ヒト血清を用いた疾患マーカー分子の探索

生命情報工学第２講座
林　あずさ

序論

神経細胞接着分子(NCAM)はシナプス形成や、細胞・細胞外基質間接着による形態形成などに重要な役割を担っている。NCAMの接着能力はポリシアル酸の存在によって調節されており、細胞外の免疫グロブリン様ドメインと接着する。統合失調症患者の脳脊髄液中NCAMフラグメントの変化は以前に報告されている。最近、当研究室でも統合失調症患者血清中の2種類のNCAMフラグメント(70kDa前後)の分子量比に変化があることを見出した。本研究では統合失調症患者と健常者の血清において、GC-MSを用いて脂肪酸組成の違いや、二次元電気泳動法を用いてNCAMフラグメントの違いを検出することを目的とした。

統合失調症について

統合失調症の診断基準(DSM-4)

A.特徴的症状：以下のうち2つまたはそれ以上

1. 妄想
2. 幻覚
3. 解体した会話（例：頻繁な脱線または滅裂）
4. ひどく解体したまたは緊張病性の行動
5. 陰性症状（感情の平板化、思考の貧困、または意欲の欠如）

B.社会的または職業的機能の低下：仕事、対人関係、自己管理などの面で一つ　以上の機能が病前に獲得していた水準より著しく低下している。

小児期や青年期の発症の場合、期待される対人的、学業的、職業的水準にまで達しない。

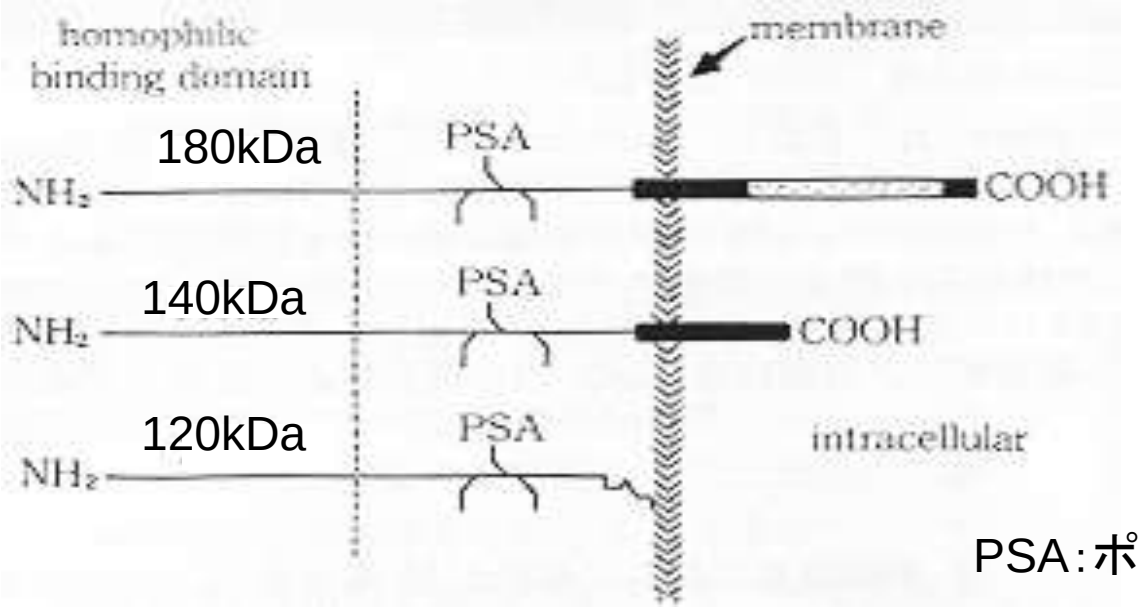
C.期間：障害の持続的な徴候が少なくとも6ヶ月間存在する。この6ヶ月の期間には、基準Aを満たす各症状（すなわち、活動期の症状）は少なくとも1ヶ月間（または治療が成功した場合はより短い）存在しなければならない。

以下、D、E、Fと続く。

NCAMについて

神経細胞接着分子NCAM（neural cell adhesion molecule）は、細胞間および細胞－細胞外基質間のカルシウム非依存性接着に関与する糖タンパクである。

