

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許

1. 角田慎一、堤 康央、新規腫瘍マーカーを用いた乳癌の検査方法（出願中）。
2. 電気泳動ゲルのタンパク質を固定化し、質量分析できる膜フィルター（申請予定）
3. 発明の名称：「 α -アクチニン-4 遺伝子のコピー数または発現レベルを指標とした癌の診断法」
発明者：本田一文、山田哲司、廣橋説雄、稲澤譲治、井本逸勢、津田均、山本宗平、高野政志
出願日：2008年7月2日
出願番号：特願2008-173469（国内出願）
出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団
4. 発明の名称：「ゲムシタピン治療による副作用の出現リスク検定方法」
6. 発明の名称：「膵臓癌の検出法」
発明者：本田一文、山田哲司、廣橋説雄
出願日：2009年1月30日
出願番号：特願特願2009-019920（国内出願）
出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

I. 研究協力者

角田 慎一 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

鎌田 春彦 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
創薬プロテオミクスプロジェクト

仲 哲治 独立行政法人医薬基盤研究所
免疫シグナルプロジェクト

世良田 聡 独立行政法人医薬基盤研究所
免疫シグナルプロジェクト

発明者：山田哲司、尾野雅哉、松原淳一、上野秀樹、西條長宏、廣橋説雄

出願日：2008年10月17日

出願番号：特願特願2008-268592（国内出願）

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

5. 発明の名称：「水酸化プロリン α -フィブリノーゲンタンパク質に対する高親和性モノクローナル抗体」

発明者：能勢博、橋口朋代、尾野雅哉、山田哲司、廣橋説雄

出願日：2008年10月14日（実施例追加12月25日）

出願番号：特願2008-264742（国内出願）特願2008-330745（実施例追加）

出願人：株式会社トランスジェニック、国立がんセンター総長

阿部 康弘 独立行政法人医薬基盤研究所

今井 直 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

長野 一也 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

佐々木一樹 国立循環器病センター
研究所薬理部

尾崎 司 国立循環器病センター
研究所薬理部

疾患関連たんぱく質の解析基盤の研究

分担研究者 堤 康央 独立行政法人医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー

研究要旨

我々のグループでは、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」の確立を進めている。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で、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る。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る。

A. 研究目的

近年のプロテオミクス技術の進展に伴って、がんや自己免疫疾患をはじめとする各種難治性疾患に関連する創薬バイオマーカー蛋白質を探索・同定しようとする研究が、世界的規模で推進されている。この創薬バイオマーカー蛋白質には、疾患の発症や悪化といった病態を的確に診断するための「疾患バイオマーカー蛋白質」や、疾患の発症や悪化に直接関与している「創薬ターゲット蛋白質」、疾患治療に関与している「医薬品シイズ蛋白質」に加え、医薬品の有効性や安全性等を高確度で予測・解析できる

「有効性/安全性バイオマーカー蛋白質」が含まれており、これらの情報を有効活用することで、画期的診断薬・治療薬の開発が可能になるものと期待されている。しかし、これまでの所、創薬プロテオミクス研究から画期的診断薬・治療薬の開発に成功した例は、世界的にみても極めて乏しいのが現状である。これは、疾患時の細胞や組織においては、数十から数百種類以上の蛋白質が、質的・量的・時空間的に発現変動しており、これら膨大な数の発現変動蛋白質（疾患関連蛋白質）の中から真に有用な創薬バイオマーカー蛋白質を絞り込むシステムが確立されてい

ないことに大きく起因している。本観点から我々は、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ことを目的に、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論の確立を進めている。これ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で、僅か数週間で特異抗体を網羅的に作製すること、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。本年度の研究では、上記方法論、即ち「抗体プロテオミクス技術」の最適化を試みた。

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／抗原を効率よく同定しうる方法の確立を試みた。

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 μ g 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 μ l 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 Daltsix 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 NaI₄ 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 μ 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 μ 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 μ l の trypsin 溶液 (20 μ 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 μ l の 50% acetonitrile / 5% TFA 溶液、2 回目は 50 μ l の 80% acetonitrile / 5% TFA 溶液、3 回目は 50 μ 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 μ 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) ナイーブ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 μ 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 μ 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 μ g/ml ampicillin、50 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 倍希釈したナイーブファージ抗体ライブラリを input とし、200 μ 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 μ 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 μ 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 プレートにピックアップした。各ウェルが OD600 = 0.3~0.6 に達するまで培養した後、100 μ 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 μ 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 μ g/ml ampicillin、50 μ g/ml kanamycin 含有 2YT 培地を 200 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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Laemli 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) で一晩洗浄後、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 5×10^4 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 μ g を 7M 尿素 (urea)、2 M チオ尿素 (thiourea)、4% CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propa

nesul fonate) 緩衝液、2 mM TBP (tributyl phosphine)、0.0002% ブ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, pH8.8)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) ウェスタンブロットティング

