

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19202

研究課題名(和文) 生理活性ペプチドサルューシン の超高感度測定法の開発とその病態生理学的役割の解析

研究課題名(英文) Establishment of a sandwich ELISA for salusin-beta

研究代表者

藤本 和実 (Fujimoto, Kazumi)

北里大学・理学部・特任助教

研究者番号：50769297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：サルューシン は2003年にin silicoペプチド探索法にて発見された初めての生理活性ペプチドである。本因子の発見は世界的に注目されたが、本因子特有の実験器具への吸着性のため、取り扱いが難しく血中濃度測定系を構築できず、ヒト体内での循環ペプチドとしての意義を検討できない時期が続いた。独自の抗体作製技術を用いてサンドイッチELISA系の構築を試みた結果、全長サルューシン のみ検出可能な測定系の確立に成功した。サルューシン には日内変動があり、副交感刺激試験実施前後の検討では非常に迅速な変動がみられた。また糖尿病、中枢性尿崩症患者血中濃度は健常者と比較し、有意に低値を示した。

研究成果の概要(英文)：Salusin- was initially predicted from bioinformatic analyses in 2003. Salusin- acutely regulates hemodynamics and chronically induces atherosclerosis, but its unique physicochemical characteristics to tightly adhere to all types of plastic and glassware have prevented elucidation of its precise pathophysiological role. In this study, we successfully established a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to quantitate plasma free full-length salusin- concentrations. Free salusin- levels showed circadian variation and its levels in patients with diabetes mellitus and panhypopituitarism combined with complete central diabetes insipidus showed significantly lower than healthy controls.

研究分野：病態検査学

キーワード：ELISA 生理活性ペプチド

1. 研究開始当初の背景

サリュージンは In silico ペプチド探索法(遺伝子構造解析ツールを用いて cDNA ライブラリーの塩基配列を検索し、明らかなシグナル配列を有して分泌性タンパクをコードすると考えられる cDNA を選択するという方法)により 2003 年に初めて発見された多機能性生理活性ペプチドである。サリュージンにはサリュージン と があり、それぞれ 28 アミノ酸、20 アミノ酸から成る。本ペプチドは従来の血管拡張性因子と異なり、一過性で強力な降圧・徐脈惹起作用を有しており、サリュージン の方が強力であることが知られている(Shichiri M, Nature Med, 2003)。サリュージン はマクロファージや局所の内分泌系細胞からも産生されるが、視床下部にも発見して下垂体後葉から分泌され、バソプレシン分泌促進作用を示す。さらに内因性副交感神経刺激因子としての役割を示すほか(Izumiyama H, Hypertension, 2005)、マクロファージ泡沫化などの作用を有して強力な動脈硬化促進作用を示す(Watanabe T, Circulation, 2008)。ところが、サリュージン の生理活性が報告によって一定せず、その原因も不明であったため一時的に研究の進展が停滞した。2009 年にサリュージン がガラス、ポリプロピレン、ポリスチレンといった一般的に研究室で使用する実験器具へ強力に吸着するという独特の性質が明らかとなり(Shichiri M, Nature Med, 2007)、極微量の界面活性剤を実験器具や緩衝液に添加することにより吸着を回避することが可能となり、ようやくラジオイムノアッセイ(RIA)系を確立した(Sato K, Regul Pep, 2009)。しかしながら血液中、培養細胞上清中のサリュージン を検出するためには抽出、濃縮操作が必須であるが、その操作の過程でサリュージン を損失している可能性が示唆された。サリュージン 特有の性質を考慮すると全長 20 アミノ酸で存在している遊離体と他の血漿タンパク質(キャリアタンパク)に吸着して存在していることが予測できる。血漿を抽出・精製しても RIA では血中サリュージン 濃度を明らかにすることができず、特にサリュージン 遊離体のヒト血中濃度測定系はいまだ確立されておらず、その動態は不明である。申請者は過去に単球系細胞を用いてサリュージン の分泌動態について検討した。単球およびマクロファージからの細胞外分泌量を RIA で測定したが、本測定法は熟練した技術が必要とされ測定には長時間かかるため、目指していた“簡便で正確な測定法”にするためにはまだ多くの課題が残されていた。その後、新規抗体の作製をきっかけにヒト血中濃度測定を目的とした新規サンドイッチ酵素免疫測定系(ELISA)を確立し、血中各種蛋白に結合した総サリュージン 濃度を血漿抽出物から測定することに成功した。こうして明らかにしたヒト血漿抽出物中総サリュ

