

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月10日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390184

研究課題名（和文） 疾患バイオマーカーとしての酸化修飾トランスサイレチンの同定とその測定法の確立

研究課題名（英文） Detection and measurement of transthyretin with oxidative modification as a biomarker for disease prevention

研究代表者

吉川 敏一（YOSHIKAWA TOSHIKAZU）

京都府立医科大学・医学（系）研究科・学長

研究者番号：60128725

研究成果の概要（和文）：質量分析計による血清蛋白質プロファイル解析により見出したトランスサイレチンの酸化修飾体であるシステイニル化トランスサイレチン（Cys-TTR）の疾病予防試験におけるバイオマーカーとしての意義を明らかにし、Cys-TTRに対するモノクローナル抗体を作製し、簡易測定技術の基盤を確立した。

研究成果の概要（英文）：Clinical significance of serum transthyretin with oxidative modification was investigated in order to use it as a molecular biomarker for the disease prevention study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,120,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査医学

キーワード：トランスサイレチン、メタボリックシンドローム、血清蛋白質プロファイル、バイオマーカー、糖尿病

1. 研究開始当初の背景

生活様式の欧米化に伴いわが国におけるメタボリックシンドロームは著明に増加しており、その対策・予防は緊急を要する国家的課題である。近年の基礎分子化学的研究により、ストレスや高血糖に伴う酸化反応やメイラード反応がメタボリックシンドロームの病態に関与することが明らかになりつつある。蛋白質の量的変化ではなく、活性酸素や活性窒素種による蛋白質の酸化的翻訳後修飾が種々の生命現象へ関与している可能

性を考え、プロテオミクス解析を進めており、特に、酸化反応やメイラード反応による翻訳後修飾蛋白質のプロテオミクス解析技術においては、ソフト、ハードともに、われわれを含めたわが国の研究者がリードする分野である。前試験において、メタボリックシンドローム動物モデル（Otsuka Long Evans Tokushima Fatty : OLETF ラット）を用いた血清蛋白質プロファイル解析により、糖尿病発症前期において上昇し、その後の糖尿病発症を予測するバイオマーカーとして、トラン

スサイレチンの酸化修飾体である「システイニル化トランスサイレチン (Cysteinylated Transthyretin: Cys-TTR)」を同定した。

2. 研究の目的

本研究では、糖尿病、動脈硬化性疾患発症前段階のいわゆる「未病期」を診断できるバイオマーカー（疾病発症リスクマーカー）を用いた科学的評価手法を構築し、各種介入試験の効能を正しく立証することで予防医学を普及させ、国民の健康増進・生活習慣病予防を進めることを目的としている。具体的目的は、①Cys-TTRの修飾反応の分子機構を解明し、メタボリックシンドロームの病態への関与を明らかにすること、②ヒト臨床検体を用いた横断的研究を行いその臨床的意義を明らかにすること、③Cys-TTRの糖尿病、メタボリックシンドローム発症に対する予防介入試験におけるバイオマーカーとしての有用性を評価すること、④モノクローナル抗体を使用した簡易型Cys-TTR測定法を確立すること、である。

3. 研究の方法

1 研究計画1：Cys-TTRの分子機構に関する基礎的検討

Cys-TTRは、TTRに対する酸化ストレスにおいてCys¹⁰のアミノ酸側鎖がS-チオール化を受けた後に、cysteinyl-glycineペプチドなどが付加した可能性が高いために、Cys-TTRは生体における酸化ストレスマーカーとなっていることを証明する。さらに、グルタチオン(GSH)による付加反応によりglutathionylated-TTRも生成している可能性が高いため、同修飾体についても評価する。翻訳後修飾を受けたTTRの同定には質量分析計を中心とした解析を進めていく。具体的には、ラットあるいはヒト血清を用いたin vitro実験系において、過酸化水素などによる酸化ストレス負荷状態においてどのような修飾を受けたTTRが生じているかを質量分析計を中心としたプロテオミクス解析により明らかにする。さらに、Cys-TTR修飾蛋白質の生成を抑制、制御可能な低分子抗酸化剤を中心に探索する。すでにわれわれが有効性を確認している機能性食品因子（アスタキサンチン、食物繊維など）による介入試験を行い、Cys-TTRがメタボリックシンドロームに対する有効性を未病段階で評価できるバイオマーカーとなりうるかどうかについて評価する。

