

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 7 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591273

研究課題名（和文）プロテオミクスを用いた人種別血管炎患者における抗血管内皮細胞抗体の対応抗原の同定

研究課題名（英文）Identification of target proteins of anti-endothelial cell antibodies in different racial groups with vasculitis by proteomics

研究代表者

唐澤 里江 (KARASAWA RIE)

聖マリアンナ医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50434410

研究成果の概要（和文）：プロテオミクスを用いて抗血管内皮細胞抗体（anti-endothelial cell antibodies:AECA）の対応抗原候補蛋白を検出・同定したところ、日本人大型血管炎患者と米国人大型血管炎患者では大きく異なっていた。AECA の対応抗原である Peroxiredoxin2 (Prx2)と PPIA cyclophilin A (PPIA) に対する自己抗体陽性率を高安動脈炎患者で評価したところ、日本人では 85%以上であったが米国人では 15%以下であった。プロテオミクスで巨細胞性動脈炎患者血清を用いて大動脈血管内皮細胞に特異的な AECA の対応抗原候補蛋白を 9 個、巨細胞性動脈炎に特異的な AECA の対応抗原候補蛋白を 22 個同定した。一方米国人高安動脈炎患者血清では、大動脈血管内皮細胞に特異的なスポットを 15 個検出し、米国人高安動脈炎に特異的なスポットを 4 個検出した。本研究より AECA の対応抗原における人種別評価の重要性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We attempted to identify candidate target proteins for anti-endothelial cell antibodies (AECA) comprehensively by a proteomic approach. Proteomic analyses showed significant different candidate target proteins between Japanese patients and American patients with large vessel vasculitis. More than 85% of Japanese patients with Takayasu arteritis (Tak) were found to have autoantibodies to Prx2 and PPIA, target proteins of AECA, respectively, whereas less than 15% of American patients with Tak were found to have them. Next, candidate target proteins for AECA were detected in American patients with giant cell arteritis (GCA) by two-dimensional electrophoresis-Western blotting. As a result, 9 endothelium-specific proteins and 22 patient-specific proteins were identified in GCA patients. 15 endothelium-specific spots and 4 patient-specific spots were detected in American patients with Tak. This work demonstrated that it is important to assess target proteins of AECA in different racial groups with vasculitis.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2010年度 | 700,000   | 210,000 | 910,000   |
| 2011年度 | 700,000   | 210,000 | 910,000   |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 2,700,000 | 810,000 | 3,510,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、膠原病・アレルギー内科学

キーワード：膠原病、医化学

1. 研究開始当初の背景

(1) 一部の小型血管炎の疾患標識マーカーとして抗好中球細胞質抗体(ANCA)があるが、大型・中型血管炎における疾患標識マーカーの検出に未だ至っていない。

(2) 現在血管炎の病因・病態解明には至っておらず、疾患特異的な治療法も開発されていない。加えて1)の理由から、診断・治療が遅れて重度の後遺症や著しいQOLの低下をきたす症例も稀ではない。

(3) このような状況のため、血管炎の診断に関して社会的要求が高まっており、国内外の研究の競争が激しい。

(4) 原発性および続発性血管炎患者に加え、不明熱といった血管炎の有無の診断が必要とされる患者数は年々増加している。

2. 研究の目的

抗血管内皮細胞抗体 (AECA)は血管炎患者に高率に検出される自己抗体であり、疾患活動性との相関や血管炎の病因・病態形成に関

与している可能性が指摘されている。AECAの役割を明らかにする目的で、我々はプロテオミクス的手法を用いて AECA の対応抗原を検出・同定し、その個々の対応抗原候補蛋白から血管炎の病因・病態へアプローチする。本研究は北米血管炎グループ (VCRC) との共同研究であり、人種間での評価を行い、疾患特異的マーカーの検出、診断補助用キットの開発を含めた臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) 我々は日本人血管炎患者における AECA の対応抗原として、抗酸化酵素の Peroxiredoxin2 (Prx2) および免疫抑制剤の cyclosporinen の結合蛋白である cyclophilin A (PPIA) を同定し、両者に対する自己抗体が高安動脈炎に特異性が高い可能性を見出している。今回、Prx2およびPPIAに対する自己抗体陽性率を米国人血管炎患者血清を用いて評価する。

(2) 大型・中型血管炎の高安動脈炎および巨細胞性動脈炎の疾患活動性が高い米国人患者血清を 5 サンプルずつ使用して、プロテオ

ミクスにて、AECA の対応抗原候補蛋白を検出・同定する。

(3) (2)の同定蛋白において、他の血管炎で自己抗体陽性率を評価するとともに、疾患活動性および血管炎の病因・病態への関与の有無を検討する。

#### 4. 研究成果

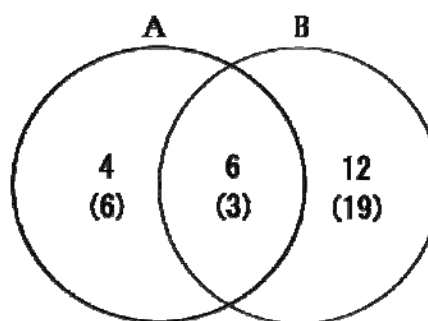
(1) 米国人患者血清を用いてPrx2 およびPPIA に対する自己抗体陽性率をそれぞれ評価したところ、陽性率は15%以下であり、日本人患者血清とは明らかに異なっていた。

