

【 原著 】

プロテインアレイ法による高気圧酸素が抑制する炎症性サイトカインの探索

右田平八¹⁾, 渡辺 渡¹⁾, 吉武重徳²⁾, 庄司早希³⁾, 福元広行¹⁾
九州医療科学大学 生命医科学部 生命医科学科¹⁾
九州医療科学大学 臨床心理学部 臨床心理学科²⁾
大分医師会立 アルメイダ病院 臨床工学室³⁾

【要約】

吸入気の酸素分圧を著しく高めた高気圧酸素治療 (hyperbaric oxygen therapy: HBO) は炎症を伴う病態に対して効果的であることから、組織感染症や骨髄炎、早期創傷治癒に適応されている。炎症のプロセスにおいて、炎症性サイトカインが全身性あるいは局所性炎症反応の原因となっており、HBOと炎症性サイトカインに関して、HBOが抑制する炎症性サイトカインについての検証方法が幾つかの論文で報告されている。本研究では、HBOを受けた疾患の異なる患者の血液サンプルから各種炎症性サイトカインの発現変動について検討した。方法は、一度に36種の分析が可能なプロテインアレイ法を用いて網羅的に解析し、HBOが抑制する炎症性サイトカインを探索した。結果はCCL5, ICAM-1, SDF-1, SERPINE1, MIFの発現を認めた。プロテインアレイ法を用いてHBOによる5種の変動を捕捉した。

キーワード

高気圧酸素治療, 炎症性プロセス, 網羅的分析法, タンパク機能解析

【original】

Search for inflammatory cytokines suppressed by hyperbaric oxygen using protein array.Heihachi Migita¹⁾, Wataru Watanabe¹⁾, Shigenori Yoshitake²⁾, Saki Shoji³⁾, Hiroyuki Fukumoto¹⁾

- 1) Kyushu University of Medical Science, School of Medical Life Sciences, Department of Medical Life Sciences.
- 2) Kyushu University of Medical Science, School of Clinical Psychology, Department of Clinical Psychology.
- 3) Almeida Memorial Hospital, Department of Clinical Engineering.

【abstract】

Hyperbaric oxygen therapy (HBO) is beneficial in conditions involving inflammation and is therefore indicated for tissue infections, osteomyelitis, and wound healing. Inflammatory cytokines are considered triggers of systemic and local inflammatory responses. HBO may suppress inflammatory cytokines. In this study, we investigated changes in the expression of various inflammatory cytokines from blood samples of HBO patients with various diseases. We used a protein array method that allows multiple analyses at once. The results showed CCL5, ICAM-1, SDF-1, SERPINE1, and MIF expression changes.

keywords

hyperbaric oxygen therapy, inflammatory process, comprehensive analysis method, protein function analysis

I. 緒言

炎症性サイトカインは临床上重要であるが、正常(健康)な場合に殆ど検出されない。重篤な疾病や感染症、外傷後の経過中にサイトカインが上昇することが知られている¹⁾。高気圧酸素治療(hyperbaric oxygen therapy: HBO)は炎症を伴う病態に対して効果的であることから、組織感染症や骨髄炎、早期創傷治癒に適応されている。炎症のプロセスにおいて、炎症性サイトカインが全身性あるいは局所性炎症反応の原因となっているが、HBOが抑制する炎症性サイトカインの種類についての分析方法は確立されていない。本研究では、炎症性病変を持つHBO患者の施行前後の血液から炎症性サイトカインの発現変動について、一度に36種のサイトカイン分析が可能なプロテインアレイ法を用いて網羅的に解析することを目的に検討した。

II. 対象および方法

患者背景はイレウス2例(男性2名, 平均年齢85才)、難治性末梢循環不全1例(女性, 80才)、広汎圧挫減創1例(女性, 36才)で初回のHBO(2.0 ATA, 60 min/time)施行前後の血清サンプルを対象とした。採血後に遠分離した血清サンプルを冷凍保存し、九州保健福祉大学(生命医科学科および動物生命薬科学科)内で解凍後にプロテインアレイ法(Proteome™

