

200729024 B

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18年度～19年度 総合研究報告書

主任研究者 苗代 康可

平成20 (2008) 年 4月

## 目 次

I. 総合研究報告		
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	-----	1
苗代康可		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	11
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	13

## 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。

## B. 方法

### 1) 検体の収集

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札幌医科大学倫理規定ののっとり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。

### 2) 前処理法の検討

前処理法として以下を検討する。

- 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。
- 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。
- c. アルブミン除去カラムを利用し abundantなタンパク質を除去する。

### 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 (LBP)の回収

100 $\mu$ lの血漿に終濃度4mMとなるようにEGTAを添加し20,000 $\times$ gにて遠

心後、上清を回収した。その上清にリポソーム500 $\mu$ l、CaCl<sub>2</sub>15mM加え、PBSを加え、全量を1mlとし、4°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Bradford法にてタンパク質量測定を行い、100 $\mu$ g分をPh column装填HPLCにて8分画にわけ、次の解析にもちいた。

### 5) 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。解析には、Au chipをもちいた。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。

### 6) GeLCMS法によるタンパク質の同定および発現比較

#### a. LBP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、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ズ、QSTAR XL: Applied Biosystems)により解析しProteinPilot software (AppliedBiosystems)によりdatabase検索にて同定する。

b. non-label GeLCMS based quantitative differentiation

Step1 GeLCMS 法によるタンパク質の発現比較 (図 1 参照)

1. SDS-PAGE

LBP に対し、Bradford 法にてタンパク質量測定を行った。次に LBP 100 $\mu$ g を Ph column 装填 HPLC にて 8 分画にわけ乾燥後、20 $\mu$ l の sample buffer (0.2M Tris-HCl (pH6.8), 4% SDS, 8M Urea, 0.1M dithiotreitol (DTT), 0.01% Bromophenol blue (BPB)) にて溶解した。溶解したサンプルは 80mm  $\times$  100mm  $\times$  1.0mm precast polyacrylamide gel (5-15%, Tris-HCl, BioRad, USA) を用い、1 次元 SDS-PAGE により分離した。電気泳動条件は、50V 定電圧で、Tris glycine electrophoresis buffer (25mM Tris, 0.192M glycine, 0.1% SDS) を用いた。泳動後、polyacrylamide gel を銀染色 (EZ stain Silver キット (ATTO, Tokyo)) し、各 lane ごと、長軸方向に 5mm 間隔でスライス (14 スライス) した。各スライスを 1mm 四方に刻み、Eppendorf tube 内で in gel digestion を行った。

2. In gel digestion

1mm 四方に刻んだ gel を 100% acetonitrile にて脱水し、centrifugal concentrator (タイテック株式会社) にて乾燥させた。10mM DTT および 100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  を添加し 56 $^\circ\text{C}$  にて 1 時間インキュベ-

ート (還元) の後、55mM iodoacetamide および 100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  を加え 45 分間暗所静置した (アルキル化)。その後、100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  500  $\mu$ l にてゲル片を 10 分間インキュベートし、100% acetonitrile 500 $\mu$ l で脱水、centrifugal concentrator にて乾燥した。再度 100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  500 $\mu$ l にて 30 分インキュベートの後、100% acetonitrile 500 $\mu$ l で脱水し、centrifugal concentrator にて乾燥させた。

次に digestion buffer (12.5ng/ $\mu$ l Trypsin (Wako, Tokyo), 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 5mM  $\text{CaCl}_2$ ) を 20 分ごと 3 $\mu$ l ずつ加え、4 $^\circ\text{C}$  で静置し、gel 片が膨潤するまで繰り返した。digestion buffer (trypsin (-)) (50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 5mM  $\text{CaCl}_2$ ) を 20  $\mu$ l 加え、37 $^\circ\text{C}$  にてインキュベート (over night) した。

インキュベート後、20mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  を 50 $\mu$ l 添加し 20 分 sonication によって trypsin によって消化されたペプチドを抽出した。5% formic acid, 50% acetonitrile 溶液を 50 $\mu$ l 添加し 20 分 sonication し、ペプチド抽出を 3 回繰り返した。抽出したペプチド溶液は、超遠心器 (40,000g, 30min) 処理し、上清を回収し質量分析にもちいた。

3. ペプチド発現比較

In gel digestion により、各スライスから抽出したペプチドを、nanoLC (DiNa, KYA Technology,

Tokyo)と QSTAR® (quadrupole-Time of Flight-MS/MS (Q-TOF-MS/MS) Applied Biosystems Japan)にて MS 解析し、測定されたペプチドの質量、retention time および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同定をペプチドレベルでおこなった。

Step2 GeLCMS 法によるタンパク質の同定 (図1 参照) Step1 で使用したのと同じサンプルを Step 1 で取得したペプチドの質量、retention time を利用し MSMS 解析することでプリカーサーイオ

ンおよびフラグメントイオンの質量 data を集め、ProteinPilot software (Applied Biosystems)により蛋白質データベース検索し蛋白質の同定を行った。

Step3 Multiple Reaction Monitoring (MRM)による validation (図1 参照) Step 2 で得られた、MS および MS/MS の data を利用し、4000 Q TRAP LC/MS/MS システム (AppliedBiosystems)により MRM 解析し、タンパク質発現量の比較の validation を行う。

