

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390163

研究課題名(和文)アルギナーゼの炎症性バイオマーカーとしての有用性に関する研究

研究課題名(英文)Evaluation of arginase as an inflammatory biomarker.

研究代表者

荻野 景規(Ogino, Keiki)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：70204104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円、(間接経費) 4,290,000円

研究成果の概要(和文)：喘息・肥満・糖尿病などの持続性炎症疾患における、アルギナーゼのバイオマーカーとしての有用性をヒトとマウスにおいて検討した。喘息患者血清を用いて、アルギナーゼおよび生理的因子との関連について多変量解析を行ったところ、アルギナーゼはhs-CRP、呼気NO、NOx、酸化ストレスバイオマーカーである3-ニトロチロシンと正の関係を示し、炎症性バイオマーカーとしての有用性が示唆された。マウス肥満モデルにおいてアルギナーゼ発現は血糖値・体重の増加と共に増大し、肥満・糖尿病の発症に関与する可能性が示された。また、亜硝酸イオンによるインスリン濃度の抑制が認められ、糖尿病予防に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The availability of arginase as a biomarker for asthma, diabetes, and obesity was evaluated. In asthmatic patients, the relationship among arginase and physiological factors was investigated using a multivariable analysis. Given that the concentration of serum arginase had a positive correlation with hs-CRP, exhaled nitric oxide, NOx, and 3-nitrotyrosine, it is likely that arginase is available as a biomarker. In obese model mice, the expression of arginase was upregulated, in proportion as increase of body weight and blood glucose. Nitrite may contribute to prevention of diabetes, because the concentration of insulin was downregulated with nitrite.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：予防医学 アレルギー アルギナーゼ バイオマーカー 喘息 糖尿病 肥満

1. 研究開始当初の背景

(1) 動物実験における背景

アルギナーゼは尿素回路を構成する酵素の一つで、肝臓の原形質に主に発現するⅠ型と腎臓のミトコンドリアに多く発現するⅡ型という2つの分子種が存在する。我々は、ダニ抽出物の点鼻投与により作製された喘息モデルマウスを用い、アルギナーゼⅠの肺組織における発現誘導及び血清における活性上昇を初めて証明した。これは、アルギナーゼがNO合成酵素の基質でもあるL-Arginineを消費し、NO合成酵素の発現が増大しているにも関わらず、気管支拡張に必要なNOの不足を引き起こす可能性を示唆するものである。さらに、アルギナーゼ阻害剤の投与により、気道抵抗の緩和、Th2サイトカインの低下、気管支肺胞洗浄液(Bronchoalveolar lavage fluid; BALF)中の好酸球数抑制といった抗炎症作用が観察された。以上より、実験喘息モデルでアルギナーゼの発現がNOを介して喘息病態に影響していることが証明された。

(2) 疫学調査における背景

我々は、ELISAを用いて、喘息患者における血清中アルギナーゼⅠの有意な上昇及び高感度CRP(C-reactive protein)との相関を初めて証明した。中でも、血清中IgE濃度の低い非アトピー性の喘息罹患患者においてアルギナーゼⅠは高値を示した。以上より、血清中アルギナーゼⅠは、非アトピー性喘息の診断における新規バイオマーカーとして有用であることを示した。

2. 研究の目的

喘息、肥満、糖尿病等の慢性かつ低レベル持続性炎症疾患を対象に、疫学研究及び実験動物モデルの双方について、アルギナーゼⅠをバイオマーカーとして炎症と病態との関係を解明することにより、世界に先駆けて予防医学的な有用性を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 喘息における血清アルギナーゼⅠと呼気NO及び血清IgEとの関連性 - ヒト症例と動物モデルを用いた検討 -

ヒト症例については、川崎医科大学との共同研究を行った。喘息患者の呼気NO及び呼吸機能を測定した。また、血清及び尿を採取し、アルギナーゼⅠ量及びその関連物質(L-arginine、hs-CRP、NOx [NO₃⁻及びNO₂⁻]等)を測定し、それらの相関について多変量解析を用いて分析した。