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% CH₃CNにより抽出し、凍結乾燥した。その後、0.1% TFA, 2% CH₃CN, 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 μm; 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 μg/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のIPTG(β-ガラクトシターゼ活性の誘導物質)を加え、25°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°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°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 Nde1 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 µg/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°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°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) ウェスタンブロットティング

ウェスタンブロットティングには、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™ 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 µg/ml に希釈し、96 ウェルプレート(MaxiSorp Nunc 社)に 100 µl 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 µl 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 名及び健康人 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 µl 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 μ 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 μ 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 μ l の PBST で 5 回洗浄した。TMB+(Dako 社)を 100 μ 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 μ 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 \times 健常人の標準偏差) \times 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。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載した。

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(Table 1)。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。

spot 8 を抗原として用いた結果、input ファージ数に対する output ファージ数の割合(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)。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、得られたファ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 に対するファージ抗体を用いた Western Blot と免疫染色により評価した所、単離したファージ抗体は 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、ファ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。

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)。

(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-phosphate dehydrogenase)、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。

(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)。

(4) 抗アルドラーゼ A 抗体エピトープの確認

すでに RA では抗アルドラーゼ A 抗体がマーカーとなりうること、また抗アルドラーゼ A 抗体の認識部位はアルドラーゼ A の N 末端アミノ酸側(第 1 位~第 38 位)に存在することが報告されている。そこで、SLE のマーカーとなりうる抗アルドラーゼ A 抗体に対するエピトープとなりうる領域についてアルドラーゼ A の組換えタンパク質と患者血清でウェスタンブロット法により血清の反応性を確認した。

正常なアルドラーゼ A(全長アルドラーゼ A)は、363 個のアミノ酸より構成される。そこで、アルドラーゼ A について全長の組み換えタンパク質、及び第 274 位~第 363 位のアミノ酸領域、第 184 位~第 363 位のアミノ酸領域、第 94 位~第 363 位のアミノ酸領域の各 C 末端側のアミノ酸領域を欠損させた 3 種類の欠損変異体(deletion mutant)、アルドラーゼ A C-del 1~3 を人工的に作製した(図9参照)。SLE 患者血清中の抗アルドラーゼ A 抗体に対するエピトープ領域を、全長アルドラーゼ A 及び 3 種類の欠損変異体を抗原としてウェスタンブロット法により確認した。

SLE 患者では全長アルドラーゼ A、アルドラーゼ A C-del 1 及び C-del 2 でバンドが認められたのに対し、アルドラーゼ A C-del 3 ではバンド反応が認められな

かった。すなわち、SLE 患者に認められる抗アルドラーゼ抗体のエピトープとなりうる領域は、アルドラーゼ A のアミノ酸配列のうち、第94位～第183位の領域に含まれることが考えられた(図9参照)。

一方、疾患コントロールとして RA 患者についても同様の検討を行った。その結果、全長アルドラーゼ A 及びアルドラーゼ A C-del 1~3 のすべてにおいてバンドが認められた。すなわち、RA 患者に認められる抗アルドラーゼ抗体のエピトープとなりうる領域は、アルドラーゼ A のアミノ酸配列のうち、第1位～第93位の領域に含まれることが考えられた(図9参照)。このことより、SLE 患者に認められる抗アルドラーゼ抗体に対するエピトープは、RA 患者に認められる抗アルドラーゼ抗体に対するエピトープとは異なることが確認された。

上記により、アルドラーゼ A に関し、SLE 患者と RA 患者では、異なる自己抗体を有することが示唆された。したがって、SLE 患者の場合は、RA 患者とは異なるエピトープを認識する抗アルドラーゼ A 抗体であることが確認された。

E. 結論

本年度、最適化を試みた抗体プロテオミクス技術により、新規乳がんマーカー候補として 21 種類の蛋白質の同定と同時に、僅か 2 週間という短期間で見出した全ての抗原に対する抗体(ファージ発現型抗体)を作製しうることを明らかとした。本方法は、プロテオミクスで見出される多数の候補蛋白質の効率的絞り込みにより有用な基盤技術になりうるものと考えられる。

また本研究では、SLE の新規自己抗体として抗アルドラーゼ A 抗体の同定に成功した。抗アルドラーゼ A 抗体を測定して SLE について検査を行うと、従来の検査方法に比べて、より感度及び特異性の高い検査方法を行うことができると考えられる。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である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

