

論 文 概 要

論 文 題 目

プロテオーム解析による花粉症治療関連分子 Apolipoprotein
AIV の同定とその機能解析

指 導 教 員

人間総合科学研究科 生命システム医学専攻 有波忠雄教授

(所属) 筑波大学大学院人間総合科学研究科 生命システム医学専攻

(氏名) 丸田友香

目的:

花粉症は国民の 35%以上が罹患しており、病態の解明とより安価で効果的な治療法の開発は社会的にも急務の課題である。花粉症に対して長期寛解を期待できる治療法として舌下免疫療法があるが、同治療法は一般の普及を妨げる欠点も有する。もし、舌下免疫療法により変化する分子を同定できれば、より安価かつ容易な治療形態を開発することが可能である。現在までにスギ花粉症患者の舌下免疫療法前後におけるヒトの試料を用いてプロテオーム解析を行った例はないことから、プロテオーム解析により新たな疾患関連タンパク質が見つかる可能性は高い。そこで、本研究では、同一のスギ花粉症患者の舌下免疫療法前後の血清タンパク質を比較することにより、舌下免疫療法により特異的に変動するタンパク質を探索し、変動したタンパク質について患者由来の好塩基球とノックアウトマウスを使った解析を行うことで、花粉症の病態に対する舌下免疫療法の作用機序の解明、また、花粉症の治療に効果的なタンパク質の精製を目的とした。

対象と方法:

舌下免疫療法を行った 24 名のスギ花粉症患者（実薬投与群 15 名とプラセボ群 9 名）を対象とし、プロテオーム解析を行った。具体的には、血清サンプルタンパク質の調整を行った後にディファレンシャル二次元電気泳動(2D-DIGE)を行った。また、得られた 2D-DIGE の像をデジタル化し、Decyder ソフトウェアにより治療前後のタンパク質発現を比較し、治療前後のタンパク質発現に有意差のあるタンパク質スポットを検出した。そして、これらのタンパク質の同定のために二次元電気泳動(2D-PAGE)を行い、ゲルを銀染色した後、タンパク質スポットを切り出し、ゲルの脱染色、トリプシンによるゲル内タンパク質の消化、ペプチドの抽出・回収を行い、抽出したペプチドを HPLC により濃縮分離した。得られた分画をそれぞれ MALDI-TOF/TOF 型質量分析器を用いて分析した。質量分析によって得られたペプチドスペクトルを Mascot データベースにおいて既知のタンパク質と比較する事でタンパク質を同定した。また、同定したタンパク質の中で実薬投与群において特異的に発現が増加し、かつ症状緩和と関連のみられたタンパク質に注目し、ウェスタンブロットを用いて相対変化量の解析を行った。さらに、実薬群において特異的に変化がみられたタンパク質について Pathway analysis を行った。

プロテオーム解析により舌下免疫療法関連タンパク質として ApoA-IV が検出されたため、スギ花粉症患者由来の好塩基球を用いて ApoA-IV 添加によるヒスタミン遊離率の検討、および、ApoA-IV knockout マウスを用いたアレルギー反応に対する APOA-IV の機能解析を行った。スギ花粉症患者の末梢血単核球より分離した好塩基球をスギ花粉エキス Cryj1 のみを添加して培養した場合と、スギ花粉エキス Cryj1 に加えてリコンビナント ApoA-IV を添加して培養した場合のヒスタミン遊離率を測定した。また、ApoA-IV knockout マウスおよび wild type マウスを用いてアレルギー性鼻炎を誘発させた後、症状（くしゃみ、鼻掻き）、血清総 IgE、血清 OVA 特異的 IgE、サイトカイン定量および発現

解析、鼻組織における好酸球の浸潤を評価し、両群の比較を行った。

最後に Human recombinant ApoA-IV の精製を行った。Human recombinant ApoA-IV を大腸菌で効率的に発現させるために、ヒト ApoA-IV 配列の最適化を行った後に ApoA-IV 遺伝子の人工合成を行い、発現ベクター pET30a- ApoA-IV を構築した。この pET30a- ApoA-IV と大腸菌 BL21star を用いたタンパク質発現、及び、アフィニティークロマトグラフィーとイオン交換クロマトグラフィーを組み合わせたタンパク精製により、Human recombinant ApoA-IV を作成した。

結果:

プロテオーム解析により、治療前と比較して治療後において統計学的に有意な変化 ($p < 0.05$) を示し、かつ 1.1 倍以上の変化が認められた 16 個のタンパク質スポットを検出した。また、それらのスポットについて質量分析を行い、15 スポット、7 種類のタンパク質を同定した。これらのタンパク質のうち実薬投与群において特異的に発現が増加していたタンパク質として、Acidic complement component 4 (C4A)、ApoA-IV、Transthyretin (TTR) が確認された。また Pathway analysis によりこれら 3 つのタンパク質は共通の転写因子である HNF4A によって制御されていることが示唆された。さらに、これらのタンパク質のうち ApoA-IV が症状緩和との関連が認められた ($P < 0.05$)。ApoA-IV についてウェスタンブロットを用い、相対変化量の解析を行った結果、実薬投与群において治療後に顕著な ApoA-IV の増加が確認された。

ApoA-IV の機能解析を目的に行ったヒスタミン遊離試験により、ApoA-IV 添加群において有意にヒスタミン遊離率の抑制が認められた。さらに、ApoA-IV knockout マウスおよび wild type マウスを用いてアレルギー性鼻炎を誘導し、病態の評価を行った結果、症状(くしゃみ、鼻掻き)について ApoA-IV knockout マウス群において有意に多く誘発されているという結果を得た ($P < 0.05$)。しかし、血清総 IgE、血清 OVA 特異的 IgE、サイトカイン定量および発現解析については傾向はあるものの有意差は得られなかった ($P > 0.05$)。また、鼻組織における好酸球浸潤にも大きな差が確認できなかった。

最後に Human recombinant ApoA-IV の発現精製を行い、活性能をもつリコンビナントタンパク質の精製法を確立した。

考察:

スギ花粉症患者の舌下免疫療法治療前と治療後(実薬投与群およびプラセボ群)の血清を用いたプロテオーム解析により、実薬群のみで有意に発現が増加し、かつ症状緩和と関連が確認されたタンパク質として ApoA-IV が見いだされた。また、ApoA-IV の機能解析により好塩基球においてヒスタミン遊離抑制作用を持つことが確認された。これらのことからこれら ApoA-IV は舌下免疫療法により変動したタンパク質である可能性が高く、治療に有用な抗炎症作用のあるタンパク質である可能性が考えられた。ApoA-IV knockout マ

ウスおよび **wild type** マウスを用いたアレルギー性鼻炎誘導実験では、症状について有意差がみられたことから、アレルギー性鼻炎症状の軽減に **ApoA-IV** が関与している可能性が示された。

結論:

プロテオーム解析により、実薬群のみで有意に発現が増加したタンパク質として **C4A**、**Apo-AIV**、**Transthyretin (TTR)**が同定され、**Pathway analysis** を行った結果、3つのタンパク質は共通の転写因子である **HNF4A** によって制御されていることが示唆された。また3つのタンパク質のうち症状緩和と関連が確認されたタンパク質として **ApoA-IV** を同定した。**Apo-AIV** はヒスタミン遊離抑制作用があり、**in vivo** の実験においても症状緩和に関連していることが示唆された。