

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 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700460

研究課題名（和文） 霊長類におけるストレス蛋白質の解析

研究課題名（英文） Analysis of the stress protein in primates

研究代表者

東濃 篤徳 (Higashino Atsunori)

京都大学・霊長類研究所・特定研究員

研究者番号：30470199

研究成果の概要（和文）：

小胞体ストレス蛋白質のひとつにカルレティキュリン (Crt) がある。Crt は分子量約 55 kDa のタンパク質であり、細胞内小器官である小胞体に常駐する分子シャペロンの一種である。その細胞外での機能はまだ完全には明らかにされていないが、様々な疾患で血中濃度の変動が報告されているため、細胞外での機能解明は重要であると考えられる。

カニクイザル血漿中における Crt 自己抗体の加齢に伴う変化を調査したところ、Crt 自己抗体は加齢に伴う増加を示したが、Crt の増減は加齢との相関は見られなかった。次にカニクイザルリンパ球中における制御性 T 細胞の関与する免疫寛容系の加齢による変化を解析したところ、細胞抗原マーカーである FOXP3、FOXP3/CD25、CD25/CD4 の発現が若齢サル血球に比べて老齢ザル血球で減少していることが明らかになった。またカニクイザル白血球細胞において Crt によって発現量が増加した遺伝子群は細胞骨格再構築、免疫および細胞接着に関与する遺伝子群であった。

研究成果の概要（英文）：

Calreticulin (Crt) is a molecular chaperone ubiquitously present in the endoplasmic reticulum. In non-human primates, age-related occurrence of anti-Crt antibody has not been reported. We developed an ELISA assay for an anti-Crt antibody and determined the age-related increase in the levels of anti-Crt antibody in three groups of cynomolgus monkeys: juvenile (1.5 yr), young adults (5-10yr) and aged adults (20-34 yr). Mean \pm SD auto-antibody levels at 450 nm in juvenile, young adults and aged groups were 0.23 ± 0.18 , 0.30 ± 0.28 , and 0.55 ± 0.33 , respectively. Statistically significant differences were noted in the autoantibody levels to Crt among the aged group and juvenile or young adults. This is the first report to demonstrate the expression of anti-Crt autoantibody in aged monkeys and indicates that cynomologous monkeys may serve as an appropriate nonhuman primate model for studies of age-related alteration of immune function in elderly humans.

Next, we examined the effects of exogenous Crt for gene expression in macaque blood cells. Transcriptome data from whole blood cells of cynomolgus monkeys were obtained using the next-generation sequencer SOLiD. The short-read tags obtained from this analysis were mapped on the rhesus macaque genome sequence. Addition of exogenous Crt protein increased some gene expressions, such as cytoskeleton remodeling, immune, and cell adhesion. The data show a possibility of application of stress proteins for veterinary medical research of macaque monkeys.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000

年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：環境・施設，分子生物学

1. 研究開始当初の背景

動物が精神的あるいは身体的ストレスを受けると細胞内環境が変化し、タンパク質の合成過程に影響を与えることにより変性タンパク質が増加する。分子シャペロンと呼ばれるストレスタンパク質はこれら変性タンパク質の修復をおこなうものである。修復には複数のストレスタンパク質が関与しており、細胞質ストレス応答系・小胞体ストレス応答系の2つが知られる。後者では特に小胞体中で合成される糖鎖結合の分泌タンパク質や膜タンパク質などの重要なタンパク質の修復に関与するものである。代表的な小胞体ストレスタンパク質としてカルレティキュリン(Crt)が知られている。Crtは現在、臨床応用としてヒト膀胱癌のマーカーとしての利用が報告されている。またCrtは精神的ストレスマーカーである糖質コルチコイドの受容体として機能するが、その細胞外での機能はまだ完全には明らかにされていない。様々な疾患でCrt血中濃度の変動が報告されているため、細胞外での機能解明は重要であると考えられる。

2. 研究の目的

ヒトに近縁なサル類におけるCrt自己抗体の血中濃度を測定し、自己抗体濃度の高い個体を選抜し、これらの個体における生理的特徴を見出す。これまでに確立されているCrt組換タンパク質発現系を用いてリコンビナントタンパク質を精製し、これを用いて細胞外Crtのサル類血球細胞への免疫学的作用における機能を、遺伝子発現を指標として解析する。

