様式C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成２２年４月２４日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008 ～ 2009
課題番号：20791279
研究課題名（和文） ベーチェット病における疾患特異的自己抗原のプロテオミクスによる網羅的解析
研究課題名（英文） Proteomic analysis of the disease specific autoantibodies in Behcet’s disease
研究代表者
奥貫 陽子 （OKUNUKI YOKO）
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号：40459508

研究成果の概要（和文）：ウエスタンブロット法を併用したプロテオミクスの手法を用いて、内因性ぶどう膜炎における網膜自己抗原を網羅的に検出した結果、Esterase D と brain type creatine kinase が、ベーチェット病およびその他の内因性ぶどう膜炎（サルコイドーシス、原田病）の網膜自己抗原である可能性を見出した。これらの抗原は複数の内因性ぶどう膜炎に共通する自己抗原であり、疾患特異的抗原はなかった。

研究成果の概要（英文）：A proteomic approach combined with western blotting was applied to detect multiple retinal autoantigens in endogenous uveitis. As results, Esterase D and brain type creatine kinase were defined as retinal autoantigens in endogenous uveitis, including Behcet’s disease, sarcoidosis, and Vogt-Koyanagi-Harada disease. There was no disease specificity in the two newly defined autoantigens.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
２００８年度	1,500,000	450,000	1,950,000
２００９年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総 計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学
キーワード：プロテオミクス、内因性ぶどう膜炎、自己抗原

１．研究開始当初の背景

ベーチェット病の発症機序のひとつにぶどう膜・網膜組織に対する自己免疫反応が考えられており、いくつかの自己抗原の報告がある。しかし、その他にも自己抗原が存在し、ベーチェット病におけるぶどう膜炎の原因・病態の修飾にかかわっている可能性が考えられる。

２．研究の目的

ベーチェット病における新規網膜自己抗原を網羅的に検出し、原因・病態の解明を図る。

３．研究の方法

ウエスタンブロット法を併用したプロテオミクスの手法を用いて、網羅的な眼組織特異的な自己抗原検出を行った。

（１）ヒト網膜抗原を用いた二次元ウエスタンブロット法
①抗原として、輸入眼球から得たヒト網膜組織を二次元電気泳動し、ベーチェット病患者の血清、および健常人血清を用いて二次元ウエスタンブロット法を行った。
②ベーチェット病で陽性率の高い蛋白スポットを質量分析装置を用いて同定し、抗原候補蛋白とした。
（２）マウス網膜抗原を用いたウエスタンブロット法
①抗原として、マウス網膜組織を二次元電気泳動し、実験的自己免疫性ぶどう膜炎（EAU)を誘導したマウスから採取した血清、あるいはコントロールマウスの血清を用いて二次元ウエスタンブロット法を行った。
②EAU を誘導したマウスで陽性率の高い蛋白スポットを質量分析装置を用いて同定し、抗原候補蛋白とした。
（３）自己抗原性の確認
①同定された蛋白の組み換えたんぱくを作成した。
②ベーチェット病、サルコイドーシス、Vogt-小柳－原田病患者のおよび健常人血清を用いて一次元ウエスタンブロットを行い、抗原候補蛋白の抗原性の確認、疾患特異性を検討した。
（４）病態との関連の検討
抗原性が確認された新規自己抗原陽性例と陰性例について病態に差を認めるかを検討した。

４．研究成果
（１）マウスを用いた内因性ぶどう膜炎モデルで抗原候補蛋白として 6 個の抗原候補蛋白が検出された。そのうち、Esterase D と brain type creatine kinase が、ベーチェット病およびその他の内因性ぶどう膜炎（サルコイドーシス、原田病）の網膜自己抗原である可能性を見出した。しかし、それらの抗原に疾患特異性はなく、病態との関連も見られなかった。

（２）ヒト網膜抗原を用いた抗原検出では、5 個の抗原候補蛋白が検出された。それらのうち、esterase D は（１）の結果で同定されたものと同じ抗原であり、heat shock protein 60 は既報の自己抗原であった。その他 aldolase A, oxygen regulated protein, retinaldehyde binding protein 1 については、組み換えたんぱくを用いたウエスタンブロットで自己抗原性は確認されなかった。

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　３　件）
Okunuki Y et al, Proteomic surveillance of retinal autoantigens in endogenous uveitis:implication of Esterase D and brain-type creatine kinase as novel autoantigens. Molecular Vision. 査読あり 12 巻　2008, 1094-1104

〔学会発表〕（計　１１　件）
奥貫　陽子、竹内　大ら、免疫原性を有する網膜局在タンパクのプロテオーム解析　東京医科大学ハイテクリサーチセンター最終研究成果　公開シンポジウム　2008. 1.21

〔図書〕（計　０　件）
〔産業財産権〕
○出願状況（計　０　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計◇件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
奥貫　陽子　（OKUNUKI　YOKO）
東京医科大学　眼科・助教
研究者番号：40459508

(2)研究分担者
（　　）

研究者番号：

(3)連携研究者
（　　）
研究者番号：