

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25年 5月30日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21590669

研究課題名（和文） ヒト血漿中グランザイム3は炎症反応のマーカーとなるか

研究課題名（英文） Can human plasma granzyme 3 be used as a biological marker for inflammation?

研究代表者

稲垣 弘文（INAGAKI HIROFUMI）

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：50213111

研究成果の概要（和文）：大腸菌に産生させたヒトグランザイム3を用いてモノクローナル抗体を作成し、それらを用いて新しい測定法（サンドウィッチ ELISA 法）を確立した。一方、ヒトのリンパ球が試験管内において産生するグランザイム3が、不活性型前駆体であることが明らかとなったため、前駆体に特異的なモノクローナル抗体を新たに作成し、活性型と前駆体を分別定量することを可能にした。健康人血漿中のグランザイム3の濃度は非常に低く、ELISA 法の検出限界以下であった。

研究成果の概要（英文）：A new sandwich ELISA for human granzyme 3 was established using monoclonal antibodies raised against recombinant human granzyme 3 produced in *E. coli*. On the other hand, human peripheral blood lymphocytes were shown to secrete enzymatically inactive precursor of granzyme 3 (progranzyme 3) to the culture medium *in vitro*. Therefore, new monoclonal antibodies against progranzyme 3 were prepared. Using these antibodies, we could measure active granzyme 3 and inactive progranzyme 3 separately. Granzyme 3 concentrations in human plasma samples from healthy donors were very low and less than the detection limit of the ELISA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学、衛生学

キーワード：グランザイム3、モノクローナル抗体、酵素免疫測定法、細胞障害性 T 細胞、バイオマーカー、炎症

1. 研究開始当初の背景

免疫系が関与する病態の代表的なものは感染症や自己免疫疾患であるが、それ以外にも炎症反応を伴うものすべてに関与している。すなわち、喫煙による微小な呼吸器炎や動脈硬化など生活習慣病とその前兆と言えるよ

うなものにも免疫系、特に細胞性免疫機能が関与していると考えられる。炎症反応に対するバイオマーカーとしては CRP を代表とする Acute Phase Reactants があるが、メディエーターを介して主として肝臓で産生される間接的なマーカーであり、炎症部位において

直接産生されるものの方が望ましいと考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、細胞障害性 T 細胞に特徴的に存在する Granzyme 3 という酵素蛋白について、細胞性免疫が関与する病態である炎症反応の指標としての応用可能性を検討することを目的とする。すなわち、我々が開発した Granzyme 3 に対する Sandwich ELISA 法を用いて、主として健康人ヒト血漿中の Granzyme 3 濃度を測定し、正常範囲の決定を行うとともに、その変動と炎症性疾患の有無の可能性を検討する。すなわち、脂質、糖質などの生化学検査や、炎症マーカーのひとつである C-反応性蛋白 (CRP) と比較することによって、有用性の検討を行う。

3. 研究の方法

(1) ヒト Granzyme 3 に対する高感度 Sandwich ELISA の確立

抗ヒト Granzyme 3 モノクローナル抗体は、大腸菌に発現させたヒト Granzyme 3 (Y. Hirata *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 446 35-43 (2006)) を抗原として用い、常法に従って作製した。得られた 22 種類のモノクローナル抗体のうち、G3H61 と G3H64 の 2 種類を用いて Sandwich ELISA を行った。まず、pH9.5 の条件下で G3H61 抗体を 96 穴 MaxiSorp プレート (NUNC 社製) にコートし、ブロックの後、Granzyme 3 を反応させた。さらに、ビオチン標識 G3H64 抗体を反応させた後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを反応させた。洗浄後、発色試薬 TMBZ を用いて検出した。

