

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 22 日現在

機関番号：13201
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659294
 研究課題名（和文）転写因子 NF- κ B ハイスループット検査システム構築による救急医療への応用
 研究課題名（英文）Application to the emergency care by establishment of high-throughput examination systems for transcription factor NF- κ B activation
 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）：

われわれは救急医療における代表的病態である全身炎症性症候群（SIRS）の救命率を高めることを目標に新しい炎症病態診断システムを確立した。まず、真核生物由来の DNA ポリメラーゼを作成し高感度で迅速な敗血症起因菌同定検査法を確立した。次に、炎症性疾患の病因に関与する転写因子 NF- κ B 活性量を迅速かつ大量に測定できる検査法を開発した。本方法は、液相中にある物質のブラウン運動を観察できる 1 分子蛍光相関法（FCS 法）を基盤にしており、蛍光ラベルされた DNA プローブと NF- κ B 結合状態を共焦点領域内で測定する。本方法により SIRS 患者のリンパ球 NF- κ B 活性化量が、救急医療における炎症マーカーとして利用できるようになる。

研究成果の概要（英文）：

We developed new inflammation diagnostic system in order to raise the lifesaving rate of systemic inflammatory reactive syndrome, SIRS. Using the eukaryote-made thermostable DNA polymerase, the sensitive and reliable detection of bacteria becomes feasible for large fields, thereby making the development of a wide range of powerful applications possible. Further, we have established a novel high-throughput 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 Brownian motion in solutions, because the elevation of NF- κ B activity reflects the acute inflammation. Measuring the NF- κ B activity in the patients with SIRS would be useful as inflammatory marker for emergency care.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,600,000	780,000	3,380,000

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：転写因子、NF-kappa B、FCS 法、ハイスループット、1 分子計測法、救急医療

1. 研究開始当初の背景

われわれは今まで転写因子 NF- κ B シグナル

機構から癌や全身炎症反応症候群（SIRS）、関節リウマチ等の種々の疾患に対する分子病態研

究を行ってきた (*Science*253:1026, 1991, *Science*258:1792, 1992, *J. Biol. Chem.* 282: 25177, 2007, *Infect. Immun.* 69:2788, 2001)。NF- κ B活性化検査は、炎症性疾患や癌など多くの疾患の迅速な病態解析に貢献できると考えている。そこで、生物試料中の細胞内NF- κ B活性状態を把握するため、高感度ELISA法等の測定法開発を試みてきた。その成果を①国際特許 (PTC/JP2005/2006) [Immune sytem 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 (SIRS) の発症予測] に出願してきた。ELISA法よりも高精度なアッセイ法を開発することで、炎症性サイトカイン (IL-6, IL-8, MCP1 等) 発現やCRP測定より迅速かつ網羅的に炎症病態を把握できるとともにステロイド等の炎症抑制の治療効果を迅速に把握でき臨床に応用できると考えている。本研究により、課題であった生体試料を利用した蛍光相関分光法 Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) を基盤としたNF- κ B検査システムが完成できる。NF- κ B測定用ELISA法は既に開発され販売されているが感度と特異性が低く、人体診断に認められてない。米国Panomics社からは活性化転写を 54 種類エレメントと結合させる転写因子発現検出用TranSignal TF DNA arreyが開発されているが、同様に人体診断は使用不可となっている。

2. 研究の目的

本研究において、炎症の中核を担う転写因子 NF- κ B 活性化状態を病院検査室で利用できる高感度・迅速性を有するハイスループット型 NF- κ B 検査システムを構築する。本検査は、全血からリンパ球・白血球を短時間で簡便に分離し、高純度な核蛋白を抽出できるサンプリング法開発に加え、物質のブラウン運動が計測できる 1 分子蛍光相関法(FCS)を基盤に生体試料中の転写因子を特異的に定量計測ができる新規競合アッセイ法を考案した世界初の転写因子検査システムである。本競合アッセイ法により、半導体等の材料純度に利用されてきた技術を生物試料でも測定可能とし、さらにハイスループット化と自動化を視野に入れた医療応用に向けた挑戦的研究である。本検査システムが構築されると、救急医療で迅速な対応が要求される全身炎症反応症候群(SIRS)等の重篤な炎症性疾患に関わる NF- κ B 活性化の迅速検査法が確立でき、SIRS 早期治療への対策に貢献できる。

