

厚生労働科学研究費補助金（疾患関連たんぱく質解析研究事業）
分担研究報告書

高血圧、心循環器系疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立

分担研究者 南野直人 国立循環器病センター研究所 部長

高血圧症や心循環器系疾患に関連し疾患マーカーや創薬標的の候補となるたんぱく質やペプチドを発見するためには、より微量の対象までを再現的に解析する高感度、高精度の分離、検出システムの構築と、変動が期待される状況下で比較解析を実施する必要がある。対象組織中のたんぱく質を酵素消化して得られるペプチドと組織を抽出して得られる内在性ペプチドを、昨年度までに確立した2次元高速液体クロマトによる分離と質量分析計による検出法で解析し、得られる情報の有効性について検討を行った。血液中の低分子量たんぱく質、ペプチドについても同様の視点から解析し、より意義のある情報を収集すべく対象や手法について検討を進めた。

A. 研究目的

ヒト、あるいはマウス、ラットなどの数多くの動物においてゲノム遺伝子配列が決定、データベース化されたため、次の包括的データベース化の対象は生体で実在、機能するたんぱく質、ペプチド、化合物の実験的解析によるファクトデータベース構築へと明確にシフトした。細胞、組織、血液をはじめとする体液などのたんぱく質の発現・存在量、立体構造、相互作用、機能などの情報を包括的に収集、利用可能にできれば、生命現象の理解のみならず疾患発症や病態形成に関わるたんぱく質、医薬品や食品をはじめ産業に利用できるたんぱく質を発見する上で極めて有用と考えられる。しかし、様々な生命現象の場で多彩な機能を発揮するたんぱく質分子は極めて多様な性質を示し、たんぱく質総体である「プロテオーム」を解析することは困難である上、定量的に比較することはより困難であり、再現的且つ高感度に実施できる方法が開発されていない。更に修飾などの詳細構造解析については未解決な問題が山積している。本研究では循環器疾患を対象として、ヒト組織、血液、細胞などに含まれるたんぱく質を網羅的に解析し、高血圧、心疾患、動脈硬化などに関連するたんぱく質を見出す解析法（プロファイリング法）の確立、高感度・高精度化、たんぱく質同定法や量的評価法の効率化、迅速な解析システムの開発研究などを行う。

本年度の研究では、これまでに確立した2次元高速液体クロマトグラフィー(2-dimensional high performance liquid chromatography, 2D-HPLC)を基盤に、Maldi、Esiなどの異なるイオン化法の質量分析計、Maldi法でも解析範囲の広いSeldi質量分析計などを使用して、心臓組織抽出物、血液試料を対象に、たんぱく質やペプチドの解析法を検討し、各対象について最終的に高い再現性が得られる分析システムを作成する。また、疾患を対象として意義のある解析データを入手するため、解析対象とすべき標的たんぱく質やペプチドをある程度絞り込み、その調整法、解析法について具体的なプロトコールを作成して実地に検討を行い、利用可能な分析システムを構築する。

B. 研究方法

1) 心臓組織試料の検討：ラット心房組織抽出物を主たる対象に、抽出物の脱塩、濃縮後、ゲル濾過にて分子量1万以上、6K・3K、3K以下の3画分に分離し、それぞれについて還元アルキル（アセトアミド）化後、分子量1万以上の画分（たんぱく質画分）についてはトリプシン消化を行う。量の多いたんぱく質画分については、トリプシン消化を2D-HPLCにて分離し（1次元目 SP 陽イオン交換 HPLC, 1.0 x 50 mm, pH3.8 のギ酸アンモニウム・10%アセトニトリル含有系、2次元目逆

相 nano HPLC, 75・300・m x 150mm, アセトニトリル-0.01%トリフルオロ酢酸系)、2次元目 HPLC 溶出物については Maldi 質量分析用 target plate 上に spot し、Proteomics 4700 質量分析計で解析する。量の少ない 6K-3K、3K 以下については、先ず逆相 1次元の nano HPLC にて分離し、たんぱく質画分のトリプシン消化物と同様に分析を行い、その解析結果、観測ペプチドの種類などに従い分離、解析手法の検討を行う。

心房組織のたんぱく質画分、ペプチド画分について安定した結果が得られた場合は、心室組織についても同様の解析を行い、解析の可否の判断を行う。

2) 血液試料の検討：血液のペプチド解析については、血漿と血清に分けて検討を行う。血漿についてはペプチド量が非常に少ないこと、昨年度の終わりから試料にプロテアーゼインヒターカクテルを添加していること、などの相違があり、試料の採取、保存方法、処理方法の別にたんぱく質画分、分子量 6K 以下のペプチド画分に分けて検討を行う。基本的には逆相系固相抽出法によりたんぱく質、ペプチドを抽出し、抽出物の解析、ゲル濾過分離物の解析、逆相 nano HPLC 分離物の解析を行う。また、低分子量たんぱく質画分、ペプチド画分を対象を絞り込む場合は、相互作用を減弱させた条件下での限外濾過膜による分離、逆相系固相抽出による回収後、上記の方法に従い分析を行う。逆相 nano HPLC などにおける分離物については Maldi 質量分析計で、抽出物など分子量分布範囲の広い試料については Seldi 質量分析計で解析を行う。

(倫理面への配慮)

動物組織については、当センターの動物実験指針に従った動物実験計画書を提出し、動物実験委員会の承認を受け、動物愛護に配慮して採取する。血液試料は「プロテオーム解析による循環器疾患関連たんぱく質の探索研究」として当センターの倫理委員会で承認を受け、研究協力者に十分な説明を行い、同意を得て採取した試料を対象に行う。

C. 研究結果

組織抽出物についても、たんぱく質のみならず

ペプチドの分析も行うために、組織採取直後に加熱処理を行いプロテアーゼ失活させた。このために大分子量たんぱく質をはじめとする多くのたんぱく質は不溶化、排除されたが、ゲル濾過後のたんぱく質画分(分子量1万以上)重量は分子量6K以下のペプチドの数倍以上に達していた。

還元アルキル化後のたんぱく質画分のトリプシン消化物の 2D-HPLC による分離、解析結果からは、心筋細胞特異的な筋組織形成たんぱく質、細胞骨格たんぱく質、細胞質やミトコンドリア局在たんぱく質が数多く検出された。今回の分析では1次元目の分画数が少ないこともあるが、同定されたペプチド数に比して前駆体蛋白数は増加せず、たんぱく画分のショットガン解析を徹底して行っても、有意な情報量の増加はあまり期待できないと考えられた。

還元アルキル化後の 6K-3K、3K ペプチド画分の 1次元 nano HPLC による解析からは、 α -心房性ナトリウム利尿ペプチド(α -ANP)並びにその代謝的分解物と考えられる断片が観測された。ANP について心房組織に多いと考えられる BNP (組織濃度が ANP の 1-2%) については、観測できなかった。一方、上記たんぱく画分にて検出された筋組織形成たんぱく質、細胞骨格たんぱく質などの断片が数多く観測されたが、塩基性アミノ酸の C 末側以外で切断を受けた断片が大部分であることから、代謝的分解物あるいは抽出・精製過程における切断や加水分解により生成したペプチドと推定された。しかし、分子量 3,000 付近においては α -ANP がマスクロマト上最も顕著なピークを示すことから、組織中に存在するペプチドの回収は十分行われているものの、多量に存在するたんぱく質のごく一部が切断を受けた分解ペプチドや代謝生成ペプチドが解析を困難にしていると推定された。

心房に比してペプチド含量少ない心室組織のペプチド画分についても予備的な検討を行った。実際にペプチド画分の対たんぱく質重量比は心房より小さく、構造たんぱく質の分解に由来すると推定されるペプチドが大部分であった。

