

200809006A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

疾患関連創薬バイオマーカー探索研究

平成 20 年度 総括・研究分担報告書

研究代表者 山西 弘一

平成 21(2009)年 4 月

# 目 次

I. 総括研究報告書	
創薬バイオマーカー探索研究 .....	1
山西 弘一	
II. 研究分担者報告書	
1. 疾患関連たんぱく質の解析基盤の研究 .....	40
堤 康央	
2. 循環器疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の研究 .....	57
寒川 賢治	
高血圧、心循環器系疾患に関する微量たんぱく質解析技術の研究	
南野 直人	
3. 認知症等の精神・神経疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の研究 ...	61
高坂 新一	
4. 疾患関連たんぱく質の解析技術の向上と確立 .....	64
下田 智久	
5. iTRAQ 法に関する微量たんぱく質解析技術の研究 .....	75
中山 敬一	
6. 創薬バイオマーカー探索研究基盤の確立とその活用 .....	80
平野 久	
7. 疾患関連創薬バイオマーカー探索研究 .....	88
山田 哲司	

## 疾患関連創薬バイオマーカー探索研究

研究代表者 山西弘一 独立行政法人医薬基盤研究所 研究所長

### 研究要旨

本研究は、我が国におけるがん、糖尿病、認知症等の代表的な疾患について、健常人と患者との間のたんぱく質発現の変動を質的・量的に評価することで、発現変動しているたんぱく質を探索し、この中から創薬バイオマーカーあるいは疾患バイオマーカーとなる『たんぱく質』を解析・同定するための基盤技術を開発することを目指したものであり、同時に、『疾患の発症や悪化、治癒に関わるたんぱく質』を有効活用し、画期的創薬、医療技術開発に資する研究基盤技術を開発しようとするものである。

本年度は、ヒト疾患試料等を用いて、以下の研究を実施したので報告する。

- ① プロテオミクス研究で得られる膨大な情報を創薬研究に有効活用するための基盤技術開発を目的に、蛋白質の機能解析に最も有用で不可欠なモノクローナル抗体を利用し、創薬バイオマーカー蛋白質を効率よく絞り込む方法「抗体プロテオミクス技術」の確立を進めた。本技術は、プロテオミクス研究によって同定される多数の疾患関連蛋白質に対して、独自に構築したファージ抗体ライブラリ技術を駆使することにより僅か数週間で特異抗体を網羅的に作製し、更に、得られた抗体を組織マイクロアレイ解析に適用することで、多症例の臨床検体において候補蛋白質を一挙にバリデーションを可能とするものである。本年度は、「抗体プロテオミクス技術」の最適化を目的に、乳がんを対象疾患として、発現変動蛋白質の同定と、それらに対する抗体の網羅的取得を試みた。種々の検討の結果、乳がん細胞株において発現変動している蛋白質を2D-DIGE/MS解析により20種類同定すると同時に、ファージ抗体ライブラリを用いることで、それらに対する特異抗体を数週間で得ることができた。

また一方、各種難病に対する有効な診断法・治療法の開発に資する有用なバイオマーカー探索を目的に、自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス（SLE）を解析対象として、患者血清を利用したプロテオミクス解析により自己抗体／抗原を同定しうる方法の確立を試みた。血管内皮細胞 HUVEC の二次元電気泳動と SLE 患者血清を用いたウェスタンブロット、および MS 解析により、SLE の新規自己抗体として抗アルドラーゼ A 抗体を同定することができた。SLE 患者において、この抗アルドラーゼ A 抗体を測定することにより、従来の検査方法に比べて、より感度で特異性の高い検査を行うことができると考えられた。また、アルドラーゼ A は、腎障害を示す SLE 患者にて高い陽性率を示したことから、腎障害を伴う SLE のマーカーとなり得るものと期待された。（堤）

- ② 循環器系疾患の病態、治療、予後などを正確に評価可能なバイオマーカーとなるたんぱく質やペプチドを発見するためには、微量の対象を高感度に分離、検出し構造解析できるシステムとともに、血液などの試料から高濃度のたんぱく質を除去し、微量たんぱく質などの分解を抑制して再現的に濃縮する前処理方法の確立が必須である。ナノ液体クロマトグラフィーや質量分析計の高感度、高精度化により前者の目的はかなり達成されつつあるが、微量のたんぱく質や

ペプチドを解析可能とする前処理方法については未開拓な領域が大きいため、本年度の研究では血漿試料を主たる対象に方法論の開発を目指した研究を実施した。(寒川・南野)

- ③ 本研究では神経変性疾患（認知症、パーキンソン病など）の治療成績向上を行い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、患者由来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、その臨床的応用を図ることを目的とした。これまでの研究でプールした髄液試料を用いた絞り込みで中枢神経特異的は多数の蛋白質を同定し髄液使用の有用性を確認できたことを踏まえ、個々の患者でのプロテオーム解析を可能にするための微量測定法の前処理条件を詳細に検討した。また、神経変性疾患の誘因として重要な酸化ストレスについてその影響を髄液試料で検出可能にするための技術開発を開始し、脱ユビキチン化酵素 UCH-L1 の酸化修飾体がパーキンソン病原因変異体である I93M UCH-L1 に類似の性状を示し、chaperone 介在型オートファージに影響する可能性を示した。(高坂)

- ④ 平成 19 年度までは、主に cICAT 法を使用して様々な疾患の血清を用いて解析を行ってきたが、その間にも、技術の進歩めざましく、近年では cICAT 法に代わって iTRAQ 法が主流になりつつある。そこで、本研究では、iTRAQ 法での解析に当たって、本施設に現有する機器での解析プロトコルの検討を行い、解析機器の比較を含め、血清を使用した解析方法の確立を目的として検討を行った。

また、血清とは異なり、脳脊髄液(CSF)のように、たんぱく質含量が少ない試料での解析を可能とするための解析方法の検討を行う事としたが、それに先立ち、前年度で行われた結果との再現性の確認と試料の前処理操作での影響要因の検討を行った。なお、報告書は前半の内容と後半の内容を別々にまとめて記載した。(下田)

- ⑤ ヒト生体試料からのバイオマーカー探索のためには高感度に多数のたんぱく質の同定・定量を行うシステムの開発が必須である。われわれは isobaric tag for relative and absolute quantitation (以下、iTRAQ) を用いてたんぱく質修飾情報の網羅的取得方法のための基盤技術開発を行うため、メーカー推奨の標準プロトコルを改変し、より効率的なシステムの開発を行った。また、その技術を応用してリン酸化たんぱく質の網羅的解析技術開発を目指し、その基盤技術の検討を行い、良好な結果を得た。(中山)

- ⑥ 質量分析装置(MS) 4機種を用いて iTRAQ 標識ペプチドを分析し、各機種で 1,554~1,834 種類のタンパク質を同定した。すべての装置で共通して検出されるタンパク質の数はかなり少なく、特定の装置でのみ検出されるタンパク質が多かった。4機種により全部で 3,570 種類のタンパク質を検出・同定することができた。この結果は、より網羅的にタンパク質を解析するためには複数種の MS を用いる必要があることを示している。次に、多数の微量タンパク質を MS で検出・同定するため、血漿中の高濃度タンパク質を効率的に低減する方法を検討した。その結果、中空糸膜カラムにより低減すれば、MS によって最も多数のタンパク質が同定できること、また、抗体アフィニティーカラムを用いれば、最も簡便に高濃度タンパク質を低減できることがわかった。一方、iTRAQ/MS/MS 等を用いて検出された卵巣明細胞腺癌関連タンパク質のうち、アネキシン IV (ANX4) について、抗体、siRNA などを用いてバリデーションを行った結果、ANX4 を診断マーカーや創薬ターゲットとして利用できる可能性があることが明らかになった。(平野)

- ⑦ 国立がんセンターで臨床検体の定量的なタンパク質発現の網羅的解析に特化して開発された 2DICAL (2 Dimensional Image Converted Analysis of Liquid Chromatography and Mass

Spectrometry)法はハイスループットなショットガンプロテオミクス手法である。本年度は切除不能膵がん患者血漿を用い、ゲムシタピンによる化学療法副作用マーカーを同定した。2DICALではタンパク質検体を同位元素で標識することなく、1台のLC-MSで月間約100症例の定量解析可能であり、統計学的に十分な症例数の解析が必要な臨床プロテオーム研究に適していた。プロテオームリサーチセンターにこの手法を導入することで新規バイオマーカーの開発が促進されることが期待される。(山田)

#### 研究代表者

山西弘一 独立行政法人医薬基盤研究所  
理事長

#### 研究分担者

堤 康央 独立行政法人医薬基盤研究所  
創薬プロテオミクスプロジェクトリーダー

寒川賢治 国立循環器病センター研究所  
所長

南野直人 国立循環器病センター研究所  
部長

高坂新一 国立精神・神経センター神経研究所  
所長

下田智久 財団法人 ヒューマンサイエンス振  
興財団 理事長

中山敬一 九州大学生体防御医学研究所  
教授

平野 久 横浜市立大学先端医科学研究センタ  
ー 副センター長・  
大学院国際総合科学研究科生体超分  
子科学専攻教授

山田哲司 国立がんセンター研究所  
化学療法部 部長

ジェクトなどのように、たんぱく質全般の基本構造と機能との連関を解析する「たんぱく質からのアプローチ」に加え、患者と健常者との間のたんぱく質の質、量の違いを時空間的に評価する「疾患からのアプローチ」により、創薬ターゲットや医薬品シーズ、疾患マーカーを同定することが急務となっている。