3. 研究の方法

病院検査室で転写因子 NF- κ B 活性に対する定量検査を実現し救急医療の現場で臨床利用するために、①臨床検体からFCS測定機器導入までのサンプリングのハイスループット化と自動化、②敗血症の起病菌を同定するために、PCRを施行するが、反応に利用するDNAポリメラーゼは大腸菌由来のものしか世の中に存在しないため大腸菌DNAのコンタミネーションが問題となってきた。そこで真核生物からDNAポリメラーゼを作成した。③核蛋白中のNF- κ B量を特異的に同定法できる検査法開発を行った。

①は、全血をleukoLock filterで吸着させリンパ球分離回収する方法と、リンパ球表面分子抗体反応後磁性ビーズより特定細胞を回収する分離する方法法を検討した。②は、真核生物として酵母に発現ベクター(pYES-TA01, ToMV)を用いてTaq polymerase 遺伝子を導入した。アフィニティクロマトグラフィーよりTaq polymeraseを精製した。③は、ELISAやFCSでリコンビナントNF- κ Bを測定できる段階まで到達しているが、生物試料核蛋白中に存在するNF- κ Bを特異的に検出するために、蛍光標識プローブに対し非標識NF- κ B特異結合プローブ過剰量入れた反応並進拡散時間と蛍光標識プローブに対し非標識NF- κ B非結合プローブを過剰量入れた並進拡散時差より、NF- κ B量を定量測定した。

FCS測定法を完成させた後、その臨床的有用性を検証する。本ハイスループット型NF- κ B検査システムは、富山大学附属病院において救急医療現場を中心に臨床治験を実施した。①健常者ボランティアリンパ球を用いたNF- κ B基準範囲設定：インフォームド・コンセントが得られた健康人よりEDTA加採血7mlを採血し、リンパ球より核蛋白を抽出し、核内NF- κ B解析を行った。②大手術時の全身性炎症反応症候群発症予測とモニタリングによる臨床的評価は、人工心肺を長時間利用する心臓手術例、生体侵襲度の高い腹部手術症例例を検討した。手術直前、麻酔導入時、手術中(人工心肺導入前後等)、手術後EDTA-2Na加7ml採血し、全血から直ちに血漿とリンパ球を分離し、確立した方法によりリンパ球核蛋白を抽出した。血漿中のTNF- α , IL1 β , IL-6, IL-8, IL-18, MCP-1はELISA法で測定した・リンパ球核内NF- κ B量の測定を行い、各サイトカイン変動との相関を解析と臨床経過との検証を行った。

4. 研究成果

1) 自動化を目指した簡便なリンパ球・白血球分離法(方法1)EDTA-2Na採血管で採血後溶血剤で可溶後白血球吸着フィルター膜に吸引でリンパ球を分離回収する方法を検討した。作業時間約2分工程で純度の高い単核

球が得られた。(方法2) 表面分子抗体反応後、磁性ビーズより特定細胞を回収し濃度緩衝液に NP40 を加え、細胞膜融解後遠心沈降物に高塩緩衝液を加えた。作業時間は8分で CD45 特異的血球分離が得られた。

2) 真核生物由来 Taq DNA polymerase 作成 : 酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) に Taq DNA polymerase 遺伝子を組み込んだ発現ベクター (pYES-TA01, ToMV) を導入し、抗菌剤存在下で酵母を増殖させた。強発現から得られた Taq DNA polymerase は、アフィニティクロマトグラフィー等で精製した。この酵母由来 Taq DNA polymerase の性能は、従来の大腸菌由来のものと比較して、バクテリア共通プライマー (18s リボソーム RNA) を利用した PCR を 60 から 100 サイクル廻しても、全くバクテリア DNA コンタミネーションを認めないことが確認された。

3) FCS を用いた NF- κ B 活性化量測定法確立
①リコンビナント hr-p50 オリゴヌクレオチドに対する結合特異性 : 核抽出物の粘性は NF- κ B 結合配列を持つ蛍光標識 DNA プローブのブラウン運動に影響を与えるため、粘性によって FCS 測定の際の拡散時間の延長をもたらす。粘性の影響を排除するため蛍光標識 DNA プローブに対する WT competitor および NS competitor を用意した。まず WT competitor の存在下および非存在下における hr-p50 と蛍光標識 DNA プローブ複合体の拡散時間を測定した。蛍光標識 DNA プローブのみの拡散時間は $478.2 \pm 7.5 \mu\text{sec}$ であった。hr-p50 を加えると hr-p50 は蛍光標識 DNA プローブと結合することにより分子量が大きくなり、拡散時間は延長した ($969.3 \pm 26.3 \mu\text{sec}$)。これに WT competitor (1 nM) を加えると、WT competitor は予想通り蛍光標識 DNA プローブと競合し、拡散時間は短縮した ($868.0 \pm 3.4 \mu\text{sec}$)。さらに、大過剰量の WT competitor (50 nM) を加えた場合では、拡散時間は hr-p50 が存在しない場合とほぼ同程度であり ($495.8 \pm 9.4 \mu\text{sec}$)、蛍光標識 DNA プローブが複合体から解離したと考えられる。一方、NS competitor はその濃度に関わらず拡散時間への影響はほとんど認めなかった。このことは、NF- κ B/蛍光標識 DNA プローブ複体の形成が、蛍光標識 DNA プローブ NF- κ B 結合コンセンサス配列に依存し、本法が特異性の高い検出方法であることを示している。

