

200729024A

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

リポソームをバイオリガンドとしたRA血清早期診断法に関する研究

平成19年度 研究報告書

主任研究者 苗代 康可

平成20（2008）年 4月

## 目 次

I. 総括研究報告	
リポソームをバイオリガンドとしたRA血清早期診断法に関する研究 苗代康可	--- 1
II. 分担研究報告	
1. リポソームによる血漿の前処理と質量分析器 (SELDI TOF-MS法) による解析に関する研究 苗代康可	--- 11
2. リポソームの改良による新規バイオリガンドの検討に関する研究 相馬 仁	--- 17
3. GeLCMS法によるリポソーム結合タンパク質の発現比較と同定 に関する研究 小海康夫	--- 21
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	--- 27
IV. 研究成果の刊行物・別刷	--- 29

## 厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）

### 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：苗代康可 札幌医科大学医学部教育研究機器センター分子解析部門 助教  
分担研究者：相馬 仁 札幌医科大学医学部教育研究機器センター分子解析部門 准教授  
小海康夫 札幌医科大学医学部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、結合タンパク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 SELDI-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- $\alpha$  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 臨床上的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。

#### B. 方法

##### 1) 検体の収集

健常人ボランティアを募り血漿を100人分収集する。疾患群として札幌医科大学第一内科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の検出本数が多いものをもちいる。

## 4) GeLCMS法によるタンパク質の同定および発現比較

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、trypsinによりゲル内消化した後、LCMS分析する方法 (Gel-enhanced LCMS, GeLCMS法) をもちいる。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、QSTAR XL: Applied Biosystems) により解析し ProteinPilot software (Applied Biosystems) により database 検索

にて同定する。ラベルフリーのペプチド発現強度比較においてはGel内消化後、抽出したペプチドをnano-LC system (DiNa system: KYA technologies) により分離し、質量分析器 (QSTAR XL: Applied Biosystems) によりMS解析し、DeCyder MS ソフトウェアシステム (GE ヘルスケア バイオサイエンス) にてラベルフリーの発現差異解析同定をペプチドレベルでおこなう。

5) 健常人群およびRA治療前後における血漿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、バイオマーカーの検索を行う。

(倫理面への配慮)

本研究では、患者および健常者の血液検体を解析対象としているため、ボランティアの健常人および患者の参加協力を得なければならない。所定の手続きを通して、本学倫理委員会に内容を申請し、承認を本人のみならず家族の承諾を得るものとする。

## C. 研究結果

1) ボランティアを募り、健常人血漿を100人分収集した。さらに札幌医科大学第一内科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人分のインフリキシマブ投与前後の血漿を収集した。収集した血漿は、凍結融解による変質をさけるため分注し、-80℃で保存した。

2) 前処理法として人工脂質二重層膜 (リポソーム) 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、また血漿中に微量に存在するタンパク質を濃縮収集する (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) ことから本研究に最適と考えられた。検討中、作製されるリポソームの大きさの不均一性からタンパク質の捕捉効率にばらつきが生じる問題点があきらかとなったため、この点を克服するために、マグネタイト表面に均一にリン脂質プローブを固着させたマグネタイトリポソームを開発した。マグネタイトリポソームは大きさが均一で、リポソームより大きな表面積を持ち、

プローブ表面の分子種を簡単に変えることができ、磁力により拡散、凝集が可能である。そのため効率よく、種々の結合タンパク質を再現性よく回収することが可能となった (図1 参照)。

3) 正常人血漿100人分およびRA患者治療前後50人分の血漿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。ProteinchipにはAu chipをもちいた (図2 参照)。

