

- N., Matsutani, T., Hiwasa, T., Takiguchi, M., Saeki, N., Iwadate, Y. (2014) Circulating anti-filamin C antibody as a potential serum biomarker for low-grade gliomas. *BMC Cancer* 14, 452.
 2. Morii, S., Kato, M., Seki, N., Shinmen, N., Iwase, K., Takiguchi, M., Hiwasa, T. (責任著者) (2014) Inhibition of cell growth by nuclear receptor COUP-TFI: possible involvement of decorin in growth inhibition. *Biochem. Physiol.* S4-001.
 3. Machida, T., Kubota, M., Kobayashi, E., Iwadate, Y., Saeki, N., Yamaura, A., Nomura, F., Takiguchi, M. and Hiwasa, T. (責任著者) (2015) Identification of stroke-associated antigens via screening of recombinant proteins from the human expression cDNA library (SEREX). *J. Translat. Med.* 13, 71.
 4. Goto, K., Sugiyama, T., Matsumura, R., Zhang, X. M., Kimura, R., Taira, A., Arita, E., Iwase, K., Kobayashi, E., Iwadate, Y., Saeki, N., Mori, M., Uzawa, A., Muto, M., Kuwabara, S., Takemoto, M., Kobayashi, K., Kawamura, H., Ishibashi, R., Sakurai, K., Fujimoto, M., Yokote, K., Nakayama, T., Harada, J., Kobayashi, Y., Ohno, M., Chin, H., Nishi, E., Machida, T., Iwata, Y., Mine, S., Kamitsukasa, I., Wada, T., Aotsuka, A., Katayama, K., Kikkawa, Y., Sunami, K., Takizawa, H., Nakamura, R., Tomiyoshi, G., Shinmen, N., Kuroda, H., Hiwasa, T. (責任著者) (2015) Identification of cerebral enfarction-specific antibody markers from autoantibodies detected in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Mol. Biomark. Diagnos.* 6: 2.
 5. Shimada, H., Ito, M., Kagaya, A., Shiratori, T., Kuboshima, M., Suzuki, M., Liu, T. L., Nabeya, Y., Matsubara, H., Matsushita, K., Nomura, F., Takiguchi, M., Hiwasa, T. (責任著者) (2015) Elevated serum antibody levels against cyclin L2 in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *J. Cancer Sci. Ther.* 7(2), 60-66.
 6. Kuroiwa, N., Iwase, K., Morii, S., Takiguchi, M., Hiwasa, T. (責任著者) (2015) Up-regulation of growth-inhibitory or tumor suppressive genes by overexpression of C/EBP α or C/EBP β in *ras*-transformed NIH3T3 cells. *Integr. Mol. Med.* 2(2): 150-157.
- ## 2. 学会発表
1. 日和佐隆樹、後藤憲一郎、松村竜太郎、杉山隆夫、瀧口正樹 (2014) 全身性エリテマトーデス患者の自己抗体から選別された脳梗塞血清抗体マーカー. 第 10 回日本臨床プロテオーム研究会 (2014.5.10、東京)
 2. 日和佐隆樹、佐藤万里子、木村理沙、瀧口正樹、峯清一郎、竹本稔、小林一貴、河村治清、石橋亮一、横手幸太郎、中村利華、富吉郷、新免奈津子、黒田英行 (2014) 脳梗塞および糖尿病の診断に有用な血清 BMP-1 抗体マーカー. 第 19 回日本病態プロテアーゼ学会 (2014.8.8-9、大阪)
 3. 島田英昭、谷島聡、小池淳一、松下一之、野村文夫、日和佐隆樹、田川雅俊 (2014) 消化管癌患者における RalA 抗原に対する免疫反応. 第 73 回日本癌学会学術総会 (2014.9.25-27、横浜)
 4. 日和佐隆樹、峯清一郎、木村理沙、佐藤万里子、張曉萌、瀧口正樹、小林英一、岩立康男、佐伯直勝、後藤憲一郎、松村竜太郎、杉山隆夫、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 (2014) 動脈硬化性脳梗塞に対応する血清抗体マーカーの同定. 第 87 回日本生化学会 (2014.10.15-18、京都)
 5. 日和佐隆樹 (2014) 動脈硬化関連疾患の血清

抗体マーカーの開発. 第 87 回日本生化学会
(2014.10.15-18、京都) (フォーラム)

6. 日和佐隆樹 (2014) 動脈硬化症に対応する血清抗体マーカーの同定. 第回日本分子生物学会
(2014.11.25-27、横浜) (フォーラム)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

1. 「デオキシハイプシン・シンターゼ遺伝子を指標として用いる動脈硬化の検出方法」2014 年 11 月 7 日出願、発明者：中村利華、黒田英行、富吉郷、日和佐隆樹、瀧口正樹、佐伯直勝；出願者：千葉大学及び藤倉化成株式会社、出願番号：特願 2014-226847 号
2. 「動脈硬化診断用ポリペプチドマーカー、及び該マーカー等を用いる動脈硬化の検出方法、並びに動脈硬化診断用キット」2014 年 11 月 12 日特許査定 (中国)、発明者：中村利華、黒田英行、富吉郷、日和佐隆樹、瀧口正樹、佐伯直勝、町田利生；出願者：千葉大学及び藤倉化成株式会社、出願番号：特願 2008-209210

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

1. 分担執筆：日和佐隆樹 (2014) 疾患抗体マーカーの開発. 医学のあゆみー臨床プロテオミクス. 251 巻. 953-957 頁.

3. 急性冠症候群バイオマーカーとしてのマイクロ RNA の可能性について

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

—急性冠症候群バイオマーカーとしてのマイクロ RNA の可能性について—

研究分担者：尾野 亘（京都大学大学院医学研究科 循環器内科学 准教授）

研究要旨

細胞の中だけでなく、血液を含む体液中にもマイクロ RNA が脂質膜に包まれて存在している。我々は心血管疾患の患者血清中のマイクロ RNA について検討した。その結果、急性冠症候群において、胸痛発症後トロポニンTよりも早期に末梢血に miR-133 が上昇し、これがトロポニンTとよく相関することを見出した。さらに、この血中マイクロ RNA が臓器間において情報を伝達する可能性についても明らかにした(Kuwabara Y et al. *Circulation: Cardiovascular Genetics*. 2011;4:446-454.)。さらに心血管疾患症例において血中および体液中の診断マーカー、情報伝達について検討をつづけている。

A. 研究目的

我々は、心血管病における病態生理学的意義がまだ充分解明されていない核酸、特にマイクロ RNA の疾患バイオマーカー、あるいは予知マーカーとしての可能性を追求している。

心不全の病態に関与している可能性のあるマイクロ RNA を同定し、その診断能および病態形成への寄与を検討するのが本年度の研究の主目的である。心不全関連血中マイクロ RNA のスクリーニングのために、心不全の急性期および緩解期の血清を用いて検討を行う。同一個人の血清を比較して検討を行うことにより個体差を排除した病態に特異的なデータが得られるものと考えている。