②TNF- α 刺激 HeLa 細胞の検討 : HeLa 細胞を 50 ng/ml TNF- α で 15 分間刺激後、核抽出物を抽出し、核抽出物中の NF- κ B/蛍光標識 DNA プローブ複合体の拡散時間を評価した (Fi)。TNF- α 未刺激の核抽出物を加えると、蛍光標識 DNA プローブ単独の状態よりも拡散時間が延長した ($564.8 \mu\text{sec} \rightarrow 600.1 \mu\text{sec}$)。この結果は、TNF- α 未刺激の核抽出物中に少量の NF- κ B が存在するか、あるいは核抽出物による粘性によって拡散時間が延長した可能性

を示している。しかし、TNF- α 刺激により拡散時間はさらに延長した ($753.4 \pm 10.6 \mu\text{sec}$)。このことは、TNF- α 刺激により NF- κ B シグナル伝達経路が活性化され、p50 と蛍光標識 DNA プローブの複合体形成が検出できたことを示している。さらに、そこに WT competitor を加えたところ、拡散時間は TNF- α 未刺激の HeLa 細胞の核抽出物を加えた場合と同程度まで短縮した ($590.1 \pm 9.1 \mu\text{sec}$)。この結果は、TNF- α 未刺激の核抽出物中にはほとんど NF- κ B が存在していなかったことを示唆する。これとは対照的に、NS competitor は TNF- α で刺激した HeLa 細胞の核抽出物の拡散時間には影響を与えなかった。これらの結果より、WT competitor と NS competitor を用いることでバックグラウンドとしての粘性を揃えることができ、測定値を検量線に適応することが可能であると判断できた。

③NF- κ B 結合量定量と添加回収率 : 定量に用いる検量線を作成するため、既知濃度の hr-p50 を測定した。y 軸は hr-p50 と蛍光標識 DNA プローブの結合率を示している。次に、U937 細胞の核抽出物 10 μg に対して hr-p50 0.8 ng を加え、NF- κ B との結合率を求めた。WT competitor を加えた溶液における結合率 ($3.6 \pm 2.8\%$) は、蛍光標識 DNA プローブと反応溶液中の物質の非特異的な結合の影響を示しており、NS competitor を加えた溶液における結合率 ($26.6 \pm 2.3\%$) は、加えた hr-p50 と蛍光標識 DNA プローブの結合と、非特異的な結合の影響の両方を加味した値である。これらを基に Fig. 9C で作成した検量からそれぞれ定量値を求め、NS competitor を加えた溶液における定量値から WT competitor を加えた溶液における定量値を引いて、hr-p50/蛍光標識 DNA プローブ複合体のみの定量値を求めたところ、0.67 ng/test であり、その回収率は 88.9% であった。Table 1 は hr-p50 の量を変えて行った添加回収試験の結果であり、いずれの場合も同時再現性における変動係数は約 10% 程度であった。

④FCS 法の NF- κ B 結合量と NF- κ B の転写活性との相関 : FCS で求められる拡散時間が NF- κ B の核内移行をとらえているかどうかを調べるため、I κ B α の阻害剤である BAY11-7082 を用いて NF- κ B の核内移行阻害実験を行った。Jurkat T リンパ球は PMA (20 ng/ml) と ionomycin (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で 30 分間刺激した後、BAY11-7082 (0~40 nM) で 2 時間処理した。5 nM の BAY11-7082 処理では拡散時間に影響はなかったが、BAY11-7082 の濃度に従って拡散時間は短縮した。この結果は FCS による拡散時間が NF- κ B の核内移行を捉えていることを示唆する。続いて、FCS によって測定される NF- κ B の DNA 結合率が核内