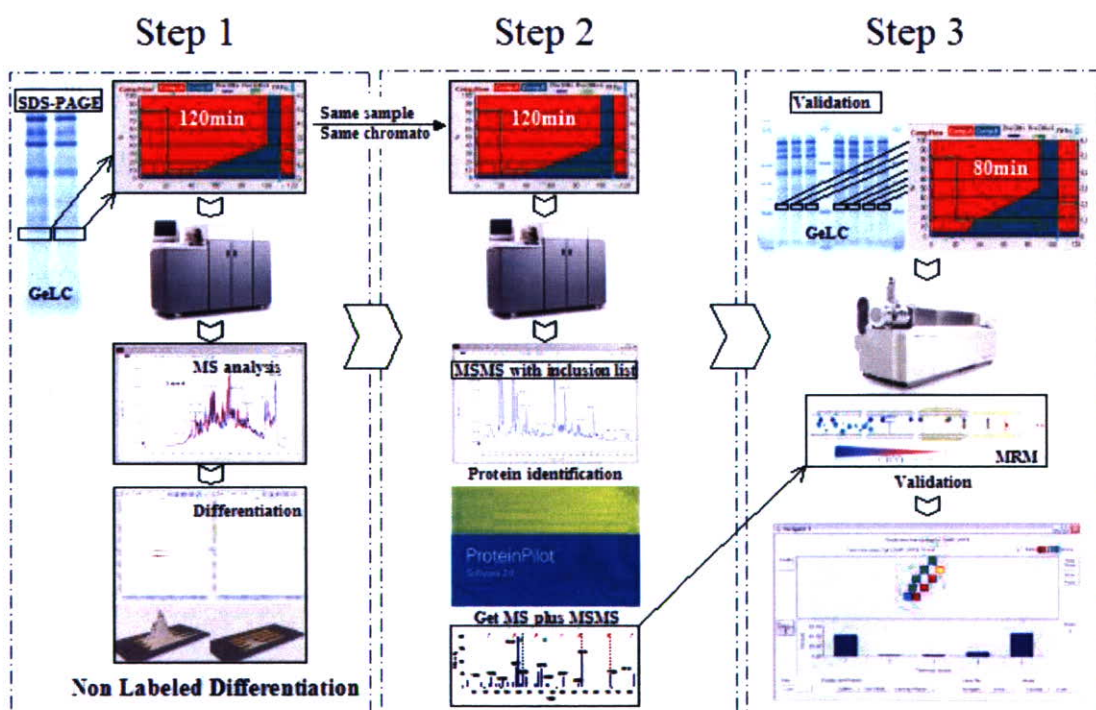


図1. 質量分析解析によるNon Label Quantitative differentiation の流れ

7) マグネタイトリポソームの作製  
10mg/ml (in CHCl<sub>3</sub>) のマグネタイト

10μl に 10mg/ml (in CHCl<sub>3</sub>・MeOH, ホスファチジルセリン: ホスファチヂ

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。

- 8) マグネタイトリポソーム結合タンパクの回収と再現性の確認  
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 (Amersham Biosciences, Tokyo) にて解析した。
- 9) ホスファチジルセリン (PS): ホスファチジルコリン (PC) の比率と結合タンパク質の変化の検討  
10mg/ml (in  $\text{CHCl}_3$ ) のマグネタイト 10 $\mu$ l に 10mg/ml (in  $\text{CHCl}_3 \cdot \text{MeOH}$ , ホスファチジルセリン: ホスファチジルコリンの混合比率を変化させた) 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。

#### (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. 結果

- 1) 健常人血漿を 100 人分、疾患群とし 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 $^{\circ}\text{C}$  に凍結保存した。
- 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 800 peaks/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。リポソームによる前処理後、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 2 a, b 参照)。検出されたバイオマーカー候補には 10000 Da 未満の分子が多く含まれていた。



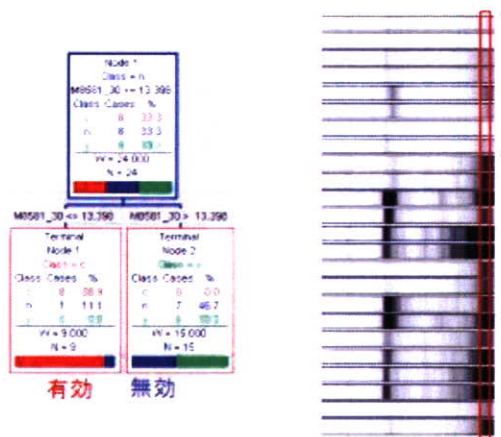


図 2 a. 治療効果をターゲットに得られた診断マーカー候補の一例

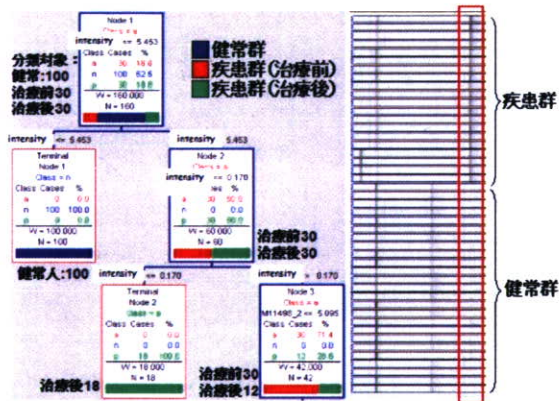


図 2 b. 治療前、治療後、健康人をターゲットに得られた診断マーカー候補の一例

3) GeLCMS 法によるタンパク質の同定  
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、約 300 種類のタンパク質が同定された (図 3)。

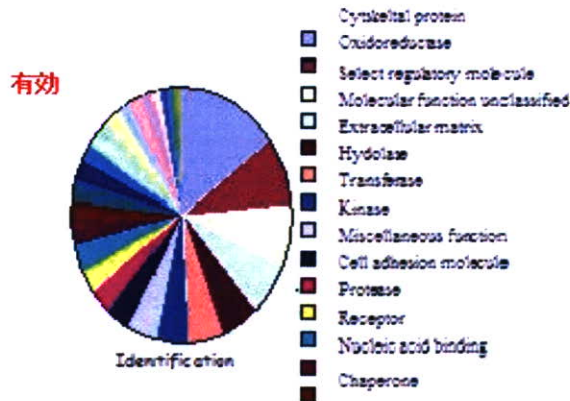


図 3 LBP 構成蛋白質の機能別分類

4) non-label GeLCMS based quantitative differentiation システムの構築  
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を構築した。複数のスペクトラムからなる LCMS データを、質量電荷比 ( $m/z$ ) および保持時間 (RT) を二軸とする平面に描出し、その強度を濃淡で示す手法であり、保持時間のずれを機器の調整およびサンプルの調整を厳格におこなうことによって複数サンプル間での無標識定量比較 non-label quantitative differentiation が可能となった。

5) マグネタイトリポソームを作製し以下を検討した。

a. 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 (図 4)、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。