1. Yoshikawa M., Mukai Y., Okada Y., Yoshioka Y., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Okada N., Doi T., Nakagawa S. : Ligand independent assembly of purified soluble human Magic Roundabout (Robo4), a tumor endothelial specific marker., *Protein. Expr. Purif.*, 61(1):78-82, 2008.
2. Kamada H., Fugmann T., Neri D., Roesli C.: Improved protein sequence coverage by on resin deglycosylation and cysteine modification for biomarker discovery. , *Proteomics.*, in press.
3. Nagano K., Imai S., Mukai Y., Nakagawa S., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Rapid isolation of intrabody candidates by using an optimized non-immune phage antibody library., *Pharmazie.*, in press.
4. Iwahori K, Osaki T, Serada S, Fujimoto M, Suzuki H, Kishi Y, Yokoyama A, Hamada H, Fujii Y, Yamaguchi K, Hirashima T, Matsui K, Tachibana I, Nakamura Y, Kawase I, Naka T. Megakaryocyte potentiating factor as a tumor marker of malignant pleural mesothelioma: Evaluation in comparison with mesothelin. *Lung Cancer.* 2008 Oct;62(1):45-54.
5. Takahashi T, Naka T, Fujimoto M, Serada S, Horino J, Terabe F, Hirota S, Miyoshi E, Hirai T, Nakajima K, Nishitani A, Souma Y, Sawa Y, Nishida T. Aberrant Expression of Glycosylation in Juvenile Gastrointestinal Stromal Tumors. *Proteomics clinical applications* 2008 Sep;(2):9: 1246-1254

G-2 学会発表

1. 山下琢矢, 宇都口直樹, 鈴木 亮, 長野一也, 角田慎一, 堤 康央, 丸山一雄 :ファージ表面提示法を用いた抗腫瘍組織血管抗体の創製., 遺伝子・デリバリー研究会 第8回シンポジウム., 大阪, 2008年5月.

2. Shin-ichi Tsunoda, Kazuya Nagano, Tomoaki Yoshikawa, Yasuo Yoshioka, Shinsaku Nakagawa, Yasuhiro Abe, Haruhiko Kamada, Yasuo Tsutsumi : Antibody-based proteomics for efficient discovery and validation of tumor biomarkers., 第 67 回日本癌学会学術総会, 東京, 2008 年 10 月.
3. 岡村賢孝, 今井 直, 長野一也, 吉田康伸, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: 抗体プロテオミクスによる乳がんマーカーの探索., ファーマバイオフィオーラム 2008, 東京, 2008 年 11 月.
4. 吉田康伸, 今井 直, 長野一也, 岡村賢孝, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: 抗体プロテオミクスによるがんリンパ節転移マーカーの探索., 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2008 年 12 月.
5. 岡村賢孝, 今井 直, 長野一也, 吉田康伸, 阿部康弘, 角田慎一, 堤 康央 : 抗体プロテオミクスによる乳癌バイオマーカーの探索., 日本薬学会第 129 年回, 京都, 2009 年 3 月.
6. Imai S., Tsunoda S., Yoshida Y., Nakagawa S., Fukuoka J., Tsutsumi Y.: A novel system for efficiently screening tumor-related proteins using antibody proteomics, HUPO 7th Annual World Congress Amsterdam 2008, Amsterdam, 16 - 20 August, 2008.
7. Yoshida Y., Imai S., Yoshikawa T., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Proteomic profiling of human lymphatic endothelial cells for analyzing lymphangiogenesis, HUPO 7th Annual World Congress Amsterdam 2008, Amsterdam, 16 - 20 August, 2008.
8. Nagano K., Yoshikawa T., Sugita T., Nabeshi H., Imai S., Suzuki K., Fukuoka J., Nakagawa S., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Relationship between regulatory T cell infiltration and progression of different tumors assessed by high-density tissue microarray., 7th Joint Conference of the International Society for Interderon and Cytokine Research and International Cytokine Society., Canada, 12-16 October, 2008.
9. S. Serada, P. He, T. Takahashi, K. Iwahori, Y. Souma, A. Kim, T. Naka. Identification of alpha-enolase autoantibody as a novel biomarker in non-small cell lung cancer. 20th EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics Geneva, Switzerland 21-24 October 2008
10. K. Iwahori, S. Serada, T. Takahashi, Y. Souma, M. Kim, Y. Kishi, I. Kawase, T. Naka. A comparative analysis of megakaryocyte potentiating factor and mesothelin as serum markers for the detection of malignant pleural mesothelioma. 20th EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics Geneva, Switzerland 21-24 October 2008
11. T. Takahashi, T. Naka, M. Fujimoto, S. Serada, Y. Souma, E. Miyoshi, S. Hirota, T. Nishida. Aberrant expression of glycosylation in juvenile gastrointestinal stromal tumours. 20th EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics Geneva, Switzerland 21-24 October 2008
12. 堤 康央: 医薬品開発におけるバイオマーカー～探索研究から臨床開発まで～. 平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金政策創薬総合研究推進事業 第 11 回ヒューマンサイエンス総合研究ワークショップ, 静岡, 2008 年 11 月.
13. 角田慎一: 癌治療最適化のための細胞内薬物ターゲティング技術の研究, 第 10 回創薬ビジョンシンポジウム, 東京, 2008 年 12 月.
14. 長野一也, 今井 直, 中川晋作, 角田慎一, 堤 康央 : 疾患プロテオミクスからバイオマーカーの創出へー抗体プロテオミクス技術の確立とがん関連マーカーの探索ー., 日本薬学会第 129 年回大学院生シンポジウム, 京都, 2009 年 3 月.

