

2. 動脈硬化関連疾患自己抗体マーカーの ACS 症例における定量評価

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業）
分担研究報告書

血中自己抗体検出と新規炎症マーカーを用いた急性冠症候群予知因子
および治療標的の探索
動脈硬化関連疾患自己抗体マーカーの ACS 症例における定量評価

研究分担者：日和佐 隆樹（千葉大学大学院医学研究院 遺伝子生化学 准教授）

研究要旨

急性冠症候群（ACS）は動脈硬化に密接に関係していると考えられている。我々は動脈硬化に係る血清自己抗体マーカーを発現クローニング法、及びプロテインアレイ法による一次スクリーニングを行ない、約 650 種類の候補マーカーを同定した。これらのうち、二次スクリーニングで選別された 115 種類の抗原について、ACS の患者血清と健常者血清の抗体レベルを AlphaLISA 法により測定し比較した。その結果、タンパク質抗原では AP3D1、ZRF 等、また、ペプチド抗原では XRCC4、RPA2、CLDND1 等に対する抗体レベルが健常者に比べ ACS 患者検体において有意に高かった。ACS に関わる自己抗体の存在が確認できたことから、これらの自己抗体レベルを測定することにより発症を予測できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

ACS は発症前に予知することが最も重要である。しかしながら、発症前の患者検体を入手することは極めて困難であり、発症後の検体を調べてもそのほとんどは結果を見ているに過ぎない。その意味において、発症直後に特異的に出現する抗体は、発症が原因となって出現したとは考えられず、発症前から存在していたと推定される。即ち、そのような抗体は発症予測マーカーとなり得る。そこで、ACS の発症直後の検体に特異的に出現する抗体を同定し、予知マーカーとなり得るかどうかを検証する。

初年度の研究において、当教室において既に同定し、選別された動脈硬化 / 脳梗塞の自己抗体マーカー 115 種類について ACS に関連したマーカーが含まれているかどうかを調べた。

B. 研究方法

ACS の患者血清は京都大学附属病院、愛知学

院大学、及び千葉大学附属病院からそれぞれ 93 検体、91 検体、67 検体を収集し、100 倍に希釈して用いた。健常者血清は千葉大学職員、及び下志津病院職員の検体を 128 検体用いた。抗原は動脈硬化 / 脳梗塞の候補マーカーとして一次スクリーニングで選別された約 650 種類のうち、二次スクリーニングで選別されたタンパク質抗原とペプチド抗原をそれぞれ 77 種類と 38 種類準備した。タンパク質抗原は 10 μ g/ml に希釈し、glutathione-ドナービーズと抗ヒト IgG-アクセプタービーズを用いた Alpha (Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay) LISA 法により血清抗体レベルを解析した。ペプチド抗原は 400 ng/ml に希釈し、Avidin-ドナービーズと抗ヒト IgG-アクセプタービーズを用いた。

（倫理面への配慮）

急性冠症候群、及びその関連疾患の患者血清を用いる研究については、「動脈硬化関連疾患のバ

イオマーカーの開発」(実施責任者：日和佐隆樹)の課題名で千葉大学大学院医学研究院倫理委員会に申請し、平成 22 年 3 月 30 日に承認を受け、さらにその修正版が平成 23 年 10 月 17 日付けで承認されている(承認番号：千大医総第 44 号)。その申請書の記載に従って使用している。協力病院はそれぞれの倫理審査委員会の承認を得ている。検体はインフォームドコンセントを得て採取している。

C . 研究結果

既知候補自己抗体マーカーの定量評価：AlphaLISA 法により各抗原に対する血清抗体レベルを調べた。ACS 患者検体と健常者検体の数値を有意差検定した結果、P 値が最も低かったのは、タンパク質抗原では AP3D1 と ZRF でそれぞれ 0.00002 と 0.00012 であった。健常者の平均値 + 2SD をカットオフ値とした時の陽性率が最も高かったのは AP3D1 と PACRG で、ともに 15.1% であった。77 種類中、53 種類について健常者と ACS 患者検体で有意差が認められた。

