

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07892

研究課題名(和文)慢性閉塞性肺疾患の早期検査法の開発

研究課題名(英文)Development of early detection method for Chronic Obstructive Pulmonary Disease

研究代表者

柴田 孝之 (SHIBATA, Takayuki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・助教

研究者番号：10448491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、慢性閉塞性肺疾患(COPD)の早期発見法の確立を目指して、申請者らが独自に開発したペプチド配列特異的な蛍光誘導体化反応を応用し、COPDのバイオマーカーであるプロリン-グリシン-プロリンという配列のトリペプチドを定量できる技術の開発を行った。その結果、喀痰を直接蛍光反応に付し、得られた反応液の上清を高速液体クロマトグラフィーによって分離・検出するのみで、COPD患者の喀痰に含まれる微量の標的マーカーを簡便に定量することに成功した。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present research is the development of an early detection method for Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). For this purpose, the peptide sequence-specific fluorescence derivatization reaction has been utilized in order to detect the proline-glycine-proline tripeptide which is known as a biomarker for COPD. The sputum sample from a COPD patient was applied to the fluorescence reaction, and the resulting supernatant was analyzed with high-performance liquid chromatography. As the result, a minimal amount of the target marker was successfully quantified.

研究分野：分析化学

キーワード：慢性閉塞性肺疾患 ペプチド 蛍光 臨床検査

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は、好中球が炎症細胞の主体を占める慢性的な呼吸器疾患である。発症初期は咳嗽・喀痰・喘鳴・息切れなど風邪に似た症状を示すが、重篤化すると呼吸不全を誘発し慢性的な呼吸困難を来すことから、死よりも苦しい病気として恐れられている。発症の原因は多岐にわたるが、「たばこ病」の通称が示す通り、喫煙が最も発症リスクの高い要因である。一方、大気汚染による有害物質の吸入曝露も COPD の主因であることが分かっており、受動的かつ外因性の発症リスクを有することから、COPD は世界規模で社会問題となっている。

COPD の診断では一般的に、スパイロメーターを用いた呼吸機能検査で気流制限を確認し、胸部 X 線や CT などの画像診断で確定診断を行う。従って、患者の自覚症状が早期発見に重要であるが、上述の通り COPD の初期症状は比較的軽く、また経過が緩徐であることから、症状が現れた場合に風邪・加齢・疲労が原因と自己判断され易い。そのため、重症化後に COPD と診断されるケースが非常に多く、COPD 死者数は同じ呼吸器疾患である喘息死者数の 6 倍にも上る。COPD 患者数は世界的に増加傾向にあり、今後も増加すると予測されている。このような背景から、早期の段階で COPD を診断できる技術の開発が、世界中で望まれ続けている。

2. 研究の目的

本研究では、COPD の早期検査法の確立を目標として、申請者らが開発した 3,4-ジヒドロキシン安息香酸 (3,4-DHPAA) を用いるペプチド配列特異的な蛍光反応を応用し、COPD のバイオマーカーとして見出されたトリペプチドであるプロリン グリシン プロリン (PGP) を標的とした、生体試料中の PGP を簡便かつ迅速に定量できる技術の創製を目的としている。

3. 研究の方法

PGP を水に溶解して 10 μ M 溶液を調製し、これを PGP 標品として適宜希釈した。反応液の容量を 100 μ L に設定し、これに合わせて 3,4-DHPAA、ホウ酸緩衝液および過ヨウ素酸塩溶液の濃度を適宜調節した。0.5 mL チューブに PGP、3,4-DHPAA、ホウ酸緩衝液、過ヨウ素酸塩の順に添加し、一定時間静置後に反応液の蛍光強度を蛍光分光光度計にて測定した。また、蛍光検出器を備えた逆相 HPLC にて分離・検出を行った。血清を用いた実験では、ヒト血清プールに濃度既知の PGP 標品を添加したものを調製し、同様に PGP を検出した。COPD 患者の喀痰サンプルを用いた実験では、喀痰 50 μ L に PBS を 50 μ L を添加して良く混合し、遠心分離した後の上清を 3,4-DHPAA 反応に付した。検出法は、上述の方法に従った。