B. 研究方法

急性心不全の増悪期と緩解期の血清サンプルを比較し、その変動から疾患関連マイクロ RNA 候補を選出する。このためのスクリーニングとしてプールした血清からマイクロ RNA を抽出し、定量的 PCR 法と RNA シークエンス法を用いて網羅的にマイクロ RNA の変動を検出した。これにより変動が確認されたマイクロ RNA については症

例ごとに個別に抽出および定量を行う。これらにより得られた発現量およびその変化のデータを臨床的情報と照らし合わせ、診断能や予後予測能を検定する。これらの臨床情報との相関から血清中のマイクロ RNA の働きとして想定されるものについては細胞・動物モデルにおいて更なる実験を行い、機能解明を行う。

（倫理面への配慮）

「心血管疾患患者における血中バイオマーカーおよび RNA 発現レベルと病態との関連の検討(ヒト遺伝子解析承認番号 G-322)」は倫理委員会にて承認済みであり、倫理面で問題のないように進める。

C. 研究結果

少数例のプールサンプルからの網羅的解析の結果、数種類のマイクロ RNA の変動が確認された。これは定量的 PCR 法および RNA シークエンス法のいずれにおいても確認されており、信頼性が高いものと考えている。具体的には臓器特異的な発現が知られているマイクロ RNA-X1, 血管内皮機能に重要とされるマイクロ RNA-X2 の急性期での

上昇と治療による低下などが観察されている。これらの変動を今後、個別症例からの RNA 抽出および定量を行い確認する。また、個別の定量値と臨床データとの相関を検討する。また並行して動物の心不全モデルにおいても同様の結果が得られるかどうか検討を開始する。

D. 考察

心不全患者の診断における血清マイクロ RNA についての報告は少数散見されるが、いずれも健常者との比較で検討しており急性期の変動に着目した報告はまだ見られていない。我々は短期間の間に変動する疾患において、同一個体内での要素を比較することでその要素に与える当該疾患の純粋な影響を抽出することが可能であると考えている。急性心不全はこの条件によく合致する疾患であり、本研究は心不全にまつわる研究という観点だけでなく、生体におけるストレスが血清中のマイクロ RNA を変動させるモデルとしても非常に意義深いものであると考えている。

E. 結論

心不全の急性期において血清中のマイクロ RNA 量は変動している可能性が示唆された。また、これは異なる二つの方法によっても同様の結果が得られており結果の信頼性は高いものと考えられる。今後多症例における検討において同様の変動が確認されればこれらのマイクロ RNA の変動は心不全の病勢の変動を反映していると考えられ、心不全の診断に有用である可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K; MicroRNAs and lipoprotein metabolism. *J Atheroscler Thromb.* 2014;21:17-22.
2. Nagao K, Sowa N, Inoue K, Tokunaga M, Fukuchi K, Uchiyama K, Ito H, Hayashi F,

- Makita T, Inada T, Tanaka M, Kimura T, and Ono K. Myocardial expression level of neural cell adhesion molecule correlates with reduced left ventricular function in human cardiomyopathy. *Circulation; Heart Failure.* 2014;7:351-8
3. Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Sowa N, Yahagi N, Shimano H, Matsumura S, Inoue K, Marusawa H, Nakamura T, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T, and Ono K; MicroRNA-33 regulates sterol regulatory element-binding protein 1 expression in mice *Nat Commun.* 2013;4:2883. doi: 10.1038/ncomms3883.
4. Ono K; Seeing is believing - imaging of a plaque in the renal artery. *J Cardiol Cases* 2013 in press
5. Yamamoto E, Natsuaki M, Morimoto T, Furukawa Y, Nakagawa Y, Ono K, Mitsudo K, Nobuyoshi M, Doi O, Tamura T, Tanaka M, Kimura T; CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2 Investigators. Long-Term Outcomes After Percutaneous Coronary Intervention for Chronic Total Occlusion (from the CREDO-Kyoto Registry Cohort-2). *Am J Cardiol.* 2013;112:767-74.
6. Takanabe-Mori R, Ono K, Wada H, Takaya T, Ura S, Yamakage H, Satoh-Asahara N, Shimatsu A, Takahashi Y, Fujita M, Fujita Y, Sawamura T, Hasegawa K. Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1 Plays an Important Role in Vascular Inflammation in Current Smokers. *J Atheroscler Thromb.* 2013;20:585-90.
7. Morikami Y, Natsuaki M, Morimoto T, Ono

- K, Nakagawa Y, Furukawa Y, Sakata R, Aota M, Okada Y, Onoe M, Kawasuji M, Koshiji T, Nakajima H, Nishizawa J, Yamanaka K, Yamamoto H, Kimura T; CREDO-Kyoto PCI/CABG registry cohort-2 investigators. Impact of polyvascular disease on clinical outcomes in patients undergoing coronary revascularization: An observation from the CREDO-Kyoto Registry Cohort-2. *Atherosclerosis*. 2013;228:426-31.
8. Tamaki Y, Iwanaga Y, Niizuma S, Kawashima T, Kato T, Inuzuka Y, Horie T, Morooka H, Takase T, Akahashi Y, Kobuke K, Ono K, Shioi T, Sheikh SP, Ambartsumian N, Lukanidin E, Koshimizu TA, Miyazaki S, Kimura T. Metastasis-associated protein, S100A4 mediates cardiac fibrosis potentially through the modulation of p53 in cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol*. 2013;57:72-81.
 9. Tokushige A, Shiomi H, Morimoto T, Ono K, Furukawa Y, Nakagawa Y, Kadota K, Iwabuchi M, Shizuta S, Tada T, Tazaki J, Kato Y, Hayano M, Abe M, Hamasaki S, Tei C, Nakashima H, Mitsudo K, Nobuyoshi M, Kita T, Kimura T. Influence of initial acute myocardial infarction presentation on the outcome of surgical procedures after coronary stent implantation: a report from the CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2. *Cardiovasc Interv Ther*. 2013 ;28:45-55.
- ## 2. 学会発表
- ### 1. 国際学会
1. Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Sowa N, Yahagi N, Shimano H, Hasegawa K, Kume N Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33 encoded by an intron of sterol regulatory element-binding protein-2 (Srebp2) regulates Srebp1 in vivo. The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014 April 14th, Kyoto, Japan.
 2. Baba O, Horie T, Kuwabara Y, Chujo Y, Watanabe S, Kinoshita M, Horiguchi M, Nakamura T, Chonabayashi K, Hishizawa M, Hasegawa K, Kume N Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33 deficiency reduces atherosclerotic plaque progression in apoE knockout mice. The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014 April 14th, Kyoto, Japan.
 3. Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakano T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33 deficiency leads to high fat diet-induced obesity and insulin resistance in vivo. European Society of Cardiology Congress 2014, 30 Aug 2014 - 4 Sep., Barcelona – Spain.
 4. Nishino T, Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33, embedded in Srebf2 intron, regulate fatty acid synthesis through targeting SREBP-1 in vivo. European Society of Cardiology Congress 2014, 30 Aug 2014 - 4 Sep., Barcelona – Spain.
 5. Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakano T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Kimura T, Ono K. Serum HDL-C decreases in microRNA-33b knock-in mice for an intron of sterol regulatory element-binding factor 1 (Srebf1). 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress September 12-14, Kyoto, Japan.

