

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2008 ~ 2009
課題番号：	20790416
研究課題名(和文)	選択的プロテオミクスを用いた関節液中タンパク解析による関節炎診断マーカーの探索
研究課題名(英文)	Investigation of arthritis diagnostic marker from synovial fluids using selective proteomics based analysis
研究代表者	
	松村 洋子 (Matsumura Yoko)
	大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：	80388256

研究成果の概要(和文):本研究では質量分析の手法を用い関節リウマチ患者の関節液中シトルリン化タンパクとしてfibrinectin,fibrin,vimentinを同定した。また関節リウマチ関節液中に変形性関節症より多く発現しているタンパクとして α 1acid glycoproteinとfibrinogenを同定、また変形性関節症に多いタンパクとしてapolipoprotein A-Iを同定できた。これらの組み合わせにより新たな関節炎診断マーカーの可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文):In this study, we identified three proteins, citrullinated fibrinogen, citrullinated fibronectin, and citrullinated vimentin in synovial fluids derived from RA patients by proteomics based analysis. Besides, compared to synovial fluids from OA patients, α 1acid glycoprotein and fibrinogen were found in higher levels and apolipoprotein A-I was found in lower level in synovial fluids from RA patients. It was thought that there was a possibility of a new arthritis diagnostic marker by combination of these proteins.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
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:境界医学 病態検査学

キーワード:臨床検査医学 プロテオミクス 関節炎

1. 研究開始当初の背景

関節痛・関節炎は、リウマチ性疾患を始め様々な疾患に見られ日常診療で接する機会が多い病態で、代表的な疾患には、関節リウマチ(RA)、変形性関節症(OA)がある。

中でもRAは、生物製剤などの早期使用により寛解導入できることが、近年報告されており、早期診断が重要視されている。RAの診断については抗CCP(cyclic citrullinatedpeptide)抗体が有用だが、実際の臨床の場では特に早期RAの場合鑑別診断に苦慮する事も多い。OAは65歳以上の20-60%が発症する疾患であり、初期にはレントゲン上の変化がなく鑑別診断・

除外診断が必要だが、未だ有用な診断マーカーは見いだされていない。これらの関節炎疾患について早期に確実な診断をするために関節炎の新規診断マーカーが必要である。

一方、抗CCP抗体の抗原となるシトルリン化タンパクは、RAやアルツハイマー病の発症に関与することが報告され注目されている。シトルリン化タンパクはRA関節中に多数存在し既に幾つかのタンパクが同定されている。当初はRA特異的と考えられていたが、最近ではRA以外の関節炎疾患にも認められると報告されている。元来、シトルリンは遺伝暗号にないアミノ酸であり、既存のタンパク中のアルギニンが peptidyl arginine deiminase (PADI)によりシトルリンに変換

されることでシトルリン化タンパクが生じる。この時、アルギニンに含まれている正の電荷が消失しタンパクの立体構造が変化することで機能的な影響を及ぼすと考えられている。

抗CCP抗体の抗体価は血清より関節中で高いため、これまではシトルリン化タンパクの同定には関節滑膜や関節液が用いられてきた。その検出は、免疫染色や Western Blott法による候補タンパクの存在証明や、関節滑膜を材料としたプロテオミクス手法によるタンパク解析から行われており、関節液の検体を使用したシトルリン化タンパクについての網羅的解析は行われていない。

プロテオミクスは質量分析器を用いて発現しているタンパク全てについて網羅的に検出・同定する手法である。今回、プロテオミクス手法を用いて関節液中のシトルリン化タンパクを選択的に検出・同定する手法を用いて各種関節炎の関節液中のシトルリン化タンパクのタンパクプロファイルの解析を試みた。また同時に各疾患のプロファイルを比較検討し疾患に特徴的なタンパクを同定することは、発症機序や病態を解明するとともに、関節炎新規診断マーカーを開発にもつながると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、質量分析を用いて種々の関節炎疾患の関節液中タンパクの同定を行い、診断マーカーとしての有用性や病態との関連を検討する事である。

従来シトルリン化タンパクはRA特異的と考えられていたが、最近では他の関節炎疾患の関節液中シトルリン化タンパクの存在が報告されている。既に同定されているシトルリン化タンパク以外にも関節中にはシトルリン化タンパクが存在しており、病態との関わりがあると考えられる。また、関節液中には、壊死細胞から出たタンパク・合成が盛んな細胞から作られたタンパク・細胞表面から切断されたタンパクなどが含まれており、関節の状態が直接反映されていると考えられるため検体には関節液を用いる。

具体的には

- (1)抗シトルリン抗体を用いたRAの関節液中のシトルリン化タンパクの解析
- (2)RAとOAにおいて量的に差のあるタンパクの同定を行う。

3. 研究の方法

- (1) 抗シトルリン抗体を用いたRAの関節液中のシトルリン化タンパクの解析について

臨床データ及び検体の収集:

当院整形外科加療中の患者を対象に、RA,OAの関節液を収集した。対象検体は文部科学省ヒトゲノム・遺伝子に関する倫理方針及び学内倫理委員会規定に則って採取した関節炎患者の関節液を用いる。関節液は採取後冷凍庫(-70℃)に保存する。

