

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー・治療研究事業）
研究報告書

リポソームをバイオリガンドとしたRA血清早期診断法

主任研究者氏名：苗代康可 札幌医科大学教育研究機器センター分子解析部門 助教
分担研究者氏名：相馬 仁 札幌医科大学教育研究機器センター分子解析部門 准教授
小海康夫 札幌医科大学教育研究機器センター分子解析部門 教授

研究要旨

新しいバイオリガンドとして、リン脂質の種類、割合、構造を改変した人工脂質二重層膜であるリポソームを用い、結合たんぱく質を濃縮することにより、シグナル伝達、アポトーシス、カルシウムストレス、酸化ストレスといった生体イベントに関与する機能的な低分子量タンパク質を効率的に収集する方法を開発した。本研究ではこれらのタンパク質の発現プロファイリングを SELD-TOF MS をもちいて作成、健常人および関節リウマチ患者間で比較することにより診断システムを構築する。ヒト血漿プロテオミクス解析により、微量のタンパク質の変化を捉え早期診断、治療効果予測、治療効果の判定を可能とし関節リウマチの重症化防止に役立てる。

A. 研究目的：

関節リウマチ (RA: Rheumatoid Arthritis) は最も頻度の高い自己免疫疾患であり、その病因は不明である。我が国の RA 患者は約 60 万人いると言われ、高齢化の影響もあり、年間の新規発症患者数は、年々増加する傾向にある。RA では発症早期より関節破壊を起こすことがわかっており、患者の多くは関節の痛みにより、不自由な日常生活を耐え忍んでいる。さらに長期間の罹病により寝たきりの生活を強いられ、生命予後に影響をおよぼすことも少なくない。近年、抗 TNF- α 抗体が治療にもちいられるようになり、難治性の RA においても症状の緩和ができるようになったが、治療奏成功率は 70%程度である。治療に要する費用も高額であり、

治療前に効果の予測ができればさらに費用対効果をあげることができると考えられる。特に RA 臨床上の重要な問題点として、特異性に乏しいリウマチ因子以外に診断に有用な血清マーカーがないこと、疾患活動性をモニターする客観的、特異的な指標がないこと、予後の推定や薬剤投与の基準となる適切なマーカーが判明していないことがあげられる。以上の問題点を踏まえ、本研究では RA の早期診断を目標とするとともに、治療効果予測、治療効果判定を正確に行うシステムの構築を目的とし、新規の疾患特異的マーカーの同定および本システムの診断系への導入を目標とした。

- 1) 健常人および疾患群の血漿収集
- 2) 血漿の前処理法の検討
- 3) 質量分析器 (SELDI TOF-MS 法) による前処理後血漿の解析
- 4) 前処理血漿に含まれるタンパク質の同定
- 5) 解析結果データの処理

B. 方法

1) 検体の収集

健常人ボランティアを募り血漿を収集する (初年度は100人程度)。疾患群として札幌医科大学通院中の関節リウマチ患者を対象にインフォームドコンセントを得たうえで50人程度の治療前、治療経過中の血漿を収集する。

2) 前処理法の検討

前処理法として以下の方法を検討し、適切な条件を決定する。

- a. 人工脂質二重層膜を利用した脂質結合タンパク質の濃縮分離を行う前処理
- b. 強陰イオン交換樹脂を利用し血漿タンパク質を等電点に応じて分ける前処理
- c. アルブミン除去カラム利用による血漿からのabundantなタンパク質除去をおこなう前処理

3) SELDI-TOF MSによる解析

Ciphergen社のProteinchip systemにて上記前処理後の正常人血漿をSELDI-TOF MS解析する。解析にもちいるProteinchipはイオン交換chip、金属親和性chip、Au chipのなかからpeakの検出程度が良いものを持ちいる。

4) GeLCMS法によるタンパク質の同定

前処理後の血漿タンパク質をSDS-PAGE分離後にゲルレーンを5mm毎にスライス化

し、ゲル内消化した後、LCMS分析する方法 (Gel-enhanced LCMS, GeLCMS法) をもちいた。消化後、抽出したペプチドはnanoLC-MS/MS法 (DiNaシステム: 株式会社ケーワイエーテクノロジーズ、QSTAR XL: Applied Biosystems) により解析しdatabase検索にて同定した。

5) 健常人群から得られるタンパク質の分子量と発現強度のデータを統計処理し、正常値の範囲を決定する。

C. 結果

1) 健常人ボランティアを募り血漿を73人分収集、保存し、解析を進めた。さらに札幌医科大学通院中の関節リウマチ患者を対象にインフォームドコンセントを得たうえで30人分のインフリキシマブ投与前後の血漿を収集し、凍結融解を繰り返さないため分注し、 -80°C で保存した。

2) 前処理法として人工脂質二重層膜を利用した脂質結合タンパク質の濃縮分離を行う前処理が検討した処理法のなかで一番簡便であり、多くのタンパク質 peak を検出 (のべ約800peaks/sample) することから本研究に最適と考えられた。

3) 正常人血漿73人分からそれぞれ人工脂質二重層膜 (リポソーム) に結合した脂質結合タンパク質 (LBP: Liposome Binding Protein) をPhカラムを装填したHPLCにより8分画に分け、Ciphergen社のProteinchip systemにて質量分析解析 (SELDI-TOF MS法による) した。もちいるProteinchipはイオン交換chip、金属親和性chip (銅およびニッケル)、Au chipを検討した

が、Au chipが一番簡便で一番多くの peakを検出した。(図1)

