

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08612

研究課題名(和文) 蛍光相関分光法による炎症関連転写因子活性定量プロファイル解析の臨床検査への展開

研究課題名(英文) Development and clinical application of quantity profile analysis to inflammatory allied transcription factor activity by fluorescence correlation spectroscopy

研究代表者

北島 勲 (Kitajima, Isao)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：50214797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子活性は、がんや炎症性疾患の病態に大きく関わっている。転写因子活性化定量解析に関して、ELISA法が研究レベルで利用されている。われわれは蛍光相関分光法(FCS)を基盤にした解析法を開発した。病態に関連する転写因子(NF- κ B、AP1、NF-IL-6、SP1、NF-AT、OCT1)と特異的に結合する蛍光DNAプローブを作製し、TNF- α 、LPS、PMA/Ionomycinで刺激したリンパ球において、NF- κ BとAP1活性の1.5倍増加を確認した。FCS法は、ELISA法と比較して迅速、簡便、容易でハイスループットな転写因子活性定量検査利用に期待できる。

研究成果の概要(英文)：As for the quantity transcription factor activated analysis, an ELISA method is used at a study level. We developed new experimental apparatus for the detection of inflammatory allied transcription factor activity based on fluorescence correlation spectroscopy (FCS), which is able to analyze binding between DNA and protein in the liquid phase. We made each fluorescence DNA probe which specifically bound to NF- κ B, AP1, NF-IL-6, SP1, NF-AT or OCT1. To assess the applicability of the FCS method, we quantitated each transcription factor activity in the human lymphocytes stimulated with TNF- α , LPS, or PMA/Ionomycin. In results, 1.5-fold increased NF- κ B and AP1 activity was measured two hours after stimulation with TNF- α or PMA/Ionomycin. The quantity transcription assay by the FCS method is quick, simple, easy and high-throughput analytical method, compared to the ELISA method.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：転写因子 NF- κ B 蛍光相関分光法 ELISA 活性定量

1. 研究開始当初の背景

申請者は、炎症関連転写因子である **NF-κB** 活性検査が炎症性疾患やがん等の病態解析に活用できると考え、病院検査室で実用化可能な測定法開発研究を行っている。転写因子活性化解析は、転写因子結合コンセンサス配列を有する DNA プローブをプレート上に固相化し各転写因子に特異的な抗体で検出する **ELISA** 法が研究室レベルで行われている。しかし、本方法は個々の転写因子に対する解析で網羅的解析ではないためプロファイル分析には適していない。また、米国 **Panomics** 社からは 54 種類のエレメントと結合させる転写因子発現検出 **Transignal TF DNA array** が開発されているが、ドットプロット法による定性測定で人体試料測定は認められていない。そこで、申請者は、ナノテクノロジーを用いた先端計測分析法である蛍光相関分光法(**Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS**)法の応用を考案した。

2. 研究の目的

FCS 法は溶液中の分子間相互作用を 1 分子レベルで解析でき、生体内で生じる液相反応でかつホモジニアスアッセイ (洗浄工程不要) のため迅速性が確保できる特徴があるが臨床検査領域への応用例が少ない。そこで、炎症反応に重要な転写因子 **NF-κB** 活性化を定量計測できる競合アッセイ法を確立してきた (**PLosOne8,e75579,2013**)。本研究では、**FCS** 法による転写因子活性定量法を **ELISA** 法と比較検証し、その有用性を明らかにする。本研究の目的は、**NF-κB** に加え、炎症や細胞活性、増殖に関連する転写因子と特異的に反応する蛍光標識 DNA プローブを開発し、細胞活性や炎症を網羅的に評価できる定量転写因子プロファイル検査を開発し、今後の臨床応用に向けた基盤を確立することである。