このような疾患プロテオミクス研究に基づいた創薬(プロテオーム創薬)への期待と注目が国際的・学際的に集約されてきた背景として、ゲノムシーケンス研究から判明した約2万2千種の遺伝子に比して、膨大とも言える10万種以上にもものぼるたんぱく質、特に解析困難であった巨大分子量のたんぱく質に対しても、高性能質量分析機器の開発および「iTRAQ法」、「ショットガン法」などの網羅性の高い新規開発などにより大規模かつ包括的なハイスループット解析が可能となり、「疾患からのアプローチ」が昨今の技術革新により現実的になったことが挙げられる。事実、スイスやドイツ、米国などの欧米諸国は、この「疾患からのアプローチ(疾患プロテオミクス)」に国家プロジェクトとして、大量の予算を投入し、今まさに着手し始めている。

以上の我が国にとって重要かつ深刻な状況を鑑み、我が国としても、高血圧、糖尿病、がん、痴呆症、炎症性・アレルギー性免疫疾患などを対象として、新規治療薬・診断薬の開発や新規医療技術・治療法の確立などに必須となる疾患関連たんぱく質を有効活用できる基盤技術の開発研究を産官学連携により推し進め、国際競争力に満ち溢れた画期的な医薬開発を支援し、日本における製薬企業などの振興・発展を図ることが最重要となる。

以上の背景のもと、本研究は、我が国の主要疾

#### A. 研究目的

医薬品開発に際して、創薬ターゲットや医薬品シーズ、疾患マーカーとなる疾患関連たんぱく質の発見とその知的財産権の確保は、今後の医薬品産業の発展に必要な不可欠であり、ライフラインと位置付けられる。従って、近年ますます激化しつつある新薬開発や新規治療技術の創出において、欧米諸国等との国際競争に打ち勝つためには、疾患関連たんぱく質の発見とその知的財産権の確保に向けた作業を加速させることが重要となってきた。そのためには、タンパク 3000 プロ

患などに関して、患者と健常人との間の発現たんぱく質の変動を、質的、量的、時空間的に評価することにより、疾患関連たんぱく質の探索のための技術開発の推進と普及を図るとともに、探索されてきた数多くの疾患関連たんぱく質群の中から医薬品シーズ・創薬ターゲット・疾患マーカーとなり得るたんぱく質を絞り込み、これらを新規医薬品の創出等に有効活用していくための基盤技術を確認し、我が国独自の知的財産を創出しようとするものである。

本研究の成果は、我が国の創薬研究に係る基盤的な技術レベルを飛躍的に向上させるため、遺伝子解析では欧米に出遅れたものの、日本の医薬品産業の国際競争力を強化し、我が国はもとより、世界の患者に質の高い医療を提供するものと考えられる。

以上の観点から本研究では、疾患関連たんぱく質解析研究を総合的に推進していくため、疾患組織・細胞などの臨床検体から、疾患関連たんぱく質の探索・同定と、その中から医薬品シーズ・創薬ターゲットとなり得るたんぱく質の絞り込みを効果的かつ効率的に行うための研究基盤技術の開発に加え、医薬品シーズ・創薬ターゲットとなり得るたんぱく質の有効活用法に関する研究を行い、疾患の予防・治療・診断方法の確立や画期的医薬品の開発に資することを旨とし、以下の研究を行った。

## B. 研究方法

### B-1. 抗体プロテオミクス技術の最適化

#### (1) 細胞

ヒト乳がん細胞株 (SKBR3) とヒト不死化乳腺細胞 (184A1) は American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。SKBR3 細胞の培養には、10%ウシ胎児血清 (FBS) 及び 1% Antibiotic-Antimycotic Mixed Solution (Ab: Nacalai Tesque) を含む McCoy's 5a 培地 (Sigma) を、184A1 細胞の培養には乳腺上皮細胞培地 Kit (TAKARA) を用いた。

#### (2) 二次元ディファレンシャル電気泳動 (2D-DIGE)

ディッシュ上で培養した乳がん細胞株 SKBR3 と乳腺上皮細胞株 184A1 を、細胞溶解液 (7 M urea、2 M thiourea、4% CHAPS、10 mM Tris-HCl (pH 8.5)) で溶解し、2D Quant Kit (Amersham) を用いて蛋白質の濃度を測定した。乳腺細胞、乳がん細胞由来蛋白質、および内部標準用として各細胞由来蛋白質の等量混合サンプル各 50 µg を、それぞれ 400 pmol のラベル化試薬 Cy3、Cy5、Cy2、(Amersham) と混合し、氷上で 30 分間反応させ、その後 10 mM lysine を加え、氷上で 10 分間静置することで反応停止させた。標識されたサンプルを全て混合し、sample buffer (2% DTT、2% pharmalyte (Amersham Biosciences)、7 M urea、2 M thiourea、4% CHAPS) で 450 µl にメスアップした。一方、二次元電気泳動後に蛋白質を回収するためのピックゲル用に、ラベル化しない蛋白質サンプルも同様に混合調製した。等電点泳動専用ホルダーにサンプルを注入して、IPG-gel (pH 5-6) スリップ (Amersham) を入れ、乾燥防止用オイルを重層した後、泳動を行った。泳動終了後、IPG-gel を平衡化 buffer A (Tris-HCl (pH 6.8)、6 M urea、30% glycerol、2% SDS、0.002% BPB、10 mg/ml DTT) と平衡化 buffer B (Tris-HCl (pH 6.8)、6 M urea、30% glycerol、2% SDS、0.002% BPB、25 mg/ml iodoacetamide (Sigma)) に各 15 分間浸し、平衡化を行った。二次元目泳動には、後のステップでゲルの溶解が可能な SDS-PAGE 用ゲル (10% polyacrylamide and 2.7% N,N'-diallyltartardiamide gels) に

IPG-gel スリップをセットし、アガロースで封入後、電気泳動槽 ETTAN DALSIX Electrophoresis System (Amersham) を用いて、2次元目の電気泳動を行った。定量解析用ゲルはそのまま蛍光スキャンを行い、ピック用ゲルは Deep Purple Total Protein Stain を用いて一晩染色し、脱色液により脱色を行った後にスキャンに供した。解析には、Typhoon scanner、および ETTAN DIGE softwares を使用し、スポットピックには ETTAN Spot Picker (Amersham) を使用した。ファージ抗体作製用の

抗原蛋白質抽出には、ピックしたゲルに 88 mM NaIO<sub>4</sub>を加えて室温で 30 分インキュベーションすることでゲルを溶解し、蛋白質を抽出した。

### (3) MS解析

ピックしたゲル片に 100  $\mu$ l の脱色液 (25 mM ammonium bicarbonate (Nacalai Tesque) / 50% acetonitrile (Nacalai Tesque)) を加え、室温で 10 分振とうさせた後、液を除去することで脱色した。続いて 200  $\mu$ l の acetonitrile を加え、ゲル片が白濁した後取り除き、遠心濃縮器

(CENTRIFUGAL CONCENTRATOR, TOMY) によって乾燥させた。脱水したゲル片に 5  $\mu$ l の trypsin 溶液 (20  $\mu$ l/ml trypsin (Promega) / 50 mM ammonium bicarbonate) を加え、37°C で 16 時間反応させることで、ゲル内の蛋白質を消化した。その後、ゲル片に抽出液 (1 回目は 50  $\mu$ l の 50% acetonitrile / 5% TFA 溶液、2 回目は 50  $\mu$ l の 80% acetonitrile / 5% TFA 溶液、3 回目は 50  $\mu$ l の 100 % acetonitrile) を加え、3 分間ソニケーションし、更に 30 分間ボルテックスした後の抽出液を回収するという操作を 3 回行うことでペプチドを抽出した。ペプチド抽出液は遠心濃縮器によって濃縮し、ZipTip C18 チップ (Millipore) を用いて精製し、これをサンプル溶液とした。サンプル溶液 1  $\mu$ l を Prespotted AnchorChip for Proteomics (BRUKER DALTONICS) に滴下し、乾燥させ、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF/MS/MS, autoflexII, BRUKER DALTONICS) により解析した。

### (4) ナイープファージ抗体ライブラリの作製

scFv ライブラリ遺伝子を組み込んだファージミドベクターを大腸菌 TG1 株にエレクトロポレーションし、その適量を 50  $\mu$ g/ml ampicillin、2% glucose 含有 LB プレートに播種し、37°C で一晩培養した。50  $\mu$ g/ml ampicillin、2% glucose 含有 2YT 培地を加えてコロニーを全て回収し、250 rpm、37°C で OD600 = 0.3~0.6 まで培養した。M13K07 ヘルパーファージ (Invitrogen) を添加し、110 rpm、37°C で 30 分間、250 rpm、37°C で 30 分間培養後、2000 rpm で 10 分間遠心し、得られ

