

## 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25年5月30日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590711

研究課題名（和文） 日本人クローン病のバイオマーカーの確立

研究課題名（英文） Establishment of biomarkers for Japanese patients with Crohn's disease

研究代表者

光山 慶一（MITSUYAMA KEIICHI）

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：20200066

研究成果の概要（和文）： phage display法により日本人クローン病(CD)患者に有用な抗原ペプチド（TCP353）を確立した。TCP353は既存の抗原とは相同性を認めず、TCP353で末梢血単核球を刺激するとCD単核球での炎症性サイトカインであるtumor necrosis factor- $\alpha$ 、interleukin-1、interleukin-6の産生亢進がみられ、対応抗原がCDの病態に関与することが示唆された。TCP353に対する抗体はCDに対する特異度90%、感度61.7%であり、有用なバイオマーカーとなることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： We isolated a novel peptide (TCP353) that specifically binds to sera from Crohn's disease (CD) patients using a phage display technique. TCP353 peptide stimulates the pro-inflammatory responses of CD mononuclear cells. An ELISA analysis for antibodies to TCP-353 demonstrated that while 61.7% of the samples from CD patients were seroreactive, seroreactivity was less common among patients with other diseases. TCP353 may have diagnostic, pathogenic and therapeutic significance with regard to the treatment of CD.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
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：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：クローン病、バイオマーカー、サイトカイン、TCP353

1. 研究開始当初の背景

近年、特定の疾病に相関して変化するバイオ

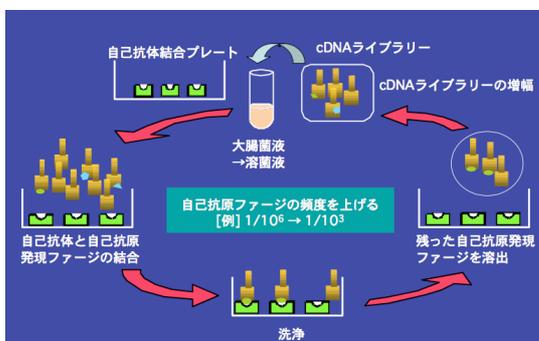
マーカーの臨床、病態上の意義が注目されている。炎症性腸疾患においても、主として欧米人患者において腸内細菌や食物抗原に対する抗 Flagellin 抗体、抗 OmpC 抗体、抗 I2 抗体、ASCA や、自己細胞に対する PCNA などがバイオマーカーとして報告されている。しかし、これらのマーカーの日本人患者での陽性率や特異性は必ずしも満足できるものでなく、日本人に有用なバイオマーカーの確立が急務である。

## 2. 研究の目的

- (1) フェージディスプレイ法の技術を用いて、日本人クローン病患者血清と特異的かつ高率に反応する抗原（ペプチド）を探索する。
- (2) 探索したペプチドのクローン病病態への関与を検討する。
- (3) 探索したペプチドに対する抗体のクローン病患者での特異性を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 大腸癌 cDNA を用いて作製した T7 フェージディスプレイライブラリーを、多数のクローン病患者血清中の IgG を用いてスクリーニングした（フェージディスプレイ法）[図 1]。クローン病患者血清と特異的に結合するファージを選別し、発現ペプチドのアミノ酸配列を決定した。



[図1] フェージディスプレイ法によるスクリーニング手順。

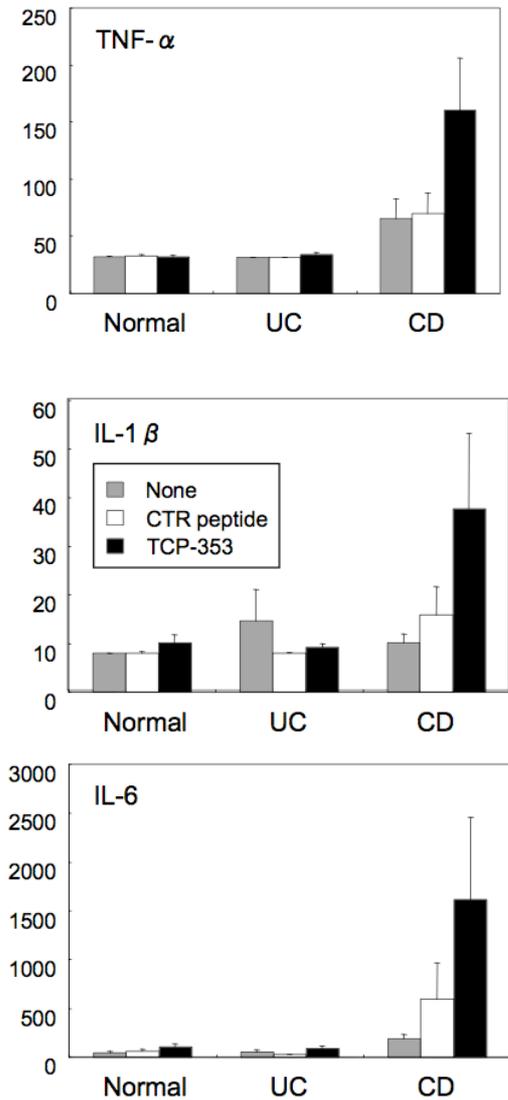
(2) クローン病、潰瘍性大腸炎、健常人より末梢血単核球を分離し、合成した抗原ペプチド(TCP353)の刺激下で 24 時間培養し、上清中の各種サイトカイン濃度(TNF, IL-1, IL-6, IL-10)を測定した。

