

研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2008 ～ 2010
課題番号：	20590588
研究課題名（和文）	間質性肺炎合併皮膚筋炎における疾患関連マーカー蛋白の定量プロテオミクスによる探索
研究課題名（英文）	Detection of Disease-related Proteins in Dermatomyositis Associated with Interstitial Pneumonia by Proteomics-based Analysis
研究代表者	
武内 徹	(Takeuchi Tooru)
	大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：	10330078

研究成果の概要（和文）：

本研究では定量プロテオミクスの手法を用い間質性肺炎合併皮膚筋炎の治療前後により変動する血清蛋白を同定した。治療により CRP, C3 などの炎症性蛋白が減少し、レチノール結合蛋白などの抗炎症性蛋白が増加した。さらに炎症とは直接関連がない Vitronectin や X が変化することがわかり、疾患との関連性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

This paper showed the change in the serum proteins by treatment of dermatomyositis associated with interstitial pneumonia using proteomics-based quantitative analysis. Inflammatory proteins as CRP and C3 were increased, and anti-inflammatory proteins as retinol-binding protein were increased. Moreover, the expression of vitronectin and X was altered, and may be related with the disease activity or the pathogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：皮膚筋炎、間質性肺炎、バイオマーカー、プロテオーム解析

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性進行型間質性肺炎合併皮膚筋炎 (DM-CIP) はステロイド治療に対して反応性がよく予後も良好である。一方、急性/亜急性進行型間質性肺炎合併皮膚筋炎 (DM-A/SIP) はしばしば治療抵抗性で、ステ

ロイド、サイクロスポリン、シクロフォスファミドなどの免疫抑制剤の 2 剤あるいは 3 剤併用療法が試みられている (Tanaka F, **Intern Med** 2000; Nawata N, **J Rheumatol** 1999; Takano Y, **Modern Rheumatol** 2002)。近年これらの併用療法により DM-A/SIP の治

療成績は向上しているが、生存率は未だ 40～70%にとどまる。申請者らは、これまでに早期から免疫抑制剤の併用療法を積極的に導入し、治療効果が不十分な時には他の免疫抑制剤を追加することが予後と呼吸機能の改善に重要であることを報告した (Kotani T, *J Rheumatol*, 2008)。DM-A/SIP は疾患の進行が早く、その治療においては診断・病勢把握を迅速に評価できる有用なバイオマーカーが必要である。

(2) バイオマーカー探索において、近年二次元電気泳動、高速液体クロマトグラフィー、質量分析などを組み合わせたプロテオミクスを用いた手法が注目されている。この手法は高感度で血清などの生体試料中の微量タンパク質を網羅的に同定・解析するのに有用である。申請者および共同研究者らの研究室では、これまでに全身性エリテマトーデス・関節リウマチなどの自己免疫疾患患者や肺癌・消化器癌などの患者にみられるバイオマーカー探索をプロテオミクスの手法により精製・同定してきた (Takeuchi T, *J Chromatogr B* 2007; Nakanishi T, *J Chromatogr B* 2006; Tabushi Y, *Ann Clin Biochem*, 2008)。

2. 研究の目的

本研究では、近年確立された蛋白質・ペプチドを高感度で同定できるプロテオミクスの手法を用い、DM-A/SIP 患者の血清から早期診断や病勢把握を評価できる新たなバイオマーカーを見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) DM-IP 患者を対象として、治療の前後、他の自己免疫疾患患者および健常者とを比較検討する。臨床データとしては、疾患名、発症年齢、合併症、臓器病変、疾患活動性、検査所見 (CK, LD, KL-6、血液ガス)、呼吸機能、自己抗体の有無などを診療録より得る。IP の評価は高分解能 X 線 CT (HRC T) にて行い、非特異性間質性肺炎 (NSIP)、急性間質性肺炎 (DAD)、特発性器質化肺炎 (COP)、剥離性間質性肺炎 (DIP)、呼吸細気管支炎を伴う間質性肺疾患 (RB-ILD)、リンパ球性間

質性肺炎 (LIP) に分類する。

(2) 血清検体は、研究内容を説明し同意を得られた後に採取し、Multiple Affinity Removal Column (Agilent Technologies) にてアプライし、主要蛋白を除去してプロテオミクス解析に用いる。検体は $25 \mu\text{g}/125 \mu\text{L}$ (7cm ゲルの場合) または $100 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ (18cm ゲルの場合) になるように膨潤バッファーに溶かし二次元電気泳動する。泳動後、タンパク染色し解析する。タンパク発現量に差があるスポットをゲルより切り出す。切り出したゲルを洗浄し還元・アルキル化した後、ゲル内でトリプシン消化しペプチドの抽出し質量分析 (MS) を行い、peptide mass finger print 法、
或いは *de novo* sequence 法で蛋白を同定する。