たペレットに対して 100  $\mu$ g/ml ampicillin、50  $\mu$ g/ml kanamycin 含有 2YT 培地を添加して 6 時間培養した。4°C、2000 rpm で 10 分間、更に 10000 rpm で 15 分間遠心し、回収した上清に氷冷した 20% PEG-6000、2.5 M NaCl を 1/5 volume 加え、激しく混和して氷上で 1 時間静置した。15000 rpm で 10 分間遠心して得られたペレットを NTE buffer (100 mM NaCl、10 mM Tris、1 mM EDTA) に懸濁し、0.45  $\mu$ m の Millex-HV (MILLIPORE) を用いてフィルターろ過し、ファージを回収した。

### (5) Dot Blot パンニング

Bio-Dot Microfiltration Apparatus に、TBS に浸したニトロセルロース膜を固定した。抽出した蛋白質を各 well に 500  $\mu$ l 添加し、メンブレン上に固相化した。blocking buffer (10% skim milk & 25% glycerol) を 200  $\mu$ l/well 添加して、室温で 2 時間静置してブロッキングした。TBS で 1 回洗浄し、blocking buffer で 10 倍希釈したナイープファージ抗体ライブラリを input とし、200  $\mu$ l/well 添加して、室温で 2 時間静置した。TBST と TBS で 10 回洗浄後、100 mM triethylamine を 100  $\mu$ l 添加して、室温で 30 分間静置した。output ファージ溶液を回収し、それらに 50  $\mu$ l の Tris-HCl (pH 8.0) を加えて中和した。また、output ファージの一部を用いてタイターを測定した。

### (6) Dot Blot ELISA によるスクリーニング

パンニング後に回収したファージを TG1 に感染させ、生じたコロニーを 96 well プレートにピッキングアップした。各ウェルが OD600 = 0.3~0.6 に達するまで培養した後、100  $\mu$ g/ml ampicillin、2% glucose 含有 2YT 培地で 10 倍希釈した M13K07 ヘルパーファージ溶液を 20  $\mu$ l/well で添加した。37°C で 1 時間静置培養した後、2000 rpm で 10 分間遠心し、上清を除去した。100  $\mu$ g/ml ampicillin、50  $\mu$ g/ml kanamycin 含有 2YT 培地を 200  $\mu$ l 加えて 37°C で一晩培養し、2000 rpm で 10 分間遠心し、回収された上清を以下のスクリーニング実験に用いた。2D-DIGE 解析から得られた抽出蛋白質を Bio-Dot Microfiltration Apparatus を用い、TBS に浸したニトロセルロー

ス膜上に固相化した。各 well に blocking buffer (10% skim milk & 25% glycerol) を 200  $\mu$ l ずつ添加して、室温で 2 時間静置してブロッキングを行った。TBS で 1 回洗浄後、blocking buffer で希釈した精製ファージを 200  $\mu$ l/well 添加し、室温で 2 時間静置した。TBST (0.1% Tween 20 を含む TBS) と TBS で 5 回洗浄後、blocking buffer で 1000 倍希釈した HRP/anti-M13 monoclonal antibody を 200  $\mu$ l/well 添加した。TBST と TBS で 3 回洗浄後、メンブレンを ECL plus Western Blotting Detection System で処理し、発光像を LAS-3000 を使用して撮影した。

#### (7) ファージ抗体を用いた Western Blot

上記で作製したファージ抗体を、第一章 第三節に準じて作製した。293T細胞と spot 8 を LTX により遺伝子導入した 293T細胞を細胞溶解液により溶解し、2 倍濃度の Laemmli Sample Buffer を等量混合し、終濃度 5% となるように 2-mercaptoethanol を添加後、95°C で 5 分処理した。各試料を、作製した SDS-PAGE 用ゲルに添加し、SDS-PAGE 用緩衝液を用い、ゲル 1 枚当たり 30 mA の定電流で 1 時間電気泳動を行った。また、Kaleidoscope prestained standards (Bio-rad) を分子量マーカーとして用いた。電気泳動後のゲルを PVDF 膜 (Millipore) に転写し、10% Block Ace を添加してブロッキングした。TBS で 1 回洗浄後、ファージ抗体  $10^{12}$  CFU/ml を添加し、緩やかに振とうさせながら室温で 3 時間反応させた。TBST (0.1% Tween 20 を含む TBS) で一晚洗浄後、0.4% Block Ace で 3000 倍希釈した HRP/anti-M13 monoclonal antibody を添加し、振とうさせながら室温で 1 時間反応させた。TBST で 4 回洗浄後、メンブレンを ECL plus Western Blotting Detection System で処理し、発光像を LAS-3000 を使用して撮影した。

#### (8) ファージ抗体を用いた免疫染色

48 well プレートに乳がん細胞株 SKBR3 と乳腺上皮細胞株 184A1 を  $5 \times 10^4$  cells/well で播種した。氷冷したメタノールを添加し 4°C で固定した後、PBS にて洗浄し、Biotin Blocking System

(DAKO) と 5% BSA (Sigma) を用いてブロッキングした。PBS で洗浄後、ファージ抗体  $10^{12}$  CFU/ml を添加し、緩やかに振とうさせながら室温で 1 時間反応させた。PBST (0.1% Tween 20 を含む TBS) で 3 回洗浄後、100 倍希釈した Biotin/anti-M13 monoclonal antibody を添加し、振とうさせながら室温で 1 時間反応させた。PBST で 3 回洗浄後、100 倍希釈した streptavidin / AP を添加し、振とうさせながら室温で 1 時間反応させた。PBST で 3 回洗浄後、Liquid Permanent Red により 5 ~ 20 分発色させ、PBST で洗浄後、蛍光顕微鏡 (OLYMPUS) を用いて観察した。

## B-2 全身性エリテマトーデス (SLE) の新規自己抗体に関する研究

### (1) 試料

全身性エリテマトーデス (SLE)、関節リウマチ (RA)、多発性筋炎 (PM) 患者血清は大阪大学医学部附属病院、呼吸器免疫アレルギー内科にてインフォームドコンセントについて同意を得た患者より提供していただいた。

### (2) HUVEC タンパク質の抽出

SLE においては症状の一つとして血管に炎症が起きることから、血管内皮細胞由来である HUVEC (正常ヒト臍帯静脈内皮細胞) からタンパク質を抽出し、SLE の患者血清中の自己抗体が反応する新規自己抗原の同定を試みた。自己抗体スクリーニング方法は図 1 に示した。抽出したタンパク質を二次元電気泳動 (2D-PAGE) により展開し、健康人血清と比較し、患者血清にて特異的に検出されるスポットを自己抗体が反応した抗原 (自己抗原) とした。2D-PAGE したゲルを銀染色し、自己抗原と対応するスポットを切り出し、ゲル内消化法にてペプチドを調整し、質量分析計にて解析後、MASCOT にてデータベースサーチを行い、タンパク質の同定を行った。

HUVEC は CHAMBREX 社から購入し、添付の培地を用いて培養した。増殖した HUVEC を PBS (-) で洗浄後、cell scraper ではがし、遠心分離により細胞を回収した。タンパク質はタンパク質抽出用キッ



ト (complete mammalian proteome extraction kit (Calbiochem社)) を用いてHUVECから抽出し、二次元電気泳動(2D-PAGE)に用いた。抽出したタンパク質は、タンパク質量定量キット (RC-DC Protein Assay kit (Bio-Rad Laboratories社)) を用いてウシ血清アルブミン(BSA)をスタンダードとして定量した。

### (3) 2D-PAGE

抽出したタンパク質 50  $\mu$ g を 7M 尿素(urea)、2 M チオ尿素(thiourea)、4% CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate)緩衝液、2 mM TBP (tributyl phosphine)、0.0002% プロモフェノールブルー (BPB)、0.2% Biolyte 3-10 (Bio-Rad)) を含む膨潤溶液で溶かし、等電点電気泳動(IEF)を行った。IEFには 11 cm のストリップゲル(ReadyStrip™ IPG strips pH3-10NL)を用いた。タンパク質を含む膨潤溶液で 12 時間、50V の電圧をかけてストリップゲルを膨潤させ、タンパク質をゲルに取り込ませた。膨潤後、2 時間で 250V、その後 1 時間で 8,000V まで上昇させ、45,000Vh 通電した。IEF 後のストリップゲルを以下の手順で還元アルキル化した。最初に 20 mg/ml DTT を含む平衡化緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 6 M Urea, 20% v/v グリセロール, 2% SDS, pH 8.8) で 20 分間振とうし、その後、25 mg/ml ヨードアセトアミドを含む平衡化緩衝液で 15 分間遮光して振とうした。続いて、2 次元目の電気泳動は 10% Bis-Tris Criterion™ XT Precast gel (Bio-Rad Laboratories社) を用いて泳動した。展開したタンパク質の染色には MS (Mass Spectrometry) 銀染キット (和光純薬社) により染色した。

