

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590441

研究課題名(和文) シトルリン化酵素 PAD による分子修飾に伴う病態修飾の解析と臨床応用

研究課題名(英文) Clinical application and biochemical analysis of the citrullinated proteins which catalyzed by peptidylarginine deiminase

研究代表者

丸山 直記 (Maruyama, Naoki)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長

研究者番号：00115940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円、(間接経費) 1,260,000 円

研究成果の概要(和文)：血中 human PAD4 (hPAD4) 濃度の測定系、及び hPAD4 自己抗体の検出系を確立した。RA 患者では hPAD4 高値を示すものがあつたのと同時にゼロ値を示すものが存在した。さらに、ゼロ値を示したほとんどの患者で hPAD4 自己抗体が陽性であつた。一方、健常者では RA 患者に比べて hPAD4 が低値であつた。今回確立した hPAD4 測定法及び hPAD4 自己抗体検出法は RA の早期診断へと応用できる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：We developed two novel methods for sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of human peptidylarginine deiminase 4 (hPAD4) and the detection of hPAD4 autoantibodies in the peripheral blood. The combination of these sandwich ELISA methods might be a potentially beneficial clinical tool for diagnosing RA.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：酵素 蛋白質 癌 シトルリン PAD

1. 研究開始当初の背景

Peptidylarginine deiminase (PAD) はペプチド中に含まれるアルギニンをカルシウムイオンの存在下でシトルリンに変換(シトルリン化)する機能を有する酵素である。動物種では5種類のPADのサブタイプが知られている。このシトルリン化により分子の機能や抗原性が変化し、様々な病態と関連することを我々は解析してきた。PADによるシトルリン化により誘導される変化は生理的なものと病理的なものが知られている。

2. 研究の目的

本研究では診断・治療に利用を目的としてPAD血中レベルとPAD自身に対する自己抗体の高感度測定法の確立を行う。これらの測定法を用いて各種疾患、特に関節リウマチと悪性腫瘍におけるPAD発現とその悪性度等の病態との相関を検討する。

3. 研究の方法

(1) 組み換えPAD4の作製

ヒト4型PAD (PAD4) cDNAを用いた組み換え蛋白を作製する。作製する組み換え分子はシトルリン化活性を有するものとする。そのため発現システムにおいては酵素活性を持たせる。

(2) PAD4に対するモノクローナル抗体の作製

作製した組み換えPAD4をBALB/cマウスに免疫し、モノクローナル抗体を樹立する。通常の酵素抗体法によりスクリーニングを行い、Western blotting法により確認を行う。

(3) 血中PAD4の高感度測定系の開発

血中PAD4の測定系は、組み換えPAD4蛋白を抗原としたサンドイッチELISA法を確立する。

(4) PAD4に対する自己抗体検出系の開発

リウマチ患者血清中にはPAD4自身に対する自己抗体が存在している。これまで用いられている方法を改良しより高感度の測定系を開発する。基本的には従来のELISA法の変法であり、標的抗原は組み換えPAD4分子である。

(5) 各種疾患の病理組織学および臨床病態との相関解析

対象とする主たる疾患はヒト神経膠芽腫(glioblastoma)である。

4. 研究成果

(1) 血中human PAD4 (hPAD4)濃度の測定系、及びhPAD4自己抗体の検出系を確立し、関節リウマチ(RA)患者の血中hPAD4濃度、及びhPAD4自己抗体の有無を調べた。即ち、hPAD4組換えタンパク質(rhPAD4)を大腸菌で発現、精製した。hPAD4に特異的なモノク

ローナル抗体を作製し、hPAD4に特異的なサンドイッチELISA法、及びhPAD4の自己抗体を検出するサンドイッチELISA法の2種類を確立した。そして、RA患者32例、健常者20例の血中hPAD4濃度及びhPAD4自己抗体の有無を測定した。その結果、RA患者ではhPAD4高値を示すものがあつたのと同時にゼロ値を示すものが存在した。さらに、ゼロ値を示したほとんどの患者でhPAD4自己抗体が陽性であった。一方、健常者ではRA患者に比べてhPAD4が低値であった。また、ゼロ値を示す健常者はいなかった。これらの結果から、RAの初期ではhPAD4が高値となり、やがてhPAD4の自己抗体ができる可能性が示唆された。今回確立したhPAD4測定法及びhPAD4自己抗体検出法はRAの早期診断へと応用できる可能性が考えられる。

(2) シトルリン化タンパク質を特異的に検出する抗体を作製し、固形腫瘍を中心にシトルリン化タンパク質の局在と病態との相関について解析を試みた。ヒト神経膠芽腫(glioblastoma)の病理組織を用いてシトルリン化タンパク質の免疫染色を行った結果、細胞増殖の盛んな神経膠芽腫ではシトルリン化蛋白質がほとんど染色されなかった。一方、神経膠芽腫に隣接する正常な神経細胞ではシトルリン化蛋白質が染色された。これらの結果から神経膠芽腫の成立に蛋白質のシトルリン化は関与しないと考えられる。他の癌での病態成立にシトルリン化蛋白質が関与するかは興味深い。

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4件)

Jang, B., Ishigami, A., Maruyama, N., Carp, R.I., Kim, Y.S., Choi, E.K. : Peptidylarginine deiminase and protein citrullination in prion diseases: Strong evidence of neurodegeneration. Prion 7: 42-46 (2013)

Ishigami, A., Uchida, Y., Miyazaki, T., Handa, S., Choi, E.K., Kim, Y.S., Kasahara, Y., Maruyama, N. : Two novel sandwich ELISAs identify PAD4 levels and PAD4 autoantibodies in patients with rheumatoid arthritis. Mod Rheumatol. 23: 794-803 (2013)

Jang, B., Jeon, Y.C., Choi, J.K., Park, M., Kim, J.I., Ishigami, A., Maruyama, N., Carp, R.I., Kim, Y.S., Choi, E.K. : Peptidylarginine deiminase modulates the physiological roles of enolase via citrullination: links between altered multifunction of enolase and neurodegenerative diseases. Biochem.

