感度・迅速検出法開発と救急医療への応用
 研究課題名 (英文) : Development of the hypersensitive and rapid detection method for NF- κ B activation using by Fluorescence Correlation Spectroscopy and its application to the emergency medicine
 研究代表者
 北島 勲 (Isao Kitajima)
 富山大学大学院医学薬学研究部 (医学)・教授
 研究者番号 : 50214797

研究成果の概要 (和文) :

炎症反応の中核を成す転写因子 NF- κ B 活性化状態を病院検査室で利用できる高感度・迅速な計測方法を開発する。本研究は液相における物質のブラウン運動を計測する一分子蛍光相関法を基盤にした応用開発である。救急医療での迅速な対応が要求される全身炎症反応症候群 (SIRS) 病態に関わる NF- κ B 活性化状態の迅速検査法を確立することで SIRS の予後予測と早期対策が期待できる。

研究成果の概要 (英文) :

We have established a novel measurement system for the NF- κ B activity using fluorescence correlation spectroscopy (FCS), which was a methodology to examine the size and number of fluorescence-labeled molecules in a confocal area by direct observation of their Brownian motion in solutions. The principle of the measurement was to detect the different of molecular weights of fluorescent-labeled DNA probe and DNA probe-NF- κ B complex. The elevation of NF- κ B activity reflects the acute inflammation. Measuring the NF- κ B activity in the patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS) would be useful as an inflammatory marker.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野 : 臨床検査

科研費の分科・細目 : 境界医学・7003 (病態検査学)

キーワード : 転写因子、NF- κ B、一分子蛍光相関法、全身炎症反応症候群、救急医療

1. 研究開始当初の背景

申請者は、成人 T 細胞白血病ウイルス Tax 蛋白を介する細胞活性に NF- κ B シグナル機

構の関与を解明したことを契機に、NF- κ B と疾患の分子病態解析をライフワークとするようになっていった

(Science253:1026, 1991, Science258:1792, 1992. J. Biol. Chem. 282:25177, 2007)。次に細菌感染による炎症に重要な Toll like receptor (TLR)の NF-κB 活性化調節機構に関する研究へと展開した。lipopolysaccharide (LPS)過剰産生状態下での TLR2 発現誘導に NF-κB 活性化の異常亢進が必須であることを明らかにし、SIRS 病態に NF-κB 過剰活性化が強く関与することを示した (Infect. Immun. 69:2788, 2001)。最近、敗血症モデルマウスによる NF-κB 活性化の重要性とカスパー制御で SIRS 治療が可能であることを報告した (Cardiovascular Res. 76:132, 2007)。以上を背景に、救急医療に貢献する研究に着手している。現在、本研究遂行のため、以下の特許を申請している。

①国際特許 (PTC/JP2005/2006) [Immune system multifunction disease diagnosis supporting method and diagnosis support information output device], ②国内特許 (特願 2007-177135) [ステロイド感受性の判定方法及び全身性反応症候群の発症予測]

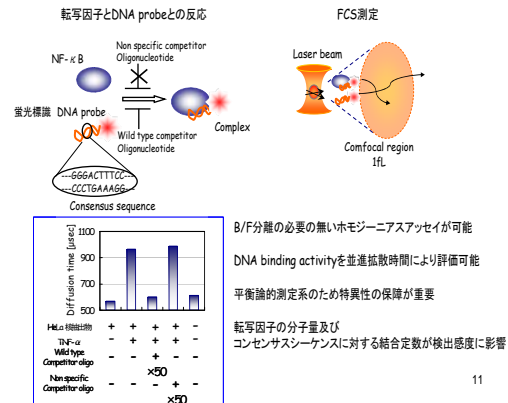
2. 研究の目的

疾患を細胞内シグナル伝達という視点から捉えると、数万種類存在する細胞受容体を解析するには数の上で極めて困難である。そこで、約 2000 種類に情報が集約される転写因子で解析する方が効率的かつ網羅的であると考えた点に学術的特色がある。転写因子解析は RI を用いたゲル・シフトアッセイ法が主流であるが定量性と迅速性に問題がある。本研究は分子間相互作用計測技術の利用により、緊急検査室や手術室に応用できるシステムを開発するという分子医学基礎研究から病院臨床検査へのトランスレーショナル・リサーチであることが特徴である。生体内高分子を測定し、疾患の病態解析や診断・治療判定に応用する研究・開発は時代の潮流となっている。しかし、転写因子活性化