1遺伝子からRNAを転写する際のスプライシングの違いによって、シアル酸を持つ分子量180kDa、140kDa、120kDaの3種類のアイソフォームが形成される。



PSA：ポリシアル酸

実験方法

サンプル

健常者および統合失調症患者の血清
（千葉県浅井病院より供与）

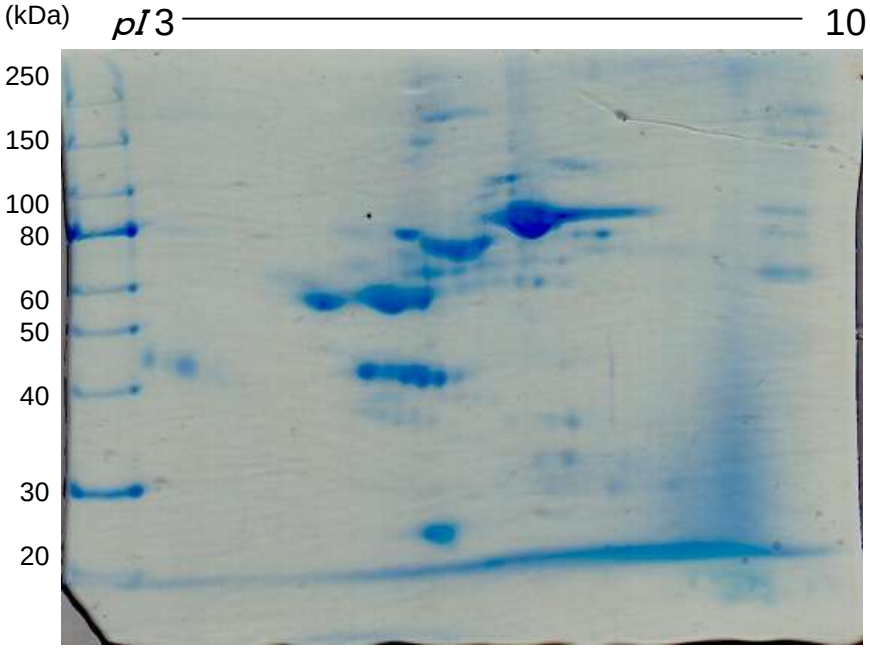
1. Pure Spin A-I kit (アプロサイエンス社) を使用し、ヒト血清中に多量に含まれるアルブミンやグロブリンを除去した
2. 2-D Cleanup kit (Bio-Rad社) を使用し、沈殿・再懸濁により、電気泳動に影響を与える因子を除去した
3. 二次元電気泳動を行い、等電点と分子量により分離した
4. Western blot (WB)を行い、NCAMを観測する