2 研究計画2：Cys-TTR測定法の確立

システイニル化部位を含む15残基のペプチドを合成し、システイニル化を行い、Cys-TTRペプチドを得る。これをキャリアー蛋白質に結合し、抗原とする。既報に従い、

モノクローナル抗体を作製する。さらに、システイニル化部位を含む10残基のペプチドも合成しており、システイニル化部位がジスルフィド結合ではなくチオエステル結合された、アスパラギン酸化トランスサイレチンペプチドを合成した。これをキャリアー蛋白質に結合し、抗原として、同様にモノクローナル抗体作製を実施する。

3 研究計画3：Cys-TTRの臨床的意義

当初の研究では血清中Cys-TTRは糖尿者において有意に増加することを見いだしていた。その後、同Cys-TTRは動物モデルでも同定されており、本研究では生活習慣に関与する種々の疾患群でどのような変化となっているかを臨床的に明らかにする。メタボリックシンドロームに対する介入試験におけるCys-TTRの科学的評価の有用性について検討する。Cys-TTRは動物モデルOLETFラットに対して食物繊維を摂取させた長期試験において、糖尿病発症前に上昇し、食物繊維摂取によりその上昇が抑制された蛋白質としてSELDI-TOF-MSにより同定されたマーカーである。よって、ヒト臨床試験においても同様の試験を計画している。

4. 研究成果

- ① メタボリックシンドローム動物モデルOLETFラットにおいては糖尿病発症前に血清Cys-TTRが有意に上昇することを見だし、食物繊維の摂取は糖尿病発症に対する遅延作用があるだけでなく、血清Cys-TTRの上昇を有意に抑制することを明らかにした。
- ② 機能性食品因子（アスタキサンチン、食物繊維など）による介入試験を行い、Cys-TTRがメタボリックシンドロームに対する有効性を未病段階で評価できるバイオマーカーとなりうるかどうかについて評価した。
- ③ 疾病予防バイオマーカーであるアポリポプロテインA2、A1、C2のELISAシステムを試作し、その定量性について確認し、アゾポリマーチップ基盤を用い、抗マウス抗体をジョイント抗体として利用し、ジョイント抗体を利用して、酸化ストレスマーカーに特異的なモノクローナル抗体とともに疾患予防バイオマーカーに特異的なモノクローナル抗体のインプリンティングのための普遍的な技術の確立を行った。
- ④ 量子ドット標識ストレプトアビジンを抗体チップ上で化学発光を測定する機器をライトキャプチャー装置を利用して試作した。

- ⑤ 健常人ボランティアに対して食物繊維摂取臨床試験を実施し, Cys-TTR の変動を確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計23件)

- ① Aoi W, Takanami Y, Kawai Y, Otsuki T, Kawake T, Naito Y, Yoshikawa T. Relaxant effect of microtitan via regulation of autonomic nerve activity in mice. *Life Sci* 2009;85:408-11. DOI:10.1016/j.lfs.2009.07.007
- ② Harusato A, Naito Y, Takagi T, Yamada S, Mizushima K, Hirai Y, Horie R, Inoue K, Fukumoto K, Hirata I, Omatsu T, Kishimoto E, Uchiyama K, Handa O, Ishikawa T, Kokura S, Ichikawa H, Muto A, Igarashi K, Yoshikawa T. Inhibition of Bach1 ameliorates indomethacin-induced intestinal injury in mice. *J Physiol Pharmacol* 2009;60 Suppl 7:149-54. URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20388958
- ③ Naito Y, Takagi T, Oya-Ito T, Okada H, Suzuki T, Hirata I, Hirai M, Uchiyama K, Handa O, Uchida K, Yoshikawa T. Impaired gastric ulcer healing in diabetic mice: role of methylglyoxal. *J Physiol Pharmacol* 2009;60 Suppl 7:123-30. URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20388955
- ④ Naito Y, Yoshikawa T. Oxidative stress-induced posttranslational modification of proteins as a target of functional food. *Forum Nutr* 2009;61:39-54. DOI:10.1159/000212737
- ⑤ Omatsu T, Naito Y, Handa O, Hayashi N, Mizushima K, Qin Y, Hirata I, Adachi S, Okayama T, Kishimoto E, Takagi T, Kokura S, Ichikawa H, Yoshikawa T. Involvement of reactive oxygen species in indomethacin-induced apoptosis of small intestinal epithelial cells. *J Gastroenterol* 2009;44 Suppl 19:30-4. DOI: 10.1007/s00535-008-2293-3
- ⑥ Takagi T, Naito Y, Inoue M, Akagiri S, Mizushima K, Handa O,

