

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 16 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860820

研究課題名(和文) 強皮症におけるトポイソメラーゼ・セントロメアタンパク質の翻訳後修飾異常の探索

研究課題名(英文) Proteomic analysis of posttranslational modification on topoisomerase 1 and centromere protein in patients with Scleroderma.

研究代表者

飯塚 進子 (Iizuka, Nobuko)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：00348533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：強皮症の自己抗原であるトポイソメラーゼ (topo1) 並びにセントロメアB(CENTB)タンパク質について、強皮症患者由来並びに健常者末梢血単核球(PBMC、各n=3)を抗原とし、二次元電気泳動法を用いてタンパク質を分離展開した。抗topo1抗体並びに抗CENTB抗体をもちいてウェスタンブロット(WB)を行い、強皮症群と健常人群における抗原抗体反応について比較、検討した。抗topo1抗体によるWBでは全12スポットを検出し、2群間で異なる反応強度を示すタンパク質スポットが5スポット得られた。同様に、抗CENTB抗体では全8スポットを検出し、内、2群間で2倍以上の反応強度が4スポットでみられた。

研究成果の概要(英文)：To investigate the posttranslational modification on Topoisomerase (topo1) and centromere B protein (CENTB) which are autoantigenic proteins of Scleroderma.

We separated proteins extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 3 patients and healthy donors to 2-dimensional electrophoresis and performed western blotting (2DE-WB) using anti-topo1 antibodies and anti-CENTB antibodies, respectively. We analyzed the differently reactivities of protein spots on 2DE-WB between the scleroderma (Ssc) and the healthy control (HC) groups.

In 2DE-WB of topo1 analysis, we detected 12 protein spots, and 5 out of 12 spots have more than 2-times stronger or lower reactivities in Ssc than in HC groups. Also in 2DE-WB of CENTB analysis, we detected 8 protein spots and 4 out of 8 spots have more than 2-times stronger reactivities in Ssc than HC groups. We tried to identify these proteins, which have differential reactivities in 2DE-WB between Ssc and HC groups, by mass spectrometry.

研究分野：膠原病

キーワード：強皮症 プロテオミクス 翻訳後修飾 自己抗原タンパク質

1. 研究開始当初の背景

強皮症は、自己免疫性疾患のひとつで 50 - 60 歳代の女性に好発する難治性疾患であり、皮膚をはじめとする多臓器の線維化や微小血管障害を生じる。発症原因はわかっていない。強皮症には疾患特異的な自己抗体が存在するため、皮膚硬化や特異抗体の出現が診断に有用であり、存在する自己抗体の種類により発症症状がことなり、しかも予後の推定がある程度は可能である。強皮症の特異的抗体として、代表的な以下の抗体が挙げられる。

(1) 抗 DNA トポイソメラーゼ (topo1) 抗体または抗 Scl-70 抗体は全身性強皮症で陽性率が高い。陽性例は皮膚硬化・指先部虚血癩痕・内臓病変・肺線維症と関与しているという報告がある。

(2) 抗セントロメア (CENT) 抗体は、限局性強皮症で 60-90% の陽性率であり高齢発症で高率にみられる。肺線維症・内臓病変は少なく、原発性胆汁性硬化症と自己免疫性肝炎の 60% に抗体がみられる。主要対応抗原は、セントロメア B タンパク質である。その他にも抗 RNA ポリメラーゼ抗体、抗 U1 snRNP 抗体 (日本 34%)、抗 U3snRNP (fibrillarin) 抗体 (4%)、抗 Th/To (RNase p/MRP) 抗体 (3%)、抗 Ku 抗体 (3%)、抗 PM-Scl 抗体など多種の自己抗体が発見されているが、代表的な自己抗体である上記 (1) (2) に着目した。自己抗体が作られる原因として、自己抗原タンパク質が何らかの異常な修飾を受けた結果、抗原タンパク質の機能異常並びに抗原性が生じるのではないかと、という仮説をたてた。今までに、強皮症患者組織において、topo1 の Small ubiquitin related modifier (SUMO) の異常修飾があるという報告や、SLE における u1RNP のリン酸化異常や糖鎖異常などの種々の報告がみられる。

2. 研究の目的

(1) 強皮症における自己抗原タンパク質 (トポイソメラーゼ 並びにセントロメア B タンパク質) の疾患特異的な修飾異常について、プロテオミクス的手法を用いて解析することを目的とした。

(2) さらに、修飾異常が検出された場合、疾患特異的修飾異常がどのようなタンパク質機能異常を生じ病態に関連するのかの解析。

異常修飾による自己抗原性の獲得についての解析。

についての検討を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 検体

全身型強皮症 (topo1 陽性) 患者、限局性強皮症 (CENT 陽性) 患者、健常人サンプルとし

てそれぞれ末梢血を採取した。末梢血より単核球 (PBMC) を分離回収し、単核球細胞をホモジナイズし、PBMC 由来タンパク質を抽出、 -80°C で保存した。また、この際に分離した血清についても同様に回収し、 -80°C にて保存した。