### (4) ウェスタンブロッティング

上記の手法により 2D-PAGE によりゲル上に展開した HUVEC タンパク質を PVDF 膜に電気転写し、SLE 患者血清を用いて自己抗体が反応する新規自己抗原の探索を行った。血清の非特異的な反応を防ぐために、タンパク質を転写した PVDF 膜を 5% スキムミルク/PBST (PBS + 0.1% Tween20) により室温で 1 時間振とうしブロッキングした。PVDF 膜

を PBST で洗浄後、PBST で 150 倍希釈した SLE 患者血清を用いて PVDF 膜を室温で 1 時間インキュベートした。PBST で 10 分間、3 回ずつ洗浄した後、PBST で 5,000 倍希釈した HRP 標識抗ヒト IgG (GE healthcare社) を用いて PVDF 膜を室温で 1 時間インキュベートした。PBST で 10 分間、3 回ずつ洗浄した後、蛍光反応システム (chemiluminescence reaction system (PerkinElmer社)) により、自己抗体が反応する自己抗原を検出した。

### (5) トリプシンを用いたゲル内消化法

ゲル内消化は、以下の論文に従って行った (Shevchenko A et al., Anal Chem 1996, 68, 850-8.)。トリプシン消化ペプチドは、5% トリフルオロ酢酸 (TFA)、45% 蒸留水 (DW)、50% CH<sub>3</sub>CN により抽出し、凍結乾燥した。その後、0.1% TFA, 2% CH<sub>3</sub>CN, 98% DW で溶解し、質量分析のサンプルとした。

### (6) 質量分析法

質量分析は、液体クロマトグラフィー (LC) と質量分析計 (MS) を組み合わせた LC/MS 解析システムにより行った。LC は、逆相 HPLC システムにより、Magic 2002 capillary HPLC (Michrom BioResources社) を用い、カラムは C-18 RP column (length 15 cm, i. d. 200  $\mu$ m; GL Sciences Inc社) を用いた。ペプチドは以下の溶媒 A、溶媒 B を 30 分 5~65% にグラジエントをかけることでカラムから溶出した (溶媒 A : 0.1% ギ酸を含む 2:98 の アセトニトリル/蒸留水; 溶媒 B : 0.1% ギ酸を含む 95:5 の アセトニトリル/蒸留水)。ナノスプレーイオン源を介してイオン化したペプチドは LCQ イオントラップ型質量分析機 (ThermoElectron社) で解析した。データは、MS スキャンとそれに続いて最も強いピークを MS/MS スキャンにより得た。MS/MS スペクトルは MASCOT 検索プログラム (Matrix Science社) を用い、ヒトタンパク質 SwissProt database (human protein Swiss-Prot database) に対してデータベースサーチをした。

### (7) 遺伝子組み換えアルドラーゼ A の大量発現・精製

アルドラーゼ A の遺伝子は、HEK293 (ヒト胎児

腎細胞)のcDNAライブラリーに対し、アルドラーゼAに特異的なプライマーを用いてPCRにより増幅した。PCR産物を大腸菌発現ベクターであるpET28のNdeIサイトにクローニングした。DNAシーケンス解析により遺伝子配列が正しいことを確認した。組み換えタンパク質は、精製を容易にするため、N末端に6xHisを融合したタンパク質として発現させた。pET28 Ald-AをBL21(DE3)codon plus RIL(Stratagene社)に形質転換し、組み換えアルドラーゼAの大量発現を行った。形質転換した大腸菌を50 $\mu$ g/mlカナマイシンを含むLB培地で培養し、濁度600 nmが0.6に達してから0.4 mM IPTG( $\beta$ -ガラクトシターゼ活性の誘導物質)を加え、25 $^{\circ}$ C、2時間で発現を誘導した。発現を誘導した大腸菌を遠心分離により回収し、PBS + 1% TritonX100 + 1%プロテアーゼ阻害剤(Protease inhibitor cocktail(ナカライテスク社))で懸濁し、超音波破碎により大腸菌を破碎した。大腸菌破碎液は高速遠心機により上清と沈殿に分離した。組み換えアルドラーゼAは上清から精製した。まず、PBS + 1 mM イミダゾールで平衡化させたNiセファロース樹脂(GE healthcare社)と遠心上清を4 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートさせた後、カラムに移し、PBS + 30 mM イミダゾールで洗浄し、PBS + 250 mM イミダゾールで溶出した。溶出したタンパク質はPBSで透析し、遠心上清を-85 $^{\circ}$ Cで保存した。精製したタンパク質は、タンパク質定量キット(Bio-Rad Laboratories社)を用いて、BSAをスタンダードとして定量した。

#### (8) 遺伝子組み換えアルドラーゼA C-del 1~3の3種類の欠損変異体の作製

アルドラーゼA C-del 1~3の3種類の欠損変異体を作製するために、それぞれの領域に対してプライマーを作製し、pET28 Ald-Aを鋳型としてPCRを行い、それぞれの欠損変異体を増幅した。これらの産物をpET28のNdeIサイトにクローニングした。DNAシーケンス解析により遺伝子配列が正しいことを確認した。組み換えタンパク質は、精製を容易にするため、N末端に6xHis融合した

タンパク質として発現させた。それぞれの発現ベクターをpET28Ald-A C-del 1, pET28Ald-A C-del 2, pET28Ald-A C-del 3と名付けた。3種類の発現ベクターをそれぞれBL21(DE3)codon plus RIL(Stratagene社)に形質転換し、組み換えアルドラーゼA C-del 1~3の大量発現を行った。形質転換した大腸菌を50 $\mu$ g/mlカナマイシンを含むLB培地で培養し、濁度600 nmが0.6に達してから0.4 mM IPTG、25 $^{\circ}$ C、2時間発現を誘導した。発現を誘導した大腸菌を遠心分離により回収し、PBS + 1% TritonX100 + 1%プロテアーゼ阻害剤(ナカライテスク社)で懸濁し、超音波破碎により大腸菌を破碎した。大腸菌破碎液は高速遠心機により上清と沈殿に分離した。組み換えアルドラーゼA C-del 1~3は沈殿(封入体(Inclusion body))から精製した。封入体をPBS + 4% TritonX100で洗浄後、遠心分離した。次に、封入体を蒸留水で洗浄し、遠心分離した。PBS + 8 M Urea + 10 mM DTTで封入体からタンパク質を抽出し、PBSで10倍にDTTを希釈後、PBS + 1 mM イミダゾールで平衡化させたNiセファロース樹脂(GE healthcare社)と室温で1時間インキュベートし、樹脂に組み換えタンパク質を吸着させた。タンパク質を吸着させた樹脂をカラムに移し、PBS + 8 M Urea + 30 mM イミダゾールで洗浄し、PBS + 8 M Urea + 250 mM イミダゾールで溶出し-85 $^{\circ}$ Cで保存した。溶出したタンパク質はタンパク質定量キット(Bio-Rad Laboratories社)を用いて、BSAをスタンダードとして定量した。

#### (9) ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングには、全長アルドラーゼAとアルドラーゼA C-del 1~3を200 ngずつ混合し、ゲル(10% Bis-Tris Criterion<sup>TM</sup> XT Precast gel(Bio-Rad Laboratories社))を用いて電気泳動を行った。続いてPVDF膜に電気転写し、5%スキムミルクで1時間ブロッキングし、1レーンずつ短冊状に切断し、PBSTで1,000倍希釈した市販アルドラーゼA抗体(Santa Cruz社)、又はPBSTで150倍希釈した血清を用いて、室温で1時間インキュベートした。PBSTで10分間、3回ずつ洗浄

で定性的に行った。構造変化については、電気泳動法の移動度に基づき比較、検討を行った。

各種アフィニティーカラム前後の濃縮や脱塩、バッファー交換を減少させるように計画しているが、実際には不可欠であるため限外濾過法にて行った。この際得られる非保持画分の主体は塩類、代謝物とペプチドであるため、酸性化後、逆相 C18 カラムで濃縮し、逆相 nano LC-Maldi 法で分離、分析した。

2. 心血管系培養細胞上清の解析： 血液中に存在する低濃度の心血管系細胞由来たんぱく質やペプチドを血液試料から分離、同定することは困難であるため、心血管系細胞の上清中に放出されるたんぱく質やペプチドを包括的に解析することにした。ラット由来の心臓線維芽細胞、血管平滑筋細胞の培養上清のプロテオーム、ペプチドーム解析を、前者は 2 次元電気泳動法、後者は 2 次元 LC 法を主体として分離し、質量分析計にて同定を行った。

3. 心臓組織試料の解析： 第 1 期研究で収集した心臓組織試料の解析が進んでいなかったため、2 次元電気泳動法でスポットの同定、解析を行った後、DIGE 法での定量比較に着手した。

#### (倫理面への配慮)

血液、組織試料は第 1 期プロテオーム研究時に当センター倫理委員会にて承認を受けて採取したものであり、昨年度末に本研究での使用承認を得ている。また、研究協力者各人に本年度 5~6 月に再度意思確認を行い、同意が得られた試料を対象とした。動物実験については、当センター実験動物委員会の承認を受けて実施した。(寒川、南野)