また、NC/Ngaマウスに対しダニ抽出物を点鼻暴露して喘息モデルを作製した。さらに、アルギナーゼ阻害剤であるnor-NOHAを点鼻暴露、抗炎症剤であるプレドニゾロンを腹腔内投与した。最終暴露から24時間後、人工呼吸器につなげて気道抵抗を測定した後に安楽死させ、肺及び血清を採取した。その後、肺におけるアルギナーゼⅠの発現及び血清におけるアルギナーゼⅠ発現量及び酵素活性を測定した。また、これらの投与による気道炎症の緩和、Th2サイトカインの発現変動についても検討を行った。

(2) ヒト単球系培養細胞及び末梢血好中球によるアルギナーゼⅠの発現誘導因子の検索及び誘導機序の解明 - マウス培養マクロファージとの比較

ヒト単球系培養細胞(THP-1)について、キサンチン-キサンチンオキシダーゼ系によるO₂、H₂O₂、H₂O₂ + Fe²⁺(⁻OH)発生系、TGF-β、IL-10等の因子を添加し、アルギナーゼⅠの誘導を試みた。酵素発現は、PCRによるmRNAレベルまたはwestern blotによる蛋白レベルで検討し、アルギナーゼⅠ誘導発現における活性酸素種の関与を検証した。

(3) 肥満・糖尿病発症マウスモデルを用いた低レベル持続性炎症におけるアルギナーゼⅠの動態把握とその制御による肥満及び糖尿病発症予防に関する研究

C57BL/6Jマウスに対し高カロリー食(脂肪含有率60%;コントロール食は10%)を与えた。また、同時にnor-NOHAまたはNaNO₂を投与した。経時的に体重、血糖を測定した後20週齢で安楽死させ、血漿中コレステロール、leptin、インスリン濃度及びアルギナーゼ活性を測定した。腹腔内脂肪組織のNOx濃度、NO合成酵素(NOS2)mRNA、アルギナーゼⅠmRNA発現等をPCRで測定し、肥満の影響によるアルギナーゼⅠの動態を検討した。

(4) 肝臓型アルギナーゼⅠに特異的なELISAの開発

ヒトアルギナーゼⅠをコードした966bpの合成DNAをpET-24a(+)-ベクターへ挿入し、大腸菌BL21(DE3)へ導入して形質転換させた大腸菌を作製した。Western blotでアルギナーゼⅠの発現を確認し、精製した。その精製標品を用い、家兔に免疫することでポリクローナル抗体を作製した。

このポリクローナル抗体を用いてELISA系を構築し、その測定再現性、安定性等についてバリデーションを行った。また、健康人から得られた血清サンプルを用い、市販ELISAとの比較を行うと同時に、アルギナーゼⅠ濃度と他の生理的パラメータとの相関につい

て解析した。

また、溶血サンプルにおけるアルギナーゼの測定精度を高めるため、赤血球中のみ発現している variant 型 (通常のアルギナーゼ I と比較し、8 アミノ酸多い) を認識可能なモノクローナル抗体の作製を試みた。

(5) 喘息モデルマウスを用いた呼気 NO の発生機序の解明

マウスに対し NO₂ を投与し、呼気を採取した。採取した呼気または対照となる室内空気を、直接 NO analyzer (NOA 280i) に導入し、NO 由来のピークを検出した。

また、キサンチンオキシダーゼ (XO) は潜在的に NO₃ または NO₂ から NO への還元能を持つことが知られている。そこで、喘息モデルマウスから肺ホモジネート及び BALF を得て、NO₃ 及び NO₂ 濃度を測定し、XO の発現を Western blotting で検討した。また、これらのサンプルから XO を native-PAGE で分離し、XO としての酵素活性をニトロブルーテトラゾリウム (NBT) との反応で測定した。

4. 研究成果

(1) 喘息における血清アルギナーゼ I と呼気 NO 及び血清 IgE との関連性 - ヒト症例と動物モデルを用いた検討 -

喘息患者血清について、血清アルギナーゼ I は、L-arginine や IgE と負の関係を示し、hs-CRP、呼気 NO、NO_x、酸化ストレスバイオマーカーである 3-ニトロチロシンと正の関係を示した。さらに L-アルギニン は 3-ニトロチロシンと負の関連性を認めた。

すなわち、アルギナーゼ I は、血中及び組織中の L-アルギニン濃度を制御していることが示された。さらに、この制御機構を介して NO 合成酵素を抑制し、酸化ストレスを増強していることが示唆された。また、アルギナーゼ I は、呼気 NO とは正の関連があり、共通の転写因子により調節されている可能性を認めた。

