



図3 皮膚、脳、および肋軟骨のヒアルロン酸量 (胎生18.5日) 野生型 (+/+), ヘテロ接合体 (+/-), ホモ接合体 (-/-)。

### 3. 抗デコリン抗体 6B6 の性状解析と有用性の検討

渡辺秀人 (愛知医科大学分子医科学研究所助教授)

デコリンは、皮膚、軟骨、血管を始め全身の組織の細胞外マトリックスに幅広く存在する小型のプロテオグリカンである。現在、抗デコリンマウスモノクローナル抗体として 6B6 が市販されているが、本抗体の認識部位は同定されておらず、それどころかデコリンを認識するという確たる証拠は得られていない。そこで我々は、本抗体のエピトープを同定し、本抗体が免疫染色とサンドイッチ Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) 法に有用であることを明らかにした。軟骨のマトリックスにもデコリンは存在しコラーゲン繊維の構造と代謝に何らかの役割を果たしていると考えられる。本研究結果は軟骨マトリックス構造と機能の研究に結びつく重要な基礎データを提供するものと考えられる。

#### 分担研究者

木全弘治

(愛知医科大学分子医科学研究所)

#### A. 研究目的

デコリンは、皮膚、軟骨、血管を始め全身の組織の細胞外マトリックスに幅広く存在する小型のプロテオグリカンである。現在、抗デコリンマウスモノクローナル抗体として 6B6 が市販されているが、本抗体の認識部位は同定されておらず、それどころかデコリンを認識するという確たる証拠は得られていない。そこで本研究では、6B6 のエピトープを同定し、本抗体の有用性を検討した。

#### B. 研究方法

市販のヒトデコリンコア蛋白質 cDNA 断片と polymerase chain reaction (PCR) により新たに調製した上流部位の cDNA を繋いで、ヒトデコリ

ンコア蛋白質 cDNA 全長を得た。この cDNA 全長を大腸菌発現系を用いて発現させた。また、cDNA の部分を PCR 法により調製し、同様にコア蛋白質の特定部位を発現させ、エピトープの同定に用いた。ウシ天然デコリン、天然ピグリカンはシグマ社より、コンドロイチナーゼ ABC は生化学工業より購入した。抗原に対する抗体の認識はウエスタンブロット法にて評価した。免疫染色は通常の間接法にて行い DAB にて発色させた。

#### C. 研究結果と考察

6B6 はウエスタンブロット法において天然デコリンを認識したがピグリカンは認識しなかった。デコリンはコンドロイチナーゼ ABC 処理すると反応性が高まった。還元下のサンプルも反応することから本抗体はデコリンコア蛋白質の一時構造 (アミノ酸配列) を認識すると考えられた。デコリンコア蛋白質の各部分を大腸

菌発現系にて発現させ、同様にウエスタンブロット法にて反応を検討したところ、アミノ酸 50-65 を包含するシステインクラスター部位にエピトープが絞り込まれた。このシステインクラスター部位はビグリカンとも高い相同性を有する部位であるが、6B6 がビグリカンとは反応しない事実から、この 16 アミノ酸残基 (50-65) の微細な際が抗体の認識を決定していると考えられた。

6B6 を免疫染色に用いたところ、皮膚組織に強い染色性が認められた。ウエスタンブロットとは異なり、組織に対するコンドロイチナーゼ ABC の全処理を加えても染色強度に変化はみられなかった。このことは組織において、すでに抗体が接近しようようにエピトープが配置していることを示唆している。

さらに 6B6 と市販の別の抗デコリン抗体、Ly111 を用いて天然デコリンに対するサンドイッチ ELISA 法を開発した。約 1  $\mu\text{g/ml}$  デコリンまでの感度の系が得られた。

本研究では抗デコリンマウスモノクローナル抗体 6B6 のエピトープ決定と本抗体の有用性を検討した。

#### D. 結論

本研究では抗デコリンマウスモノクローナル抗体 6B6 のエピトープ決定と本抗体の有用性を検討した。軟骨のマトリックスにもデコリンは存在しコラーゲン繊維の構造と代謝に何らかの役割を果たしていると考えられる。本研究結果は軟骨マトリックス構造と機能の研究に結びつく重要な基礎データを提供するものと考えられる。