### B-4. 認知症等の精神・神経疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の研究

#### (1) 微量測定系の確立

20 人 10 ml ずつの髄液をプロテオーム・ファクトリーに送付し、前処理の検討を行った。髄液蛋白量は、血漿に比べて著しく低値であるものの、血漿蛋白成分を効率的に除去する方法の開発が必要である。そこで、血漿成分抗体カラムの使用、

蛋白分解酵素不活化などの前処理条件を検討した。

#### (2) UCH-L1 の酸化修飾に関する研究

脱ユビキチン化酵素 UCH-L1 について酸化修飾剤に対する感受性、酸化修飾時の凝集性、他の蛋白質との結合性について生化学的に解析し、I93M 変異体の性状を比較した。

#### (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。髄液の一部は、榎林博太郎博士(順天堂大学名誉教授-故人)から譲り受けたパーキンソン病患者の髄液であり、連結不可能匿名化して研究利用することが当センター倫理委員会で承認されている。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にて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。(高坂)

### B-5. 疾患関連たんぱく質の解析技術の向上と確立

#### B-5-1. 検討 1: 試料の調製方法

ヒト標準血清(外国人男女購入血清 5 人ずつプールしたもの)と日赤健常人プール血清(男女 5 人ずつプールしたもの)を各 200  $\mu$ l アジレント抗体カラム Hu-6 (10.0 x 100mm)に通し、6 種の高濃度タンパク質を除いた。

6 種の高濃度タンパク質を除いた血清を濃縮後、1 検体あたり 40  $\mu$ g を標識する計算でそれぞれ 200  $\mu$ g 相当(1 検体分多めに 5 検体分)を分取した(各 2 本ずつの計 4 本)。

各サンプル(4 本)を Dissolution buffer (0.5M triethylammonium bicarbonate)で 80  $\mu$ l にメスアップ後、プロトコルの反応系の 4 倍量の計算で、各サンプル(4 本)に Denaturant (2%

した後、PBSTで5,000倍希釈したHRP標識抗ヤギ抗体(Santa Cruz社)又は、HRP標識抗ヒトIgG(GE healthcare社)を用いてPVDF膜を室温で1時間インキュベートした。PBSTで10分間、3回ずつ洗浄した後、蛍光反応システム(PerkinElmer社)により、反応したタンパク質を検出した。

#### (10) 抗アルドラーゼA自己抗体測定ELISA法

大腸菌発現系で大量発現、精製した全長アルドラーゼAをPBSで10  $\mu\text{g/ml}$ に希釈し、96ウェルプレート(MaxiSorp Nunc社)に100  $\mu\text{l}$ ずつ加え、シールし、4°Cで一晩インキュベートし抗原をプレートに固相化した。次に、PBSでウェルを洗浄後、1% BSAを含むPBSを100  $\mu\text{l}$ ずつ加え、シールし室温で2時間振とうし、ブロッキングを行った。検体はSLE患者41名、RA患者49名、PM患者11名及び健常人19名を用いた。血清を抗原と反応させる際に、大腸菌タンパク質に対する血清中の抗体を吸収させるため、血清を、BL21(DE3) codon plus RILのタンパク質(0.1 mg/ml)を含むPBSTで血清を500倍希釈し、室温で1時間振とうした。ブロッキング後のプレートをPBSで洗浄し、希釈した血清を100  $\mu\text{l}$ ずつ加え、シールして室温で1時間振とうし、インキュベートした。続いて、ウェルを200  $\mu\text{l}$ のPBSTで5回洗浄し、PBSTで5,000倍希釈したHRP標識抗ヒトIgG(GE healthcare社)を100  $\mu\text{l}$ ずつ加え、シールして室温で1時間振とうし、インキュベートした。ウェルを200  $\mu\text{l}$ のPBSTで5回洗浄した。TMB+ (Dako社)を100  $\mu\text{l}$ ずつウェルに加え、シールして室温で、振とうして発色させ、100  $\mu\text{l}$ の停止液(KPL社)を加え、450 nmの吸収をマイクロプレートリーダー(Immuno-mini NJ-2300 microplate reader (Nalge Nunc International, Tokyo, Japan))で測定した。検体の吸光度/(健常人の吸光度の平均値+3×健常人の標準偏差)×100で計算し、グラフ化した。この式から100結合単位(100 binding unit)をカットオフ値とした。

#### (倫理面への配慮)

#### インフォームドコンセント

対象患者(SLEなどの自己免疫疾患)に対し、大阪大学医学部附属病院の共同研究者である医師が説明資料に従い研究について説明し、十分の理解を得た上で、文書に同意を得た。

#### 個人情報保護

大阪大学医学部附属病院において、呼吸器・免疫アレルギー内科、立花功助教を個人情報管理者とし個人情報の管理を行った。基盤研には大阪大学医学部附属病院において連結可能匿名化された情報が試料とともに提供された。提供される情報は年齢、性別、病名、生化学データとした。

#### 試料

血液サンプル(20ml)を提供していただいた。試料は、基盤研、免疫プロジェクトの鍵のかかる冷凍庫内に保管した。研究終了後、全て医療廃棄物として廃棄する。

(堤)

#### B-3. 循環器疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の研究

##### 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研究

これまでに検討した前処理方法を踏まえ、20年度においては、微量たんぱく質の量的変動や構造変化を検出可能とするための研究を実施した。

1. 血漿試料を用いた前処理方法の検討: 抗体や各種アフィニティークロマトグラフィーを主体とする試料の前処理、濃縮法の改良と定量解析、切断・修飾などの構造変化解析について、方法の開発と探索的解析を行った。具体的には血漿試料を、抗体カラム(14種主要たんぱく質除去用)、各種アフィニティークラム(heparin, metal-chelate, 色素等)を組み合わせて分離し、限外濾過ユニットで脱塩、濃縮することにより、微量たんぱく質画分の再現的かつ簡便な濃縮・調製法を検討した。20年度に実施予定となっていたICAT法、iTRAQ法などによる定量分析がプロテオームリサーチセンター(PRC)で行われなかったため、タンパク質の解析は2次元電気泳動法による分離、Maldi-Tof-Tof 4800による分析、同定

SDS) 4  $\mu$ l、Reducing Reagent (TCEP) 8  $\mu$ lを加えて60°Cで1時間反応させタンパク質の変性と還元を行った。

次に、各サンプル(4本)にCysteine Blocking Reagent 4  $\mu$ lを加えて25°Cで10min反応を行い、システイン残基のBlockingを行った。

次に、各サンプル(4本)に50  $\mu$ gのトリプシン(ABI: Cat# 4352157)を加え、各サンプル(4本)から29.2  $\mu$ l(40  $\mu$ g相当)ずつ4本のチューブに分注し(ヒト標準血清8本、日赤健常人血清8本の計16本)、37°Cで16時間消化した。

iTRAQ 試薬 114, 115, 116, 117 各4本ずつ計16本にトリプシン消化済みサンプルの全量を各試薬チューブに移し、25°Cで60min反応させた(ヒト標準血清は114, 115 試薬で標識、日赤健常人血清は116, 117 試薬で標識)。

その後、114, 115, 116, 117 試薬で反応させたもの各1本(計4本)を1セットとして1本のチューブに混合し(計4セット)、10mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 1.92)を1.4mL加えてサンプル溶液のpHを2.7~3.0付近になるように調製した。

次に、SCX column (Poly LC Sulfoethyl A column [35 x 2.1mm, 5  $\mu$ m, 300 Å])を使用し、ギ酸アンモニウム系の溶媒で濃度勾配法により25分画にして溶出させた。

溶出画分はC18 columnにより脱塩処理を行い、蒸発乾固させMS解析用サンプルとした。尚、検体数はn=4とした。

#### B-5-2. 検討1: 試料測定方法および解析方法

上記の通り、脱塩処理を行ったiTRAQペプチド試料をnano-LC/QSTAR-XL (ABJ社製, ESI-Q/TOF)およびABI4700 (ABJ社製, MALDI-TOF/TOF)で質量分析を行い、得られたMSデータをABI-ProteinPilot™ 解析ソフトおよびParagon Method 95%を用いて、ペプチドおよびタンパク質の同定・比較定量解析をした。

なお、QSTAR-XLの測定条件は、ABJ社のiTRAQ用測定パラメータに修正した。また、Matrix展開

後の試料を用いて、ABI4700で2回および3回の再測定を実施し、同定タンパク質を解析した。

#### B-5-3. 検討2: 試料の調製方法

ヒト標準血清(外国人男女購入血清5人ずつプールしたもの)、日赤健常人血清(1検体)、非糖尿病患者血清(1検体)および糖尿病患者血清(1検体)をアジレント抗体カラムHu-6(10.0 x 100mm)に通し、6種の高濃度タンパク質を除いた血清を濃縮後、1検体あたり40  $\mu$ g 標識する計算でそれぞれ200  $\mu$ g 相当を分取した。

各サンプルをDissolution buffer (0.5M triethylammonium bicarbonate)で80  $\mu$ lにメスアップ後、プロトコルの反応系の4倍量の計算で、各サンプルにDenaturant (2% SDS) 4  $\mu$ l、Reducing Reagent (TCEP) 8  $\mu$ lを加えて60°Cで1時間反応させ、タンパク質の変性と還元を行った。