また、炎症機序における既存のバイオマーカーである hs-CRP と正の関連性があったことから、アルギナーゼ I は炎症バイオマーカーとしての可能性があることが示唆された。

動物を用いた実験として、喘息モデルマウスに nor-NOHA 若しくはプレドニゾロンを投与することにより、ダニ抽出物単体暴露時と比較して気道抵抗及び肺におけるアルギナーゼ活性の低下が認められた。また、これらの投与により粘液分泌細胞の増殖及び気道周囲における炎症性細胞の浸潤は抑制され、

Th2 サイトカインの発現も減少した。

(2) ヒト単球系培養細胞及び末梢血好中球によるアルギナーゼ I の発現誘導因子の検索及び誘導機序の解明—マウス培養マクロファージとの比較

ヒト単球系培養細胞を PMA により分化誘導させた後、H₂O₂ や H₂O₂ と Fe²⁺ により生成する OH ラジカル等の酸化ストレス源へ暴露したが、アルギナーゼの誘導は証明されなかった。

(3) 肥満・糖尿病発症マウスモデルを用いた低レベル持続性炎症におけるアルギナーゼ I の動態把握とその制御による肥満及び糖尿病発症予防に関する研究

マウスに高カロリー食を摂取させたところ、体重増加と共に、血糖値、血清インスリン値、アルギナーゼ活性等の上昇、腹腔内脂肪組織のアルギナーゼ I mRNA の強発現が認められ、逆に血清 L-アルギニンは低下した。また、アルギナーゼ I 濃度及びアルギナーゼ活性に関して、血糖値との正の相関が、L-arginine 及び NO₂ とは負の相関が認められた。この際、高カロリー食に加え NO₂ を摂取させることによって、血清インスリンの上昇は抑制された。しかし、nor-NOHA を高カロリー食群に同時投与したが、血糖値及び体重には変化が認められなかった。

肝臓組織内のアルギナーゼ I は、高カロリー食摂取マウスにおいて低い染色性を示したことから、血中アルギナーゼ I の増大分が肝臓からの遊離アルギナーゼに由来する可能性が示唆された。また、脂肪肝による動脈硬化発症について、肝臓からの遊離アルギナーゼによる L-arginine 消費及びそれに伴う NO 合成低下が関与している可能性が示唆された。

以上より、アルギナーゼ I が肥満に伴う糖尿病の発症に関与している可能性と、NO₂ が糖尿病を予防する可能性があることが示唆された。

(4) 肝臓型アルギナーゼ I に特異的な ELISA の開発

大腸菌に産生させたヒトアルギナーゼ I タンパクを用いて、ウサギ由来のポリクローナル抗体作製及び ELISA 系の構築に成功した。しかし、赤血球型 variant のみを認識するモノクローナル抗体の完成には至らなかった。

本 ELISA に関してバリデーションを行ったところ、検出範囲は 0.085 ~ 500 ng/mL であり、日内及び日間再現性、凍結融解安定性、室温及び冷蔵下における保存安定性が証明され

た。また、特異性を検証したところ、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ血清等との反応性は認められず、ヒト血清へのアルギナーゼの添加回収試験も良好であった。

また、健常成人約 700 名を対象に血清中アルギナーゼ濃度と様々な因子の相関に関して市販 ELISA との比較を行ったところ、ほぼ同様の結果を示した。すなわち、いずれも酸化ストレスバイオマーカーである尿中 8-OHdG 濃度と正の関連性があり、年齢及び血清インスリン濃度と負の関連性が認められた。

(5) 喘息モデルマウスを用いた呼気 NO の発生機序の解明

マウスに対し NO₂ を投与した後、呼気中の NO 濃度測定を試みたが、環境中 NO とのシグナル差分は非常に小さく、現行法 (NO analyzer に導入しての直接測定)での検出は困難と考えられた。動物個体からの新規検出手法については検討中である。

肺における XO の発現を検討したところ、通常では細気管支上皮に存在していたが、喘息モデルにおいては減少していた。ただし、肺ホモジネート及び BALF においては、喘息モデルにおけるタンパク発現が有意に増大し、酵素活性の上昇も認められた。一方、NO₂の量は、肺組織及び BALF のいずれにおいても喘息モデルでは減少しており、XO による NO の産生に NO₂ が利用されている可能性が示唆された。