Kokura S, Ichikawa H, Yoshikawa T. Inhalation of carbon monoxide ameliorates collagen-induced arthritis in mice and regulates the articular expression of IL-1beta and MCP-1. *Inflammation* 2009;32:83-8. DOI: 10.1007/s10753-009-9106-6

- ⑦ Takagi T, Naito Y, Okada H, Ishii T, Mizushima K, Akagiri S, Adachi S, Handa O, Kokura S, Ichikawa H, Itoh K, Yamamoto M, Matsui H, Yoshikawa T. Lansoprazole, a proton pump inhibitor, mediates anti-inflammatory effect in gastric mucosal cells through the induction of heme oxygenase-1 via activation of NF-E2-related factor 2 and oxidation of kelch-like ECH-associating protein 1. *J Pharmacol Exp Ther* 2009;331:255-64. DOI: 10.1124/jpet.109.152702

- ⑧ Aoi W, Naito Y, Mizushima K, Takanami Y, Kawai Y, Ichikawa H, Yoshikawa T. The microRNA miR-696 regulates PGC-1{alpha} in mouse skeletal muscle in response to physical activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;298:E799-806. DOI: 10.1152/ajpendo.00448.2009

- ⑨ Aoi W, Naito Y, Takagi T, Kokura S, Mizushima K, Takanami Y, Kawai Y, Tanimura Y, Hung LP, Koyama R, Ichikawa H, Yoshikawa T. Regular exercise reduces colon tumorigenesis associated with suppression of iNOS. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;399:14-9. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.07.023

- ⑩ Omatsu T, Naito Y, Handa O, Mizushima K, Hayashi N, Qin Y, Harusato A, Hirata I, Kishimoto E, Okada H, Uchiyama K, Ishikawa T, Takagi T, Yagi N, Kokura S, Ichikawa H, Yoshikawa T. Reactive oxygen species-quenching and anti-apoptotic effect of polaprezinc on indomethacin-induced small intestinal epithelial cell injury. *J Gastroenterol*