G-3 参考論文

1. He P, Naka T, Serada S, Fujimoto M, Tanaka T, Hashimoto S, Shima Y, Yamadori T, Suzuki H, Hirashima T, Matsui K, Shiono H, Okumura M, Nishida T, Tachibana I, Norioka N, Norioka S, Kawase I. Proteomics-based identification of α -enolase as a tumor antigen in non-small lung cancer. *Cancer Science* 2007 Aug;98(8):1234-40
2. Serada S, Fujimoto M, Takahashi T, He P, Hayashi A, Tanaka T, Hagihara K, Yamadori T, Mochizuki M, Norioka N, Norioka S, Kawase I, Naka T. Proteomic analysis of autoantigens associated with systemic lupus erythematosus: anti-aldolase A antibody as a potential marker of lupus nephritis. *Proteomics clinical applications*. 2007 Feb;1(2):185-191

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許

角田 慎一、堤 康央、新規腫瘍マーカーを用いた乳癌の検査方法(出願中).

I. 研究協力者

角田 慎一 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
鎌田 春彦 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
阿部 康弘 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
今井 直 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
長野 一也 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
仲 哲治 独立行政法人医薬基盤研究所 免疫シグナルプロジェクト
世良田 聡 独立行政法人医薬基盤研究所 免疫シグナルプロジェクト