血液試料からのペプチド抽出については、昨年度までに検討した逆相系固相抽出カートリッジ

を使用した。抽出物をゲル濾過にて分離後、逆相 nano HPLC で分離し MalDI 質量分析計で解析した。厳密に調製、迅速処理した血漿試料中の分子量 6K 以下のペプチド画分は極めて少なく、たんぱく質との重量比で 1 万分の 1 以下と推定された。血漿試料を一度凍結・融解するだけでペプチド量は明確に増加し、例えばブラジキニンとその Arg 欠失ペプチドが明確に観測された。血漿試料にプロテアーゼインヒターカクテルを添加することによりペプチド生成は明確に抑制されたが、完全ではなかった。血清試料においては、分子量 6K 以下のペプチドが大きく増加しており、補体系、キニノ系、凝固線溶系などのたんぱくに由来するペプチドが多数観測された。特に C3f に由来するものが多く観測されるが、単一なペプチドではなく C 末端の Arg 欠失ペプチド、N 末端から exopeptidase により順次消化されたペプチドが観測された。血漿試料も経時的に同様の断片が増加してくること、C 末端に Arg を有するペプチドが多いことから、補体系、凝固系などの活性化によりこれらのペプチドが生成すると推定された。

上記試料の分子量 6K 以上のペプチドから低分子量たんぱく質にかけての領域においては、血漿試料においても明確なピークがある程度の数存在し、血清ではこれらが増加しつつピーク数も増加した。そこで、限外濾過膜などにて大分子量たんぱく質を除去後、固相抽出を行い、Seldi 質量分析計などで解析を開始すべく準備を始めた。しかし、分析試料調製過程に使用する器具類、処理条件などにより観測結果が変動するなどの問題が認められたため、実試料の解析まで進めなかった。

D. 考察

ペプチドーム解析において開発した 2D-HPLC 系を活用することにより、心房組織のショットガン解析で多数のたんぱく質のトリプシン消化ペプチドを同定できた。しかし、同定されたたんぱく質の大部分は細胞や組織を形成する構造たんぱく質や代謝関連たんぱく質であった。ほぼ同じ条件で実施した脳のとたんぱく質解析結果と比較した場合、同定されたたんぱく質数はむしろ少なく、心

組織には組織濃度の高いたんぱく質が一定数存在し、これらの消化物が構成要素の大部分を占めるためと推定された。このため、主要たんぱく質の除去を行わない場合、ショットガン解析法で検出たんぱく数を増加させるには、より大規模な分離、展開を徹底して行なう必要があると考えられた。

心房組織は分泌顆粒を含み、内分泌組織に次いでペプチド量が多い組織と推定される。今回の解析でも ANP は強く検出され、量は少ないが ANP の分解ペプチドも多種検出され、この水準は脳内ペプチドのレベルを大きく上回っていた。しかし、ペプチド画分にも上記の構造たんぱく質に由来する代謝・分解ペプチドが多数存在し、低濃度のペプチドの検出、解析を妨害した。より低レベルのペプチドを検出するためには、脳と同様により徹底したプロテアーゼの迅速不活性化が不可欠である。心室組織も ANP, BNP に加え幾つかのペプチドホルモンを産生しているが、心房 ANP の 1/100 程度の組織濃度であるため、現状の手法ではこれらのレベルのペプチドを直接検出することはできなかった。しかし、心房組織のペプチドを例にとると、ANP の 1/10 以下のペプチドであっても mg レベルの組織で十分検出、解析可能であり、1次元 HPLC で観測される数百ペプチド中の幾つかが疾患などで生成・消失、変動すれば、十分に観測可能であることが確認された。

昨年度までの研究で、血漿中のペプチド量は極めて少なく疾患マーカー探索対象として有望であることが示されている。しかし、採血条件、保存、濃縮などの処理過程で二次的に補体系、凝固系などのプロテアーゼが不可避免的に活性化され、本来の血液中にはない分解ペプチドが多数、急速に生成することが示された。プロテアーゼインヒターカクテルの添加は有効であるが、完全な抑制にはほど遠いと言わざるをえない。また、凍結・融解などの操作だけでもプロテアーゼが活性化されてたんぱく質は分解しペプチドが生成するため、ペプチドや低分子量たんぱく質を臨床現場で使用する診断用マーカーとするには、かなり安定的に存在し量的にも多い対象を選択する方が望ましいと考えられる。最近、Villanueva らは血液中の主要なたんぱく質の断片ペプチドが腫瘍マーカーとし

て利用でき、かつ exopeptidase で消化された一連のペプチドのパターン解析で腫瘍の有無や種類などが診断可能と報告している (J Clin Invest. 116: 271, 2006, Mol Cell Proteomics. 5: 1840, 2006.)。解析対象は厳格に管理されているが血清であり、かつかなり高濃度存在するペプチドである。これらのことを総合すると、従来想定されていた疾患マーカーの対象を、量的の多いペプチドや低分子量たんぱく質にまで広げ再検討する必要があると考えられた。

E. 結論

組織内の微量のたんぱく質をショットガン解析法で解析し病態との関連を検索するためには、2D-HPLC を含めた高度の分離法と高感度の解析法が必要である。ペプチド解析も困難ではあるが、たんぱく質の分解を抑制する方法論が確立できれば、疾患マーカーには十分使用可能で、かつたんぱく質より分離・解析が容易である。血液についても、補体系や凝固系などのプロテアーゼがコントロールできれば、ペプチドや低分子量たんぱく質も大きな標的であることが確認された。

存在量に極端な違いのあるプロテオームやペプチドームを解析対象とし標的たんぱく質やペプチドを探索するには、一定濃度以上で存在し且つ安定な物質に対象が絞られる上、実際に疾患マーカーとして使用するには、安定性や検出の容易さも不可欠な要件である。Villanueva らの報告のように、特定の切断や断片化に着目する手法もペプチド解析と関連して重要と考えられ、特異的な標的、微量たんぱく質やペプチドが対象という立場を一度離れ、再検討する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① K. Komori, M. Konishi, Y. Maruta, M. Toriba, A. Sakai, A. Matsuda, T. Hori, M. Nakatani,

N. Minamino and T. Akizawa: Characterization of a novel metalloproteinase in Duvernoy's gland of *Rhabdophis tigrinus tigrinus*. J. Toxicol. Sci., 31, 157-168 (2006)

- ② S. Nagata, J. Kato, K. Sasaki, N. Minamino, T. Eto, K. Kitamura: Isolation and identification of proangiotensin-12, a possible component of the renin-angiotensin system. Biochem. Biophys. Res. Commun., 350, 1026-1031 (2006)

2. 学会発表

- ① N. Minamino, H. Kuwahara, K. Sasaki, T. Osaki, T. Katafuchi, T. Takao, M. Isoyama. Peptidome database and identification of new biologically active peptides. 9th Chinese International Peptide Symposium 2006 (平成 18 年 7 月、上海)
- ② N. Minamino, H. Kuwahara, K. Sasaki, T. Osaki, T. Kihara, J. Isoyama-Tanaka, T. Katafuchi, T. Takao, M. Isoyama. PEPTIDOME Database and Identification of New Bioactive Peptides. International Conference: 43rd Japanese Peptide Symposium/4th Peptide Engineering Meeting (平成 18 年 11 月、横浜)
- ③ 佐々木一樹, 南野直人: ペプチドーム解析による新規ペプチドの探索, 大阪大学蛋白質研究所セミナー「ペプチドの真価: 検出・探索から診断・創薬へ」(平成 19 年 1 月、大阪)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

研究協力者

佐々木一樹, 尾崎司, 桑原大幹 (国立循環器病センター研究所薬理部)

