

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 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成 21 年度 ～ 平成 23 年度

課題番号：21590854

研究課題名（和文）プロテオミクスを用いた自己免疫性肝炎における自己抗体の網羅的解析

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of autoantibodies in autoimmune hepatitis using proteomics tool

研究代表者

大平弘正（OHIRA HIROMASA）

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90274951

研究成果の概要（和文）：本研究は、自己免疫性肝炎（AIH）におけるプロテオミクスの手法を用いた網羅的な自己抗体の対応抗原について検討し、AIH 患者に特異的な自己抗体の対応抗原として、phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) を同定した。抗 PEPCK 抗体は、健康人での陽性はなく、AIH では 30 例中 10 例（33.3%）、原発性胆汁性肝硬変（PBC）患者とのオーバーラップ例 16 例中 7 例（43.7%）、PBC30 例中 2 例（6%）と AIH で高頻度に検出され、特異性が高いことが確認された。この自己抗体の測定は、AIH の診断に役立つ知見と考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed autoantibodies in patients with autoimmune hepatitis (AIH) using proteomics tool. In the process of screening of autoantibodies, phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) protein was identified as a target antigen of an autoantibody from serum of patients with AIH. Anti-PEPCK antibody was positive in 33.3% (10/30) in patients with AIH, 43.7% (7/16) in patients with primary biliary cirrhosis (PBC)-AIH overlap and 6% (2/30) in patients with PBC, but not detected in healthy control. This antibody is detected by high frequency in AIH patients and its specificity is high. In conclusion, measurement of anti-PEPCK antibody is considered to be useful for diagnosis of autoimmune hepatitis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
22 年度	600,000	180,000	780,000
23 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,000,000		3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：プロテオソーム、自己免疫性肝炎、phosphoenolpyruvate carboxykinase、自己抗体

1. 研究開始当初の背景

本邦における自己免疫性肝炎 (AIH) はその多くが1型 AIH であり、抗核抗体、抗平滑筋抗体などの自己抗体が検出されるが、これら自己抗体には疾患特異性がない。AIH の診断においては、国際診断基準とわが国の診断指針を用いられているが、特異的な疾患マーカー (自己抗体) が無いため、非定型例や急性発症例においてはしばしば診断に苦慮する。また、劇症肝炎非移植例における AIH の救命率は 25% ときわめて予後不良であり、要因の一つに診断困難例の存在が挙げられる。一方、プロテオミクスの手法を用いた自己抗体の対応抗原の検討は、多くの分野で検討がなされ、網羅的な解析から多くの新規の知見を見出している。これまで、AIH においては Ballot E らによって抗核抗体ならびに肝細胞膜抗原に関する報告がなされている (Proteomics 2004, Hepatology 2008)。これら検討により、核抗原として ribonucleoproteinA2/B1、膜抗原として liver arginase、cytokeratins8、18、heat shock protein 70、90、valosin-sontaining protein が候補として挙げられている。しかし、これら報告は、あくまでも海外の AIH 患者を対象としていることから臨床像が大きく異なる本邦例での検討が必要である。したがって、本邦例の AIH においては診断あるいは病態に関与する高感度の疾患特異的な自己抗体の探索が急務である。

2. 研究の目的

本研究は申請者らがこれまで継続して検討してきた自己免疫性肝炎 (AIH) における自己抗体に関する研究において、新たな探索方法としてプロテオミクスの手法を用いて、その自己抗体を網羅的に解析することを目的とする。本研究では以下の点について見とすることを目標とした。

(1) 酸化ストレス負荷の有無により、正常ヒト肝細胞および初代肝類洞内皮細胞 (ラット肝から分離培養) から膜成分、細胞質成分、核成分を抽出し、プロテオミクス手法にて患者血清に特異的に反応する抗原蛋白を同定する。

(2) 同定された抗原蛋白を合成し、Western blot 法や ELISA 法にて AIH の診断マーカーとして新規自己抗体の有用性を明らかとする。

(3) 新規自己抗体の AIH の臨床病態との関連について明らかとする。

(4) 同定された抗原蛋白と CpG DNA を用い AIH モデルマウス作成に着手する。

3. 研究の方法

(1) 抗原蛋白の抽出

正常ヒト肝細胞 (Cryo hHEps) から過酸化水素負荷の有無で cell fraction kits (Bio Vision) を用いて細胞膜成分、細胞質成分、核成分を抽出する (Abe K, Ohira H, et al. Fukushima J Med Sci 2007)。ラット肝からの肝類洞内皮細胞は以前のわれわれの手法に準じて分離培養する (Ohira H, et al. J Hepatol 1994)。その後、肝類洞内皮細胞から肝細胞と同様に抗原蛋白を抽出する。

(2) 二次元電気泳動

上記にて抽出した蛋白を Multiphor II Electrophoresis Unit (GE Healthcare) にて一次元目から二次元目電気泳動を行う。その後、ゲルを染色しスポットの発現を確認する。