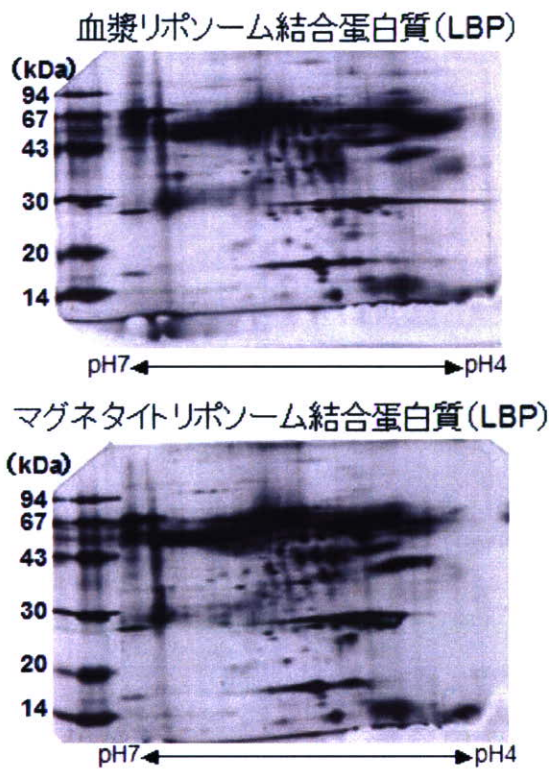


図 4 マグネタイトリポソームとリポソームに吸着する LBP の比較

b. 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 (図 5)。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。

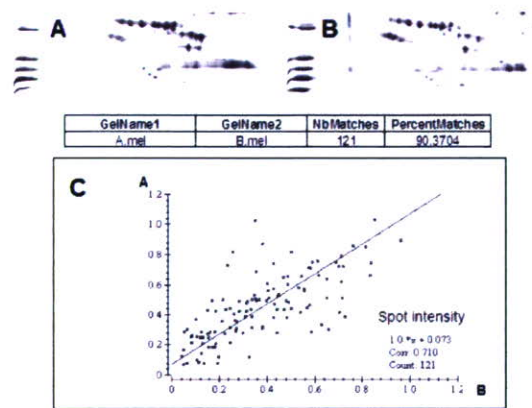


図 5 再現性の確認

c. 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 (図 6)。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。

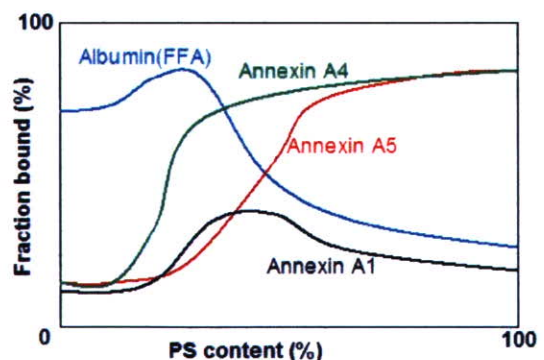


図 6 PS の混合比率と回収される LBP の変化

#### 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1ng/mlで存在しているサイトカインまでさまさま)。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、そのままでは血漿中の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。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、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血漿の前処理をおこなった。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 2mM の高い  $\text{Ca}^{2+}$  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。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(pmol 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。バイオマーカー候補を複数検出され、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られる。

#### 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

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
木村成寿・相馬仁・苗代康可・小海康夫	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	生物物理化学	50	231-6	2006
Naishiro Y, Suzuki C, Kimura M, Yamamoto M, Takahashi H, Sohma H, Hori T, Shinomura Y, Kokai Y, Imai K.	Plasma analysis of rheumatoid arthritis by SELDI	Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi	Jun;30(3)	145-50	2007
Hitoshi Sohma, Mami Yamaguchi, Kyoichi Matsumoto, Hirohito Honda, Yoshiyuki Amano, Yuka Mizue, Kokichi Kikuchi, Tetsu Maeda, Shozo Toyomasu, Masako Momma, Shinji Murakami, Yasuo Kokai	Elevation of plasma level of annexin A5 in Alzheimer's disease	10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders	July 16-20	145-51	2006

## 〔技術〕

## 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

## SUMMARY

Human plasma contains a numerous number of proteins that provide variable information reflecting to physiological and pathological conditions of human body. Some of such proteins have been expected for pathobiological markers for diagnosis and drug development for human diseases. To capture plasma proteins in a manner of high-through put, several ligands have been employed, though these systems are still required many improvements. In this report, we present a novel system using liposome as a ligand to capture a wide variety of plasma proteins. One hundred micro litter of plasma was incubated with liposome of multi-lamellar vesicle in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ . Proteins bound to liposome were then eluted in the presence of EGTA. A two-dimensional gel analysis revealed more than 150 proteins in one electrophoresis run in a range of pH 4–7 with a molecular weight between 100 kda to 30 kda. The pattern of silver-stained proteins showed reproducible with the same donor. Apparent differences were detected between the pattern under different pathologic conditions including healthy volunteer and that with patients with chronic inflammation. Taken together, the method using liposome might provide a useful biological ligand for plasma protein analysis and a novel system for proteomic approach combined with other chromatographic module.

Key words: liposome, biological ligand, plasma, proteomics.

## はじめに

血漿は、血液成分の一部として全身諸臓器を環流し、大循環を経て心臓にもどり、肺を通過してふたたび臓器に送られる。すなわち、種々の疾患において血漿は、臓器および病巣からの血液環流により直接に病巣からの蛋白質を大循環に運搬している。このように、血漿中の蛋白質は、障害臓器からの情報を蛋白質を介して直接もたらすことにより、病態マーカーを含んでいることが生理、病理学的な論拠として挙げられる。血漿は、体液のなかで蛋白質の種類と濃度およびそれを含む非蛋白質成分の構成に大きな特徴を有する。蛋白質成分については、血清アルブミンなどのきわめて濃度の高い蛋白質から、ホルモンなどの低濃度蛋白質より構成されている。蛋白質の種類としても、疎水性の強い蛋白質から親水性の蛋白質まで多様である。近年、

プロテオミクスの技術によって血漿には3000種類を超える蛋白質が存在することが示された<sup>1)</sup>。さらに、病気の種類によってこれらの蛋白質の種類と濃度が変化することは、ヒト血液生化学臨床検査によるデータが示しているところである。新たなバイオリガンドの出現は、それ以前のさまざまな応用系では検出しにくかった分野の視野を与えるという点で重要な分野である。プロテオーム解析技術は、短時間に pmol 以下の微量蛋白質の同定が可能であり、より広範な分子マーカー解析に向いている。この特性を利用して本研究で我々は初めて、脂質をリガンドとして用いることを試みた。

生体膜は、種々のリン脂質およびそれらの異なる組成と割合によって、機能特異的に発達した器官である。人工的に形成したリポソーム<sup>2)</sup>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ことができることから、酵素学、

Plasma proteomic analysis using liposome as a biological ligand.