厚生労働科学研究費補助金（疾患関連たんぱく質解析研究事業）
分担研究報告書

痴呆等の精神・神経疾患に関連する微量タンパク質解析技術の確立

分担研究者 高坂 新一 国立精神・神経センター神経研究所 所長

本研究では神経変性疾患（パーキンソン病、若年性痴呆症など）の治療成績向上を行いましたその発症機序の解明や診断技術の高度化を図るため、血液、尿サンプル中の蛋白質のプロテオーム解析を実行し、当該疾患に特異的な、あるいは特徴ある蛋白質群を同定し、その臨床的利用を行うことを目標とする。国立精神・神経センター武蔵病院から提供したパーキンソン病患者血液試料の第一次解析結果を踏まえ、髄液試料を用いた絞り込みの有用性を確認し髄液使用についてのIRBの承認を得た。また、神経変性疾患研究の困難さを克服するため細胞傷害時に神経細胞死が亢進するモデル動物を作製しその発症機序の解析を進めた。さらに家族性筋萎縮性側索硬化症の変異遺伝子産物に関して未知の分解経路を発見し治療薬開発の新たな標的分子を開拓した。

A. 研究目的

本研究では、神経変性疾患（パーキンソン病、若年性痴呆症など）の治療成績向上を図り、またその発症機序の解明や診断技術の高度化を図るため、当該疾患に特異的な、あるいは特徴ある蛋白質群の同定とその臨床的活用をめざす。神経変性疾患では蛋白質の不溶化・凝集が細胞変性の本態と考えられているが、その成立には免疫機序の関与も認められ、また自律神経症状などを認めることも多い。さらに、生活習慣がその発症に影響を与えることは近年の疫学的調査から明らかになってきており、血液、尿などの解析から予防・診断に関して新たな知見が得られるとの期待が高まっている。また、種々の薬剤が神経変性疾患の治療に用いられているが、脳内への効果的な輸送には血中動態並びにその代謝の分子実体の解明が不可避である。したがって本研究のアプローチは薬物治療の向上にも多大に貢献する。本年度までにパーキンソン病 12 例、パーキンソン症候群 10 例の臨床検体の確保と情報のまとめを行い、プロテオームファクトリーへ提供した。さらに、パーキンソン病患者 40 名程度の連結不可能匿名化された試料を確保している。また脳という組織の特殊

性から、研究成果の獲得にはモデル動物の開発と利用、ならびに新規創薬の標的分子の開発が神経変性疾患研究には必須であることから、昨年度報告した新規パーキンソン病モデルマウスである I93M UCH-L1 発現マウスに加えて今年度は UCH-L1 の近縁分子である UCH-L3 の欠損マウスの表現型解析を行った。また家族性筋萎縮性側索硬化症の創薬標的分子の同定など周辺分野の基盤整備も行った。

B. 研究方法

(1) 神経変性疾患（パーキンソン病等）の研究試料の確保

新規試料については、パーキンソン病及びパーキンソン症候群（多系統萎縮症など）患者のリンパ芽球、血漿、尿、髄液等を研究に利用するための説明資料、説明文書、同意文書を作成し、国立精神・神経センター倫理委員会にて承認された。また、東京大学医学部神経内科に保存されていたパーキンソン病患者の株化リンパ球 200 症例については、主要な研究者が当センターに異動したことにより、既提供試料として研究利用ができるように、倫理委員会の承認を得た。さらに、連結可

能匿名化されているパーキンソン病およびパーキンソン症候群患者髄液が 40 例程度収集できており、その使用を倫理委員会での承認を受けた。

(2) モデル動物の解析、創薬標的分子開発に関する研究

UCH-L3 欠損マウスにおける細胞傷害時の神経細胞死亢進機序について網膜の光変性を題材に生化学的、病理学的に解析した。家族性筋萎縮性側索硬化症原因遺伝子産物の変異体を用いその代謝におけるユビキチン系とリソソーム系の役割を解析した。

(倫理面への配慮)

今回の研究に用いるヒト由来試料はすべて当センター倫理委員会において承認を得た方法でインフォームドコンセントを取得したものを使用する。動物を使用する研究計画はすべて国立精神・神経センター神経研究所動物実験倫理問題検討委員会や分担研究者の所属する施設の倫理問題検討委員会で審議され承認を受けた。実際の動物使用に当たっては国の法律・指針並びに米国 NIH の基準を守り動物が受ける苦痛を最小限に留めた。

C. 研究結果

(1) 研究試料の確保に関する研究

新規試料については、すでに本センターの倫理委員会での承認を得ている、「血液、尿、髄液を用いた脳神経疾患の病因・治療法の開発に関する研究」によって収集・保存が可能な疾患の内、パーキンソン病及びパーキンソン症候群患者の血漿、尿を本研究に利用するための倫理申請を行い、承認を得た。そして、2007年2月までに、12名のパーキンソン病患者及び10名のパーキンソン症候群患者の血漿をプロテオームファクトリーに提供した。また、カルテ等から臨床情報の抽出を行い、暗号化した情報としてプロテオームファクトリーに提供した。

さらに、パーキンソン病及びパーキンソン症候群患者 40 名程度の連結不可能匿名化された髄液

を確保し、倫理委員会において本研究における使用の承認を得た。

(2) モデル動物の解析、創薬標的分子開発に関する研究

家族性筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子産物 super oxide dismutase (SOD) の 3 種の変異体 (A4V, G85R, G93A) を細胞に一過性に強発現しユビキチン系とリソソーム系のそれぞれの阻害薬を用いて凝集性の亢進や代謝の変動、細胞機能に及ぼす影響を解析したところ、SOD はこれまで報告されていたユビキチン系に加えてマクロオートファジー・リソソーム系でも制御を受け、マクロオートファジー・リソソーム系が変異 SOD の神経毒性の抑制に寄与していることを明らかにした。また UCH-L3 は網膜では視細胞に局限した発現を示し、UCH-L3 欠損マウスに認められる視細胞死はミトコンドリアの形態変化を伴い、アポトーシス非依存的な神経細胞死であることを明らかにした。

D. 考察

パーキンソン病など神経変性疾患については近年の分子遺伝学的解析から家族性疾患を中心にいくつもの病因遺伝子が同定された。数多くの孤発性については病因の特定はいまだだなされていないが家族性の成果を発展させることで、対症療法の高度化だけでなく根本的治療法開発も展望できるとの期待が高まっている。成因に関しては国内外における研究から、蛋白質の構造変化、凝集、蓄積と神経細胞死・神経変性との関連が示されており conformation 病の概念確立とともに、アポトーシスに加えて神経細胞機能不全も神経変性の主因として位置づけられるようになってきた。さらに、近年では免疫学的機序の関与に注目が集まっており、喫煙者にパーキンソン病発症者が少ないという疫学的調査が明らかにされるなど生活習慣との関連でも注目を集めている。

我々はこれらの近年の知見を参考に、血液、尿などの末梢サンプルにおいても新たな知見が生み出

される可能性が高いと考え、神経変性疾患患者、特にパーキンソン病における血液、尿中蛋白質の網羅的解析を行うことにした。今年度までにパーキンソン病患者12名とパーキンソン症候群10名の試料を供給し、ファクトリーにおいて第一次解析結果を得る段階まで進展した。今後は、更なる検体での解析の続行による疾患特異的蛋白質の同定を図るとともに、より中枢神経の病態を反映している髄液サンプル活用が可能になった。

これまでに独自に作成したI93M UCH-L1発現トランスジェニックマウスが既存のパーキンソン病モデル動物に比べ優れた点を多く有している新規モデルであることを見出したが、今年度はさらにUCH-L1の近縁分子であるUCH-L3がカスパーゼ非依存的神経細胞死に関与すること、家族性筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子産物であるSODの変異体の細胞毒性がマクロオートファジーでも制御を受けることを見出した。本成果の意義は大きく、根本的治療に向けて新たな治療標的が見出される可能性が高まった。

E. 結論

当センターから供給した患者検体を用いたプロテオーム解析により、パーキンソン病において変動する蛋白質の第一次候補が得られた。さらに供給数を増加させるとともに、髄液を用いた研究アプローチが可能になった。また、UCH-L3欠損マウスの病態解析を行い、変異SOD凝集に関する新たな機序を見出した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hattori, K., Uchino, S., Isosaka, T., Maekawa, M., Iyo, M., Sato, T., Kohsaka, S., Yagi, T. and Yuasa, S.: Fyn is required for haloperidol-induced catalepsy in mice. *J.*