6. Baba O, Horie T, Ono K, Kuwabara Y, Sowa N, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T. MicroRNA-33 deficiency reduces atherosclerotic plaque progression in apoE knockout mice. 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress September 12-14, Kyoto, Japan.
 7. Kuwabara Y, Horie T, Baba O, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Nakao T, Nishino T, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-451 is involved in diabetic cardiomyopathy through suppression of the LKB1/AMPK pathway. 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress September 12-14, Kyoto, Japan.
 8. Nishino T, Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33, embedded in Srebf2 intron, regulate fatty acid synthesis through targeting SREBP-1 in vivo. 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress September 12-14, Kyoto, Japan.
 9. Current Topics in HDL-C~Novel regulation by microRNA-33 and implications for future therapeutic strategies~. Koh Ono. The 8th Otsuka Asia Atherosclerosis Conference Oct 11th-12th, 2014 Shanghai, China.
 10. Nishino T, Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Ide Y, Nakazeki F, Koyama S, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33, Located Within Srebf2 Intron, Regulate Fatty Acid Synthesis via Targeting SREBP-1 in vivo. American Heart Association Annual Scientific Sessions 2014, November 15-19, Chicago, Illinois, U.S.A.
 11. Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Ide Y, Nakazeki F, Koyama S, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33b Knock-in Mice for an Intron of Sterol Regulatory Element-Binding Factor 1 (Srebf1) Exhibit Reduced HDL-C in vivo. American Heart Association Annual Scientific Sessions 2014, November 15-19, Chicago, Illinois, U.S.A.
 12. Wada H, Satoh-Asahara N, Akao M, Abe M, Ono K, Morimoto M, Shimatsu A, Takahashi Y, Hasegawa K. Self-rating Depression Scale Score as an Inverse and Independent Predictor of Successful Smoking Cessation with a Pharmacological Treatment for Nicotine Addiction. American Heart Association Annual Scientific Sessions 2014, November 15-19, Chicago, Illinois, U.S.A.
- 2.国内学会
1. 堀江貴裕. SREBP-2 のイントロンに存在するマイクロ RNA-33 は SREBP-1 の発現を制御する.第 51 回日本臨床分子医学会学術集会 YIA-3 日本臨床分子医学会奨励賞 (YIA) 受賞 平成 26 年 4 月 11 日, 東京.
 2. 桑原康秀. microRNA-451 は LKB1-AMPK 経路を抑制することで、ラット心筋細胞において細胞障害を、生体においては高脂肪食誘導性心肥大を誘導する. 第 51 回日本臨床分子医学会学術集会 平成 26 年 4 月 11 日, 東京.
 3. 馬場 理. アポ E 欠損マウスにおいてマイクロ RNA-33 欠損は動脈硬化進展を抑制する. 第 51 回日本臨床分子医学会学術集会 平成 26 年 4 月 11 日, 東京.
 4. 堀江貴裕、西野共達、馬場理、桑原康秀、中尾哲史、西賀雅隆、宇佐美俊輔、出原正康、

- 矢作直也、島野仁、横出正之、北徹、木村剛、尾野亘. SREBP-2 のイントロンに存在するマイクロ RNA-33 は SREBP-1 の発現を制御する. 第 1 回 Research Planet 平成 26 年 5 月 10 日,
5. 尾野 亘. Featured Session: 最先端の病態研究 「microRNA-33 の動脈硬化・脂質制御における役割」. 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 平成 26 年 7 月 10 日, 東京.
 6. 尾野 亘. 第 9 回五島雄一郎賞受賞講演 「High impact of microRNA-33 on atherosclerosis and lipid metabolism」. 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 平成 26 年 7 月 11 日, 東京.
 7. 尾野 亘. 「脂質代謝を起点としたマイクロ RNA、転写因子の相互作用の解明」. 転写代謝システム班会議 平成 26 年 7 月 12 日, 仙台.
 8. 馬場 理、堀江貴裕、桑原康秀、木村 剛、尾野 亘. 「マイクロ RNA の骨髄機能および慢性炎症における役割」. 転写代謝システム班会議 平成 26 年 7 月 12 日, 仙台.
 9. 西野共達、堀江貴裕、尾野 亘. 「microRNA-33 は生体内で SREBP-1 を介して脂肪酸合成を制御する」. 転写代謝システム班会議 平成 26 年 7 月 12 日, 仙台.
 10. 「microRNA-33b knock-in mice for an intron of sterol regulatory element-binding factor 1 (Srebf1) exhibit reduced HDL-C in vivo」尾野 亘、堀江貴裕、西野共達、北徹、木村剛. 第 1 回 iHF フォーラム 平成 26 年 8 月 10 日,
 11. 尾野 亘、堀江貴裕、西野共達、北 徹、木村 剛. microRNA-33b knock-in mice for an intron of sterol regulatory element-binding factor 1 (Srebf1) exhibit reduced HDL-C in vivo. 第 5 回 Molecular Cardiovascular Conference II 平成 26 年 9 月 5-6 日, 神戸ベイシェラトンホテル&タワーズ.
 12. 桑原康秀、堀江貴裕、馬場 理、出原正康、宇佐美俊輔、中尾哲史、西賀雅隆、西野共達、井手裕也、中関典子、小山智史、木村 剛、尾野 亘. 飽和脂肪酸により誘導される microRNA-451 は、糖尿病性心筋症の増悪因子である. 第 5 回 Molecular Cardiovascular Conference II 平成 26 年 9 月 5-6 日, 神戸ベイシェラトンホテル&タワーズ.
 13. 堀江貴裕、西野共達、馬場 理、桑原康秀、中尾哲史、西賀雅隆、宇佐美俊輔、出原正康、中関典子、井手裕也、小山智史、曾和尚也、矢作直也、島野 仁、横出正之、北 徹、木村 剛、尾野 亘. Srebf1 のイントロンに microRNA-33b をノックインしたマウスは HDL コレステロールの減少を示す. 新学術領域研究 転写代謝システム 新学術領域若手ワークショップ 2015 年 2 月 6-7 日, 群馬県伊香保.
 14. 桑原康秀、堀江貴裕、中島康弘、伯野大彦、馬場 理、出原正康、宇佐美俊輔、西賀雅隆、西野共達、中尾哲史、井手裕也、中関典子、小山智史、北 徹、木村 剛、尾野 亘. 心肥大・心不全における lincRNA の機能解析. 新学術領域研究 転写代謝システム 新学術領域若手ワークショップ 2015 年 2 月 6-7 日, 群馬県伊香保.
 15. 中尾哲史、堀江貴裕、馬場 理、西賀雅隆、西野共達、宇佐美俊輔、桑原康秀、出原正康、中関典子、井手裕也、小山智史、曾和尚也、大野聡子、青木浩樹、木村 剛、尾野 亘. miR-33 ノックアウトマウスにおける大動脈瘤についての検討. 新学術領域研究 転写代謝システム 新学術領域若手ワークショップ 2015 年 2 月 6-7 日, 群馬県伊香保.
 16. 西野共達、堀江貴裕、馬場 理、桑原康秀、尾野 亘. microRNA-33b promotes atherosclerotic plaque formation in vivo. 新学術領域研究 転写代謝システム 新学術領域若手ワークショップ 2015 年 2 月 6-7 日,

群馬県伊香保.