(2) 更に、Prx2 とPPIAに対する自己抗体の経時的評価をしたところ、日本人患者血清では両蛋白に対する自己抗体価が疾患活動性と相関していたが、米国人患者血清では明らかな相関は認められなかった。

(3) 血管炎患者血清を用いた Western blotting (抗原として血管内皮細胞抽出蛋白を使用) を行ったところAECAの対応抗原候補蛋白が日本人患者血清と米国人患者血清では異なっていた。

(4) 大動脈血管内皮細胞および大動脈外膜線維芽細胞 (対照) からの抽出蛋白と活動性が高い米国人巨細胞性動脈炎患者血清および米国人健常人血清 (対照) を用いて Western blotting を行った。大動脈血管内皮細胞に特異的な AECA の対応抗原候補蛋白スポットおよび米国人巨細胞性動脈炎患者

に特異的な AECA の対応抗原候補蛋白スポットを網羅的に検出し、mass finger printing にて同定した。結果を以下に示す。



A:大動脈血管内皮細胞に特異的な AECA の対応抗原候補蛋白スポット数。( )内は同定された蛋白数。

B:米国人巨細胞性動脈炎患者に特異的な AECA の対応抗原候補蛋白スポット数。( )内は同定された蛋白数。

米国人と日本人血管炎患者血清を用いた AECAの対応抗原候補蛋白の結果を比較検討したところ、巨細胞性動脈炎患者で同定されたAECAの対応抗原候補蛋白において、数個は同様であったが日本人と米国人では大きく異なっていた。

(5) 活動性が高い米国人高安動脈炎患者血清を用いて(4)同様に行った結果、大動脈血管内皮細胞に特異的なスポットを 15 個検出し、米国人高安動脈炎患者に特異的なスポットを 4 個検出した。このうち両者に特異的なスポットは 4 個であった。(4)同様に、高安動脈炎患者血清を用いて同定されたAECAの対応抗原候補蛋白において、数個は同様であつ

たが日本人と米国人では大きく異なっていた。

(6) 現在までに、(4)で同定された蛋白のうち、約20個の蛋白でELISAにてその自己抗体陽性率を評価したが、自己抗体陽性率はいずれも50%以下であった。 今回のELISAでは、米国健康人血清が約20検体と少なかったため、cut off値の検討が不十分であったと考えられ、検体数を40検体前後に増やして再度検討する予定である。また米国人と日本人の大型血管炎患者では、AECAの対応抗原候補蛋白が大きく異なっていたことから、同一疾患においても疾患活動性や臨床症状などの臨床像との関連の有無など、さらに詳細な検討が必要であると考えられた。加えて、本研究よりAECAの対応抗原における人種別評価の重要性が示唆された。

#### 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4件)

- ① Karasawa R, Yudoh K, Ozaki S, Kato T. Anti-endothelial cell antibodies(AECA) in patients with systemic vasculitis: our research using proteomics. *Expert Opin Biol Ther* 2011;11: 77-87, 査読あり
- ② Karasawa R, Kurokawa MS, Yudoh K, Masuko K, Ozaki S, Kato T. Peroxiredoxin 2 is a novel autoantigen for anti-endothelial cell antibodies in systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol* 2010;161: 459-470, 査読あり
- ③ 唐澤里江、尾崎承一. 抗血管内皮細胞抗体、日本臨床、査読なし、68巻、2010、

705-707

- ④ 唐澤里江、遊道和雄. 血管炎患者における疾患特異的マーカーの検出、腎と透析、査読なし、68巻、2010、104-107

[学会発表] (計3件)

- ① Karasawa R, Tamaki M, Sato T, Ozaki S and Yudoh K. Useful biomarkers for Takayasu's arteritis. The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012. March, 2012, Tokyo, Japan.
- ② Karasawa R, Kato T, Ozaki S, Yudoh K. Novel autoantigen for anti-endothelial cell antibody (AECA) identified by proteomics in vasculitis. *Rheumatology*. April, 2010, Birmingham, UK.
- ③ Karasawa R, Kato T, Ozaki S and Yudoh K. The role of the autoantibodies to peroxiredoxin2, autoantigen for anti-endothelial cell antibody (AECA), in pathogenesis of systemic vasculitis. Annual European Congress of Rheumatology. June, 2010, Roma, Italy.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

唐澤 里江 (KARASAWA RIE)  
聖マリアンナ医科大学・医学(系)研究科  
(研究院)・講師  
研究者番号：50434410

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

遊道 和雄 (YUDOH KAZUO)  
聖マリアンナ医科大学・医学(系)研究科  
(研究院)・教授  
研究者番号：60272928