(3) Western blot

二次元電気泳動後のゲルを Semi-Dry Transfer Units (GE Healthcare) を用いてニトロセルロース膜に転写し、Western blot を施行する。一次抗体 (患者血清) を 500 倍 - 1000 倍希釈にて行う。使用する血清は、国際診断基準を満たす典型的な AIH 患者でステロイド未治療患者 2 例および全身性エリテマトーデス患者 2 名、健常者 1 例の血清を用いる。血清の採取に当たっては本学倫理委員会にて承認され、同意を得たものを使用する。

(4) 質量分析

疾患群のみ陽性の蛋白スポットと同部位のスポットをゲルより切り出し、Trypsin にてゲル内消化を行ったのち、質量分析を行う。

(5) タンパク質の同定

解析ソフトを用い NCBI protein データベースより候補抗原蛋白の同定を行う。

(6) 候補抗原蛋白を用いた自己抗体の AIH における疾患特異性の検討

抗原蛋白を用いて、Western blot 法および ELISA 法にて AIH 患者血清中の自己抗体の検出を行い、対照のウイルス性慢性肝炎、原発

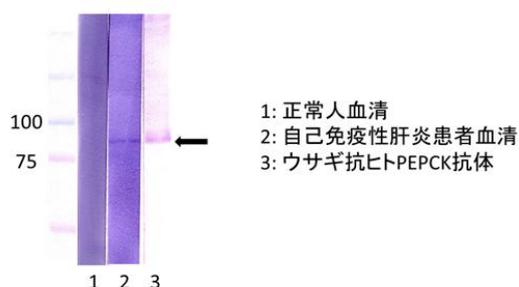
性胆汁性肝硬変、全身性エリテマトーデス患者、健常人との比較を行い、その陽性頻度、特異性について検討する。疾患特異性が高い、陽性頻度の高い自己抗体が発見された場合、肝臓内における局在について免疫染色にて確認する。検体の使用に関しては、本学の倫理委員会にて承認され、同意の得られたものを使用する。

(7) 新規自己抗体のAIHにおける病態との関連に関する検討

上記検討にて、疾患特異性が高い、陽性頻度の高い新規自己抗体が発見された場合、AIHの臨床検査値、臨床経過、組織所見、予後との関連について統計学的に検討する。

4. 研究成果

(1) 正常ヒト肝細胞 (Cryo hHEps) から非核成分を抽出し抗原蛋白として利用し、プロテオソーム解析のスクリーニングのWestern-blot法にてAIH患者血清と特異的に反応するバンドを発見した。同部位のN末端アミノ酸解析にて Ile-Gln-Thr-Leu-Arg-Val-Leu-Ser-Gly-Asp の配列を確定し、ホモロジーサーチの結果からこの抗原蛋白が phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) であることを同定した。



(2) リコンビナント PEPCK 蛋白、植物抽出 PEPCK 蛋白、抗 PEPCK 抗体を用いて、患者血清が PEPCK 蛋白と特異的に反応することを確認した。

(3) Western blot 法にて AIH 患者における陽性率や臨床背景との比較をおこなった。抗原としてリコンビナント PEPCK 蛋白が最も安定したデータが得られたため、抗原として用いることとした。Western blot による検討では、健常人での陽性は認められず、AIH では 30 例中 10 例 (33.3%)、Paris 診断基準を満たす原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 患者と AIH とのオーバーラップ例 16 例中 7 例 (43.7%)、

PBC30 例中 2 例 (6%) と AIH で比較的高頻度で抗体が検出され、特異性が高いことが確認された。なお、ELISA 法の検討では、条件設定で課題が見つかり、安定した結果が得られず使用する抗原蛋白、ブロッキング法について現在も調整中である。

(4) 抗 PEPCK 抗体陽性の AIH の臨床的特徴は現時点では、臨床検査値、臨床経過、組織所見、予後との関連について統計学的に有意なものは見つかっていない。

(5) 抗原蛋白と CpG DNA を用いた AIH モデルマウスの動物モデル作成は研究期間内に着手できず次期の課題となった。

PEPCK は細胞質 (PEPCK1/PCK1) およびミトコンドリア内 (PEPCK2/PCK2) に存在する肝糖新生の律速酵素の一つであり、オキサロ酢酸からホスホエノールピルビン酸の変換に関与する。本抗体は申請者らが正常ヒト肝細胞の非核成分に AIH 患者血清と特異的に反応する抗原蛋白として本研究により、新規に同定した。AIH の類縁疾患である PBC の疾患標識抗体はミトコンドリア内に存在するピルビン酸脱水素酵素を抗原蛋白としており、この観点からも抗 PEPCK 抗体は非常にプロミッシングである。

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 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大平弘正 (OHIRA HIROMASA)
福島県立医科大学・消化器・リウマチ膠原
病内科・教授
研究者番号：90274951

(2) 研究分担者

横川順子 (YOKOKAWA JUNJO)
福島県立医科大学・消化器・リウマチ膠原
病内科・非常勤助教
研究者番号：00453019
高橋敦史 (TAKAHASHI ASTUSHI)
福島県立医科大学・消化器・リウマチ膠原
病内科・助教
研究者番号：40404868
阿部和道 (ABE KAZUMICHI)
福島県立医科大学・消化器・リウマチ膠原
病内科・助教
研究者番号：30468128

(3) 連携研究者

()

研究者番号：