

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861645

研究課題名(和文) 眼サルコイドーシスにおける疾患特異的抗原の解明

研究課題名(英文) Investigation of disease specific antigen for ocular sarcoidosis

研究代表者

小嶋 健太郎 (Kojima, Kentaro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40554762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：未知の眼サルコイドーシス特異的抗原の候補タンパク質の探索を目的として、硝子体手術時に得られたサルコイドーシスぶどう膜炎および比較対象として他の非サルコイドーシスぶどう膜炎の硝子体液をプロテオミクスで網羅的に解析した。二群に分けて蛍光二次元ディファレンシャル電気泳動(2D-DIGE)により比較解析を行った結果、合計15個のタンパク質スポットにおいて発現に差が認められた。これらのタンパク質は他のぶどう膜炎と異なりサルコイドーシスぶどう膜炎に特異的に関与するタンパク質であり、さらに詳細に解析することによりサルコイドーシスぶどう膜炎に特異的な抗原を同定できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate unknown disease specific antigen for ocular sarcoidosis, we have analyzed vitreous sample of sarcoidosis and non-sarcoidosis uveitis obtained at the time of vitrectomy surgery using proteomics. By comparing two groups, we were able to elucidate 15 differentially expressed annotated proteins spots, either unregulated or down regulated. These proteins are specific to sarcoidosis uveitis and by further analysis, there is a possibility to identify disease specific antigen for ocular sarcoidosis.

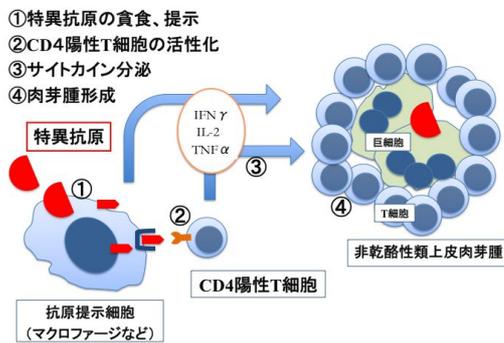
研究分野：眼科学

キーワード：サルコイドーシスぶどう膜炎 プロテオミクス 疾患特異的抗原

1. 研究開始当初の背景

サルコイドーシスは原因不明の全身性肉芽腫疾患であり、肺、心臓、皮膚、眼病変などを呈する。特に日本人では眼病変(眼サルコイドーシス)の頻度が高いことが知られ、虹彩・隅角結節、硝子体混濁、網膜静脈炎など多彩な所見を伴う肉芽腫性ぶどう膜炎を生じる。原田病、ベーチェット病と共に3大ぶどう膜炎を占め、難治例では続発性緑内障や黄斑浮腫により社会的失明にまで至る疾患である。病理学的所見では非乾酪性類上皮肉芽腫を認め、病変部でのCD4陽性T細胞の浸潤が特徴的である。病因としては疾患感受性のある宿主が何らかの抗原物質に暴露された結果、CD4陽性T細胞が活性化しTh1タイプの免疫反応を誘導して肉芽腫が形成されることが分かっているが、疾患特異的な抗原は未だ確定していない(図1)。

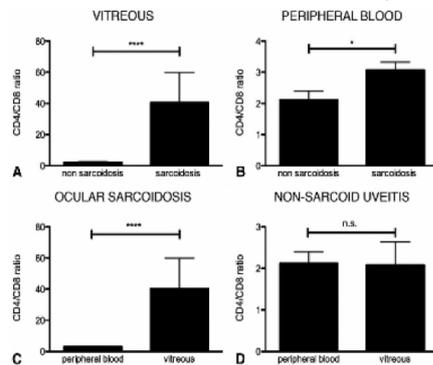
図1: サルコイドーシスの病態



欧米において結核菌や非定型抗酸菌をサルコイドーシスの原因として挙げる報告がある一方で日本ではアクネ菌を原因とする報告があり、結論は出ていないのが現状である。いずれも病変部から菌のDNAが検出されたことを根拠としているが、実際にサルコイドーシスに特異的な抗原を検索した報告は肺病変による1報のみである(Song, et al. J Exp Med. 2005.)。

研究代表者らは、サルコイドーシスぶどう膜炎を含めたぶどう膜炎に対して国内でも有数の手術加療経験があり、京都府立医科大学倫理委員会で承認された臨床研究のもと、患者の同意を得たうえで採取した硝子体サンプルを用いてぶどう膜炎を含め網膜硝子体疾患の病態解明を行っている。その結果、サルコイドーシスぶどう膜炎における硝子体混濁が眼内に浸潤したT細胞であること、またそのT細胞の細胞表面マーカー解析を施行した結果、肺サルコイドーシスの場合と同様に病変部の浸潤T細胞のCD4/CD8比が非サルコイドーシス群に対して有意に高値であることを示し、診断法として有用であることを見出している(図2)(Kojima K, et al. Ophthalmology. 2012.)

