

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07926

研究課題名(和文) 顕微鏡的多発血管炎の新規バイオマーカー・治療標的候補血清ペプチドの網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of serum peptides for exploration of novel biomarkers and therapeutic targets of microscopic polyangiitis

研究代表者

黒川 真奈絵 (Kurokawa, Manae)

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：90301598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：顕微鏡的多発血管炎(MPA)のバイオマーカー候補として、アポリポ蛋白質A-I由来断片化ペプチドAC13に加え、補体C4由来の断片化ペプチド及び新規ペプチドを同定した。血管炎モデルSCG/ThpNkcマウスにAC13を投与したところ、高度の尿潜血が対照群より早く出現し、糸球体での半月体形成率が高い傾向を認めた。AC13はMPAの腎における血管炎病態の増悪に関与する可能性が考えられた。また、AC13の受容体候補分子として37kDの蛋白質がスクリーニングされた。MPA特異的な血清ペプチドバイオマーカー候補が複数検出され、AC13はMPAの血管炎病態を増悪させ治療標的となる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ANCA関連血管炎は、欧米では多発血管炎性肉芽腫症(GPA)の頻度が高いが、本邦ではMPAの方が高頻度で患者数も増加しており、MPA特異的なバイオマーカーの確立及び治療標的分子の解明が急務である。現在MPO-ANCAがMPAの診断に用いられるが、これはGPAや好酸球性多発血管炎性肉芽腫症(EGPA)等でも認められ、MPAと他血管炎との鑑別を困難にしている。我々が同定したAC13、補体C4由来ペプチド、新規ペプチドの中で、特にAC13はGPAやEGPAを含む他疾患では認めず腎炎病態を増悪させたことから、MPO-ANCAを凌駕するMPAのバイオマーカーかつ治療標的となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：As novel serum peptide biomarker candidates for microscopic polyangiitis (MPA), we identified a complement C4-derived peptide (1,738 m/z) and an unknown peptide (2,503 m/z) in addition to AC13, an apolipoprotein A-I-derived peptide (1,525 m/z). Injection of AC13 into SCG/ThpNkc mice, a model for ANCA-associated vasculitis, showed earlier onset of severe hematuria ($p < 0.05$) and a tendency of higher crescent formation in glomeruli compared to the PBS-injection. Taken together the result that AC13 induces inflammatory cytokines of IL-6 and IL-8, the peptide is considered to be involved in exaggeration of the pathophysiology of MPA. We also screened 37kD protein as a candidate receptor for AC13. This study revealed multiple serum peptide biomarkers for MPA, and that AC13, a bioactive peptide, may be not only a useful biomarker but also a therapeutic target for MPA.

研究分野：リウマチ・膠原病

キーワード：顕微鏡的多発血管炎 バイオマーカー 血清ペプチド 質量分析 治療標的

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

MPA は抗好中球細胞質抗体(anti-neutrophil cytoplasmic antibody、ANCA)関連血管炎(ANCA-associated vasculitis, AAV)の一疾患であり、急速進行性糸球体腎炎や肺胞出血、間質性肺炎等を来す重篤な疾患である。しかしながら、その病因・病態には未だ不明な点が多く、疾患特異的なバイオマーカーは確立されておらず、治療標的分子も定まっていない。本邦では欧米と異なり MPA の頻度が高いため、MPA の克服に向けた研究は日本が主導して行う必要がある。

AAV には、MPA の他に多発血管炎性肉芽腫症(granulomatosis with polyangiitis, GPA)とアレルギー性肉芽腫性血管炎(eosinophilic granulomatosis with polyangiitis, EGPA)が含まれ、この3疾患はしばしば鑑別が困難な場合がある。現在 MPA のバイオマーカーとして、好中球顆粒内蛋白質のミエロペルオキシダーゼ(myeloperoxidase, MPO)を抗原とする自己抗体である MPO-ANCA が測定されている。MPO-ANCA は MPA で 65-90%と高い陽性率を示す。しかし MPO-ANCA は GPA の約 25%、EGPA の 30-40%の他、半月体形成性糸球体腎炎や Goodpasture 症候群、甲状腺薬の投与例等でも陽性となる為 MPA における特異性は低く、MPA の診断を困難にしている。また現在 MPA はステロイドや免疫抑制剤により治療されており、感染症等の副作用により致命的な転帰を辿る症例も見られる。MPA に特異的なバイオマーカーの確立及び治療法の開発が急務である。

2. 研究の目的

研究代表者は、MPA の活動期に apolipoprotein A-I(ApoA-I)の断片化が亢進して生成される血清ペプチド AC13 (²⁵⁵SALEEYTKKLNTQ²⁶⁷)を見出した(Arthritis Rheum 2011;63:3613)。AC13 は活動期の MPA で GPA、EGPA や他の血管炎、膠原病に比較し高いイオン強度を示し、MPA 特異的な新規バイオマーカーとして期待される。AC13 以外にも、MPA の血清中で特異的に増減するペプチドが存在する可能性があり、これらの同定を試みる。既に同定している AC13 について、MPA の血管炎病態に影響するかを検討する。また、AC13 について、MPA の治療標的となるかを検証するため、受容体等の刺激伝達経路の同定を試みる。