Michitoshi Kimura, Hitoshi Sohma, Yasuyoshi Naishiro, Yasuo Kokai; 札幌医科大学医学部分子機能解析部門

Correspondence address: Yasuo Kokai; Department of Biomedical Engineering, Sapporo Medical University School of Medicine, S1W17, Chuo-ku, Sapporo, Hokkaido 060-8556, Japan.

Abbreviations: PBS, phosphate buffered saline; MLV, multilamellar vesicle; SDS, sodium dodecyl sulfate; IEF, isoelectric focusing; HPLC, high performance liquid chromatography; LBP, liposome binding protein.

(受付 2006年8月3日, 受理 2006年9月20日, 刊行 2006年12月15日)

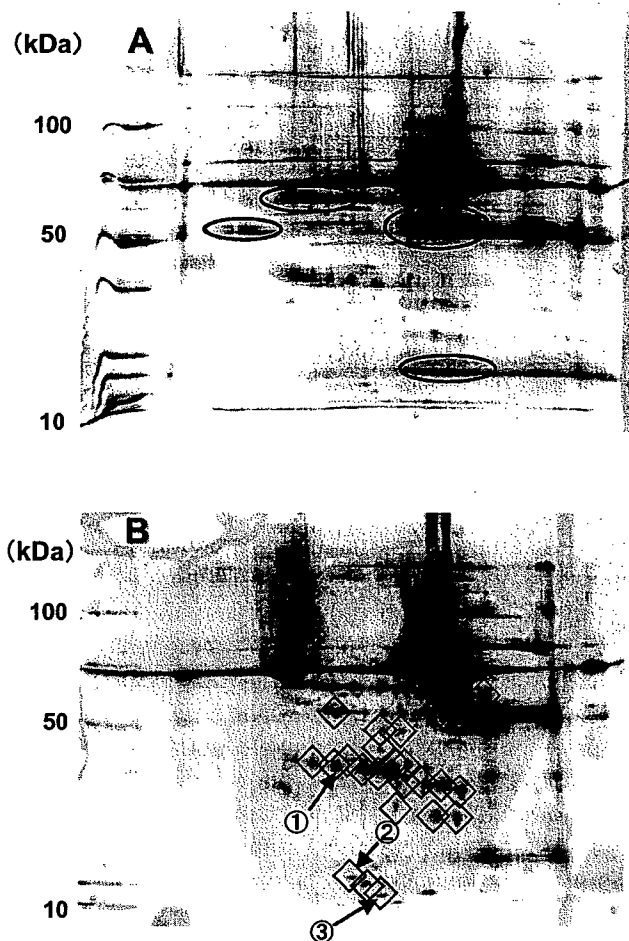


Fig. 1. Comparison of electrophoretic patterns with whole plasma proteins and liposome binding proteins by two dimensional gel electrophoresis.

Fifty microgram of whole blood plasma proteins (A) or liposome binding proteins (LBP) (B) are electrophoresed by two dimensional gel electrophoresis. Spots are visualized by silver staining. Diamonds indicate protein spots that showed an increased staining intensity in LBP compared to that with whole plasma proteins, whereas circles indicate protein spots that showed a decreased staining intensity in LBP compared to that with whole plasma proteins.

物性化学などの広い分野で検討されている。本研究では、リポソームが提供する膜構造の蛋白質への親和性を用いた網羅的な蛋白質の解析の可能性を検討し、血漿蛋白質解析を通じて病態マーカー探索<sup>3)</sup>への応用の可能性を検討した。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、細胞が何らかの蛋白質分泌を起こす可能性がある。その蛋白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<sup>4)</sup>。血液中には約2 mMの高いCa<sup>2+</sup>が存在しているため、リポ蛋白質や細胞膜と結合している可能性がある。本研究では、Ca<sup>2+</sup>依存的にリン脂質と相互作用する血漿蛋白質に注目した。正常人および炎症性疾患患者の血漿を用いた解析により、

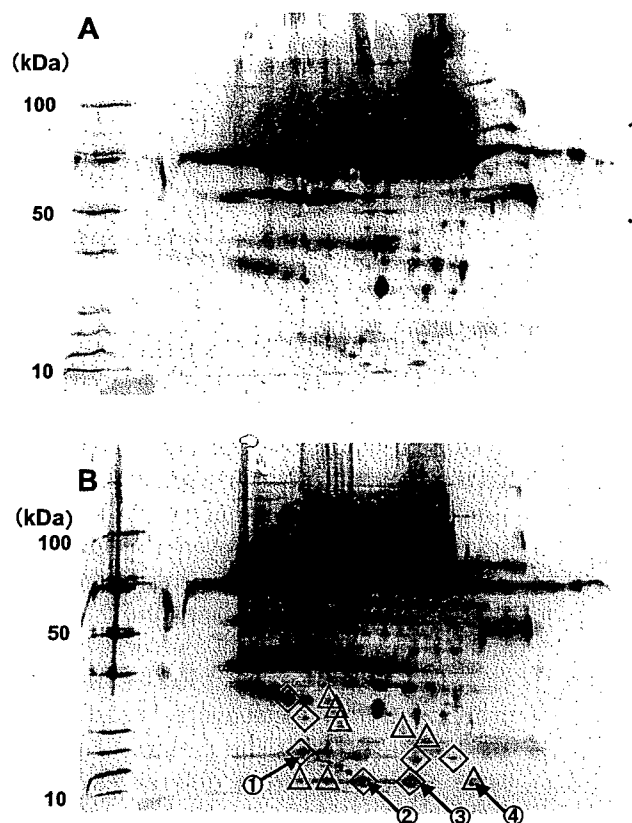


Fig. 3. Comparison of electrophoretic patterns of liposome binding proteins with plasma obtained from healthy volunteer (A) or malignant rheumatoid arthritis (MRA) (B) by two dimensional gel electrophoresis.