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 10 件)

[1] Zou Y, Wang DH, Sakano N, Sato Y, Iwanaga S, Taketa K, Kubo M, Takemoto K, Masatomi C, Inoue K, Ogino K. Associations of serum retinol, α -tocopherol, and γ -tocopherol with biomarkers among healthy Japanese men. International Journal of Environmental Research and Public Health, 査読有, Vol.11, 2014, 1647-1660. (doi: 10.3390/ijerph110201647)

[2] Ogino K, Wang DH, Kubo M, Obase Y, Setiawan H, Yan F, Takahashi H, Zhang R, Tsukiyama Y, Yoshida J, Zou Y. Association of serum arginase I with L-arginine, 3-nitrotyrosine, and exhaled nitric oxide in healthy Japanese workers. Free Radical Research, 査読有, Vol. 48, 2014, 137-145. (doi: 10.3109/10715762.2013.842979)

[3] Ogino K, Murakami I, Wang DH, Tsukiyama Y, Takahashi H, Kubo M, Sakano N, Setiawan H,

Bando M, Ohmoto Y. Evaluation of serum arginase I as an oxidative stress biomarker in a healthy Japanese population using a newly established ELISA. Clinical Biochemistry, 査読有, Vol. 46, 2013, 1717-1722. (doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.08.012)

[4] Iwanaga S, Sakano N, Taketa K, Takahashi N, Wang DH, Takahashi H, Kubo M, Miyatake N, Ogino K. Comparison of serum ferritin and oxidative stress biomarkers between Japanese workers with and without metabolic syndrome. Obesity Research & Clinical Practice, 査読有, 2013, in press. (doi: 10.1016/j.orcp.2013.01.003)

[5] Inoue K, Sakano N, Ogino K, Sato Y, Wang DH, Kubo M, Takahashi H, Kanbara S, Miyatake N. Relationship between ceruloplasmin and oxidative biomarkers including ferritin among healthy Japanese. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 査読有, Vol. 52, 2013, 160-166. (doi: 10.3164/jcfn.12-122)

[6] Sato Y, Ogino K, Sakano N, Wang DH, Yoshida J, Akazawa Y, Kanbara S, Inoue K, Kubo M, Takahashi H. Evaluation of urinary hydrogen peroxide as an oxidative stress biomarker in a healthy Japanese population. Free Radical Research, 査読有, Vol. 47, 2013, 181-191. (doi: 10.3109/10715762.2012.759218)

[7] Akazawa Y, Kubo M, Zhang R, Matsumoto K, Yan F, Setiawan H, Takahashi H, Fujikura Y, Ogino K. Inhibition of arginase ameliorates experimental ulcerative colitis in mice. Free Radical Research, 査読有, Vol. 47, 2013, 137-145. (doi: 10.3109/10715762.2012.756980)

[8] Ogino K, Kubo M, Takahashi H, Zhang R, Zou Y, Fujikura Y. Anti-inflammatory effect of arginase inhibitor and corticosteroid on airway allergic reactions in a Dermatophogoides farinae-induced NC/Nga mouse model. Inflammation, 査読有, Vol. 36, 2013, 141-151. (doi: 10.1007/s10753-012-9529-3)

[9] Imagama T, Ogino K, Takemoto K, Kato Y, Kataoka H, Suzuki H, Ran Z, Setiawan H, Fujikura Y, Taguchi T. Regulation of nitric oxide generation by up-regulated arginase I in rat spinal cord injury. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 査読有, Vol. 51, 2012, 68-75. (doi: 10.3164/jcfn.D-11-00011)

[10] Ogino K, Takahashi N, Kubo M, Takeuchi A, Nakagiri M, Fujikura Y. Inflammatory airway

responses by nasal inoculation of suspended particulate matter in NC/Nga mice. *Environmental Toxicology*, 査読有, 2012, in press (オンライン公開済). (doi: 10.1002/tox.21791)

〔学会発表〕(計 10 件)

