

研究組織

研究代表者：伊藤 喜久 旭川医科大学医学部教授

分担研究者：河端 薫雄 旭川医科大学医学部助手

尿炎症蛋白プロテイン1の遺伝子多型、結合

蛋白解析と病態検査診断への展開

交付決定額(配分額)

(金額単位:千円)

	(研究番号 14370791)		合 計
平成14年度	2,900	0	2,900
平成15年度	2,000	0	2,000
平成16年度	2,300	0	2,300
総 計	7,200	0	7,200

平成14-16年度 科研費補助金「基盤研究(B) (2)

研究論文

研究成果報告書

1) Takeshi Ohchi, Noriharu Saito, Kazuhisa Kawabata, Shingo Ichikawa, Akihiro Yanaguchi, Yoshifumi Uemura, Yoshihisa Itoh, Shosaku Abe, Yomai Hiraga, and Noriyuki Sato. Polymorphism of Clara 10-kD protein Gene of Sarcoidosis. Am J Respir Crit Care Med. 169: 1800-1807, 2004
平成17年3月

2) Tanaka R, Saito T, Shijubo N, Takahara M, Yamada G, Kawabata J, Itoh Y, Kudo R. Expression of uteroglobin in normal and carcinogenic endometrium and influence of hormone replacement therapy. Int J Cancer. 109(1): 43-8, 2004

3) Shijubou N, Kawabata J, Saito M, Itoh Y. Clinical aspects of Clara cell 10-Kdprotein/uteroglobin. J Clin Lab Invest (14): 1139-49, 2003

4) Matsunaga A, Nakamura T, Saito T, Kawabata J, Suzuki T, Itoh K, Suzuki M, Hayasaka K. Association of the uteroglobin gene polymorphism with IgA nephropathy in Japanese. Am J Kidney Dis. 39: 36-41, 2002.

研究代表者 伊藤喜久
(旭川医科大学医学部教授)

研究組織

研究代表者 : 伊藤 喜久 旭川医科大学医学部教授

分担研究者 : 河端 薫雄 旭川医科大学医学部助手

岩崎 匡臣 栄研化学株式会社

DUG ユニツ技術開発部・研究職

四十坊典晴 札幌医科大学第三内科 (平成 14 年度)

交付決定額(配分額)

(金額単位:千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 14 年度	2,900	0	2,900
平成 15 年度	2,000	0	2,000
平成 16 年度	2,300	0	2,300
総計	7,200	0	7,200

研究論文

- 1) Takashi Ohchi, Noriharu Sijubo, Isao Kawabata, Shingo Ichikawa, Akihiro Yamaguchi, Yoshifumi Umemori, Yoshihisa Itoh, Shosaku Abe, Yomei Hiraga, and Noriyuki Sato. Polymorphism of Clara 10-kD protein Gene of Sarcoidosis. Am J Respir Crit Care Med. 169: 180-186, 2004.
- 2) Tanaka R, Saito T, Shijubo N, Takehara M, Yamada G, Kawabata I, Itoh Y, Kudo R. Expression of uteroglobin in normal and carcinogenic endometrium and influence of hormone replacement therapy. Int J Cancer. 109(1): 43-8, 2004
- 3) Shijubou N, Kawabata I, Sato M, Itoh Y. Clinical aspects of Clara cell 10-Kdaprotein/uteroglobin. Curr Pharma Desighn. 9(14): 1139-49, 2003
- 4) Matsunaga A, Nakamura C, Itoh Y, Masakane I, Suzuki T, Itoh K, Suzuki M, Hayasaka K. Association of the uteroglobin gene polymorphism with IgA nephropathy in Japanese. Ame J Kidney Dis. 39: 36-41, 2002.

総説

- 1) 四十坊典晴、河端薫雄、佐藤昇志、伊藤喜久 抗炎症抗癌分子 クララ細胞 10-Kda 蛋白質 炎症と免疫 12(3)79-84(331-336), 2004
- 2) 河端薫雄、伊藤喜久 遺伝子検査によるオーダーメイド医療 臨床病理 12:1124-1129. 2002
- 3) 四十坊典晴、河端薫雄、佐藤昇志、伊藤喜久 クララ細胞 10 kDa 蛋白質 臨床化学 32:227-223, 2003.
- 4) 伊藤喜久 生物物理化学 検査前検査から見た尿蛋白個別測定 生物物理化学 2005 印刷中

学会発表

- 1) 伊藤喜久 特別講演 ヒトプロテイン1/クララ細胞 10kDa 蛋白質 第43回日本臨床医学会東海・北陸支部総会 平成16年3月7日, 三重
- 2) 伊藤喜久 教育講演 検査前検査から見た尿蛋白個別測定 第55回日本電気泳動学会総会 平成16年11月13日, 東京、生物物理化学 48 捕:3、2004.
- 3) 林 由紀子、伊藤喜久 リコンビナントプロテイン1のアクチン骨格系を介した血小板凝集抑制作用 第37回日本臨床検査医学会北海道支部総会 2003年9月、札幌
- 4) Itoh Y Clinical significance of protein 1. Conference on Molecular Biology and Biochemistry, Hanoi, 20 October, 2003
- 5) Itoh Y Variation of urinary proteins in preanalytical stages. Symposium World challenge of urinalysis. The 18th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Kyoto, 24 October 2002.
- 6) Kawabata I, Umemori Y, Shijyubo N, Daichi T, Hotta O, Itoh Y. Single nucleotide polymorphisms of the protein 1 gene. The 18th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Kyoto, 22 October 2002.
- 7) 河端薫雄、梅森祥央、伊藤喜久 サルコイドーシス患者におけるCC10遺伝多型の単一ヌクレオチド多型 臨床検査医学会北海道支部 2002年9月、札幌