## マグネタイトを用いる →リポソームに代わるnew probe

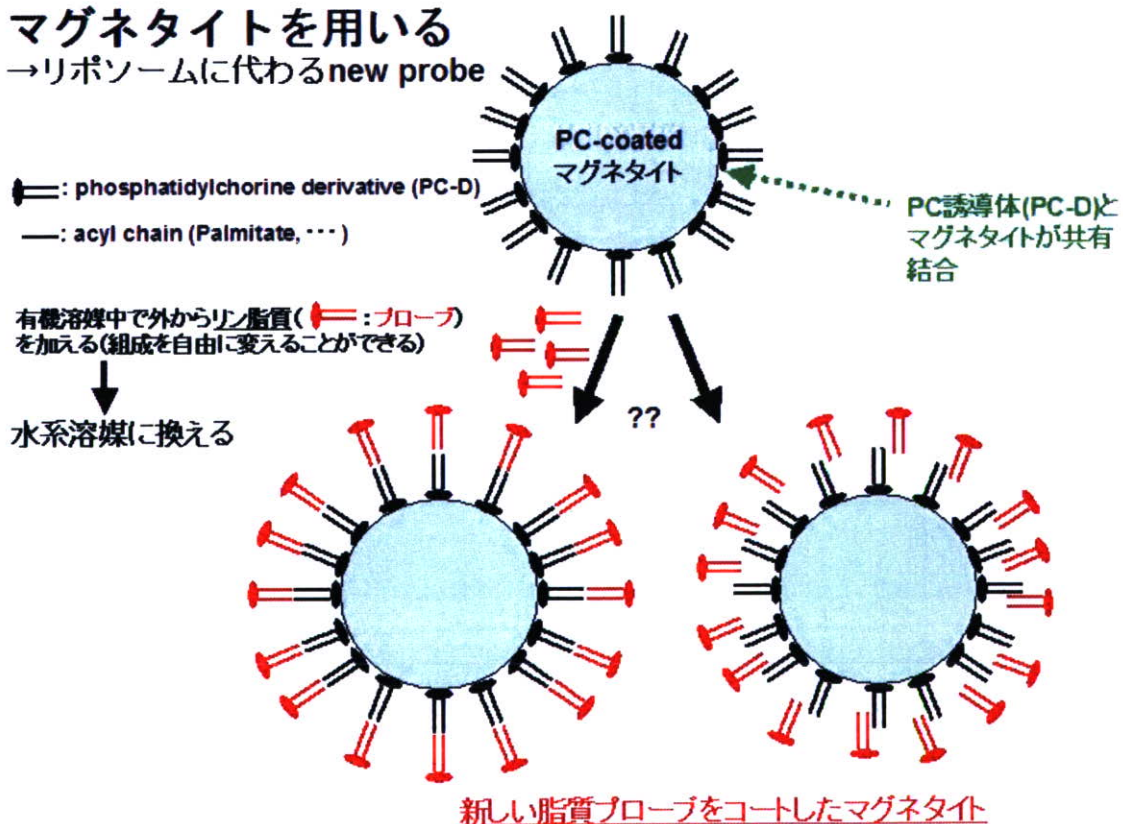


図1. 新規バイオリガンド：マグネタイトリポソームの概要



図2. 正常人群血漿の解析例 (分画3, Au chip 使用, 検出範囲10-30k M/Z)

4) 正常人血漿から集めたLBPをSDS PAGEにより分離し、Gel内trypsin消化後、消化ペプチドを抽出し、質量分析器 (QSTAR XL: Applied Biosystems) をもちいてLBP構成タンパク質を同定した。現在約300種類のタンパク質が同定されている。さらにGeLCMS法によるタンパク質の同定法を応用し、発現定量も行えるシステムを構築した。本システムはSELDI-TOF MS解析では検出したマーカー候補分子がいかなるタンパク質であるかを同定するために精製濃縮などの多大な労力を要したのに比べ、発現比較をラベルフリーで行うことができ、タンパク質同定をほぼ同時に行える利点がある。前処理後の血漿タンパク質をSDS PAGEにより分離し、trypsinにより、in gel digestionをおこない、ペプチドを抽出した。抽出

したペプチドはnano-LCシステムにより分離し、質量分析器 (QSTAR XL: Applied Biosystems) にて解析し、得られたmass, retention time, 発現強度の情報をもとにDeCyder MS ソフトウェアシステム (GEヘルスケア バイオサイエンス) にてラベルフリーの発現差異解析をペプチドレベルで行った (図3 Step1参照)。発現変化が認められたペプチドはmass, Retention timeの情報をもとに、同一サンプルを、さらにMSMS解析を再度おこなうことによりタンパク質同定が可能である (図3 Step2参照)。MS、MSMS解析により得られた情報からさらにLit-Q-MS/MS (400QTRAP®) によるMultiple Reaction Monitoring :MRM 解析し、validationをおこなった (図3 Step3参照)。

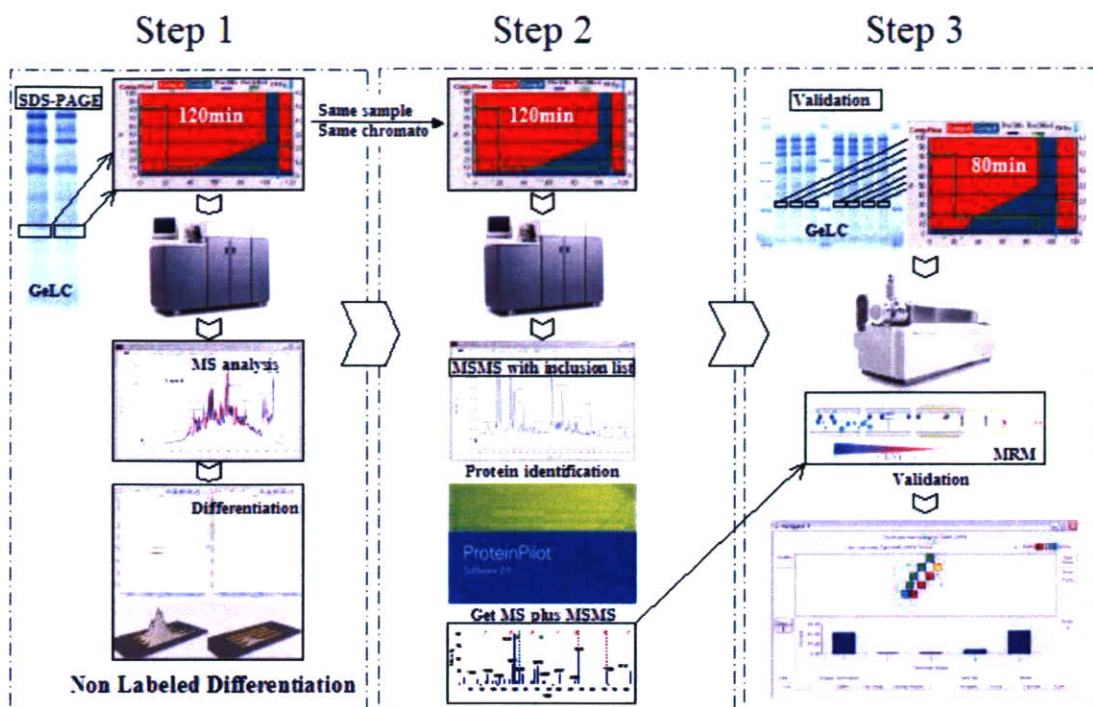


図3. 質量分析解析によるNon Label Quantitative diferentiation の流れ

5) 札幌医科大学第一内科に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て収集した50人の治療前後の血漿および健常人血漿100人分を前処理し、脂質結合タンパク質(LBP)の濃縮分離をおこなった。LBPは、CIPHERGEN社のProteinchip systemにてSELDI-TOF MS解析した。患者治療前後および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、バイオマー

