

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：32703

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24107

研究課題名(和文) サリバオミクス解析を用いた唾液シトルリン化関連物質の同定

研究課題名(英文) Identification of salivary citrullination-related substances using salivaomic analysis

研究代表者

坂口 和歌子 (Sakaguchi, Wakako)

神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：50420972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、RAモデルマウスの唾液をプロテオミクスにより網羅的に解析し、RAの病因を病理学的観点からも解明した。RAマウスの足関節H-E染色では、関節破壊と炎症細胞の浸潤が見られた。ウェスタンブロットでは、血清、唾液、足首で46 kDa (A1AT)、55 kDa (CCP) に対応するバンドが検出され、これらのバンドのプロテオミクス分析により、唾液と血清でシトルリン化 A1AT が同定された。A1AT と抗 CCP 抗体による足関節の免疫染色は、滑膜上で強い陽性シグナルを示し、A1AT はタンパク質のシトルリン化に関与しており、RA の発症、重症化に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチ (RA) は病因・病態は未だ解明されておらず、発症の予防や根本的な治療法はまだない。早期に薬物療法を開始することで RA を寛解させ関節破壊を抑制し、機能障害を起こさないようにするには、早期に診断、治療をすることが重要となる。唾液検査は非侵襲的、簡便でスクリーニング検査としても用いやすく、癌や自己免疫疾患など様々な分野で注目されている検査方法で、RA においても疾患特異性の高い自己抗体は疾患診断のためのバイオマーカーとなりうる。これらの背景から、唾液を用いて網羅的に解析することで RA 発症メカニズム、発症に関与する物質の解明し、唾液による新たな診断基盤を形成していく。

研究成果の概要(英文)：In this study, salivary proteins of RA model mice were comprehensively analyzed by proteomics, and the pathogenesis of RA was elucidated from a pathological point of view. H-E staining of the ankle joint of RA model mice showed joint destruction and infiltration of inflammatory cells in the surrounding area. Western blotting detected bands corresponding to 46 kDa (A1AT) and 55 kDa (CCP) in serum, saliva, and ankle, and proteomics analysis of these bands identified citrullinated A1AT in saliva and serum. Immunostaining of the ankle joint with A1AT and anti-CCP antibody shows a strong positive signal on the synovium, and A1AT is involved in protein citrullination and may be involved in the onset and severity of RA.

研究分野：環境病理学

キーワード：関節リウマチ -1 antitripsin(A1AT) 抗CCP抗体 ACPA 唾液検査 DBAマウス

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は病因・病態は未だ解明されておらず、発症の予防や根本的な治療法はまだない。現在、生物学的製剤が続々と開発され骨破壊抑制や寛解導入へ多大な効果を上げているが、これらの治療法を早期に導入することで、RAを寛解させ関節破壊を抑制し、機能障害を起こさないようにする為に、早期に診断をすることが重要となる。

わが国における RA 有病率は 0.6~1.0%、患者数は 60~100 万人と推定される。厚生労働省は、免疫アレルギー疾患を有する患者は、国民のおよそ 30%にのぼると報告しており、1990 年度からリウマチ性疾患について研究事業を開始した。病因及び病態の解明、治療法等の研究の推進を図っており 2015 年国民医療費の概況報告では、RA を含む「筋骨格系及び結合組織の疾患」の医療費は全体の 7.7%を占め、3 番目に多い。そこで RA の発症早期に診断がなされ、適切な治療を早期から実施・継続することにより、重症化を予防することを目標とし、RA 発症のメカニズムの解明、遺伝背景においてハイリスク集団に対して発症前からの医学的介入に関する研究を推進している。RA の自己抗体 ACPA は発症の何年も前から陽性になることが知られており、数年を経て発症するとの報告がある (Kurowska W, et al. Cent Eur J Immunol, 2017, 42; 390-398)。しかし、ACPA の発症機序や動態、タンパクのシトルリン化など自己抗体の産生経緯についてまだ完全に解明されていないのが現状である。

唾液検査は非侵襲的、簡便でスクリーニング検査としても用いやすく、癌や自己免疫疾患など様々な分野で注目されている検査方法で、RAにおいても疾患特異性の高い自己抗体は疾患診断のためのバイオマーカーとなりうる。これらの背景から、唾液を用いたオミックス解析によりシトルリン化関連物質をシトルリン化が進む段階で分析し、自己抗体の産生される前でのRA発症メカニズム、発症に関与する物質の解明することで唾液による新たな診断基盤を形成できると考えた。これまでに、申請者はRAのモデルマウスの唾液中から自己抗体である抗シトルリン化タンパク抗体 (ACPA) が検出されることを報告した。そこで今回、ACPAが産生される前のタンパクのシトルリン化が起こる段階において唾液でシトルリン化関連物質の検出ができるのではないかと仮説を立てた。唾液によるサリバオミックス解析を用いて、シトルリン化関連物質をマッピング解析する。そして、RAの発症メカニズム、新たな診断法の基盤を形成へ導く。

2. 研究の目的

ACPAはシトルリン化されたvimentin、-enolase、fibrinogenなどを抗原とする自己抗体群で、発症前の段階では低力価であり、RA発症直前に、ACPAの力価と親和性が上昇すると考えられている (Willemze A, et al. Nat Rev Rheumatol, 2012, 8: 144-152)。本研究は、唾液中からシトルリン化されたタンパクおよび関連物質を検出し、プロテオーム解析によって得られたRAの病態メカニズムを解明する。これにより唾液による新しい診断基盤を構築し、この結果によって将来的に、唾液による簡易検出法の開発をすることを目指しており、本研究はその予備実験として学術的創造性の高い研究といえる。そして歯科が、全身の健康を守るスクリーニングの場になり、本研究により、歯科と他分野の共同研究の推進をもたらし、医科歯科連携へ繋げていく研究になることを目的にしている。

