

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：37604

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590718

研究課題名(和文)新規ラジカル捕捉剤を用いた免疫スピントラップ法の開発と臨床的有用性の検証

研究課題名(英文)Evaluation of new radical measurement method using imuno-spin trapping with anti-spin trap antibody

研究代表者

佐藤 圭創 (Sato, Keizo)

九州保健福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：00315293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレスは、三大成人病をはじめ、糖尿病、感染症・炎症、急性肺傷害、老化など様々な疾患病態と深く関連していることから、正確で簡便な酸化ストレスマーカー測定法の開発が強く求められている。そこで我々は、ラジカル捕捉剤の抗体を用いることにより、安定でかつ高感度に酸化ストレスの本体である、ラジカルの測定法の開発を行った。その結果、抗ラジカル捕捉剤の抗体(抗DMP0抗体)を用いた、免疫染色法、ELISA法、HPLC法でラジカル測定できることを確認できた。本方法は、新規酸化ストレス測定として、あらゆる分野の研究に貢献できると考えられた

研究成果の概要(英文)：Oxidative Stress have important roles in various diseases such as diabetes, infectious disease, inflammatory disease, lung injury and aging. Therefore, development of a correct and handy method of oxidative stress is desired. So we have developed the new radical measurement method which is stable and high sensitive by using an antibody of a radical trap agent. As a results, It could be confirmed that it can be gauged, a immunostain method, ELISA method and HPLC method. Consequently, I could think this method could contribute to a study of all fields as new oxidation stress measurement.

研究分野：酸化ストレスの本体であるフリーラジカルの新規測定法の開発

キーワード：酸化ストレス フリーラジカル ラジカル捕捉剤 抗ラジカル捕捉剤抗体

1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスは、三大成人病をはじめ、糖尿病、感染症・炎症、急性肺傷害、老化など様々な疾患病態と深く関連している(Biochem. J. 401: 1, 2007)ことから、正確で簡便な酸化ストレスマーカー測定法の開発が強く求められている。しかし、現在使用されている酸化ストレスマーカー測定法の多く(化学発光、8-OHdG、cytochrome C還元法、NBT還元法、ヘキサノイルリジン、アクロレイン、タンパク質過酸化物質など)は、*in vitro*の限られた実験では有用であるものの、生体試料そのものを用いた実験や*in vivo*のフリーラジカル検出においては、試料中の金属、還元性物質、蛋白、酸素濃度によるアーチファクトが多く、再現性の良い結果が得られていない(Free Radic. Biol. Med. 43: 506, 2007)。さらに、これらの方法は間接的なマーカーであり、フリーラジカルにより引き起こされる酸化ストレスを直接検出できないため、信頼性が高く、且つフリーラジカルを直接検出することが可能となる「酸化ストレスマーカー測定法の開発」が渴望されている。一方、酸化ストレス病態に対して、抗酸化剤での治療を試みた場合(New Eng. J. Med. 357: 562, 2007)の治療効果評価においては、酸化ストレスの測定が必要であるにも拘わらず、現行の酸化ストレスマーカーでは正確な評価が出来ないために、抗酸化治療の発展の障害ともなっている。

2. 研究の目的

現在、三大成人病をはじめとする各種疾患において、「酸化ストレス」がその病態に深刻に関与していると考えられている。しかし、実際に、ヒトや動物実験で酸化ストレスがどの程度起こっているかを直接測定することは容易でなく、また酸化ストレスを制御する治療法の研究も進んでいない。そこで、我々は、自身で開発した新しいフリーラジカル捕捉剤を用いて、酸化ストレスのもととなるフリー

ラジカルを安定化させ、フリーラジカル捕捉剤に対する、抗体を用いた免疫学的手法により、高感度に定量する方法を開発することを目的とした課題に取り組むこととした。本課題は、三大成人病をはじめとする各種疾患での酸化ストレスの病態解析や治療薬の開発などに応用可能な、新規バイオマーカーを測定する汎用性の高い測定法を開発して、医学薬学領域のニーズに応えるものであると考える。

3. 研究の方法

ラジカルを安定化させるラジカル捕捉剤の抗体を作成し、電子スピン共鳴法、免疫染色法、ELISA法、HPLC法、などを用いて、ラジカルを測定する。

4. 研究成果

(1)DMPO及びDPPMPOの抗体の作成：

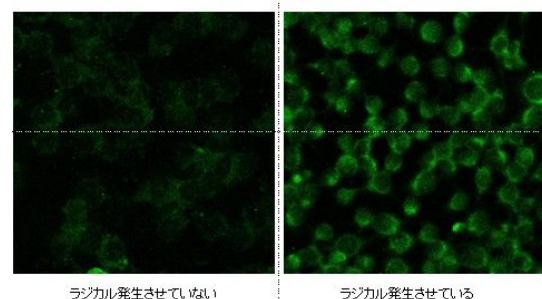
DMPO(5,5-dimethyl pyrroline N-oxide)の抗体作成は成功するも、DPPMPO(DMPO誘導体)の抗体は、構造がDMPOと類似しており、特異度の高い抗体が得られなかった。このため、実験は、主に抗DMPO抗体(ポリクローナル)を用いて行った。

(2)免疫染色によるラジカルの可視化

RAW264.7をLPSで刺激しラジカルを産生させ、抗DMPO抗体をもちいて、免疫染色した。その結果、ラジカル産生を確認できた(図1)。

図1

細胞を用いた免疫染色



(3)ミオグロビンを用いたエライザ系でのラジカル検出

ミオグロビンにフェントン反応によるヒドロキシラジカルを暴露させ、ミオグロビンラジカル-DMPO 複合体の検出を試みたところ、抗 DMPO 抗体を用いた ELISA 法で検出できた (図 2 & 3)