の NF- κ B 量や転写活性と相関するかどうかを調べるために Western blotting とルシフェラーゼアッセイを行った。NF- κ B レポータープラスミドを導入した HEK293 細胞を TNF- α で 30 分間刺激して核タンパクを抽出し、Western blot 法を実施した。この結果、TNF- α の刺激濃度に応じて NF- κ B は核内移行は増加した。ルシフェラーゼアッセイによる NF- κ B の転写活性は TNF- α 刺激後 3 時間で測定した。Fig. 10B と同様に、転写活性も TNF- α の濃度に依存して増加した。また、FCS を用いて核内の NF- κ B の DNA に対する結合量を TNF- α 刺激の 30 分後と、3 時間後に測定した。FCS によって測定された NF- κ B の結合量は TNF- α 刺激後 30 分で増加したが、3 時間では増加は見られなかった。これらの結果は FCS によって定量される NF- κ B の DNA 結合量は、NF- κ B の核内移行に伴う転写活性を表すことを意味する。

⑤ FCS によるヒト末梢血リンパ球核内の NF- κ B 活性測定：FCS における NF- κ B 活性の測定をヒト末梢血リンパ球に適応可能かどうかを調べるために、ヒト末梢血リンパ球を TNF- α 1ng/ml で 15 分間刺激し、核タンパク中の NF- κ B 活性を FCS により定量した。ヒト末梢血リンパ球中の NF- κ B 活性は TNF- α の刺激に応じて増加し、生体試料でもこの FCS 検出システムは応用可能となることを示している。

4) 臨床治験

周術期における炎症モニターの検討

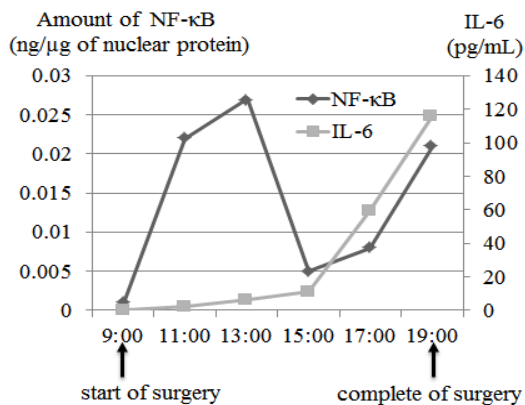
5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

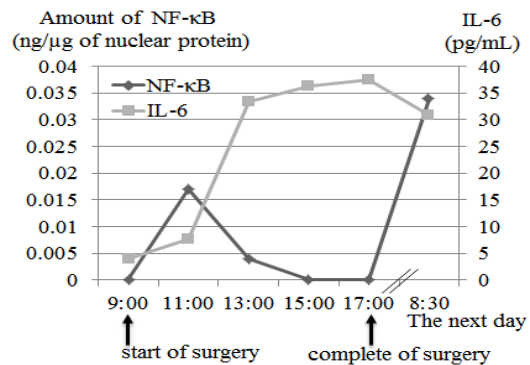
1) Hirano K, Takashima S, Dougu N, Taguchi Y, Nukui T, Konishi H, Toyoda S, Kitajima I, Tanaka K.: Study of hemostatic biomarkers in acute ischemic stroke by clinical subtype. 5021(5):404-410, 2012 (査読有り)

2) 久保田智美、林史朗、仁井見英樹、北島勲：当院 6 年間における細菌性眼感染症の検

Case 1 pancreas cancer



Case 2 esophagus cancer



出動向調査。臨床病理 60(7):605-611, 2012 (査読有り)

3) Niimi H, Mori M, Tabata H, Minami H, Ueno T, Hayashi S, Kitajima I: A novel "eukaryote-made" thermostable DNA polymerase which is free from bacterial DNA contamination. Journal of Clinical Microbiology 49(9):3316-3320, 2011 (査読有り)

4) Hagiwara A, Harada K, Hida Y, Kitajima I, Ohtsuka T: Distribution of serine/threonine kinase SAD-B in mouse perichoral nerve synapse. NeuroReport 22(7):319-325, 2011 (査読有り)

5) Ichinose A, Souri M, Kitajima I (Japanese collaborative research group on "Acquired haemorrhaphilia due to factor XIII deficiency"): As many as 12 cases with haemorrhagic acquired factor XIII deficiency due to its inhibitors were recently found in Japan. Thromb Haemost 105(5):925-927, 2011 (査読有り)