3. 研究の方法

(1)独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医学科学研究センターのカニクイザルから測定サンプルとして血漿を収集した。血中Crt測定用サンプルとしてカニクイザル血漿を幼齢群(1.5歳)10頭、若齢群(5-10歳)20頭、老齢群(20-34歳)63頭の3群から、合計93サンプルの収集を行った。Crt自己抗体を測

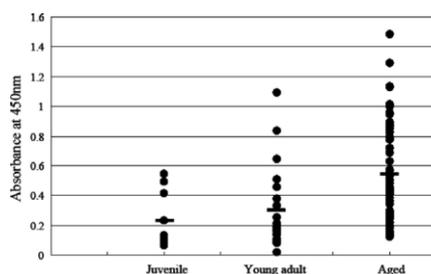
定するためのELISA法に用いる標準物質としてCrt組換タンパク質発現系を用いてリコンビナントタンパク質を精製し、Crt自己抗体のELISA測定系を確立した。カニクイザル血漿中におけるCrt自己抗体の加齢に伴う変化を調査した。

(2)カニクイザルリンパ球中における制御性T細胞の関与する免疫寛容系の加齢による変化をフローサイトメトリーによって解析した。

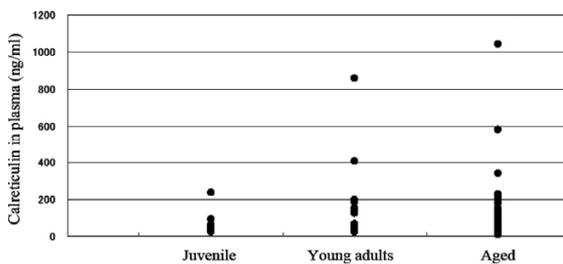
(3)Crtの細胞外での機能について遺伝子発現を指標として解析した。カニクイザル白血球は、リポ多糖(LPS)を添加したRPMI-1640培地によって培養された。SOLiD-4 systemを用いてCrt存在下、非存在下の各細胞の遺伝子発現について解析した。解析された約30,000の遺伝子のうち、およそ18,000の遺伝子についての発現量はthe reads per kilobase of exon length per million mapped reads (RPKM)値によって比較された。この中で発現量の高かった約7,700の遺伝子について、さらにpathway解析を行った。

4. 研究成果

(1)Crt自己抗体を測定するためのELISA法に用いる標準物質としてCrt組換タンパク質発現系を用いてリコンビナントタンパク質を精製し、Crt自己抗体のELISA測定系を確立した。カニクイザル幼齢群、若齢群、老齢群の3群間において血漿中におけるCrt自己抗体の加齢に伴う変化を調査したところ、Crt自己抗体は加齢に伴う増加を示した(図1)が、Crtの増減は加齢とは関係がない傾向が見られた(図2)。



(図 1) 幼齡, 若齡, 老齡カニクイザル個体群における血漿中抗カルレティキュリン自己抗体の (450nm 吸光度による) 比較



(図 2) 幼齡, 若齡, 老齡カニクイザル個体群における血漿中カルレティキュリン濃度の比較

(2) 抗原となりうる Crt の恒常性と Crt 自己抗体の加齢による増加という現象から, 加齢により免疫寛容系の崩壊が起こり自己免疫疾患の要因になっているのではないかと予想した. そこでカニクイザルリンパ球中における制御性 T 細胞の関与する免疫寛容系の加齢による変化をフローサイトメトリーによって解析したところ, 細胞表面抗原マーカーである FOXP3, FOXP3/CD25, CD25/CD4 の発現が若齡サル血球に比べて老齡ザル血球で減少する傾向を見出した (表 1).

