

血中CRP複合体のプロテオーム解析

小倉彩世子¹⁾, 中山智祥^{1,2)}, 下澤達雄³⁾

Proteome analysis of C-Reactive Protein (CRP) binding protein

Sayoko OGURA¹⁾, Tomohiro NAKAYAMA^{1,2)}, Tatsuo SHIMOSAWA³⁾

要旨

C-reactive protein (CRP) は肝臓で産生され、炎症などの刺激によって数百倍にも産生が増加し、血清中のCRP濃度は感染症の重症度や組織傷害の有無の判定に広く用いられている。CRPは多糖体やリン酸などと結合しており、複合体を形成していることが報告されている。これらのCRPの複合体についてはいくつか測定報告があるが、臨床的意義および病態との関連については不明なことも多い。CRPに結合している複合体および、CRPとの結合しているcomplexを抗CRP抗体で免疫沈降したものとNegative control (mouse IgG) で免疫沈降したもので比較した。さらにCRP正常、および高値の血清を免疫沈降したものを二次元泳動し、質量分析装置を用いてタンパク質の解析を行った。その結果、新たにCRPに結合するタンパク質としてVitamin D binding proteinが同定された。

1. はじめに

C-reactive protein (CRP) は肝臓で産生され、炎症などの刺激によって数百倍にも産生が増加し、血清中のCRP濃度は感染症の重症度や組織障害の有無の判定に広く用いられている。一方正常血清中にも微量ながら存在しており、その意義に興味もたれている。近年では動脈硬化や冠動脈疾患の早期診断・治療の経過観察として高感度CRP測定法の開発などが行われてきた。CRPは多糖体やリン酸などと結合しており、複合体を形成していることが報告されている¹⁾。これらのCRPの複合体についてはいくつか測定報告があるが、臨床的意義および病態との関連については不明なことも多い。近年CRPとβ2-glycoproteinが酸化LDLと複合体を形成していることがわかり、この複合体は動脈硬化性疾患である糖尿病患者血中、特にIntima media thickness (IMT) で診断される動脈硬化陽性患者で特異的に検出され、急性炎症性のCRP陽性患者では検出さ

れないことが報告された²⁾。さらに、この複合体は高感度CRPと高い相関性を示し、高感度CRPの本体が複合体であると考えられている。よってCRP複合体が慢性炎症マーカーになりうることが今後期待されている。本研究の目的は、CRP複合体のプロテオーム解析を行い、CRP複合体を構成するタンパク質を特定し、病態との関連性を明らかにすることによって、新たな慢性炎症マーカーを臨床検査に応用する事である。

2. 対象及び方法

対象として2012年から2014年に駿河台日本大学病院を受診した外来・入院患者残余血清を用いた。本研究を遂行するにあたって当該倫理委員会に申請し承認を得た。使用まではプール凍結し保存した。Magnetを用いた免疫沈降法で抗CRP抗体 (Thermo Fisher Scientific社) とNegative control (mouse IgG, Santa Cruz社) をおよびProtein A/G ビーズ (Pierce