3. 研究の方法

1) 炎症関連転写因子特異的 DNA プローブの検索と作成: 転写因子結合配列はデータベース **TRANSFAC2008.3** と検索ソフトウェア **MATCH** (*Nucleic Acid Res.* 2003, 31, 3576-9) を用いて候補配列を選別する。各転写因子結合配列 (**NF-IL6 (C/EBP)**, **ATF/CREB**, **AP1**, **NFAT**) に対して **Stem loop** 型 DNA プローブを作成する。

2) 蛍光相関分光法 (**FCS** 法) を基盤にした検査室で実施できる臨床検査用転写因子活性化測定プロトコールを作成する。まず、採血条件 (血液量、**EDTA** 採血管かクエン酸加採血管)、検体前処理 (核蛋白抽出条件、検体安定の保存温度と保存条件検討) を決定する。血液サンプルから効率よくリンパ球核蛋白を抽出できる方法と核蛋白中の転写因子と DNA プローブとの結合条件を決定する。次に **FCS** 測定機器であるオリンパス社 **MF20** 機器と測定条件を設定する。**MF20** 機器を用いた **FCS** 法による転写因子活性化定量化データ解析は、**MF** 機器に搭載されている 1 成分計算式から、生体試料による定量測定精度向上のために 2 成分モデルへとデータの変換算出プログラムに改良したわれわれの開発法 (**Harada K, et al. PLOS One 2013Oct;8:e75579**) を利用する。

3) **FCS** 法と **ELISA** 法における crude (粗製) 核抽出液 (核蛋白) 中の転写因子活性定量性を比較検討する (添加回収試験)。リコンビナント **NF-κBp50** 1ng, 2ng, 3ng, 6ng に crude 核抽出液を 0, 5, 10μg を混入させ、**FCS** 法と **ELISA** 法で解析する。4) **T** リンパ球細胞株 **Jurkat cell** に対して **TNF-α** (50ng/mL), **LPS** (100 ng/mL), **PMA** (20 ng/mL)+**Ionomycin** (1μg/mL) で刺激 3 時間刺激し、核蛋白と RNA を抽出する。刺激前後の炎症関連転写因子活性量 (**NF-κB**, **AP-1**, **NF-AT**, **OCT**) を 2) で確立した **FCS** 法で解析する。

4. 研究成果

1) 炎症に関連する転写因子と特異的に結合する DNA プローブ構築

NF-κB, **NF-IL6 (C/EBP)**, **ATF (VREB)**, **SP1**, **AP1**, **NF-AT** に特異的に結合できるプローブを見出し作成した (図 1)。とくに **NF-κB** に対しては、結合コンセンサスシーケンスをタンデムに 2 個連結したプローブ (5' - ttgттаасааGGGACTTCcgctgGGGGACTTCcaggaggcgtgg) が結合特異性の高いことをゲルシフトアッセイで証明した。さらに二本鎖 DNA プローブは、stem-loop 構造にすることで安定性が高くなり、プローブ作成においてアニリング操作が省略でき迅速性に有用であった。

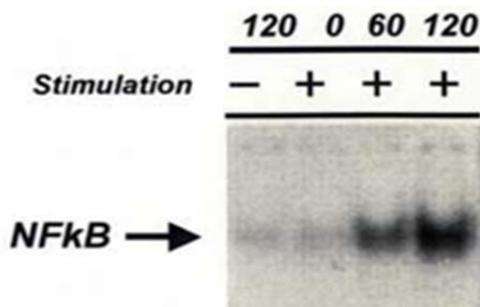


図 1. NF-κB プローブと核蛋白中の NF-κB 結合

Jurkat 細胞を IL-1 で刺激し 60 分、120 分後に核蛋白を抽出しゲルシフトアッセイで検出した。

2) 蛍光相関分光法 (FCS 法) を基盤にした転写因子活性定量測定法構築

患者血液からカラムを用いて迅速にリンパ球を分離し、高品質な核蛋白を抽出した。得られた核蛋白を 1) で確立した蛍光標識転写因子結合 DNA プローブと反応させた。次にオリンパス社 MF 20 測定機器を用い、384well マイクロプレート利用により高速かつハイスループット化に成功した。データ解析は、われわれが開発した 2 成分解析プログラムを用いて、各転写因子リコンビナント蛋白を基準にした検量線より定量化した。