(2) ヒト末梢血リンパ球による Granzyme 3 の産生

健康人ボランティア 6 名 (男性 2 名、女性 4 名) より採血して単核球分画を得、10% FCS を含む RPMI1640 培地を用いて 2×10^6 cells/mL の濃度に調整後、312.5 IU/mL の IL-2 を添加して 37°C で 7 日間培養した。1 日後、3 日後、5 日後および 7 日後に培養上清を回収した。得られた培養上清について、上記 Sandwich ELISA により、Granzyme 3 の測定を行った。

(3) ヒト Progranzyme 3 に対するモノクローナル抗体の作製と Sandwich ELISA の確立

抗ヒト Progranzyme 3 モノクローナル抗体は、大腸菌に発現させたヒト Progranzyme 3 (Y. Hirata *et al.*, *Arch. Microbiol. Immunol.* 54 98-104 (2010)) を抗原として用い、常法に従って作製した。得られた 12 種類のモノクローナル抗体のうち、Progranzyme 3 に対する反応性に基づいて G3HP08 を選択し、G3H61 との組み合わせで Sandwich ELISA を行った。まず、pH9.5 の条件下で G3H61 抗体を 96 穴 MaxiSorp プレート (NUNC 社製) にコートし、ブロックの後、Granzyme 3 を反応させ

た。さらに、ビオチン標識 G3HP08 抗体を反応させた後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを反応させた。洗浄後、発色試薬 TMBZ を用いて検出した。

(4) Sandwich ELISA による健康ヒト血漿中の Granzyme 3 の検出

確立された Progranzyme 3 測定用 G3H61-G3HP08 Sandwich ELISA を用い、健康人血漿中 Progranzyme 3 の濃度の測定を試みた。単純にリン酸緩衝液などで希釈しただけでは、擬陽性反応が強く出現するケースもあった。そこで、希釈液に、1M NaCl、マウスモノクローナル抗体、ラット血清、EDTA、EMPIGEN BB (界面活性剤)などを添加し、擬陽性反応を抑制することにより、血漿に添加した標準物質 (Progranzyme 3) の回収率を求めた。

4. 研究成果

(1) ヒト Granzyme 3 に対する高感度 Sandwich ELISA の確立 (Fig. 1)

最も反応性の高かった G3H61 とビオチン標識 G3H64 の組み合わせで Sandwich ELISA を確立した。

この系を用いて、活性型 Granzyme 3 (Gr3(per))、不活性型 Progranzyme 3 (Gr3(pro))、変性型の Granzyme 3 (Gr3(IB)) 及び活性型 Granzyme A (GrA(per)) に対する反応性を比較したところ、酵素活性をもつ Gr3(per) は高感度に検出することができた (検出限界約 5 pg/ml) (Fig. 1)。また、変性型である Gr3(IB) に対してだけでなく、不活性型である Gr3(pro) に対しても反応性が低かった。また、Granzyme 3 と 1 次構造が類似している GrA(per) に対しては全く反応しなかった。すなわち、用いたモノクローナル抗体が活性型の Granzyme 3 の 3 次構造を認識することが示された。

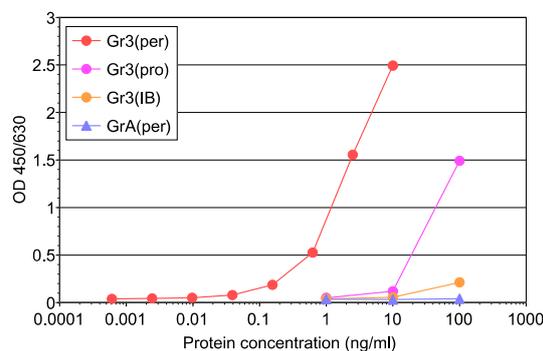


Fig. 1. G3H61-G3H64 Sandwich ELISA.

