

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19590567

研究課題名 (和文) プロテオミクスを用いた抗核抗体および自己抗体の検出と同定

研究課題名 (英文) Detection and identification of anti-nuclear antibodies and autoantibodies using proteomic strategy

研究代表者

今福 裕司 (IMAFUKU YUJI)

公立大学法人福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40254015

研究成果の概要：

プロテオミクスの手法を用いて、抗核抗体および自己抗体を検出すること、および同定することを目的として研究を行った。

液相あるいは固相での抗原蛋白の分画を行い、各分画に対する血清の反応性を検討し、その結果、コントロールと比較して患者血清において強く反応する分画を見出した。

本研究によりプロテオミクスの手法を用いることによって新たな抗核抗体および自己抗体を見出す方向性を明らかに出来たと考える。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	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：境界医学・病態検査学

キーワード：プロテオミクス・自己抗体・抗核抗体

1. 研究開始当初の背景

種々の自己抗体およびそれに含まれる抗核抗体については膠原病などの疾患に特異性のある抗体 (疾患標識抗体) が知られてい

るが、その一方でまだまだ解明されていない抗体も多く、またその対応抗原の解析が細胞生物学的研究の進展に寄与する可能性を秘めている。また、我々の以前の研究において、

健常者においても抗核抗体がかなりの割合で陽性となることもわかっている。そしてこの抗体について検索を行い、ウェスタンブロットの結果、分子量の同じような抗原と班のすることを見出したが、蛋白質を同定するまでには至らなかった。

自己抗体の検索は従来、抗体が反応すると推定される抗原を推定し、それを単利、精製したのち抗体と反応性を確認してきたが、多数の抗原に対して抗体との反応性をスクリーニングする新しい手法（ハイスループットスクリーニング **high-throughput screening: HTS**）の一つとしてプロテオミクス的手法が利用可能となっている。プロテオミクス的手法とは蛋白質をある手法で分離し、そのなかで例えば疾患を有する者由来の材料と疾患を有しない者由来の材料を比較して、有意な差のある分画をさらに解析し、質量分析器を用いて分画に含まれる多数の蛋白質を同定して、疾患群で特異的な蛋白質を同定するものである。

2. 研究の目的

本研究では、上記背景を鑑みて、一般的にわかっている疾患標識抗体（例えば抗 dsDNA 抗体、抗 RNP 抗体、抗 Sm 抗体、抗 SS-A 抗体、抗 SS-B 抗体、抗 Scl-70 抗体、抗 Jo-1 抗体等）以外の抗体を、プロテオミクスの手法を用いて、抗核抗体および自己抗体を検出、同定することを目的とした。それらの疾患特異性は上記の疾患標識抗体と比較すれば低い可能性もあるが、多種多様な自己抗体のスクリーニング的手法の確立という目的も併せて本研究を行った。

3. 研究の方法

はじめに抗核抗体（**Fluorescent Antinuclear Antibody**）のスクリーニング検査にて陽性（血清希釈 160 倍以上にてもヒト培養細胞と反応させた場合、核領域に免疫グロブリンの沈着を意味する蛍光が陽性と判定される場合）を呈した血清のうち、**ELISA** 法による抗 DNA 抗体などの疾患特異的抗体が検出されなかった検査材料の収集を行った。

また、抗核抗体を検出する抗原を準備した。上記、抗核抗体スクリーニング検査に用いられているヒト培養細胞である **HEp-2** 細胞を培養し、界面活性剤、蛋白分解酵素阻害剤を含む細胞溶解液にて溶解を行い、細胞溶解液（**lysate**）を抗体スクリーニングのための抗原とした。

抗原の分画（**fractionation**）にはゲルを用いた 2 次元電気泳動などの固相プロテオミクスよりも感度が数段優れている液相プロテオミクス（**liquid-phase proteomics**）の系を用いた。

一次元目は液相等電点電気泳動を用いて蛋白質の **pI** の違いに基づいて分画した（20 分画）。

二次元目は逆相 **HPLC** を用いて蛋白質の疎水性の違いにより分画を行った（80 分画）。

これらの分画をマイクロプレートウェルに固相化して、血清と反応させた後 **HRP** 標識抗ヒト免疫グロブリン抗体を用いて反応させた後、化学発光反応基質と反応させ、シグナルを検出した。

このイムノスクリーニングの結果、陰性コントロールと比較して患者血清と強く反応する（統計学的に有意に高値を呈する）いくつかの陽性分画を得ることが出来た。

また、従来からのゲルベースの方法にて確認を行った。

2 次元電気泳動装置を用いて、1 次元目を

等電点電気泳動 (pI) により分画を行う、2次元目は SDS-PAGE により分子量の違いにより分画し、2次元分画ゲルを得た。その後、PVDF メンブレンに転写を行い、ブロッキングを行った後、血清と反応させた。その後、HRP 標識抗ヒト免疫グロブリン抗体を用いて反応させた後、化学発光を行わせてシグナルを検出した。

その後、当該位置のゲルを切り出し、質量分析器にて蛋白同定を行った。

最終的に、この分画について SDS-PAGE の諸条件下によるさらなる分画を行い、多数の蛋白が含まれていることを確認し、ブロッティングを行った。さらに陽性バンドについて proteinID を求めるべく種々検討を行った。

4. 研究の成果

プロテオミクスの手法により、抗原として用いた細胞溶解液に対して液相プロテオミクスの手法にて1次元および2次元分画により、約 90 の分画を得ることが出来た。また、従来の固相の手法を用いても、状態の良い、よく分離された2次元ゲルを得ることが出来た。

イムノスクリーニングの結果、液相プロテオミクスではコントロールと比較して有意に高値のシグナル、を呈する分画、すなわちその分画に対する自己抗体が多く含まれる分画を複数見出した。

また固相プロテオミクスでも同様に、メンブレンへのブロッティング後にイムノスクリーニングを行い、2次元上の個々の位置におけるシグナルを解析し、コントロールと比較して有意に高値のシグナルを呈するスポットを見出すことが出来た。

その後、当該位置のゲルを切り出し、質量分析器にて蛋白同定を行ったが、この分画に

も多数の蛋白質が認められ、さらに1次元 SDS-PAGE による分画を追加してメンブレンに転写後に血清を用いてイムノスクリーニングを試みたが、最終的に有意な蛋白質の proteinID を得るには至らなかった。

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 1 件)

自己抗体検査の全国サーベイとそれに基づく標準化の検討

熊谷俊一、林伸英、大田俊行、赤星透、今福裕司、小柴賢洋

臨床病理 57 巻 1 号 31-41, 2009

[学会発表] (計 1 件)

日本臨床検査医学会 総会

(2008.11.28、名古屋国際会議場)

自己抗体検査の全国サーベイとそれに基づく標準化の検討(抗核抗体)

林伸英、赤星 透、大田俊行、今福裕司、小柴賢洋、熊谷俊一

臨床病理 56 巻, 164, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今福 裕司 (IMAFUKU YUJI)

公立大学法人福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40254015

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし