

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07392

研究課題名（和文）顕微鏡的多発血管炎の新規血清ペプチドバイオマーカー候補AC13の定量系の確立

研究課題名（英文）Establishment of a quantitative system for AC13, a candidate for a novel serum peptide biomarker of microscopic polyangiitis

研究代表者

佐藤 政秋（Sato, Masaaki）

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：90463801

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：活動期の顕微鏡的多発血管炎（MPA）患者の血清で増加するアポリポ蛋白A-Iの末端13アミノ酸残基のペプチド・AC13について、内部標準を用いた質量分析による濃度定量系を構築した。MPAの血清AC13濃度は、多発血管炎性肉芽腫症、関節リウマチ及び健常に比し有意に高値を示した。定量した血清AC13濃度はCRPと有意な強い正の相関を示し、AC13のMPA炎症病態への関与が考えられた。また、血清AC13濃度のcompetitive ELISA測定を目的として、抗AC13モノクローナル抗体を作製した。本研究で構築したAC13定量系は、MPAを近縁疾患から鑑別可能な臨床検査法となることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AC13は、MPAを近縁疾患から鑑別できる初の血液バイオマーカーとなる可能性が高い。本研究で構築した定量系は、症候の有無や医師の判断の差に関わらない均一な診断を可能とするため、有用な臨床検査項目となり得る。本研究で定量した血清AC13濃度はCRPと強い正の相関を示したため、血清AC13濃度が高い患者では炎症性サイトカインの産生亢進による炎症促進や、アポリポ蛋白A-I切断酵素が炎症時に活性化していることが示唆される。AC13はMPAのバイオマーカーとなるだけでなく、アポリポ蛋白A-I切断酵素やAC13シグナル伝達経路を同定することにより、MPAにおける治療標的となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：AC13, a peptide of C-terminal 13 amino acid residues of apolipoprotein A-I which is specifically increased in the sera of patients with active phase of microscopic polyangiitis (MPA). In this study, we have established a measurement system for AC13 by mass spectrometry using stable isotope-labeled AC13 as an internal standard. Serum AC13 concentration in MPA were significantly higher than those in granulomatosis with polyangiitis, rheumatoid arthritis, and healthy subjects. Serum AC13 concentration showed a strong positive correlation with CRP, suggesting the involvement of AC13 in the inflammation of MPA. We also obtained an anti-AC13 monoclonal antibody-producing hybridoma line which is required for measurement of serum AC13 concentration by competitive ELISA. These measurement systems of serum AC13 concentration may provide a clinical laboratory examination useful for differential diagnosis of MPA from related diseases.

研究分野：生化学

キーワード：バイオマーカー 顕微鏡的多発血管炎

1. 研究開始当初の背景

顕微鏡的多発血管炎 (microscopic polyangiitis, MPA) は、抗好中球細胞質抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibody, ANCA) を認める、ANCA 関連血管炎 (ANCA-associated vasculitis, AAV) に分類される全身性の難治性疾患である。全身の毛細血管や細動静脈に壊死性血管炎を来し、急速進行性糸球体腎炎や肺胞出血、間質性肺炎を生じ、身体機能及び生命予後が悪化する。早期の診断及び治療介入が求められるが、MPA の病因・病態は未だ不明である。MPA 患者の約 70% は、好中球 myeloperoxidase (MPO) を抗原とする MPO-ANCA が陽性となるため、MPO-ANCA が MPA の指標として用いられる。しかし、特異性が高くないため、MPA と他の血管炎との鑑別が難しい。MPA 特異的なバイオマーカーの確立が急務である。

2. 研究の目的

代表者のグループは、MPA 患者の血清ペプチドの網羅的解析から、活動期の MPA における血中濃度が多発血管炎性肉芽腫症 (GPA) や好酸球性多発血管炎性肉芽腫症、その他の血管炎や血管炎以外の膠原病、健常と比較し有意に高く、治療後に減少する血清ペプチドとして、アポリポ蛋白 A-I (ApoA-I) の C 末端 13 アミノ酸残基からなるペプチド (255 SALEEYTKKLNTQ 267 , AC13) を発見した。このことから代表者は、AC13 が MPA の病勢評価に有用な MPA 特異的バイオマーカーとなると考えた。そこで本研究では、活動期の MPA 血清で特異的に増加する AC13 の質量分析及び ELISA による定量系を構築し、MPA を近縁疾患から鑑別するバイオマーカーとして確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 安定同位体標識ペプチドを用いた質量分析による血清 AC13 濃度の定量系の構築
AC13 の 9 番目のリジンに安定同位体 (^{13}C , ^{15}N) を導入した、未標識 AC13 より 8 Da 大きい安定同位体標識 AC13 を合成した。この安定同位体標識 AC13 を血清検体に既知濃度で添加後、C18 基を搭載した磁気ビーズを用いて可溶性ペプチドを抽出した。抽出したペプチドを MALDI-TOF/MS で測定し、安定同位体標識 AC13 に対する血清 AC13 のイオン強度比より、血清 AC13 濃度を定量した。

(2) ELISA による血清 AC13 濃度の定量系の構築

AC13 は ApoA-I から切断されて生成するため、AC13 の N 末端のみが AC13 特異的な領域であり、その他は ApoA-I と共通している。そこで、AC13 をマウスに免疫し、ApoA-I を認識しない、AC13 の N 末端を認識する特異的モノクローナル抗体の作製を試みた。作製した抗体を用い、competitive ELISA 法による血清 AC13 濃度の定量系の構築を検討した。

4. 研究成果

(1) 安定同位体標識ペプチドを用いた質量分析による血清 AC13 濃度の定量系の構築
質量分析による血清 AC13 濃度の定量が可能かどうかの検証として、健常血清に合成 AC13 および安定同位体標識 AC13 を各々終濃度 0-20 pmol/ μL および 5 pmol/ μL で添加し、この血清から C18 磁気ビーズで抽出したペプチドの質量スペクトル測定を行った。その結果、0.625-20 pmol/ μL AC13 の範囲で、健常血清に添加した AC13 濃度と AC13 イオン強度/安定同位体標識 AC13 イオン強度比から見積もった AC13 濃度の間に高い直線性が認められた ($R^2=0.9975$) (図 1)。予備的検討において、MPA、GPA、関節リウマチ (RA) 及び健常における血清 AC13 濃度を測定したところ、MPA の血清 AC13 濃度 (6.3 ± 4.1 pmol/ μL , $n=12$) は、GPA (2.3 ± 0.9 pmol/ μL , $n=5$)、RA (2.0 ± 0.7 pmol/ μL , $n=12$) 及び健常 (1.9 ± 0.9 pmol/ μL , $n=12$) に比し有意に高値を示した (図 2)。このことから、質量分析による血清 AC13 濃度の測定系の基盤を構築できたと考えた。

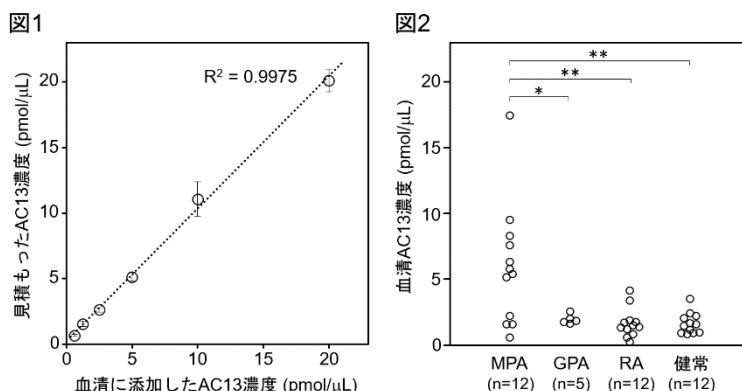


図 1：安定同位体標識 AC13 を用いた質量分析による血清 AC13 濃度定量の検証 (n=3)。
図 2：MPA および対照疾患における血清 AC13 濃度。*p<0.05, **p<0.01。

測定系の構築と並行し、MPA 44 例、対照疾患 120 例（MPA 以外の血管炎 64 例、炎症性疾患 25 例、RA 16 例、その他対照疾患 15 例）および健常 19 例の計 183 例の血清を収集した。構築した測定系を用いて、収集血清の AC13 濃度を定量した。定量した AC13 濃度と臨床検査値（①CRP、②クレアチニン、③白血球数、④MPO-ANCA 力価）との相関解析を行ったところ、血清 AC13 濃度は①～④すべての臨床検査項目との間に有意な相関があり（① $r=0.8266$, $p<0.0001$; ② $r=0.3721$, $p<0.001$; ③ $r=0.4172$, $p<0.0001$; ④ $r=0.5303$, $p<0.0001$ ）、CRP が AC13 濃度と最も強い正の相関を示した（図 3）。AC13 は微小血管内皮細胞を刺激して炎症性サイトカインを産生させるため（*Arthritis Rheum.* 2011;63:3613-24）、本研究の結果は、血清 AC13 濃度が高い患者では当該サイトカイン産生の亢進が起こり、炎症が促進されていることを示唆している。また、炎症時に活性化される血清中プロテアーゼが Apo A-I を切断し、AC13 を生成していることも示唆される。

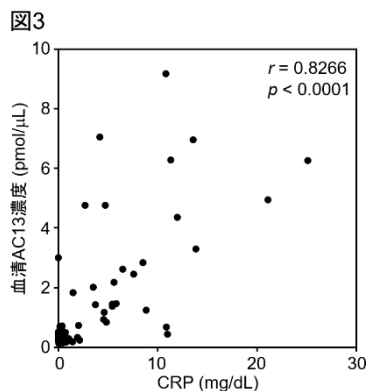


図 3 : 血清 AC13 濃度と CRP の関係 (n=89)。

(2) ELISA による血清 AC13 濃度の定量系の構築

AC13-KLH の免疫により腹水抗体価が上昇したマウスが得られ、その脾細胞よりハイブリドーマを作製した。AC13 の N 末端は、ApoA-I には存在しない AC13 特異的なエピトープとなる。そこで、AC13 の C 末端に BSA を結合させた AC13-BSA を抗原とする ELISA でのスクリーニングを行ったところ、この AC13 の N 末端を認識する抗体を産生するミックスクローンが確認された。このミックスクロンの限界希釈を行い、単一クローンを得た。当該クローン 1×10^7 cells/mL をマウス (BALB/cCrSlc, 雌, 6 匹) の腹腔内に 1 mL/body で投与し、最終的に 32 mL の腹水を得た。この腹水から、AC13 の N 末端を認識する抗体の精製を試みた。腹水に 50%飽和硫酸を添加して抗 AC13 抗体を粗精製後、陽イオンカラム (MonoS 5/50GL) でさらに分離精製した。抗体のみを含むカラム画分を使用し、AC13-BSA または BSA のみを固相化抗原とした ELISA を行った。その結果、当該カラム画分は AC13-BSA のみと結合したことから、目的とする抗 AC13 抗体を精製できたと考えた。この抗体を固相化抗体とした competitive ELISA 系により、血清 AC13 濃度を定量する用途を立てることができた。

以上、本研究では、血清 AC13 濃度の質量分析による定量系を構築し、様々な疾患における血清 AC13 濃度の測定に適用可能であることを示した。さらに、血清 AC13 濃度と CRP の強い正の相関関係から、MPA の血管炎病態に AC13 が関与し、治療標的となる可能性を見出せた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsutiya A, Arito M, Tagashira T, Sato M, Omoteyama K, Sato T, Suematsu N, Kurokawa MS, Kato T.	4. 巻 549
2. 論文標題 Layilin promotes mitochondrial fission by cyclin-dependent kinase 1 and dynamin-related protein 1 activation in HEK293T cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 143-149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.02.091.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kazuki Omoteyama, Toshiyuki Sato, Masaaki Sato, Atsuhiko Tsutiya, Mitsumi Arito, Naoya Suematsu, Manae S. Kurokawa, Tomohiro Kato	4. 巻 6
2. 論文標題 Identification of novel substrates of a disintegrin and metalloprotease 17 by specific labeling of surface proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e05804
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2020.e05804.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shu Ushimaru, Mitsumi Arito Atsuhiko Tsutiya, Toshiyuki Sato, Kazuki Omoteyama, Masaaki Sato, Naoya Suematsu, Manae S. Kurokawa, Atsuko Kamijo-Ikemori, Yugo Shibagaki, and Tomohiro Kato	4. 巻 11
2. 論文標題 Roles of Layilin in Regulation of Low-Density Lipoprotein Receptor in Malignant Glioma Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of St.Marianna University	6. 最初と最後の頁 53-59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kaji, T., Arito, M., Tsutiya, A., Sase, T., Onodera, H., Sato, T., Omoteyama, K., Sato, M., Suematsu, N., Kurokawa, M.S., Tanaka, Y., Kato, T.	4. 巻 1719
2. 論文標題 Layilin enhances the invasive ability of malignant glioma cells via SNAI1 signaling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 140-147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2019.05.034.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤政秋, 永井宏平, 佐藤利行, 吉元瞭, 芝野祐斗, 柴原美乃里, 里川晴夏, 土屋貴大, 表山和樹, 有戸光美, 末松直也, 黒川真奈絵, 加藤智啓
2. 発表標題 MPO-ANCA陽性者由来好中球 myeloperoxidaseにおける翻訳後修飾の網羅的定量解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 芝野祐斗, 吉元瞭, 柴原美乃里, 佐藤政秋, 佐藤利行, 黒川真奈絵, 永井宏平, 加藤智啓
2. 発表標題 活性酸素処理により酸化修飾を導入したMyeloperoxidase免疫による自己抗体の産生
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2021年大会（JHUP0第19回大会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉元瞭, 佐藤政秋, 里川晴夏, 芝野祐斗, 佐藤利行, 黒川真奈絵, 永井宏平, 加藤智啓
2. 発表標題 MPO-ANCA陽性者由来好中球Myeloperoxidase翻訳後修飾の網羅的定量解析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2021年大会（JHUP0第19回大会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒川真奈絵, 佐藤利行, 佐藤政秋, 土屋貴大, 表山和樹, 有戸光美, 末松直也, 加藤智啓
2. 発表標題 再発性多発軟骨炎のバイオマーカー候補となる血清ペプチドの検出
3. 学会等名 第71回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤利行、佐藤政秋、表山和樹、土屋貴大、有戸光美、末松直也、加藤智啓、黒川真奈絵
2. 発表標題 再発性多発軟骨炎における血清ペプチドプロファイルの解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤利行、佐藤政秋、高桑由希子、有戸光美、大岡正道、末松直也、川畑仁人、加藤智啓、黒川真奈絵
2. 発表標題 再発性多発軟骨炎における血清ペプチドの網羅的解析
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会総会・学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤政秋、佐藤利行、表山和樹、土屋貴大、有戸光美、末松直也、加藤智啓、黒川真奈絵
2. 発表標題 顕微鏡的多発血管炎の新規血清ペプチドバイオマーカー候補AC13のMALDI-TOF/MSによる定量
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木琳子、永井宏平、西端智也、佐藤政秋、佐藤利行、黒川真奈絵、加藤智啓
2. 発表標題 ANCA関連血管炎患者における自己抗原Myeloperoxidaseの翻訳後修飾の解析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会 第70回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有戸光美、佐藤利行、表山和樹、佐藤政秋、黒川真奈絵、加藤智啓
2. 発表標題 滑膜繊維芽細胞におけるライリンの役割
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------