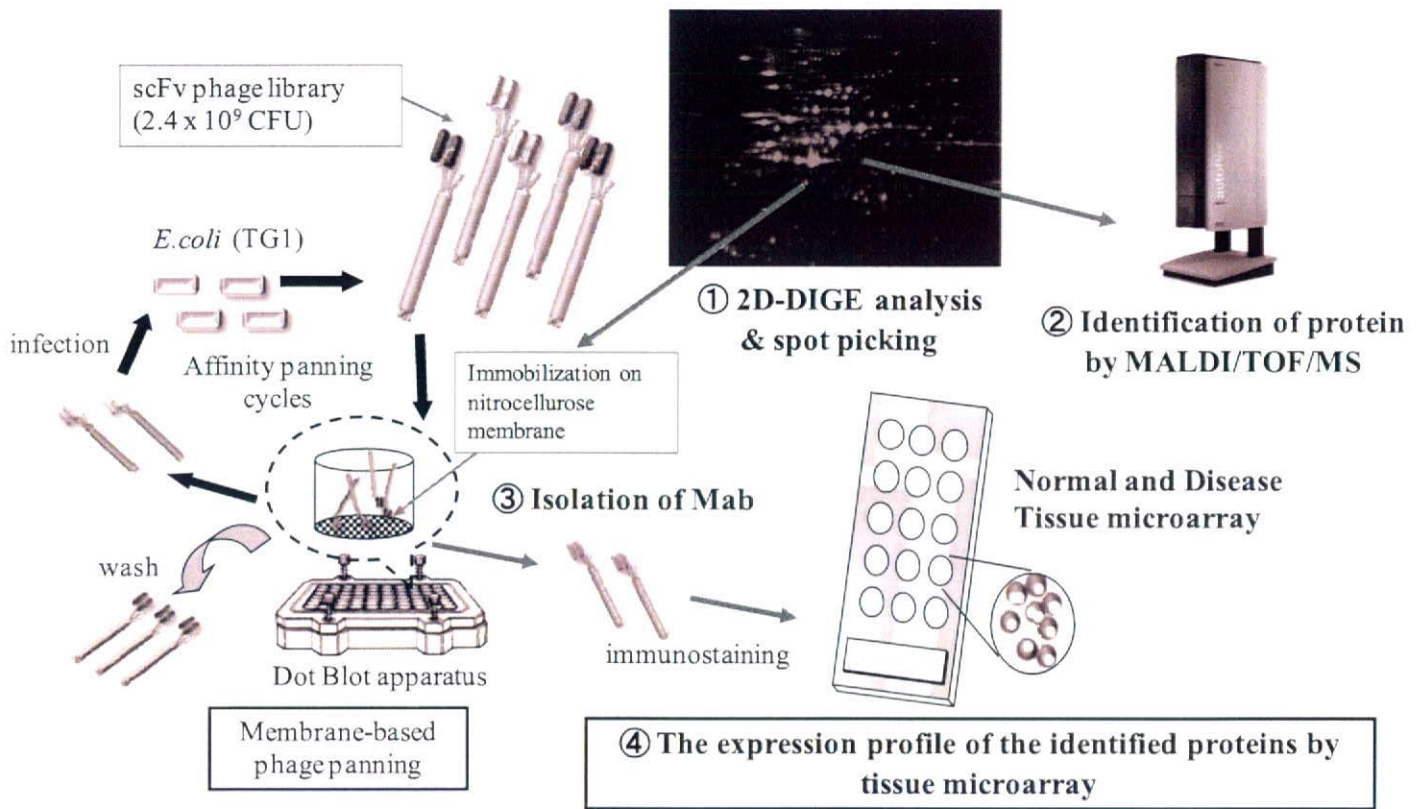


図1 抗体プロテオミクス技術を用いた創薬バイオマーカー探索

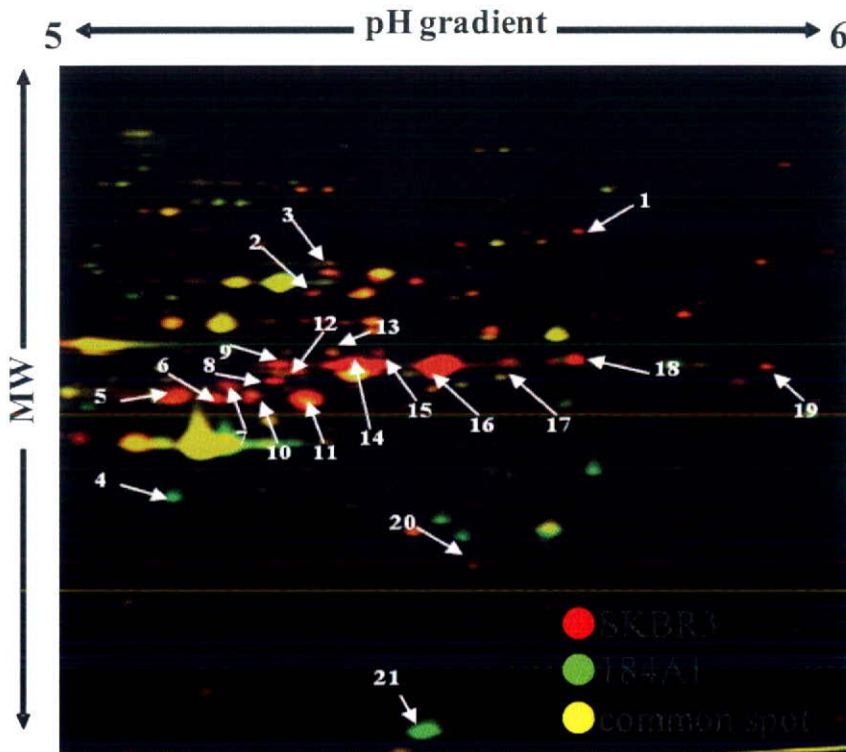


図2 乳腺および乳がん細胞の二次元蛍光差分ゲル電気泳動

Mammary gland cell (184A1) and breast cancer cell (SKBR3) were labeled using cy3 and cy5, respectively, before 2D-electrophoresis. Spots of red, green and yellow color show elevated expression level in breast cancer cell, mammary gland cell and no expression difference, respectively. The spots indicated by arrows are the proteins identified by MALDI-TOF/MS.

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 ↑
#2	62872	5.52	104	6-fold ↑
#3	75580	5.55	94	7-fold ↑
#4	36938	5.28	610	11-fold ↓
#5	41694	5.29	99	15-fold ↑
#6	47820	5.39	100	18-fold ↑
#7	47305	5.34	99	12-fold ↑
#8	47820	5.39	95	16-fold ↑
#9	51563	5.32	109	10-fold ↑
#10	51333	5.41	126	23-fold ↑
#11	48029	5.34	497	13-fold ↑
#12	51333	5.41	122	24-fold ↑
#13	52992	5.49	126	35-fold ↑
#14	51312	5.5	406	36-fold ↑
#15	54880	5.69	677	8-fold ↑
#16	53529	5.52	694	32-fold ↑
#17	53540	5.52	1143	72-fold ↑
#18	53784	5.75	353	8-fold ↑
#19	50678	5.95	130	22-fold ↑
#20	32130	5.66	119	9-fold ↑
#21	23159	5.42	119	53-fold ↓

