

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業）
 プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班 分担研究報告書

亜急性硬化性全脳炎における髄液プロテオーム解析の試み（第2報）

研究分担者：長谷川俊史 山口大学大学院医学系研究科医学専攻小児科学講座
 研究協力者：松重武志 山口大学大学院医学系研究科医学専攻小児科学講座
 研究協力者：市山高志 鼓ヶ浦こども医療福祉センター小児科
 研究協力者：Banu Anlar Department of Pediatric Neurology, Hacettepe University Faculty of Medicine

研究要旨【背景】 報告者らはこれまで SSPE 患者検体を用いて病勢の指標や病態理解のためのバイオマーカー探索を行ってきた。量および数ともに限られた希少な検体から効率よくバイオマーカーを検索するために、昨年度から SSPE 髄液蛋白の網羅的解析を試みている。

【対象と方法】 トルコ Hacettepe 大学の協力で得られた SSPE 患者 1 名および対照（睡眠障害患者 1 名）の診断時髄液を用いた。蛋白濃縮後、ポリアクリルアミドゲルを用いた二次元電気泳動を行い、対照と異なるスポットの等電点と分子量を求めた。質量分析で同定されたタンパクについて検体数を増やし、Western blot を行った。

【結果】 SSPE と対照で得られた計 472 のスポットのうち、SSPE が対照より 3 倍以上高く明瞭なスポットが 11 個検出された。質量分析の結果、Dermcidin が得られた。抗 Dermcidin 抗体を用いた Western blot では、約 25kDa と 50kDa のバンドが 2 つ検出された。

【考察】 過去の SSPE 髄液プロテオーム解析の報告は 1 つのみで、4 から 5 のスポットが認められたものの、同定には至っていない。本研究の結果では Dermcidin がその候補となっているが、Western blot のバンドは非特異的反応の可能性があるため再検討を行っている。今後はより高感度な質量分析を用いた網羅的解析を行う予定である。

A. 研究目的

報告者らはこれまで亜急性硬化性全脳炎 (Subacute sclerosing panencephalitis: SSPE) 患者の髄液を用いて、炎症性サイトカイン (interleukin [IL]-6) [1]、細胞骨格蛋白 (microtubule associated protein [MAP]-2) (投稿準備中)、代謝産物 (キノリン酸) (投稿準備中)などを病勢の把握、病態解明および治療効果判定のためのバイオマーカーとして検索を行ってきたが、効率、臨床情報の不足および患者検体が数、量ともに希少であることから、十分な結果が得られていない。そのため昨年度から報告者らはプロテオミクスの観点から SSPE 髄液蛋白の網羅的な解析について検討している。

B. 研究方法

トルコ Hacettepe 大学の協力で得られた SSPE 患者 1 例および疾患対照として睡眠障害患者 1

例の診断時髄液を用いて、蛋白濃縮後、ポリアクリルアミドゲルを用いた二次元電気泳動を行い、対照と異なるスポットの等電点と分子量を求め、質量分析により解析した。さらにその同定のための髄液検体 (対照 3 名、SSPE 3 名、急性脳症 2 名および細菌性髄膜炎 1 名) を用いて Western blot を行う。

(倫理面への配慮)

本研究では研究協力者の Hacettepe 大学 Banu Anlar 教授から個人が特定できないような状態で、匿名化した検体の提供を受けている。

本研究はヒト由来の検体を使用するため山口大学医学部附属病院医薬品等治験・臨床研究等審査委員会の承認を得て本研究を遂行している。

C. 研究結果

SSPE と対照で計 472 のスポットが検出された。このうち SSPE が対照より視認できる明瞭なスポットは 11 個検出された(図 1)。11 個のスポットは等電点 10 付近で分子量①約 160kDa, ②約 150 kDa, ③約 130 kDa, ④約 100 kDa, ⑤約 90 kDa, ⑥約 50 kDa, ⑦約 45 kDa, ⑧約 10 kDa, 等電点 7.6 付近で分子量⑨約 10kDa, 等電点 6.8 付近で分子量⑩約 10kDa, 等電点 6.5 付近で分子量⑪約 10kDa であった(表 1)。このうち質量分析により⑪が Dermcidin であると推測された。その確認のために抗 Dermcidin 抗体を用いた Western blot を施行した。約 25kDa と 50kDa のバンドが 2 つ検出されたが(図 2)、非特異的反応の可能性もあるため検討中である。