Suppressive/regulatory T cell (%)	Peripheral blood mononuclear cells	
	Young adult monkey ^a	Aged monkey ^b
Fox P3	0.41 (stdev 0.16)	0.25 (stdev 0.15)
Fox P3/CD 25	1.76 (stdev 0.69)	0.78 (stdev 0.33)
Total FoxP3	2.17 (stdev 0.69)	1.03 (stdev 0.39)
CD25/CD4	3.14 (stdev 1.55)	1.51 (stdev 0.75)
FoxP3/CD25/CD4	59.15 (stdev 15.15)	54.18 (stdev 17.25)

(表 1) 若齡, 老齡カニクイザル個体群における制御性 T 細胞に関する細胞表面抗原マーカーの比較

(3) Crt の細胞外での機能について遺伝子発現を指標として解析した. 次世代シーケンサーを用いて Crt 存在下, 非存在下の各細胞の遺伝子発現について解析した. 発現量の高かった約 7,700 の遺伝子について pathway 解析を行ったところ, Crt 存在下, 非存在下の各細胞で発現量が高かった上位 20 の遺伝子は 90%が一致しており, それらは免疫反応関連の遺伝子であった. LPS で刺激されたカニクイザル白血球細胞において Crt によって発現量が増加した遺伝子は細胞骨格再構築 (Cytoskeleton remodeling TGF), 免疫 (CD40, IL-15 signaling) および細胞接着 (Cell adhesion Chemokines) に関与する遺伝子群であった. これらの pathway 解析における危険率は $< 7.5e-16$ であり, その発現量の向上

に Crt が有意に作用していることが考えられた (表 2).

Maps	p Value
Cytoskeleton remodeling TGF, WNT and cytoskeletal remodeling	2.88E-19
Immune response CD40 signaling	8.26E-18
Immune response IL-15 signaling	7.46E-16
Cytoskeleton remodeling Cytoskeleton remodeling	1.93E-16
Cell adhesion Chemokines and adhesion	3.13E-16

(表 2) 外因性カルレティキュリンによる影響を受けた遺伝子発現経路

以上の結果はサル類の加齢による免疫調整機構の変化の一端を示す. サル類のみならず, 比較的近縁なヒトの健康統御においても応用可能な基礎データとなる.

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 1 件)

- ① Atsunori Higashino, Takashi Kageyama, Sachi Sri Kantha and Keiji Terao
Detection of Elevated Antibody Against Calreticulin by ELISA in Aged Cynomolgus Monkey Plasma
査読有り
Zoological Science, 28(2):85-89.
2011.
DOI: 10.2108/zsj.28.85

[学会発表] (計 5 件)

- ① 東濃篤徳, 坂手龍一, 高橋一朗, 足立 淳, 朝長 毅, 保富康宏, 亀岡洋祐
カニクイザル白血球における細胞外カルレティキュリンによる遺伝子発現の変化
2011. 12. 14
第 34 回日本分子生物学会年会
パシフィコ横浜
- ② 竹内昌男, 東濃篤徳, 竹内喜久子, 牧野初音, 田沼玲子, 足立 淳, 高橋一朗, 朝長 毅, 梅澤明弘, 亀岡洋祐
ヒト間葉系幹細胞株 (UE6E7T-3) の形質転換過程における mRNA 発現解析
2011. 12. 14
第 34 回日本分子生物学会年会
パシフィコ横浜
- ③ 東濃篤徳, 長田直樹, 坂手龍一, 平田誠, 亀岡洋祐, 保富康宏, 高橋一朗
次世代シーケンサーを用いたカニクイザルにおける遺伝子発現解析
2010. 12. 7
第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回

日本生化学会大会, 合同大会
神戸国際展示場

- ④ 東濃篤徳, 景山節, サチスリカクタ, 寺尾
恵治

カニクイザル血漿における カルレティ
キュリン自己抗体の加齢に伴う増加

2010. 9. 25

日本動物学会第 81 回大会

東京大学駒場キャンパス

- ⑤ Atsunori Higashino, Naoki Osada,
Yosuke Kameoka, Ichiro Takahashi,
Yasuhiro Yasutomi, Keiji Terao
TOOLS FOR GENETIC ANALYSIS OF
CYNOMOLGUS MACAQUES

2010. 9. 13

International Primatological Society

(第 23 回国際霊長類学会大会)

京都大学吉田キャンパス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東濃 篤徳 (Higashino Atsunori)

京都大学・霊長類研究所・特定研究員

研究者番号：30470199