

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791002

研究課題名(和文) 全身型若年性特発性関節炎におけるバイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Exploration of disease-specific biomarker in systemic juvenile idiopathic arthritis.

研究代表者

青山 三智子 (AOYAMA MICHIKO)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：40363981

研究成果の概要(和文)：全身型若年性特発性関節炎(JIA)の血清診断を目的に、疾患特異的バイオマーカーの探索を行った。ネイティブPAGEを組み合わせた二次元電気泳動法でプロファイリングを行い、鉄代謝関連蛋白、リポ蛋白、免疫関連分子等の発現を認めたが、発現パターンは他の発熱性疾患と類似していた。全身型JIAではHp2-2型ハプトグロビン遺伝子型を示し、トランスサイレチン関連蛋白複合体のコンポーネントが異なっていた。その詳細を検討しバイオマーカーを明らかにする予定である。

研究成果の概要(英文)：Diagnostic biomarker in systemic juvenile arthritis (sJIA) remains to be elucidated. An exploration of disease-specific marker in sJIA was conducted with a native PAGE-combined 2-DE. Peptide mapping with sera from 4 sJIA patients revealed several spots such as iron-related proteins, lipoproteins, complements, globulin-related molecules, which were similar in profiling pattern to the control samples from febrile patients. Haptoglobin 2-2 genotype was uniformly detected in sJIA sera. A unique transthyretin-combined protein complex was also profiled in sJIA sera. These results might be a breakthrough in establishing sJIA-specific biomarker.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：全身型若年性特発性関節炎、プロテオミクス、ネイティブPAGE

1. 研究開始当初の背景

小児発熱性疾患の原因は多岐にわたる。多くは急性で良性の経過をとるが、慢性あるいは再発性でまれに致死的経過をとる疾患が含まれており、予後不良な疾患群を早期に鑑別、治療することは大変重要である。若年性特発性関節炎（JIA と略する）は15歳以下に生じる原因不明の疾患である。その中で発熱を主徴とする全身型JIAは不明熱と初期診断される場合がほとんどで、JIAの治療開始が遅れ関節および生命予後を悪化させる可能性が高い。特にマクロファージ活性化症候群（MAS）合併例では致死率が10-25%と高いがその予知はいまだ不可能である。MASの誘因に解熱薬等の薬剤の関与が疑われていることから、不明熱症例において全身型JIAを的確に早期に鑑別、早期に適正な治療を行うことが重要であり、診断に有用なバイオマーカーが望まれてきた。

2. 研究の目的

JIAの原因は免疫学的遺伝素因、感染症あるいは自己抗原、自己炎症反応など想定されてきたがいまだ不明であり、病因論に基づいたバイオマーカーは見つかっていない。一方、その病態には高サイトカイン血症が関与しているが、サイトカインそのものの疾患特異性は低いためバイオマーカーとしての意義は見いだせない。加えてマイクロアレイ法などによるゲノムレベルでの解析でも多くの選定された分子は炎症等に関与する蛋白に過ぎず、疾患特異的バイオマーカーは不明である。そのような現状で、我々は臨床応用を前提とした全身型JIAの疾患特異的バイオマーカーをプロテオミクスの手法を用いて検索する。血清を試料とし、単純に分子選定を目的とするのではなく、生体内活性体として

機能している複合体の存在様式からバイオマーカーの候補を選定する。

3. 研究の方法

生体試料を用いた蛋白レベルのバイオマーカー探索は臨床プロテオミクスとして現在広く検討されている。その多くは従来型二次元電気泳動を用い、単一分子の選定を目的としたものであった。しかしこの方法はメジャー蛋白が除去されること、変性状態での分子解析であることなど結果をそのまま臨床に翻訳することは難しい。ブルーネイティブPAGE法は蛋白を生理的条件に近い状態で解析する方法である。より生理的な状態にある蛋白を分析できることにより、多量体構造をとる蛋白群やメジャー分子を含め複合体形成に関与する分子群を検出できること、疎水性蛋白の分離に効果的であることなどの利点があり、今回この方法を解析方法に選んだ。解析には、研究利用の同意を倫理委員会の定める書式で得た患者および対照者（発熱性疾患患者）由来の血清を用いた。