D. 考察

過去の SSPE 患者における髄液プロテオーム解析の報告は 1 つのみで、4 から 5 のスポットが認められたが、同定には至っていない [1]。

Dermcidin はエクリン汗腺から分泌される anti-microbial peptide として報告された [2]。C 末端が抗菌および抗真菌作用を有し、皮膚の感染防御機構を担っている。N 末端は diffusible survival evasion peptide として酸化ストレス下での神経細胞生存に関わる。本研究では SSPE 患者の髄液では疾患対照に比して Dermcidin の有意な上昇が認められたが、Western blot で検出された 2 つのバンドは非特異的反応の可能性もあるため、現在異なる抗体を用いて再検討している。今後はより高感度な質量分析を用いた網羅的解析も行う予定である。

E. 結論

SSPE 患者の髄液において疾患対照に比し Dermcidin が有意に高値であった。Dermcidin が SSPE の病態に関与している可能性が示唆されたが、現在検討中である。

[参考文献]

- 1) Aydin OF, Ichiyama T, Anlar B. Serum and cerebrospinal fluid cytokine concentrations in subacute sclerosing panencephalitis. *Brain Dev* 32:463-466, 2010.
- 2) Dams E. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of serum and cerebrospinal fluid proteins in multiple sclerosis and subacute sclerosing panencephalitis. *Acta Neurol Belg* 86:233-242, 1986.
- 3) Schitteck B. The multiple facets of dermcidin in cell survival and host defense. *J Innate Immun* 4:349-360, 2012.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