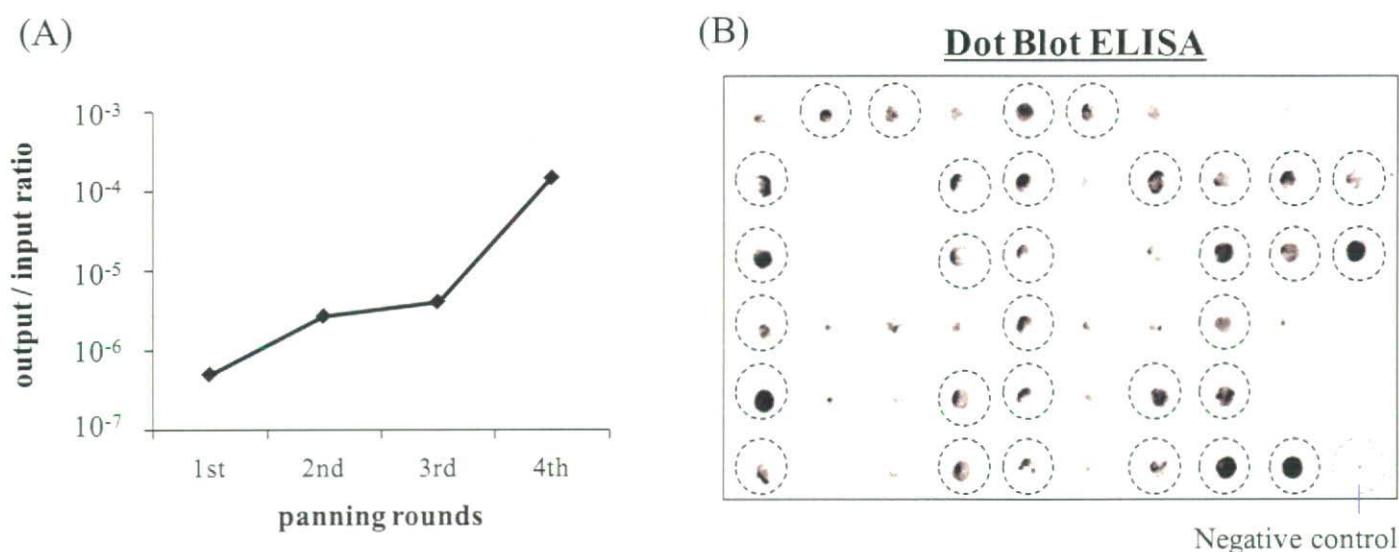


図3 ドットプロットパニングを用いたscFvナীবファージライブラリからのspot #8 蛋白質に対する抗体の単離

Affinity panning was performed on a membrane blotted protein spot #8. The scFv phage library reacted to spot #8 immobilized on the membrane. After binding step, the membrane was washed ten times with 0.1 % TBST. The bound phage was eluted with triethylamine. (A) The ratio was calculated as follows ; (output phage titer) / (input phage titer). (B) The binding properties of selected clones were measured by Dot Blot ELISA. : positive clone (dot-line circle)