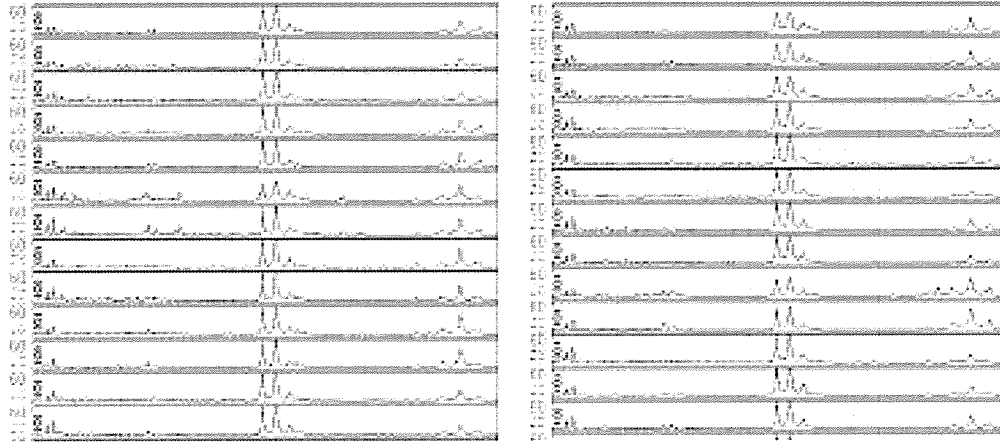


図1. 正常人群血漿の解析例 (分画3, 検出範囲10-30m/z)

- 4) 正常人血漿から集めたLBPをSDS PAGEにより分離し、in gel digestionによりtrypsin分解、抽出し質量分析器 (QSTAR XL: Applied Biosystems) により同定した。現在約300種類のタンパク質が同定されている。
- 5) 健常人群から得られるタンパク質の分子量と発現強度のデータを統計処理し、正常値のモデルを作成した。これにより発現異常のあるタンパク質の検出が容易になった。

D. 考察

- 1) 健常人群の血漿の収集は現在も継続しており、今年度中に目標の100検体を突破する予定である。疾患群に関しても、現在も症例は増加しており、治療前後の血漿を目標数(50検体)収集可能と考えている。解析に必要なと思われる検体数の確保は現在のペースで収

集できれば十分可能である。収集した血漿は分注し-80℃保存している。凍結融解を繰り返さないようにし、タンパク質の変性を極力抑えるよう留意した。

- 2) 前処理法として人工脂質二重層膜を利用した脂質結合たんぱく質の濃縮分離を行う前処理が検討した処理法のなかで一番簡便であり、多くのタンパク質 peakを検出することから最も効率的な前処理法であると考えられた。人口脂質二重層膜は新規バイオリガンドであり、未知のタンパク質を結合する可能性がある。これにより新規のバイオマーカーを同定する可能性が広がると考えられた。
- 3) 正常人血漿から集めたLBPをPhカラムを装填したHPLCにより8分画に分け、CIPHERGEN社の

Proteinchip systemにて質量分析器 (SELDI-TOF MS 法) により解析した。もちいる Proteinchip は幾種類かを検討したが、Au chip が一番簡便であり、一番多くの peak を検出した。総数延べ 250 本の peak が検出され、健常人群における正常値の範囲を設定することができ、今後疾患群との比較が容易に行えると考えられた。

- 4) 正常人血漿から人工脂質二重層膜に結合した脂質結合たんぱく質を GeLCMS 法により同定し、現在までに 300 種類のタンパク質が同定された。同定されたタンパク質の分子量と SELDI-TOF MS で測定された質量数からそれぞれの peak の同定が可能かもしれない。さらに健常人にのみ同定されるタンパク質、疾患群にのみ同定されるタンパク質の比較から疾患マーカーの発見が可能であると考えられた。
- 5) 健常人群から得られるタンパク質の分子量と発現強度のデータを統計処理し、正常値のモデル作成した。これにより発現異常のあるタンパク質の検出が容易に行えるようになった。この正常値と比較して疾患治療前の検体において著しく値の異なる 11500M/Z および 13900M/Z の peak は SAA および transthyretin であった。これらは急性期タンパク質であり既知の炎症性マーカーであるが、このシステムがうまく機能して

いることを証明しているものと考えられた。

E. 結論

本研究では RA の早期診断を目標とするとともに、治療効果予測、治療効果判定を正確に行うシステムの構築のために質量分析器による解析を主軸におき、新規バイオリガンドを用いることで新しいバイオマーカーの同定を目指した。対象とする検体は必要数収集できる目処が立ち、血漿の保存から前処理、解析までの効率的な protocol を確立した。現在までに本年度分の予定をほぼ達成し、本システムが機能していることを確認した。次年度の目標である新規の疾患特異的バイオマーカーの発見と本システムの診断系への導入にむけて現在準備中である。

F. 健康危険情報

特筆すべき点なし

G. 研究発表

1. 論文発表

リポソームをリガンドとして用いた血漿蛋白質のプロテオミクス解析

木村成寿・相馬 仁・苗代康可・小海康夫

生物物理化学 2006;50:231-6

2. 学会発表

日本ヒトプロテオーム機構第 4 回大会
リポソームをバイオリガンドとした新しい血漿タンパク質解析システムの検討

小海康夫 2006/7/18(東京)

日本ヒトプロテオーム機構第 4 回大会
SELDI-TOF MS による関節リウマチのバイオマーカーの同定

苗代康可 2006/7/18(東京)

H. 知的財産権の出願登録状況

特許出願中

リポソームをリガンドとして用いた体液
タンパク質の解析方法及び体液タンパク

質の調製方法

特願2006-193711