One hundred microgram of liposome binding proteins obtained from healthy volunteer (A) or malignant rheumatoid arthritis (MRA) (B) are electrophoresed by two dimensional gel electrophoresis.

Diamonds indicate protein spots that showed an increased staining intensity in MRA compared to that with healthy volunteer. Triangles indicate protein spots that showed unique spots in MRA compared to that with healthy volunteer.

現在までに報告されている病態マーカーが複数検出され、リポソームを用いた解析方法が血漿蛋白質のプロテオミクス解析に有用な可能性が示されたので報告する。

#### 材料および方法

1. 材料：試薬は特記されたもの以外はSIGMA社特級を用いた。
2. 血漿：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。得られた血液は、血漿分離し、血漿は-80°Cに凍結保存した。
3. リポソーム (Multilamellar Lipid Vesicle, MLV)：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 (10 mg/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。細胞膜に存在する酸性リン脂質 (PS) の含量が約10%である。今回はより単純な系を考え、リポソームの組成は10%PS



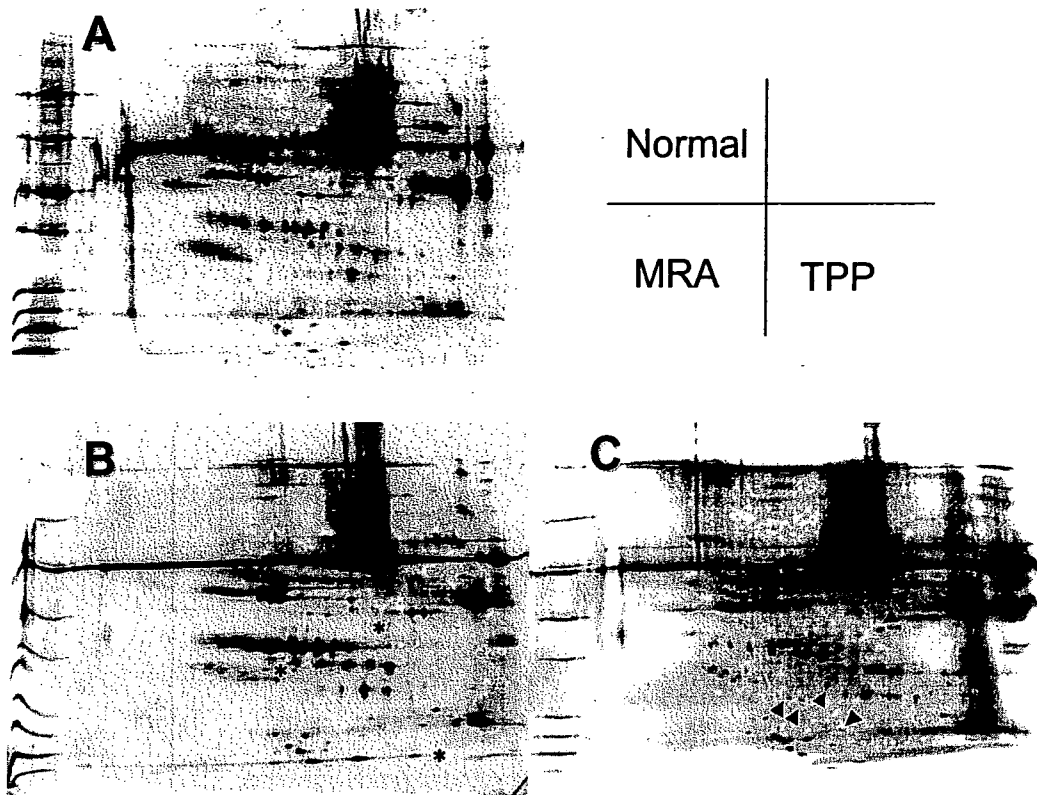


Fig. 2. Comparison of electrophoretic patterns of liposome binding proteins with plasma obtained from healthy volunteer (A), malignant rheumatoid arthritis (MRA) (B) and thrombocytopenic purpura (TPP) (C) by two dimensional gel electrophoresis.

Fifty microgram of liposome binding proteins obtained from healthy volunteer (A), malignant rheumatoid arthritis (MRA) (B) or thrombocytopenic purpura (TPP) (C) are electrophoresed by two dimensional gel electrophoresis. Distinct patterns among samples are evident in A, B and C. Asterisk indicates protein spot that is unique in MRA compared to that with healthy volunteer. Arrow head indicates protein spot that is unique in TPP compared to that with healthy volunteer.

と残りは主要な中性脂質である PC とした。その後、Buffer (50 mM Hepes (pH 7.5), 150 mM 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<sup>5)</sup> で作製した MLV 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 5 mg/ml とした。

4. 血漿蛋白質リポソーム結合: 100  $\mu$ l の血漿に終濃度 4 mM となるように EGTA を添加し 20,000 $\times$ 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> 15 mM 加え、PBS にて全量を 1 ml とし、4°C ローターにて 12 時間混和した。リポソームの添加量の増加によりリポソーム結合蛋白質 (LBP) 量は増加して行くことを確認している。今回は 500  $\mu$ g 添加した際、回収操作が容易で十分な蛋白質量を得ることができたので以後の実験は、この条件に従った。20,000 $\times$ g にて遠心後、20 mM Hepes (pH 7.5), 100 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> の Buffer にて洗浄し、10 mM EGTA にて LBP を溶出した。EGTA と CaCl<sub>2</sub> の添加量については、MLV への結合の Ca<sup>2+</sup> 親和性の違いによる分離等を目的とする場合重要であると思われる。しかし、今回、最初の試みとして Ca<sup>2+</sup> 依存的に MLV に結合しうる全ての蛋白質を