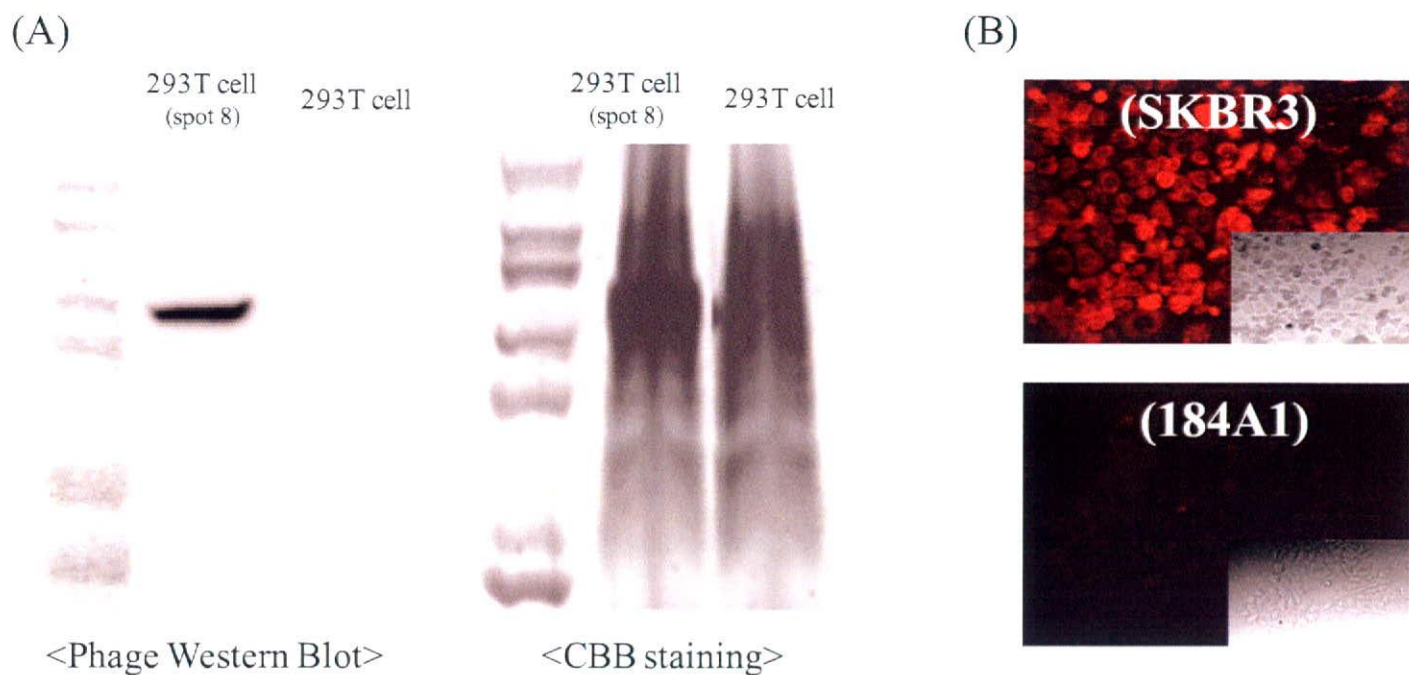


図4 抗spot 8 scFv ファージ抗体の特性

The specificity of anti-spot 8 scFv phage antibody was examined by phage Western Blot and immunofluorescence staining. Cell lysates derived from spot 8 over-expression 293T cell and 293T parental cells were applied to 10-20% SDS-polyacrylamide gel, and transferred to PVDF membrane, and detected anti-spot 8 scFv phage antibody (A). Left : Phage Western Blot, Right : CBB staining (B) Mammary gland cells (184A1) and breast cancer cells (SKBR3) were immobilized, and detected anti-spot 8 scFv phage antibody. Fluorescence images were observed using fluorescence microscope.

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 ⁻⁷) / round				Isolation of Mab / screening clone
	1st	2nd	3rd	4th	
#1	6	7	16	480	4 posi. clone / 60 clone
#2	6	7	15	500	3 posi. clone / 60 clone
#3	5	6	32	860	2 posi. clone / 60 clone
#4	5	6	5	24	1 posi. clone / 60 clone
#5	7	11	17	480	1 posi. clone / 60 clone
#6	6	7	25	420	5 posi. clone / 60 clone
#7	5	11	62	260	4 posi. clone / 60 clone
#8	5	27	41	1500	3 posi. clone / 60 clone
#9	8	9	14	370	7 posi. clone / 60 clone
#10	6	7	3	2200	5 posi. clone / 60 clone
#11	6	8	15	84	2 posi. clone / 60 clone
#12	10	11	13	94	2 posi. clone / 60 clone
#13	7	9	32	80	6 posi. clone / 60 clone
#14	4	7	46	280	5 posi. clone / 60 clone
#15	7	11	51	580	9 posi. clone / 60 clone
#16	8	7	16	4100	6 posi. clone / 60 clone
#17	5	12	33	240	2 posi. clone / 60 clone
#18	6	20	18	200	1 posi. clone / 60 clone
#19	7	10	49	940	3 posi. clone / 60 clone
#20	8	6	57	3000	2 posi. clone / 60 clone
#21	7	8	110	1900	2 posi. clone / 60 clone

