

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590714

研究課題名(和文) 質量イメージングによる関節リウマチ関節滑膜組織の疾患関連分子プロファイル解析

研究課題名(英文) Profile analysis of disease-related markers in synovial tissues of rheumatoid arthritis using imaging mass spectrometry

研究代表者

武内 徹 (Takeuchi, Tooru)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：10330078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：関節炎マウスではマクロファージやリンパ球などの免疫担当細胞の滑膜組織への浸潤と滑膜組織でのMMP-3,9、TGF- β 、VEGF発現の増加を認めたが、関節炎を誘導しなかったマウスではこれらの増加は見られなかった。関節滑膜組織より抽出した細胞内蛋白の発現を関節炎発症群と非発症群とで二次元電気泳動および安定同位体を用いた定量プロテオミクス的手法を用い比較検討し、12のピークが関節炎発症群で高く、その一つが α -enolaseであった。新鮮凍結滑膜組織からIMS用の超切片スライドの作成を試みたがスライドの作成困難であった。骨組織を含むことや組織切片は小さいことが原因であった。

研究成果の概要(英文)：This paper showed that the infiltration of inflammatory cells such as macrophages and lymphocytes into synovitis lesions and the expression of TGF- β , VEGF, MMP-3 and -9 in arthritis-model mice are elevated in comparison to control mice. Proteomics-based quantitative analysis showed the elevated expression of α -enolase and other unidentified markers in synovial tissues of arthritis. Tissue sections for imaging mass spectrometry could not be obtained by microtome because of bone tissues and small samples.

研究分野：膠原病

キーワード：関節リウマチ プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

(1) 関節リウマチ (RA) は多発関節炎を特徴とする全身性炎症性疾患である。抗 TNF 療法などの生物学的製剤やメトトレキサートなどが開発され、寛解が治療目標になるまで進歩してきた。一方、RA の病因や病態についてはいまだ不明な点も多い。RA 患者の血清および関節液を用い疾患特異的バイオマーカーや疾患活動性を反映するバイオマーカーの探索をプロテオミクス的手法を用い網羅的に行われてきた (Proteomics Clin Appl 2009; 3: 226-241)。我々も炎症性蛋白、抗炎症性蛋白、脂質関連蛋白、組織のクリアランスに関連する蛋白などの血清蛋白が、疾患活動性の低下とともに変動することや関節液中に、フィブリノーゲンやビメンチンなどの自己抗原として注目されているシトルリン化蛋白を明らかにした (J Chromatogr B. 2007, 臨床病理 2010, Ann Clin Biochem. 2008)。しかし、いずれの報告においても、血清および関節液中に含まれるアルブミンや免疫グロブリンなどの主要な血清蛋白が解析を難しくさせ、RA の炎症の主座である滑膜病変を反映するバイオマーカーの解析には至っていない。

(2) RA 滑膜組織に対する研究としては、主に免疫組織学的な手法を用いた解析がなされている。モノクローナルな特異抗体を用い、マクロファージやリンパ球などの免疫担当細胞が滑膜組織に浸潤し、IL-6 や TNF- などの炎症性サイトカイン、MMP-3 などの骨・軟骨の破壊に関連するメディエーターなどが発現していることが明らかになっている (N Engl J Med 2000; 343: 1594-1602)。これら免疫組織学的な手法を用いた解析では、分子および細胞に対する特異抗体を用いるため、既知の分子の局在や発現量を検討するのに有用である。しかし、未知の分子や細胞の組織学的な解析に対しては、時間、費用、労力を要し、網羅的な解析が可能な新たな手

法が求められていた。

(3) 質量イメージング (IMS) は金被膜プレート上のペプチド分子をイオン化試薬により重層後、N₂レーザーを照射しプロトン化し質量分析計で連続モニターし可視化 (画像化) する手法である (JASMS.1999)。この技術の発表を契機に、さらに技術開発研究が進み、ホルマリン固定パラフィン包埋組織 / 凍結新鮮組織切片の任意の部位の生体分子をイオン化し、そのプロトン化イオンの m/z を連続的にモニターすることにより、生体分子の構造情報と同時に、組織切片内の空間的局在性及びその量的変動情報までもが得られる様になり、IMS法は免疫学組織的手法とは異なる新たな解析法として注目されている。

2. 研究の目的

本研究は確立された RA モデルマウスである慢性関節炎モデル SKG マウスを用い、IMS法、安定同位体を用いた定量プロテオミクス法および免疫組織学的手法により、関節炎に関連する鍵となる未知の分子を同定し、その空間的局在性及び量的変動を解析する。