(3) 比較する 2 検体 (例: 治療前と治療後、患者と健常者) を用い、安定同位体 ^{13}C 6 個で標識された 2-nitrobenzenesulfenyl chloride (NBS) 試薬と非標識の NBS 試薬によりタンパク質のトリプトファン残基を標識する。これを混ぜ合わせ還元・アルキル化しトリプシン消化した後、質量分析計 (MS) でピーク強度の差をタンパク質量の差として定量する。

(4) タンパク量に差のある血清タンパク質について、疾患および病態、特に間質性肺炎との関連性について検討する。診療録より得られた臨床データとの関連性を統計的に解析する。

4. 研究成果

(1) 治療前後の DM-A/SIP 患者血清検体および他の自己免疫疾患患者・健常者血清検体を用い、治療による血清蛋白の変動を二次元電気泳動で確認した結果、50 個程度のスポットにおいて蛋白量が増加あるいは減少していた。CRP や $\alpha 1$ ミクログロブリンなど炎症性蛋白が増加し、抗炎症性蛋白が減少したが、未同定の蛋白も残った。治療後の血清プロファイルは、健常者血清のプロファイルと類似していたが、スポットの

異なるものが4個認めましたが、タンパク量が少ないため同定ができなかった。また、治療前の血清プロファイルと全身性エリテマトーデス患者および関節リウマチ患者血清のプロファイルは類似したが、強皮症と Sjogren 症候群とは異なっていた。

(2) 安定同位体を用いた定量プロテオミクス法により、治療により量的および質的変動する血清タンパク質の同定を行った。安定同位体 ^{13}C 6個で標識された NBS 試薬を用いることで治療により変化する同じペプチドを質量差6のピークとして変化をとらえることができる。その結果、二次元電気泳動法を用いた方法と同様に炎症蛋白・抗炎症性蛋白を同定できた(図1)が、アルブミンなどの多量の蛋白が解析の障害となった。

そこでアルブミンおよびIgGを除去できる異なるカラムを追加・処理して解析した。その結果、新規に Vitronectin (図2) や X などの蛋白を同定した。これらは IP の重症度と関連する傾向があったが、組織型との関連はなかった。

血清タンパクなどのプロファイル解析において、主要タンパク除去のために抗体カラムによる除去が行われているが、用いるからむによって抗体の結合力や認識するエピートープの違いがあり、完全に除去できないことも多い。今回、2つの除去カラムを用いることで目的タンパクをより純化した形で解析することができた。しかし、手順の複雑さや操作によるロスも大きく課題が残った。

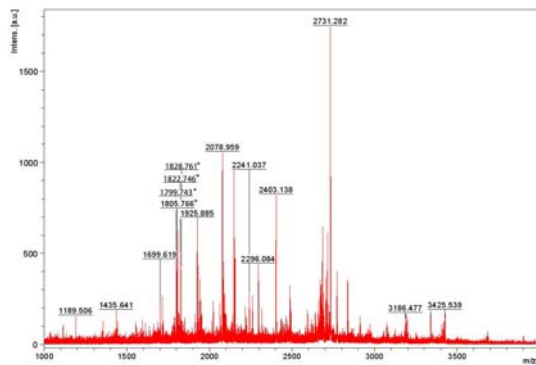


図1. ^{13}C 標識 NBS 試薬を用いた定量プロテオミクス法を用いた DM-IP 患者血清蛋白の治療

前後の変化. 治療前 (^{12}C 標識) と治療後 (^{13}C 標識) の intensity に差があるペプチドピークが 20 前後認められた。

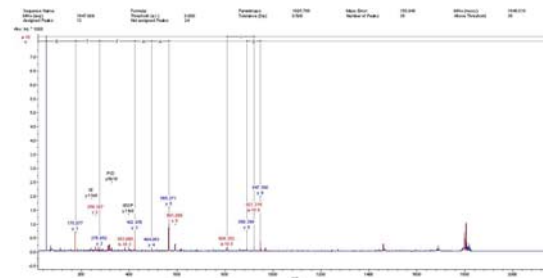


図2. ピーク 1805.766 の MS/MS 解析. *de novo* sequence 法により vitronectin と同定できた。これらの蛋白について ELISA などの従来法で定量を確認し、疾患活動性指標として役立つことが明らかにしているところである。

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2件)

1. Kotani T, Takeuchi T, Makino S, et al. Combination with corticosteroids and cyclosporin-A improves pulmonary function test results and chest HRCT findings in dermatomyositis patients with acute/subacute interstitial pneumonia. Clin Rheumatol, 査読有、(in press)

2. 武内徹、小谷卓矢、永井孝治、榎野茂樹、炎症性筋疾患に関する最近の知見：間質性肺炎に対する免疫抑制療法の有用性、リウマチ科、査読無、45巻、2011、164-169

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武内 徹 (Takeuchi Tooru)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：10330078

(2) 研究分担者

中西 豊文 (Takanishi Toyofumi)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10247843

槇野 茂樹 (Makino Shigeki)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：20268204

松村 洋子 (Matsumura Yoko)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：80388256