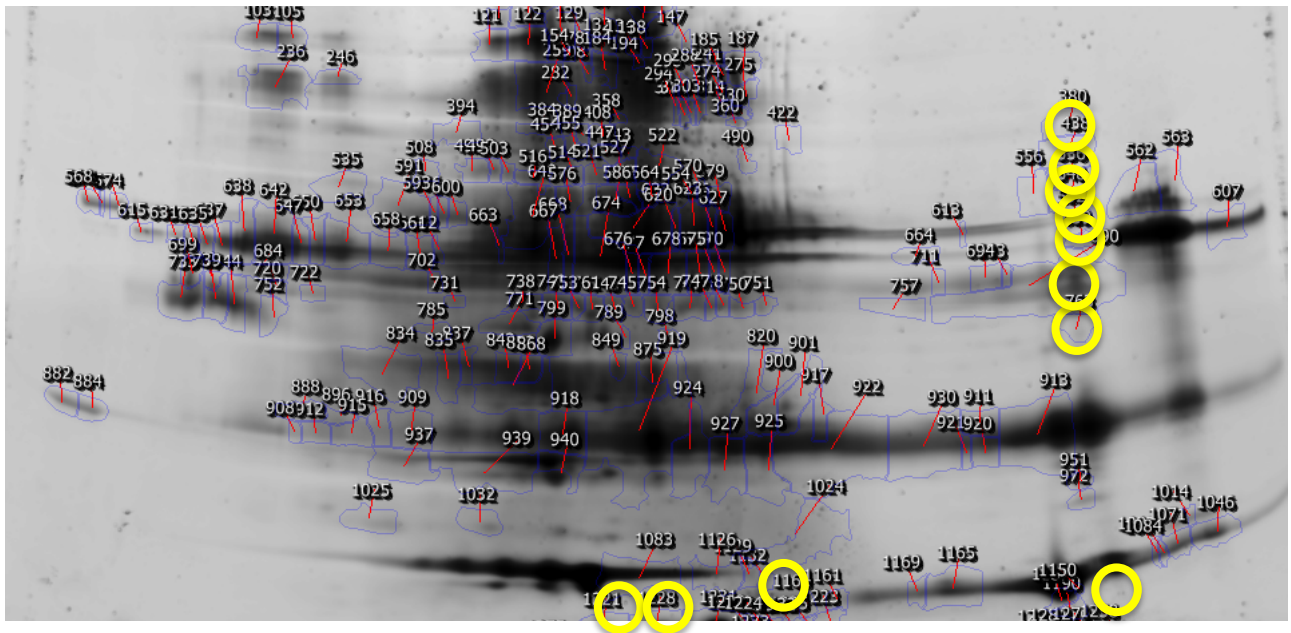


図 1. 二次元電気泳動

SSPE 髄液では対照より 3 倍以上高く、視認できる明瞭なスポットが 11 個検出された。

表 1 質量分析

スポット No	等電点	分子量	質量分析による候補蛋白
1	10 付近	約 160 kDa	Keratin
2	10 付近	約 150 kDa	Keratin
3	10 付近	約 130 kDa	Keratin
4	10 付近	約 100 kDa	Keratin Nuclear receptor corepressor 1 (合致ペプチド数 2、分子量 271 kDa) Glutamate receptor 1-4 (合致ペプチド数 1、分子量 99-102 kDa)
5	10 付近	約 90 kDa	Keratin
6	10 付近	約 50 kDa	Keratin Ig gamma-1,3 chain C (合致ペプチド数 4, 2、分子量 36, 42 kDa)
7	10 付近	約 45 kDa	Keratin
8	10 付近	約 10 kDa	Keratin Glutamate receptor 1-4 (合致ペプチド数 1、分子量 99-102 kDa)
9	7.6 付近	約 10 kDa	Keratin Glutamate receptor 1-4 (合致ペプチド数 1、分子量 99-102 kDa)
10	6.8 付近	約 10 kDa	Keratin Glial fibrillary acidic protein (合致ペプチド数 1、分子量 499 kDa)
11	6.5 付近	約 10 kDa	Keratin Dermcidin (合致ペプチド数 3、分子量 11 kDa)

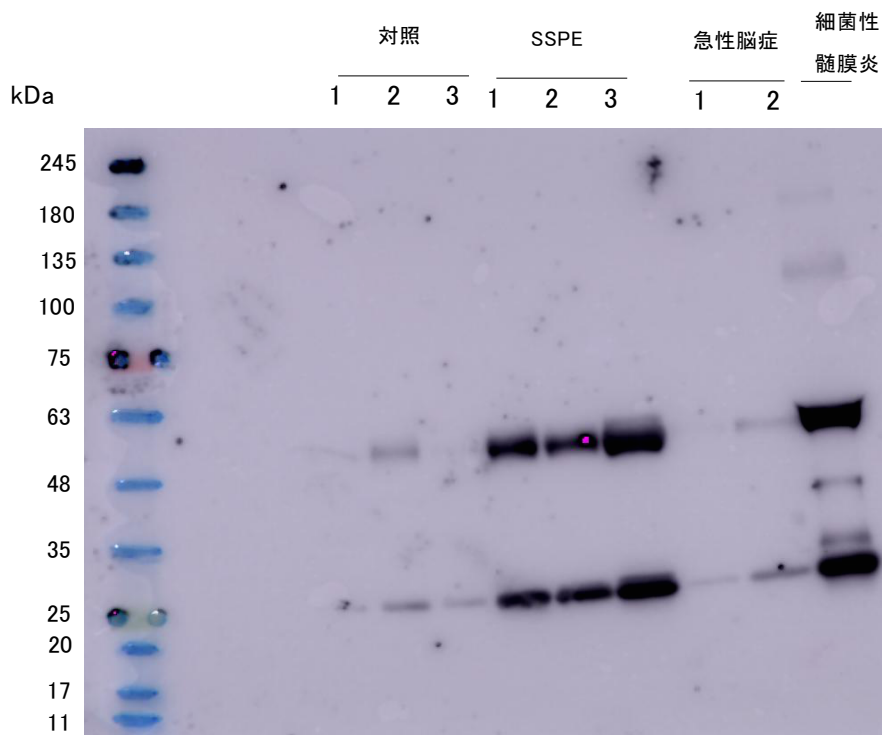


図 2. Western blot

抗 Dermcidin 抗体を用いた Western blot において約 25kDa と 50kDa のバンドが 2 つ検出されたが、非特異的反応の可能性もあるため検討中である。