次に、Cysteine Blocking Reagent 4  $\mu$ lを加えて25°Cで10min反応を行い、システイン残基のBlockingを行い、50  $\mu$ gのトリプシン(ABI: Cat# 4352157)を加え、各サンプルから29.2  $\mu$ l(40  $\mu$ g相当)ずつ4本のチューブに分注し、37°Cで16時間消化した。

iTRAQ 試薬 114, 115, 116, 117 各4本ずつ計16本にトリプシン消化済みサンプルの全量を各試薬チューブに移し、25°Cで60min反応させた(ヒト標準血清は114、日赤健常人血清は115、非糖尿病患者血清は116、糖尿病患者血清は117 試薬で標識)。

その後、114, 115, 116, 117 試薬で反応させたもの各1本(計4本)を1セットとして1本のチューブに混合し、10mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 1.92)を1.4mL加えてサンプル溶液のpHを2.7~3.0付近になるように調製した。

次に、SCX column (Poly LC Sulfoethyl A column [35 x 2.1mm, 5  $\mu$ m, 300 Å])を使用し、ギ酸アンモニウム系の溶媒で濃度勾配法により25分画にして溶出させた。

溶出画分はC18 columnにより脱塩処理を行い、

蒸発乾固させ MS 解析用サンプルとした。尚、検体数は n=1 とした。

#### B-5-4. 検討 2: 試料測定方法および解析方法

溶出画分を C18 column で脱塩した iTRAQ ペプチドは nano-LC/QSTAR XL (AB, ESI-Q/TOF) で質量分析測定を行い、得られた MS データを ABI-ProQuant 解析ソフトを用いて、ペプチドおよびタンパク質の同定・比較定量解析をした。

なお、QSTAR XL の測定条件は ABJ 社の iTRAQ 用測定パラメータに修正した。

(下田)

#### B-6. iTRAQ 法に関する微量たんぱく質解析技術の研究

iTRAQ 法の標準プロトコルでは SDS が含まれるため、標識後に陽イオン交換樹脂による SDS 除去が必須である。陽イオン交換の素通り分画 (SDS を含む) には多くのペプチドが含まれることが判っており、網羅性の低下の原因となる。また、SDS を含む試料では陰イオン交換クロマトグラフィーの適用が困難である。そこで、SDS を含まずに効率よく酵素消化および標識を行うプロトコルを確立した。

(中山)

#### B-7. 創薬バイオマーカー探索研究基盤の確立とその活用

##### 1) 分析技術の検討

##### 1. 1) iTRAQ 法を用いたタンパク質の定量的分析に適した MS の検討

MS の性能を比較するため、卵巣明細胞腺癌培養細胞のタンパク質をトリプシンで消化した後、iTRAQ 試薬で標識し、ESI-Q/TOF MS (マイクロマス社、Premier およびアプライドバイオシステムズ社、QSTAR Elite)、MALDI-TOF/TOF MS (アプライドバイオシステムズ社、4800) 及び ESI-Orbitrap MS (サーモ社、Orbitrap) の 4 機種を用いてナノ LC-MS/MS 解析を行った。

##### 1. 2) アルブミンなど血漿中に多量に存在するタ

##### ンパク質低減方法の検討

最も効率的に血漿中の高濃度タンパク質を低減でき、かつ多数の微量タンパク質を検出・同定できる方法を明らかにするため、血漿中の高濃度タンパク質を限外濾過、抗体アフィニティー、中空糸膜カラム等によって低減した後、残存する微量タンパク質を MS によって分析した。

##### 2) 疾患関連タンパク質のバリデーション

##### 2. 1) 卵巣明細胞腺癌関連タンパク質のバリデーション

蛍光デファレンスゲル二次電気泳動と MS/MS あるいは iTRAQ と MS/MS を用いて検出された卵巣明細胞腺癌関連タンパク質のうち、アネキシン IV (ANX4) のバリデーションを行った。抗 ANX4 抗体を用いて明細胞腺癌組織検体と培養細胞における ANX4 の発現を調べた。また、RT-PCR 法によって ANX4 mRNA の発現レベルを解析すると共に、発現を制御する遺伝子領域を解析した。さらに、siRNA を用いた ANX4 遺伝子の発現抑制が癌細胞の増殖に及ぼす影響を調べた。

##### 2. 2) 血漿タンパク質中の疾患関連タンパク質の検出・同定

これまでに卵巣明細胞腺癌の組織及び培養細胞で検出されたタンパク質の発現変動を患者血漿中でもとらえることができるかどうか調べるため、血漿中の多量に存在するタンパク質を中空糸膜カラムで除去した後、マイクロボア LC によって 7 画分に分けた。各画分のタンパク質を還元 S-カルボキシメチル化し、トリプシンで消化した。そして、得られたペプチドをナノ 2D-LC-ESI-Q/TOF MS によって分析し、タンパク質の同定を試みた。

##### (倫理面への配慮)

提供者の同意を得て採取され、匿名化された検体を用いて研究を行った。(平野)

#### B-8. 疾患関連創薬バイオマーカー探索研究

ゲムシタビン単剤による化学療法を受けた進行膵がん患者の内、強い副作用があった 25 例と

副作用のなかった 22 例の治療前血漿サンプルを用いた。

前処理法には Beckman Coulter 社 (現 Sigma 社) の IgY-12 High Capacity Spin Column® を用い、12 種類の血漿アバンドントタンパクを分離除去した。その flow through として得られたそれら以外のタンパクを含む分画をトリプシン処理し、nanoLC-TOF-MS にて測定し、2DICAL 法にて解析を行った。

### (倫理面への配慮)

国立がんセンターの倫理委員会による審査で承認された方法で採取保管され、検体の個人情報が出漏ることが無いように匿名化が厳重に行われるように配慮したがん患者の血漿血清検体を用いた。(山田)

## C. 研究結果

### C-1. 抗体プロテオミクス技術の最適化

### C-2. 全身性エリテマトーデス (SLE) の新規自己抗体に関する研究

結果は D 項にまとめて記載した。(堤)

### C-3. 循環器疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の研究

#### 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研究

1. 血漿試料を用いた前処理方法の検討: 血漿試料を対象に、主要たんぱく質除去用抗体カラムと各種アフィニティーカラム、限外濾過ユニットで濃縮することにより、微量たんぱく質画分の再現的かつ簡便な濃縮・調製法を検討した。今年度は 2 次元電気泳動法により解析を行ったが、高濃度たんぱく質の非特異的吸着に由来する持ち越しや、担体により除去されないたんぱく質が数% 以下程度ではあるが各カラムで見出された。低濃度たんぱく質の解析ではこれらの混入が解析を妨害すること、血漿試料では同一たんぱく質由来で構造変化などを受けて電気泳動位置の異なるスポット数が血清に比して多いなどの問題があ

り、低濃度たんぱく質の同定数は増加するものの、一度の 2 次元電気泳動法で観測されるスポット数 同定たんぱく質数を大幅に増加することはできなかった。

限外濾過ユニットについては、分子量 10,000 カット膜を使用したため、実際に検出された物質の大部分は分子量 2,500 以下のペプチドであった。血清、血漿試料の主要たんぱく質除去用抗体カラムの非吸着画分で限外濾過ユニットの非保持画分の解析を行った結果、血漿試料では血清試料より総ペプチド量が 1/3-1/5、検出ペプチド数が 1/4 程度と少なかったが、検出されたペプチドの大部分は凝固系たんぱく質の断片で、他は補体、リポたんぱく質とアノテーションの無い(UA)たんぱく質 2 種の断片であった。血清試料でも大部分はフィブリノーゲンなどの凝固系たんぱく質由来の断片であり、補体と UA たんぱく質 1 種由来のペプチド以外は、血漿試料由来の全てのペプチドを含んでいた。

2. 心血管系培養細胞上清の解析: 血液試料ではたんぱく質濃度差が極めて大きく、微量たんぱく質解析の大きな障害となっている。問題を回避する一法として心血管系培養細胞の産生するたんぱく質、ペプチドを包括的に同定し、生理的変動、病態生理的障害による変化を解析することにより候補物質を見出す研究を開始した。循環器疾患患者血中のこれらの候補物質の濃度変動より、最終的に循環器疾患関連バイオマーカー候補を探索する試みである。ラット心臓非心筋細胞(主として線維芽細胞)、血管平滑筋細胞を対象にたんぱく質、ペプチドを収集し、実際の解析に着手した。心臓非心筋細胞については解析がある程度進み、機能未知たんぱく質に由来する断片、プロセッシングにより特異的に切断、生成していると考えられるペプチドなどが同定された。

3. 心臓組織試料の解析: 第 1 期研究で心不全、心筋症患者より剖検時に収集した心臓各部位の組織試料については、2 次元電気泳動法で検出される大部分のたんぱく質の同定を終わり、DIGE 法での定量比較を開始した。