3) 核蛋白中の転写因子活性化定量は、ELISA 法より FCS 法が適する。

リコンビナント NF-κBp50 1ng, 2ng, 3ng, 6ng に核抽出液 0, 5, 10 μg を混入させ、FCS 法と ELISA 法で解析した。ELISA 法ではリコンビナント NF-κBp50 と NF-κBDNA プローブとの結合が核抽出液で阻害されたが、FCS 法では結合阻害が生じないことを明らかにした (図 2)。以上より、種々の蛋白質が存在する核抽出液中の転写因子を特異的に検出するには ELISA 法より FCS 法が優れていると考えられた。

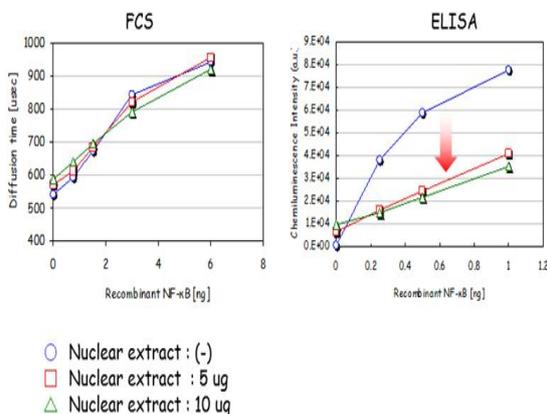


図 2 FCS 法と ELISA 法定量性 (添加回収試験)

4) 蛍光相関分光法 (FCS 法) による転写因子活性化定量

Jurkat cell に対して TNF-α (50ng/mL, LPS (100ng/mL), PMA (20ng/mL)+Ionomycin (1 μg/mL) で刺激 2 時間すると、TNF-α 刺激で NF-κB 活性が 1.27 倍増加、PMA+Ionomycin 刺激で NF-κB が 1.49 倍、AP-1 が 1.62 倍、NF-AT が 1.23 倍の増加を認めた。一方、対照である OCT-1 は NF-κB が 1.05 倍、AP-1 が 1.03 倍、PMA+Ionomycin が 1.05 倍で変動が認められなかった (図 3)。

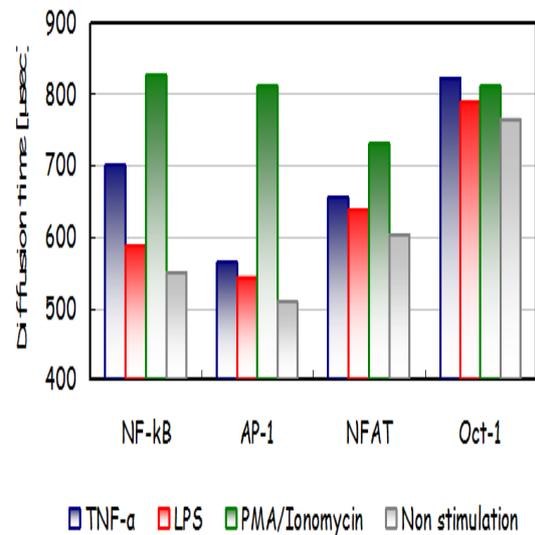


図 3 蛍光相関分光法 (FCS 法) による転写因子活性定量化

【考察】

炎症性疾患、がん、生活習慣病等は組織間、細胞間のネットワークの異常が病因となる。さらにこの異常は、細胞内シグナル伝達の異常から生じる。細胞内情報は転写因子に集約されるため、転写因子活性化を病態解析に活用する検査法開発に取り組んできた。本研究では、ELISA 法による転写因子活性解析と転写因子 DNA アレイ法を超えるハイスループット転写因子活性化プロファイル検査法を探索し、蛍光相関分光法 (FCS 法) を転写因子活性化検査法に改良し新たに構築した。患者血液中のリンパ球から核蛋白を抽出して、NF-κB、NF-IL6 (C/EBP)、ATF (CREB)、SP1、AP1、NF-AT の活性量を定量化するプロトコールを作成し、その定量性を検証した。その結果、従来の ELISA 法に比し crude な核抽出液中の転写因子測定には FCS 法が適していることを明らかにした。本研究により、FCS 法の臨床応用に向けた基盤を確立することができた。FCS 法は、

