

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)  
 研究期間： 2007~2008  
 課題番号： 19591828  
 研究課題名 (和文) 関節炎における疼痛制御物質とアミロイドのプロテオーム解析  
 および診断への応用  
 研究課題名 (英文) Proteomic analysis of pain-regulated and amyloid components  
 in cerebrospinal fluid of patients with rheumatoid arthritis  
 研究代表者  
 山本 行男 (YAMAMOTO YUKIO)  
 財団法人 東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主任研究員  
 研究者番号：80124501

研究成果の概要： 疼痛関連物質候補の一つとしてリポカリン型プロスタグランジン合成酵素 (L-PGDS) を見いだした。関節炎 (RA) の脊髄液に存在する L-PGDS 産生物質 PGD<sub>2</sub> と、その非酵素的代謝物 (15d-PGJ<sub>2</sub>) を定量化したところ、コントロールと比較して両物質の産生レベルが減少していた。この要因として、免疫沈降実験により、L-PGDS と他の蛋白質成分との会合が認められた。RA の L-PGDS は、何らかの要因で蛋白質の変性を生じ酵素活性の低下を招いていると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔

キーワード：関節炎、脊髄液、L-PGDS、蛋白質変成、免疫沈降

## 1. 研究開始当初の背景

(1)本研究は、プロテオミクスという新しい解析法により、関節炎患者の疼痛制御物質を探索し動態解析すること、またアミロイドーシス病態への悪性化を早期に発見する診断法を確立することを目的とした。研究対象とする関節炎は、結合組織を侵す全身性の免疫疾患であり、関節炎が主たる臨床症状である。多数の関節で関節炎を伴い、特に手足の関節にみられる関節軟部組織の肥厚を生じ軟骨を浸食する。更に、大きな特徴として変成蛋白質による反応性アミロイド症を生じ、ネフローゼ症候群や血管への浸潤による出血などの臨床症状を呈する。この症状は、頻度は

そう高くないが、10代の若年から認められ、合併症を生じると非常に予後が悪くなり死に至る確立が増す。そのため、早期の発見が重篤な症状を阻止するうえで重要な課題となっている。この課題に対して、より効果的な治療を目指した遺伝子レベルでの解明の動きがある。患者一人一人の遺伝子配列に基づく、いわゆる「オーダーメイド医療」は、現行の投薬治療の効率化を目指したものである。しかし、遺伝子産物が、病態下にいつどのように機能するかは判らない。その意味で、患者の現在の姿を蛋白質レベルで解析することは、よりの確な医療を可能とする、Evidence Based Medicine に繋がるもので、

患者の将来の病態像を予測する手段としても、本解析が大いに役立つことが期待される。

(2)本研究の構想に至る経過として、次の研究成果の上に成り立っている。我々は、疼痛制御物質・enkephalinの代謝阻害物質であるスピノルフィン (Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr : 分子量 876, 以下 spinorphin) を脊髄に見だし、ブラジキニンによる末梢の痛みに対する鎮痛活性を生理的な濃度で有することを明らかにしてきた (Peptide, 2000)。その効果は百日咳毒素処理に非感受性であり、本物質がG蛋白質を介さない新たな情報伝達機構に関与している可能性があると考えている。一方、本物質は、enkephalin代謝酵素を発現する好中球の機能を阻害し、更にカラゲニンで惹起したマウス急性炎症モデル系での好中球集積を有意に抑制することも明らかにしている (Biochem. Pharmacol., 1997; Life Science, 1998)。この好中球機能の抑制効果は、spinorphinが刺激剤 (FMLF) の細胞表面レセプター (FPR) への結合阻害に由来していることが分かった。更に、最近FPRのサブタイプ (FPRとFPRL1) の存在が明らかになったが、spinorphinは感染症に関与する低親和性のFPRL1に対するアンタゴニストであることも分かった (J. Immunol., 2001)。

