

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4月10日現在

機関番号：14401
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22659068
 研究課題名（和文）メイラード反応生成物を指標とした成人病を検知する非侵襲検査システムの確立
 研究課題名（英文）Establishment of the non-invading inspection system for the geriatric disease detects with Maillard reaction products.
 研究代表者
 川上 茂樹（KAWAKAMI SHIGEKI）
 大阪大学・産業科学研究所・特任准教授
 研究者番号：90432509

研究成果の概要（和文）：互いが架橋関係にある二つの架橋剤を交互に反応させる「シグナル反復増幅法」を用いて、従来法では検出不可能だった一分子レベルの微量タンパク質の検出を容易にした。成人病の指標となるメイラード反応生成物を同手法を用いて効率よく検出するための条件検討を行い、検出時間の短縮化および阻害因子の無害化の手法を確立した。

研究成果の概要（英文）：The very-small-quantity protein of the 1 molecular level was detected by the "signal repetition amplifying method" to which each makes two crosslinking agents which have a bridge construction relation react by turns. Condition examination for detecting efficiently the Maillard reaction products for geriatric diseases was performed, and shortening of detection time was realized.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	0	1,400,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	2,700,000	390,000	3,090,000

研究代表者の専門分野：タンパク質工学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：①糖尿病 ②動脈硬化 ③AGE ④シグナル増幅反応 ⑤非侵襲検査

1. 研究開始当初の背景

(1) AGE 生成阻害剤である benfotiamine (Hammes HP et al., Nat. Med. 3, 294-299, 2003) は糖尿病性腎症や網膜症の発症を抑制することから、AGEs は単なる老廃物ではなく、病態の憎悪因子とも捉えられている。永井（分担研究者）らが糖尿病性合併症の発症メカニズムを解析する目的で作成してきた AGEs を特異的に認識す

る抗体を十数種類保有しており、血液中に蓄積したメイラード反応生成物の計測が可能となっている。しかしながら尿中に漏出する AGEs の濃度は極微量であり、通常のライザでは検出は困難である。糖尿病の進展および糖尿病性合併諸症状を、血液採取を経ず、非侵襲的定量化するための計測システムの開発が待ち望まれている。

(2) 現在、広く臨床検査で使われているイライザ法のターゲット分子の検出限界濃度は数十ピコグラム/ml といわれている。しかし、ガン診断等に期待されている多くのバイオマーカー分子の濃度は十数ピコレベル以下であり、それらマーカー分子を用いた早期診断の実用化は非常に困難な状況にある。本シグナル増幅法は従来のイライザ法では検出が困難なバイオマーカー分子の検出に有効な方法となる。検証実験においてシグナル増幅反応を複数回繰り返したところ、現在のイライザ法(イムノアッセイ)では検出が困難な 1 ピコグラムの6桁下の1アトグラム/ml以下の検出も可能なことが明らかとなっている。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、尿中に漏出した極微量のメイラード反応生成物を超高感度検出方法(特開 2008-064475)で計測することで、糖尿病を発症する前の「予備群」を非侵襲的に検知する健康モニタリングシステムを研究開発することを目的とする。

(2) AGEs 化を受ける蛋白の情報を基にシグナル反復増幅法による測定系を確立する。具体的には、ストレプトアビジンの分子内の拮抗的架橋反応の改善に向け、リジッドな構造のスペーサーを有するビオチントリマーを用い、定量的な重合体形成の改善を図る。前年度、同定された AGEs 化を受ける蛋白に対する抗体のビオチン化および蛍光標識化されたストレプトアビジンと反復シグナル増幅反応を行い、定量的シグナル検出を試みる。

3. 研究の方法

(1) AGEs 動態の検証

ApoE 欠損マウス及びストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットの体液成分(血清、尿)や臓器(動脈硬化血管、水晶体蛋白、腎臓、

肝臓)、さらにヒト臨床血液検体を採取し、各種 AGEs 構造体(CML、CEL、CMA、CEA、GA-pyridine、pyrraline、pentosidine、imidazolone、2SC)に対する特異的モノクローナル抗体及び高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて、如何なる疾患でどのような AGEs 蓄積が促進するかを検証した。

(2) シグナル増幅反応の最適化

① 低濃度 ストレプトアビジン(SA) 固相プレートにおけるビオチンダイマー(BD) 増幅の検討

これまでの検討は SA を $1 \mu\text{g/mL}$ (1.67pmol/well) で固相したプレートを使用していた。このプレートで良好な増感を認めなかったことから、増幅時の SA あるいは ALP 標識 SA の立体障害を懸念した。そこで、より低濃度の SA を固相したプレートを使用した場合の増幅を検討した。SA を $0.01 \sim 10\text{ng/mL}$ ($0.02 \sim 16.7\text{fmol/well}$) で固相したプレートを使用し、16 回までの増幅を行い増感の有無を確認した。