図 2

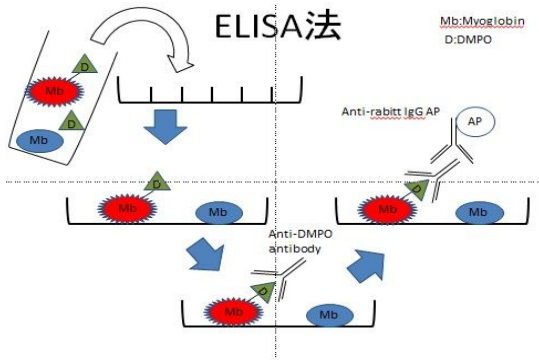
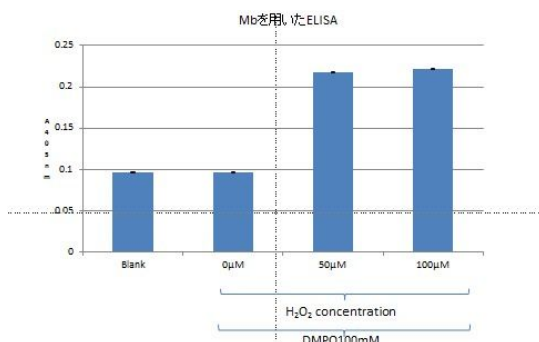


図 3

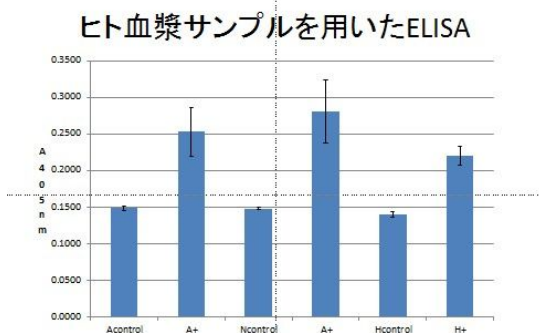


ELISAによってラジカルを測定することが可能

(4) ヒト血漿サンプルを用いたラジカル生成検討

ヒト血清にフェントン反応によるヒドロキシラジカルを暴露させ、抗 DMPO 抗体を用いた ELISA 法で検出できた (図 4)

図 4



ヒト血液でもラジカルを測定することが可能

(5) HPLC を使った新規測定法

ELISA 法は、タンパク質ラジカルしか検出できないため、より汎用性の高い測定法の開発を目指してアフィニティカラムを用いた HPLC 法を開発した (図 5)。その結果、HPLC を用いて、ラジカルの検出ができることを確認した (図 6)

図 5

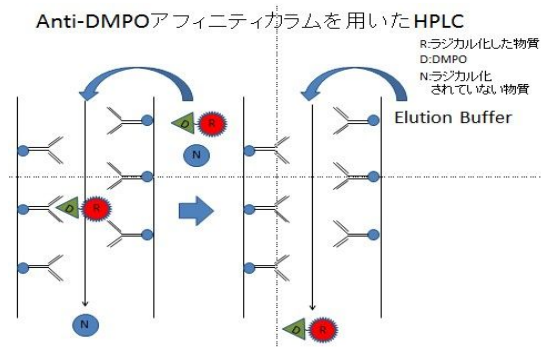
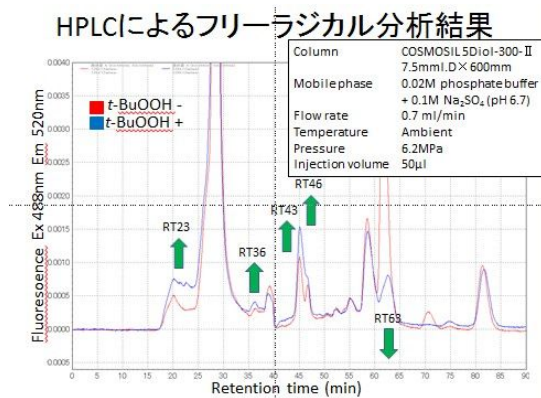


図 6



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1) Tanaka K, Ishihara T, Sugizaki T, Kobayashi D, Yamashita Y, Tahara K, Yamakawa N, Iijima K, Mogushi K, Tanaka H, Sato K, Suzuki H, Mizushima T.

Mepenzolate bromide displays beneficial effects in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease. *Nature Commun.* 4, 2013, 2686. 査読あり

〔学会発表〕(計 3件)

1)中村 聡志, 坂本 貴史, 伊藤 優哉, 宮崎 雄二, 新屋 智寛, 佐藤 圭創

Diclofenac の抗酸化活性の検討

第 86 回日本生化学会大会, 2013.9.11-13, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

2)横田 翼, 中山 志織, 長谷川 将, 大木 沙由梨, 中村 聡志, 新屋 智寛, 佐藤 圭創

緑膿菌性肺炎に対する L-carbocistein の抗酸化作用の検討

第 86 回日本生化学会大会, 2013.9.11-13, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

3)渡邊句美, 山下美紀子, 橋口誠子, 新屋 智寛, 佐藤圭創

去痰薬 L-carbocisteine の抗酸化活性の検討

第 53 回日本呼吸器学会学術集会,
2013.4.19-21. 東京国際フォーラム (東京都)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 圭創 (SATO, Keizo)

九州保健福祉大学・薬学部・薬学科・教授
研究者番号 : 00315293

(2)研究分担者

新屋 智寛 (SHINYA, Tomohiro)

九州保健福祉大学・薬学部・薬学科・助教
研究者番号 : 60551299