Biol. Chem. 281 (2006) 7129-7135

Uchino, S., Wada, H., Honda, S., Nakamura, Y., Ondo, Y., Uchiyama, T., Tsutsumi, M., Hirasawa, T. and Kohsaka, S.: Direct interaction of PDZ domain-containing synaptic molecule Shank3 with GluR1 AMPA receptor. *J. Neurochem.* 97 (2006) 1203-1214

Yogosawa, S., Kawasaki, M., Wakatsuki, S., Kominami, E., Shiba, Y., Nakayama, K., Kohsaka, S. and Akazawa, C.: Monoubiquitylation of GGA3 by hVPS18 regulates its ubiquitin-binding ability. *BBRC.* 350 (2006) 82-90

Sano, Y., Furuta, A., Setsuie, R., Kikuchi, H., Wang, Y.L., Sakurai, M., Kwon, J., Noda, M. and Wada, K.: Photoreceptor cell apoptosis in the retinal degeneration of Uchl3 deficient mice. *Am. J. Pathol.*, 169 (2006) 132-141

Kabuta, T., Suzuki, Y. and Wada, K.: Degradation of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 proteins by macroautophagy and the proteasome. *J. Biol. Chem.*, 281 (2006) 30524-30533

Setsuie, R., Wang, Y.L., Mochizuki, H., Osaka, H., Hayakawa, H., Ichihara, N., Li, H., Furuta, A., Sano, Y., Sun, Y.J., Kowan, J., Kabuta, T., Yoshimi, K., Aoki, S., Mizuno, Y., Noda, M. and Wada, K.: Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant. *Neurochem. Int.*, 50 (2007) 119-129

Murata, M.: Pharmacokinetics of L-dopa special reference to food and aging. *J. Neurology* 253(2006) [Suppl 3] III 47-52

Murata, M., Hasegawa, K. and Kanazawa, I.: The Japan Zonisamide on PD Study Group.

Zonisamide improves motor function in Parkinson disease. A randomized, double-blind study. J. Neurology 68(2007) 45-50.

Funayama, M., Li, Y., Tomiyama, H., Yosino, H., Imamichi, Y., Yamamoto, M., Murata, M., Toda, T., Mizuno, Y. and Hattori, N.: LRRK2 G2385R variant is a risk factor for Parkinson disease in Asian population. Neuro Report (in press)

2. 学会発表

(国際学会)

Ohsawa, K., Irino, Y., Nakamura, Y., Akazawa, C., Inoue, K. and Kohsaka, S.: Intracellular signaling underlying ATP-induced chemotaxis of microglia. The 8th International symposium on Adenosine and Adenine Nucleotides, Italy, 5. ,2006

Sano, Y., Furuta, A., Setsuie, R. and Wada, K.: Photoreceptor cell apoptosis in the retinal degeneration of Uchl3 deficient mice. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, 6.20, 2006

Ken, Inoue., Kyoko, Takano. and Yu-ichi, Goto.: Nonsense-mediated mRNA decay is not a major contributor to downregulate the Alu-containing splicing variants. The 56th Annual meeting of American Society of Human Genetics, New Orleans, LA, 10. 9-13, 2006

Murata, M., Teraoka, Y., Aoki, Y., Inoue, C., Saito, Y., Endo, F., Takemura, A., Okamoto, T., Lin, Y., Yamamoto, T. and Kuno, S.: Effective threshold concentration and L-dopa dose of Japanese patients with Parkinson's disease. 10th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Kyoto, 10.28 – 11.2, 2006

(国内学会)

赤澤智宏、佐々木洋、星雅人、中村泰子、高坂新一：顔面神経損傷によって発現誘導される新規の4回膜貫通型蛋白の生化学的解析 第29回日本神経科学大会、京都、7.20, 2006.

佐野野衣、古田晶子、節家理恵子、和田圭司：UCH-L3 遺伝子欠損マウスにおける網膜変性の機序 第47回日本神経病理学会総会学術研究会、岡山、5.26, 2006.

村田美穂、長谷川一子、金澤一郎：抗パーキンソン作用薬ゾニサミドの長期効果 第47回日本神経学会総会、東京、5.13, 2006

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

E. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

糖尿病等代謝性疾患に関連する微量タンパク質
解析技術の確立に関する研究

分担研究者 鏑木 康志 [国立国際医療センター・研究所]

研究要旨

【目的】わが国の主要な疾患の一つである糖尿病について、患者及び健常者由来の臨床サンプルの蛋白の差異を大規模にプロテオーム解析することにより、糖尿病関連蛋白のデータベースを構築し、新規創薬ターゲット、バイオマーカーの発見に資することを目的とする。

【方法】糖尿病患者から血清及び尿を採取して、血清は創薬プロテオームファクトリー施設のcICAT法を用いた定量解析にて、尿は本施設の2D DIGE, LC-MSにて、蛋白プロファイルを健常者と比較検討する。糖尿病以外の疾患でも、閉塞性呼吸器疾患(COPD)の患者血清について創薬プロテオームファクトリー施設にて同様な解析を行う。また、in vitroの実験として、LXRアゴニスト(T0901317)誘導性のヒト肝細胞HepG2分泌蛋白、サイトカインにて分化させたヒトマクロファージの発現蛋白を解析する。

【結果】本施設の内分泌代謝科の協力により、糖尿病患者血清サンプルを基礎検討用及び本解析用に128例収集し、創薬プロテオームファクトリー施設に発送した。一部の検体を用いてcICAT法で定量解析を行い、臨床情報との関連性を相関関係位解析等の統計学的手法にて予備的に解析した。さらに糖尿病以外にCOPD患者血清10例分を創薬プロテオームファクトリー施設に発送した。また、糖尿病患者尿サンプルを2D DIGE法にて解析し、微量アルブミン尿を有する糖尿病患者にて健常者と比較して有意に変動する80個以上のスポットを認めた。一部については、既に報告されているTransferrin, Ceruloplasmin, Uromodulinが同定された。また、T0901317処理にてHepG2より分泌されるapolipoprotein Eを同定し、サイトカインにて分化させたマクロ

A. 研究目的

糖尿病は、ライフスタイルの西洋化に伴ってわが国では戦後急増し、今や国民病ともいえるが、心筋梗塞や脳卒中などの動脈硬化性疾患の基礎疾患としても重要である。また、糖尿病性細小血管症を生じて網膜症による失明や腎症による人工透析、糖尿病性壊疽による下肢切断も増加しており、国民健康上大きな問題になっている。糖尿病の複雑な病態を解明するためには、遺伝子

及び蛋白の両面からのアプローチが必要であり、前者については候補遺伝子及び網羅的アプローチの両面からの網羅的解析が進んでいるが、後者については培養細胞、実験動物を用いた網羅的解析が端緒に付いたばかりである。

国立国際医療センター、東京女子医大、国立健康・栄養研究所の今年度までの共同プロジェクトとして、(1)インスリン作用特異性の原因のプロテオーム解析による網

羅的検索、(2) 組織細胞工学的視点でのβ膵内分泌細胞の分化・増殖・再生に關与する重要な蛋白の同定、(3) 糖尿病発症に影響する環境因子の分子機構についての転写因子に焦点を当てた解析、(4) SELDIプロテインチップシステムを用いた血清・尿蛋白プロファイリングによる新たな分子マーカーの開発を研究の4つの柱として行われた。しかし、同プロジェクトでは糖尿病患者由来サンプルを用いた大規模な解析は行われなかった。

今回我々は、プロテオームファクトリーを利用した糖尿病患者由来サンプルでの網羅的蛋白解析を駆使して、糖尿病の新規治療標的の発見、糖尿病及びその合併症の進行度、予後及び治療効果を判定する診断マーカーの開発等を目指す。また、本施設にて収集可能な糖尿病以外の疾患についても臨床サンプルの収集及びプロテオーム解析を用いた網羅的な検索にて、疾患固有の治療標的及び診断マーカーの発見を目指す。