ELISA 法と比較して迅速、簡便、容易でハイスループットな解析法である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- 1) Higashi Y, Nakamura S, Niimi H, Ueno T, Matsumoto K, Kawago K, Sakamaki I, Kitajima I, Yamamoto Y: Spondylodiscitis due to Parvimonas micra diagnosed by the melting temperature mapping method. BMC infectious diseases. 2017, 17(1): 584. doi:10.1186/s12879-017-2690-4.
- 2) Kawaguchi Y, Nakano M, Yasuda T, Seki S, Kayo Suzuki K, Yahara Y, Makino H, Kitajima I, Kimura T.: Serum biomarkers in patients with ossification of the posterior longitudinal ligament (OPLL):- inflammation in OPLL. PLOS ONE. 2017, 12(5):e0174881. doi:10.1371/journal.pone.0174881
- 3) Mochida S, Hida Y, Tanifuji S, Hagiwara A, Hamada S, Abe M, Huan M, Kitajima I, Sakimura K, Ohtsuka T:SAD-B Phosphorylation of CAST Controls Active Zone Vesicle Recycling for Synaptic Depression. Cell Report 2016:16:1-13 doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08020
- 4) Niimi H, Ueno T, Hayashi S, Abe A, Tsurue T, Mori M, Tabata H, Minami H, Goto M, Akiyama M, Yamamoto Y, Saito S, Kitajima I: Melting temperature mapping method: A novel method for identification of unknown pathogenic microorganisms within three hours of sample of collection. Scientific Reports. 2015
- 5) Harada K, Mikuni S, Beppu H, Niimi H, Abe S, Hano N, Yamagata K, Kinjo M, Kitajima I: A rapid and high-throughput quantitation assay of the nuclear factor- κ B activity using fluorescence correlation spectroscopy in the setting of clinical laboratories. PLOS One 2013Oct:8:e75579

[学会等発表] (計 3 件)

- 1) Niimi H, Kitajima I: Tm Mapping. A novel testing method for rapid bacterial identification without

- blood culture. Singapore international infectious disease conference. 2017,8,25, Singapore
- 2) Ueno T, Niimi H, Yoneda N, Yoneda S, Mori M, Saito S, Kitajima I: Eukaryote-Made Taq Polymerase Enables Reliable Detection of Pathogens in Amniotic Fluid of Preterm Labor Cases-Development of a Novel Nested-PCR-Based Assay for Detecting Mycoplasma, Ureaplasma, other Bacteria and Fungi in Amniotic Fluid Samples. The 32nd World Congress of Biomedical laboratory Science, 2016, 9, 1, Kobe,
 - 3) 北島 勲: 蛍光相関分光法による転写因子 NF- κ B ハイスループット定量法開発とその臨床応用。鹿児島大学血管代謝病態セミナー。2015、10、13、鹿児島

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: Immune system malfunction disease diagnosis supporting method and diagnosis support information output device

発明者: KITAJIMA, Isao, YAMANE Hiroshi, YOSHIDA Tomokazu, HASUI Yasushi TAKEDA Kazuhiko

権利者: 富山大学、シスメックス株式会社
国際公開番号 WO2006/062127 A1, 国

際出願番号: PTC/JP2005/022453

国際出願日: 2005,12,7

国際公開日: 2006,6,15

国内外の別: 国外 (米国)

○取得状況 (計 0 件)

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・教授

研究者番号: 50214797

(2) 研究分担者

仁井見英樹 (NIIMI Hideki)

富山大学・医学薬学研究部・准教授

研究者番号: 50401865