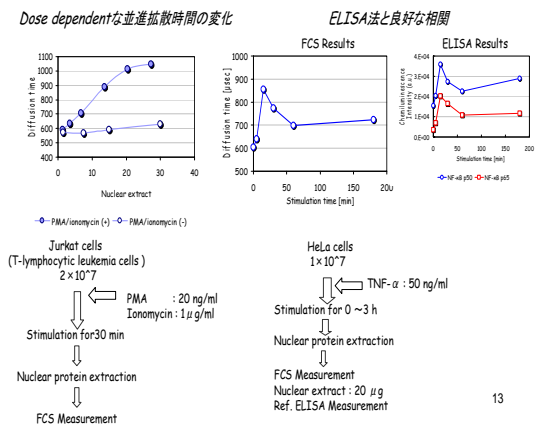
は、細胞質から核への移動やリン酸化等による修飾性を解析するため、蛋白質質量分析法とくに MALDI/TOF MS 方式では応用が難しい。そこで、高感度蛋白相互作用を解析するために最近開発され材料研究領域で注目されている分子間相互作用分析装置を医療分野に応用した点と生体内反応は「固相」でなく「液相」であることに注目し、液相反応系を原理とする FCS が転写因子測定に最も適していると考えた点が独創的な点である

3. 研究の方法

転写因子プロファイリング技術 ~FCSを用いた転写因子活性測定~



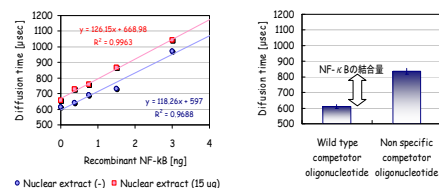
転写因子プロファイリング技術 ~FCSを用いた転写因子活性測定~



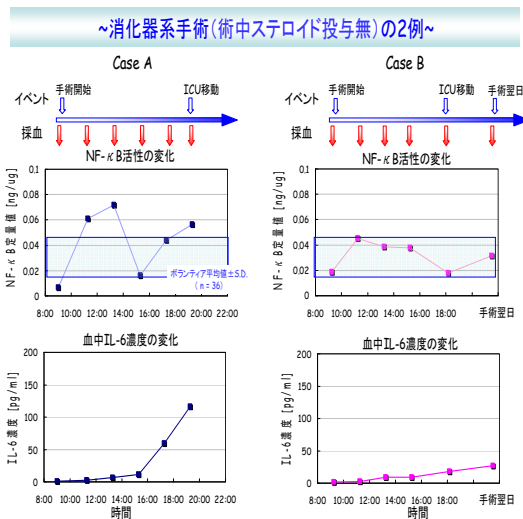
4. 研究成果

転写因子プロファイリング技術 ~NF-κBの定量法~

2種類の非特異競争相容体を用いてNF-κBの結合に相当するシグナル変化から定量が可能



*1: 検体は Jurkat 細胞 (Human leukemic monocyte lymphoma cell line) より調製
*2: Triplicateで測定を行い定量値±S.D.で表記