(2) 等電点電気泳動-ウェスタンブロット (IPG-WB)

全身性強皮症、限局性強皮症、健常群の PBMC 由来タンパク質 (各 $n=6$) を抗原タンパク質として等電点電気泳動にてタンパク質を分離した。分離タンパク質を 1 枚の膜に転写し、抗トポイソメラーゼ 抗体、並びに抗セントロメア B 抗体を 1 次抗体としてウェスタンブロット法で検出した。

(3) 二次元電気泳動-ウェスタンブロット (2DE-WB) とタンパク質同定

同様に、PBMC 由来タンパク質 ($n=3$) をミックスし、2次元電気泳動法にて分離し、各々につき抗トポイソメラーゼ 抗体、並びに抗セントロメア B 抗体を 1 次抗体にて WB し、健常人群と比較した。検出したタンパク質スポットの反応強度をタンパク質量で補正し、差異のあったものについて、質量分析器にてタンパク質同定・修飾解析を行った。

(4) 免疫沈降法

PBMC 由来タンパク質を抗原とし、各々につき抗トポイソメラーゼ 抗体、並びに抗セントロメア B 抗体を反応させるとことによって自己抗原タンパク質の回収、同定を試みた。

(5) 患者血清によるウェスタンブロット

PBMC 由来タンパク質を、SDS-PAGE 並びに二次元電気泳動にて分離展開し、一次抗体として個々の対応する患者血清を反応させた。各々の群で、健常人と比較し、検出したタンパク質の差異について解析した。

4. 研究成果

(1) IPG-WB

抗原タンパク質の異常修飾検出のため、タンパク質 ($n=6$) の等電点の差異を比較・検出した。結果、3 群間 (全身性強皮症、限局性強皮症、健常人) の PBMC 由来タンパク質で topo1 並びにセントロメア B の夫々において、3 群間でのタンパク質検出バンドに優位な差は検出しなかった。

(2) 2DE-WB

各群の PBMC タンパク質 ($n=3$) を混合し、2次元に分離、展開したのち WB にて topo1 並びにセントロメア B の検出を行った。各群と健常群について、検出したタンパク質スポットをタンパク質量にて補正し、反応強度の差異を比較した結果、2 群間で WB 検出タンパク質スポットに反応強度に差がみられるタンパク質スポットを検出した。

トポイソメラーゼ タンパク質については、2 DE-WB にて全 12 スポットの反応部位を検出し、2 群間で異なる反応強度を示すタンパク質スポットが 5 スポット得られた(図 1)。異なる反応性をもつ topo1 を検出するため、健常人群と比較して反応強度 2 倍以上(又は 2 倍以下)のスポットにつき質量分析を行った。

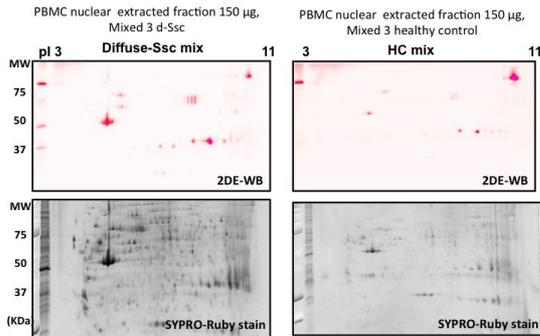


図1. 抗トポイソメラーゼ1抗体による患者由来抗原タンパク質の検出(健常との比較)

いずれも topo1 の同定には至らなかったが 1 スポットで Copper homeostasis protein cutC homolog を同定した。このタンパク質は銅吸収調整に関わるタンパク質であり、少数であるが、クローン病などの消化管病変との関わりにつき報告が認められた。強皮症は消化管蠕動運動異常を来す疾患であることから、Copper homeostasis protein cutC homolog 機能が強皮症に関連するものである可能性は推測されるが、強皮症との関連を示唆する既存の報告はみられなかった。Copper homeostasis protein cutC homolog が、強皮症の自己抗原であるかについては今後の検証が必要である。

同様に、抗 CENTB 抗体を使用し WB を行った結果全 8 スポットを検出し、内、2 群間で 2 倍以上の反応強度が 4 スポットで見られ、同部位につき質量分析を行ったが CENTB の同定には至らなかった。(図 2)

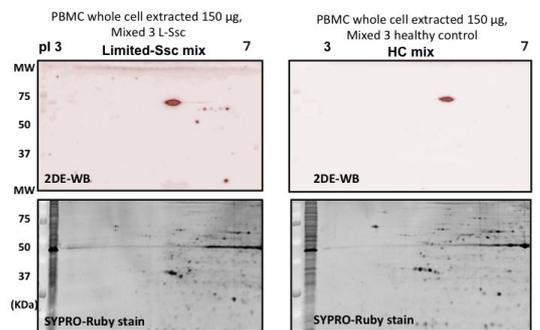


図2. 抗セントロメアB抗体による患者由来抗原タンパク質の検出(健常との比較)