カー候補を決定した。治療前および治療後、有効および無効というように複数の診断ターゲットを設けることにより、それぞれ設定されたターゲットを診断する複数のバイオマーカー候補を検出した(図4参照: 診断ターゲット=治療が有効)。検出されたバイオマーカー候補には10000Da未満の分子が多く含まれていた。

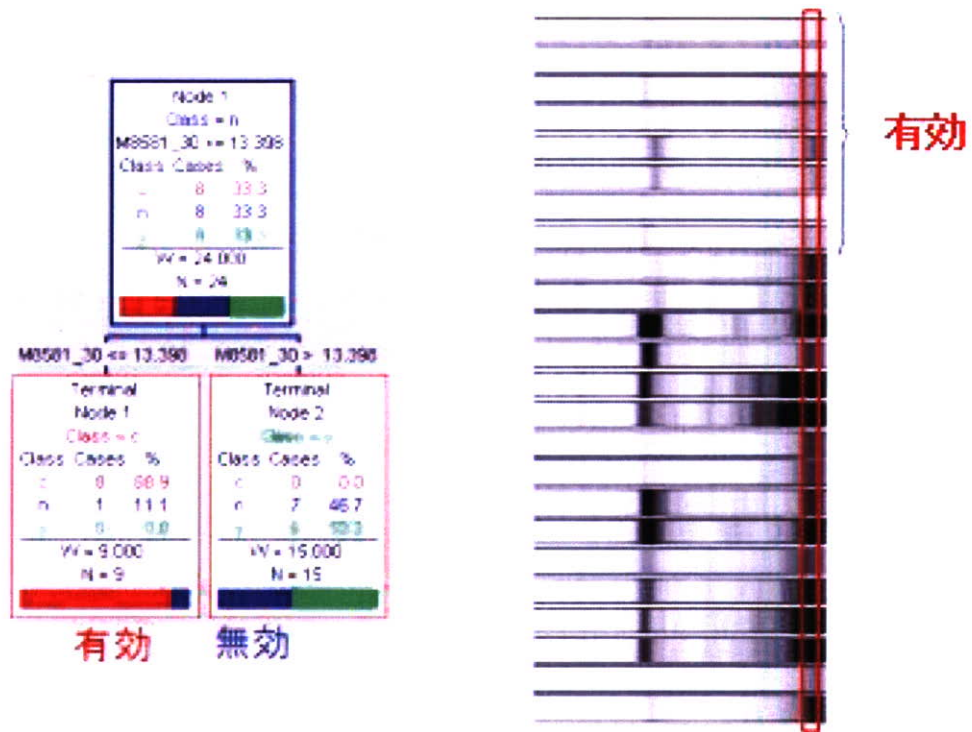


図4. 治療効果をターゲットに得られた診断マーカー候補の一例  
治療後有効と判断された血漿中に発現が多いタンパク質のバンドを検出した。

#### D. 考察

血漿のプロテオミクス解析によるバイオマーカー探索を試みた。プロテオミクスの技術により血漿には 3000 種類を超えるタンパク質の存在が明らかになっている。血漿は血液還流により全身諸臓器および病巣からのタンパク質を運搬している。血漿中には各組織からのタンパク質の放出があり、そのタンパク質のプロファイリングから健常人と疾患群間での差異を捕らえることができる。サンプルとしての血漿は、比較的少ない侵襲で、治療の経過に応じて繰り返し入手できる長所もあり、バイオマーカーを探索するためにきわめてリーズナブルであると考えられる。しかし核酸と異なり、タンパク質は親水性や疎水性などの化学的な性質

が多様であり、含まれているタンパク質のサイズも数千ダルトンから数百万ダルトンのものまで多種多様である。さらに  $10^{-10}\text{M}$  未満の濃度が低いタンパク質から  $10^{-6}\text{M}$  以上の濃度で血漿の大部分を占めるものまで含まれており解析を困難なものにしている(40mg/ml の濃度で存在しているアルブミンからわずかに  $1\text{ng/ml}$  で存在しているサイトカインまでさまざま)。さらにこの低濃度領域には多くの種類のタンパク質が存在し、 $10^{-3} \sim 10^{-4}\text{M}$  には数十種類のタンパク質が存在するが、さらに低濃度になればなるほど存在するタンパク質の種類は増える。本研究で解析機器の主軸においた SELDI-TOF MS の測定感度は非常に良いとされながらも検出限界は  $10^{-8}\text{M}$  程度であり、そのまま



は血漿中の 10-20%程度のタンパク質しか解析できず、アルブミンのような abundant なタンパク質の除去、等電点に応じた分画などの前処理が血漿のタンパク質解析には必須である。そこでわれわれはリポソームを利用した前処理をほどこした。われわれは血漿中のタンパク質群からバイオマーカーを検索するにあたり、いかに機能的に重要な分子を濃縮収集してくることが重要と考えリポソームをバイオプローブとして使用する方法を考案した。リポソームは生体膜上で起こる種々の現象をモデル的に引き起こすために作成された人工生体膜である。われわれはリポソームが提供する膜構造のタンパク質への親和性をもちいた網羅的なタンパク質の解析の可能性を検討し、血漿タンパク質の解析を通じてバイオマーカー探索への応用の可能性を検討した (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)。Ca<sup>2+</sup>は神経伝達物質の分泌に大きく関わり細胞の分化、増殖などの重要な因子である。しかし種々の病態で認められる持続的な Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇は酵素等の異常活性化により細胞障害を引き起こし (関節リウマチに見られる自己抗原にシトルリン化タンパク質があるが、このシトルリン化を引き起こすペプチジルアルギニン・デイミナーゼ: PAD は Ca<sup>2+</sup>による活性化機構が明らかになっている)、細胞が何らかのタンパク質分泌を起こす可能性がある。そのタンパク質の中に血液中にまで運ばれるものが存在すれば、病態マーカーとな