調べることを考えたので、この量を用いた。

5. 電気泳動: IEF は Amersham 社のドライストリップ (pH 4-7) 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%)<sup>6)</sup> を行った後、銀染色 (EZ stain Silver キット (ATTO, Tokyo)) し、Image Master 2D Platinum (Amersham#Biosciences, Tokyo)<sup>7)</sup> にて解析した。得られたスポットを回収し、trypsin による in gel digestion<sup>8)</sup> を行った。

6. 質量分析: in gel digestion にて得られたペプチドを nanoLC (DiNa, KYA Technology, Tokyo) と LCQ (Thermo Electron Co., Waltham, Massachusetts, USA) による LC/MS にて解析した。得られたデータは MASCOT (Matrix Science, Tokyo)<sup>9)</sup> を用いて SWISS prot, NCBI nr 蛋白質データベース検索<sup>10)</sup> をした。

## 結果

### 1. 血漿総蛋白質と LBP との比較

正常人全血漿蛋白質 (Fig. 1-A) および LBP (Fig. 1-B) を二次元電気泳動した結果、リポソームに特異的に結合することにより分離解像度が上がった蛋白質のスポットを◇で

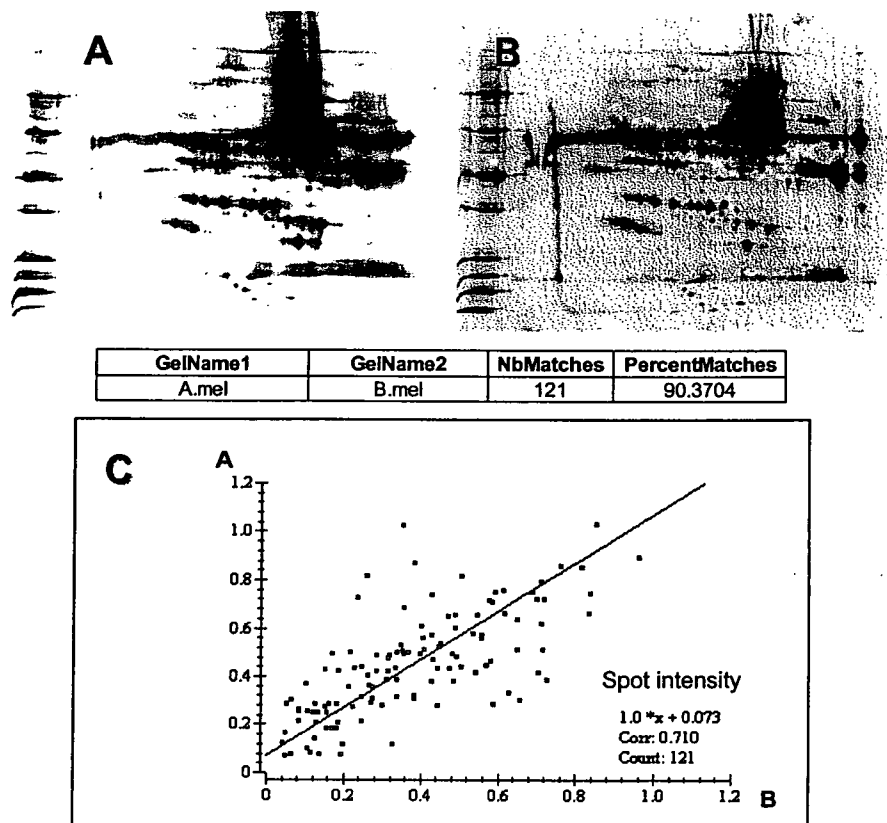


Fig. 4. Comparison of electrophoretic patterns of liposome binding protein obtained from the same plasma by independent maneuver.

Fifty microgram of liposome binding proteins obtained from healthy volunteer (A) or (B) are electrophoresed by two dimensional gel electrophoresis. The spot patterns are highly reproducible as indicated in C.

示した。全血漿中に見られ、LBPに見られないことからリポソームと結合していないと考えられる蛋白質のスポットを○で囲い示した。得られた蛋白質のスポットを質量分析にて解析した結果、①は Haptoglobin β 鎖、②は Apolipoprotein A1、③は Haptoglobin α 鎖であった。

### 2. 正常人血漿と炎症性疾患患者血漿における LBP の比較

正常人及び、炎症性疾患患者より得られた LBP を用い二次元電気泳動を行った (Fig. 2)。正常人、悪性関節リウマチ (MRA)、血小板減少性紫斑病 (TPP) において疾患により異なった電気泳動像が得られた。また正常人、MRA 患者血漿から LBP を得て二次元電気泳動を行った (Fig. 3)。正常人血漿よりも炎症性疾患 (MRA) 患者血漿において蛋白質量が増大、また炎症性血漿に特有に見られるスポットが確認できた。炎症性血漿において蛋白質のスポットが増強したものは◇で、特有に見られたものは△で示した。質量分析にて解析した結果、①は Apolipoprotein A1、②、③、④は Haptoglobin α 鎖であった。

### 3. 同一血漿由来の 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. 4)。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<sup>11)</sup>。

### 4. カルシウム非依存性 LBP の比較

カルシウム依存性 LBP を得た後、リポソームに残る蛋白質を検出するため、1%SDS にて蛋白質 (カルシウム非依存性 LBP) を溶出し、電気泳動を行った (Fig. 5)。全てのサンプルにおいて高分子量から低分子量の多くの蛋白質のバンドが見られ、カルシウム非依存的にリポソームに結合する多数の蛋白質が存在することを確認した。

### 考 察

本研究の結果から、

1. リポソームは血漿蛋白質の一定の種類に対して特異性を有する結合スペクトラムを有すること
2. LBP は正常と疾患によって異なる可能性があること
3. 現在までにモチーフまたはドメインとして報告されているカルシウム結合性蛋白質以外の結合が見られたこと

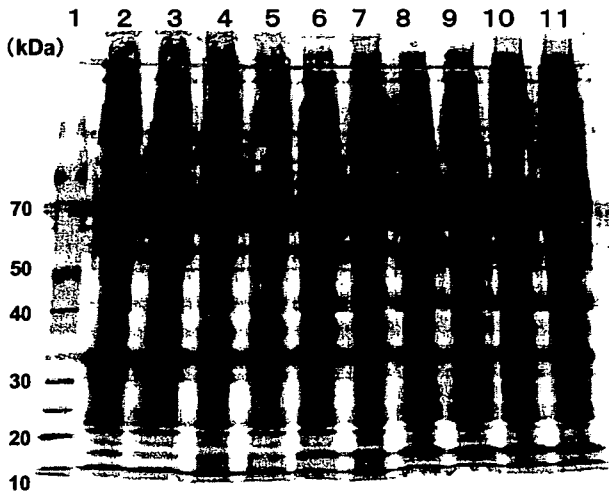


Fig. 5. Electropherogram of liposome binding protein that was not eluted in the presence of EGTA.