ージン 濃度は各種動脈硬化性疾患では高値を示し、副交感神経機能とは負の相関を示し、さらに副交感神経刺激時には内因性サリュージン が低下して生体の恒常性維持に働いている可能性も示した(Ogawa A, Peptides, 2015)。血漿の抽出・濃縮過程のため多くの血漿量と時間を費やさなければならないが、新規疾患バイオマーカーあるいは治療標的としての意義の解明が期待されながらもその取扱いの難しさのため、国際的にも研究の進展を大きく遅らせ、大手臨床検査メーカーがアッセイ系の確立を試みるも成功せず、生理活性を有する遊離体は未だ測定できない。

2. 研究の目的

ヒト生理活性ペプチドのサリュージン は種々の重要な機能が明らかとなり、疾患バイオマーカーとしての役割が強く示唆されている。新手法の「In silico 探索法」によって初めて発見された本ペプチドは従来の生理活性ペプチドにはないきわめて特異な物理化学的性状(吸着性)を示すため、血中濃度測定系の確立は困難を極めている。今回、これまで検討されてきた血中総サリュージン ではなく、血中に全長 20 アミノ酸の状態で存在している遊離体を検出可能とする測定系を開発しその濃度の測定を可能とし、心血管疾患・内分泌代謝疾患におけるバイオマーカーとしての有用性を示すための基礎的検討を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

申請者は本研究申請当時の所属研究室(現共同研究先)独自のペプチド抗体作製技術(公開特許 WO2010/071237)により作製した抗体を作成・精製し、免疫複合体転移法(Immune Complex Transfer - Enzyme Immuno Assay, ICT-EIA)(Hashida S, J Biochem, 1990)の原理に基づく高感度測定系の構築を考えた。本法では血漿の抽出操作も必要ないため、大幅な時間短縮を実現でき、将来の臨床検査への応用にも期待できる。EIA の場合、検出抗体の固相への非特異的吸着が感度向上の妨げとなる要因の一つであるが、ICT-EIA 法は固相を 2 種類使用し、検出抗体が非特異的に吸着した固相から免疫複合体を切り離し、新たな固相に移動させるため、より高感度に目的抗原を検出することができる。

(1) サリュージン 遊離体測定法の確立：共同研究先にて作製した抗サリュージン 抗体である鶏卵由来 IgY 抗体(N 端認識)・家兔由来 IgG 抗体(C 端認識)を用いる。IgY 抗体を固相抗体に、家兔由来 IgG を酵素標識抗体(検出抗体)として用いる。検出酵素には -D-galactosidase (GAL) を用いる。以下 3 点の基礎的検討を行い、測定系の確立を試みた。固相抗体、検出抗体の最適濃度の決定 吸着防止剤(界面活性剤)の最適濃度の決定 標準曲線と正常ヒト血漿希釈曲線との平行性の確認。ICT-EIA 法の構築と同時にサンドイッチ ELISA 系の確立についても検討した。(2) 健常者血漿中遊離サリュ

シン 濃度の測定：構築した測定系を用いて健常者血漿中遊離サリュースン 濃度を測定する。生理的変動があり、検体採取条件が細かく指定されていることで知られているホルモンが臨床検査マーカーとして利用されているものもあるため、サリュースン にも生理的変動があるかについて検討した。また生理的変動（体位変動、日内変動、飲水前後、排尿前後）時の遊離サリュースン の変化を検討する。（3）健常者における副交感神経刺激前後の血漿中遊離サリュースン 濃度の測定：非侵襲的かつ最も安全で簡便な副交感神経刺激試験であるバルサルバ呼吸法前後の血中遊離サリュースン の変動を調べた。

4. 研究成果

ICT - EIA 法では固相にポリスチレンビーズを用いるがサリュースン の吸着を回避するために添加した界面活性剤が抗原抗体反応を阻害してしまう。界面活性剤を低濃度にしすぎるとサリュースン の吸着が起こり正確な検出を妨げることが明らかとなった。また検出抗体に修飾する酵素の第一候補であった GAL は、非特異的吸着が少なく、酵素活性の持続性がメリットであった。しかし、GAL の分子量は 54 万と IgG の分子量 15 万よりも 3 倍以上大きく、抗原認識部位への立体障害が起こる可能性も高く、サリュースン 特有の吸着性のみならず、様々な障害が発生し、ICT - EIA 法の構築は難渋した。同時に進めていたサンドイッチ ELISA 系の開発に成功したため、本法で検討を進めた。固相抗体には鶏卵由来 N 末端特異的 IgY 抗体を、検出抗体には家兔由来 C 末端特異的 IgG 抗体