② SA に対する BD 結合の検討

SA 固相プレートに BD を反応させた後、biotin 標識 ALP を反応させた。反応させる BD 濃度を変更することにより、BD による濃度依存的な biotin 標識 ALP の反応阻害が確認できるかを検討した。

③ 増幅手順の検討

これまでの増幅反応は、BD と SA (あるいは ALP 標識 SA) を交互に反応させていた。この場合の増幅不良の原因として、①固相の SA に結合した BD のもう一方のビオチンが SA に埋もれるような状態(SA によりマスクされた状態)になることや、②固相の SA の分子内や隣接した SA 間を架橋した状態になり、引き続き反応させた SA が BD に結合できない状態になっていると考えられる。そこで試薬の添加手順を変更し増幅させることができるかを検討する。

④ 反応時間の検討

BD・FITC 標識 SA におけるインキュベート時間の検討を 0 秒・20 秒・40 秒・1 分・5 分でそれぞれ比較検討した。増幅反応の後、1M Tris-HCl buffer や PBS buffer を用いてウェルを 2 回洗浄した。Typhoon を用いて 96 穴プレートを観察し、シグナルの確認を行った。

⑤ 生体分子の検出

生体内のターゲット分子が効率的に検出できるか検証するために標準血漿液にターゲットとなる精製 PCA-1 タンパク質を 1 ヨクト (10×10^{-21} g/ml) 程度まで希釈したサンプルを作成した。一方、サンプルをさらに 100 倍および 1 万倍に 1×PBS buffer で希釈し、反復増幅法で検出できるか検証を行った。

4. 研究成果

(1) 抗 AGEs 抗体を用いて生体成分中 AGEs が高感度に検出可能となり、腎臓、皮膚のエラスチン線維等に AGEs が蓄積していることが明らかとなった。また、本法を応用して、AGEs 生成阻害剤の探索も可能となり、カテキン等のフラボノイドは 0.1 mM 以下の濃度では AGEs 生成を抑制することが明らかとなった。

(2) シグナル増幅反応の最適化

①増幅した SA シグナルと BD 濃度の相関関係を調べた。SA 濃度が 100-nM から 50-mM と増やした時、最適ビオチン濃度は異なった (図 1)。100-nM および 10-mM の SA では最適 BD 濃度は 1-mM 以下にピークがあった。一方、100-mM のストレプトアビジンでは最適ビオチンダイマー濃度は 10-mM となり、また、ビオチンダイマーの濃度が 200mM と高くても、反応効率は高くないことが明らかとなった。

予測通り、単純に増幅反応を繰り返しても BD の濃度を固定した場合、SA 濃度の差により架橋効率が異なるために単純なシグナル増幅

は望めなかった。

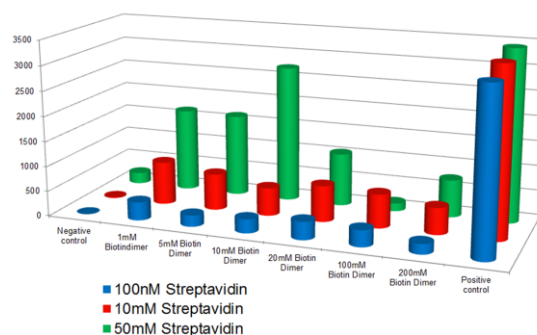


図 1 SA-BD 濃度の相関

② SA に対する BD 結合能力

biotin 標識 ALP に対する BD の濃度依存的な反応阻害が確認できた。この結果から BD の SA に対する反応性には問題がないと判断した。また BD 至適濃度として設定した 10nM では約 90%の biotin 標識 ALP の反応が阻害されたことから、SA の結合部位の 90%には BD が反応していることがわかり設定濃度として適当であったと考えられた。

③ 増幅反応条件の検討

マスクされていない BD を存在させるため予め過剰量の BD と反応させた場合、これまでの BD と SA の交互の繰り返しによる増幅方法と同等の結果であり増幅の改善を認めなかった。

SA 固相プレートの SA のみで BD が架橋するのを避けるため、プレートに予め ALP 標識 SA を分注しておき、ここに BD を添加することにより固相の SA と液相の ALP 標識 SA に BD を架橋させ反応効率の確認を行ったところ、BD と SA の交互の繰り返しによる増幅よりも感度が低下した。原因として、固相よりも液相に対して BD は早く反応し、液相の SA に対して BD は分子内架橋しているものと推察した。