17. 馬場理、堀江貴裕、伯野大彦、中島康弘、桑原康秀、中尾哲史、出原正康、宇佐美俊輔、西賀雅隆、西野共達、井手裕也、中関典子、小山智史、木村 剛、尾野 亘. マイクロRNA-33 の骨髄機能および慢性炎症における役割. 新学術領域研究 転写代謝システム 新学術領域若手ワークショップ 2015 年 2 月 6-7 日, 群馬県伊香保.
18. 尾野 亘. 「miR-33a/b による細胞・臓器レベルの脂質代謝制御機構」. 第 44 回日本心臓血管作動物質学会 シンポジウム 2 高血圧における臓器連関 2015 年 2 月 7 日, 高松.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

4. メタボリック・シンドロームにおける肝線維化と NRDC の関連

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

—メタボリック・シンドロームにおける肝線維化と NRDC の関連—

研究分担者：妹尾 浩（京都大学大学院医学研究科 消化器内科学 講師）

研究要旨

循環器疾患、糖尿病などとリンクしたメタボリック・シンドロームのひとつとして、消化器領域では、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）が注目されている。NASH および続発する肝線維化（肝硬変）に果たす NRDC の意義を明らかにするために、平成 26 年度は NRDC ノックアウトマウスを用いて、肝臓の炎症と線維化を検討した。コリン欠乏食および高脂肪食の投与により、野生型マウスでは肝臓の脂肪沈着、炎症と線維化を認めた。しかし NRDC の欠如により、肝臓に脂肪沈着を認めても炎症および線維化は生じなかった。これらの検討から、NRDC が NASH とそれに続発する肝硬変の病態に重要な役割を果たしていることが示唆された。

A. 研究目的

循環器疾患、糖尿病等の生活習慣病と密接な関連をもち、その一表現型として注目を集めている消化器疾患が、非アルコール性脂肪性肝炎（Non alcoholic steatohepatitis、以下 NASH）である。近年、B型肝炎やC型肝炎などのウイルス性肝炎は、診断および治療法の進歩により、その患者数は頭打ちになりつつある。ところが、健康診断や人間ドックにおいて指摘される肝機能異常者は増加傾向にあることが問題となっている。これら肝機能異常を示す健康診断、人間ドック受験者数の増加の主因として、NASH が大きな割合を占めると考えられている。実際、肥満のある 40 歳以上の男性では約 50%に、女性では約 25%に脂肪肝を合併し、そのうち少なからぬ数が NASH を罹患しているとされる。そして、NASH およびそれに起因する肝硬変、肝細胞癌の発症は近年とくに頻度を増しつつあり、NASH に対する治療介入がない場合、5～10年という比較的早い経過で5～20%の患者が肝硬変へと進行し、さらに5年累計肝細胞癌の発症率は11.3%に及ぶという。

これらの疫学的事実に基づいて、NASH およびそれに続発する肝線維化の病態解明と治療、予防法の開発が待ち望まれている。

そこで研究分担者らは、NASH およびその進展状態である肝硬変の病態解明と新規治療、予防標的の探索を課題とした。炎症の制御に重要な役割を果たすナルディライジン（以下 NRDC）に着目し、平成 25 年度には NASH 発症に NRDC が必要であることを、主にマウスモデルを用いて明らかにした。平成 26 年度には、NASH に続発する肝線維化発症に、NRDC がどのような役割を果たすかを、遺伝子改変マウスを用いた実験を通じて解明することとした。

B. 研究方法

野生型(WT)、および NRDC ノックアウト(KO)マウスに対して、NASH を生じさせるためにコリン欠乏食、高脂肪食、またはコントロール食を経口摂取させた。4、12、20週後に、各マウスから肝臓を採取し、組織学的、免疫組織学的検討を行った。また、肝線維化はシリウス・レッド染

色で評価した。さらに、collage I、collagen IV、TIMP、TGF-beta1、alpha-SMA など線維化進展にかかわる因子について、定量的 PCR 法で mRNA の定量を行った。

（倫理面への配慮）

平成 26 年度には、遺伝子改変マウスを用いた前臨床研究を中心に行った。それに際して、組換え DNA 実験については、京都大学組換え DNA 実験安全委員会の承認を得たのち、「組換え DNA 実験指針」に基づいて実施した。動物実験に関しては、京都大学動物実験委員会の承認を得たのち、「動物の保護および管理に関する法律」、「実験動物の飼育および保管に関する基準」、「大学等における実験動物の通知」に準拠し、動物実験が適切かつ愛護的に行われるよう配慮した。したがって、本研究遂行にあたり、倫理面での問題はないものと判断した。

C. 研究結果

コリン欠乏食を投与した WT マウスでは投与開始後 4 週から肝臓に脂肪が沈着し、12、20 週と徐々に脂肪の沈着は増強した。また高脂肪食を投与した場合も、WT マウスでは経時的に肝臓への脂肪沈着を認め、投与開始後 20 週で脂肪沈着は明らかとなった。コントロール食を投与した WT マウスでも同様に、経時的に軽度ながら脂肪沈着が増強したが、コリン欠乏食および高脂肪食に比べて軽度であった。一方、NRDc KO マウスでは、コリン欠乏食、高脂肪食ともに肝臓への脂肪沈着の程度はやや軽微であったが、やはり脂肪肝と判断し得た。肝臓中の中性脂肪を測定したところ、WT マウスでも NRDc KO マウスでも、コリン欠乏食、高脂肪食の投与により、組織像に比例して中性脂肪の増加を認めた。しかし、血清中の肝逸脱酵素（ALT）は、コリン欠乏食または高脂肪食を投与した WT マウスのみで上昇し、NRDc KO マウスでは上昇を認めなかった。なお、コントロ

ール食を投与した群では、経過中 WT マウスでも NRDc KO マウスでも、ALT の上昇は認めなかった。引き続いて、肝線維化をシリウス・レッド染色で検討したところ、WT マウスではコリン欠乏食では投与開始後 12 週、20 週と徐々に肝線維化が増強し、高脂肪食では投与開始後 20 週目に肝線維化を認めた。なお、コントロール食を投与した群では、とくに肝線維化は認めなかった。さらに、collage I、collagen IV、TIMP、TGF-beta1、alpha-SMA など線維化進展にかかわる因子についても mRNA の定量を行ったところ、WT マウスではコリン欠乏食で経時的に、高脂肪食で投与開始後 20 週目にすべての因子の mRNA の上昇を認めた。それに対して NRDc KO マウスでは、シリウス・レッド染色による組織学的な肝線維化、および線維化マーカー mRNA の上昇を全く認めなかった。