図2: サルコイドーシスと非サルコイドーシスにおける眼内浸潤T細胞のCD4/8比



2. 研究の目的

これまでの研究をさらに発展させ、サルコイドーシスぶどう膜炎においてCD4陽性T細胞を活性化させるサルコイドーシスの疾患特異的な抗原を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ぶどう膜炎の硝子体液を用いたプロテオミクスでの網羅的解析によりサルコイドーシスぶどう膜炎特異的な抗原の候補タンパク質の探索を行った。

眼内(硝子体腔内)は通常では外来抗原が存在しない空間であることから、硝子体液は外来抗原の侵入に常に曝されている気管支肺胞洗浄液や末梢血液と比べて雑多な抗原が検出される可能性が低い。すなわちプロテオミクス解析においてノイズが少なく、より信頼性の高い抗原特定が可能であると考えられるため、京都府立医科大学倫理委員会で承認された臨床研究のもと、ぶどう膜炎に対する硝子体手術時に得られた硝子体液を用いて解析した。

International Workshop on Ocular Sarcoidosis (IWOS) で設立された国際診断基準 (Herbert CP, Rao NA, Mochizuki M. Ocul Immunol Inflamm 2009) に基づいた厳格な診断のもと分類されたサルコイドーシスぶどう膜炎8例(サルコイドーシス群)とコントロールとして他のぶどう膜炎4例(非サルコイドーシス群)の硝子体液において2本を合一したミックスサンプルをCy2標識で全ゲルに共通して泳動し、蛍光二次元ディファレンシャル電気泳動(2D-DIGE)を用いてタンパク発現の比較解析を行うことにより2群間で異なる発現をしているタンパク質を検出した。2群の電気泳動ゲルに異なる色をつけた上で重ね合わせることで差が検出された画像の代表を示す(図3)。

統計学的にt検定により発現が2群間でp値が0.05以下でありかつ発現強度が ± 2.0 倍以上を示すものを発現に差があるタンパク質とした。

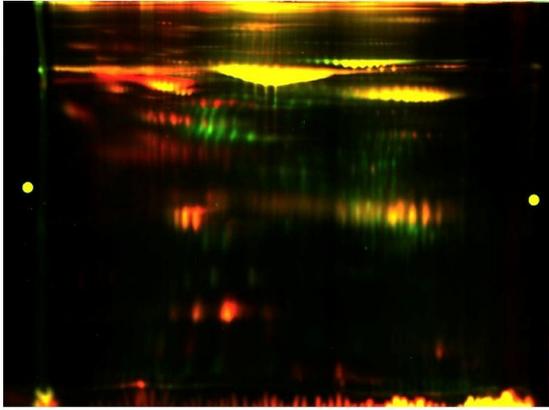


図 3：サルコイドーシス群と非サルコイドーシス群の 2D-DIGE 画像

4. 研究成果

サルコイドーシス群と非サルコイドーシス群の 2 群間の比較解析により合計 15 個のタンパク質スポットにおいて差が認められた。

12 例の硝子体液のタンパク質電気泳動ゲルの画像を示す (図 4)。

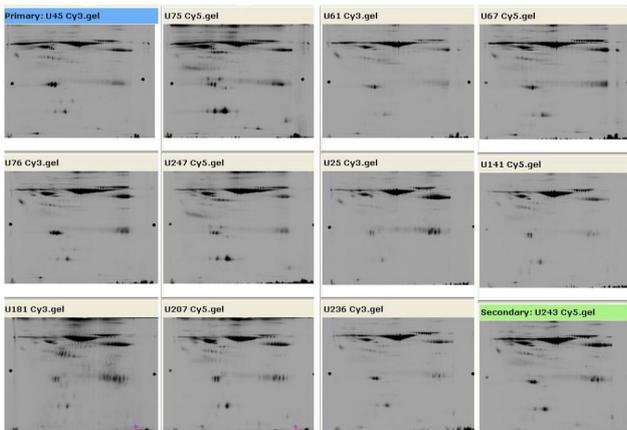


図 4: 12 例のゲル画像

これらを重ね合わせて発現に差があるスポットを分析することにより、合計 15 スポットにおいて差が検出された (図 5、表)。

サルコイドーシス群では 9 スポットで発現上昇、6 スポットで発現の低下を呈していた。代表的な発現上昇を呈したタンパク質スポット 322 (図 6) と 941 (図 7) を示す。

