

平成21年 6月 4日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591845

研究課題名(和文) 間質性膀胱炎に関する自己抗体の研究

研究課題名(英文) Study of autoantibody in interstitial cystitis

研究代表者

成田 充弘 (NARITA MISTUHIRO)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：00263046

研究成果の概要：

間質性膀胱炎ではウロプラキン (UP) III 遺伝子のエクソン4を欠失した選択的スプライシングバリエーションが重要である。この遺伝子ではエクソン4欠失部分以降のフレームシフトにより、正常には存在しないアミノ酸配列の蛋白質になる。この「異物蛋白質」に対する自己抗体の有無を調べるため、遺伝子操作により変異 UP III 蛋白質を作製した。患者血清を一次抗体とし、作製された遺伝子組み換え UP III 蛋白質を試料にしたウェスタンブロットで、一部の患者血清で反応性があった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
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・泌尿器科学

キーワード：間質性膀胱炎、自己抗体、プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

当該疾患には何らかの免疫異常が関与していることが示唆されており、現実にはステロイド剤や抗アレルギー剤の効果が見られることがある。そこで、われわれは患者血清中の尿路上皮成分に対する自己抗体について研究してみることにした。

2. 研究の目的

間質性膀胱炎 (IC) は、米国では約100万人の患者が存在するとされる。自殺を考えるほどの膀胱痛と頻尿のため、その治療薬の開発は急務で、複数の製薬会社が懸命にプロジェクトを進めている。しかし現実には、確定診断・治療に至る前の簡便なスクリーニング検査法が存在しないことが大きな障害になっている。当研究課題の目的は、①間質性膀胱炎患者血清中の尿路上皮

成分に対する自己抗体を証明する、②自己抗体が認識する抗原を同定する、③簡便な検査スクリーニングに対応抗原を利用できるか検討する、である。

3. 研究の方法

1) 臨床検体（血清・自然排泄尿・組織）の収集・保存

検体を得る患者には臨床材料の当該研究への使用につき十分な説明を行い、同意を得る。間質性膀胱炎患者および対照者の血清や自然排泄尿や組織を採取・保存する。確定診断名、検尿所見、他の診断法の結果も併せて記録する。

2) 患者血清を一次抗体とする免疫クロマトグラフィによる反応抗原の分離精製
抗ヒト免疫グロブリンビーズに患者血清に含有される抗体を結合させた抗ヒト蛋白質精製カラムを作製し、このカラムによって、膀胱粘膜組織抽出液から関連蛋白質を精製する。次に、二次元電気泳動または液相クロマトグラフィによって、分子量や等電点の違いから適度に蛋白質を分離・分散させ、質量分析装置を用いて各ポリペプチドの一次構造を決定する。一群の蛋白質を同定することによって、当該疾患に関係の深い標的蛋白質を類推することができる。

3) 患者血清を一次抗体とする二次元電気泳動 (2DE) ウェスタンブロッティング
上記2の実験手技では、蛋白質の同定段階もさることながら、実は、膀胱粘膜組織の可溶化が最大の難関である。可溶化には様々な界面活性剤が試用されるが、多くの抗原 (抗原決定基) は程度の差こそあれ、界面活性剤による変性を当然のように受ける。したがって、いかに抗原抗体反応に対する影響が少ない試薬を選定するかが、実験成功の鍵となる。このステップは、経験と勘によるトライアンドエラーで克服するしか現実の解決手段はない。逆に、通常のウェスタンブロッティングでは条件検討されることなく界面活性剤として SDS が画一的に用いられ、組織は可溶化される。そして二次元電気泳動で分子量と等電点で二次元に展開されるわけだが、一旦可溶化された後、ウェスタンブロッティングとして抗原抗体反応をさせる前に、十分に洗浄して抗原抗体反応の障害となる SDS を可及的に除去することが重要である。この

ようにして、上記2とは若干異なる条件で、自己抗体の対応抗原を探索することが必要であると思われる。

4. 研究成果

これまでの研究から、間質性膀胱炎ではウロプラキシン (UP) III 遺伝子のエクソン4を欠失した選択的スプライシングバリエントが非常に重要であることが明らかになっている。このバリエント UP III 遺伝子ではエクソン4欠失部分以降でフレームシフトが起きる結果、正常には存在しないアミノ酸配列の蛋白質になる。このような「異物蛋白質」に対して自己抗体が産生されても不思議ではないため、検証材料として、まず当該変異 UP III 蛋白質を作製することとした。

この異常蛋白質を調製すべく、NM_006953 cds1-864 (864bp) をヒト成人正常膀胱組織由来 cDNA を template として PCR 反応を行い、目的の UP III 遺伝子を含むフラグメントを調製した。増幅した PCR フラグメントは、末端に付加した制限酵素による切断を行い、同様の制限酵素で処理した pET28a ベクター (novagen) にクローニングし、ワンパスシークエンス解析によりクローニング領域に関して、配列情報と同一であることを確認した。完成した pET28a-UP3 plasmidDNA を template に、エクソン4部分 (489-571) を除くべく、reverse-primer (488-460)、forward-primer (572-600) を用いて inversePCR を行うことでエクソン4欠損 pET28a-UP3delta4 ができた。配列確認されたクローンを BL21 (DE3) RIL に transform し少量培養およびバッチ精製した。大量培養後、Ni カラムで精製し、SDS-PAGE により精製度合いを確認した。患者血清を一次抗体とし、作製された遺伝子組み換え UP III 蛋白質を対象にウェスタンブロットを実施したところ、一部の患者血清で反応性が認められた。

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)

① Y Zeng, XX Wu, Y Homma, N Yoshimura, H Iwaki, S Kageyama, T Yoshiki, Y Kakehi : Uroplakin III-Delta4 Messenger RNA as a Promising Marker to Identify Nonulcerative Interstitial Cystitis. J Urol 178:1322-1327, 2007. 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成田 充弘 (NARITA MITSUHIRO)
滋賀医科大学・医学部・講師
研究者番号：00263046

(2) 研究分担者

吉貴 達寛 (YOSHIKI TATSUHIRO)
滋賀医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80230704

上仁 数義 (JOHNIN KAZUYOSHI)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：90324590

影山 進 (KAGEYAMA SUSUMU)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：50378452

金 哲将 (KIM CHUL JANG)
滋賀医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：10204968

牛田 博 (USHIDA HIROSHI)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：80418756

(3) 連携研究者

なし