D. 考察

NASH モデルとしてよく用いられるコリン欠乏食に加えて高脂肪食の投与によっても、WT マウスおよび NRDc KO マウスの肝臓には脂肪沈着を認め、両食餌負荷はヒトの脂肪肝を良く再現するモデルと考えられた。しかし、NRDc KO マウスでは、コリン欠乏食および高脂肪食の投与によっても、肝組織中に脂肪滴の沈着を認めながら、血清中の肝逸脱酵素が上昇しなかったことから、NRDc の欠如により、単純性脂肪肝は生じて NASH に至らないことが示された。さらに、近年臨床的重要性を増している NASH に続発する肝線維化の進展に関しても、コリン欠乏食および高脂肪食の投与により、NRDc が欠如している場合はまったく線維化が生じないことが明らかとなった。

NASH の臨床上の問題点は、冒頭でも触れたように、今後中長期的にはウイルス性肝炎にかわって、肝硬変、肝細胞癌のもっとも主要な原因になることが予想されることである。このように NRDc が NASH と肝線維化の双方の進展

に決定的な役割を果たし、NRDc の欠損により、ほぼ完全に NASH と肝線維化が抑制されたことは注目に値する。研究分担者らは、NRDc が代表的な炎症性サイトカイン TNF- α のシグネリングを介して肝臓の炎症を制御することを平成 25 年度の研究によって示した。それに引き続き、平成 26 年度には NRDc が肝線維化もきわめて明瞭に制御する因子であることを示すことができた。今後は、これらふたつの知見を統合、展開していくことによって、新たな国民病の治療法を開発し、またその発症、増加を予防する方策作りに貢献すべきと考える。

E. 結論

コリン欠乏食投与、高脂肪食負荷によるマウス実験は、ヒト脂肪肝および NASH を良く再現するモデルであることが確認された。NRDc の欠如によって、単純性脂肪肝は生じても NASH を生じなかったことから、NRDc は NASH の病態に極めて重要な役割を果たすことが示唆された。さらに、NRDc の欠如によって、肝線維化も全く生じなかったことは、NASH に続発する肝線維化（肝硬変）の病態解明の一助となるとともに、新たなメタボリック・シンドロームの治療、予防標的としての NRDc の可能性を示唆すると思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsumoto Y, Matsukawa H, Seno H, Ono S. Breast cancer metastasis to the esophagus diagnosed using endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015 Feb;30(2):233.
2. Ikuta K, Umeda M, Seno H. Esophageal ulcer due to lymphoma. *Intern Med*. 2014;53(22):2649-50.
3. Kimura Y, Seno H, Matsumoto Y, Yamashita Y. Primary splenic

angiosarcoma. *Intern Med*. 2014;53(15):1717-9.

4. Ishizu-Higashi S, Seno H, Nishi E, Matsumoto Y, Ikuta K, Tsuda M, Kimura Y, Takada Y, Kimura Y, Nakanishi Y, Kanda K, Komekado H, Chiba T. Deletion of nardilysin prevents the development of steatohepatitis and liver fibrosis. *PLoS One*. 2014 May 21;9(5):e98017.
5. Kimura Y, Seno H, Ono S. A case of acute necrotizing esophagitis. *Gastrointest Endosc*. 2014 Sep;80(3):525-6.
6. Ikuta K, Seno H, Chiba T. Molecular changes leading to gastric cancer: a suggestion from rare-type gastric tumors with GNAS mutations. *Gastroenterology*. 2014 May;146(5):1417-8.
7. 妹尾浩、上尾太郎、中西祐貴、千葉勉. 大腸がん幹細胞に特異的な因子がもつ可能性. *がん分子標的治療* 12, 52-56, 2014.
8. 妹尾浩. 消化管におけるがんの微小環境と幹細胞の研究. *最新医学* 69, 120-125, 2014.
9. 妹尾浩、千葉勉. 癌幹細胞を特定するマーカーの可能性. *医学のあゆみ* 284, 863-864, 2014.

2. 学会発表

1. Seno H, Kanda K, Nishi E, Chiba T. The role of Nardilysin in intestinal tumorigenesis. The 4th symposium on TGF-beta family and cancer, January, 12, 2015, Tsukuba, Japan.
2. Seno H. The role of Dclk1-positive cells in digestive organ tumors. 4th Global Cancer Genomics Consortium, November, 14, 2014, Kyoto, Japan.
3. Seno H. Dclk1, a specific marker for cancer stem cells that does not mark normal stem cells. *iPS and Stem Cells in Cancer*

Research, April, 17, 2014, Kyoto, Japan.

4. 妹尾浩、丸野貴久、山賀雄一、中西祐貴、福田晃久、千葉勉. 細胞系譜解析を用いた消化器腫瘍幹細胞の検討. 第 14 回日本再生医療学会総会 2015.3. 横浜
5. 妹尾浩. 細胞系譜解析が示す消化器がん幹細胞マーカーの可能性. 愛知県がんセンター特別招聘セミナー 2015.2.6 名古屋
6. 妹尾浩. 消化器腫瘍モデルにおける DCLK1 陽性細胞の意義. 平成 26 年度がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動冬期公開シンポジウム 2015.1.28 東京
7. 妹尾浩. 大腸腫瘍幹細胞を標的とした新規治療法の可能性. がん医療研修機構 第 17 回オンコロジーセミナー 2014.11.15 東京
8. 妹尾浩. 消化器癌モデルマウスにおける癌幹細胞マーカーの意義. 第 8 回 In vivo 実験医学シンポジウム 2014.11.13 東京
9. 妹尾浩. 消化器癌モデルマウスにおける Dclk1 陽性細胞の役割. 第 1 回六甲医学研究会 2014.11.8 神戸
10. 妹尾浩、丸野貴久、山賀雄一、吉岡拓人、中西祐貴、千葉勉. Role of Dclk1-expressing cells in digestive organ tumors. 第 73 回日本癌学会学術総会 コアシンポジウム 1 Reprograming and transdifferentiation in cancer 2014.9.26 横浜
11. 丸野貴久、福田晃久、妹尾浩、千葉勉. 膵腫瘍幹細胞マーカーの探索. 第 73 回日本癌学会学術総会 2014.9.26 横浜 パシフィコ横浜
12. 山賀雄一、妹尾浩、千葉勉. Microarray analysis of Dclk1-positive cells in ApcMin mouse polyps. 第 73 回日本癌学会学術総会 2014.9.25 横浜
13. 妹尾浩、中西祐貴、千葉勉. Dclk1, a specific marker for tumor stem cells in digestive organs. 癌治療の未来 消化器癌幹細胞研究と最新の知見 第 52 回日本癌治療学会学術集

会 高松宮妃癌研究基金共催国際シンポジウム 2014.8.28 横浜

14. 妹尾浩. がん幹細胞を標的とした新しいがん治療の可能性. 第 2 回生命医科学コロキウム 2014.6.27 草津
15. 千葉勉、中西祐貴、妹尾浩. マウスモデルを用いた大腸がん幹細胞マーカーDclk1の同定. 第 100 回日本消化器病学会総会 シンポジウム 2014.4.25 東京