   1次抗体：Anti NCAM(H-300) rabbit polyclonal IgG

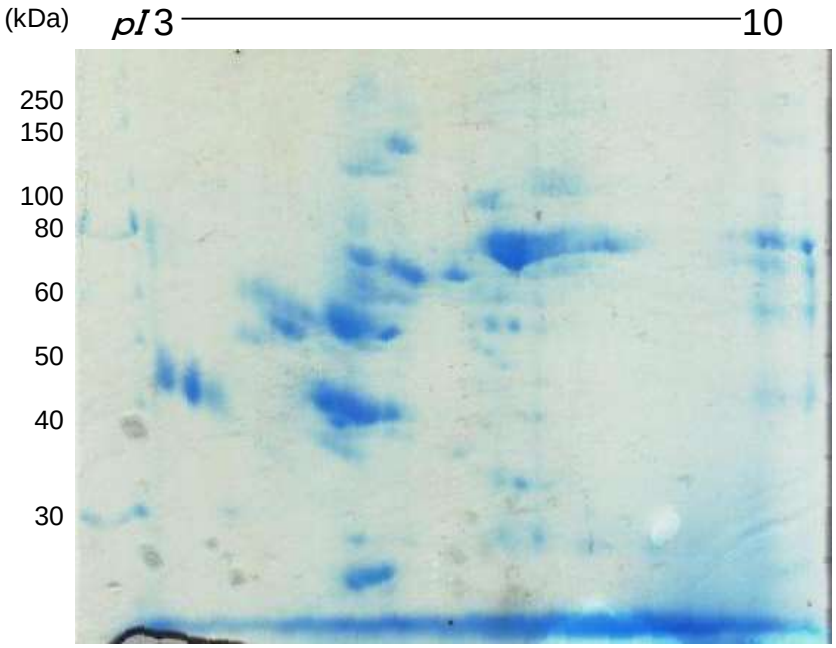
   2次抗体：Goat Anti Rabbit IgG HRP

健常者と統合失調症患者血清の二次元電気泳動の結果

CBB染色



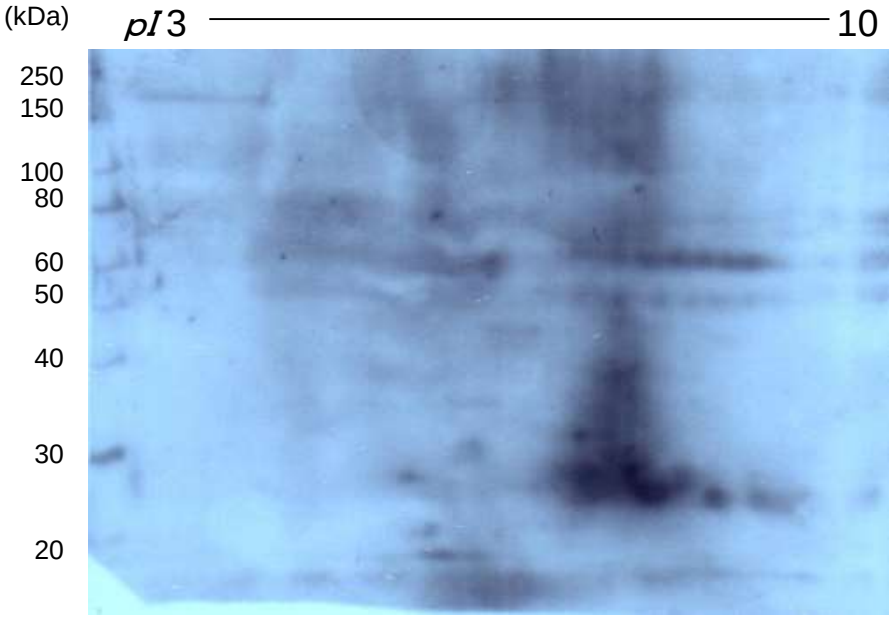