- 2010;45:692-702. DOI: 10.1007/s00535-010-0213-9
- ⑪ Takagi T, Naito Y, Okuda T, Uchiyama K, Adachi S, Mizushima K, Handa O, Kokura S, Ichikawa H, Yoshikawa T. Ecabet sodium promotes the healing of trinitrobenzene-sulfonic-acid-induced ulceration by enhanced restitution of intestinal epithelial cells. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25:1259-65. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2010.06263.x
- ⑫ Uchiyama K, Naito Y, Takagi T, Mizushima K, Hayashi N, Harusato A, Hirata I, Omatsu T, Handa O, Ishikawa T, Yagi N, Kokura S, Yoshikawa T. Carbon monoxide enhance colonic epithelial restitution via FGF15 derived from colonic myofibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391:1122-6. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.12.035
- ⑬ Aoi W, Naito Y, Hang LP, Uchiyama K, Akagiri S, Mizushima K, Yoshikawa T. Regular exercise prevents high-sucrose diet-induced fatty liver via improvement of hepatic lipid metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;413:330-5. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.08.097
- ⑭ Aoi W, Takanami Y, Kawai Y, Morifuji M, Koga J, Kanegae M, Mihara K, Yanohara T, Mukai J, Naito Y, Yoshikawa T. Dietary whey hydrolysate with exercise alters the plasma protein profile: a comprehensive protein analysis. *Nutrition* 2011;27:687-92. DOI: 10.1016/j.nut.2010.06.004
- ⑮ Kishimoto E, Naito Y, Handa O, Okada H, Mizushima K, Hirai Y, Nakabe N, Uchiyama K, Ishikawa T, Takagi T, Yagi N, Kokura S, Yoshida N, Yoshikawa T. Oxidative stress-induced posttranslational modification of TRPV1 expressed in esophageal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;301:G230-8. DOI: 10.1152/ajpgi.00436.2009
- ⑯ Oya-Ito T, Naito Y, Takagi T, Handa O, Matsui H, Yamada M, Shima K, Yoshikawa T. Heat-shock protein 27 (Hsp27) as a target of methylglyoxal in gastrointestinal cancer. *Biochim Biophys Acta* 2011;1812:769-81. DOI: 10.1016/j.bbadis.2011.03.017
- ⑰ Takagi T, Naito Y, Okada H, Okayama T, Mizushima K, Yamada S, Fukumoto K, Inoue K, Takaoka M, Oya-Ito T, Uchiyama K, Ishikawa T, Handa O, Kokura S, Yagi N, Ichikawa H, Kato Y, Osawa T, Yoshikawa T. Identification of dihalogenated proteins in rat intestinal mucosa injured by indomethacin. *J Clin Biochem Nutr* 2011;48:178-82. DOI: 10.3164/jcbrn.10-93
- ⑱ Takagi T, Naito Y, Uchiyama K, Suzuki T, Hirata I, Mizushima K, Tsuboi H, Hayashi N, Handa O, Ishikawa T, Yagi N, Kokura S, Ichikawa H, Yoshikawa T. Carbon monoxide liberated from carbon monoxide-releasing molecule exerts an anti-inflammatory effect on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Dig Dis Sci* 2011;56:1663-71. DOI: 10.1007/s10620-010-1484-y
- ⑲ Uchiyama K, Naito Y, Takagi T, Mizushima K, Hayashi N, Handa O, Ishikawa T, Yagi N, Kokura S, Yoshikawa T. FGF19 protects colonic epithelial cells against hydrogen peroxide. *Digestion* 2011;83:180-3. DOI: 10.1159/000321809
- [学会発表] (計 12 件)
- ① Yoshikawa T. Pleiotropic effects of exercise on life-style related diseases. The International Conference on Advances in Free Radical Research, Natural Products, Antioxidants and Radioprotectors in Health & Ningth Annual Meeting of the Society for Free Radical Research-India. January 11-13, 2010: India.
- ② Yoshikawa T. Free radicals and anti-aging. 8th Anti-Aging