B. 研究方法

糖尿病関連蛋白のデータベース構築のためのサンプルとして、糖尿病患者の血清及び尿を採取する。血清については臨床情報を添えて創薬プロテオームファクトリー施設に発送し、同施設のLC-MS/MSを用いて糖尿病に関連した蛋白の同定、定量を行う。尿については本研究所内で2D DIGEにてディファレンシャル解析を行い、LC-MS/MSにて同定する。結果について糖尿病の多様な病態と蛋白プロファイルとの関係性をバイオインフォマティクスの技術を用いて解析し、データベース化する。

プロテオームファクトリー施設での糖尿病関連血清蛋白データベースの構築とは別に、本施設での独自のプロジェクトとして早期糖尿病性腎症を研究対象に本施設内で2DE-DIGEを用いて、微量アルブミン尿の有無による尿蛋白プロファイル

を健常者の尿蛋白プロファイルと比較検討し、新規の糖尿病・早期腎症に固有な診断マーカー、糖尿病性腎症治療の分子標的を検索する。

本施設にて収集可能な糖尿病以外の疾患由来サンプルについても創薬プロテオームファクトリーにて解析する。その一環として、呼吸器疾患(慢性閉塞性肺疾患)の患者血清を用いて治療の分子標的、診断マーカーを検索する。

また、感染防御に關与する組織マクロファージへの細胞内分化決定因子をプロテオーム解析にて同定することを目的として、ヒト末梢血液より分離した単球をin vitroでGM-CSF またはM-CSF存在下に培養することで成熟型マクロファージに分化させる。添加する分化因子を変えることで、

GM型: human GM-CSF によって単球から分化誘導されたマクロファージ

M型: human M-CSF によって単球から分化誘導されたマクロファージ

の2つの性質の異なるマクロファージ培養細胞に分化させた後に、

- ①培養開始から48時間経過後のGM型、M型
- ②培養開始から7日間(168時間)経過後のGM型、M型
- ③7日間(168時間)培養後、結核菌(H37Rv)を感染させ、感染後48時間経過時点におけるGM型、M型の3条件6種類の培養細胞から蛋白抽出後に酵素消化し、nano HPLC-ESI MS/MS 質量分析計にて蛋白同定を試みる。

C. 研究結果

【臨床サンプルの収集】

・糖尿病

糖尿病患者由来血清の予備検討のために、過去に他の研究計画(ミレニアム・プロジェクト)の際に採取されていた糖尿病患者24人分の血清サンプルを創薬プロテオームファクトリー施設に平成17年3月発送した。それに加えて、糖尿病診断マーカーの本格的解析に使用する糖尿病患者血清

サンプルを本年度までに104人から収集し、創薬プロテオームファクトリー施設に発送した。

早期糖尿病性腎症の尿蛋白プロファイルを本施設内にて解析するために、微量アルブミン尿のある或いはない糖尿病患者から尿蛋白を各15例以上、健常者コントロール由来尿蛋白を5例以上収集した。

- ・ 糖尿病以外の疾患

慢性閉塞性肺疾患診断の血清マーカー検索の予備検討用として、慢性閉塞性肺疾患患者血清を10人分収集し、創薬プロテオームファクトリー施設に発送した。

【臨床サンプルでのプロテオーム解析】

- ・ 糖尿病

創薬プロテオームファクトリー施設にて、最初に発送した基礎検討用血清の一部を用いてcICAT法による予備的な解析を行った後に、基礎検討用血清9例、本格的解析用血清15検体を用いて高発現120血清蛋白のcICAT法による解析を行った。得られたデータについて、臨床情報との関連性を相関関係解析等の統計学的手法にて解析中である。

糖尿病性腎症患者由来尿蛋白の解析については、まず健常者由来尿を濃縮後にAlbumin and IgG Removal Kit(GE)を用いた高含有量蛋白の除去を行い、二次元電気泳動ゲル上でアルブミン、IgGがほとんど消失することを確認した。次に、この手法で処理した尿サンプルを2D-DIGE法で解析し、微量アルブミン尿を有する糖尿病患者由来尿にて健常者由来尿と比較して有意に変動する蛋白スポットを増加83個、減少6個の計89スポット認めた。一部の蛋白スポットについてLC-MS/MSにて同定した結果では、既に糖尿病性腎症にて有意に変動することが報告されているTransferrin, Ceruloplasminの増加、Uromodulinの減少が確認された。

- ・ 糖尿病以外の疾患

慢性閉塞性肺疾患患者血清10人分を発送後、創

薬プロテオームファクトリー施設での高発現血清蛋白のcICAT法による解析結果を待っている。

【2DE, LC-MSを用いたプロテオーム解析】

- ・ 糖尿病

当センター研究所・代謝疾患研究部にて、臨床サンプルを用いた蛋白の多次元液体クロマトグラフィーによる分離、LC-MSを用いた網羅的同定の予備検討として、ヒト肝細胞由来細胞株HepG2の培養上清に含まれる分泌蛋白を解析し、86個の蛋白を同定したが、そのうち10個はHepG2の分泌蛋白としては未報告であった。

また、脂質代謝を制御して高脂血症や動脈硬化症などに深く関与するLXRのアゴニスト(T0901317)をHepG2細胞の培養液に添加し、培養上清中の蛋白について二次元電気泳動を用いたディファレンシャル解析(2D-DIGE)を行った。その結果、T0901317による刺激によって有意に増加した全てのスポットがapolipoprotein E (apoE)として同定された。apoEは幅広いpIレンジと分子量にわたって複数のスポットとして点在していることも併せて確認され、このうちの一部は二次元電気泳動ゲルのProQ Emerald染色によって、糖鎖の修飾を受けていることが推定された。これより、LXRは肝臓からのいくつかの分泌蛋白の誘導を促し、他の臓器においても遠隔的に脂質代謝の調節を行う可能性が示唆された。

- ・ 糖尿病以外の疾患

肺組織内で感染防御に関与している組織マクロファージの機能に重要な蛋白を網羅的に解析するために、健常者末梢血液から採取した単球をM-CSFあるいはGM-CSFといったヒトサイトカインで分化させ、分化後に発現量の変化する蛋白を2DEにて網羅的に解析し、それぞれに特異的に発現した蛋白の同定を試みた。培養開始から48時間経過後ではGM型で103個及びM型では157個、7日目(168時間)経過後ではGM型で190

個及び M 型で 231 個、培養開始から 7 日目（168 時間）経過後に結核菌を感染させ、さらに 48 時間経過したものでは GM 型で 190 個、M 型で 231 個の蛋白を同定した。このうち GM 型、M 型共通の分泌型蛋白一種と M 型に特異的に高発現した非分泌型蛋白一種に対して、ウエスタンブロット法ならびにプロテアーゼ活性測定を行い個別に解析を進めている。

D. 考察

プロテオームファクトリーのプロジェクトの3年度目として、創薬プロテオームファクトリー施設での糖尿病関連蛋白のデータベース構築のための予備検討用血清サンプルの解析、本格的解析用の血清の収集及び解析が行われた。次年度は、創薬プロテオームファクトリー施設での解析結果と臨床情報をバイオインフォマティクスによって多角的に解析することによって、疾患あるいは病態に固有な蛋白プロファイルを抽出する。尿蛋白については、本研究所内にて確立した方法で前処理法を用いて、糖尿病患者及び健常者の尿検体を 2DE にて解析し、アルブミン以外の糖尿病性腎症に特異的な早期診断マーカーを検索する。また、血清蛋白及びペプチドについて、創薬プロテオームファクトリー施設にて SELDI-TOF を用いて解析する予定である。

糖尿病以外の疾患については、今年度発送した呼吸器疾患（慢性閉塞性肺疾患）患者由来血清の創薬プロテオームファクトリー施設での解析結果を待つ。

また、組織マクロファージのプロテオーム解析については、今年度の研究で得られた M-CSF あるいは GM-CSF での分化後に変化する蛋白発現プロファイルを元にして、多次元 HPLC、質量同位体標識試薬、蛍光標識試薬を用いた定量的精密分析系を構築する。これによって GM 型、M 型マクロファージの成長経時変化および結核菌感染前後の変化に伴い増減する蛋白を同定することを目指す。

