

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
田伏洋子	主査 教授 田 窪 孝 行
	副査 教授 木 下 光 雄
	副査 教授 林 秀 行
	副査 教授 花 房 俊 昭
	副査 教授 佐 浦 隆 一
主論文題名 Detection of citrullinated proteins in synovial fluids derived from patients with rheumatoid arthritis by proteomics-based analysis (プロテオミクス手法を用いた関節リウマチ患者関節液中のシトルリン化タンパクの検出)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究目的》</p> <p>関節リウマチ(RA)は、関節破壊・変形を主症状とする自己免疫疾患で、現在膠原病領域で最も注目されている疾患の一つである。従来より RA の診断マーカーとしてリウマチ因子が広く用いられているが、近年では感度・特異度の優れた診断マーカーとして抗 cyclic citrullinated peptide (CCP) 抗体が注目されている。</p> <p>また、ホールゲノムアプローチによる RA 関連遺伝子解析の成果として <i>PADI4</i> (<i>peptidylarginine deiminase 4</i>)が RA 関連遺伝子として同定されている。PADI はタンパク質中のアルギニン残基をシトルリン残基に変換する作用を持つ酵素の総称であり、PADI4 は滑膜に多く発現すると報告されている。何らかの条件下で PADI4 によるシトルリン化が亢進し、その結果自己ペプチドのシトルリン化の質と量に変化が生じ、抗 CCP 抗体の産生をはじめとする自己免疫反応がおこり、RA を発症するという仮説が考えられている。関節中シトルリン化タンパクの役割については未だ明らかにされていないが、その解析は RA の病態解明に有用である。これまでもシトルリン化タンパクの検索が行われているが、その検出法は免疫染色や Western Blot 法による候補タンパクの存在証明が主流であり、シトルリン化タンパクの網羅的解析は殆ど行なわれていない。</p> <p>プロテオミクスは質量分析器を用い、発現しているタンパク全てについて網羅的に検出・同定する手法である。近年のプロテオミクス技術の急速な進歩に伴い fmol 単位の微量試料からの同定が可能となり、様々なバイオマーカーが同定され診断および治療への応用が期待されているが、リウマチの分野での応用は少ない。</p> <p>そこで本研究では、プロテオミクスの手法を用いた関節リウマチ患者関節液中のシトルリン化タンパクの同定を試みた。</p> <p>《対象と方法》</p> <p>大阪医科大学整形外科を受診し、関節穿刺が行なわれた RA 患者 10 例の関節液を対象とした。関節液をヒアルロニダーゼ処理後可溶化緩衝液にて処理し、sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) によりタンパク分離した。一方は、銀染色し、またもう一方は PVDF</p>	

膜に転写し一次抗体に抗シトルリン抗体を用いて、enhanced chemiluminescence system (ECL Plus)により陽性バンドを検出した。次に陽性バンドに一致した部位を銀染色したゲルより切り抜き、トリプシンによるゲル内消化後、Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) にてシトルリン化タンパクを同定した。

免疫沈降法、Western Blot 法を用い、得られたシトルリン化タンパクが関節液中に存在することを証明した。

《結果》

1) RA 関節液をタンパク分離し、シトルリン抗体を一次抗体とした SDS-PAGE-WB-ECL 検出で、数本のバンドを認めた。MALDI-TOF MS 検出にて、陽性バンドから、fibrinogen、fibronectin、vimentin を同定した。

2) 抗 fibrinogen 抗体を用いた免疫沈降法にて RA 関節液より得られた抽出物に、一次抗体に抗シトルリン抗体、抗 fibrinogen 抗体を用い、Western Blot を行なった。クマシー染色、抗シトルリン抗体、抗 fibrinogen 抗体における Western Blot 陽性バンドは一致し、シトルリン化 fibrinogen の存在が確認された。

3) RA 関節液をタンパク分離し、抗 vimentin 抗体を一次抗体に用いて Western Blot を行なった。得られたバンドと、vimentin を検出した部位の銀染色のバンドは一致しており、シトルリン化 vimentin の存在が確認された。

《考察》

本研究は関節リウマチ患者関節液中の 3 種類のシトルリン化タンパク、シトルリン化 fibrinogen、シトルリン化 fibronectin、シトルリン化 vimentin、をプロテオミクス的手法を用いて同定したものである。

従来、関節液中のシトルリン化タンパクの検索には主に Western Blot 法や免疫染色が用いられており、その同定には候補タンパクが必要であった。また、プロテオミクスによる解析では関節滑膜を検体に用いており、関節液と異なり多数の検体を得るのは困難であった。申請者は関節液を検体に用い、プロテオミクス的手法でシトルリン化タンパクの検索を網羅的に行なった。

本研究により、関節リウマチ患者のシトルリン化タンパク検出において、関節液を用いた (SDS-PAGE-WB-MALDI-TOF MS 法による)プロテオミクス手法の有用性が証明された。今後、本法を用いた更なるシトルリン化タンパクの検出は、RA 病態解明の糸口になると期待される。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	乙 第 号	氏 名	田 伏 洋 子
論文審査担当者		主 査 教 授 田 窪 孝 行	
		副 査 教 授 木 下 光 雄	
		副 査 教 授 林 秀 行	
		副 査 教 授 花 房 俊 昭	
		副 査 教 授 佐 浦 隆 一	
主論文題名			
<p>Detection of citrullinated proteins in synovial fluids derived from patients with rheumatoid arthritis by proteomics-based analysis (プロテオミクス手法を用いた関節リウマチ患者関節液中のシトルリン化タンパクの検出)</p>			
論文審査結果の要旨			
<p>近年、関節リウマチ (RA) において、感度・特異度の優れた診断マーカーとして抗 cyclic citrullinated peptide (CCP) 抗体が注目されている。抗原となるシトルリン化タンパクの役割は明らかでないが、その解析は RA の病態解明に有用だと考えられている。申請者は本研究において、プロテオミクス手法を用い、RA 患者関節液中シトルリン化タンパクを網羅的に検索している。</p> <p>その結果、申請者は、SDS-PAGE-WB-MALDI-TOF MS 法にて、RA 関節液より 3 種類のシトルリン化タンパク、すなわち、シトルリン化 fibrinogen、シトルリン化 fibronectin、シトルリン化 vimentin、を同定した。</p> <p>本研究により、RA 患者のシトルリン化タンパク検出において、関節液を用いたプロテオミクス手法の有用性が証明された。申請者の手法では、従来行なわれてきた Western Blot 法や免疫染色のように候補タンパクは必要なく、シトルリン化タンパクの網羅的な検索が可能である。また、検体が関節液であるため関節滑膜に比し多数の検体を得る事ができる。本論文で申請者は関節液を検体とした新しいシトルリン化タンパク検出法を確立した。今後、本法を用いた更なるシトルリン化タンパクの検出は、RA 病態解明の糸口になると期待される。</p> <p>以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) Annals of Clinical Biochemistry 45: 413-417, 2008</p>			