J. 445: 183-192 (2012)
Jang, B., Shin, H.Y., Choi, J.K., Nguyen, du P.T., Jeong, B.H., Ishigami, A., Maruyama, N., Carp, R.I., Kim, Y.S., and Choi, E.K. : Subcellular localization of peptidylarginine deiminase 2 and citrullinated proteins in brains of scrapie-infected mice: nuclear localization of PAD2 and membrane fraction-enriched citrullinated proteins. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 70: 116-124 (2011)

〔学会発表〕(計 4 件)

Kagami, Y., Shimada, N., Handa, S., Choi, E.K., Kim, Y.S., Ito, H., Maruyama, N., Ishigami, A. : Age-related changes of peptidylarginine deiminase 2 in the mouse brain. The 20th IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics (IAGG 2013), Seoul, Korea, 2013.6.26
Kim, H.J., Jang, B., Jin, J.K., Jeon, Y.C., Ishigami, A., Maruyama, N., Carp, R.I., Kim, Y.S., Choi, E.K. : Peptidylarginine deiminase 2-mediated protein citrullination in prion disease. The 20th IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics (IAGG 2013), Seoul, Korea, 2013.6.26
丸山直記、石神昭人 : hPAD4 測定及び hPAD4 自己抗体検出による関節リウマチの臨床診断. 第 57 回日本老年医学会関東甲信越地方会, 東京, 2013.3.23
石神昭人、半田節子、加賀美弥生、内田好昭、丸山直記 : hPAD4 測定及び hPAD4 自己抗体検出による関節リウマチ臨床診断薬の開発. 第 133 回日本薬学会, 横浜, 2013.3.28-30
加賀美弥生、半田節子、根本哲生、丸山直記、石神昭人 : 腫瘍組織におけるシトルリ化タンパク質の局在と病態との相関. 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2012.12.11-14
半田節子、加賀美弥生、内田好昭、笠原靖、丸山直記、石神昭人 : 関節リウマチの早期診断を目指した新規 hPAD4 測定法及び hPAD4 自己抗体検出法の確立. 第 85 回日本生化学大会, 福岡, 2012.12.14-16
原田彩佳、相澤真悟、千田美紀、丸山直記、石神昭人、千田俊哉 : マウス SMP30 の X 線結晶構造解析. 第 12 回日本蛋白質科学会年会, 名古屋 4, 2012.6.20-22
佐藤安訓、新井浩司、西山敏夫、野村義宏、岸本祐樹、相澤真悟、丸山直記、石神昭人 : ビタミン C の欠乏がマウス皮膚に及ぼす影響. 日本ビタミン学会第 64 回大会, 岐阜, 2012.6.22-23

天野晶子、角田誠、相垣敏郎、丸山直記、石神昭人 : ビタミン C 欠乏がカテコールアミン生合成系に及ぼす影響. 日本ビタミン学会第 63 回大会, 広島, 2011.6.11-12
相澤真悟、千田美紀、相垣敏郎、丸山直記、石神昭人、千田俊哉 : ヒト SMP30 の X 線結晶構造解析. 第 11 回日本蛋白質科学会年会, 大阪, 2011.6.7-9
天野晶子、角田誠、相垣敏郎、丸山直記、石神昭人 : SMP30/GNL ノックアウトマウスを用いたカテコールアミン生合成系に及ぼすビタミン C 欠乏の影響. 第 34 回日本基礎老化学会大会, 東京, 2011.6.15-17
石神昭人、相澤真悟、千田美紀、相垣敏郎、丸山直記、千田俊哉 : ヒトでの 1 回摂取によるビタミン C の血中移行、尿中排泄の検討. 第 135 回ビタミン C 研究委員会, 島根, 2011.9.2
丸山直記、石神昭人 : 老化・老年学による他研究領域への貢献. 第 9 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (PPF)2011, 箱根, 20110912-13
岩間水輝、野田義博、清水孝彦、丸山直記、石神昭人 : SMP30&SOD1 ダブルノックアウトマウスの病理学的解析. 第 33 回日本基礎老化学会シンポジウム, 千葉, 2011.10.08
加賀美弥生、石神昭人、丸山直記 : マウス卵巣における SMP30 の発現と調節機構. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011.12.12-16
相澤真悟、千田美紀、相垣敏郎、丸山直記、千田俊哉、石神昭人 : ヒト及びマウス SMP30/GNL の X 線結晶構造解析とデヒドロアスコルビン酸分解活性. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011.12.12-16
岸本祐樹、金井孝夫、下門健太郎、丸山直記、石神昭人 : ビタミン C 合成不全 SMP30/GNL 遺伝子破壊マウスを用いた妊娠、出産時のビタミン C 不足が新生児に与える影響. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011.12.12-16

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.aging-regulation.jp/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
丸山 直記 (MARUYAMA Naoki)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・研究部長
研究者番号 : 00115940
(2) 研究分担者

加賀美 弥生 (KAGAMI Yayoi)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療セ
ンター (東京都健康長寿医療センター研究
所)・研究員
研究者番号： 80557661