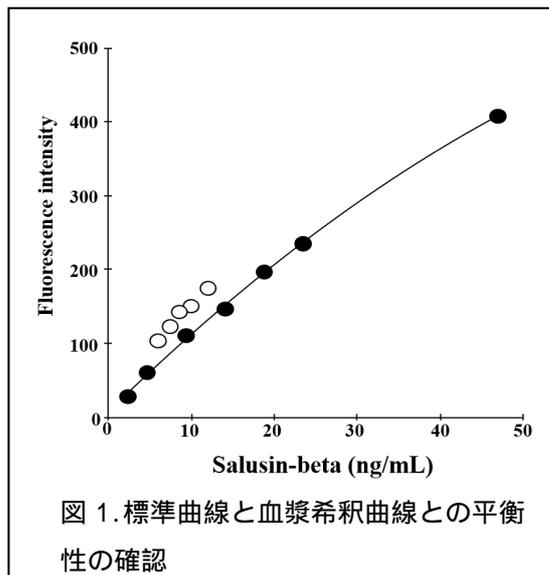


図 1. 標準曲線と血漿希釈曲線との平衡性の確認

に一般的な検出酵素として知られているペルオキシダーゼ（POD）を標識したものを用いた。POD は GAL よりも非特異的反応は増加するが、今回はフラグメント化することなく IgG の状態で POD 標識を行い、検出することが可能であった。また、測定の際にはサリュースン を含まない血漿（サリュースン 除去血漿）を独自に

作製し、これを標品あるいは必要に応じて血漿検体と混合し、常に血漿成分が検体中に 20% 含まれる状態にすることで非特異的反応を抑制し、かつサリュースン 遊離体の検出が可能となり、標準曲線と健常者血漿希釈曲線が平行となったことを確認できた（図 1）。さらに連携研究者である小寺氏らが開発した血漿抽出法ならびに質量分析技術によりサリュースン 断片が 7 種類同定された。今回構築した測定系においてこれらが影響を及ぼしているか各断片を合成して検討したところ、本測定系では 20 アミノ酸の全長サリュースン のみを検出できていることを確認した（表 1）。

Peptide	Sequence	Cross reactivity (%)
Salusin-β	AIFIFIRWLLKLGHHGRAPP	—
Salusin-β(1-7)	AIFIFIR	0.02
Salusin-β(1-11)	AIFIFIRWLLK	0.02
Salusin-β(4-10)	IFIRWLL	0.01
Salusin-β(4-11)	IFIRWLLK	0.03
Salusin-β(8-20)	WLLKLGHHGRAPP	0.02
Salusin-β(9-20)	LLKLGHHGRAPP	0.03
Salusin-β(10-20)	LKLGHHGRAPP	0.03

表 1. サリュースン 断片の交差性の確認

本測定系を用いて健常者血漿中サリュースン 濃度を測定した。平均血中濃度は約 70 ng/mL であった。性差、年齢差はみられなかった。生理的変動については体位変動（座位 15 分、臥位 30 分、立位 60 分）、飲水前後、バソプレシン分泌検査である高張食塩水負荷試験前後での変動はみられなかったが、サリュースン 遊離体には日内変動があることが明らかとなり、副交感神経機能指標が最も優位な時にサリュースン が低値を示した（図 2）。

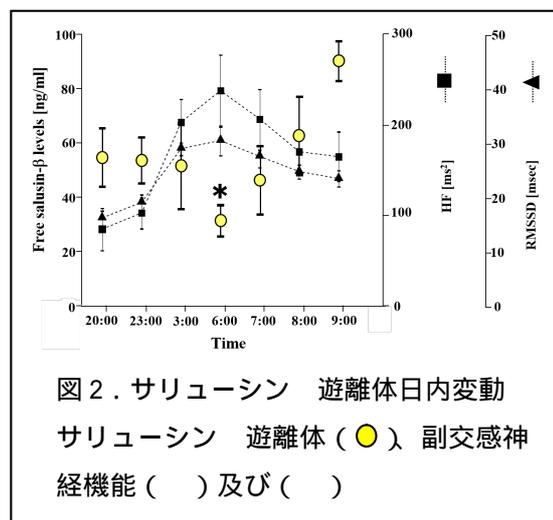


図 2. サリュースン 遊離体日内変動
サリュースン 遊離体 (●)、副交感神経機能 (■) 及び (▲)