研究概要

プロテイン1 (P1) は、肺クララ細胞 10 kDa 蛋白 (CC10)、uteroglobin、PCB結合タンパクとも呼ばれる分子量14,000ダルトンの非糖蛋白質で、7kDaのhomodimer構造をとる。肺I型上皮細胞、前立腺などから分泌され、局所の炎症制御に作用していると考えられている。科学研究補助金基盤研究(B)

(2)【尿炎症蛋白プロテイン1の遺伝子多型、結合蛋白解析と病態検査診断への展開】(研究番号第14370791)は平成14-16年度に渡り研究が実施された。

Allelic PCR, direct sequencing, luciferase reporter assay, ELISA, 免疫組織化学的検査を駆使して以下の臨床研究の成果を得た。Uteroglobin knockout mouseではヒトと組織学的に類似したIgA腎症を発症する。そこで小児、成人IgA腎症とSNPsとの関連性をG38Aに的を絞り検討した。症例数が限られequivocalな結果は否定できないが、A alleleを有するものに頻度が高く、対応する患者でのUteroglobin/protein 1の血清濃度の低下傾向を認めた(文献1)。相対的低下により抗炎症作用が高まり、さらに相対的に増加したprotein 1非結合性のIgA-fibronectin, fibronectinの腎糸球体への沈着が惹起された可能性が疑われた(文献1)。さらにサルコイドーシスのG38A多型では、38Aアレルに優位な集積があり、肺胞細胞洗浄液においても38A/Aでは、38G/G, 38G/Aに比べ低値であり、プロモータ活性の低下が関連していることを肺癌細胞株へのインターフェロン γ 誘導 reporter assayにより証明した。一般的に38Aの症例は遷延化傾向があり、予後が不良となる。患者の予後推定、治療予防に有力な武器となることが期待される(2, 3)。Uteroglobinは子宮内膜上皮細胞に豊富に産生分泌される。月経周期の分泌期において、細胞染色性が増加することを免疫組織化学的染色、ウエスタンブロットにより明らかにした。さらに子宮内膜症では陽性細胞の染色性が減少しており、子宮頸癌では減少、消失していた。詳細な機序は不明である。健常者においてはestrogenの共同作用のもとでprogesteroneの作用に支配されるが、内膜症、癌においてはこの支配から外れる(4)。

少なからぬ尿中蛋白が酸性条件で抗原性を失う。代表的な成分に β 2-ミクログロブリンがある。酸性尿ではその初期にはcathepsin Dなど酸性プロテアーゼが作用し、一次構造でcleavage site (Phe-Phe, Tyr-Phe, Leu-Tyr, Phe-Tyrなど)を有するものは容易に分解変性されやすい。一次構造上想定される切断部位は10箇所以上にも及ぶ(総説4)。ところが、プロテイン1はきわめて安定性が高く、その切断部位は2箇所しかない。さらに構造上疎水性のポケットが存在し

ておりここにリン脂質など種々のリガンドが結合しており、構造的安定性を高めていると思われる。これまで検索した限り $\alpha 1$ -ミクログロブリン、レチノール結合蛋白もきわめて安定性が高く、P1と全く共通の性状を示す(5)。尿中蛋白測定の意義を知る前には、まずその安定性を確かめなければならない。

P1の研究を推進する目的で、新たにバキユロの産生システムを確立して、無血清で大量に収拾率の高い Recombinant P1 を約 3 mg 得た。血液凝固、あるいは PG 系の制御など炎症制御機能を有するだけに、自己抗体の出現は何らかの病態の原因ともなりうる。新たに得た Recombinant P1 を用いて自己抗体検出検査の開発を進めていく予定である。

LAMP法の原理を用いた SNP タイピングは wild type あるいは mutant type それぞれに対するプライマーを設計した 2 種の増幅試薬を準備し、蛍光インターカレーターを使用することにより一定温度(約 60°C)下で約 30 分の増幅反応後直ちにタイピングが可能である。タイピングには 2 つのプライマーを allele specific primer として使用するが、特異性を完全にし、wild あるいは mutant のみを増幅させる系とするためにはプライマーと試薬組成の組合せの最適化をはかる必要がある。ターゲットである 6 種の SNPs (A-908G, G38A, G118A, C1225T, G1226A, 及び G477G) の各セットに対するプライマー設計し実施したが、G38A についてだけで増幅にいたっていない。

プラスチック製マイクロ流体デバイスによる P1 SNPs の解析を試みた。スライドガラスサイズのプラスチック板中に、1) 血液検体からの DNA 抽出、2) PCR 法による目的 DNA 増幅、3) DNA ハイブリダイゼーション法による目的配列検出の全ての機能を備えたマイクロ流路を形成させ、専用読みとり装置を preliminary であるが開発した。マイクロ流路には、1) マイクロ流路内反応によりサンプルと試薬の反応が迅速、2) サンプルの温度制御が正確で迅速、3) 多孔質壁形成によりサンプルと壁面固定 DNA との反応効率が高いなどの特徴があり上記の機能が実現可能となった。臨床検査現場において要求される高精度で操作性が簡便な分析システムの構築を目指している。