- Medicine World Congress. 2010 April 8, Monaco.
- ③ Naito Y, Ito-Oya T, Okada H, Takagi T, Handa O, Yoshikawa T. Invited Lecture. New molecular targets for gastric carcinogenesis determined by proteomics. Gachon International Gastric Cancer Symposium 2010. 2010 Oct 9; Incheon, Korea.
- ④ Naito Y. Invited Plenary Lecture. Hsp27, a new molecular target for the prevention of GI cancer. Gachon International Symposium on Gastroenterology 2012. 2012 Mar 31; Incheon, Korea
- ⑤ 吉川敏一. 高血糖と消化管疾患. シンポジウム IV・栄養と酸化ストレス: 第 13 回日本病態栄養学会年次学術集会. 2010 年 1 月 9 日~1 月 10 日: 京都.
- ⑥ 吉川敏一. 特別講演 医学からみた食品機能. 日本化学会第 90 春季年会. 2010 年 3 月 26 日: 大阪.
- ⑦ 内藤裕二, 高木智久, 伊藤 (大矢) 友子. シンポジウム「メタボリック症候群と消化器癌」Hsp27 タンパク質のメチルグリオキザールによる翻訳後修飾の解析とその細胞生物学的意義. 第 95 回日本消化器病学会総会. 2009 年 5 月 8 日; 札幌.
- ⑧ 吉川敏一. 食品による疾病予防とその評価. 特別講演: 日本食品化学学会第 16 回総会・学術大会. 2010 年 6 月 9 日: 大阪.
- ⑨ 吉川敏一. 特別講演 I. 口腔運動・機能のアンチエイジングにおける重要性. 第 14 回 NPO 法人日本咬合学会学術大会へ福岡へ. 2009 年 7 月 4 日: 福岡.
- ⑩ 内藤裕二. 特別講演: 胃癌・大腸癌の一次・二次予防に向けて. 第 24 回日本酸化ストレス学会関東支部会. 2010 年 1 月 9 日; つくば.
- ⑪ 内藤裕二, 半田 修, 青井 渉, 高橋二郎, 吉川敏一. シンポジウム「抗酸化食品因子の新規な機能探索とその応用」蛋白質の酸化特異的修飾解析による機能性食品有効性評価標的分子の探索. 第 63 回日本酸化ストレス学会学術集会. 2010. 6. 25; 横浜.
- ⑫ 吉川敏一. ハイパーサーミアの進歩ー原点から未来への展望ー. 阿部賞受賞講演: 日本ハイパーサーミア学会第 28 回総会. 2010 年 9 月 9 日: 名古屋
- ⑬ 内藤裕二, 高木智久, 吉川敏一. パネルディスカッション「大腸がん研究の新たな展開と治療戦略」運動による大腸腫瘍抑制作用は Secreted protein acidic and rich cystein (SPARC) を介する. 第 80 回日本消化器内視鏡学会総会 (JDDW2010). 2010. 10. 15; 横浜.
- ⑭ 吉川敏一. サプリメントとアンチエイジング. シンポジウム「美は外から, 内から」: 第 28 回日本美容皮膚科学会・学術大会. 2010 年 8 月 7 日: 東京.
- ⑮ 内藤裕二. 教育講演: 炎症性腸疾患: 診断と治療の最前線. 第 24 回日本消化器病学会甲信越支部教育講演会. 2010 年 10 月 23 日: 甲府.
- ⑯ 吉川敏一. メタボ時代における機能水の役割. 特別講演: 日本機能水学会第 9 回学術大会. 2010 年 10 月 30 日: 大津.
- ⑰ 吉川敏一. 先端科学を駆使した食品機能性研究による医農革命. 特別講演 II: 第 8 回日本機能性食品医用学会総会. 2010 年 12 月 11 日: 大津.
- ⑱ 内藤裕二, 高木智久, 吉川敏一. シンポジウム「酸化ストレス研究-臨床から基礎まで」翻訳後修飾タンパク質の解析で見えてきた酸化ストレス研究の新展開. 第 81 回日本衛生医学会. 2011 年 3 月 27 日; 東京 (東日本大震災のため誌上発表).
- ⑲ 内藤裕二, 高木智久, 吉川敏一. シンポジウム「消化器疾患と微小循環・酸化ストレス」翻訳後修飾タンパク質の解析で見えてきた酸化ストレス研究の新展開. 第 97 回日本消化器病学会総会. 2011 年 5 月 13 日; 東京.
- ⑳ 内藤裕二, 青井 渉, 吉川敏一. シンポジウム「何をどう食べるかの科学」運動と食品因子による大腸癌予防. 第 11 回日本抗加齢医学会総会. 2011 年 5 月 27 日; 京都.
- 21 吉川敏一. アンチエイジングの実践. 第 13 回日本医療マネジメント学会学術総会. 2011 年 6 月 24 日: 京都.
- 22 内藤裕二. 教育講演. 炎症性腸疾患診療の最前線. 日本消化器病学会近畿支部会第 38 回教育講演会. 2012 年 1 月 28 日: 大阪.
- 23 内藤裕二, 高木智久, 吉川敏一. シンポジウム「酸化ストレス研究-新しいバイオマーカーを求めて」消化管粘膜における Peroxiredoxin-6 の役割. 第 82 回日本衛生学会学術総会. 2012 年 3 月 25 日: 京都.
6. 研究組織
 (1) 研究代表者
 吉川 敏一 (YOSHIKAWA TOSHIKAZU)
 京都府立医科大学・医学 (系) 研究科・学長
 研究者番号: 601128725

(2) 研究分担者

内藤 裕二 (NAITO YUJI)
京都府立医科大学・医学(系)研究科・准
教授
研究者番号: 00305575

(3) 連携研究者

大澤 俊彦 (OSAWA TOSHIHIKO)
名古屋大学・生命農学科・教授
研究者番号: 00115536

赤池 孝章 (AKAIKE TAKAAKI)
熊本大学・医学(系)研究科・教授
研究者番号: 20231798