(3)このような基礎データをもとに、生体における本物質の役割へと焦点を移し、全身性の炎症病態である関節リウマチ (RA) 患者からの体液 (関節液および脊髄液) において、本物質の動態を解析することにした。RAサンプルにおいて、spinorphinレベルはコントロールと比較して有意に高値を示すようになり、それと反比例して本物質の代謝酵素である dipeptidyl peptidase III (DPPIII) の活性が低下することが分かった (Pain Research, 2005; ペインクリニック, 2005)。本酵素はenkephalin代謝酵素の一つであり、ブラジキニン発痛系において、本酵素の阻害物質が痛み刺激を抑制することにより、鎮痛作用に関与する可能性が考えられる。また、本酵素は侵害刺激の伝達経路である脊髄後角の中心管周辺にある浅層と上衣細胞に強く発現することからも、痛み刺激の伝達に関与している可能性が示唆された (Peptides, 2003)。このような背景により、慢性炎症かつ疼痛病態の慢性関節リウマチを対象として、アミロイドと疼痛制御物質の解析を開始した。これまでに、二次元電気泳動を用いた差異解析により、疼痛関連物質やアミロイド物質の動態を発見している。

## 2. 研究の目的

(1)本研究は、関節炎患者の疼痛病態を把握

する手段として、より客観的な指標となる体液中成分の同定とその動態を解析すること、また時として関節炎と合併して病態の悪化を引き起こすアミロイド症への予測を解析することを目的とし、最終的には、新たな総合的診断導入の可能性を探るものである。

(2)本研究の基盤となる蛋白質解析技術 (プロテオミクス) は、生体の機能分子である蛋白質の大規模解析を可能とし、癌をはじめとする疾患の早期診断や病因の解明、更に、治療に結びつける創薬研究へと応用が広がっている。多くの疾患は、その要因となる代謝やシグナル伝達などの細胞内プロセスに関わる蛋白質機能の変化が発症の直接の引き金となっていることが予想され、蛋白質レベルの解析を行うことがきわめて重要である。本法は、高感度でハイスループット、かつ網羅的な解析が可能となり、広範な材料に応用され、新たな疾患マーカーの候補も見いだされている。本研究課題は、この技術を多いに活用して、慢性炎症かつ疼痛病態の慢性関節リウマチを対象として、疼痛制御物質とアミロイドの解析および診断へ応用することを目的としている。

## 3. 研究の方法

(1) 脊髄液サンプル中における病態関連蛋白質の探索と同定

①前処理: 脊髄液中に豊富に存在するアルブミンとイムノグロブリンを市販キット (GE Healthcare) により除去した。残りの成分をトリクロロ酢酸で沈殿濃縮し、冷アセトンで数回洗浄後、可溶化した。

②電気泳動: 可溶化サンプルは一次元に等電点電気泳動を、二次元にSDS電気泳動を行い蛋白質成分を分離した。

③蛋白質解析: 泳動プロファイルは、解析ソフト (Decyder v6, Phoretix 2D) を用いて、コントロールとの差異解析を行った。

④質量分析・同定: 有意な発現差異を示すゲルスポットから蛋白質成分を抽出し、MALDI-TOF-MS/MS 質量分析を行い、Mascot 解析により同定した。

(2) 疼痛関連物質の動態解析

免疫抗体法: PGD<sub>2</sub>, 15d-PGJ<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> の産生レベルは、市販キットにより定量化した (Cayman Chemical Co., Assay Design Inc.)。

(3) 病態におけるアミロイド様蛋白質の同定

①ウェスタンブロッティング: 脊髄液中の蛋白質を酸処理し、更にアセトン洗浄して濃縮後可溶化した。一次元・二次元電気泳動後、PVDF膜へ転写しプロットを作成した。プロットをスキムミルクでブロック後、L-PGDSモノ

クローナル抗体 (Cayman Chemical Co.) と反応させた。二次抗体で処理後、Enhanced Chemi Luminescence 溶液と反応させ蛋白質を検出した。