6) Takano A, Niimi H, Atarashi Y, Sawasaki T, Terasaki T, Nakabayashi, T, Kitajima I, Tobe K, Takahara T: A novel Y231del mutation of HFE in hereditary hemochromatosis provides in vivo evidence that the Huh-7 is a human hemochromatotic cell line. Liver International 31(10):1593-1594, 2011 (査読有り)

[学会発表] (計 10 件)

1) Niimi H, Ueno T, Hayashi S, Mori M, Tabata H, Minami H, Kitajima I: A novel rapid method enables identification of pathogenic micro-organisms within 3 hours after samples are collected. 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2012, 4, 2, London, UK
 2) Niimi H, Ueno T, Hayashi S, Mori M, Tabata H, Minami H, Saito S, Kitajima I: A novel TM-mapping method that enables

identification of pathogenic microorganisms within 3 hours after samples are collected. 52nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2012, 9, 11, San Francisco, CA, USA

3) 北島勲：菌血症/全身炎症反応症候群に対する迅速・高感度検査システムの構築。第22回日本臨床化学会九州支部総会・第56回日本臨床検査医学会九州地方会合同会。2011, 2, 12, 福岡

4) 北島勲：菌血症/全身炎症反応症候群に対する迅速高感度検査システムの構築。平成23年度臨床検査医学研究振興基「小酒井望賞」受賞講演 2, 3, 2012, 東京

5) 北島勲：新しい臨床化学への挑戦 - 新規酵母由来耐熱性DNA polymeraseの開発と転写因子NF- κ B測定の実用化への応用を通じて。第30回日本臨床化学会甲信越支部総会。6, 2, 2012, 松本

6) Kitajima I, Yoshioka K, Kabata T, Tani M, Tomita K, Uji Y: Rapid change of the fibrin monomer complex level during the perioperative period for early diagnosis of venous thrombolism. 21st International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. May 15-19, 2011, Berlin, Germany

7) Kitajima I, Harada K, Tomoda F, Kagitani S, Koike T, Inoue H: NF- κ B activity in the peripheral blood lymphocytes correlates with metabolic syndrome-related biomarkers in patients with essential hypertension. 2011 American Society for Clinical Pathology Annual Meeting/WASPaLM XXVI World Congress, October 19-23, 2011, Las Vegas, USA

8) Niimi H, Mori M, Minami H, Ueno T, Hayashi S, Kitajima I: Highly sensitive detection of bacteria using novel "eukaryote-made" Taq polymerase. 21st International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. May 15-19, 2011, Berlin, Germany

9) Sakata Y, Mimuro J, Takahashi H, Tshuji H, Eguchi Y, Kitajima I, Matsushita T, Kuroda T: Post-marketing surveillance of the safety and effectiveness of thrombomodulin alfa in Japanese patients with DIC. XXIII Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis. July 26, 2011, Kyoto, Japan

10) 北島勲：転写因子NF- κ Bから斬る炎症、がん、血液凝固のクロストーク。第12回Pharmaco-Hematology シンポジウム、2011, 6, 17, 富山

〔図書〕(計4件)

1) 北島勲：凝固・線溶と臨床検査。わかりやすい血栓と止血の臨床 (日本血栓止血学会編集)、南江堂、東京、p10-14、2011

2) 北島勲：プロトロンビン時間(PT)、トロンボテスト(TT)、ヘパプラスチンテスト(HPT)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)。臨床検査データブック 2011-2012 (黒川清、春日正雅、北村聖編集)、医学書院、東京、p375-379、2011

3) 北島勲：トロンビンとアンチトロンビン。血管生物医学事典 (佐藤靖史、森田育夫、高倉伸幸、小室一成監修、日本血管生物医学会編集)、朝倉書店、東京、p134-135、2011

4) 北島勲：トロンビン受容体。血管生物医学事典 (佐藤靖史、森田育夫、高倉伸幸、小室一成監修、日本血管生物医学会編集)、朝倉書店、東京、p279、2011

〔産業財産権〕

○取得状況 (計1件)

名称：Method for identifying pathogenic microorganisms responsible for infection by extracting the DNA of a microorganism.

発明者：Miimi H, Kitajima I

権利者：富山大学

種類：特許(United States Patent)

番号：US8,323,898 B2

取得年月日：Dec.4, 2012

国内外の別：国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北島 勲 (Kitajima Isao)

富山大学・医学薬学研究部 (医学)・教授

研究者番号：50214797

(2) 研究分担者

仁井見 英樹 (Niimi Hedeki)

富山大学・附属病院・助教

研究者番号：50401865