E. 結論

ポストゲノム時代に疾患に関連した遺伝子情報が集積した上で、これらの情報を疾患の診断及び治療にいかにかかすかが今後の課題になる。特に糖尿病の特徴は、国内患者：740 万人、潜在的には推計 1,620 万人と患者数が多い上にさらに増加傾向にあること、患者の 90% 以上を占める 2 型糖尿病がインスリン分泌低下及びインスリン抵抗性が合併して発症する多因子性疾患であることである。このため、本プロジェクトにて糖尿病患者由来サンプルを大規模に収集し、蛋白の網羅的同定を行い、蛋白プロファイルと様々な臨床情報との関連性についてバイオインフォマティクス技術を用いて多変量解析することによって、遺伝子要因、環境因子、合併症等の影響が加味された上での病態に合わせた新しい治療法の開発、病態や病期を診断可能な新規のバイオマーカー開発によって、糖尿病の診療に貢献することが期待される。また、呼吸器疾患等の糖尿病以外の疾患においても、同様のアプローチは有用であると考えられる。また、*in vitro* でヒトサイトカインにて分化させたマクロファージのプロテオーム解析によって、組織マクロファージへの分化の分子機構及びその感染防御における役割の解明が期待される。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

論文：

Yamashita R, Fujiwara Y, Ikari K, Hamada K, Otomo A, Yasuda K, Noda M, Kaburagi Y. Extracellular proteome of human hepatoma cell, HepG2 analyzed using two-dimensional liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Mol Cell Biochem*. In press.

学会発表：

鏑木康志、山下亮、浜田圭子、安田和基、野田光彦：IRS高発現CHO細胞の核抽出液でのプロテオーム解析、第79回日本内分泌学会学術総会、2006年5月、神戸

山下亮、井狩高平、浜田圭子、安田和基、鏑木康志：尿タンパク質の調製と2D DIGEによる解析、第4回日本ヒトプロテオーム学会、2006年7月、東京

山下亮、井狩高平、浜田圭子、安田和基、鏑木康志：IRS-1, IRS-2 高発現ヒト肝細胞のプロテオーム解析、第4回日本ヒトプロテオーム学会、2006年7月、東京

井狩高平、山下亮、浜田圭子、大友明日香、安田

和基、鏑木康志：IRS-1, IRS-2 高発現ヒト肝細胞のプロテオーム解析、日本分子生物学会 2006 フォーラム、2006年12月、名古屋

浜田圭子、山下亮、井狩高平、大友明日香、安田和基、鏑木康志：インスリン/IGF受容体による遺伝子発現制御の比較解析、日本分子生物学会 2006 フォーラム、2006年12月、名古屋

総説：

山下亮、鏑木康志：蛍光ディファレンスゲル二次元電気泳動による糖尿病病態解析、生物物理化学 2006年 Vol.50 No.3 193-200

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
該当事項なし

厚生労働科学研究費補助金（疾患関連たんぱく質解析研究事業）
分担研究報告書

小児免疫・アレルギー疾患関連因子の探索ならびに微量タンパク質解析技術の確立
分担研究者 田上 昭人 国立成育医療センター研究所 薬剤治療研究部 部長

研究要旨 小児の免疫・アレルギー疾患の中で腎炎・ネフローゼ症候群について疾患特異的な指標となる体液性因子の解析について血清を用いた解析方法および患者について検討を行った。

A. 研究目的

小児の免疫・アレルギー疾患は近年患者の増加がみられ、その病因・病態の解明および治療方法の開発は成育医療において重要な課題の一つである。このような疾患の病態の解明・治療法の開発において、網羅的に疾患関連因子・薬物標的因子の探索が可能なプロテオーム解析は、トランスクリプトーム解析とともに有用である。つまり、これらの疾患においては、原因遺伝子だけではなくその遺伝子により作られるたんぱく質の動態や他の生体分子との相互作用、さらにはこれに関連する細胞全体の機能情報ネットワークを詳細に解析し、個体の遺伝的特徴（ゲノム情報）を付加して系統的に整理していくことにより、疾患の解明や治療法の開発が可能となるものと考えられる。喘息やネフローゼ等の疾患は、ステロイド剤や免疫抑制剤が有効であることより、原因となる疾患関連分子が血清中あるいは尿中に存在することが示唆されてきている。本研究では、疾患関連新規病態分子を同定し病態の解明とともに、免疫・アレルギー疾患の新たな治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

原疾患を有する患者から発症時（急性期）、寛解期および正常人の血清の蛋白質の種類、質、量の相違について質量分析装置およびバイオフィーマティクス技術を用いて解析する。さらに、同定された因子について疾患との関連性について生物学的・医学的関連性を解析するために動物や細胞を用いた検討を行う。

（倫理面への配慮）

本研究においては、国立成育医療センター倫理委員会に倫理申請を行い、承認を得た（平成16年8月17日、倫理申請受付番号94、追加申請：平成18年12月27日、倫理申請受付番号94）。本倫理規定に従い、検体の採取・解析等遵守している。

C. 研究成果

本年度は、昨年度に引き続き小児腎疾患の患者より血清を採取し血清中のプロテオーム解析を行った。平成16年10月から平成18年10月までの検体総数は56検体で患者数26名、男性19名、女性7名で、検体提供時の年齢は図1に示す。

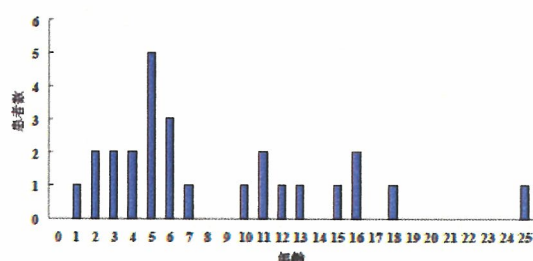


図1 患者の年齢分布

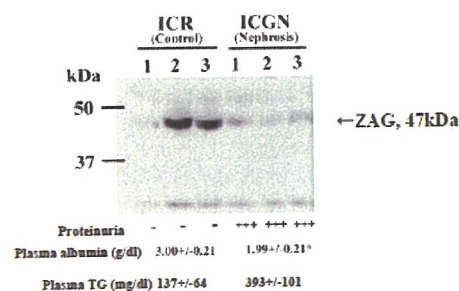
26名の患者の内訳を表1に示す。26名中、ネフローゼ症候群21名、FSGS腎移植後2名、IgA腎症2名、その他1名であった。

	患者数計	微小変化	び慢性メサン ギウム増殖	FSGS	糸球体腎炎 慢性増殖性	その他	生理所見なし	不明
ネフローゼ症候群	21	6	2	2	0	3	4	4
ステロイド感受性	16	4	1			3	4	4
ステロイド抵抗性	4	1	1	2				
不明	1	1						
FSGS腎移植後	2			2				
IgA腎症	2		2					
その他	1				1			

表1 疾患の内訳

ネフローゼ症候群の患者において発症時（蛋白尿陽性）、治療時（蛋白陰性）、寛解時（蛋白尿陰性）の検体を用いて血清中のプロテオーム解析を行ったところ疾患及び病態と関連して変動するZinc-alpha2-glycoprotein (ZAG)がバイオインフォマテクス解析により同定された。

ZAGとネフローゼ症候群との関連性を明らかにするためにネフローゼ自然発症モデルマウス（ICGN）を用いて血中ZAGの解析を行った。コントロールマウス及び疾患モデルマウスそれぞれ3匹についてウエスタンブロット法を用いて血清中のZAGの解析を行ったところコントロールマウスに比べてネフローゼ症候群を発症している病態モデルマウスではZAGが減少していることが示唆された（図2）。