電気泳動による関節液中タンパクの分離:

これらの関節液をヒアルロニダーゼ処理後、可

溶化した各60 μ gの関節液を膨潤バッファーに溶解し、SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)にて電気泳動し、タンパクを分離する。タンパク染色は銀染色で行う。

関節液中のシトルリン化タンパクの検出(Western Blott法):

抗シトルリン抗体を用いたWB法により関節液中のシトルリン化タンパクの検出を行う。電気泳動で分離したタンパクを、PVDF(polyvinylidene fluoride)膜に転写し、抗シトルリン抗体と膜上で反応させた後、HRP標識抗IgG抗体と反応させ、ECL(enhanced chemiluminescence system)での発色反応を行い、関節液中のシトルリン化タンパクのバンドを検出する。

ゲルからのタンパク質の抽出:

上記のシトルリン化タンパクのバンドに一致したバンドをゲルごと切り出す。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する。消化物を遠心濃縮し、シトルリン化タンパクのトリプシン消化物を得る。

質量分析とタンパク解析:

得られた抽出物(トリプシン消化物)を質量分析(MS)する。得られたMSスペクトル(数個から十数個のペプチドのピーク)に対しタンデム質量分析(MS/MS)にて各ペプチドのアミノ酸配列を決定する。質量分析器に付属するデータベース検索ソフトでSWISS-PROTなどのデータベースから検索しタンパクを同定する。このデータベースには既知のタンパクをトリプシン消化した際に生成されるペプチドの質量値があり、これを利用し質量分析により得られたMSスペクトルと比較し同定する(mass finger print法)。また、MSスペクトルの中の一つのペプチドから、更にMS/MSスペクトルを得る。これによりアミノ酸配列が質量数の差として得られ、データベースから検索しタンパクを同定する(*de novo* sequence法)。

- (2)RAとOAにおいて量的に差のあるタンパクの同定

臨床データ及び検体の収集:

(1)同様、当院整形外科加療中の患者を対象に、RA,OAの各10例の関節液を収集した。

二次元電気泳動による関節液中タンパクの分離:

RAとOAの患者各10例の関節液を各20 μ gずつ合わせ、200 μ gにしたものをヒアルロニダーゼ処理後、遠心分離し細胞成分を取り除いたものを、アルブミン除去カラムで処理。得られた検体を不純物を除去キットを用い、塩類・界面活性剤・脂質・核酸の除去。可溶化した関節液を膨潤バッファーに溶解し、高速等電点電気泳動システムとSDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)にて二次元電気泳動し、タンパクを分離する。タンパク染色はCBB(Coomassie Brilliant Blue)染色を行った。

ゲルからのタンパク質の抽出:

上記のspotに一致したspotをゲルごと切り出す。(1)同様ゲル内でトリプシン消化する。

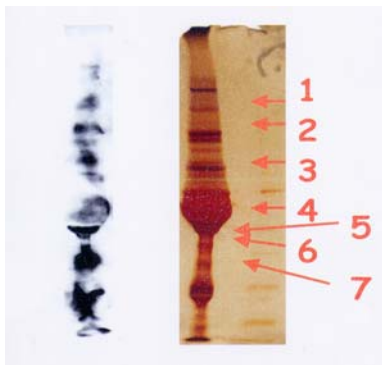
質量分析とタンパク解析:
得られた抽出物を(1)同様質量分析(MS)する。

発現量に差のあるタンパクの検索:
CCB染色では、スポットの大きさがタンパク量と比例するため、得られたタンパクプロファイルからデンシドメーターを用いてspotのサイズに差があるタンパクを検索。

4. 研究成果

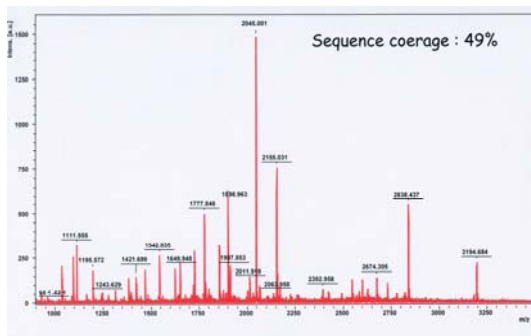
(1)RA関節液のシトルリン化タンパクのタンパクプロファイルを同定した。(図1)
RA患者の関節液中よりFibrnectin, Fibrin, Vimentin、新たにAnnexin2を同定した。(図1,2)
他にAlbuminも同定したが、シトルリン化Albuminというより、同一バンド内にアルブミンと複合体を形成するタンパクの存在が疑われた。

図1 RA関節液をSDS-PAGEによりタンパク分離(右)し一次抗体にシトルリン抗体を用いWB行いシトルリン化タンパクを検索(左)しゲルより抽出。抽出物をMSしシトルリン化Fibrnectin, Fibrin, Vimentin, Annexin2を同定。



- 1 Fibronectin and serum albumin
- 2-4 Serum albumin
- 5 Serum albumin and vimentin
- 6 ChainE, Fragment Double D from Human Fibrin
- 7 Annexin A2