3. 研究の方法

(1) MPA で特異的に増減する、AC13 以外の血清ペプチドの網羅的解析

MPA 及び対照疾患患者の血清よりペプチドを抽出し、質量分析により各ペプチドのイオンピーク強度を網羅的に測定する。MPA 特異的に増減が見られたペプチドのアミノ酸配列を MS/MS 法にて同定し、ペプチドが由来する親蛋白質を同定する。

(2) モデル動物における AC13 の血管炎病態への影響

ANCA 関連血管炎のモデルマウスに AC13 及び対照として PBS を投与し、腎炎及び全身の血管炎病態における AC13 の影響を検討する。

(3) AC13 受容体の同定

ピオチン標識 AC13 を、ヒト肺微小血管内皮細胞上の AC13 受容体と相互作用させる。ピオチンを AC13 受容体にトランスファー後、ストレプトアビジンで検出し質量分析で同定する。

4 . 研究成果

(1) MPA、GPA・EGPA を含む血管炎症候群、SLE を含む膠原病の患者及び健常者より血清を取得し、弱陽イオン交換によりペプチドを抽出した。抽出したペプチドのイオンピーク強度を、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析(matrix assisted laser desorption/ionization - time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF/MS)により網羅的に測定した。その結果、AC13(質量電荷比 1,525m/z)以外に MPA で特異的にイオン強度が上昇しているペプチドを 2 個検出し、それらの質量電荷比は 1,738m/z 及び 2,503m/z であった。これらペプチドのアミノ酸配列を、MALDI-TOF/MS 及び liquid chromatography-mass spectrometry を用い MS/MS 法にて解析した結果、1,738m/z のペプチドの配列は N-NGFKSHALQLNNRQI-C と同定された。得られた配列で蛋白質データベースを探索したところ、当該配列は補体 C4 の一部であることが分かった。このことより、1,738m/z ペプチドは補体 C4 を親蛋白質とする断片化ペプチドであり、AC13 と同様に MPA の活動期に特異的に切断される可能性が考えられた。一方、2,503m/z のペプチドの配列は N-LMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK-C と同定された。当該配列を用いて同様に蛋白質データベースを探索したが、この配列を含む蛋白質は検出されなかった。このことより、2,503m/z のペプチドは未知の単体蛋白質または蛋白質由来の断片化ペプチドであることが示唆された。これらの 1,738m/z 及び 2,503m/z のペプチドも、AC13 と同様に MPA のバイオマーカーとして有用である可能性が示された。なお、1,738m/z 及び 2,503m/z のペプチドとも AC13 の配列を含む ApoA-I 由来ペプチドではなかった為、AC13 を検出する ELISA において検出される可能性が否定された。AC13 を MPA のバイオマーカーとして測定する ELISA の系の特異性を裏付ける結果が得られた。

(2) AC13 の炎症惹起能が血管炎の病態に關与するかを評価するため、ANCA 関連血管炎の疾患モデルである SCG/ThpNkc マウスに AC13 を投与し、血管炎の増悪が認められるかを観察した。6 週令の SCG/ThpNkc マウスに AC13 または対照として溶媒の PBS のみを静脈投与し、7 週令から 20 週令または人道的エンドポイントまでの生存日数及び尿潜血・尿蛋白等を経時的に測定した。人道的エンドポイント及び 20 週令において安楽死後に臓器を採取し、腎炎病態における AC13 の影響を組織的に観察した。その結果、AC13 投与群では高度の尿潜血が対照群より早く出現し(p<0.05)、AC13 が腎炎の発症を早める可能性が示された。腎組織所見では、AC13 投与群において糸球体での半月体形成率が高い傾向が認められた。生存日数及び高度尿蛋白質の出現時期、その他の所見においては、対照群との差を認めなかった。以上より、AC13 は MPA の腎における血管炎病態の早期発現及び増悪に關与する可能性が示唆された。AC13 はヒト微小血管内皮細胞において IL-6 及び IL-8 産生を上昇させる炎症惹起能を in vitro で示しており、今回の in vivo の結果と矛盾しないと考えられる。

(3) 上記の結果より AC13 は MPA の血管炎病態を増悪させる可能性が示され、MPA の治療標的となることが考えられた。AC13 により惹起される刺激伝導経路を遮断するため、その構成分子を同定することが望ましい。暗所でビオチン及び光反応基を有するクロスリンカーを AC13 に結合させ、当該 AC13 をヒト肺微小血管内皮細胞に作用させた。その後、当該細胞の抽出物を調整し、光反応でビオチンを AC13 と結合した蛋白質にトランスファーした。この蛋白質検体に対しストレプトアビジンを用いてウェスタンブロットを施行したところ、37kD の蛋白質が候補分子としてスクリーニングされた。バックグラウンド蛋白質の混入が多数あり同定には

至らなかったが、今後免疫沈降法等を加え質量分析で同定を試みる。

以上より、本研究において、AC13 以外にも MPA 特異的なバイオマーカー候補が検出され、また AC13 が MPA の血管炎病態を増悪させ治療標的となる可能性が示された。今後、AC13 を含むこれらペプチドを MPA のバイオマーカーとして確立し、MPA 特異的な治療法を検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Omoteyama Kazuki, Sato Toshiyuki, Sato Masaaki, Tsutiya Atsuhiko, Arito Mitsumi, Suematsu Naoya, Kurokawa Manae S., Kato Tomohiro	4. 巻 6
2. 論文標題 Identification of novel substrates of a disintegrin and metalloprotease 17 by specific labeling of surface proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e05804 ~ e05804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2020.e05804	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ushimaru Shu, Arito Mitsumi, Tsutiya Atsuhiko, Sato Toshiyuki, Omoteyama Kazuki, Sato Masaaki, Suematsu Naoya, S. Kurokawa Manae, Kamijo-Ikemori Atsuko, Shibagaki Yugo, Kato Tomohiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Roles of Layilin in Regulation of Low-Density Lipoprotein Receptor in Malignant Glioma Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of St. Marianna University	6. 最初と最後の頁 53 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17264/stmarieng.11.53	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsutiya Atsuhiko, Arito Mitsumi, Tagashira Takuma, Sato Masaaki, Omoteyama Kazuki, Sato Toshiyuki, Suematsu Naoya, Kurokawa Manae S., Kato Tomohiro	4. 巻 549
2. 論文標題 Layilin promotes mitochondrial fission by cyclin-dependent kinase 1 and dynamin-related protein 1 activation in HEK293T cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 143 ~ 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.02.091	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kaji T, Arito M, Tsutiya A, Sase T, Onodera H, Sato T, Omoteyama K, Sato M, Suematsu N, Kurokawa MS, Tanaka Y, Kato T.	4. 巻 1719
2. 論文標題 Layilin enhances the invasive ability of malignant glioma cells via SNAI1 signaling.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 140-147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2019.05.034.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 黒川真奈絵、佐藤政秋、佐藤利行、高桑由希子、表山和樹、永淵裕子、有戸光美、末松直也、大岡正道、川畑仁人、加藤智啓
2. 発表標題 顕微鏡的多発血管炎の新規血清バイオマーカー候補AC13定量系の開発
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤利行、佐藤政秋、表山和樹、土屋貴大、有戸光美、末松直也、加藤智啓、黒川真奈絵
2. 発表標題 再発性多発軟骨炎における血清ペプチドプロファイルの解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒川真奈絵、佐藤利行、佐藤政秋、土屋貴大、表山和樹、有戸光美、末松直也、加藤智啓
2. 発表標題 再発性多発軟骨炎のバイオマーカー候補となる血清ペプチドの検出
3. 学会等名 第71回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 有戸光美、佐藤利行、表山和樹、佐藤政秋、黒川真奈絵、加藤智啓
2. 発表標題 滑膜繊維芽細胞におけるライリンの役割
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 表山和樹、佐藤利行、佐藤政秋、土屋貴大、有戸光美、末松直也、黒川真奈絵、加藤智啓
2. 発表標題 A Distintegrin And Metalloprotease 17 (ADAM17) 新規基質の探索
3. 学会等名 第15回日本臨床プロテオゲノミクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒川真奈絵
2. 発表標題 新規血清ペプチドバイオマーカーの臨床応用を目指して - 内部標準を用いた質量分析による定量法の開発 -
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木 琳子、永井 宏平、西端 智也、佐藤 政秋、佐藤 利行、黒川 真奈絵、加藤 智啓
2. 発表標題 ANCA 関連血管炎患者における自己抗原 Myeloperoxidase の翻訳後修飾の解析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Manae S. Kurokawa
2. 発表標題 Development of Novel Serum Peptide Biomarkers - Toward Clinical Application -
3. 学会等名 The 17th Matsuyama International Symposium 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤政秋、佐藤利行、表山和樹、土屋貴大、有戸光美、末松直也、加藤智啓、黒川真奈絵
2. 発表標題 顕微鏡的多発血管炎の新規血清ペプチドバイオマーカー候補AC13のMALDI-TOF/MSによる定量
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
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
研究協力者	加藤 智啓 (Kato Tomohiro)		
研究協力者	川畑 仁人 (Kawahata Kimito)		
研究協力者	永井 宏平 (Nagai Kouhei)		
研究協力者	大岡 正道 (Ooka Seido)		
研究協力者	高桑 由希子 (Takakuwa Yukiko)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	佐藤 利行 (Sato Toshiyuki)		
研究協力者	佐藤 政秋 (Sato Masaaki)		

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