りうる。血液中には約 2mM の高い Ca<sup>2+</sup>が存在しているため、リポタンパク質や細胞膜と結合している可能性がある。われわれは、Ca<sup>2+</sup>依存的にリン脂質と相互作用する血漿タンパク質に注目し実際に Ca<sup>2+</sup>依存的 Liposome 結合タンパク質を SELDI-TOF MS により解析した結果、治療前および治療後、健常群および疾患群というようにいくつかの診断ターゲットを設けることにより複数のバイオマーカー候補を検出し、一例をしめした。現在これらのマーカー候補がどのようなタンパク質であるか同定中であるが、これらの中には分子量 10000Da 以下の分子が複数存在し、新規バイオマーカーとなる期待がもたれる。SELDI-TOF MS による解析は、一度に protein chip に捕捉された複数のタンパク質を同時に測定することが可能であり多数のタンパク質の発現量および分子量がピークとして検出され、必要な検体はごく少量(p mol レベル)であり臨床検体を直接利用でき、解析に要する時間も短く臨床への応用がしやすい利点がある。しかし得られる情報は質量電荷比と発現強度のみであり、タンパク同定にはさらに精製濃縮の労力を必要とする。そこでわれわれは、質料分析解析による Non Label Quantitative differentiation システムを開発した。本システムは、Nano-LCMS 解析で得られる膨大なピークデータを効率よく定量的に解析するシステムであり、検出感度も非常に高く、バイオマーカー候補検出からタンパク質同定までを効率的に行える優れたシステムと考えられる。さらに RA におけるバイオマーカー検出のみならず、他疾患におけるバイオマーカー

一の検索にも利用でき、応用範囲は広い。しかし血漿の蛋白質の濃度は  $10^{12}$  のダイナミックレンジを持つため、本システムに適合したダイナミックレンジと感度に調整するための、前処理の重要性は依然として高いと考えられる。

#### 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。現在のところ、同定にはいたっていないものの、バイオマーカー候補を複数検出しており、バイオマーカー候補探索のシステムとして効率的に機能している。血漿の前処理をおこなうための新規バイオリガンドであるマグネタイトリポソームの開発、non-label quantitative differentiation 法の開発にも成功し、今後、より効率的にバイオマーカー探索同定が行えると考える。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### a) 論文発表

1. 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. Plasma analysis of rheumatoid arthritis by SELDI

Naishiro Y, Suzuki C, Kimura M, Yamamoto M, Takahashi H, Sohma H, Hori T, Shinomura Y, Kokai Y, Imai K.

Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi. 2007 Jun;30(3):145-50.

##### b) 学会発表

1. 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ジカル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)
2. 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)
3. 日本臨床免疫学会第34回総会  
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 2006/10/2(東京)
4. 日本ヒトプロテオーム機構第5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 2007/7/30(東京)
5. 日本ヒトプロテオーム機構第5回大会  
血漿プロテオミクスにおける正常コントロールの病理学的考察  
小海康夫 2007/7/30(東京)
6. 日本ヒトプロテオーム機構第5回大会  
認知症の血中分子マーカー (アネキシンA5) の検討  
相馬 仁 2007/7/30(東京)
7. 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related

Disorders

Elevation of plasma level of  
annexin A5 in Alzheimer' s disease  
Hitoshi Sohma 2006/7/16-20(Spain)

8. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress  
of Biochemistry and Molecular  
Biology The novel molecular marker  
for Alzheimer diseas  
Hitoshi Sohma 2006/6/18-23 (京都)

H. 知的所有権の出願・取得状況

特許出願中

1. 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

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）

分担研究報告書

リポソームによる血漿の前処理と質量分析器（SELDI TOF-MS 法）による解析

主任研究者：苗代康可 札幌医科大学医学部教育研究機器センター分子解析部門 助教

研究要旨

新しいバイオリジカルリガンドとして、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 SELDI-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

SELDI TOF-MS を front line において質量分析以外の技術では計測不能である微量かつ低分子量の機能的血漿たんぱく質に焦点を当てることにより、RA 患者血漿におけるたんぱく質の微小な発現量変化や異なる蛋白の存在を簡便かつハイスループットに計測可能なシステムを開発するとともに新規の疾患特異的マーカーの同定を目的とした。

B. 方法

1) 健常人ボランティアより血漿を 100 人分収集する。疾患群として札幌医科大学第一内科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て、治療前後の血漿を 50 人分収集する。血漿は、札幌医科大学倫理規定にのっとりインフォームドコンセント後、附属病院第 1 内科患者より得た。