抗ZAG抗体を用いたウエスタンブロット
 蛋白質量100μg相当の血清を7.5%SDS-PAGEにより電気泳動を行い、ウエスタンブロットを行った。
 Primary antibody: ZAG(1E2), 1:200 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC)
 Secondary antibody: anti-mouse IgG, HRP, 1:3000

図2 モデルマウスにおける血清ZAG

D. 考察

小児腎疾患の中でも特にネフローゼ症候群に関連する因子の探索同定を行うためにネフローゼ症候群の様々な病態における血清を採取した。プロテオーム解析ならびにバイオインフォマテクスを用いた解析により数種類の因子が疾患及び病態と関連することが示唆されたが、生物学的関連性については今後明らかにしていく必要がある。更に大規模な患者の解析やモデル動物を用いた解析により生物学的関連性を確認し、また疾患における蛋白の分子生物学的意味について解明していく必要がある。

E. 結論

小児のネフローゼ症候群の患者においてプロテオーム解析を行った。バイオインフォマテクスを用いた解析により、数種類の蛋白が統計学的に有意に関連があることが明らかになったが、今後生物学的・医学的関連性について解明を行っていく必要があると考えられた。

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. 知的所有権の取得状況

1) 特許取得

なし

2) 実用新案登録

なし

3) その他

なし

厚生科学研究費補助金（疾患関連タンパク質解析研究事業）
分担研究報告書

加齢関連疾患に関連する微量タンパク質解析技術の確立

分担研究者 太田壽城 国立長寿医療センター 病院長
田平 武 国立長寿医療センター 研究所長
研究協力者 徳田治彦 国立長寿医療センター 臨床検査部長
渡邊 淳 国立長寿医療センター 血管性認知症研究部
分子病態研究室長

研究要旨

本年度は、引き続き認知症および骨粗鬆症患者の血清検体をプロテオームファクトリーへの提供・プロテオミクス解析を継続し、提供検体は合計 32 例となった。また、前年度の尿中のタンパク質の解析に引き続き、これまでに確立した微量タンパク質の解析システムを用い、アルツハイマー病 (AD) を中心として、認知症で最も変化が期待される脳脊髄液中の主なタンパク質の同定を行った。また、前年度のラット脳組織の解析に続いて、家族性脳血管性認知症である Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL)患者脳のプロテオーム解析を行い、CADASIL 脳の微小血管には Notch3 の細胞外領域が蓄積していることを明らかとした。一方、骨形成担当細胞におけるタンパク質リン酸化による機能制御について検討し、骨芽細胞において主要な骨形成促進物質の一つである線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2) による血管内皮細胞増殖因子(VEGF)産生には、p44/p42 mitogen-activated protein (MAP)キナーゼに加えて stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK)のリン酸化による活性化が関与すること、FGF-2 が p70 S6 キナーゼをリン酸化し活性化すること、p70 S6 キナーゼの活性化が SAPK/JNK のリン酸化を抑制し、FGF-2 による VEGF 産生を抑制的に制御することを明らかとした。これらは臨床検体における疾患関連タンパク質解析を進める上で、きわめて重要な新知見と考えられる。

A.研究目的

高齢化社会の進行に伴い、加齢関連疾患の急増が知られている。これまでに私共は、認知症および骨粗鬆症患者の臨床検体について、病院から研究所へのサンプル提供体制を確立し、さらに認知症・骨粗鬆症・褥創の3疾患について、病院から創薬プロテオームファクトリー (PF) へのサンプル提供体制を整備してきた。また、疾患関連タンパク質およびペプチドの分析態勢を整備し、ADに関連するタンパク質・ペプチドの網羅的解析技術について検討してきた。

本年度は、引き続き PF への認知症・骨粗鬆症患者の血清サンプルの提供を行いこれらの疾患関連タンパク質の解析に資することとした。また、微量タンパク質の解析法を確立し、各疾患における特異的なタンパク質の同定、早期診断のための生化学的マーカーを得ることを目的とする。本年度は AD を中心とした認知症の脳脊髄液を用い、各疾患における網羅的なタンパク質の解析を行った。また、原因遺伝子として Notch3 が同定されている家族性脳血管性認知症の CADASIL に着目し、この病態を探るために、CADASIL 患者剖検

脳および対照剖検脳から微小血管を分離し、Notch3 を中心に血管内のタンパク質に変化がないか解析を行い、発症機序の解明を試みた。さらに骨粗鬆症の発症・進展に関与する機能タンパク質の解析として、骨芽細胞培養系を用いて、タンパク質リン酸化の相互制御機構による細胞機能制御につき検討した。

B.研究方法

昨年度までの本研究において策定・検証された PF へのサンプル提供手順により、認知症および骨粗鬆症の診療を担当する診療科医師からの試料および診療情報の受領・一時保管・試料提供を行った。なお、今年度は特に認知症の試料提供を促進した。

脳脊髄液は前処理としてアルブミン、イムノグロブリン G、イムノグロブリン A、トランスフェリン、ハプトグロビン、アンチトリプシンといった高濃度に含まれる主要な 6 つのタンパク質の抗体が固定されたアフィニティーカラムを用いて素通り画分と吸着した画分に分けた。これらの画分のタンパク質はトリプシンで消化を行い、1 分間にナノリットルといった低流量で流せる HPLC を用いた nanoLC/MS/MS によってショットガン分析を行い、脳脊髄液中のタンパク質を網羅的に解析した。

CADASIL 患者剖検脳および対照剖検脳はそれぞれプロテアーゼ阻害剤を含む PBS 中でホモジナイズし、ガラスビーズを用いたカラムで微小血管を分離した。血管は RIPA buffer, Urea/Thiourea, ギ酸等で可溶化し、各画分を SDS 電気泳動後、Notch3 の抗体でウエスタンブロットを行った。さらに各画分は、nanoLC/MS/MS によるショットガン分析を行い、微小血管中のタンパク質を網羅的に解析した。

新生仔マウス頭蓋冠より分離株化された骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞を 10%FCS を含む α -MEM 培地にて培養し、5 日後培地を 0.3%FCS を含む α -MEM として 48 時間後以下の実験に供した。

細胞を各種阻害剤にて前処置した後、線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2) にて刺激し、培地中の VEGF (血管内皮細胞増殖因子) 濃度を ELISA にて、mRNA の発現をリアルタイム RT-PCR 法にて解析した。細胞質分画中の p70 S6 キナーゼ、p44/p42 MAP キナーゼ、p38 MAP キナーゼ、stress-activated protein kinase/ c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) のリン酸化について Western blot 法を用いて解析した。p70 S6 キナーゼのノックダウンは siRNA のトランスフェクトにより行った。

(倫理面への配慮)

当センターにおける臨床試料の解析あるいは PF への臨床試料の提供については、既に当院倫理委員会および PF 倫理委員会の承認を得ている。

C.研究結果

認知症および骨粗鬆症患者の血清について検体採取・保存および PF への提供を継続し、これまでに認知症 15 例、骨粗鬆症 17 例の提供を行った。診療情報の提供もあわせて行った。

AD 6 例、軽度認知障害 2 例、非 AD 4 例、健常人 2 例の脳脊髄液 250 μ l の網羅的な解析から 500 程のタンパク質をリストアップした。血漿由来のタンパク質のみならず、細胞内由来の微量なタンパク質の同定も可能となった。しかしながら、AD のみに共通といったタンパク質は同定出来なかったため、相関係数などをもとに数値化して比較を試みている。

CADASIL 脳および対照脳から微小血管を含む画分を精製し、免疫組織化学的検討を行ったところ、CADASIL 脳の一部の微小血管では Notch3 の細胞外領域を認識する抗体 N2 で反応性を示した。一方、対照脳では全く反応性を示さなかった。また、細胞内を認識する抗体 C2 ではともに反応性が見られなかった。

さらにウエスタンブロットでは、RIPA buffer 可溶性画分、Urea/Thiourea 可溶性画分で CADASIL 脳と対照脳で N2 によるバンドのパタ