健常者



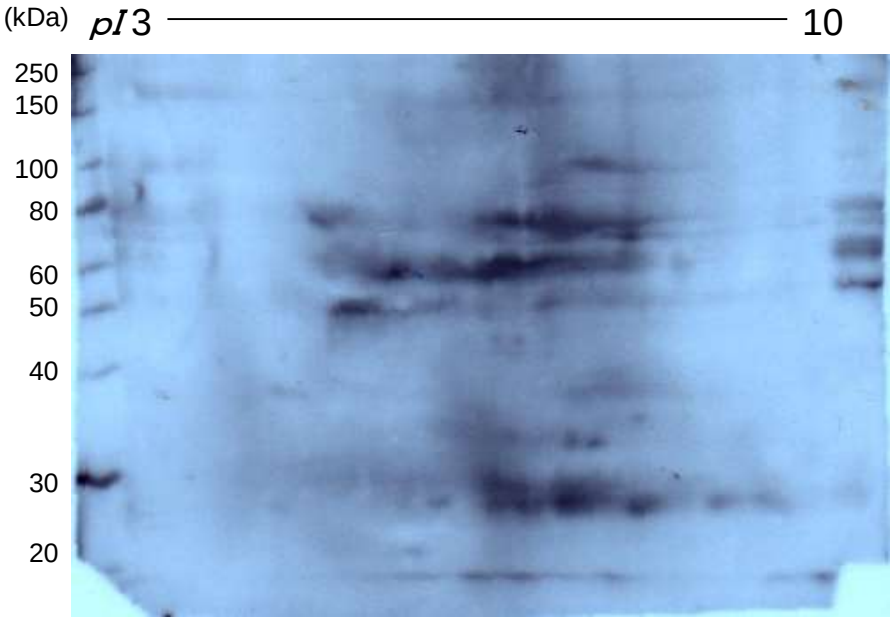
罹患者

Western Blotting

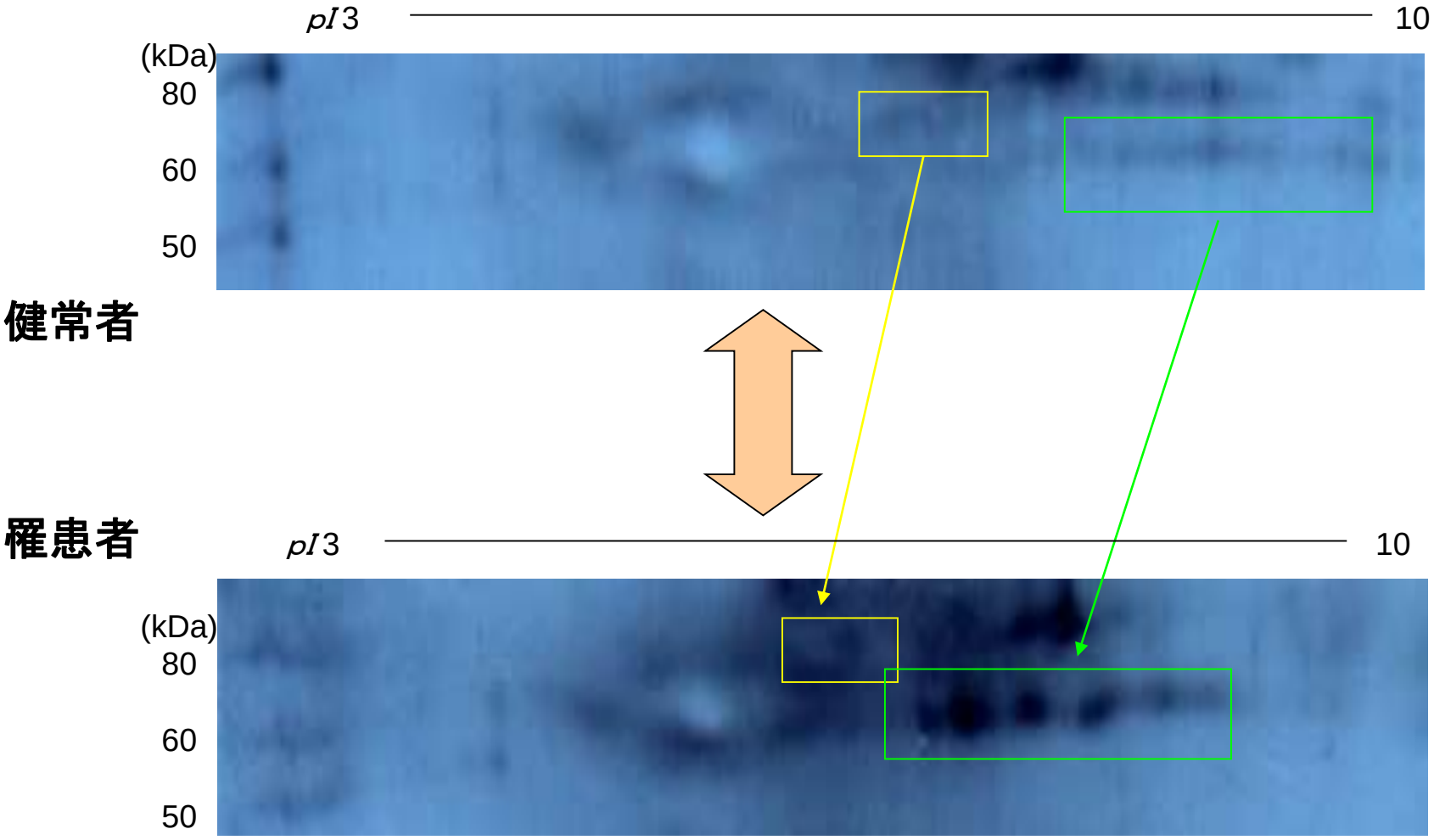
1次抗体：Anti NCAM(H-300) rabbit polyclonal IgG
2次抗体：Goat Anti Rabbit IgG HRP



健常者

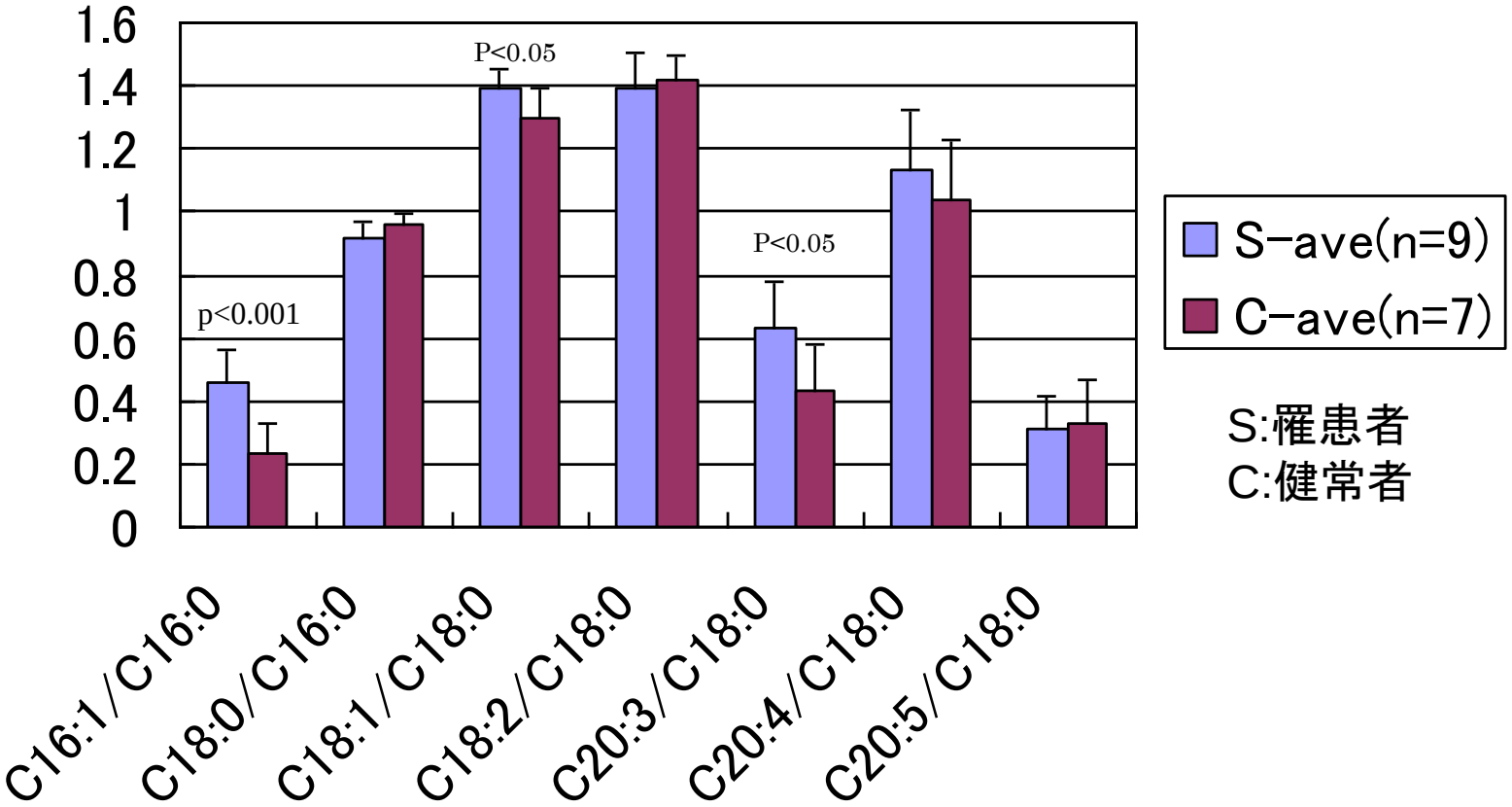


罹患者



1次抗体：Anti NCAM(H-300) rabbit polyclonal IgG
2次抗体：Goat Anti Rabbit IgG HRP

統合失調症患者血清中の脂肪酸組成



結論

- 二次元電気泳動で、血清からNCAMフラグメントを70kDa 付近、*pI* 7～9付近に観測することができた。
- 健常者と統合失調症患者の血清の二次元電気泳動のタンパク染色(CBB染色)において、顕著な違いは見られなかった。
- GC-MS測定において、脂肪酸組成の比率、特にC16：1/C16：0比に有意差が見られ、統合失調症患者の血清でC16:1が上昇していた。

今後の課題

- より多くのサンプルを比較検討する必要があり、現在、継続中である。

- 今後、NCAMフラグメントの定量的解析や、他のマーカー分子と統合失調症患者の病態との関連について調べていく必要がある。