1) 日本大学医学部 病態病理学系 臨床検査医学分野

2) 日本大学医学部 病態病理学系 コンパニオン診断学分野

3) 東京大学医学部附属病院 検査部

小倉彩世子: ogura.sayoko@nihon-u.ac.jp

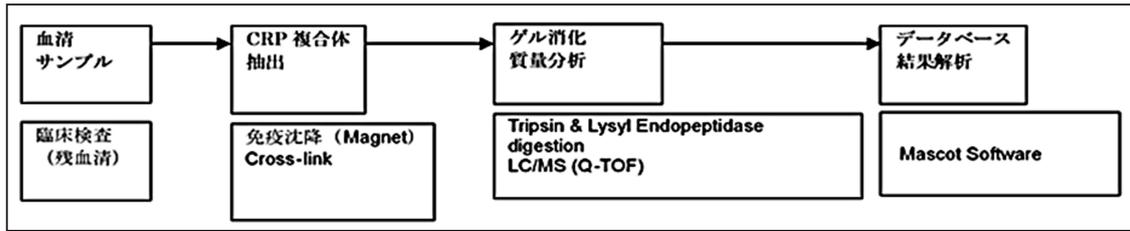


図1 CRP複合体検出の流れ

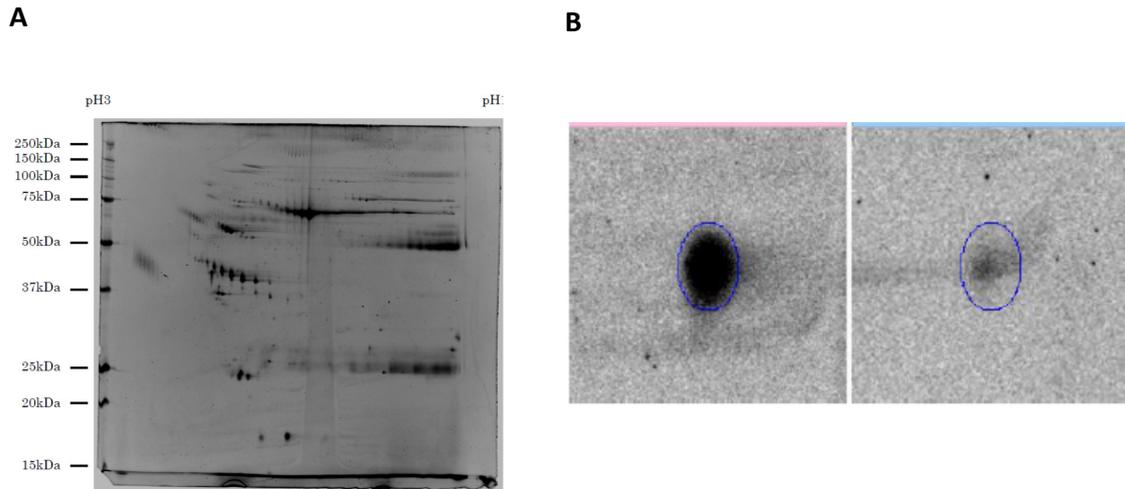


図2A・B 2次元電気泳動 ゲルスロット解析

社)を結合させ、その後血清とともに1時間培養した。結合した蛋白を2次元電気泳動 (pH3-10) にて泳動し、Gel spotを画像解析ウェア (SameSpots) にて解析し、発現量の違いの認められるスポットを切り出し、LC-MS/MS解析を行った。質量分析から得られたデータはMascot software (Matrix Science社) にてデータベースと照合し同定を行った。

3. 結果

抗CPR抗体で免疫沈降したものとNegative control (mouse IgG) で免疫沈降したものをそれぞれLC/MSにて解析を行ったがいずれもHuman IgGやAlbuminなどの血中蛋白が多く、違いを見つけるのは困難であった。その為IgGやAlbuminを除去するDepletion カラムの使用を試みた。しかしSDS page電気泳動にて、DepletionカラムによってCRPと結合する蛋白の減少が認められることが確認された。そのため、Depletionカラムは用いず免疫沈降を行い、2次元電気泳動によってスポット解析を行う事

とした。2次元電気泳動 (pH 3.0-10) では免疫沈降後も数多くのスポットが検出された (図2A)。CRP陽性プール血清とCRP陰性プール血清の電気泳動の結果をゲルスロット解析したところ、3つのスポットに変化が認められた。発現変化の強いスポット (図2B) をLC-MS/MS解析を行った。幾つかの既知の蛋白が検出され (表1)、そのうち2次元電気泳動の泳動結果と一致するVitamin D binding protein 53kDが同定された。

4. 考察

今回の結果からCRP複合体としてVitamin D binding proteinが新たに同定された。Vitamin D binding proteinはビタミンDと結合し、血中でのVitamin Dの濃度やVitamin D binding proteinの濃度は冠動脈疾患と相関があるとの報告がある³⁾。今後はCRP複合体としてのVitamin D binding protein量を測定し、臨床的意義を検討する。

表1 LC-MS/MSによって同定された蛋白

Identified Proteins	Accession Number	Molecular Weight
Vitamin D-binding protein OS=Homo sapiens GN=GC PE=1 SV=1	sp P02774 VTDB_HUMAN	53 kDa
Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1	sp P00738 HPT_HUMAN	45 kDa
Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 PE=1 SV=3	sp P01009 A1AT_HUMAN	47 kDa
Angiotensinogen OS=Homo sapiens GN=AGT PE=1 SV=1	sp P01019 ANGT_HUMAN	53 kDa
Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1	sp P01857 IGHG1_HUMAN (+1)	36 kDa

謝辞

本研究は平成26年度日本大学医学部学術研究助成金「土岐研究」の支援によりなされたものであり、ここに深甚なる謝意を表します。

文献

- 1) Chang MK, Binder CJ, Torzewski M, Witztum JL: C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002) **99**(20):13043-13048.
- 2) Tabuchi M, Inoue K, Usui-Kataoka H, Kobayashi K, Teramoto M, Takasugi K, Shikata K, Yamamura M, Ando K, Nishida K, Kasahara J et al: The association of C-reactive protein with an oxidative metabolite of LDL and its implication in atherosclerosis. *J Lipid Res* (2007) **48**(4):768-781.
- 3) Rocchiccioli S, Andreassi MG, Cecchetti A, Carpegiani C, L' Abbate A, Citti L: Correlation between vitamin D binding protein expression and angiographic-proven coronary artery disease. *Coron Artery Dis* (2012) **23**(7):426-431.