ーンに違いがみられた。CADASIL 脳ではギ酸可溶性画分にも反応性がみられ、Notch3 の細胞外領域が変性し蓄積していることが明らかとなった。一方、C2 では各画分での違いはなかった。各々の画分は直接トリプシンで消化し、nanoLC/MS/MS によってショットガン分析を行った。主要な蛋白質のほとんどが両者に共通して存在しており際立った違いは見られなかった。また、血管を構成する蛋白質以外にも神経細胞やグリア細胞由来の蛋白質が多く見られた。

骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において、FGF-2(70 ng/ml)は 60 分まで時間依存性に p70 S6 キナーゼのリン酸化を促進し、刺激後 20 分で最大となった。p70S6 キナーゼの阻害剤であるラパマイシンは FGF-2 による VEGF 産生および mRNA 発現を増強した。ラパマイシンは FGF-2 による p70S6 キナーゼのリン酸化を抑制した。一方、FGF-2 は既報の p44/p42 MAP キナーゼおよび p38 MAP キナーゼのリン酸化に加えて SAPK/JNK のリン酸化を促進したが、ラパマイシンはこれらのうち SAPK/JNK のリン酸化のみを増強した。SAPK/JNK の阻害剤である SP600125 は、FGF-2 により惹起される VEGF 産生・mRNA 発現を抑制した。FGF-2 による VEGF 産生・mRNA 発現および SAPK/JNK のリン酸化に対するラパマイシンの増強作用は SP600125 により抑制された。さらに siRNA による p70 S6 キナーゼのノックダウンは FGF-2 による SAPK/JNK のリン酸化を増強した。

D. 考察

認知症および骨粗鬆症について、PF への臨床試料提供を継続した。認知症については担当診療科医師に周知を図った結果、提供試料の増加が見られた。また骨粗鬆症については内科からの提供が見られた。これらの疾患はいずれも高齢者医療においてその対策が急務となっているものであり、疾患関連タンパク質の解析が待たれる。引き続き試料提供体制の充実を図るとともに、治療による

修飾について検討したい。

脳脊髄液などヒト試料の解析において最も難しい点は、用いた研究試料が必ずしも均質な母集団ではないことである。実際 AD と診断されていても、血管性認知症等の疾患を有する複合型の認知症や、臨床症状は現れていないが既に脳内に AD の病理学的特徴を有する AD 予備群も存在するなど、純粋に正常ならびに AD と判断するのは極めて難しい症例がある。今後、多くの試料を解析することで AD と相関するタンパク質を検索し、定量化することが AD の診断法を確立するために重要であると考えられる。

CADASIL 脳および対照脳全体のタンパク質の解析では大きな違いが見られなかったため、病理学的特徴が顕著にみられる微小血管を分離し、血管内のタンパク質に変化がないか解析を試みた。しかしながら、電気泳動及び質量分析からは、Notch3 以外に際立った変化が見られなかった。今回用いた微小血管の精製方法では神経細胞やグリア細胞の混入がみられることから、CADASIL における血管変性メカニズムを知るためには、より高度な微小血管の精製を行い、それらの比較を行う必要があると思われた。

骨芽細胞により産生された FGF-2 は骨器質内に埋入され、骨のリモデリングにおける骨吸収と骨形成のカップリングに関与するとともに、骨折に際しては骨芽細胞における発現が亢進することが知られており、骨の形成促進の場面において特に重要な役割を果たしていると考えられている。今回、培養骨芽細胞系において、FGF-2 が p70 S6 キナーゼのリン酸化を促進することが明らかとなった。今回検討した Thr389 のリン酸化は p70 S6 キナーゼの活性化とよく相関することが知られており、骨芽細胞における FGF-2 の作用に p70 S6 キナーゼの活性化が関与することを強く示唆すると考えられる。また FGF-2 により p44/p42 MAP キナーゼ、p38 MAP キナーゼに加えて SAPK/JNK のリン酸化が促進されることが明らかとなった。MAP キナーゼはリン酸化により活

性化されることが知られており、FGF-2 により SAPK/JNK が活性化されると考えられた。VEGF は微小血管床の形成をはじめ、骨リモデリングにおいて重要な役割を果たしていることが知られているが、私どもは FGF-2 による VEGF 産生は p44/p42 MAP キナーゼを介すること、および p38 MAP キナーゼにより抑制的に制御されることを明らかとしている。今回、ラパマイシンおよび p70 S6 キナーゼのノックダウンが FGF-2 により惹起される VEGF 産生・mRNA 発現および SAPK/JNK のリン酸化を増強したことは、p70 S6 キナーゼと SAPK/JNK の間にクロストークが存在し、巧緻な細胞機能の制御のもとに VEGF 産生が行われていることを示唆している。今後さらに解析を進めることにより、細胞レベルでのタンパク質の翻訳後修飾による機能制御機構、ひいては疾患発症・進展等の病態制御機構の解明に資することが期待できる。

E. 結論

加齢関連疾患（認知症・骨粗鬆症）の臨床検体のプロテオームファクトリーへの提供を継続した。nanoLC-MS/MS を用いた微量タンパク質の解析システムによって AD 患者ならびに他の疾患さらには健康人の脳脊髄液から、主要なタンパク質を同定した。また、CADASIL 脳のプロテオーム解析から微小血管に Notch3 の細胞外領域が蓄積していることを明らかとした。培養骨芽細胞において、FGF-2 による VEGF 産生に SAPK/JNK が関与し、p70 S6 キナーゼによるネガティブフィードバック機構が存在することが示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takai S, Tokuda H, Hanai Y, Harada A, Yasuda E, Matsushima-Nishiwaki R, Kato H,

- Ogura S, Ohta T, Kozawa O. Negative regulation by p70 S6 kinase of FGF-2-stimulated VEGF release through stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase in osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* in press
2. Hanai Y, Tokuda H, Takai S, Harada A, Ohta T and Kozawa O. (2006) Minodronate suppresses prostaglandin F2 α -induced vascular endothelial growth factor synthesis in osteoblasts. *Horm. Meta. Res.* 38:152-158.
3. Takai S, Tokuda H, Matsushima-Nishiwaki R, Hanai Y, Kato K and Kozawa O. (2006) Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt plays a role in sphingosine 1-phosphate-stimulated HSP27 induction in osteoblasts. *J. Cell. Biochem.* 98:1249-1256.
4. Hanai Y, Tokuda H, Ishisaki A, Matsushima-Nishiwaki R, Nakamura N, Yoshida M, Takai S, Ohta T, and Kozawa O. (2006) Involvement of p44/p42 MAP kinase in insulin-like growth factor-I-induced alkaline phosphatase activity in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 251:42-48.
5. Hanai Y, Tokuda H, Ohta T, Nishiwaki-Matsushima R, Takai S and Kozawa O. (2006) Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt auto-regulates PDGF-BB-stimulated interleukin-6 synthesis in osteoblasts. *J. Cell. Biochem.* 99:1564-1571.
6. Takai S, Tokuda H, Yoshida M, Yasuda E, Matsushima-Nishiwaki R, Harada A, Kato K, Kozawa O. (2006) Prostaglandin D2 induces the phosphorylation of HSP27 in osteoblasts: function of the MAP kinase superfamily. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 75:61-67.

7. Takai S, Tokuda H, Hanai Y, Kozawa O.
(2006) Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt
plays a part in tumor necrosis
factor- α -induced interleukin-6 synthesis in
osteoblasts. *Horm. Meta. Res.* 38:563-569.

8. Tanabe K, Tokuda H, Takai S,
Matsushima-Nishiwaki R, Hanai Y, Hirade K,
Katagiri Y, Dohi S and Kozawa O. (2006)
Modulation by the steroid/thyroid hormone
superfamily of TGF- β -stimulated VEGF
release from vascular smooth muscle cells. *J.*
Cell. Biochem. 99:187-195.

2. 学会発表

1. 渡邊淳、田平武、高橋慶吉. CADASIL 脳の
微小血管に蓄積する Notch3 の解析 第 25 回日
本認知症学会 (2006 年 10 月、広島).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし