

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

吉岡 拓也

専攻分野：生化学

コース：疾患プロテオーム・分子病態治療学

指導教授：加藤 智啓

主論文の題目：

Protein Profiles of Peripheral Blood Mononuclear Cells as a Candidate Biomarker for Behcet's Disease.

(末梢血単核球の蛋白質プロファイルは、ベーチェット病のバイオマーカー候補である)

共著者：

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

緒言

ベーチェット病(Behcet's Disease, BD)は再発性の急性炎症発作を特徴とする全身性血管炎である。BDの病因は不明であるが、T細胞や単球・マクロファージによるTh1優位の免疫異常が報告されている。またBDのバイオマーカーはHLA-B51等いくつか提唱されているが、未だ有用なものは確立されていない。我々はBD患者、健常人(healthy control, HC)、関節リウマチ(rheumatoid arthritis, RA)患者及びクローン病(Crohn's disease, CD)患者の末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)で発現している蛋白質を網羅的に解析し、BDの病態解析および新規バイオマーカー候補の検出を試みた。

方法・対象

BD 16例、RA 16例、CD 12例及びHC 16例より、同意のもとPBMCを

採取した。PBMC より抽出した蛋白質を用い 2 次元ディファレンシャルゲル電気泳 (2 dimensional-differential image gel electrophoresis, 2D-DIGE) を行い、得られた蛋白質スポットの強度を全て測定した。蛋白質の同定はマトリックスレーザー脱離イオン化法を用い、データベース検索により行った。統計学的有意差は、Student-t 検定により計算した。疾患判別モデル作製は、直交部分最小二乗判別分析 (orthogonal partial least square-discriminant analysis, OPLS-DA) により行った。本研究は聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会 (第 794 号) の承認を得て施行した。

結果

2D-DIGE の結果、1 症例あたり 563 個の蛋白質スポットが得られた。BD 群で HC 群に比較し 1.2 倍以上の強度を示した蛋白質スポットを 14 個、-1.2 倍 (1/1.2) 以下の強度を示したスポットを 9 個検出した ($p < 0.05$)。BD 群と RA 群の比較では、BD 群で 1.2 倍以上の強度を示したスポットを 98 個、-1.2 倍以下を示したスポットを 17 個検出した ($p < 0.05$)。BD 群と CD 群では、BD 群で 1.2 倍以上のスポットを 227 個、-1.2 倍以下のスポットを 141 個検出した ($p < 0.05$)。

蛋白質スポット強度を用い疾患判別モデルを作製した結果、BD 群と HC 群間、BD 群と RA 群間、及び BD 群と CD 群間は、全 563 個の蛋白質スポットの強度を用い完全に判別できた。判別に用いるスポット数の減少を試みたところ、BD 群と HC 群間は 23 個のスポット強度により完全に判別できた (BD/HC-23 model)。同様に、BD 群と RA 群間は 35 個 (BD/RA-35 model)、BD 群と CD 群間は 1 個 (BD/CD-1 model) のスポット強度より、完全に判別できた。この 1 個のスポット強度は、CD 群を RA 群と HC 群からも完全に判別した ($p < 0.05$)。

BD の病態に関与する蛋白質を同定するため、BD 群と HC 群間で 1.2 倍以上の強度差を示しかつ BD/HC-23 model に使用された 16 個、BD 群と RA 群間で 1.5 倍以上の強度差を示しかつ BD/RA-35 model に使用された

20 個、BD 群と CD 群間で BD/CD-1 model に用いた 1 個のスポットの同定を試みた。その結果、BD 群と HC 群間で 11 個、BD 群と RA 群間で 9 個、BD 群と CD 群間で 1 個の合計 21 個のスポットから 16 個の蛋白質を同定した。それらは、細胞骨格、転写/翻訳、T 細胞活性化、骨代謝、アポトーシス制御、微生物感染に関わる蛋白質であった。

BD 群と非 BD 群の判別を少数スポットにより試みたところ、tyrosine-protein phosphatase non-receptor type4、threonine synthase-like 2、 β -actin の 3 個のスポット強度の組合せ (BD/nonBD-3 model) にて受信者動作曲線下面積 0.889、感度 81.3%、特異 93.2%を得た。CD 群と非 CD 群を完全に判別したスポットは、上記と異なる β -actin のスポットであった。

考察

PBMC の蛋白質プロファイルは BD の鑑別に有用と考えられ、特に BD/nonBD-3 model は臨床応用に十分な高い感度、特異度を示した。今後はより多くの患者を用いて、当モデルを評価する必要がある。BD/CD-1 model のスポット強度について、以前に CD と潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis, UC) の鑑別を PBMC の 2D-DIGE で試みた研究結果を用いて検討したところ、CD と UC はほぼ同じ値を示した (CD 1.462 ± 0.523 AU、UC 1.467 ± 0.377 AU)。BD/CD-1 model は、炎症性腸疾患と他疾患の鑑別に有用な可能性がある。BD/nonBD-3 model と BD/CD-1 model で異なる β -actin のスポットが使用されたが、これは翻訳後修飾の違いを示している可能性が考えられる。

結語

BD で発現が変化している新規の蛋白質を同定した。これらの蛋白質は協働して BD の炎症に関与していると考えられる。T 細胞、B 細胞、NK 細胞、単球に発現されている蛋白質を個別に解析することにより、BD の疾患メカニズムのより詳細な解明が期待される。