Fifty microgram of liposome binding proteins that were not eluted in the presence of EGTA obtained from healthy volunteer, thrombocytopenic purpura (TPP) or malignant rheumatoid arthritis (MRA) are electrophoresed by one dimensional gel electrophoresis.

- 1; marker
- 2, 3; healthy volunteer 1
- 4, 5; healthy volunteer 2
- 6, 7; healthy volunteer 3
- 8, 9; thrombocytopenic purpura (TPP)
- 10, 11; malignant rheumatoid arthritis (MRA)

が明らかとなった。これらの結果は、血漿には一定の条件のもとにリポソームに結合する蛋白質群が存在することを示す。リン脂質二重膜に結合する結合モチーフとして EF hand や Endonexin fold, C2 ドメインが知られている。Endonexin fold は, Type II  $Ca^{2+}$  binding-site と呼ばれ Annexin などに代表される結合モチーフで,  $Ca^{2+}$  存在下に PS と結合する。今回の実験では示さなかったが, 我々はリポソームが Annexin family の一部に結合することを同定している。近年, 種々の親和性抗体を用いた血漿中の高濃度蛋白質の除去<sup>12)</sup> が, 血漿プロテオミクス解析の前段階に導入されている。しかし, 血清アルブミンの除去が血漿プロテオミクス解析に影響を与えるという報告もある<sup>13)</sup>。血漿中の血清アルブミンは約 6 割を占め微量成分を分析する妨げになる。今回の実験で LBP の調製に使用した血漿量は血漿のみを二次元電気泳動に使用したときの約 100 倍量だが, 二次元電気泳動で認められた血清アルブミン量は, ほぼ同一であった (Fig. 1)。そのことから LBP 法は血清アルブミンを不完全だが除く効果があり, 更に低分子の蛋白質は LBP 法を用いることで, 二次元電気泳動法で分析可能な量にまで増強した。すなわち LBP 法は血清アルブミンによる解析妨害を減らし, 微量蛋白質を抽出するために有用な方法である。また今回, データを示してはいないが複数例の正常 LBP において, 同じ傾向の電気泳動パターンを得ることができ, MRA 患者 LBP とは異なったパターンだった。患者 LBP に

は炎症性疾患に關与する蛋白質の Haptoglobin (190 ~ 1700  $\mu\text{g/ml}$ ), Apolipoprotein A1 (男: 1190 ~ 1550  $\mu\text{g/ml}$ , 女: 1260 ~ 1650  $\mu\text{g/ml}$ ) (Haptoglobin, Apolipoprotein A1 は血漿蛋白質に占める割合<sup>14)</sup> としては 1% 程の蛋白質) が多く見られた。また正常 LBP をトリプシン消化後 LC-MS にて解析した結果, 血漿中に占める蛋白質の濃度が 1% に満たない Vitamin D binding protein (200 ~ 550  $\mu\text{g/ml}$ ), Ceruloplasmin (210 ~ 370  $\mu\text{g/ml}$ ), Transthyretin (220 ~ 400  $\mu\text{g/ml}$ ), Apolipoprotein C II (男: 18 ~ 46  $\mu\text{g/ml}$ , 女: 15 ~ 38  $\mu\text{g/ml}$ ), Apolipoprotein C III (男: 58 ~ 100  $\mu\text{g/ml}$ , 女: 54 ~ 90  $\mu\text{g/ml}$ ), Heparin cofactor 2 (100  $\mu\text{g/ml}$ ), Antithrombin III (150 ~ 310  $\mu\text{g/ml}$ ) や, さらに Interleukin などと同レベルの濃度である Kininogen-1 (10 ~ 20  $\text{pg/ml}$ ) などの微量蛋白質が LBP 中に検出されている。このことより血漿蛋白質解析に本システムが有用であることが示唆された。100  $\mu\text{l}$  から短時間で簡便に特定の蛋白質を結合精製できる点は, 血漿プロテオミクスにおいてきわめて重要な特徴を有すると考えられる。今後, リポソームに結合する分子の網羅的な同定とともに, データベースの構築が重要と考えられる。一方血清アルブミンは, 含量は少ないが今回検討したサンプルのすべてに検出された。しかし血清アルブミンは, 両親媒性の性質を持つため特異的結合とは考えにくい。リポソーム結合分画に一定量の血清アルブミンや Ca 結合ドメインを保有していない Haptoglobin, Apolipoprotein A1 が回収されることの意義は, 今後の検討課題であり, LBP を網羅的に同定するなどして, その結合スペクトラムを決定する必要があると考えられる。

## 文 献

- 1) Omenn GS, States DJ, Adamski M, Blackwell TW, Menon R, Hermjakob H, Apweiler R, Haab BB, Simpson RJ, Eddes JS, Kapp EA, Moritz RL, Chan DW, Rai AJ, Admon A, Aebersold R, Eng J, Hancock WS, Hefta SA, Meyer H, Paik YK, Yoo JS, Ping P, Pounds J, Adkins J, Qian X, Wang R, Wasinger V, Wu CY, Zhao X, Zeng R, Archakov A, Tsugita A, Beer I, Pandey A, Pisano M, Andrews P, Tammen H, Speicher DW, Hanash SM. Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. *Proteomics* 2005;5(13): 3226-3245.
- 2) Torchilin VP, Weissig V eds. Oxford University Press Preparation of liposomes in Liposomes, second edition, A Practical Approach, 2003:3-29.
- 3) Shen Y, Kim J, Strittmatter EF, Jacobs JM, Camp DG 2nd, Fang R, Tolie N, Moore RJ, Smith RD. Characterization of the human blood plasma proteome. *Proteomics* 2005; 5(15):4034-4045.
- 4) Trump BF, Berezsky IK. Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J* 1995;9(2):219-228.