2) 人工脂質二重層膜（リポソーム）により脂質結合タンパク質（LBP）の濃縮分離を行う。

3) リポソームの作製

リン脂質（egg PC; Phosphatidyl Choline, PS; Phosphatidyl Serine）はクロロホルム/メタノール（2:1）に溶解し（10mg/ml）、必要量の PC と PS を 9:1 に混ぜ、N<sub>2</sub>（gas）で乾固させた。その後、Buffer（50mM HEPES（pH7.5）、150mM NaCl）を加えて、48°C で 30 分間インキュベートし、2 分間 vortex ミキサーで激しく攪拌し調製した。この条件で作製したリポソームは蛋白質と結合した後、下記の条件で完全に沈殿し、回収することができる。リン脂質の終濃度は 5mg/ml とした。

4) 血漿中リポソーム結合タンパク質の回収

100μl の血漿に終濃度 4mM となるように EGTA を添加し 20,000×g にて遠心後、

上清を回収した。その上清にリポソーム 500 $\mu$ g、CaCl<sub>2</sub> 15mM 加え、PBS を加え、全量を 1ml とし、4 $^{\circ}$ Cローターにて 12 時間混和した。20,000 $\times$ g にて遠心後、20mM HEPES (pH7.5), 100mM NaCl, 2mM CaCl<sub>2</sub> の Buffer にて洗浄し、10mM EGTA にて LBP を溶出した。抽出した LBP は Ph カラムを装填した HPLC により 8 分画に分け、次の解析にもちいた。

3) Ciphergen 社の Proteinchip system にて LBP の分画を SELDI TOF-MS にて解析する。Proteinchip には Au Chip を使用した。

### C. 結果

1) 健常人血漿を 100 人分、疾患群とし

て 50 人分のインフリキシマブ投与前後の血漿を収集し、得られた血液は、血漿分離し、凍結融解による変性を避けるため使用するまで -80 $^{\circ}$ C に凍結保存した。

2) リポソームによる前処理をおこなった。処理後、それぞれの LBP を Ph カラム装填 HPLC により 8 分画に分け、SELDI TOF-MS にて Au chip を用いて解析した。治療前および治療後、有効および無効というように複数の診断ターゲットを設けることにより、それぞれ設定されたターゲットを診断する複数のバイオマーカー候補を検出した (図 1a, b 参照)。検出されたバイオマーカー候補には 10000Da 未満の分子が多く含まれていた。

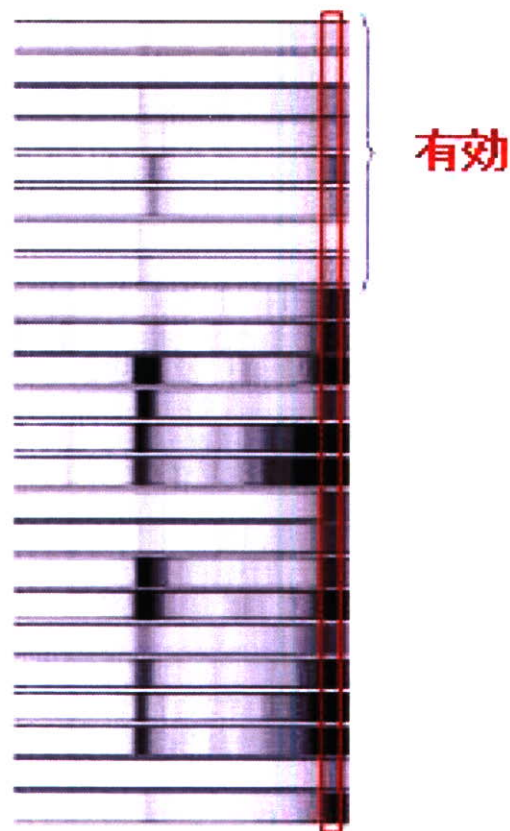
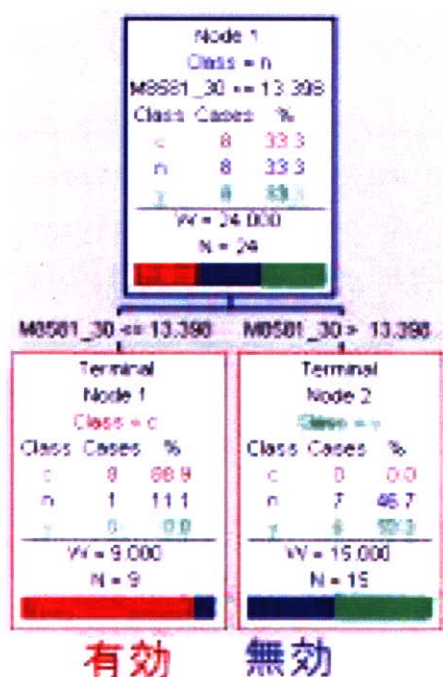