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

- 1) Yoshioka K, Kitajima I, Kabata T, Tani M, Kawahara N, Murakami H, Demura S, Tsubokawa T, Tomita K: Venous thromboembolism after spinal surgery: Changes of the fibrin monomer complex and D-dimer level during the perioperative period. *Journal of Neurosurgery. Spine* 13(5):594-599,2010 (査読有)
- 2) Tsuboi Y, Kurimoto M, Nagai S, Hayakawa Y, Kamiyama H, Hayashi N, Kitajima I, Endo S: Induction of autophagic cell death and radiosensitization by the pharmacological inhibition of nuclear factor-kappa B activation in human glioma cell lines. *J. Neurosurg.* 110(3):594-604, 2009 (査読有)
- 3) Tamura N, Kitajima I, Kawamura Y, Toda E, Eguchi Y, Ishida H, Goto S: Important regulatory role of activated platelet-derived procoagulant activity in the propagation of thrombi formed under arterial blood flow conditions. *Circ J.* 73(3):540-548,2009 (査読有)
- 4) Katayama Y, Kitajima I, Niimi H, Kitahara H, Kawai H: Diagnosis of cerebral cortical vein thrombosis with T2*-weighted magnetic resonance imaging. *Brit Med J Case Reports* 2009[doi:10.1136/bcr.03.2009.1651] (査読有)
- 5) Hatakeyama N, Sakuraya F, Matsuda N, Kimura J, Kinoshita H, Kemmotsu O, Yamazaki M, Hattori Y: Pharmacological significance of the blocking action of the intravenous general anesthetic propofol on the slow component of cardiac delayed rectifier K⁺ current. *J. Pharmacol Sci.* 110:334-343, 2009 (査読有)
- 6) Kinoshita H, Hatakeyama N, Minonishi T, Hatano Y: severity of obstructive sleep apnea syndrome may affect postoperative hypoxemia in morbidly obese patients. *Anesth Analg* 108:1044, 2009(査読有)
- 7) Wang J, Xu Z, Kitajima I, Wang Z: Effects of different statins on endothelial nitric oxide synthase and AKT phosphorylation in endothelial cells. *International Journal of Cardiology* 127(1):33-39, 2008 (査読有)
- 8) Nakahata K, Kinoshita H, Ishida Y, Matsuda N, Hatakeyama N, Kondo T, Hatano Y: Cholinesterase inhibitor donepezil dilates cerebral parenchymal arterioles via the activation of neuronal nitric oxide synthase. *Anesthesiology* 109:124-129, 2008 (査読有)
- 9) Kamiyama K, Matsuda N, Yamamoto S, Takano K, Takano Y, Yamazaki H, Kageyama SI, Kokoo H, Nagata H, Hatakeyama N, Tsukada K, Hattori Y:

Modulation of glucocorticoid receptor expression, inflammation and cell apoptosis in septic guinea-pig lung using methylprednisolone. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 259:L998-L1006, 2008 (査読有)

- 10) Kinoshita H, Matsuda N, Hatakeyama N, Azma T, Kuroda Y, Tange K, Hatano Y: Role of phosphatidylinositol 3-kinase and NADHP oxidase in ATP-sensitive K⁺ channel function impaired by high glucose in the human artery. Hypertension, 52:507-513, 2008 (査読)

[学会発表] (計 5 件)

- 1) Kitajima I: Anti-inflammatory effect of pitavastatin on NF- κ B activated TNF- α through Rho kinase pathway in breast cancer cells. Keystone Symposia 2010 NF- κ B in inflammation and Disease, 2010, 1.5-1.10, Santa Fe, USA
- 2) Harada K, Kitajima I: Nuclear factor- κ B activity correlates with metabolic syndrome-related biomarkers in patients with essential hypertension. 2010 AACC (American Association for Clinical Chemistry) Annual Meetin, 2010, July 25-29, Anaheim, CA, USA
- 3) Niimi H, Kitajima I: Fastest ID system for detecting septic bacteris. 2009 Bio International Convention. The Global event for Biotechnology. 2009, 5,18-21, Atlanta, USA
- 4) Kitajima I: Role of Nuclear factor- κ B (NF- κ B) in tumor progresion. The 1st International traditional chinese medicine (TCM) and Interative Medicine Oncology Formum. 2008, 10,18, Shanghai, China.
- 5) Kitajima I, Note R, Ogawa T, Abe S, Kadowaki M, Yamagata K: A new assay for NF- κ B activity in biological samples

using fluorescence correlation spectroscopy and its application to perioperative cardiac monitoring.2008 Keystone symposia NF- κ B. 2008, 2、12-17, Banff, Canada

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他] ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北島 勲 (ISAO KITAJIMA)

富山大学大学院医学薬学研究部・教授

研究者番号 : 50214797

(2) 研究分担者

仁井見 英樹 (HIDEKI NIIMI)

富山大学附属病院検査部・副部長, 助教

研究者番号 : 50401865

畠山 登 NOBORU HAKAKEYAMA)

富山大学附属病院手術部・副部長

准教授)

研究者番号 : 70251907