また、PRC では第 1 期研究期間中に収集した血清試料を解析対象としないことが決定されたため、創薬プロテオームファクトリー施設より血清試料の返却を受け、当センターでの解析に使用することにした。(寒川、南野)

#### C-4. 認知症等の精神・神経疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の研究

##### (1) 微量測定系の確立

これまでの検討では、最初の髄液量が10ml必要であるという制約はあるものの、Agilent 抗体カラム (Hu14) で分画し、素通り画分と吸着溶出画分を得て、0.1% SDS、50mM Tris/HCl (pH 8.5) に溶解することで、cICAT 法解析で311種類のタンパク質を同定でき、そのうち294種は髄液特異的蛋白として同定できていた。

髄液2mlからのcICAT法測定を可能にするために、以下の点を検討し、概ねその方法論が確立できた。

##### ①抗体カラムの必要性の再評価

血清中に多量に存在している蛋白質は、微量蛋白質を同定・定量する際に障害となるため、アルブミン、IgG、トランスフェリンなどの蛋白質を吸着除去させる方法が一般的である。しかし、カラムを用いることで回収蛋白量が減少することから、髄液についても血清と同様に14種類のタンパクを除去できるカラムを使用する必要があるかないかを再検討した。その結果、髄液においても14種類のタンパクが多く存在していることが判明したため、抗体カラム処理は必要と判断した。

##### ②EDTA、56°C、30分の前処理の必要性

本処理の目的は、抗体カラムによりプロテアーゼ阻害タンパクである $\alpha$ 2マクログロブリンが除去されるため、その後の処理で微量タンパクが分解を受けることを懸念したものである。しかし、本処理によって同定タンパク数に顕著な差は見られず、タンパク回収量が1/10以下に低下することが判明した。よって、この処理を省くことにした。

③cICAT法に必要な蛋白量は、初期量2mlから回収できるか？

50 $\mu$ g以上の回収量であれば、cICAT法での1回分の測定が可能である。プールされた髄液2mlを用いると、回収タンパク量は約124 $\mu$ gであった。一方で、個々の髄液検体5検体での検討では、

まず溶血があった2検体を除外、1検体は極端に低濃度で除外し、残り2検体の回収量は134、67 $\mu$ gであり、検体ごとのばらつきが大きいことが判明した。さらに少量の初期量1mlからの検討では、2mlからの解析結果に比較し、同定蛋白質数が2-3割減少することを確認した。

##### (2) UCH-L1の酸化修飾に関する研究

酸化型UCH-L1は酸化修飾の程度に応じて酵素活性が減弱することに加えて、生化学的に凝集性が亢進しており、他の蛋白質との結合性も高まることが示された。結合上昇する蛋白質の中には、chaperone 介在型オートファージの構成因子であるLAMP2、Hsc70、Hsp90が含まれていた。これらの性状はI93M UCH-L1にも認められた。(高坂)

#### C-5. 疾患関連たんぱく質の解析技術の向上と確立

以下のD-5. 考察の項に結果と考察として記載した。

(下田)

#### C-6. iTRAQ法に関する微量たんぱく質解析技術の研究

上記方法の改善の結果、iTRAQ 標識後のペプチドを陽イオン交換および陰イオン交換クロマトグラフィーの二つの異なる分離モードで分画することが可能になり、タンパク質同定の網羅性を著しく向上させることができた。また、金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)によるリン酸化ペプチドの精製法は非特異的な非リン酸化ペプチドの混入が大きな問題である。そこで、IMAC 担体や金属の選定、バッファー条件や洗浄回数などの系統的な最適化を詳細に行い、極めて高い純度でリン酸化ペプチドを精製する方法を確立した。その結果、わずか100 $\mu$ g程度のタンパク質消化物から700種類以上のリン酸化ペプチドを同定できた。また、各種イオン交換クロマトグラフィーを用いた多次元LC化とiTRAQ法による定量法を組み合わせることによって、10000カ所以上におよぶリン酸化の同定・定量に成功した。

(中山)





これまでに卵巣明細胞腺癌の組織や培養細胞で40種類のタンパク質の発現変動を明らかにした。検出されたタンパク質の発現変動を患者血漿中でもとらえることができるかどうか調べた。血漿中の高濃度タンパク質を中空糸膜カラムで除去した後、マイクロボア HPLC によって7画分に分けた。そして、トリプシンで消化後、ナノ2D-LC-ESI-Q/TOF MS によって分析し、タンパク質の同定を試みた。この方法によって3,000近くの血漿タンパク質を同定することができたが、目的とするタンパク質を検出することはできなかった。

(平野)

#### C-8. 疾患関連創薬バイオマーカー探索研究

2DICAL法を用い、血液毒性の両極端な症例群(強い副作用あり:25例、副作用なし:22例)の治療前血漿プロテインプロファイルを解析し、検出された60,888ピークの中で統計学的に最も高度の有意性を示したペプチドピークのアミノ酸配列がハプトグロビン由来であることを同定した。さらに発現量の差をWestern Blotで確認した。

治療前血液ハプトグロビン値、治療前好中球数・血小板数、体表面積を用いた血液毒性予測モデル(ノモグラム)を構築した。このモデルの臨床的有用性は3つの独立したコホート合計305症例において再現性良く確認され、切除不能腺がん患者におけるゲムシタピンによる血液毒性の予測バイオマーカーとして血中ハプトグロビン値が有用なマーカーであることを示した。(山田)

#### D. 結果・考察

##### D-1. 抗体プロテオミクス技術の最適化

抗体プロテオミクス技術(図1参照)の有用性評価と新規乳がん関連マーカー蛋白質の探索を目的として、まず不死化乳腺細胞株184A1から調製した蛋白質を対照サンプルに乳がん細胞株SKBR3から調製した蛋白質を疾患サンプルとして

2D-DIGE法を試みた(図2参照)。定量的解析を行った結果、特に発現変動レベルの大きかった21個のspotに対して、ゲルspotを切り出し、ゲルを溶解することにより蛋白質を回収した(表1参照)。抽出した蛋白質の一部を質量分析法(MS解析)による蛋白質の同定に供し(図1参照)、一部をニトロセルロース膜へとblotし、Dot Blotを用いたパンニング法を同時に行った。ここで、各spotの蛋白質量を測定した所、全てのspotでそれぞれ数十~数百ng程度しか含まれておらず、前章で確立した抗体単離システムを用いないと、蛋白質の同定と抗体作製は同時に行えないことが判明した。表1に示した同定した蛋白質の中で、乳がんに関連するマーカーとして報告があるものはspot 8だけであり、それ以外の蛋白質と乳がんとの関連は不明であった。

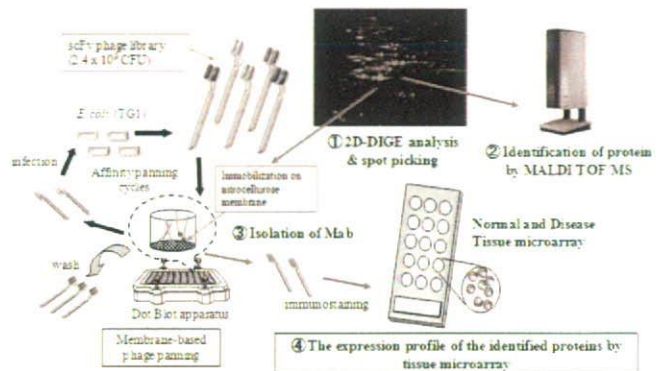


図1 抗体プロテオミクス技術

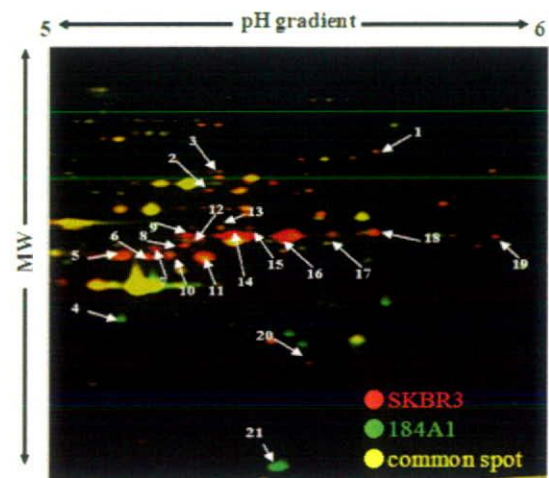


図2 乳腺および乳がん細胞の二次元蛍光差分ゲル電気泳動

spot 8 を抗原として用いた結果、input フェージ数に対する output フェージ数の割合 (Ratio) は、1st パンニング後と比較して 4th パンニング後で、約 1000 倍にも濃縮された。更に目的抗原に対する抗体を単離できているかを確認するため、spot 8 に対する親和性を Dot Blot ELISA により評価した (図 3 参照)。