②免疫沈降実験：脊髄液をまず Protein G-agarose と反応させ非特異的結合成分を除去した。次いで、遠心後の上清に L-PGDS 抗モノクローナル抗体および protein G-agarose との反応において特異的結合成分を捕捉した。充分洗浄後、泳動用の緩衝液に懸濁させ、100°C 3 分加熱させて、結合成分を分離抽出した。本成分は、SDS 電気泳動を行い転写プロットを作成し、上記ウエスタンブロット法に準じて分析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 関節炎の脊髄液における発現変動蛋白質の探索

研究対象とする関節リウマチは、結合組織を侵す全身性の免疫疾患であり、関節炎が主たる臨床症状である。その他、特徴的な症状として関節の慢性的な痛みを生じる。今回、患者の脊髄液中に存在する蛋白質の動態を解析し、痛みの発現に関連する成分を探索することにした。患者サンプルを前処理し、二次元電気泳動を行い、銀染色あるいは蛍光標識にて可視化し、コントロールとの差異解析から、幾つかの発現変動蛋白質を見出した。それらの蛋白質から、疼痛関連物質として報告されている lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) に着目した。

(2) 本物質は神経因性疼痛に分類されるアロディニア (異痛症) の病態発現に関与する物質である。関節リウマチ (RA) の脊髄液中に存在する L-PGDS 産生物質 PGD<sub>2</sub> と、その非酵素的代謝物 (15d-PGJ<sub>2</sub>) を定量化し、本酵素の動態を分析した。L-PGDS は見かけの発現量が增大しているにもかかわらず、その酵素活性がコントロール群と比較し、RA 群において減少していることが認められた。

(3) 酵素活性低下の要因として、RA 患者の脊髄液中に存在する L-PGDS が蛋白質変成を生じている可能性を検討した。患者脊髄液中の蛋白質を前処理したサンプルの転写プロットと抗 L-PGDS モノクローナル抗体との反応は、26 kD の単量体と高分子側にバンドを見出した。更に、患者脊髄液と特異抗体との反応から得られた免疫沈降物を分析すると、上記と同様の高分子成分が認められた。そこで、電気泳動後の本成分をゲルから抽出し、トリプシン処理を行い質量分析計にて測定した。Mascot 解析から、本物質は  $\alpha$ -1 antitrypsin であることが同定された。

本研究により、全身性の免疫疾患で疼痛病態である RA において、疼痛制御物質候補

L-PGDS は、 $\alpha$ -1 antitrypsin との会合により蛋白質の変性を生じ酵素活性の低下を生じている可能性が考えられ、今後病態との関連性を追究していく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Kubo, H., Kotani, M., Yamamoto, Y., Hazato, T. : Involvement of sperm protease in the binding of sperm to the vitelline envelope in *Xenopus laevis*. Zool. Sci., 25 : 80-87, 2008
- ② 林健児、山本行男、伊藤雄策、岡崎敦、羽里忠彦 : 脊髄由来のプロテアーゼ阻害物質 spinorphin の疼痛時における動態. ペインクリニック, 29 : 207-210, 2008
- ③ 鈴木恵子、山本行男、羽里忠彦、稲田英一、宮崎東洋 : 周術期アミノペプチダーゼ M の動態. ペインクリニック, 28 : 1615-1619, 2007

[学会発表] (計 13 件)