Profiler, R&D systems社製)を用いて検出した。実験は、血清サンプルをオリジナルの割合で混合し、キット添付の標準プロトコールに従って実施した。プロテインアレイはケミルミイメーシングシステム(VILBER LOURMAT社製)で検出した化学発光をシステムの撮影用ソフトウェアで撮影し、画像処理にはアメリカ国立衛生研究所の画像処理ソフト(ImageJ)を用いて輝度(%)を算出した。

尚、本研究は九州保健福祉大学の倫理委員会承認を得て実施し、筆者らに開示すべき利益相反(conflict of interest: COI)はない。

1. 血清サンプルの定量

使用する血清サンプルの量を既定したものではなく、実験者の実地経験によるところが大きい。初回の測定で添付文書に示された標準プロトコール通りにHBO前後の血清をそれぞれ50 μ L, 200 μ Lでサンプリングして測定に用いた。しかし、反応が微量で判定困難であり、試薬が高価で潤沢に使用できないため、2回目の測定では疾患の異なる4つの血清サンプルを混合し、サンプリングを600 μ L(150 μ L \times 4)と増量して測定した。

2. プロテインアレイ法

プロテインアレイ法では、36種類のヒトサイトカイン

Table 1. Cytokine antibody array (membrane array: 36 types) and abbreviations

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A	Reference		CCL1 I-309	CCL2 MCP-1	MIP 1 α / β	CCL5 RANTES	CD40L TNFSF5	C5 (complement)	CXCL1 GRO α	CXCL10 IP-10	Reference									
B			CXCL11 I-TAC	SDF-1 CXCL12	G-CSF	GM-CSF	ICAM1 CD54	INF- γ	IL-1 α IL-1F1	IL-1 β IL-1F2										
C			IL-1ra IL-1F3	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-8	IL-10	IL-12 p70										
D			IL-13	IL-16	IL-17A	IL-17E	IL-18 IL-1F4	IL-21	IL-27	IL-32 α										
E	Reference		MIF	SERPINE1 PAI-1	TNF- α	TREM-1														Negative Control

Abbreviation explanation					
abbreviation	name	abbreviation	name	abbreviation	name
CCL1,2,5	CC chemokine ligand 1,2,5	MIP	macrophage inflammatory proteins	CD 40L	cluster of differentiation 40 ligand
C5	cytokine array C5	CXCL1,10,11	C-X-C motif chemokine ligand 1,10,11	SDF-1	stromal cell-derived factor-1
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor	GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor	ICAM1	intercellular adhesion molecule1
INF- γ	interferon- γ	MIF	macrophage inflammatory proteins	SERPINE1	serpin family E member 1
IL-1~32	interleukin-1~32	TNF- α	tumor necrosis factor- α	TREM-1	triggering receptor expressed on myeloid cells1

に対する抗体をスポットした配列 (array) で単一試料中に存在する多数のサイトカインを同時に検出することができる。尚、プロテインアレイ法で検出されるサイトカインと略語解説を Table 1 に示す。プロテインアレイ法は従来の免疫沈降法であるウエスタンブロッティング法よりも手技的に簡便で、短時間に多くのサイトカインの解析を行うことが可能である。各キットには特異性の高い抗体を2ヶ所ずつスポットしたメンブレンアレイと各種バッファーおよびビオチン標識した検出抗体が含まれており、サンプルの各標的因子をアレイ上に捕捉し、ビオチン標識した検出抗体とHRP標識ストレプトアビジンを用いて一度に検出する。サイトカインの発現量は、apoptosisや炎症、血管形成、免疫反応、遊走など多くの生体内作用によって変化する。サイトカイン同士の相互作用は広範囲に及ぶため、生物学的反応・機能を完全に解析するには抗体アレイ解析のような多重分析が適している。個々のターゲット因子を測定するELISA法やウエスタンブロット法と異なり、抗体アレイは一度に多種類のタンパク質活性を解析できるためサイトカインシグナルに関連する重要な因子や病気のメカニズム、バイオマーカーの探索にも有用である²⁾。