(2) ヒト末梢血リンパ球による Granzyme 3 の産生

ヒト末梢血単核球に IL-2 を加えて培養したところ、培養上清中に G3H61-G3H64 を用いた sandwich ELISA で検出される Granzyme 3 が

存在し、明らかに日を追ってその濃度は上昇した (Fig. 2)。しかし、その濃度には、大きな個人差が認められた。一方、IL-2 を添加しない場合には培養上清中の濃度は非常に低く、IL-2 の刺激によって Granzyme 3 が産生、分泌されたと考えられた。

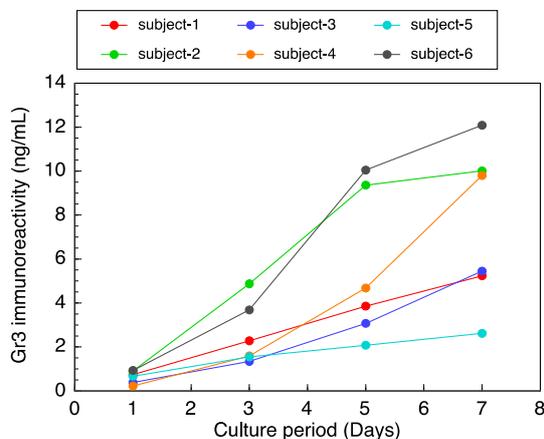


Fig. 2. Production of Granzyme 3 by LAK cells.

次に、培養上清中の Gr3 分子の状態を G3H04 抗体を用いた western blotting によって解析したところ、分子量が活性型 Gr3 よりやや大きく、標準品との比較によって、N 末端側の pro-peptide が切断されていない不活性型の前駆体 (Progranzyme 3) であると考えられた (Fig. 3)

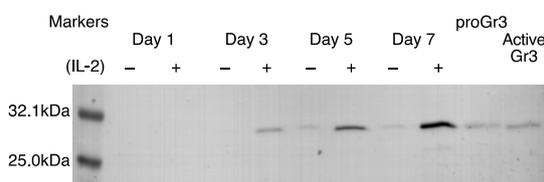


Fig. 3. Molecular size of granzyme 3 produced by LAK cells.

以上の結果より、活性化ヒト末梢血リンパ球は、Progranzyme 3 を産生することが明らかとなり、末梢血血漿中に存在する Granzyme 3 も Progranzyme 3 である可能性が高いと考えられた。しかし、Fig. 1 に示したように、G3H61-G3H64 Sandwich ELISA は、Progranzyme 3 に対する反応性が低いことが明らかとなっており、Progranzyme 3 に対する新しい測定系を確立する必要があると考えられた。

(3)ヒト Progranzyme 3 に対するモノクローナル抗体の作製と Sandwich ELISA の確立
G3H61 と G3HP08 の組み合わせにおいては、Progranzyme 3 (Gr3(pro))には良好に反応するが、Granzyme A (GrA(per))はもちろん、変性型の Granzyme 3 (Gr3(IB))や活性型

Granzyme 3 (Gr3(per))に対する反応性が低く、前駆体型 Gr3 のみを測定する事が可能であると考えられた (Fig. 4)。

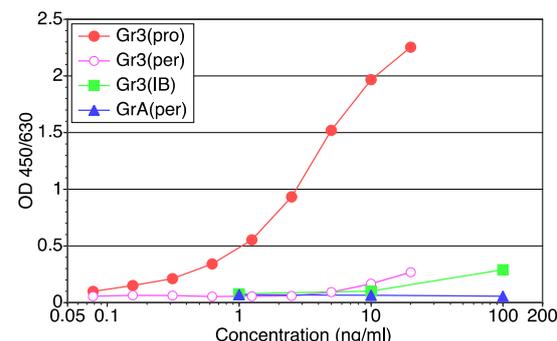


Fig. 4. G3H61-G3HP08 Sandwich ELISA.