現在これら 15 個の候補タンパク質のスポット切り出しとタンパク質のゲル内消化を行うことによりペプチド化し保存安全性を確保したうえで、次段階である Protein Sequencing によるタンパク質同定を行っており、解析が進むことにより眼サルコイドーシスに特異的な抗原タンパク質を特定できる可能性がある。

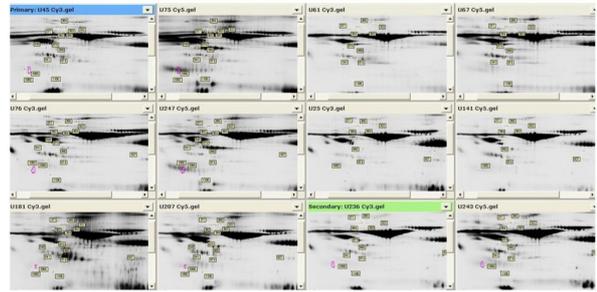


図 5：発現に差があったタンパク質スポット

Master No.	T-test	Av. Ratio in Sarcoidosis
322	0.0015	2.04
377	0.021	2.45
382	0.024	2.55
383	0.032	2.58
384	0.0093	2.82
385	0.016	2.94
848	0.098	-5.23
879	0.0068	-3.75
927	0.0087	-2.19
941	0.043	2.19
960	0.013	2.15
974	0.013	2.15
1066	0.013	-4.56
1082	0.55	-3.79
1106	0.012	-2.29

表：発現に差を認めた 15 の候補タンパク質スポット

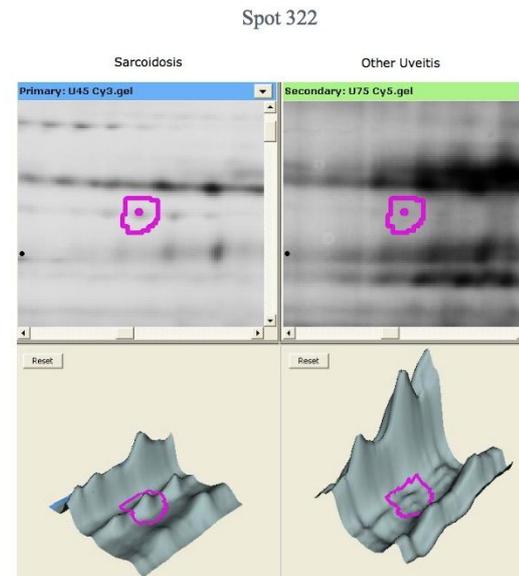


図 6：サルコイドーシス群で発現上昇を呈したスポット 322

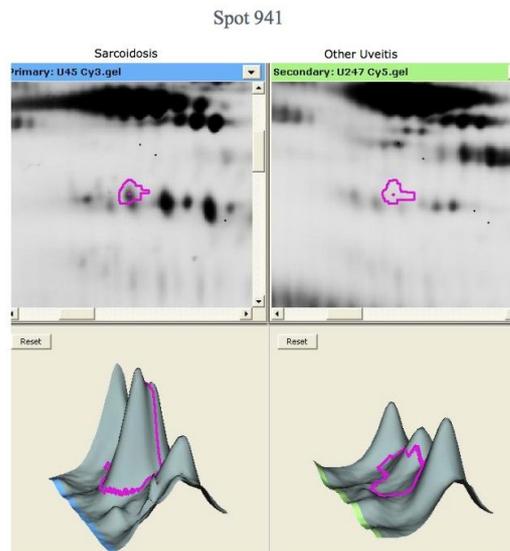


図 5：サルコイドーシス群で発現低下を呈したスポット 941

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)

Maruyama K, Nagata K, Kojima K, Sugita S, Mochizuki M, Kinoshita S.

Intraocular Invasion of Adult T-cell Leukemia Cells without Systemic Symptoms after Cataract Surgery.

Case Rep Ophthalmol 査読有

4 巻、2013 年、p252-256

10.1159/000355486

〔学会発表〕(計 1 件)

Kentaro Kojima.

Diagnostic Vitrectomy for Ocular Sarcoidosis.

Cairo Retina Meeting 2014.

平成 26 年 1 月 2 日

カイロ(エジプト)

〔図書〕(計 1 件)

小嶋健太郎

メジカルビュー社

小切開硝子体手術入門！-これだけわかれば始められる-

2014 年

p113-116, p230, p234-235

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小嶋 健太郎 (KOJIMA, Kentaro)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：40554762

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：