

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

野澤 洋平

専攻分野：最新医学研究コース

コース：

指導教授：加藤 智啓

主論文の題目：

Comprehensive Analysis of Surface Proteins of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE 患者末梢血単核球の表面蛋白質プロファイルの解析)

共著者：

Mitsumi Arito, Kazuki Omoteyama, Masaaki Sato, Yukiko Takakuwa, Seido Ooka, Manae S. Kurokawa, Tomohiro Kato

緒言

全身性エリテマトーデス (SLE) は、様々な自己抗体の産生を特徴とする原因不明で難治性の自己免疫疾患である。皮膚や腎臓など多臓器の障害を起し、また抗核抗体や抗二本鎖 DNA 抗体・低補体など特徴的な検査所見が認められる。自己抗体の産生機序は不明であり、病因論的意義も不詳である。SLE の病因を解明するためにそれを探索する新たな方法が必要である。

細胞表面蛋白質は、細胞内外の情報を伝達する役割を担っている。そのため、その発現もしくは翻訳後修飾の異常が疾患発症の要因となりうる。その点において、SLE においても病因探索の切り口となりえる。対象分子を絞った場合には fluorescence activated cell sorting (FACS) 解析が有効であり、実際に、複数の研究グループにより SLE 患者の末梢血単核球における様々な細胞表面蛋白質の異常が明らかにされている。しかし、FACS は、限られた特定の細胞表面蛋白質のみを解析する方法であるため、細胞表面蛋白質を網羅的に解析することはできない。

そこで本研究では、SLE 病態解析を進める方法として、細胞表面蛋白質を標的とした網羅的解析法を用いて、SLE 患者の末梢血単核球の表面蛋白質プロファイルを検討した。

方法・対象

SLE 患者および対照として健常者各 5 人より血液を採取した。調製した末梢血単核球の表面蛋白質をビオチン化標識後に溶解させ、アビジンビーズによりビオチン標識された細胞表面蛋白質のみを回収した。その後、蛍光色素標識二次元電気泳動に供し、表面蛋白質を網羅的かつ定量的に検出し、SLE 群と健常群の細胞表面の蛋白質プロファイルを比較した。また、両群間でスポット強度差が特に大きいスポットについて、蛋白質を質量分析にて同定した。なお、本研究は、聖マリアンナ医科大学の生命倫理委員会の承認を得ている（第 794 号）。

結果

上記電気泳動の結果、計 468 個の蛋白質スポットが得られた。SLE 群と健常群間でスポット強度差が ± 1.5 倍以上の蛋白質スポットが 137 個（29.3%）あり、その中でスポット強度差が ± 2.5 倍以上のスポットが 44 個（9.4%）であった。

次に、SLE 群と健常群間で強度差が ± 2.5 倍以上の蛋白質スポット 44 個のスポットを蛋白質同定の対象とし、そのうち 17 個のスポットについて構成蛋白質を同定した。17 個のスポットのうち 13 個のスポットは SLE 群で強度が高く、myeloblastin、cyclin-L1、leukocyte elastase inhibitor、DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB11-2b、POTE ankyrin domain family member F、および actin が同定された。残り 4 個の蛋白質スポットは、SLE 群で強度が減弱しており、heterogenous nuclear ribonucleoprotein H、pyruvate kinase PKM、tubulin alpha-4A chain が同定された。

考察

一般に細胞表面蛋白質の解析には FACS が用いられる。FACS では、解析対象とする膜表出蛋白質の蛍光標識抗体で染色し、蛍光強度を抗原量として定量的に測定する。そのため表出している蛋白質のみを解析でき

るが、使用できる蛍光の種類が限られているため、一度に数種類の蛋白質しか解析できない。一方、本研究での方法は、表出する蛋白質すべてをビオチン標識するため、解析対象となる蛋白質の種類に制限はない。ただし、ビオチン標識後、細胞を破碎し、アビジンビーズにより精製し二次元電気泳動に供するため、膜表出蛋白質に加えて細胞膜付近で膜表出蛋白質と結合している蛋白質も解析対象となる。このことから本法は、細胞膜局在蛋白質のプロファイルを調べるのにも適している。研究の目的により細胞表面蛋白質ビオチン標識法と FACS は使い分けられるのが实际的であろう。

本研究で、SLE 患者の末梢血単核球の細胞膜に局在しているタンパク質として、アクチンなど本来細胞質ゾルに局在する蛋白質や Cyclin-L1 など本来核に局在する蛋白質が同定された。これら同定蛋白質が細胞膜に表出しているのか、細胞膜表出蛋白質と結合していたために検出されたのかは、今後個別に調べなければならない。また、本来局在する場所からの細胞膜付近への移動が SLE の病態とどのように関係するのかも今後調べなければならない課題である。

結論

細胞表面蛋白質のビオチン標識により、SLE 患者の末梢血単核球の細胞表面蛋白質の網羅的解析が可能であることが示された。SLE 患者の末梢血単核球の表面蛋白質プロファイルは、健常者のそれとは大きく異なっており、SLE 病態を調べるための新しいアプローチになる可能性がある。