(4) Sandwich ELISA による健康ヒト血漿中の Granzyme 3 の検出

G3H61-G3HP08 Sandwich ELISA を用い、健康人血漿中 Progranzyme 3 の濃度の測定を試みた。その結果、EMPIGEN BB (界面活性剤)、EDTA、ラット血漿および特異性の異なるマウスモノクローナル抗体を加えることにより、添加回収試験において良好な結果を示す手順を確立した。

次に、同意の得られた数名の血漿を採取し、Progranzyme3 濃度を求めた。しかし、健康人においては、その濃度は検出限界付近の低濃度であった。

少なくとも現状の測定系においては、健康人血漿中の Progranzyme 3 の濃度を測定することは出来ない。今後は、炎症性疾患の患者血漿を用いて解析を行う一方、個人の炎症性疾患のリスク評価という点では、末梢血リンパ球による Progranzyme 3 産生量を指標とすることも検討する必要があると考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 11 件)

- ① 稲垣弘文、平田幸代、清水孝子、川田智之、抗ヒト Granzyme 3 モノクローナル抗体による酵素活性の上昇、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 16 日、福岡 (マリンメッセ福岡)
- ② 平田幸代、稲垣弘文、清水孝子、川田智之、FRET 基質を用いたヒト Granzyme 3 の反応速度論的解析、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 16 日、福岡 (マリンメッセ福岡)
- ③ 稲垣弘文、平田幸代、清水孝子、川田智之、抗ヒト Granzyme 3 モノクローナル抗体の酵素活性への影響、日本薬学会第 132 年

- 会、2012年3月29日、札幌（北海道大学）
- ④ 平田幸代、稲垣弘文、清水孝子、川田智之、FRET基質ライブラリを用いたヒトGranzyme 3とGranzyme Aの活性比較、日本薬学会第132年会、2012年3月29日、札幌（北海道大学）
 - ⑤ 稲垣弘文、平田幸代、清水孝子、川田智之、ヒト前駆体型Granzyme 3に特異的なsandwich ELISAの確立、第84回日本生化学会大会、2011年9月23日、京都（京都国際会館）
 - ⑥ 平田幸代、稲垣弘文、清水孝子、川田智之、ヒトGranzyme 3の基質アミノ酸配列の検索、第84回日本生化学会大会、2011年9月23日、京都（京都国際会館）
 - ⑦ 平田幸代、稲垣弘文、清水孝子、川田智之、ヒトGranzyme 3の基質アミノ酸配列の検索、日本薬学会第131年会、2011年3月30日、静岡（ツインメッセ静岡）
 - ⑧ Inagaki, H., Hirata, Y., Shimizu, T., Kobayashi, M., Li, Q., Kawada, T., Expression of granzyme 3 protein in human peripheral blood lymphocytes analyzed by flow cytometry., 14th International Congress of Immunology, Aug. 23, 2010, Kobe (Kobe International Exhibition Hall)
 - ⑨ Hirata, Y., Inagaki, H., Shimizu, T., Kobayashi, M., Kawada, T., Establishment of a new sandwich ELISA system for human granzyme 3., 14th International Congress of Immunology, Aug. 23, 2010, Kobe (Kobe International Exhibition Hall)
 - ⑩ 稲垣弘文、平田幸代、清水孝子、小林麻衣子、川田智之、Lymphokine-activated killer (LAK) 細胞によるGranzyme 3の産生、日本薬学会第130年会、2010年3月30日、岡山（桃太郎アリーナ）
 - ⑪ 平田幸代、稲垣弘文、清水孝子、川田智之、活性型ヒトGranzyme 3に特異的なsandwich ELISAの確立、日本薬学会第130年会、2010年3月30日、岡山（桃太郎アリーナ）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲垣 弘文 (INAGAKI HIROFUMI)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号：50213111

(2) 研究分担者

平田 幸代 (HIRATA YUKIYO)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：40322515
川田 智之 (KAWADA TOMOYUKI)
日本医科大学・医学(系)研究科(研究院)・

教授

研究者番号：00224791

大塚 俊昭 (OTSUKA TOSHIAKI)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80339374