また、最も簡便で安全な副交感神経刺激試験であるバルサルバ呼吸法を実施し、血中濃度を検討したところ 30 秒後に低値を示し、1 分間後に試験前値に戻るといった非常に迅速な変動がみられた。今回 1 型糖尿病、2 型糖尿

病、下垂体機能低下症例群における血中濃度を測定したところ、健常者と比較して有意に低値を示す結果が得られた(図3)。

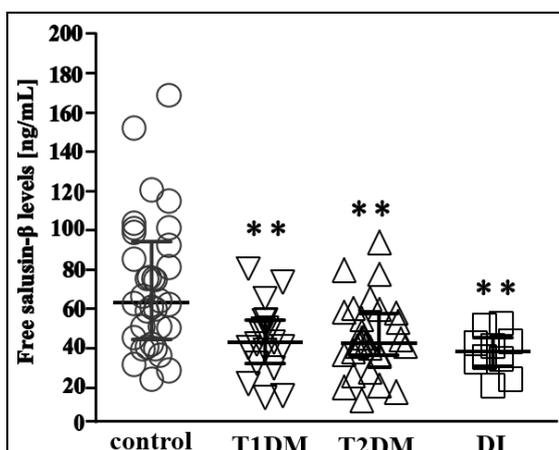


図3. 各疾患群におけるサリュージン血中濃度

左から健常者、1型糖尿病、2型糖尿病、下垂体機能低下症

このように生理的変動があり、疾患によって低値を示すことが明らかとなり、全長サリュージンが生体内を循環するペプチドホルモンとして何らかの役割を担っている可能性が示された。ペプチド発見後約10年の時を経てようやく測定系が確立され、血中濃度を測定することが可能となったからこの成果である。健常者も含め、今回検討した症例だけではまだまだ不明な点も多く、症例数も増やしながら今後も引き続き検討を続けていく。また詳細な検討を進めていくためには本測定系の感度向上、サンドイッチELISA法だけでなくICT-EIA法に基づいた測定系の構築に関する検討も引き続き行っている。研究期間中ポリスチレンビーズを用いて検討していたが、抗原抗体反応を阻害せずにサリュージンの吸着性を回避する界面活性剤の濃度や種類の調整に難渋し、期間内に系を立ち上げることができなかった。ポリスチレンビーズではなく磁気ビーズを用いる方法について計画している。サリュージンは当初その存在を予測されて発見された生理活性ペプチドであるが、実際に血液中から同定され、本研究においては体内を循環しているペプチドホルモンとしての可能性を示すことができた。これまで行われてきた大量の組織抽出物からペプチドを探索する方法ではサリュージンのように特殊な性質をもつペプチドは発見されにくかったと考えられる。急速に発展し続けている質量分析技術とサリュージン発見の際に考案されたin silico解析との組み合わせにより今後もさらなる新規生理活性ペプチド、疾患バイオマーカーとなりうる因子を発見できる可能性を秘めている。今後もこれらの技術を駆使し、

日本が世界をリードしてきたペプチド研究に貢献していきたい。

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)

Kazumi Fujimoto, Akinori Hayashi, Yoshio Koderu, Masayoshi Shichiri et al.,

「Identification and quantification of plasma free salusin-, an endogenous parasympathomimetic peptide」

Scientific Report、査読有、volume7、No.1、2017、article number 8275

DOI:10.1038/s41598-017-08288-0

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 和実 (FUJIMOTO, Kazumi)

北里大学・理学部・特任助教

研究者番号: 50769297

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

七里 眞義 (SHICHIRI, Masayoshi)

北里大学・医学部・教授

研究者番号: 10206097

小寺 義男 (KODERA, Yoshio)

北里大学・理学部・教授

研究者番号: 60265733

林 哲範 (HAYASHI, Akinori)

北里大学・医学部・助教

研究者番号: 30458830

(4) 研究協力者

鎌田 裕二 (KAMATA, Yuji)

小川 顕史 (OGAWA, Akifumi)

加藤 由起子 (KATO, Yukiko)

川島 祐介 (KAWASHIMA, Yusuke)

斉藤 達也 (SAITO, Tatsuya)