

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

内田 貞輔

専攻分野：疾患プロテオーム・分子病態治療学

コース：

指導教授：加藤 智啓

主論文の題目：

Comparative Proteomic Analysis of Neutrophils from Patients with Microscopic Polyangiitis and Granulomatosis with Polyangiitis
(顕微鏡的多発血管炎と多発血管炎性肉芽腫症における患者好中球のプロテオームの比較解析)

共著者：

Kouhei Nagai, Toshiyuki Sato, Nobuko Iizuka, Mitsumi Arito, Yukiko Takakuwa, Hiromasa Nakano, Seido Ooka, Manae S. Kurokawa, Naoya Suematsu, Kazuki Okamoto, Shoichi Ozaki, Tomohiro Kato

緒言

顕微鏡的多発血管炎 (Microscopic Polyangiitis、MPA) と多発血管炎性肉芽腫症 (Granulomatosis with Polyangiitis、GPA) は共に、抗好中球細胞質抗体 (Anti-neutrophil cytoplasmic antibody、ANCA) 関連血管炎に含まれ、全身の毛細血管や細動静脈等の小型血管の炎症を主体とした疾患である。ANCA が共通して検出されることから、好中球の異常が病態に深く関わっていると考えられているが、未だその病因・病態は明らかにされていない。また、両疾患は初期症状が似ているものの、治療や再発のリスク、生命予後が異なるため、発症初期に両疾患を鑑別し適切な治療を開始し、また維持していく必要がある。出現する ANCA のサブタイプが診断鑑別に有用とされているが、特異度は高いとは言えず、他疾患でも検出されるなど、それだけで確定診断には至らない。本

研究では、好中球蛋白質の網羅的解析を行い、疾患特異的マーカーや病因病態の解明の助けとなる蛋白質を探索した。

方法・対象

米国リウマチ学会の血管炎診断基準とチャペルヒル分類を用いて ANCA 関連血管炎と診断した患者 20 例 (MPA11 例、GPA9 例) および、比較対象として健常者 (Healthy Control、HC) 10 例より、インフォームド・コンセントを得たうえで末梢血を採取した。末梢血より好中球を分離し、そこから抽出した蛋白質を 2-Dimensional Fluorescence Difference Gel Electrophoresis (2D-DIGE) 法により定量比較した。MPA、GPA、HC の 3 群間で発現量に有意差を認めた蛋白質スポットについて、質量分析法により蛋白質を同定した。また、蛋白質定量情報を SIMCA-P[®] による principal component analysis (PCA)、orthogonal partial-least-squares-discriminate analysis (OPLS-DA) などの多変量解析を用いて評価し、さらに疾患特異的マーカーの候補タンパク質に関しては、receiver operating characteristic (ROC) 曲線を用いて検討した。

なお本研究は、聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会 (承認 794 号) の承認を得たものである。

結果

好中球蛋白質の 2 次元電気泳動の結果、1 検体あたり 864 個の蛋白質スポットが得られた。その中で MPA、GPA、HC の 3 群間において分散分析 (ANOVA) で有意差 ($p < 0.05$) があるスポットが 55 個認められ、そのうち、31 個のスポットを質量分析法により同定した。SIMCA-P[®] による OPLS-DA 解析で検討したところ、同定された 31 個のタンパク質スポットの定量情報を用いて、血管炎群 (MPA 群と GPA 群) と HC 群を完全に分離することができた。MPA 群と GPA 群を鑑別するマーカーとなる蛋白質スポットを探索したところ、13 個の蛋白質スポット (10 個の蛋白質) の定量情報を用いて両群を鑑別することができた。さらに ROC 曲線を用

いて検討したところ、neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) と A-kinase anchor protein 7 isoforms alpha and beta (AKAP7) の組み合わせで高い鑑別能力（感度 100%、特異度 75%、ROC 曲線下面積 89.6%）があることが示された。

考察

末梢血好中球の蛋白質発現情報を用いて、MPA 群、GPA 群、HC 群をそれぞれ完全に判別することができた。このことから、3 群間の蛋白質の発現プロファイルが異なっており、これら発現の異なる蛋白質が ANCA 関連血管炎の病因病態や MPA、GPA 間での病因病態の違いと関連性が高いと考えられた。同定された蛋白質は、好中球の接着や遊走機能に関わる蛋白質、細胞骨格に関連する蛋白質、および、抗酸化作用、蛋白質の構造維持に関わる蛋白質であった。特に、GPA においては、炎症と関連する蛋白質の発現の増強が多く認められた。

結論

本研究では、末梢血好中球の蛋白質発現プロファイルを用いて MPA 群、GPA 群、および HC 群を鑑別することができた。3 群間で発現に有意な差が見られた蛋白質は GPA と MPA の鑑別マーカーとして利用できる可能性がある。また、これらの蛋白質が血管炎の病態、病因に関与している可能性がある。