#### E. 学会発表

1. デルマタン硫酸プロテオグリカンに対するモノクローナル抗体、6B6 が認識するエピトープの同定  
澤田啓生、篠村多摩之、渡辺秀人、辻卓夫、木全弘治  
第 73 回日本生化学会大会 (横浜)  
平成 12 年 10 月 12 日

2. デルマタン硫酸プロテオグリカンに対するモノクローナル抗体、6B6 が認識するエピトープの同定  
澤田啓生、篠村多摩之、渡辺秀人、辻卓夫、木全弘治  
第 73 回日本生化学会中部支部例会 (名古屋)  
平成 13 年 5 月 26 日

#### F. 発表論文

III、IV の項参照

4. 慢性関節リウマチにおける血清由来ヒアルロン酸結合蛋白質 (serum-derived hyaluronan-binding protein, SHAP) の関与

渡辺秀人 (愛知医科大学分子医科学研究所助教授)

ヒアルロン酸は、

軟骨のマトリックスにもデコリンは存在しコラーゲン繊維の構造と代謝に何らかの役割を果たしていると考えられる。本研究結果は軟骨マトリックス構造と機能の研究に結びつく重要な基礎データを提供するものと考えられる。

分担研究者

木全弘治

(愛知医科大学分子医科学研究所)

A. 研究背景と目的

ヒアルロン酸分子は、グルクロン酸と N-アセチルグルコサミンの二糖繰り返し単位から成る生体高分子であるが、その単純な構造にもかかわらず脊椎動物の結合組織の重要な成分として多彩な機能を発揮している。その多様な機能は糖鎖の長さヒアルロン酸—蛋白質相互作用によって獲得されている。現在、二十種類以上のヒアルロン酸結合分子が発見されているが、これらはヒアルロン酸との結合様式によって、四つのグループに分類されている。その中で、血清由来 HA 結合蛋白質(SHAP)は唯一のヒアルロン酸と共有結合する分子として知られている。

木全らは約十年前、培養細胞の細胞

外マトリックスから、血清由来の新しいヒアルロン酸結合蛋白質を発見し、血清由来 HA 結合蛋白質 (serum-derived hyaluronan-associated protein, SHAP) と名付けた。のちに SHAP は血清中のインター- $\alpha$ -トリプシンインヒビター (ITI) 分子の長鎖サブユニットであることが明らかとなった。ITI 分子は、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンであるピクニン短鎖サブユニットのコンドロイチン硫酸鎖に、一本または二本の長鎖がエステル共有結合によって結合するという分子構造を持つ。その長鎖サブユニットは、エステル結合交換反応でそのままヒアルロン酸鎖に移り換え、SHAP となる。ITI は肝臓で合成され血中に常に高濃度に存在しているが、刺激によって組織に流入し、組織内にてヒアルロン酸と複合体を形成し機能を発揮すると考えられている。

ヒアルロン酸のリウマチ性関節炎病態との関連は数多く報告されている。上記のようにヒアルロン酸が組織の局所において SHAP と結合することで機能すると仮定すれば、HA は SHAP-HA 複合体として RA の病態に関与すると考えられる。

今回我々は RA における SHAP の関与とその役割を明らかにする目的で、RA 患者血清中ヒアルロン酸と SHAP-ヒアルロン酸複合体の濃度を定量し、二者の相関性に関して検討した。

## B. 研究方法

RA 患者血清中ヒアルロン酸と SHAP-ヒアルロン酸複合体の定量には ELISA 法を用いた。RA 患者滑液中の SHAP-HA 複合体の精製は塩化セシウムの密度勾配超遠心法により調製した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とウエスタンブロットは従来の方法を用いた。