3. 研究の方法

(1) 慢性関節炎モデル SKG マウスは Specific Pathogen Free 環境下に飼育し、真菌菌体を皮下投与することで関節炎を誘導する。関節炎発症後、関節炎を評価し、採血後・過剰麻酔により屠殺する。直ちに足関節を摘出し、液体窒素にて凍結保存する。血液は遠心分離し、血清を -70 で保存する。

(2) 新鮮凍結滑膜組織から超切片スライドを作成し、ホルマリン固定後にマクロファージやリンパ球などの免疫担当細胞に発現する CD4・CD8 など、炎症性メディエーターである MMP-3、IL-6、TNF- など、シトルリン化蛋白の候補である vimentin に対する標識モノクローナル抗体にて免疫染色をする。得られた画像をイメージング機能搭載した UltrafleTreme (MALDI- TOF-MS 装置,

Bruker-Daltonics 社) に転送する。

(3) 上記と同一の新鮮凍結滑膜組織から IMS 用の超切片スライドを作成し、スライド上でトリプシン消化後(37℃、1.5 時間)、マトリクス(イオン化試薬:ジヒドロ安息香酸、ジヒドロ酪酸)を塗布し、ultrafleXtreme に挿入する。免疫組織における組織内局在情報を基に直接、関節組織超切片に N2 レーザーを照射し、組織超切片全体を 10 から 200 μm ステップでマススペクトル(MS)を連続測定する。連続して得られた MS 強度を基に各質量の組織切片内の空間的を可視化(画像化)する。免疫組織染色画像を参考に、酵素消化・マトリクス・N2 レーザーの強度など最適な条件を決める。関節炎発症群(20 匹)と非発症群(20 匹)の IMS を比較検討する。空間的局在性および量的に差異を認める IMS について、さらに MS/MS 法で分子を同定し、関節炎との関連性を検討する。

(4) 関節滑膜組織より抽出した細胞内蛋白の発現を関節炎発症群と非発症群とで比較検討する。両群の滑膜組織より抽出キットを用い細胞内蛋白を抽出し、蛋白定量を行う。両群を等量に混合したものをコントロールとして、関節炎発症群または非発症群とコントロールをそれぞれ安定同位体 ¹³C 6 個で標識された試薬と非標識の試薬により蛋白質のトリプトファン残基を標識する。これらを混ぜ合わせ還元・アルキル化しトリプシン消化した後、質量分析計でピーク強度の差をタンパク質量の差として定量する。

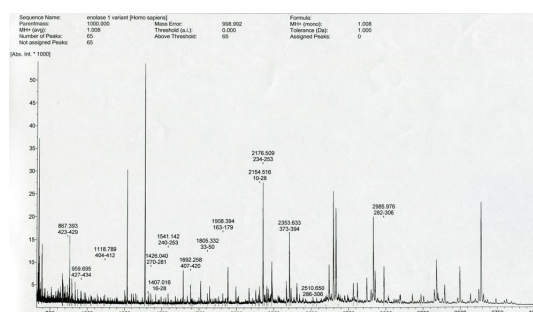
4. 研究成果

(1) 関節炎マウスではマクロファージやリンパ球などの免疫担当細胞の滑膜組織への浸潤と滑膜組織での MMP-3,9、TGF-β、VEGF 発現の増加を認めた。関節炎を誘導しなかったマウスでは炎症細胞の浸潤、MMP-3,9、TGF-β、VEGF 発現の増加は見られなかった。既報と同様の結果が得られた。シトルリン化蛋白については、滑膜組織での

発現を確認できなかった。

(2) 新鮮凍結滑膜組織から IMS 用の超切片スライドの作成を試みた。しかし、骨組織を含むために超切片を作ることができずスライドの作成困難であった。そのため、滑膜組織のみを関節から剥離し超切片スライドを作成する手法を試みた。組織切片の剥離は可能であったが、組織切片は小さく IMS による解析は困難であった。

(3) 関節滑膜組織より抽出した細胞内蛋白の発現を関節炎発症群と非発症群とで二次元電気泳動および安定同位体を用いた定量プロテオミクス的手法を用い比較検討した。その結果、蛋白発現量が 2 倍以上あるピークを 12 個見出した。関節炎発症群と非発症群それぞれに発現量が多いピークがあった。これらのピークについて、蛋白の同定を試み、2 つのピークは α-enolase であった(下図)。他のピークに関しては解析中である。



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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武内 徹 (TAKEUCHI Tooru)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：10330078

(2)研究分担者

中西 豊文 (NAKANISHI Toyofumi)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10247843

槇野 茂樹 (MAKINO Shigeki)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：20268204

小谷 卓矢 (KOTANI Takuya)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：80411362

(3)連携研究者

なし