3. 画像処理ソフトImageJ

解析に用いたImageJは、アメリカ国立衛生研究所 (National Institutes of Health: NIH) が開発した画

像処理ソフトである³⁾。ImageJを使用することにより、TIFF・JPEGなど多くの形で保存された画像の編集・解析を行うことができ、科学研究における画像解析に広く利用されている。

4. 輝度計算式の定義

Table1で示したアレイのA (1,2), A (19,20), E (1,2) のスポットはReferenceのスポットである。反応が見られたサイトカインのスポットの発現量を輝度 (% intensity) として次式より算出した。また、Referenceのスポットの数値を平均した値を最大値 (Max) とし、E (19,20) のNegative controlのスポットの数値を最小値 (Min) とした。

$$\% \text{ intensity} = \frac{\text{Exp}-\text{Min}}{\text{Max}-\text{Min}} \times 100$$

5. プロテインアレイ法の手順

プロテインアレイ法の手順について Figure 1 に示す。

- 1) ブロッキングを行い、血清サンプルへの非特異的な結合を防止した。
- 2) メンブレンと希釈した血清サンプルを60分間反応させた。
- 3) 目的とするサイトカインと結合させるため、ビオチン標識検出抗体を混合して12時間インキュベートし、各標的サイトカインをアレイ上に捕捉した。
- 4) HRP標識ストレプトアビジンを用いてインキュベートすることで一度にすべて検出する。

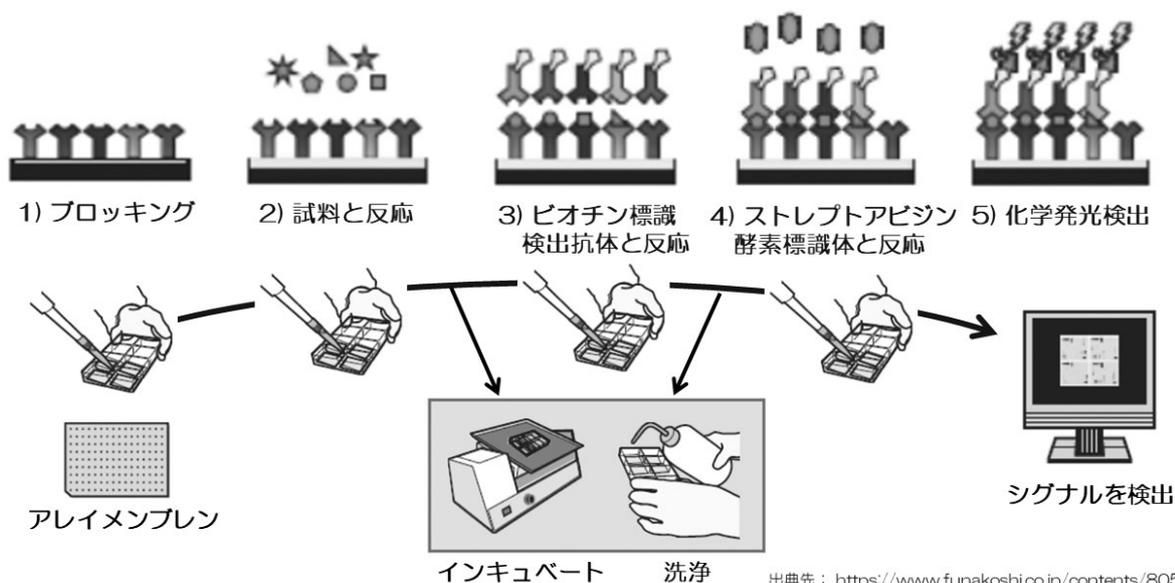


Figure 1: R&D Co., Ltd., Modified and quoted from membrane type antibody array flowchart