4. 研究成果

(1) 平成 27 年度は、まず 3,4-DHPAA 反応に必要な酸化剤・緩衝剤・反応促進剤の種類と濃度を網羅的に探索し、PGP を蛍光検出できる反応条件の最適化を行った。その結果、本反応にはホウ酸緩衝液が必須であるだけでなく、反応液の pH が 7.9 ~ 8.3 の範囲、かつホウ酸の濃度が 25 ~ 35 mM の領域でのみ蛍光体を与えるという、極めて限られた条件下で進行することが明らかになった。また、3,4-DHPAA の終濃度は 1 ~ 2 mM、酸化剤の種類は過ヨウ素酸塩、その終濃度は 25 ~ 125 μ M が、それぞれ最適条件であると判明した。

次に、本反応による PGP の定量を指向して、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた PGP 蛍光体の分離・検出を試みた。興味深いことに、溶離液にホウ酸緩衝液を使用しない場合、全く蛍光ピークが出現しなかった。この結果より、PGP 蛍光体における発色団は非常に不安定であり、ホウ酸非存在下では構造を維持できないことが分かった。一方、一定濃度のホウ酸が存在すれば、有機溶媒が混和しても蛍光体の構造は保持された。以上の結果より、PGP を検出・定量するための HPLC 条件を明らかにできた。

(2) 平成 28 年度は、実際に生体試料としてヒト血清を使用して、血清中 PGP の定量の可能性を検討した。まず、血清が PGP 蛍光反応に及ぼす影響を調べたところ、わずか 10 μ L の血清を PGP 蛍光反応液に添加するだけで蛍光反応が阻害されることが分かった。そこで、反応阻害物質の除去を目的として、有機溶媒による血清の前処理を試みた。それと同時に、前処理に使用する有機溶媒が蛍光反応に及ぼす影響を評価した。その結果、アルコール系溶媒を使用すると血清タンパク質を効率よく除去できること、更に PGP 蛍光反応によって得られる蛍光強度が増強することを見出した。最終的に、エタノールを前処理溶媒として採用し、100 μ L の血清を PGP 蛍光反応に供する反応条件を確立した。

この最適化された条件を用いて、PGP の添加回収実験を行った。すなわち、濃度既知の PGP 標準液を添加した血清 100 μ L を使用して、エタノール処理を経て蛍光反応に付し、得られた蛍光強度を検量線を用いて定量し、算出した PGP 量を実際に添加した PGP 量と比較した。その結果、回収率は 89 ~ 100% であった。以上の結果より、ヒト生体試料に含まれる PGP 量を正確に定量する手法を開発した。

(3) 平成 29 年度は、これまでに検討した生体試料中の PGP の定量法を踏襲し、実際に重度の COPD 患者から得られた喀痰サンプルを使用して、喀痰中 PGP 量の定量を試みた。均一なホモジネートにした喀痰 50 μ L に PBS 50 μ L を添加して良く混合し、遠心分離した後の上清を 3,4-DHPAA 反応に付した。

まず、予備的実験として、喀痰のみから得られた蛍光強度と、喀痰に PGP 標品をスパイクして得られた蛍光強度を比較した。その結果、喀痰に大量の蛍光物質が含まれており、分光蛍光度計を使用して PGP 由来の蛍光強度のみを正確に得ることが困難であった。

そこで、平成 27 年度の成果を基に、蛍光反応液を HPLC に供して PGP 由来のピークを分離・検出することで、PGP の定量を試みた。その結果、喀痰中の PGP 由来の蛍光ピークを同定可能であることを見出した。得られたクロマトグラムから算出した本検体中の PGP 量は 0.207 $\mu\text{mol/L}$ であった。以前論文で紹介された、LC/MS/MS 法にて測定した COPD 患者の喀痰中 PGP 濃度が 0.2153 $\mu\text{mol/L}$ と報告されていることから、本手法によって得られた PGP 値は、重篤な COPD 患者の喀痰に含まれる PGP 量として適当な値であると予想される。

以上、本研究では、独自に開発したペプチド特異的な発蛍光試薬である 3,4-DHPAA を用いて、喀痰を直接蛍光反応に付して得られた蛍光体を HPLC にて分離・検出するのみで、COPD 患者の喀痰に含まれる微量のマーカである PGP トリペプチドを定量できる可能性を示した。

<引用文献>

O'Reilly P, Jackson PL, Noerager B, Parker S, Dransfield M, Gaggan A, Blalock JE, N- α -PGP and PGP, potential biomarkers and therapeutic targets for COPD. *Respir. Res.*, **10**, 38-45 (2009).