## C. 研究結果と考察

RA 患者の関節液から SHAP-ヒアルロン酸複合体を塩化セシウム密度勾配超遠心法を用いて調製したところ、同複合体は 15 に分けた画分のうち 5-15 すなわち上清側三分の二に認められた。70ml の関節液から、約 56 mg のヒアルロン酸を得られ、その中には 3.1 mg の SHAP が含まれていた。関節液の SHAP-ヒアルロン酸複合体の濃度は、血中濃度の数十倍であり、SHAP-ヒアルロン酸複合体は関節で形成されると思われた。

SHAP-ヒアルロン酸複合体は広い密度範囲で分布していたが、一定

量のヒアルロン酸当たりの SHAP 濃度が低密度画分と高密度画分とで異なることがわかった。結果を総合すると、RA 関節液中のヒアルロン酸は、平均分子量 180 万あたり、高密度画分では 3 個、低密度画分では 5 個の SHAP 分子と結合していることが明らかとなった。

ITI 長鎖サブユニットには三種類の isoform が存在する。ピクニンとの組み合わせによって、ITI ファミリーの各メンバーが形成されるがヒト血液中には主に HC 1 と HC 2 を含む ITI と HC 3 を含む Pre-a-tyrpsin inhibitor が存在する。このような多様性が RA 患者滑液中の SHAP-HA 複合体にも存在するかどうかを調べたところ、三種類の長鎖サブユニット isoform すべてが検出され、関節液 SHAP-ヒアルロン酸複合体の形成には、ITI と Pre-a-tyrpsin inhibitor が両方関与していることが明らかとなった。

## D. 結論

RA 関節液中では、多くのヒアルロン酸は SHAP と共有結合した状態で存在する。血液中の SHAP-ヒアルロン酸複合体は、関節液から流出したものと考えられる。ヒアルロン酸に結合する SHAP の量と構成する長鎖サブユニットのアイソフォームの多様性が明確に示された。これらの研究結果は RA における関節液中のヒアルロン酸代謝の研究に役立つと考えられる。

SHAP-ヒアルロン酸複合体の形成と RA 病態との関連については、現在追  
究中であるが、SHAP-HA 複合体の  
形成は恐らく炎症を促進すると思わ  
れる。今後、炎症下の滑膜の細胞外  
マトリックスの形成において SHAP-  
ヒアルロン酸複合体はどのような役  
割をするのか、またそのマトリク  
スは炎症性細胞とどのような相互作  
用をするのか、特に c d 4 4 との相  
互作用に注目して検討する必要があ  
る。

#### E, 学会発表

##### 1. Zhuo, L., and Kimata, K.

Covalent binding of SHAPs is  
important for the physiological  
function of hyaluronan. *The*  
*RYUMACHI*. 2002, 42:333.

第 46 回日本リウマチ学会総会・学術  
集会, 神戸, 2002

#### F. 発表論文

III、IV の項参照

### III. 研究成果の刊行に関する一覧

#### (論文)

Kamiya, N., Jikko, A., Kimata, K., Damsky, C., Shimizu, K., and Watanabe, H.: Establishment of a novel chondrocytic cell line, N1511, derived from p53-null mice. J Bone Miner Res., 17, 1832-1842, 2002.

Sawada, H., Shinomura, T., Kimata, K., Takeuchi, J., Tsuji, T., and Watanabe, H.: Characterization of an anti-decorin monoclonal antibody, and its utility. J. Biochem., 132, 997-1002, 2002.

Zhuo, L., Shen, L., Yoneda, M., Yingsung, W., Watanabe, H., Ishiguro, N., and Kimata, K.: Equivalent involvement of the heavy chain isoforms of inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor family molecules in forming a covalent complex with hyaluronan in vivo. Eur J Biochem. Submitted.

Yingsung, W., Zhuo, L., Morgelin, M., Yoneda, M., Kida, T., Watanabe, H., Ishiguro, N., Iwata, H., and Kimata, K.: Molecular heterogeneity of the SHAP-hyaluronan complex: Isolation and characterization of the complex in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. J. Biol. Chem., submitted.

20020275

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、  
P.25の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。