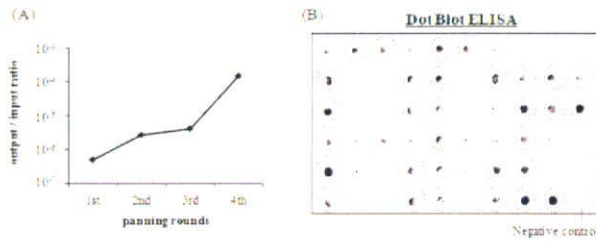


図 3 ドットプロットパンニングを用いた scFV ナイブフェージライブラリからの spot#8 蛋白質に対する抗体の単離

その結果、4th パンニング後のクローンでは、多数の spot 8 に対する抗体の単離に成功していることが明らかとなり、シーケンス解析の結果、3 種類の配列の異なる抗体であることが判明した。また、得られたフェージ抗体の特異性を評価するため、ランダムに 1 クローンを選択し、その spot 8 に対するフェージ抗体を用いた Western Blot と免疫染色により評価した所、単離したフェージ抗体は TRAIL-R2 特異的に結合し、Western Blot や免疫染色等のアプリケーションに使用可能な汎用性の高い抗体であることが示唆された (図 4 参照)。表 2 に 2D-DIGE 解析で見出された全ての蛋白質に対する抗体単離の結果をまとめており、全ての spot に対して特異性の高い複数の抗体の作製に成功した。2D-DIGE より回収された微量蛋白質を効率よく利用して、蛋白質の同定ならびに、フェージ抗体を取得するまでに要した期間は僅か 2 週間であり、迅速かつ網羅的に 2D-DIGE 解析で同定される蛋白質から直接的に抗体を作製できる技術を初めて確立した。

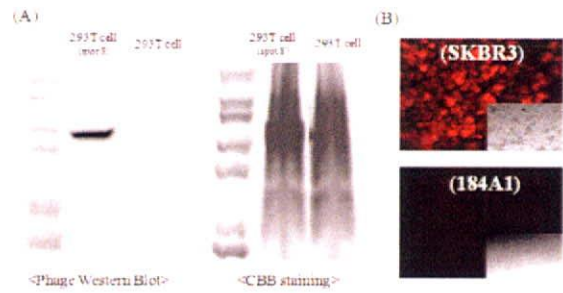


図 4 抗 spot8 scFv フェージ抗体の特性

表 1 MALDI-TOF/MS による乳癌関連蛋白質

spot	MW	pI	protein volume (ng)	cancer normal
=1	84649	5.87	119	6-fold <sup>^</sup>
=2	62872	5.52	104	6-fold <sup>^</sup>
=3	75580	5.55	94	7-fold <sup>^</sup>
=4	36938	5.28	610	11-fold <sup>v</sup>
=5	41694	5.29	99	15-fold <sup>^</sup>
=6	47820	5.39	100	18-fold <sup>^</sup>
=7	47305	5.34	99	12-fold <sup>^</sup>
=8	47820	5.39	95	16-fold <sup>^</sup>
=9	51563	5.32	109	10-fold <sup>^</sup>
=10	51333	5.41	126	23-fold <sup>^</sup>
=11	48029	5.34	497	13-fold <sup>^</sup>
=12	51333	5.41	122	24-fold <sup>^</sup>
=13	52992	5.49	126	35-fold <sup>^</sup>
=14	51312	5.5	406	36-fold <sup>^</sup>
=15	54880	5.69	677	8-fold <sup>^</sup>
=16	53529	5.52	694	32-fold <sup>^</sup>
=17	53540	5.52	1143	72-fold <sup>^</sup>
=18	53784	5.75	353	8-fold <sup>^</sup>
=19	50678	5.95	130	22-fold <sup>^</sup>
=20	32130	5.66	119	9-fold <sup>^</sup>
=21	23159	5.42	119	53-fold <sup>v</sup>

表 2 抗体ライブラリからの乳がん関連蛋白質に対する抗体の単離と濃縮

spot	Output/Input Ratio, x 10 <sup>3</sup>				Isolation of NAb screening clone
	1st	2nd	3rd	4th	
*1	6	7	16	480	4 pos. clone 60 clone
*2	6	7	15	500	3 pos. clone 60 clone
*3	6	6	32	860	2 pos. clone 60 clone
*4	6	6	5	24	1 pos. clone 60 clone
*5	7	11	17	480	1 pos. clone 60 clone
*6	6	7	25	420	5 pos. clone 60 clone
*7	6	11	62	260	4 pos. clone 60 clone
*8	6	27	41	1520	3 pos. clone 60 clone
*9	6	9	14	370	7 pos. clone 60 clone
*10	6	7	3	2200	5 pos. clone 60 clone
*11	6	8	15	84	2 pos. clone 60 clone
*12	10	11	13	94	2 pos. clone 60 clone
*13	7	9	32	80	6 pos. clone 60 clone
*14	4	7	46	260	5 pos. clone 60 clone
*15	7	11	51	580	9 pos. clone 60 clone
*16	6	7	16	4100	6 pos. clone 60 clone
*17	5	12	33	240	2 pos. clone 60 clone
*18	6	20	18	180	1 pos. clone 60 clone
*19	7	10	49	940	3 pos. clone 60 clone
*20	6	6	57	3000	2 pos. clone 60 clone
*21	7	8	110	1900	2 pos. clone 60 clone

## D-2. 全身性エリテマトーデス (SLE) の新規自己抗体に関する研究

### (1) SLE 患者血清中の自己抗体のスクリーニング

まず、HUVEC からタンパク質を抽出し、抽出したタンパク質を 2D-PAGE でゲル上にスポットとして展開し、銀染色を行った (図 6 参照)。展開したタンパク質を、PVDF 膜に転写して、患者血清を抽出したタンパク質と反応させ、ウェスタンブロット法により患者血清中に存在する抗体と展開した各タンパク質との抗原抗体反応パターンを調べた (図 6 参照)。健常ヒト血清でのウェスタンブロットパターン (図 6 参照) と比較し、患者血清中で特異的に見られる陽性スポットを自己抗原とした。また、抗アルドラーゼ A 抗体を含む試料でのウェスタンブロットパターンも調べた (図 6 参照)。

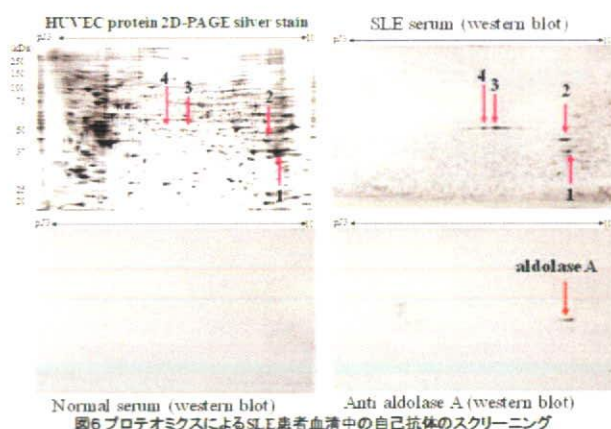


図6 プロテオミクスによるSLE患者血清中の自己抗体のスクリーニング

図6 プロテオミクスによる SLE 患者血清中の自己抗体のスクリーニング

### (2) 質量分析計による自己抗原の同定

HUVEC のタンパク質抽出液から SLE の新規自己抗原として、アルドラーゼ A (Aldolase A) を同定した。また、同手法により SLE の既知の自己抗原である SS-B/La、GAPDH (glyceraldehydes-3-phosphatedehydrogenase、hnRNP A2/B1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1)、アネキシン A2 (annexin A2)、等の自己抗原も検出できた (表

3 参照)。このことより、本スクリーニング手法が、自己抗原のスクリーニングとして有用であることが示された。

表3 プロテオーム解析により単離された自己抗原

Autoantigens identified by LC-MS/MS	
Spot 1	GAPDH
	Heterogenous nuclear ribonucleo protein A2 B1
	Annexin A2
Spot 2	Aldolase A
Spot 3	Elongation factor 1-gamma
	Lupus La protein (SS-B La)
Spot 4	Elongation factor 1-gamma

### (3) ELISA 法による抗アルドラーゼ A 抗体の確認

アルドラーゼ A に対する抗アルドラーゼ A 抗体が、SLE の疾患マーカーとして有用か否かを確認するため、抗アルドラーゼ A 抗体の検出方法の確立を試みた。アルドラーゼ A について、遺伝子をクローニングし、遺伝子組み換えタンパク質を大腸菌発現系により大量発現、精製し、抗アルドラーゼ A 抗体を測定する ELISA システムを構築した。

ELISA 法により 41 名の患者血清を用いてアルドラーゼ A についての自己抗原陽性率を解析し、疾患マーカーとしての有効性を検証した。その結果、約 30% の患者において抗アルドラーゼ A 抗体が検出された (図 7 参照)。また SLE 患者のうちでもより重症である腎障害のある SLE 患者の 43.4% において、抗アルドラーゼ抗体陽性を示すことが判明した (図 8 参照)。一方、健常人 19 名の血清を用いて同様の解析を行った結果、抗アルドラーゼ抗体陽性率は 0% であった (図 7, 8 参照)。さらに、疾患コントロール群として自己免疫疾患である RA 患者 49 名及び PM 患者 11 名について同様の解析を行った。その結果、抗アルドラーゼ抗体陽性率は、それぞれ 8.2%、18.2% であった (図 7, 8 参照)。