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出 版 地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Goto K, Sugiyama T, Matsumura R, Zhang X, Kimura R, Taira A, Arita E, Iwase K, Kobayashi E, Iwade Y, Saeki N, Mori M, Uzuawa A, Muto M, Kuwabara S, Takemoto M, Kobayashi K, Kawamura H, Ishibashi R, Sakurai K, Fujimoto, M, Yokote K, Nakayama T, Harada J, Kobayashi Y, Ohno M, Chin H, Nishih E, Machida T, Iwata Y, Mine S, Kamitsukasa I, Wada T, Aotsuka A, Katayama K, Kikawa Y, Sunami K, Takizawa H, Nakamura R, Tomiyoshi G, Shinmen N, Kuroda H, Hiwasa T	Identification of cerebral infarction-specific antibody markers from autoantibodies detected in patients with systemic lupus erythematosus.	J. Mol. Biomark. Diagn.	6	2	2015

Ishizu-Higashi S, Seno H, Nishihashi E, Matsumoto Y, Ikuta K, Totsuda M, Kimura Y, Takada Y, Kimura Y, Nakanishi Y, Kandada K, Komekado H, Chiba T.	Deletion of nardilysi prevents the development of steatohepatitis and liver fibrosis.	PLoS One.	9	e98017	2014
---	---	-----------	---	--------	------

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Identification of Cerebral Infarction-Specific Antibody Markers from Autoantibodies Detected in Patients with Systemic Lupus Erythematosus

Ken-ichiro Goto^{1,2}, Takao Sugiyama³, Ryutaro Matsumura⁴, Xiao-Meng Zhang², Risa Kimura², Akiko Taira², Emiko Arita², Katsuro Iwase², Eiichi Kobayashi⁵, Yasuo Iwadate⁵, Naokatsu Saeki⁵, Masahiro Mori⁶, Akiyuki Uzawa⁶, Mayumi Muto⁶, Satoshi Kuwabara⁶, Minoru Takemoto⁷, Kazuki Kobayashi⁷, Harukiyo Kawamura⁷, Ryoichi Ishibashi⁷, Ken-ichi Sakurai⁷, Masaki Fujimoto⁷, Koutaro Yokote⁷, Takashi Nakayama⁸, Jun-ya Harada⁸, Yoshio Kobayashi⁸, Mikiko Ohno⁹, Hirotochi Chin⁹, Eiichiro Nishi⁹, Toshio Machida¹⁰, Yo Iwata¹¹, Seichiro Mine¹², Ikuo Kamitsukasa¹³, Takeshi Wada¹⁴, Akiyo Aotsuka¹⁴, Kaoru Katayama¹⁵, Yuriko Kikkawa¹⁵, Kenro sunami¹⁶, Hirotaka Takizawa¹⁷, Rika Nakamura^{2,18}, Go Tomiyoshi^{2,18}, Natsuko Shinmen^{2,18}, Hideyuki Kuroda¹⁸ and Takaki Hiwasa^{2*}

¹Department of Orthopedics, National Hospital Organization, Chiba-East-Hospital, Chiba, Japan

²Department of Biochemistry, Chiba University, Graduate School of Medicine, Chiba, Japan

³Department of Rheumatology, Shimoshizu National Hospital, Chiba, Japan

⁴Department of Rheumatology, National Hospital Organization, Chiba-East-Hospital, Chiba, Japan

⁵Department of Neurological Surgery, Chiba University, Graduate School of Medicine, Chiba, Japan

⁶Department of Neurology, Chiba University, Graduate School of Medicine, Chiba, Japan

⁷Department of Clinical Cell Biology and Medicine, Chiba University, Graduate School of Medicine, Chiba, Japan

⁸Department of Cardiovascular Medicine, Chiba University, Graduate School of Medicine, Chiba, Japan

⁹Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan

¹⁰Department of Neurosurgery, Chiba Cerebral and Cardiovascular Center, Chiba, Japan

¹¹Department of Cardiovascular Medicine, Chiba Cerebral and Cardiovascular Center, Chiba, Japan

¹²Department of Neurological Surgery, Chiba Prefectural Sawara Hospital, Chiba, Japan

¹³Department of Neurology, Chiba Rosai Hospital, Chiba, Japan

¹⁴Department of Internal Medicine, Chiba Aoba Municipal Hospital, Chiba, Japan

¹⁵Department of Neurosurgery, Narita Red Cross Hospital, Chiba, Japan

¹⁶Chiba Medical Center, Department of Neurosurgery, Chiba, Japan

¹⁷Port Square Kashiwado Clinic, Kashiwado Memorial Foundation, Chiba, Japan

¹⁸Medical Project Division, Research Development Center, Fujikura Kasei Co, Saitama, Japan

*Corresponding author: Takaki Hiwasa, Department of Biochemistry and Genetics, Chiba University, Graduate School of Medicine, Inohana 1-8-1, Chuo-ku, Chiba 260-8670, Japan; Tel: +81-432262541; E-mail: hiwasa_takaki@faculty.chiba-u.jp

Rec date: Jan 05, 2015; Acc date: Jan 28, 2015; Pub date: Feb 02, 2015

Copyright: © 2015 Goto K, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

Background: Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease which may be caused by development of the autoantibodies. On the other hand, SLE is a high-risk group of atherosclerosis, so it is possible that some of autoantibodies in SLE are the result of atherosclerosis-related diseases such as cerebral infarction (CI), cardiovascular disease (CVD) and diabetes mellitus (DM).

Methods: The initial screening of autoantibodies was performed using the protein array method. AlphaLISA was used to analyze the serum antibody levels using synthetic polypeptides as antigens.

Results: After the initial screening using protein array, we identified 67 antigens that were recognized by IgG antibodies in sera of patients with SLE. In the second screening, 170 peptides derived from amino acid sequences of 67 antigens were synthesized and used as antigens for analysis of serum antibody levels by AlphaLISA. The antibody levels for ten peptides were significantly higher in the sera of patients with SLE than in those of healthy donors. Further AlphaLISA analysis of sera of patients with CI, CVD or DM revealed that the serum antibody levels for four peptides derived from SOSTDC1, CTNND1, CLDND1 and CCNG2 were elevated in patients as compared to those of healthy donors.

Conclusions: Serum antibody levels against peptide antigens of SOSTDC1, CTNND1, CLDND1 and CCNG2 are useful markers for diagnosis of the progression of CI, CVD and/or DM.

Keywords: Systemic lupus erythematosus; Cerebral infarction; Cardiovascular disease; Diabetes mellitus; Antibody biomarker

Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic inflammatory disorder characterized by damage to multiple organ systems caused by the production of many autoantibodies, generation of immune complexes, and activation of the complement system [1-3]. Dysfunction of T cells and accelerated activation of B cells in SLE patients [4] enables the development of various autoantigens such as the anti-nuclear antibody [5]. SLE specific autoantibodies thus far reported were the anti-Sm antibody [6], anti-double-stranded DNA antibody [7], anti-U1RNP antibody [8], anti-SSA/Ro antibody [9,10] and the anti-P ribosomal protein antibody [11], yet the pathogenic role of these antibodies remains to be proven.

Accelerated atherosclerotic diseases have been recognized as major causes of mortality in SLE. In the study of large case series of patients with SLE, 6-20% and 4-15% of deaths were due to cardiovascular disease (CVD) and cerebrovascular disease, respectively [12-14]. To estimate the onset risk of accelerated atherosclerosis in SLE patients, several markers have been introduced including C-reactive protein [15], lipoprotein (a) [16], homocysteine [17], inflammatory cytokines [18,19], yet the satisfactory results have not been obtained.