- 5) Sohma H, Creutz CE, Gasa S, Ohkawa H, Akino T, Kuroki Y. Differential lipid specificities of the repeated domains of annexin IV. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1546(1):205-215.
- 6) O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975;250(10):4007-4021.
- 7) Appel R, Hochstrasser D, Roch C, Funk M, Muller AF, Pellegrini C. Automatic classification of two-dimensional gel electrophoresis pictures by heuristic clustering analysis: a step toward machine learning. *Electrophoresis* 1988;9(3):136-142.
- 8) Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996;68(5):850-858.
- 9) Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 1999;20(18):3551-3567.
- 10) Mann M, Wilm M. Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags. *Anal Chem* 1994;66(24):4390-4399.
- 11) Mitchell A, Power JF. An empirical investigation into the dimensions of run-time coupling in java programs. *ACM International Conference Proceeding Series; Vol. 91, Proceedings of the 3rd International Symposium on Principles and Practice of Programming in Java 2004, Las Vegas, Nevada 2004 June 16-18.*
- 12) Echan LA, Tang HY, Ali-Khan N, Lee K, Speicher DW. Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma. *Proteomics* 2005;5(13):3292-3303.
- 13) Granger J, Siddiqui J, Copeland S, Remick D. Albumin depletion of human plasma also removes low abundance proteins including the cytokines. *Proteomics* 2005;5(18):4713-4718.
- 14) Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 2002;1(11):845-867. Review. Erratum in: *Mol Cell Proteomics* 2003;2(1):50.

## 第34回総会ポスター賞受賞記念論文

総説 (推薦論文)

推薦者: 日本臨床免疫学会理事, 第34回総会長 尾崎承一

## 血漿のプロテオミクス解析

苗代康可<sup>\*1,\*2</sup>, 鈴木知佐子<sup>\*2</sup>, 木村成寿<sup>\*1</sup>, 山本元久<sup>\*2</sup>, 高橋裕樹<sup>\*2</sup>  
相馬 仁<sup>\*1</sup>, 堀 司<sup>\*1,\*3</sup>, 篠村恭久<sup>\*2</sup>, 小海康夫<sup>\*1</sup>, 今井浩三<sup>\*4</sup>

## —Plasma analysis of rheumatoid arthritis by SELDI—

Yasuyoshi NAISHIRO<sup>\*1,\*2</sup>, Chisako SUZUKI<sup>\*2</sup>, Michitoshi KIMURA<sup>\*1</sup>, Motohisa YAMAMOTO<sup>\*2</sup>, Hiroki TAKAHASHI<sup>\*2</sup>, Hitoshi SOHMA<sup>\*1</sup>, Tsukasa HORI<sup>\*1,\*3</sup>, Yasuhisa SHINOMURA<sup>\*2</sup>, Yasuo KOKAI<sup>\*1</sup> and Kohzoh IMAI<sup>\*4</sup><sup>\*1</sup>Department of Biomedical Engineering, Sapporo Medical University School of Medicine<sup>\*2</sup>First Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine<sup>\*3</sup>Department of Pediatrics, Sapporo Medical University School of Medicine<sup>\*4</sup>President, Sapporo Medical University School of Medicine

(Received March 23, 2007)

## summary

To identify protein biomarkers linking to disease activity and treatment responses of patients with rheumatoid arthritis (RA), proteomic study using mass spectrometric analysis of plasma proteins was performed. Proteomic profiling technologies can simultaneously resolve and analyze multiple proteins in plasma. Evaluation of multiple proteins of the plasma will be essential to discover protein biomarkers. In this study, we used protein chip surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry approach (SELDI-TOF MS). Through differential profiling of plasma proteins, we selected two prospective candidate biomarkers. One mass spectrometric peak distinguished patients with RA from healthy controls was transthyretin (TTR) and the other distinguished inactive patients with RA from patients with active RA was Serum Amyloid A (SAA). This study demonstrates that proteomic profiling using mass spectrometry of plasma greatly facilitates global discovery and verify clinically relevant sets of disease biomarker directly links to disease activity and treatment responses.

**Key words**—Rheumatoid Arthritis; Proteomics; SELDI-TOF MS; Plasma; Liposome

## 抄 録

プロテオミクスの技術が、近年、非常に発展してきている。プロテオミクス解析は複雑な、多種類のタンパク質混合物のプロファイルを一挙に解析することができる。さらに発現量のみではなく、タンパク質の修飾状態までも検出可能である。とくに、血漿のような、多くのタンパク質を含む、複雑なサンプルの解析に有効であると考えられ、関節リウマチにおける診断、疾患活動性および治療効果判定に有用と思われるバイオマーカーの検索が行われている。本稿では血漿のプロテオミクス解析に関する有用性、問題点を、関節リウマチを中心に、われわれの研究報告を含め解説する。

## 1. はじめに

関節リウマチ (以下 RA) は世界人口の約1%と罹患率の高い疾患であり、患者本人のQOLの低下やそれに伴う社会的損失と社会経済にも大きな影響

を及ぼす。しかしながら、生物学的製剤が使用可能となり、従来の治療薬では考えられないほどの画期的な効果が得られており、わが国においてもその有効性が証明されつつある。ただし、年間の薬剤費が高価であり、結核をはじめとした感染症の副作用もあるといった問題点がある。そこで生物学的製剤をより効率よく利用するためのバイオマーカーの開発が希求されている。今回、我々がRAを対象に実際に行ったマーカーの検索を例に、血漿のプロテオミクス解析について解説する。

\*1札幌医科大学教育研究機器センター分子機能解析部門

\*2札幌医科大学内科学第一講座

\*3札幌医科大学小児科学講座

\*4札幌医科大学