図1a. 治療効果をターゲットに得られた診断マーカー候補の一例

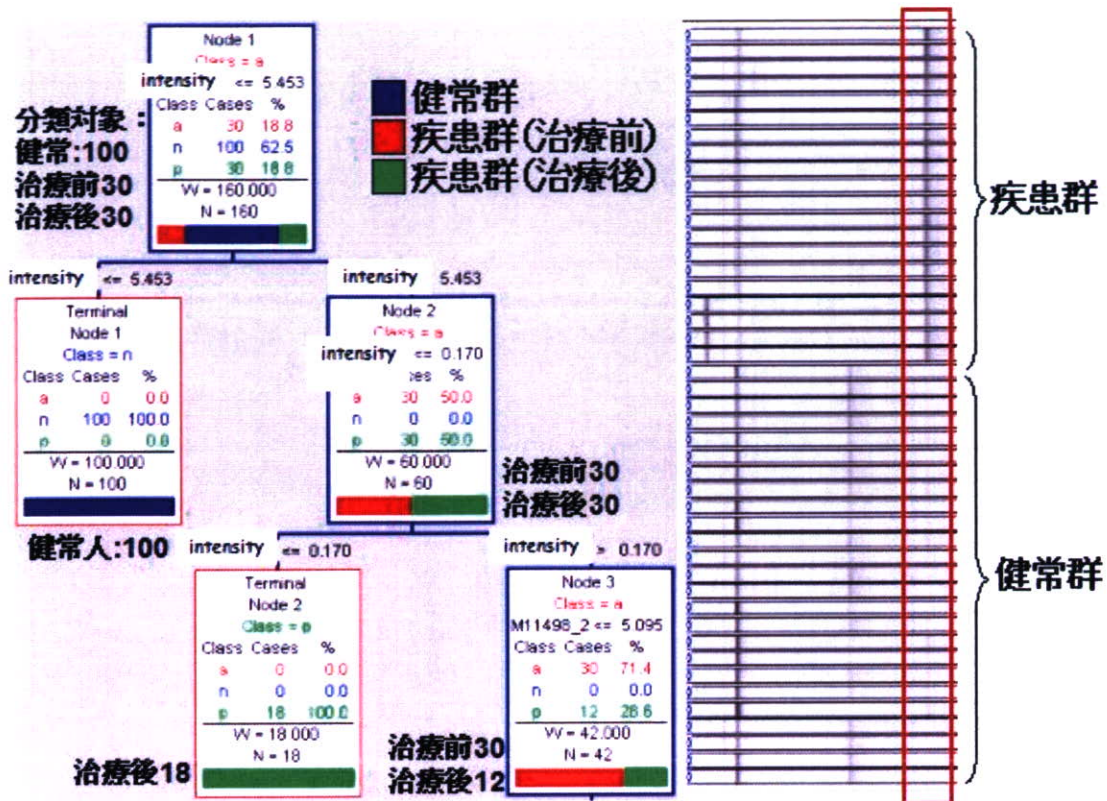


図1b. 治療前、治療後、健常人をターゲットに得られた診断マーカー候補の一例

#### D. 考察

血漿のプロテオミクス解析によるバイオマーカー探索を試みた。プロテオミクスの技術により血漿には 3000 種類を超えるタンパク質の存在が明らかになっている。しかし血漿中に存在する微量かつ低分子量の機能的血漿たんぱく質に焦点を当てるためには、アルブミンのような abundant なタンパク質の除去、等電点に応じた分画などの前処理が血漿のタンパク質解析には必須である。そこでわれわれはリポソームを利用した前処理をほどこした。われわれは血漿中のタンパク質群からバイオマーカーを検索するにあたり、いかに機能的に重要な分子を濃縮収集してることが重要と考えリポソーム

をバイオプローブとして使用する方法を試みた。リポソームは生体膜上で起こる種々の現象をモデル的に引き起こすために作成された人工生体膜である。われわれはリポソームが提供する膜構造のタンパク質への親和性をもちいた網羅的なタンパク質の解析の可能性を検討し、血漿タンパク質の解析を通じてバイオマーカー探索への応用の可能性を検討した (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)。リポソーム 結合タンパク質を SELDI-TOF MS により解析した結果、治療前および治療後、健常群および疾患群というようにいくつかの

診断ターゲットを設けることにより複数のバイオマーカー候補を検出し、一例をしめした。現在それらのマーカー候補がどのようなタンパク質であるか同定中であるが、これらの中には分子量 10000Da 以下の分子が複数存在し、新規バイオマーカーとなる期待がもたれる。SELDI-TOF MS による解析は、一度に protein chip に捕捉された複数のタンパク質を同時に測定することが可能であり多数のタンパク質の発現量および分子量がピークとして検出され、一度に多くのタンパク質 peak の発現強度の比較ができ、バイオマーカーの検索には非常に有効な手段であるが、得られる情報は質量電荷比と発現強度のみであり、タンパク同定にはさらに精製濃縮の労力を必要とすることから、SELDI による解析に必要な検体量(p mol レベル)と同程度のタンパク量でタンパク同定する技術が今後必要と思われる。

#### E. 結論

血漿を LBP で前処理し、リポソーム結合タンパク質を SELDI-TOF MS により解析した結果、治療前および治療後、健常群および疾患群というようにいくつかの診断ターゲットを設けることにより複数のバイオマーカー候補を検出した。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### a) 論文発表

1. 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. Plasma analysis of rheumatoid arthritis by SELDI

Naishiro Y, Suzuki C, Kimura M, Yamamoto M, Takahashi H, Sohma H, Hori T, Shinomura Y, Kokai Y, Imai K.

Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi. 2007 Jun;30(3):145-50.

##### b) 学会発表

1. 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ジカル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)
2. 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)
3. 日本臨床免疫学会第34回総会  
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 2006/10/2(東京)
4. 日本ヒトプロテオーム機構第5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 2007/7/30(東京)
5. 日本ヒトプロテオーム機構第5回大会  
血漿プロテオミクスにおける正常コントロールの病理学的考察  
小海康夫 2007/7/30(東京)
6. 日本ヒトプロテオーム機構第5回大会

認知症の血中分子マーカー（アネキシンA5）の検討

相馬 仁 小海 康夫 苗代 康可  
2007/7/30(東京)