On the other hand, recent studies have revealed that specific autoantibodies exist in the sera of patients with atherosclerosis, such as autoantibodies for phospholipid (Antiphospholipid syndrome) [20,21], apolipoprotein A-1 [22] and oxidized low-density lipoprotein [23]. We have also reported that the antibody levels against RPA2 were associated with the onset of ischemic stroke [24]. These antibody markers might be useful for evaluation of the onset of lethal atherosclerotic disease in patients with SLE.

In the present study, we have comprehensively screened autoantigens which were recognized by IgG antibodies in the sera of patients with SLE by the protein array method. We then selected and identified autoantigens specific for cerebral infarction (CI), CVD and/or diabetes mellitus (DM).

Materials and Methods

Patients and healthy donor sera

This study was approved by the Local Ethical Review Board of the Chiba University, Graduate School of Medicine as well as that of the National Hospital Organization, Shimoshizu Hospital and Chiba-East hospitals. Sera were collected from patients after they had given written informed consent. Each serum sample was centrifuged at 3,000 x g for 10 min, and then the supernatant was stored at -80°C until use.

The serum samples of SLE were obtained from Shimoshizu Hospital, and those of CI and transient ischemic attack (TIA) were obtained from Sawara Hospital, Rosai Hospital, Aoba Hospital and Chiba Medical Center. Samples of CVD and DM were obtained from Chiba University Hospital, and those of healthy donors were from Chiba University, Kashiwado Clinic and Fujikura Kasei Co.

Protein array screening

Initial screening was performed using ProtoArrays® Human Protein Microarrays v4.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), which were loaded with 9,480 species of proteins. A total of 11 sera, 6 from patients and 5 from healthy donors, were used to detect antigens recognized specifically by IgG antibodies in the sera of patients.

Peptide synthesis

Three epitope sites in the candidate antigen proteins were predicted using the program ProPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/propred/>). N-terminal biotinylated 15mer peptides without purification were synthesized and used in the second screening. For the third screening, synthetic peptides were purified by HPLC. The purity of each peptide was determined to be higher than 90%.

AlphaLISA (Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay)

To evaluate the serum antibody levels, AlphaLISA was used. AlphaLISA was performed in 384-well microtiter plates (white opaque OptiPlate™ from Perkin Elmer) containing 2.5 µL of 1/100-diluted serum and 2.5 µL of biotinylated synthetic peptides (400 ng/mL) in AlphaLISA buffer (25 mM HEPES, pH 7.4, 0.1% casein, 0.5% Triton X-100, 1 mg/mL dextran-500, and 0.05% Proclin-300). The reaction mixture was incubated at room temperature for 6-8 h, then anti-human IgG-conjugated acceptor beads (2.5 µL at 40 µg/mL) and streptavidin-conjugated donor beads (2.5 µL at 40 µg/mL) were added and incubated at room temperature in the dark for another 1 - 14 days. The plate was read on an EnSpire Alpha microplate reader (PerkinElmer).

Statistical analyses

Fisher's exact (two-sided) probability test and the Mann-Whitney U test were used to determine the significance of the differences between the two groups. All statistical analyses were carried out using the GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA). P values lower than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Initial screening of SLE-specific antigens by protein array

By using protein microarrays loading with 9,480 proteins, we examined 6 sera from SLE patients and 5 sera from healthy controls to identify SLE-associated antigens. Sixty-seven proteins such as SOSTDC1, CTNND1 were selected as antigens by reacting with more than 5 sera from SLE patients and not with any of the sera from healthy donors (Table 1). These proteins may include not only antigens specific for SLE but also those specific for the complication such as CI, CVD and DM.

Name	
ZIC4	C9orf32
SDHB	DKFZp762
MGC17553	SOSTDC1
RARS2	RNPC3
IPO11	CDC45L
SLC25A24	ZNF649
OTX1	ABAT
MKRN2	CLIC5
KCNS3	H2AFY

ATP6V0A1	TOP3B
SIAH1	KIAA0391
TAS2R13	SND1
FGF23	PCDHA7
TFAM	ZNF449
CLDND1	PPAN
MAFG	AGPAT6
CCNG2	CTRB1
ACTL6B	MAPK13
APEX1	ORC3L
PARP15	MAP4K4
CLK1	RAPGEF4
KIF12	SIRT1
CTNND1	VEGFD
TCF7L2	ZNF187
MYBBP1A	TUFM
ANK1	MIER3
C15orf15	ERp27
PRKCH	C3orf37
ENG	HAPLN1
NOLA1	RNF32
RPS15A	GLCE
C15orf15	UXS1
RBMS3	ETV3
CSNK1A1	

Table 1: List of Protein array-selected antigens recognized by serum antibodies of SLE patients.

Second screening using crude peptides

The amino acid sequences of the 170 peptides shown in Table 2 were predicted as epitope sites of 67 candidate antigen proteins selected in the first screening. In the second screening, these 170 peptides were synthesized and used as antigens for analysis of the serum antibody levels by AlphaLISA. The serum levels of eight peptides (No. 55, 57, 63, 79, 87, 88, 113 and 128) were significantly higher in SLE, CI and/or CVD patients than in healthy controls, and these peptides were selected as useful markers.

No.	Name	Sequence	No.	Name	Sequence	No.	Name	Sequence	No.	Name	Sequence
1	ZIC4-3	YKTSLVMRKRL RLYR	44	SIAH1-267	FAENGNLGINVT ISM	87	MYBBP1A-113 4	LYWQAMKTLGV QRPK	130	KIAA0391-1 80	KYLYLCVFHMQ TSEV

Third screening using purified peptides

We then obtained highly purified biotinylated polypeptides, SOSTDC1-156, CTNND1-211, CLDND1-69, CCNG2-231, TFAM-231, TOP3B-628, MYBBP1A-1134 and MYBBP1A-1306. The sera of HD and SLE patients used for AlphaLISA were obtained from Shimoshizu Hospital. Serum antibodies against SOSTDC1-156, CTNND1-211, TOP3B-628 and MYBBP1A-1306 showed significantly high levels in patients with SLE as compared to those in HD (Table 3). Other peptides showed no apparent difference, probably because the peptides were selected based on the difference between CI and HD in the second screening.

The antibody levels of most peptides were higher in patients with CI (Rosai Hospital and Aoba Hospital) or CVD (Chiba University Hospital and Kyoto University Hospital) than in HD (Table 4). In particular, the levels against SOSTDC1-156 and CLDND1-69 showed obvious differences between CI and HD. On the other hand, CTNND1-211 and CLDND1-69 showed large differences between CVD and HD. When the cut-off value was determined as the average + 2SD of healthy donors, the positivity of CTNND1-211 in CVD was 12.5%. We then examined another set of patients with CI (Narita Red Cross Hospital, Chiba Medical Center and Chiba University Hospital) together with DM (Chiba University Hospital). The differences between CI and HD were reproduced for SOSTDC1-156 and CLDND1-69, and CCNG2-231, and TOP3B-628 also showed clear differences (Table 5). By comparing between HD and patients with DM, CCNG2-231 showed the most obvious difference, although most of other peptides showed similar differences.

Validation test for acute CI and TIA

We further examined the serum antibody levels using another set of sera from patients with aCI (Sawara Hospital) as well as those who has experienced TIA. The serum antibody levels to SOSTDC1-156 were higher in TIA and aCI patients as compared with those of HD (Figure 1). The levels to CTNND1-211, CLDND1-69 and CCNG2-231 were elevated at the aCI stage but not at the TIA stage.

Correlation analysis

We then performed Spearman correlation analysis between the antibody levels and the information of the subject persons including gender, age, height, weight, BMI, maximum intima-media thickness (IMT), blood test data and lifestyle such as smoking, alcohol intake, and work and exercise habits. Data from more than 400 patients were analyzed. The levels of SOSTDC1-156 showed a positive correlation with age, max IMT, complication of hypertension and smoking habit but reverse correlation with working and Chinese tea drinking habits (Table 6). Correlation with IMT represents that this marker reflects atherosclerosis. The levels of CTNND1-211 showed reverse correlation with weight and BMI.

2	ZIC4-185	FKAKYKLVNHIR VHT	45	TAS2R13-30	INCIDWVSKREL SSV	88	MYBBP1A-1306	IRSPSLLQSGAK KKA	131	KIAA0391-478	DDPFLLYATLHS GNH
3	ZIC4-269	RGCDKCYTHPS SLRK	46	TAS2R13-110	KIASFSSPAFLY LKW	89	ANK1-34	CFVLKHIHQELD KEL	132	SND1-423	INIAEALVSKGLA TV
4	SDHB-238	FSLYRCHTIMNC TRT	47	TAS2R13-179	VKFTMTMFSLT PFTV	90	ANK1-99	TKKIIRKVVVRQID LS	133	PCDHA7-172	LSPNEYFFLDVP TSN
5	MGC17553-17	PSKENWFRQLR SQAV	48	TAS2R13-284	GNAKLQRAFL VAAK	91	C15orf15-22	VRNDCKVFRFC KSKC	134	PCDHA7-789	PNPDWRYASL RAGM
6	MGC23985-18	LTCYADDPDK PDDK	49	FGF23-6	LRLWVCALCSV CSMS	92	PRKCH-130	YDHFVANCTLQ FQEL	135	ZNF449-69	ILELLVLEQFLTI LP
7	RARS2-2	ACGFRRACQ LSRV	50	FGF23-40	IHLTATARNYS HLQ	93	PRKCH-171	TLTGSTFTEATLQ RDR	136	PPAN-69	RMTLQLIKVQE GVGE
8	RARS2-179	GLLGTGFQLFG YEEK	51	FGF23-85	ITGVMSRRYLC MDR	94	PRKCH-360	SRSTLRRQGKE SSKE	137	AGPAT6-45	LYMKSLKIFAW ATL
9	RARS2-359	QMLKIMGYDWA ERCQ	52	FGF23-131	QYHFLVSLGRA KRAF	95	ENG-98	VLSVNSSVFLHL QAL	138	AGPAT6-171	RYCFLPLRIAL AFT
10	RARS2-402	LRMLQNMAK TTKK	53	TFAM-5	RSMWGVLSALG RSGA	96	ENG-473	SFVQVRVSPSV SEFL	139	AGPAT6-368	MVTYLLRMMTS WAIW
11	RARS2-500	QHLLRFDEVLY KSSQ	54	TFAM-38	LPRWFSSVLAS CPKK	97	ENG-583	TSKGLVLPVAVL GITF	140	CTRB1-229	GIVSWGSDTCS TSSP
12	IPO11-52	HTLDINVRWLAV LYF	55	TFAM-231	LRRTIKKQRKYG AEE	98	NOLA1-123	FYFSVKLSENM KASS	141	MAPK13-189	RAPEVILSWMH YNQT
13	IPO11-143	RQHRALLTFYH VTKT	56	CLDND1-12	ACVLSLISTIYMA AS	99	RPS15A-2	VRMNVLADALK SINN	142	ORC3L-212	SPPVVVLKDME SFA
14	IPO11-215	LKVLRLKTVNGF VEP	57	CLDND1-69	FRYNGTVGLWR RCIT	100	RPS15A-31	SKVIVRFLTVMM KHG	143	ORC3L-297	QFPFKINEKVLQ VLT
15	IPO11-320	CMNLKIMVKNY AYK	58	CLDND1-177	HLLAGLCTLGSV SCY	101	RPS15A-99	FGFIVLTTSAGI MDH	144	ORC3L-410	MNYFLVLRCLH KFTS
16	IPO11-526	DQDLVVRIETAT TLK	59	MAFG-34	VRELNQHLRGL SKKE	102	C15orf15-23	RNDCKVFRFCK SKCH	145	MAP4K4-40	VEVVNGNGTYGQ VYKG
17	IPO11-579	HVLHLVSCVIER VNM	60	CCNG2-84	LDRFLALMKVK PKHL	103	RBMS3-130	PTNLVYISNLPIS MDE	146	MAP4K4-152	GLAHLHHHHVIH RDI
18	IPO11-708	KIINGYIFLSSTE FL	61	CCNG2-130	QCKCTASDIKR MEKI	104	CSNK1A1-13	VGGKYKLVIRKI GSGS	147	RAPGEF4-44	PLRPANTITKVP SEK
19	SLC25A24-113	QSLQTLGLTISE QQA	62	CCNG2-181	SLDKLEAQLKA CNCR	105	CSNK1A1-109	TMKTVLMLADQ MISR	148	RAPGEF4-391	MMHCVFMPNT QLCPA
20	SLC25A24-248	RSLWRGNGTN VIKIA	63	CCNG2-231	KKHSHKINDTEFF YWR	106	CSNK1A1-277	LRQLFRILFRTL NHQ	149	RAPGEF4-583	DVSVFTTLTING RLF
21	SLC25A24-389	LGCALSSSTCG QLAS	64	CCNG2-270	WIVSRRTAQN LHSY	107	C9orf32-156	SLRPNGIIVIKDN MA	150	RAPGEF4-680	QFVWVTEICLC SQLS
22	SLC25A24-430	LFRRIISKEGIPG LY	65	ACTL6B-146	FFLCKTAVLTAF ANG	108	C9orf32-184	CRDLDVVRRIC SAG	151	RAPGEF4-841	SYVRQLNVIDN QRTL
23	SLC25A24-444	YRGITPNFMKVL PAV	66	ACTL6B-376	KLIASNSTMERK FSP	109	DKFZp762-2	LHMSRLLSTK PSSI	152	SIRT1-26	MTLWQIVINILSE PP
24	OTX1-68	REEVALKINLPE SRV	67	APEX1-168	VTAYVPNAGRG LVRL	110	DKFZp762-142	KWLISPVKIVSR PTI	153	SIRT1-246	VIGSSLKVRPVA LIP
25	MKRN2-109	LRDRNLSGMAE RKTQ	68	APEX1-189	DEAFRKFLKGL ASRK	111	DKFZp762-365	PHFQGFQKLPS SPLG	154	VEGFD-155	NTSTSYISKQLF EIS