

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 19 日現在

機関番号：32519
 研究種目：若手研究 B
 研究期間：2011 年度 ～2012 年度
 課題番号：23790195
 研究課題名（和文）
 ステロイド薬投与量決定マーカー候補リポカリン 2 の細胞内外ステロイド濃度調節機能
 研究課題名（英文）
 Regulation of intra- or extracellular glucocorticoid concentration by Lipocalin2 as a candidate marker for steroid dosage.
 研究代表者
 小澤 実香 （ OZAWA MIKA ）
 城西国際大学・薬学部・助手
 研究者番号：40398558

研究成果の概要（和文）：

本研究では、1) リポカリン 2 はステロイド化合物との結合能を有すること、2) リポカリン 2 の生理的役割は、細胞内または細胞外の遊離ステロイド濃度を調節し、ステロイドの生理的作用および薬効発現に寄与しているとの仮説を検証することを目的とした。2) に関して、結合能を評価するために、Biacore を用いてステロイド-リポカリン 2 相互作用評価系を構築した。その結果、リポカリン 2 はデキサメタゾンに対して用量依存的に結合したが、プレドニゾロンに対しする結合は認められなかった。このことから、リポカリン 2 は特定のステロイド化合物と結合する可能性が考えられた。2) については、今後の課題として検討を進めていきたい。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is to examine the hypothesis that lipocalin-2 binds to glucocorticoids, and regulates the concentration of intra- or extracellular free glucocorticoids. To examine the hypothesis, we established an assay for interaction between lipocalin-2 and glucocorticoids using surface plasmon resonance system. Our surface plasmon resonance analysis showed that lipocalin-2 interacts with dexamethasone dose-dependently, while the interaction of lipocalin-2 with prednisolone was not detected.. These results suggested that lipocalin-2 has a possibility of binding to specific glucocorticoids. We will examine the physiological role of lipocalin-2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療薬学

キーワード：プロテオミクス、バイオマーカー、ステロイド、タンパク質、相互作用

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

ステロイド性抗炎症薬は、種々の疾患に対し抗炎症剤として、あるいは免疫抑制剤として、現在広く用いられている。一方で、様々な副作用が起こり易いにも関わらず、個別化治療のための投与量・漸減療法・離脱タイミングに関する明確な指標（バイオマーカー）が存在しない。従って、今後国民より求められる個別化医療における医薬品適正使用の観点から、より客観的・絶対的な至適投与量の決定方法が必要と考えられ、定量性のあるバイオマーカーの探索が急務と考えられる。

研究代表者は、種々のステロイド薬処理によるヒト表皮角化細胞 (HaCaT) 内タンパク質のプロテオーム解析により、ステロイド処理により発現量の増加が認められたタンパク質の一つとしてリポカリン 2 を同定した。NCBI が公開するゲノムデータベース情報を利用し、ヒトリポカリン 2 遺伝子の 5' 上流にステロイド反応性エレメントの存在を確認した。これにより、リポカリン 2 タンパク質のステロイド化合物による誘導能が支持された。

リポカリン 2 の作用機序や生理的意義に関しては、細胞外マトリックス分解抑制作用や、細胞増殖あるいは増殖抑制への関与が示唆されているが、未だ不明な点が多く残されている。

研究代表者は、蛋白構造が β バレル構造を有していることや、リポカリンファミリーは脂溶性化合物との結合能を示すことから、リポカリン 2 はステロイド化合物との結合能を有すること、そしてリポカリン 2 の生理的役割は、細胞内または細胞外の遊離ステロイド濃度を調節し、ステロイドの生理的作用および薬効発現に寄与しているとの仮説を立てた。

2. 研究の目的

リポカリン 2 -ステロイド薬の結合を解析するための評価系を構築し、ステロイド薬に対する親和性や選択性を調べ濃度調節機能の可能性を検討することにより、ステロイド処理によって発現が増加するリポカリン 2 の生理的意義の解明を目的とした。

3. 研究の方法

1) ヒトリポカリン 2 に対するステロイド化合物の結合性を評価するための評価系の構築
Biacore 2000 を用いて、リガンドとしてコハク酸プレドニゾロンおよびコハク酸デキサメタゾンをセンサーチップへ固定化した。リポカリン 2 に加えコントロール候補としてステロイドとの結合が報告されているコルチコイド結合グロブリン、 α 1 酸性糖タンパク質、グルココルチコイド受容体を用いて、各タンパク質とリガンドとの相互作用についてスクリーニングを行った。

2) リポカリン 2 タンパク質強制発現細胞株の作製

HaCaT 細胞よりクローニングした目的遺伝子を哺乳動物発現ベクター (pFN28A) へ挿入し、HaloTag 融合リポカリン 2 発現ベクターを調製した。これをリポフェクション法により HaCaT 細胞へトランスフェクションしたのち、HaloTag の蛍光リガンドである HaloTag TMR を用いて、蛍光顕微鏡により目的タンパク質の発現を確認した。また、G418 による安定発現株の選択を試みた。

4. 研究成果

1) ヒトリポカリン 2 に対するステロイド化合物の結合性を評価するための評価系の構築
低分子化合物をリガンドとして用いる場合、可能な限り多く固定化する必要があることから、固定化条件の検討を行った。センサーチップの活性化 (NHS 化) 時間を 13 分、リガンド反応時間 7 分において RU 値が最大となったことから、本条件をもとにコハク酸プレドニゾロンおよびコハク酸デキサメタゾンを固定化した。続いて、コントロールの探索を目的としてグルココルチコイド受容体、 α 1 酸性糖タンパク質、コルチコイド結合グロブリンをアナライトとした相互作用のスクリーニングを行った結果、 α 1 酸性糖タンパク質が適していることが示唆された。また、リポカリン 2 はデキサメタゾンに対して用量依存的に結合したが、プレドニゾロンに対する結合

は認められなかった。今回、ステロイド骨格における 17 位側がチップへ固定されていることから、A・D 環における側鎖が結合に影響を与えた可能性が考えられる。今後、より精査していきたい。

2) リポカリン 2 タンパク質強制発現細胞株の作製

リポフェクション法により、約 40%の細胞において目的遺伝子の導入が確認できた。また、一過性発現細胞のみならず安定発現細胞株を得ることができた。今後、細胞内外におけるリポカリン 2 とステロイドの結合解析に、本細胞株を用いて検討したい。

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)

[学会発表] (計 1 件)

小澤実香、鈴木直人、神谷貞浩、佐田宏子、富岡佳久、小嶋文良「リポカリン 2 に対するステロイド結合能の評価系構築に関する検討」、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤 実香 (OZAWA MIKA)
城西国際大学・薬学部・助手
研究者番号：40398558