ブルーネイティブ PAGE

クマシーブリリアントブルー（CBB）を Charge-shift molecule に使い、ゲル上で分子群の発現を可視化する方法である。インビトロジェン社製 Coomassie G-250 を用い、Bis Tris-Tricine 系の支持体-泳動バッファの組み合わせで中性 pH 条件下に一次元目の泳動を行う。血清を試料としているため界面活性剤等可溶剤の添加は行わない。サンプルバッファはインビトロジェン社製 NativePAGE サンプルバッファを使用し、試料は還元剤添加や加熱処理をせずアプライする。ゲルは3-12%の Gradient ゲルを用い、室温条件下で150Vの定電圧で泳動を行

う。予備実験の段階で一次泳動後のバンドのシャープさをメタノール固定後脱色して判定し、アプライする血清の容量あるいは蛋白量、G-250 添加量、泳動時間を適正化する。泳動の終わったゲルは乾燥しないよう手早く泳動バッファーに浸しながらレーン毎に切り分け、湿潤の状態でサランラップに包んで-80℃保存する。もし速やかに二次元目の泳動へ進む場合は SDS 処理へと進む。

SDS-PAGE (二次元泳動)

一次泳動の後、レーン毎に切り分けたゲルストリップを SDS-PAGE の前処理として SDS 処理、ジメチルアクリルアミドでアルキル化する。二次元目の泳動は常法に従い SDS ランニングバッファーで 250V の定電圧で行う。二次元泳動後のゲルは銀染色および SYPRO Ruby 染色し、ゲル上でスポットを確認する。スポットを確認したゲルは Bio-Rad 社のイメージアナライザーで二次元マップとして画像として取り込み、後のペプチド解析結果から定義付け可能なプラットフォームとして保存する。

ゲル内消化~MALDI-TOF 質量分析

二次元マップ上認められた全てのスポットを Spot Cutter を用いて切り出し、スポット毎にチューブ内に移す。そのゲル片を還元化、アルキル化した上でトリプシン消化液に浸しオーバーナイトインキュベートする。インキュベート後のトリプシン液 1 μL を MALDI ターゲットプレートに載せ、マトリックス液と混和する。混和後のプレートを本学中央研究室研究機器センター遺伝子構造解析室の MALDI-TOF/MS 質量分析計 (Autoflex II, BRUCKER DALTONICS 社) を用いて質量分析し、各々のピーク値につい

て ClinProtTools™ (BRUCKER DALTONICS 社) でデータ解析を行う。MASCOT サーチからペプチド断片を選定、最終的に各スポットのペプチドマップの構築を行う。

4. 研究成果

臨床プロテオミクスの一つとして、ヒト血清 1μL を用いてブルーネイティブ PAGE→SDS-PAGE の二次元電気泳動を行い、多数のペプチドスポットを確認、それらのプロファイリングに成功した。これは糖尿病患者に関する解析に次ぐヒト血清を試料とした検討で、テクニカルにブルーネイティブ PAGE を用いた臨床プロテオミクスが解析可能であることを追試的に証明した研究である。

血清分子マップの作成

患者血清を用いた解析では、鉄代謝に関わる蛋白群、脂質代謝に関わるリポ蛋白、補体やグロブリンなど免疫関連分子等の発現をみとめた。その発現パターンは対照群である発熱性疾患患者のパターンと似通っていた。

今回解析した全身型 JIA 患者全例はハプトグロビン遺伝子型が Hp2-2 であることが判明した。ハプトグロビン遺伝子多型は糖尿病や動脈硬化、薬物代謝などの罹患リスクにかかわることが示されており、全身型 JIA の罹患リスクに影響する可能性が示唆された。また川崎病においてはハプトグロビン多型が急性炎症性蛋白である CRP の血清値に強く関連することが報告されており、全身型 JIA の病態そのものに関連している可能性があると考えられた。

一次元泳動で最も泳動度が大きいポジションに全身型 JIA 患者血清ではトランスサイレチンのスポットを認めた。これらは対照群である発熱性疾患患者血清では急性期には

認めず、回復期にのみ認められ、明らかに差異のあった所見である。一方、免疫比色法で測定した血清トランスサイレチン値は全身型 JIA と他の発熱性疾患では有意差を認めなかった。これらのことはトランスサイレチンが構成する蛋白複合体が全身型 JIA と他の発熱性疾患では異なることを意味する。トランスサイレチンは **multifunctional protein** としてレチノールの全身への供給のみならず甲状腺ホルモンの蛋白結合にも関与することが知られている。全身型 JIA でのトランスサイレチンの関与する蛋白複合体を解析することで、全身型 JIA 特有の炎症のメカニズムを解明できる可能性があり、かつ JIA 特異的炎症バイオマーカーを提唱できると考えられ、引き続き複合体解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青山 三智子 (AOYAMA MICHIKO)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：40363981