H. 知的所有権の出願・取得状況

特許出願中

1. 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



厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）

分担研究報告書

リポソームの改良による新規バイオリガンドの検討

分担研究者：相馬 仁 札幌医科大学医学部教育研究機器センター分子解析部門 准教授

研究要旨

われわれは血漿中のタンパク質群からバイオマーカーを検索するにあたり、いかに機能的に重要な分子を効率良く単離してることが重要と考えリポソームをバイオプローブとして使用する方法を考案した。リポソームは生体膜上で起こる種々の現象をモデル的に引き起こすために作成された人工生体膜である。われわれはリポソームが提供する膜構造のタンパク質への親和性をもちいた網羅的なタンパク質の解析の可能性を検討し、血漿タンパク質の解析を通じてバイオマーカー探索への応用の可能性を検討した。

A. 研究目的

リポソームをバイオリガンドとして結合タンパク質を回収する方法は新しい原理によるものであり、リポソームに  $Ca^{2+}$  依存的に結合するタンパク質群には未知のタンパク質も多く含まれると考えられ、新規バイオマーカー検索に有効である可能性がある。昨年度からの検討において、作製されるリポソームの大きさの不均一性からタンパク質の捕捉効率にばらつきが生じる問題が明らかとなった。本分担研究では、この点を克服するために、マグネタイト表面に均一にリン脂質プローブを固着させたマグネタイトリポソームを開発することを目的とした。

B. 方法

1. マグネタイトリポソームの作製  
10mg/ml (in  $CHCl_3$ ) のマグネタイト 10 $\mu$ l に 10mg/ml (in  $CHCl_3 \cdot MeOH$ , ホスファチデルセリン：ホスファチデルコリン＝

9:1) 15 $\mu$ l を加えて窒素ガスで乾燥させた。乾燥後、1ml の buffer (50mM Tris-HCl (pH7.5), 0.15M NaCl) に再浮遊させたものを使用した。

2. マグネタイトリポソーム結合タンパク質の回収と再現性の確認

リポソーム結合タンパク質の回収方法は分担研究者小海の研究報告に詳細を譲る。

LBP100 $\mu$ g 分を電気泳動: IEF は GE ヘルスケア社のドライストリップ (pH4-7) を用いて行った。泳動後、SDS にて平衡化し、2次元目の SDS-PAGE (8-12%) を行った後、銀染色 (2D-銀染色試薬-II キット (第一化学薬品株式会社)) し、Image Master 2D Platinum (Amershambiosciences, Tokyo) にて解析した。

3. ホスファチデルセリン (PS)：ホスファチデルコリン (PC) の比率と結合タンパク質の変化の検討

10mg/ml (in  $CHCl_3$ ) のマグネタイト 10 $\mu$ l

に表面に 10mg/ml (in CHCl<sub>3</sub>・MeOH, ホスファチジルセリン: ホスファチジルコリンの割合を変化させた) を加えて窒素ガスで乾燥させた。乾燥後、1ml の buffer (50mM Tris-HCl (pH7.5), 0.15M NaCl) に再浮遊させたものを使用した。

### C. 結果

#### 1. マグネタイトリポソームとリポソームに吸着する LBP の比較

従来利用してきたリポソームに結合する血漿 LBP とマグネタイトリポソームに結合する血漿 LBP を二次元電気泳動および銀染色で比較した結果 (Fig. 1)、同様に血漿タンパク質画分を分離でき、さらにマグネタイトリポソームを利用したほうが、より多くのタンパク質を回収することができた。

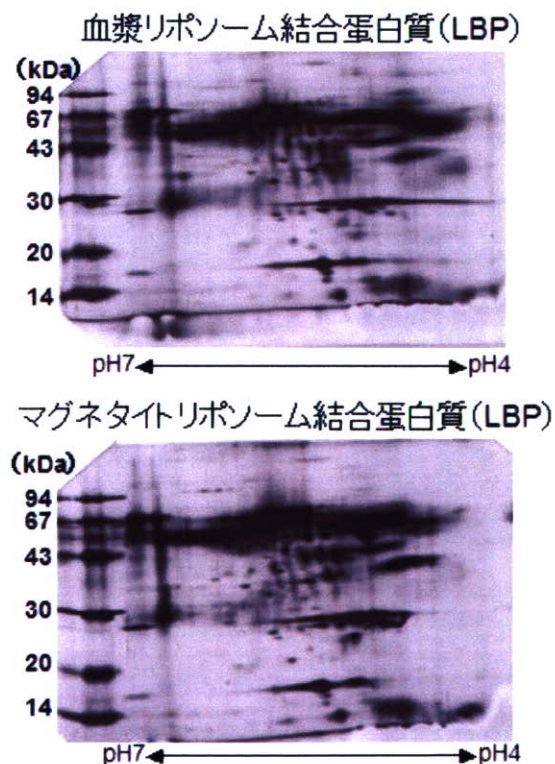


Fig. 1

2. 同一血漿由来 LBP での再現性の検討  
同一血漿から独立手技にて LBP を 2 サンプル得て、二次元電気泳動を行い、再現性の確認を行った (Fig. 2)。検出されたスポットを Image Master 2D Platinum にて解析したところ、Match 率 90.37%、スポット強度の相関係数は 0.71 であり高い相関 ( $0.7 \leq |\text{相関係数}| \leq 0.9$ ) を示し、良好な再現性を得ることができた。