両者ともに、自己抗原タンパク質同定に至らなかった理由として、タンパク質量が質量分析に対して不足していることが考えられた。

(3) 次に、免疫沈降法を利用して、目的と

する自己抗原タンパク質の回収を試みた。免疫沈降法で回収したタンパク質を抽出のうえ、SDS-PAGE にて分離し、WB を行ったが、強皮症群と健常人において、目的タンパク質バンド部位は検出されず、質量解析解析は困難であった。

(4) 患者血清を反応させた WB

以上から、抗 topo1 並びに抗 CENTB による疾患特異的抗原タンパク質の検出が困難であったことから、反応する抗体を血清中自己抗体に変更し解析を行った。SDS-PAGE 並びに 2 次元に抗原タンパク質を展開し、WB の結果を検証した。

SDS-PAGE における WB において、患者 PBMC 由来タンパク質を各々対応した患者血清にて反応させ、健常人 PBMC 由来タンパク質に患者血清と反応させた結果を比較、検討した。結果、

topo1 群 (n=4) においては、目的タンパク質における検出バンドに優位差が認められなかった。(図 3)

セントロメア B 陽性群 (n=3) において、

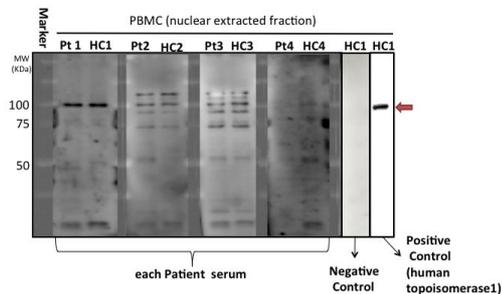


図3. 患者血清によるトポイソメラーゼ1の検出

検出した反応バンドにおいて、個々の症例で健常人群と反応に差が認められたが、群間での差異は認めなかった。(図 4)

次に、全身性強皮症 (topo1) 並びに限局性強皮症 (CENT) 群においても、同様に PBM

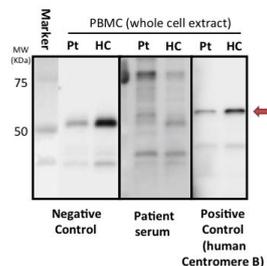


図4. 患者血清によるセントロメアタンパク質の検出(1例)

由来タンパク質を 2 DE に展開し、患者血清による WB を行ったが、非特異的反応が強く検証困難であった。そのため、患者血清から IgG を抽出し、同様に 2 DE-WB を施行するも、結果は同様であった。

現在、セントロメアタンパク質について、検体数を増やして患者血清による反応に群間での差異があるかにつき検討中である。

引用文献

Zhou X, et al. : Arthritis Res Ther. 2011 Aug 9;13(4):R128. Decreased catalytic function with altered sumoylation of DNA topoisomerase I in the nuclei of scleroderma fibroblasts.

Nagai K, et al.: Electrophoresis. 2012 Jul;33(13):2028-35. Altered posttranslational modification on U1 small nuclear ribonucleoprotein 68k in systemic autoimmune diseases detected by 2D Western blot.

Tamby MC, et al. : Autoimmun Rev. 2003 May;2(3):152-7. New insights into the pathogenesis of systemic sclerosis.

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 3 件)

Endo W, Arito M, Sato T, Kurokawa MS, Omoteyama K, Iizuka N, Okamoto K, Suematsu N, Nakamura H, Beppu M, Kato T. Effects of sulfasalazine and tofacitinib on the protein profile of articular chondrocytes. Mod

Rheumatol. 2013 Dec 11. 査読あり。

URL:<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/14397595.2013.864225>

Ando T, Iizuka N, Sato T, Chikada M, Kurokawa MS, Arito M, Okamoto K, Suematsu N, Makuuchi H, Kato T.

Autoantigenicity of carbonic anhydrase 1 in patients with abdominal aortic aneurysm, revealed by proteomic surveillance. Human Immunology

2013; 74: 852-857. 査読あり

URL:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0198885913000748>

Uchida T, Nagai K, Sato T, Iizuka N, Arito M, Takakuwa Y, Nakano H, Ooka S, Kurokawa MS, Suematsu N,

Okamoto K, Ozaki S, Kato T. Comparative proteomic analysis of neutrophils from patients with microscopic polyangiitis and granulomatosis with polyangiitis.

Journal of Proteomics 2013; 91:

259-269. 査読あり。

URL:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0198885913000748>

〔学会発表〕(計 1 件)

Kojima S, Iizuka N, et al. Proteomic analysis of whole glomeruli in patients with IgA nephropathy using micro-sieving. HUPO2013: 2013年9月17日: パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 1 件)

飯塚 進子、加藤智啓、日本臨床社出版、最新関節リウマチ学、2014、223

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
掲載なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯塚 進子 (IIZUKA NOBUKO)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：00348533

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：