一方、ペプチド抗原では XRCC4 と RPA2 と CLDND1 に対する抗体レベルの有意差検定の P 値は 10^{-6} 以下であり、陽性率はそれぞれ 29%、38%、42% であった。38 種類中、23 種類について健常者と患者検体で有意差が認められた。

D . 考察

AlphaLISA 法による血清抗体レベルの測定はプレートの洗浄の必要がなく、ELISA に代わる方法として近年注目されている。しかし一方で、AlphaLISA 法は光、温度、空気中の酸素等の影響を受け、エッジ効果等の誤差を生じやすい。我々は多くの試行実験により本方法を習得し、再現性よくデータを出すことに成功した。

この方法により血清抗体レベルを調べた結果、多くの動脈硬化マーカーは ACS の検体においても有意に高いレベルを示すことがわかった。ACS に関わる血清抗体マーカーを同定したのは本研究

が初めてである。

タンパク質抗原と比べて、ペプチド抗原を用いた時には非特異的反応が減少し、バックグラウンドが安定するので患者検体の陽性率が高くなり、有意差検定の P 値が低くなる傾向が見られた。

ペプチド抗原で高い陽性数と低い P 値が認められた XRCC4 と RPA2 はともに DNA 二重鎖切断の修復に関わるタンパク質である。虚血により DNA 二重鎖切断が誘導されると報告されていることから、虚血後にこれらのタンパク質が高発現することが自己抗体の産生につながると推定された。

その他の AP3D1、ZRF、PACRG、CLDND1 は患者データとの関係を調べたところ、いずれもブラススコアと相関していることが判明した。即ち、これらのマーカーは動脈硬化性の冠動脈疾患を検出していると推定された。

E . 結論

血清自己抗体は ACS 発症の直後に出現するわけではなく、発症前から存在していたと推定される。即ち、発症直後に特異的に検出される自己抗体マーカーを同定することにより発症を予測することが可能になると考えられた。

F . 研究発表

1 . 論文発表

1. Iwase, K., Ishihara, A., Yoshimura, S., Andoh, Y., Kato, M., Seki, N., Matsumoto, E., Hiwasa, T., Muller, D., Fukunaga, K. and Takiguchi, M. The secretogranin II gene Is a coincidence detector of glutamate and dopamine inputs. *J. Neurochem.* 128, 233-245, 2014.

2 . 学会発表

1. 日和佐隆樹、張曉萌、瀧口正樹、峯清一郎、岩立康男、佐伯直勝、森雅裕、桑原聡、竹本稔、小林一貴、河村治清、横手幸太郎、上司

郁男、和田猛、青墳章代、町田利生、島田英昭、工藤孝、土居洋文、中村利華、富吉郷、新免奈津子、黒田英行、糖尿病性脳梗塞の診断に有用な血清抗体マーカーTUBB2Cの同定．第 86 回日本生化学会（2013 年 9 月 11 日-13 日、横浜）

2. 日和佐隆樹、島田英昭、岩立康男、松谷智郎、星野敢、松原久裕、野村文夫、食道癌またはグリオーマの患者血清における SEREX 抗原 CENPF に対する血清抗体レベルの上昇．第 72 回日本癌学会（2013 年 10 月 3 日-5 日、横浜）
3. 日和佐隆樹、張曉萌、瀧口正樹、峯清一郎、岩立康男、佐伯直勝、森雅裕、武藤真弓、鵜沢顕之、桑原聡、町田利生、工藤孝、土居洋文、中村利華、富吉郷、新免奈津子、黒田英行、脳梗塞の進行に対応する血清抗体マーカーの同定．第 86 回日本分子生物学会（2013 年 12 月 3 日-6 日、神戸）

G．知的所有権の取得状況

1．特許取得

「脳梗塞の診断マーカー及び診断キット」平成 26 年 1 月 6 日出願、発明者：後藤憲一郎、日和佐隆樹、松村竜太郎、杉山隆夫；出願者：千葉大学及びヒューマンサイエンス振興財団、出願番号：特願 2014-000417 号

2．実用新案登録

該当なし

3．その他

該当なし