Table 2. Cytokine antibody array (5 spots expressed)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A	Reference		CCL1 I-309		CCL2 MCP-1		MIP 1 α / β		CCL5 RANTES		CD40L TNFSF5		C5 (complement)		CXCL1 GRO α		CXCL10 IP-10		Reference	
B			CXCL11 I-TAC		SDF-1 CXCL12		G-CSF		GM-CSF		ICAM1 CD54		INF- γ		IL-1 α IL-1F1		IL-1 β IL-1F2			
C			IL-1ra IL-1F3		IL-2		IL-4		IL-5		IL-6		IL-8		IL-10		IL-12 p70			
D			IL-13		IL-16		IL-17A		IL-17E		IL-18 IL-1F4		IL-21		IL-27		IL-32 α			
E	Reference		MIF		SERPINE1 PAI-1		TNF- α		TREM-1											Negative Control

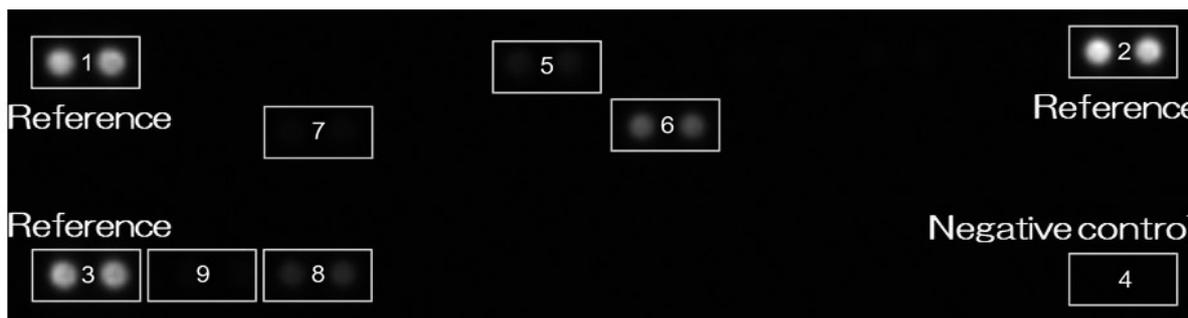


Figure 2: pre-HBO (Converting Chemiluminescence Imaging System images to ImageJ)



Figure 3: post-HBO (Converting Chemiluminescence Imaging System images to ImageJ)
Code 5: CCL5, Code 6: ICAM-1, Code 7: SDF-1, Code 8: SERPINE1, Code 9: MIF

5) 結合したサイトカインの量に比例して各スポットで光が生成される。

IV. 結果

プロテインアレイ法で発現したスポットを色調して Table 2 に示し、ケミルミメージングシステムで得られた画像を ImageJ で画像処理したものを Figure 2 (pre HBO), Figure 3 (post HBO) に示した。

プロテインアレイ法で検出できる 36 種類のサイトカインのうち、発現が確認されたのは 5 スポット (code 5,6,7,8,9) であった。発現したサイトカインの輝度変化を (pre-HBO% → post-HBO%) とした。内訳は CCL5 (15.7% → 28.6%), ICAM-1 (47.4% → 39.5%), SDF-1 (6.5% → 2.9%), SERPINE1 (27.2% → 30.5%), MIF (6.0% → 4.6%) であった。

尚、輝度の pre-post HBO 変化量 ± 5% 以上を有効発現量 (*) と定義した。

結果を Table 3 にプロットし、その結果をグラフ Figure 4 に示した。

HBO 前後の輝度比は、5 つのスポットのサイトカインの発現量の変化量がそれぞれ、CCL5 は 12.9%, ICAM-1 は 7.9%, MIF が 1.4% 減少し、SERPINE1 が 3.3%, SDF-1 が 3.6% 増加した。ICAM-1 と CCL5 のスポットで 5% 以上の変化が確認された。

V. 考察

検出可能な 36 種類のサイトカインのうち、5 つのスポットで反応が確認されたが n が少ないのは否めない。しかし、初回の HBO (2.0 ATA, 60 min) 前後で生体

Table 3. Cytokine antibody array results (% intensity)

code	cytokine	pre-HBO	post-HBO	difference
5	CCL5	15.7%	28.6%	12.9%*
6	ICAM-1	47.4%	39.5%	7.9%*
7	SDF-1	6.5%	2.9%	3.6%
8	SERPINE1	27.2%	30.5%	3.3%
9	MIF	6.0%	4.6%	1.4%