検討した BD と SA の混合比率では、1:1 混合のものが SA 重合体の生成が多かったが、SA 重合体の生成は僅かであった。

今回の検討からは、SA の重合に良好な条件が見出せず、BD を介した SA 重合体の作製は困難であった。

BD 濃度を変動させることによりシグナル増幅がかかるようになったが、理想的なシグナルが 3 倍となるような増幅効率を具現化することが出来なかった。

④ シグナル増幅時間の短縮

シグナル増幅反応の時間検討において反応時間が 0 秒では、ポジティブコントロールとネガティブコントロールの差が明確にでなかった。しかし、20 秒以上の反応時間を取ることで、その差が明確にでることがわかった。また、反応時間が 1 分・5 分のはネガティブコントロールのシグナルが上昇していることが明らかとなった。よって、一回のシグナル増幅反応時間は迅速に検出するため、20 秒の反応時間が十分であり、明瞭な差が検出できる 3 回のシグナル増幅反応時間は 60 秒程度あれば可能であることが示唆された。

実際にシグナル増幅させる場合、一回の増幅反応の洗浄時間が総検出時間に影響を与えることが明らかであり、手作業で行っている今回の試験では洗浄に 10 秒程度の時間がかかっており、洗浄処理の自動化により時間短縮を計りたい。

⑤ 生体分子の検出

生体内にあるターゲットタンパク質を効率的に検出することが出来るか検証するためにターゲット分子として PCA-1 タンパク質を標準血漿で希釈したサンプルを作成し、抗 PCA-1 抗体を用いて反復増幅法で検出をしたところ、血漿で直接希釈したサンプルは全て検出することが出来なかった (図 2)。これは標準血漿に反復増幅反応を阻害する因子が

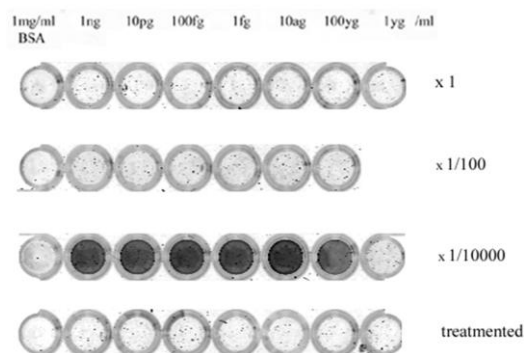


図 2. 反復増幅反応の阻害

含まれていることが示唆された。同血漿サンプルを 100 倍希釈した場合でもこの阻害効果が見られシグナルを検出することが出来なかった。一方、一万倍希釈した場合、PCA-1 タンパク質 100 ヨクトグラム (yg; 10×10^{-19} g/ml) から 1ng/ml まで検出した (図 2)。1yg (10×10^{-21} g/ml) 以下では検出することが出来なかった。このことは本反復シグナル増幅法を用いれば生体内に存在する阻害分子を希釈することで無害化し、標的タンパク質分子が 1 分子程度有れば検出することが可能であることを示した。

まとめ

今回の試験を通して SA の修飾により反応効率が大きく変わることを見いだした。何も修飾されていない SA は BD もしくはビオチン分子と架橋反応を起こすことが出来るが、BD を用いて 2 回目以降の架橋反応は著しくその効率を低下させた。一方、FITC や ALP 標識された SA は効率が悪いもののシグナル増幅反応がかかることを今回の試験で明らかにした。これは SA 分子が修飾されることにより、ビオチン分子の提示反応を起こしていることが示唆された。ビオチン分子の提示反応は SA の分子構造により架橋反応効率を向上させる可能性を示している。現在、ビオチントリマー、ビオチントリマーを用いたシグナル増幅反応を検討しており、極微量に生体内に存在するマーカー分子検出・定量化を実現化したい。

検査の対象となる汗・尿・便・唾液などに

はビオチンを補酵素として持つビオチン酵素やアビジン様タンパク質や対象のタンパク質をマスキングする阻害因子が含まれている可能性が高い。今回、単純にサンプルを希釈することで、それらの阻害因子を無害化することを明らかにした。抗体を用いて標的タンパク質を検出する他の手法では検出限界が低いもので 100 フェムトグラム (10×10^{-13} g/ml) のタンパク質量を必要としており、阻害因子が存在した場合希釈する以外の対応が求められる。本手法を用いれば 100 ヨクトグラム (10×10^{-19} g/ml) の標的タンパク質の検出が可能であり、実に 6 桁の検出感度の差は歴然である。マーカーとなる標的分子の存在の有無で確定診断が出来る検査として実用化することも可能である。