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 7 件)

柴田 孝之, 宗 初枝, 慢性閉塞性肺疾患の診断を指向したペプチドマーカーの高感度検出法, アレルギーの臨床, 38(1), 89-92 (2018). (査読有)

Yasmin H, Rahman MS, Shibata T: Facile and selective determination of dipeptides using 3-methylcatechol as a novel fluorogenic reagent. *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 1-7 (2018). (査読有)
DOI: 10.1007/s10989-018-9703-z

柴田 孝之, ペプチド配列特異的な蛍光反応を利用した慢性閉塞性肺疾患のスクリーニング検査法, アレルギーの臨床, 37(7), 667-670 (2017). (査読有)

柴田 孝之, 慢性閉塞性肺疾患の早期検査法の開発, アレルギーの臨床, 37(4), 367-367 (2017). (査読有)

Yin S, Kabashima T, Zhu Q, Shibata T, Kai M: Fluorescence assay of dihydroorotate dehydrogenase that may become a cancer biomarker. *Sci. Rep.*, **7**, 40670 (2017). (査読有)
DOI: 10.1038/srep40670

Zhu Q, Yu Z, Kabashima T, Yin S, Dragusha S, El-Mahdy AF, Ejupi V, Shibata T, Kai M: Fluorometric assay for phenotypic differentiation of drug-resistant HIV mutants. *Sci. Rep.*, **5**, 10323 (2015). (査読有)
DOI: 10.1038/srep10323

Yin S, Dragusha S, Ejupi V, Shibata T, Kabashima T, Kai M: Sensitive and Selective Determination of Orotic Acid in Biological Specimens Using a Novel Fluorogenic Reaction. *J. Fluoresc.*, **25**, 1005-1011 (2015). (査読有)
DOI: 10.1007/s10895-015-1584-3

[学会発表](計 18 件)

椛島 力、安達杏奈、甲斐雅亮、柴田孝之, DNA methyltransferase 活性測定用の新規 FRET 基質の開発, 日本薬学会第 138 年会, 2018 年 3 月 25-28 日, 石川県立音楽堂、他(石川県・金沢市)

柴田孝之、富田真央、甲斐雅亮、椛島 力、アミノ酸の構造を識別する新規呈色法, 新アミノ酸分析研究会第 7 回学術講演会, 2017 年 12 月 4 日, 大田区産業プラザ PiO (東京都)

椛島 力、安達杏奈、甲斐雅亮、柴田孝之, FRET を用いた新規 DNA methyltransferase 活性測定法の開発, 第 34 回日本薬学会九州支部大会, 2017 年 11 月 25-26 日, 崇城大学(熊本県・熊本市)

島村亮祐、根本俊光、櫻井宏樹、甲斐雅亮、椛島 力、柴田孝之, ウラシル特異的蛍光反応の DPD 欠損症診断法としての展開, 第 34 回日本薬学会九州支部大会, 2017 年 11 月 25-26 日, 崇城大学(熊本県・熊本市)

片山晶誠、甲斐雅亮、椛島 力、柴田孝之, ヒストン脱アセチル化酵素の新規活性測定法の開発, 第 34 回日本薬学会九州支部大会, 2017 年 11 月 25-26 日, 崇城大学(熊本県・熊本市)

柴田孝之, 高選択的な新規非加熱式アミノ酸呈色反応, 第 16 回バイオ・ライフサイエンス研究展 Bio tech 2017, 2017 年 6 月 28-30 日, 東京ビッグサイト(東京)

都)

島村亮祐、柴田孝之、根本俊光、尹 晟、
椋島 力、甲斐 雅亮、ウラシル特異的蛍
光反応を用いた尿中ウラシルの HPLC
定量法、日本薬学会第 137 年会、2017 年
3 月 24-27 日、仙台国際センター(宮城
県・仙台市)

柴田孝之、椋島 力、廣谷真優、前田朋
樹、甲斐雅亮、簡便かつ高選択的な新規
アミノ酸呈色法、新アミノ酸分析研究会
第 6 回学術講演会、2016 年 11 月 4 日、東
京大学(東京都・文京区)