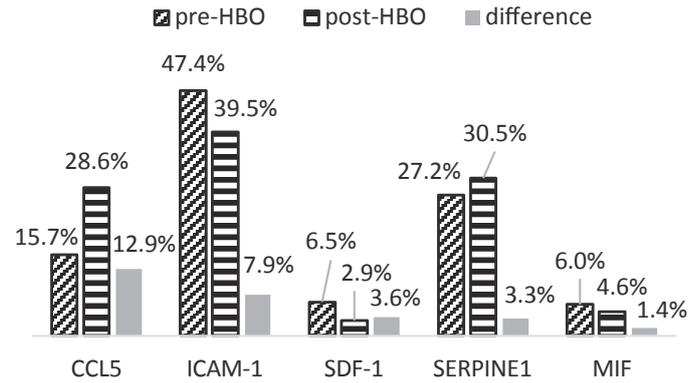


Figure 4: Result bar graph

% intensity pre and post HBO: Changes in cytokine expression levels in the five spots were, CCL5 decreased by 12.9%, ICAM-1 decreased by 7.9%, SDF-1 decreased by 3.6%, SERPINE1 by 3.3% and MIF by 1.4% increased. Changes of 5% or more were confirmed in ICAM-1 and CCL5 spots.

のサイトカインの変動を捕捉し、サイトカイン種が特定された事に意義があると考えられた。今回の探索では特に細胞接着分子 (ICAM-1) が HBO 後に減少した。炎症の初期段階である白血球の組織の浸潤には、血流中の白血球と血管内皮細胞の接着が必須であり、この接着には、細胞間接着分子である ICAM-1 が重要な役割を担っている⁴⁾。炎症反応における ICAM-1 の役割は、種々の病態モデルで報告^{5),6)}され、また血管内皮細胞側の接着分子でもある ICAM-1 は、炎症性サイトカインの刺激で発現が増強することが報告されている⁷⁾。HBO 後に ICAM-1 が減少していたことから、炎症初期に生じる ICAM-1 の発現抑制は、サイトカイン・カスケード⁸⁾を断つ上で早期の HBO が重要であることが示唆された。しかしながら、炎症部位への増殖因子や活性抑制因子の役割の多くが HBO で不明であり、ケモカインの 1 種である CCL5 のように増加した因子も見られた。CCL5 は、T 細胞、血小板、マクロファージ、樹状細胞、内皮細胞などの多様な細胞から分泌され、受容体 CCR1, CCR3, CCR5 を介して T 細胞・単球・好酸球・好塩基球などの遊走を誘導する⁹⁾。CCL5 は炎症細胞を活性化する一方で、血管新生や組織修復にも関わり、神経保護にも働く¹⁰⁾など多面性があり、その機能の解明が脳梗塞の新たな治療につながることも期待される。近年では、CCL5 の発現が免疫細胞の機能を調整し、がん免疫応答に大きく影響することも報告されている¹¹⁾。

SDF-1 は胎児期の B 細胞生成、骨髄での造血において重要な役割を担っていることが報告¹²⁾されて明らかになっており、セリン蛋白分解酵素インヒビター-SERPINE1 は、血管内皮、肝臓、単球/マクロファージ、血小板、脂肪組織によって産生され、肥満、インスリン抵抗性 2 型糖尿病の病因に関与することや、予後不良マーカーとしての可能性が示唆されている¹³⁾。また、MIF はマクロファージ遊走阻止因子であることが報告されている¹⁴⁾。しかし、本探索では SDF-1, SERPINE1, MIF については変化量が微量であった。さらに、今回はスクリーニング的に単一のサンプル中の複数のサイトカインがどう動いたかについて全体的な傾向を網羅的に解析することを目的としたため、使用した血清サンプルは、疾患の異なる 4 つの患者血清サンプルを混合したものであり、検出されたサイトカインについてそれぞれの効果は明らかになっていないことから、ELISA 法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ELISA) を用いて定量解析することで新たな HBO による効果が解明されると推測される。ELISA 法は、試料溶液中に含まれる目的の抗原あるいは抗体を、特異抗体あるいは抗原で捕捉するとともに酵素反応を利用して検出、定量する方法である¹⁵⁾。