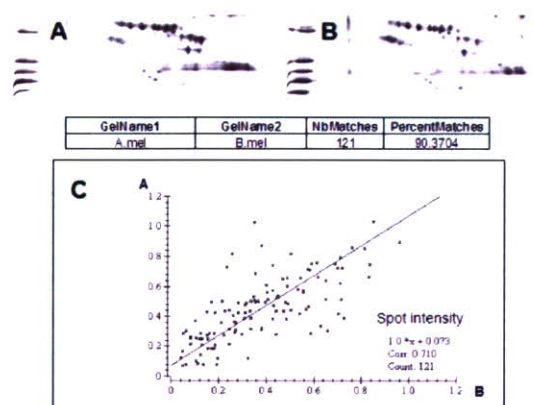


Fig. 2

#### 2. PS と PC の混合比率の変化と回収される LBP の変化

PS と PC の混合比率を変化させて作製したそれぞれのマグネタイトリポソームにアルブミン、アネキシン A1、アネキシン A4、アネキシン A5 の混合物を吸着させ LBP として回収される割合の変化を見た (Fig. 3)。PS の比率が増えるにつれ、吸着するアルブミンは減り、アネキシン A4、アネキシン A5 の割合が増えるのがわかる。PS と PC の混合比率を変化させることで LBP の内容を変化させることが可能である。

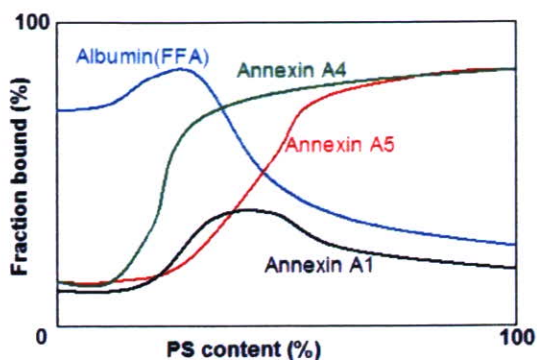


Fig. 3

#### D. 考察

プロテオミクスの技術により血漿には3000種類を超えるタンパク質の存在が明らかになっている。しかしアルブミンのように  $10^{-6}\text{M}$  以上の濃度で血漿の大部分を占めるものが含まれており解析を困難なものにしている。そのため血漿のプロテオミクス解析を行うためには、アルブミンのような abundant なタンパク質の除去、等電点に応じた分画などの前処理が血漿のタンパク質解析には必須であり、前処理の重要性は非常に高いと考えられる。そこでわれわれはリポソームを利用した前処理をほどこした。われわれは血漿中のタンパク質群からバイオマーカーを検索するにあたり、いかに機能的に重要な分子を濃縮収集してくることが重要と考えリポソームをバイオプローブとして使用する方法を考案した。リポソームは生体膜上で起こる種々の現象をモデル的に引き起こすために作成された人工生体膜である。われわれはリポソームが提供する膜構造のタンパク質への親和性をもちいた網羅的なタンパク質の解析の可能性を検討し、血漿タンパク質の解析を通じてバイオマーカー探索への応用の可

能性を検討した (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)。 $\text{Ca}^{2+}$ は神経伝達物質の分泌に大きく関わり細胞の分化、増殖などの重要な因子である。しかし種々の病態で認められる持続的な  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇は酵素等の異常活性化により細胞障害を引き起こし (関節リウマチに見られる自己抗原にシトルリン化タンパク質があるが、このシトルリン化を引き起こすペプチジルアルギニン・デイミナーゼ: PADは  $\text{Ca}^{2+}$ による活性化機構が明らかになっている)、細胞が何らかのタンパク質分泌を起こす可能性がある。そのタンパク質の中に血液中にまで運ばれるものが存在すれば、病態マーカーとなりうる。血液中には約  $2\text{mM}$  の高い遊離  $\text{Ca}^{2+}$ が存在しているため、リポタンパク質や細胞膜と結合している可能性がある。われわれは、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存的にリン脂質と相互作用する血漿タンパク質に注目し実際に  $\text{Ca}^{2+}$ 依存的 Liposome 結合タンパク質を SELDI-TOF MS により解析した。本分担研究で報告したマグネタイトリポソームは、大きさが均一で、プローブ表面の分子種を簡単に変えることができ、さらに熱応答性分子を持つためにその性質を利用し容易に、磁力により拡散、凝集させることが可能である。そのため効率よく、種々の結合タンパク質を再現性よく回収することが可能となった。  
血漿の前処理にきわめて有効な新規リガンドであると考えられる。

E. 結論：新規バイオリガンドであるマグネタイトリポソームの作製に成功した。マグネタイトリポソームは血漿の前処理に有効である。

F. 健康危険情報  
特になし。

### G. 研究発表

#### a) 論文発表

1. 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. Plasma analysis of rheumatoid arthritis by SELDI\_  
Naishiro Y, Suzuki C, Kimura M, Yamamoto M, Takahashi H, Sohma H, Hori T, Shinomura Y, Kokai Y, Imai K.  
Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi. 2007 Jun;30(3):145-50.

#### b) 学会発表

1. 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ジカル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)
2. 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)
3. 日本臨床免疫学会第34回総会  
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 2006/10/2(東京)

4. 日本ヒトプロテオーム機構第5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 2007/7/30(東京)
5. 日本ヒトプロテオーム機構第5回大会  
血漿プロテオミクスにおける正常コントロールの病理学的考察  
小海康夫 2007/7/30(東京)
6. 日本ヒトプロテオーム機構第5回大会  
認知症の血中分子マーカー (アネキシンA5) の検討  
相馬 仁 2007/7/30(東京)

7. 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders  
Elevation of plasma level of annexin A5 in Alzheimer's disease  
Hitoshi Sohma, Yasuo Kokai  
2006/7/16-20(Spain)
8. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology  
The novel molecular marker for Alzheimer disease  
Hitoshi Sohma, Yasuo Kokai  
2006/6/18-23 (京都)

H. 知的所有権の出願・取得状況  
特許出願中

1. 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