図2:Annexin2のspectrum

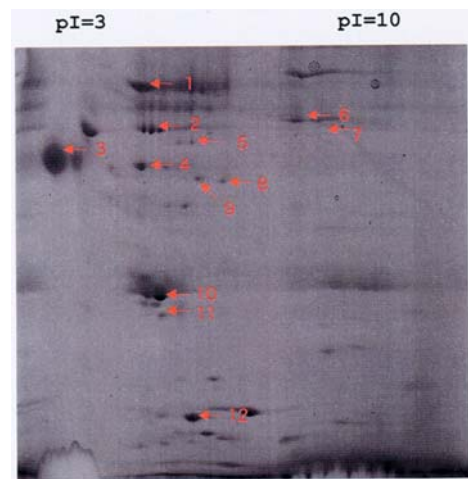


Annexin2はカルシウムリン脂質結合性を持ち、一次構造上高い相同性を持つタンパクであるアネキシンファミリーの一つで、血管内皮細胞やマクロファージなどに豊富に存在し、プラスミンの産生を促進する事で、線溶系に促進的に働く事が知られており、細胞増殖や分化に関わっているとの報告もある。今後、RAとの関連について引き続き検討を行う。
今回の同定はSDS-PAGEで得られたバンドから抽出されたタンパクを用いていることから、シトルリン化WBとバンドが一致しているもバンド中に含まれる他のタンパクである可能性があるため、現在シトルリン化Annexin2が関節液から抽出出来るか確認中である。

(2)RA, OA関節液のタンパクプロファイルを同定・比較した。

関節液から得たタンパクプロファイルからRA, OA関節液に共通するタンパクとして、12のタンパクを同定した。これらのタンパクについてデンシドメーターを用いRA, OAでspotのサイズの比較検討を行った。(図3)

図3 関節液のタンパクプロファイル



以下のタンパクを同定。

1. Hemopexin precursor(β -1 β -glycoprotein)
2. α -1- β -glycoprotein
3. α 1acid glycoprotein precursor
4. Apolipoprotein A-IV precursor
5. Fibrinogen γ chain precursor
6. Fibrinogen β chain
- 7-9. chainE, Fragment Double D from Human Fibrin
10. Proapolipoprotein (Apolipoprotein A-I)
11. Plasma retinol-binding protein precursor
12. Transthyretin、

RA関節液中にOAより多く発現しているタンパクとして α 1acid glycoproteinとfibrinogenを同定、またOAに多いタンパクとしてApolipoprotein A-Iを同定した。

これらのタンパクについて文献的な考察を行った。

Apolipoprotein A-I はHDL(高比重リポタンパク)の構造タンパクであり、LCAT(lecithin-cholesterol acyltransferase)の活性化・末梢組織からのコレステロールの引き抜きやHDLリガンドとしてなど、コレステロールの逆転送系に重要な役割を果たすタンパクとして知られており、IL-1やTNF α の産生を抑制することや、RAの関節変形の制御に関係しているのではないかとの報告がある。

α_1 acid glycoprotein (AGP)は急性相反応物質のひとつで、生体防御に関わっていると考えられており、IL-6、IL-1、TNF α の作用を調節することによる好中球貪食能低下・リンパ球幼稚化制御など免疫抑制作用もあるといわれている。RA患者のAGPは早期から増加することが確認されており関節破壊との関連が示唆されており、またOA患者のAGPは疾患活動性によく相関すると言われている。

Fibrinogenは凝固線溶系の基質タンパクのひとつで、フィブリンに転化して凝固血栓をつくるという代表的な生理機能以外にも、血小板の糖タンパクを介する凝集反応に関与するほか、創傷治癒の治療機転に関与したり、生体の防衛反応に深く関与していると考えられている。シトルリン化をうけたフィブリノゲンがRAの関節変形に関わっているのではないかという報告もある。

α 1 acid glycoprotein、Fibrinogen、Apolipoprotein A-I はそれぞれRA、OAとの関連が示唆されるため、今後引き続きこれらのタンパクの組み合わせによる診断マーカーとしての有用性や病態との関連を検討する。

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 1件)

Tabushi Y, Nakanishi T, Takeuchi T, Nakajima M, Ueda K, Kotani T, Makino S, Shimizu A, Hanafusa T, Takubo T.

Detection of citrullinated proteins in synovial fluids derived from patients with rheumatoid arthritis by proteomics-based analysis.

Ann Clin Biochem. 査読有
2008 Jul; 45(Pt 4): 413-7.

[学会発表](計 2件)

(1) 第56回日本臨床検査医学会学術集会
平成21年8月28日 札幌コンベンションセンター

関節炎診断マーカーの同定 松村洋子 武内徹 中西豊文 田窪孝行

(2) 第55回日本臨床検査医学会学術集会
平成20年11月30日 名古屋国際会議場
関節液中のシトルリン化タンパク解析による関節炎診断マーカーの検索 田伏洋子 武内徹 中西豊文 田窪孝行

6. 研究組織

(1)研究代表者

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