- ① 山本行男、佐藤洋、久保英夫、芦野洋美、木村光兵 : 神経ブロックによる疼痛管理における直腸がん患者の脊髄液プロテオーム解析. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会, 2008. 12. 9-12. 神戸.
- ② 芦野洋美、鈴木直子、小野富男、山本行男、島村眞里子 : カルパインの阻害による血管腔形成の制御. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会, 2008. 12. 9-12. 神戸.
- ③ Yamamoto, Y., Akita, Y., Shimamura, M., Sato, H., Fukasaku, S., Aritake, K. : Changes in levels of prostaglandin D<sub>2</sub> metabolite in cerebrospinal fluids of rheumatoid patients. 7<sup>th</sup> Annual World Congress Human Proteome Organization (HUPO) 2008, 2008. 8. 16-20, Amsterdam (Netherlands).
- ④ 山本行男、平松恭子、高橋慶一、山岡和子、秋田朗子 : 大腸癌における尿プロテオーム解析による病態マーカーの探索 : 第二報. 日本ヒトプロテオーム機構第 6 回大会, 2008. 7. 29-30. 大阪.
- ⑤ 山岡和子、三島一彦、松谷雅生、西川亮、山本行男、廣井隆親 : グリオーマの分子病態マーカーの探索. 日本ヒトプロテオーム機構第 6 回大会, 2008. 7. 29-30. 大阪.
- ⑥ 中村里依太、木村光兵、佐藤洋、鈴木尚生子、佐藤和恵、山本行男 : 疼痛患者の

脊髄液におけるL-PGDSとその代謝産物の動態に関する検討. 日本麻酔科学会第55回学術集会. 2008. 5. 12-14. 横浜.

- ⑦ 山本行男、佐藤洋、岡崎敦、林健児、西村欣也、久保英夫、島村真里子、秋田朗子：変形性関節症および関節リウマチ患者の脊髄液におけるPGE<sub>2</sub>およびPGD<sub>2</sub>の動態. 第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学大会, 2007. 12. 11-15, 横浜.
- ⑧ 秋田朗子、大海忍、福田宏之、川崎博史、山本行男、大野茂男、平野久、小野功貴、米川博通：ラット下垂体由来GH細胞においてTRH刺激で活性化されたPKC $\epsilon$ はケラチン8のSer8とSer23をリン酸化する. 第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学大会, 2007. 12. 11-15, 横浜.
- ⑨ 島村真里子、芦野洋美、飯郷正明、山本行男：ジペプチドL-carnosineによる血管新生の阻害と抗腫瘍作用. 第15回日本血管生物医学学会学術大会, 2007. 11. 29-30, 福岡.
- ⑩ Shimamura, M., Ashino, H., Shimizu, M., Yamamoto, Y., Minamikawa-Tachino, R., Takahashi, S.: L-carnosine, an endogenous bioactive dipeptide inhibits angiogenesis and tumor metastasis. The 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2007. 10. 3-5, Yokohama.
- ⑪ 山岡和子、三島一彦、西川亮、松谷雅生、秋田朗子、山本行男、廣井隆親：ヒトグリオーマの悪性化に関与するチロシンリン酸化蛋白質の検索. 日本ヒトプロテオーム機構 第5回大会, 2007. 7. 30-31, 東京.
- ⑫ 山本行男、高橋慶一、佐藤功栄、平松恭子、山岡和子、島村真里子、久保英夫、秋田朗子：大腸癌における尿プロテオーム解析(第一報) 解析条件の基礎的検討. 日本ヒトプロテオーム機構 第5回大会, 2007. 7. 30-31, 東京.
- ⑬ 東賢志、佐藤洋、木村光兵、秋田朗子、山本行男：脊髄液における疼痛関連物質の動態解析. 日本麻酔科学会第54回学術集会, 2007. 5. 31-6. 2, 札幌.

[その他]

ホームページ

<http://www.rinshoken.or.jp/database/yyama.pdf>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 行男 (YAMAMOTO YUKIO)

財団法人 東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主任研究員  
研究者番号：80124501

### (2) 研究分担者

秋田 朗子 (AKITA YOSHIKO)

財団法人 東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主任研究員  
研究者番号：40124432

山岡 和子 (YAMAOKA KAZUKO)

財団法人 東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主任研究員  
研究者番号：00124438

西村 欣也 (NISHIMURA KINYA)

順天堂大学・医学部・麻酔科学ペインクリニック講座・准教授  
研究者番号：80164581

高橋 慶一 (TAKAHASHI KEIICHI)

都立駒込病院・大腸外科・部長  
研究者番号：60443115

久保 英夫 (KUBO HIDEO)

財団法人 東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・研究員  
研究者番号：50178034