(3) 合成した抗原ペプチド(TCP353)に対する抗体を用いて ELISA を構築し、久留米大学消化器内科、および福岡大学筑紫病院消化器科、鹿児島大学医学部消化器・生活習慣病学、琉球大学医学部光学医療診療部、宮崎大学医学部第二内科、長崎大学医学部光学医療診の計 6 施設に受診中のクローン病 196 例、潰瘍性大腸炎 210 例、その他の腸炎 98 例、膠原病 132 例、健常人 187 例での血清抗体価を測定した。さらに ASCA や各種マーカーとの関連を検討した。

## 4. 研究成果

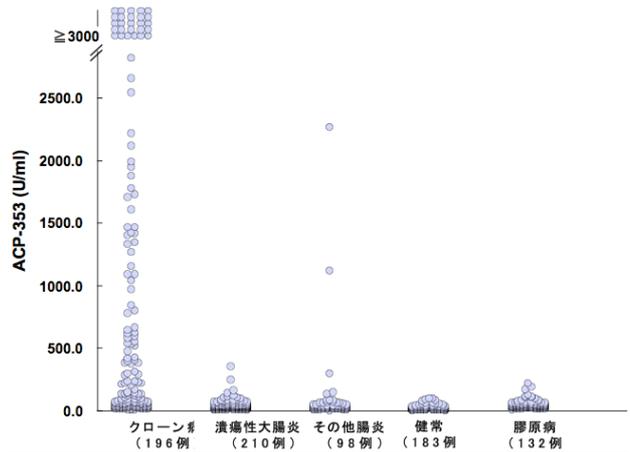
(1) 構築したペプチドELISAは、再現性、添加回収、希釈試験などの基礎的性能試験において良好な結果を示した。本新規抗原ペプチドのホモロジー検索では、既存のバイオマーカーを含む如何なる蛋白抗原とも相同性を認めなかった。

(2) 本新規抗原ペプチド(TCP353)で末梢血単核球を刺激すると、クローン病単核球では健常人単核球と異なり炎症性サイトカインTNF, IL-1, IL-6の産生亢進がみられた [図2]。一方、抗炎症性サイトカインIL-10の産生亢進はみられなかった。興味深いことに、潰瘍性大腸炎単核球ではクローン病単核球でみられたようなサイトカイン産生の変化は認められなかった。

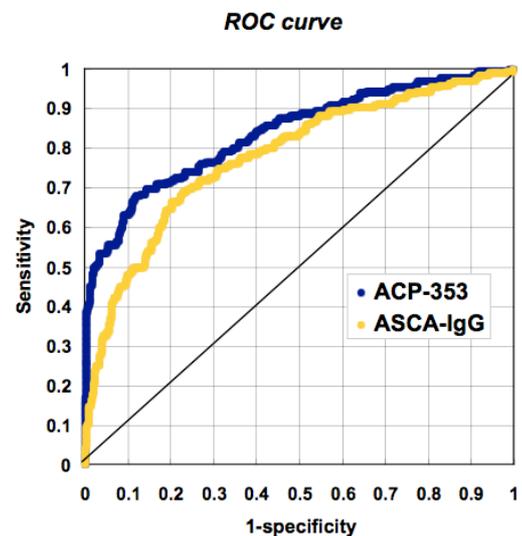


〔図2〕 抗原ペプチド(TCP353)刺激時の、クローン病、潰瘍性大腸炎、健常人の単核球からのサイトカイン産生能。

(3) 新規抗原ペプチドに対する抗体(ACP353)の血清抗体価の特異度が90%以上となるカットオフ値を求めて陽性判定した結果、クローン病61.7%、潰瘍性大腸炎7.3%、その他腸疾患0%、健常人2.8%であった〔図3〕。ROCカーブでも、本ペプチドに対する抗体価測定(ACP353)の方がASCAよりも高い有用性を示した〔図4〕。



〔図3〕 新規抗原ペプチドに対する抗体(ACP353)の血清抗体価



〔図4〕 ROCカーブの1比較

(4) 新規抗原ペプチドに対する抗体はクローン病に特異的で、ASCAより感度、特異度ともに高率であり、日本人クローン病の有用なバイオマーカーとなることが示唆された。さらに、本抗原ペプチドはクローン病の病態にも深く関与し、病因の追求、新規治療法の開発の面からも重要な因子と考えられた。今後、研究面では、抗原蛋白の同定や、トランスジェニックマウスの作製などにより、クローン病の病因、病態との関連を追及する予定である。臨床面では、班会議の臨床研究として全

国レベルでの前向き試験等を実施し、臨床的有用性を最終評価したい。

#### 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 Mitsuyama K, Niwa M, Masuda J, Kuwaki K, Yamasaki H, Takedatsu H, Kobayashi T, Sata M. Isolation and characterization of a novel short peptide associated with Crohn's disease. Clin Exp Immunol. 査読有. 2011. 166(1). 72-79.

DOI: 10.1111/j.1365-2249.2011.04444.x.

② 光山慶一, 佐田通夫. IBDとバイオマーカー：血清抗体の意義. IBD Research. 査読無. 2010. 4(4). 274-281.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

光山 慶一 (MITSUYAMA KEIICHI)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：20200066

##### (2) 研究分担者

山崎 博 (YAMASAKI HIROSHI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：20529565

桑木 光太郎 (KUWAKI KOTARO)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：60425171

竹田津 英稔 (TAKEDATSU HIDETOSHI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：80352144

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：