[1] 鄒宇、汪達紘、坂野紀子、佐藤美恵、久保正幸、竹本圭、荻野景規：男性労働者における血中抗酸化ビタミンと血中バイオマーカーとの関連性について、第 57 回中国四国合同産業衛生学会 2013 年 12 月 8 日、香川県社会福祉総合センター (香川)

[2] 三宅優紀、高橋秀和、久保正幸、汪達紘、佐藤美恵、吉田純子、張燃、築山依果、鄒宇、舟久保徳美、叶欽霞、石井香代子、井上清美、荻野景規：職業従事者におけるストレスに関するスコアと生活習慣及び血液バイオマーカーとの関連性についての検討、第 86 回日本産業衛生学会学術総会、2013 年 5 月 17 日、ひめぎんホール (愛媛)

[3] 高橋秀和、中田信也、張燃、ヘリ・セティアワン、村上育郎、久保正幸、荻野景規：肥満マウスモデルにおける血中アルギナーゼ活性およびアルギニン量の変化、第 83 回日本衛生学会学術総会、2013 年 3 月 25 日、金沢大学 鶴間キャンパス (石川)

[4] 井上清美、坂野紀子、佐藤美恵、汪達紘、久保正幸、高橋秀和、宮武伸行、荻野景規：企業従事者における抗酸化炎症バイオマーカーセルロプラスミンに関する研究、第 56 回中国四国合同産業衛生学会、2012 年 12 月 9 日、岡山大学 創立五十周年記念館 (岡山)

[5] 佐藤美恵、荻野景規、坂野紀子、汪達紘、吉田純子、赤澤裕二、神原咲子、井上清美、久保正幸、高橋秀和：企業健診受診者における酸化ストレスバイオマーカーと動脈硬化および冠動脈疾患リスクについて、第 56 回中国四国合同産業衛生学会、2012 年 12 月 9 日、岡山大学 創立五十周年記念館 (岡山)

[6] 井上清美、坂野紀子、佐藤美恵、久保正幸、汪達紘、高橋秀和、宮武伸行、荻野景規：セルロプラスミンは抗酸化炎症バイオマーカーの一種か？、第 10 回日本予防医学学会学術総会、2012 年 11 月 25 日、広島大学 霞キャンパス広仁会館 (広島)

[7] 佐藤美恵、荻野景規、坂野紀子、汪達紘、吉田純子、赤澤裕二、神原咲子、井上清美、久保正幸、高橋秀和：健診受診者における尿中過酸化水素について、第 10 回日本予防医学学会学術総会、2012 年 11 月 25 日、広島大学 霞キャンパス広仁会館 (広島)

[8] 荻野景規：新しい炎症性バイオマーカー『アルギナーゼ』と酸化ストレス、第 82 回日本衛生学会総会、2012 年 3 月 25 日、京都大学 吉田キャンパス (京都)

[9] 荻野景規：呼気 NO とその調節因子、第 3 回日本安定同位体・生体ガス医学応用学会大会、2011 年 11 月 4 日、東邦大学医療センター大森病院 5 号館地下 1 階臨床講堂 (東京)

[10] 荻野景規、高橋紀子、ヘリ・セティアワン、赤澤裕二、高橋秀和、汪達紘：健康成人及び喘息患者における血清 3-nitrotyrosine の疫学的評価、第 17 回 MPO 研究会シンポジウム、2011 年 10 月 28 日、アークホテル熊本 (熊本)

〔図書〕(計 1 件)

[1] Kubo M and Ogino K, Springer, *Studies on Pediatric Disorders* (Chapter Title: Analytical Procedures for Nitrate/Nitrosative Stress), 2014, in press.

6. 研究組織 (2014 年 3 月 31 日現在)

(1) 研究代表者

荻野 景規 (OGINO KEIKI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：70204104

(2) 研究分担者

汪 達紘 (WANG DA-HONG)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師
研究者番号：90294404

高橋 秀和 (TAKAHASHI HIDEKAZU)
山口大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：90450402
(平成 23 年 6 月～)

久保 正幸 (KUBO MASAYUKI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：60420519
(平成 24 年 4 月～)

尾内 一信 (OUCHI KAZUNOBU)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：80351899

尾長内 靖 (OBASE YASUSHI)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：40399762

(3) 連携研究者

松井 秀樹 (MATSUI HIDEKI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：30157234