柴田孝之、島村亮祐、根本俊光、尹 晟、
椋島 力、甲斐雅亮、DPD 欠損症のスク
リーニング検査を指向した尿中ウラシル
濃度の蛍光定量法、日本分析化学会第
65 年会、2016 年 9 月 14-16 日、北海道大
学(北海道・札幌市)

柴田孝之、弱酸性条件下でのみ発光する
新規蛍光物質、第 15 回国際バイオテク
ノロジー展 Bio tech 2016、2016 年 5 月
11-13 日、東京ビッグサイト(東京都)

大島澄佳、柴田孝之、椋島 力、甲斐雅
亮：新規蛍光反応による DNA 中のメチ
ル化シトシン定量法の開発。日本薬学会
第 136 年会、2016 年 3 月 26-29 日、パシ
フィコ横浜(神奈川県・横浜市)

柴田孝之、田上奈緒美、椋島 力、甲斐雅
亮：ペプチドの新規蛍光検出反応および
HPLC によるヒストン修飾部位の解析。
新アミノ酸分析研究会第 5 回学術講演会、
2015 年 12 月 7 日、東京大学(東京都・
文京区)

安達杏奈、椋島 力、柴田孝之、甲斐雅
亮：DNA アプタマーの HER2 発現細胞
への導入。第 32 回日本薬学会九州支部
大会、2015 年 11 月 28-29 日、九州保健
福祉大学(宮崎県・延岡市)

陣内伸俊、椋島 力、柴田孝之、甲斐雅
亮：プリオンタンパク質の加熱処理によ
るプロテアーゼ抵抗性への影響。第 32
回日本薬学会九州支部大会、2015 年 11
月 28-29 日、九州保健福祉大学(宮崎
県・延岡市)

田上奈緒美、椋島 力、柴田孝之、甲斐雅
亮：新規蛍光反応によるヒストン修飾解
析法の開発。第 32 回日本薬学会九州支
部大会、2015 年 11 月 28-29 日、九州保
健福祉大学(宮崎県・延岡市)

Sheng Yin, Tsutomu Kabashima,

Takayuki Shibata, Masaaki Kai :
Fluorometric assay of dihydroorotate
dehydrogenase activity and orotic acid
concentration in a cell lysate. 日本分
析化学会第 64 年会、2015 年 9 月 9-11 日、
九州大学(福岡県・福岡市)

Valon Ejupi, Tsutomu Kabashima,
Takayuki Shibata, Masaaki Kai :
Collagenase activity and its
stimulation in cultured cells by
spectrofluorometric evaluation. 日本
分析化学会第 64 年会、2015 年 9 月 9-11
日、九州大学(福岡県・福岡市)

安達杏奈、朱 欽昌、椋島 力、柴田孝之、
甲斐雅亮：DNA アプタマー-siRNA によ
る HIV プロテアーゼの発現抑制効果。
第 28 回バイオメディカル分析科学シン
ポジウム、2015 年 8 月 21-23、長崎大学
(長崎県・長崎市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
○出願状況(計 3 件)

名称：アミノ酸およびペプチドの検出方法な
らびに検出試薬
発明者：甲斐雅亮、椋島力、柴田孝之
権利者：国立大学法人長崎大学
種類：特許
番号：特願 2016-014936
出願年月日：平成 28 年 1 月 28 日
国内外の別：国内

名称：pH 依存性蛍光化合物
発明者：柴田孝之
権利者：国立大学法人長崎大学
種類：特許
番号：特願 2016-068416
出願年月日：平成 28 年 3 月 31 日
国内外の別：国内

名称：非 RI でのジヒドロピリミジンデヒド
ロゲナーゼ活性測定方法
発明者：柴田孝之
権利者：国立大学法人長崎大学
種類：特許
番号：特願 2017-118941
出願年月日：平成 29 年 6 月 16 日
国内外の別：国内

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/function/index-j.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

柴田 孝之 (SHIBATA, Takayuki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・

助教

研究者番号：10448491

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

島村 亮祐 (SHIMAMURA, Ryosuke)

櫻井 宏樹 (SAKURAI, Hiroki)