3. 研究の方法

本研究では、RA モデルマウスの唾液タンパク質をプロテオミクスにより網羅的に解析し、病理学的な視点からも含めて RA の病因を解明した。今回の実験では、DBA マウスを使用した。このマウスは、マウスに型コラーゲンを投与することで関節炎モデルが形成される。その中で、重度 RA マウス、軽度 RA マウス、コントロール群の3つに分類した。マウスの4肢の足関節の腫脹を毎日計測し、関節炎指数を算出した。麻酔下にマウスから血清、唾液、および足首の関節をサンプリングし、足関節は micro CT で炎症や関節の変形などを確認した。Western blotting で得られた、ゲル片をプロテオーム解析することで血清、唾液、足関節中のシトルリン化タンパクの同定を行った。また抗 CCP 抗体の定量のため、血清、唾液、足関節のサンプルを ELISA 法で定量化した。さらに、足関節および顎下腺を H-E 染色および抗 CCP 抗体、Anti 1-antitripsin 抗体による免疫染色を行い、病理組織学的側面からも病態の解析を行った。

4. 研究成果

RA モデルマウスの足関節は腫脹を認め、関節炎指数を計測したところ、重度 RA 群は軽度より優位に高かった。Micro CT でも重度 RA 群は足骨の関節部分が一部変形し、骨の非薄化を認めた。H-E 染色では関節の破壊および周囲に炎症細胞の浸潤を認め、これらの炎症細胞は、コントロール群では認めなかった。Western blotting では、血清、唾液、および足首関節で 46 kDa および 55kDa(CCP)に対応するバンドが検出された。その部分をプロテオーム解析したところ、重度 RA モデルマウスの唾液と血清でシトルリン化した A1AT が同定された(図1)。A1AT および抗 CCP 抗体による足首関節の免疫染色では、関節滑膜に強い陽性シグナルが示された(図2)。また、唾液腺では陽性シグナルは認められず、唾液腺自体は抗体産生に関与しておらず、足関節で慢性炎症が起き、タンパクがシトルリン化、そしてシトルリン化したタンパクが血流に流れ、唾液中へ流出したと考えられる。A1AT は、環状シトルリン化ペプチド抗体と同様に、RA モデルマウスのタンパク質のシトルリン化に関与しており、RA の発症と重症度に関与している可能性が考えられた。今後、ヒトによる臨床実験を行い、さまざまなシトルリン化タンパクを唾液から同定することで、疾患の発症予測や因子を持っていることを早めに確認することができる、そして早期発見や関節の変形などを認める前に早期治療ができ、重症化予防に繋がる可能性が示唆された。



図1 プロテオーム解析の結果。46kDa (A1AT)の血清、唾液中からシトルリン化タンパクが検出された。赤丸部にシトルリン化が認められる。

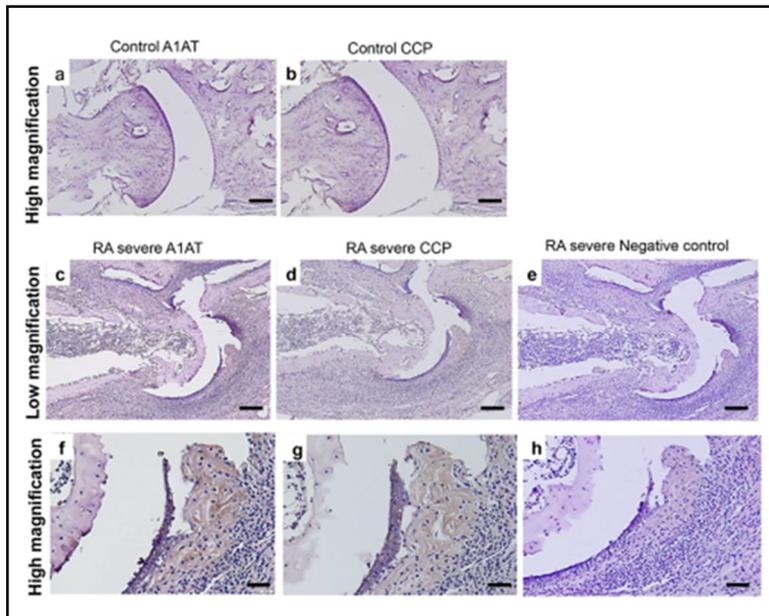


図2 免疫染色の結果。a:control 群 A1AT による染色、b:control 群 CCP による染色
 c, f: RA 群 A1AT による染色、d, g: RA 群 CCP による染色、e, h: Negative control
 f, g では関節滑膜に陽性シグナルを認める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Sakaguchi W, To M, Yamamoto Y, Inaba K, Yakeishi M, Saruta J, Fuchida S, Hamada N, Tsukinoki K	4. 巻 108
2. 論文標題 Detection of anti-citrullinated protein antibody (ACPA) in saliva for rheumatoid arthritis using DBA mice infected with Porphyromonas gingivalis. Archives of Oral Biology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.archoralbio.2019.104510, 2019.	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂口 和歌子
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis感染DBAマウスにおける唾液中ACPA検出の検討
3. 学会等名 秋季 日本歯周病学会学術大会
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
---------	---------