種々の抗原抗体反応の組合せを利用し、最終的には酵素標識した抗原あるいは抗体を反応系に組込んで、酵素活性を検出することも必要であろう。酵素活性の検出には反応によって吸光スペクトルが変化する

基質が用いられ、吸光度測定で数値化することでサイトカイン探索が可能であった。

今後、症例を骨髄炎や組織感染症等に系統化して、各々のサイトカイン探索をプロテインアレイ法からELISA法による詳細な検証が必要であると考えられた。

VI. 結語

HBO効果の指標と治療戦略として、HBOが抑制する炎症性サイトカインの探索に簡便なプロテインアレイ法が有用であった。

参考文献

- 1) M. J. Bown, M. L. Nicholson, P. R. F. Bell, et al.: Cytokines and inflammatory pathways in the pathogenesis of multiple organ failure following abdominal aortic aneurysm repair: *Eur J Vasc Med Biol* 22. 2001; pp.485-495.
- 2) Yang L, Wang J, Li J, et al.: Identification of serum biomarkers for gastric cancer diagnosis using a human proteome microarray: *Mol Cell Proteomics*.15. 2016; pp.614-623.
- 3) Abramoff M.D, Magelhaes P.J, Ram S.J: "Image Processing with ImageJ". *Biophotonics International*, volume 11, issue 7, 2004; pp.36-42.
- 4) 東田朋恵, 飯郷裕, 坪川政雄, 他.: 急性および慢性炎症におけるICAM-1の役割. *日本炎症・再生医学会抄録* 1992;Vol.12 (4).
- 5) Barton R.W, Rothlein R, Ksiazek J, et al.: The effect of anti-intercellular adhesion molecule-1 on phorbol ester-induced rabbit lung inflammation. *J. Immunol*. 1989; 143: pp.1278-1282.
- 6) Wegner C.D, Gundel R.H, Reilly P Hayns, et al.: Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. *Science*.1990; 247: pp.456-459.
- 7) Shimizu Y, Newman W, Gopal T V, et al.: Four molecular pathways of T cell adhesion to endothelial cells. roles of LFA-1, VCAM-1 and ELAM-1 and changes in pathways hierarchy under different activation conditions. *J. Cell. Biol*. 1991; 113: pp.1203-1212.
- 8) 笠倉新平: サイトカイン・カスケード. *検査と技術*1991;19巻7号: pp.319-321.
- 9) 寺尾聰: 脳梗塞におけるケモカイン RANTES について. *日本脳循環代謝学会機関誌*2017;Vol.28 (2).
- 10) Tripathy D, Thirumangalakudi L, Grammas P: RANTES upregulation in the Alzheimer's disease brain. a possible neuroprotective role. *Neurobiol Aging*.2010; 31: pp.8-16.
- 11) Wooseok Seo, Kanako Shimizu, Satoshi Kojo, et al. Runx-mediated regulation of CCL5 via antagonizing two enhancers influences immune cell function and anti-tumor immunity. *Nature Communications* 2020; Mar 26.11 (1) :1562.
- 12) 長澤丘司: 心臓血管系形成におけるケモカイン SDF-1/PBSF およびその受容体 CXCR4 の役割. *社団法人日本実験動物学会, 日本疾患モデル学会記録*1999;Vol.15.
- 13) Maria Tziastoudi, Efthimios Dardiotis, Georgios Pissas, et al. Serpin Family E Member 1 Tag Single-Nucleotide Polymorphisms in Patients with Diabetic Nephropathy; An Association Study and Meta-Analysis Using a Genetic Model-Free Approach. *Genes (Basel)* 2021; Nov 25.
- 14) 西平順: 炎症におけるMIFの発現と機能. *日本炎症・再生医学会抄録*2001;Vol.21 (5).
- 15) MBLライフサイエンス.「ELISAの原理と方法」2017; <https://ruo.mbl.co.jp/bio/support/method/elisa.html/> (2023.4.19最終閲覧)