本研究の目的である AGE s を指標にした非侵襲検査の基礎である抗体の作成、および、検出する組織や分泌物に存在する阻害因子を無害化し、標的タンパク質一分子レベルでの検出技術はほぼ確立した。一方、反復増幅法を用いた定量化が本試験期間内に達成できなかったことは残念であった。しかし、定量化するための貴重な知見を得ることが出来た。これらの知見を礎に本手法の確立に向け邁進したい。

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 8 件)

- ① Park J, Kwon MK, Huh JY, Choi WJ, Jeong LS, Nagai R, Kim WY, Kim J, Lee TG, Lee HB, Ha H. Renoprotective antioxidant effect of alagebrium in experimental diabetes. *Nephrol Dial. Transplant.* In press. 査読有
- ② Nakano M, Kubota M, Owada S, Nagai R. The pentosidine concentration in human blood specimens is affected by heating. *Amino Acids.* In press. 査読有
- ③ Fujiwara Y, Kiyota N, Tsurushima K, Yoshitomi M, Horlad H, Ikeda T, Nohara T, Takeya M, Nagai R. Tomatidine, a

tomato sapogenol, ameliorates hyperlipidemia and atherosclerosis in apoE-deficient mice by inhibiting ACAT. *J Agric Food Chem.* In press. 査読有

- ④ Yoshinaga E, Kawada A, Ono K, Fujimoto E, Wachi H, Harumiya S, Nagai R, Tajima S. N^ω-(Carboxymethyl)lysine Modification of Elastin Alters Its Biological Properties: Implications for the Accumulation of Abnormal Elastic Fibers in Actinic Elastosis. *J Invest Dermatol.* 132(2):315-323, 2012. 査読有
- ⑤ Fujiwara Y, Kiyota N, Tsurushima K, Yoshitomi M, Mera K, Sakashita N, Takeya M, Ikeda T, Araki T, Nohara T, Nagai R. Natural Compounds Containing a Catechol Group Enhance the Formation of N^ω-(carboxymethyl)lysine of the Maillard Reaction. *Free Radic. Biol. Med.* 50(7): 883-891, 2011. 査読有
- ⑥ Mera K, Nagai R, Takeo K, Izumi M, Maruyama T, Otagiri M. An autoantibody Against N^ω-(carboxyethyl)lysine (CEL): Possible Involvement in the Removal of CEL-Modified Proteins by Macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 407(2):420-425, 2011. 査読有
- ⑦ Fujiwara Y, Hayashida A, Tsurushima K, Nagai R, Yoshitomi M, Daiguji N, Sakashita N, Takeya M, Tsukamoto S, Ikeda T. Triterpenoids isolated from *Zizyphus jujuba* inhibit foam cell formation in macrophages. *J. Agric. Food Chem.* 59(9): 4544-4552, 2011. 査読有
- ⑧ Shimasaki S, Kubota M, Yoshitomi M, Takagi K, Suda K, Mera K, Fujiwara Y, Nagai R. N^ω-(carboxymethyl)arginine Accumulates in Glycated Collagen and Klotho-deficient Mouse Skin. *Anti-Aging Medicine* 8 (6) : 82-87, 2011. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 永井竜児、糖化とは何か：食品素材を用いた抗糖化とその応用性、食品開発展2011 TTCセミナー、東京、2011年10月5日
- ② Nagai R, Shimasaki S, Nagai M, Fujiwara Y. Inhibition of AGE

formation by catechin and other flavonoids, First International Congress on Cocoa, Coffee and Tea, Italy, 2011年9月14日

- ③ 永井竜児、老化危険因子としてのAGEs およびRAGE、第11回日本抗加齢医学会総会シンポジウム24 京都 2011年5月29日
- ④ 永井竜児、糖代謝および脂質代謝を改善する食品成分の探索、日本学術振興会レドックス生命科学第170委員会 東京、2011年3月11日
- ⑤ 永井竜児、カルボニルによる新たな翻訳後修飾機構の解析と老化関連疾患との関連性について、徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部セミナー、徳島 2010年11月5日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 茂樹 (KAWAKAMI SHIGEKI)
大阪大学・産業科学研究所・特任准教授
研究者番号：90432509

(2) 研究分担者

永井 竜児 (NAGAI RYOJI)
日本女子大学・家政学部・講師
研究者番号：20315295