Protein extraction from HUVEC

Protein separation by 2D-PAGE, and electrotransfer onto PVDF membrane

Western Blotting with serum from SLE patients

Selection of SLE patients specific Positive Spot

Identification of proteins by LC-MS/MS analysis

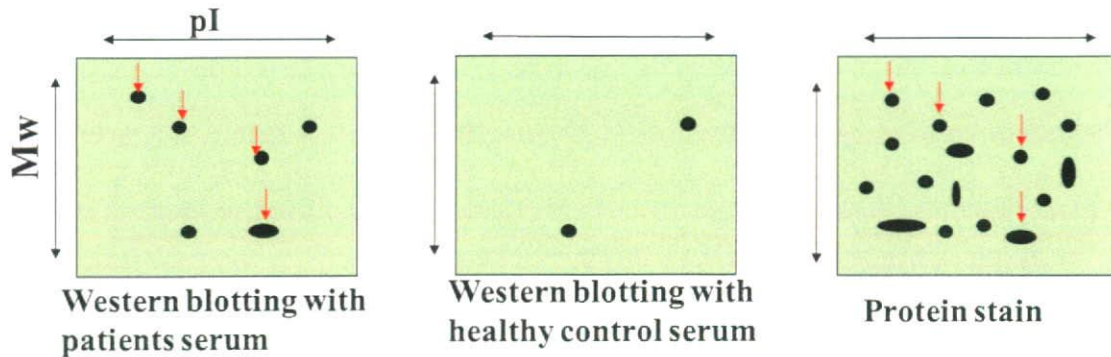
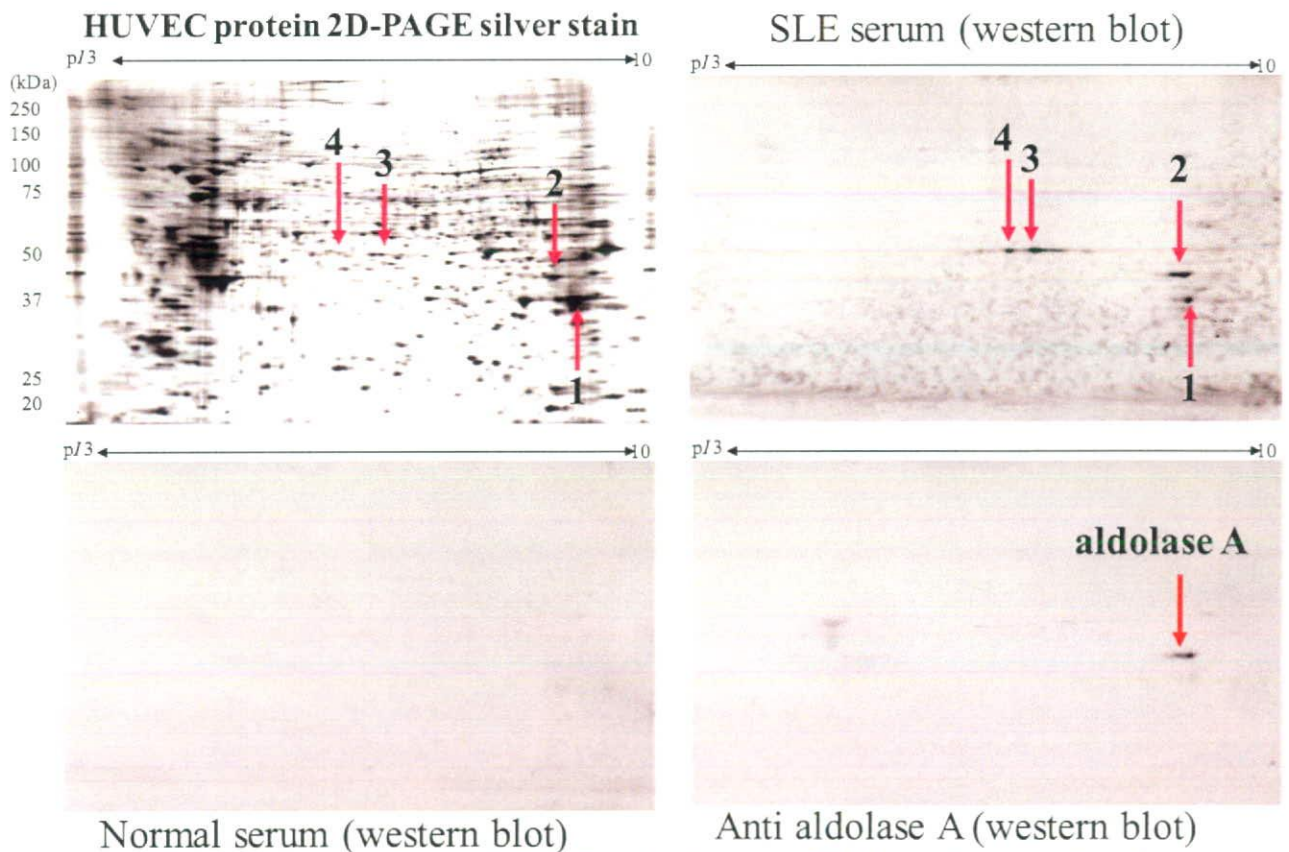


図5 プロテオーム解析を用いたSLE患者由来血清中の自己抗体のスクリーニング戦略



Normal serum (western blot)

Anti aldolase A (western blot)

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

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

ELISA anti-aldolase A antibody

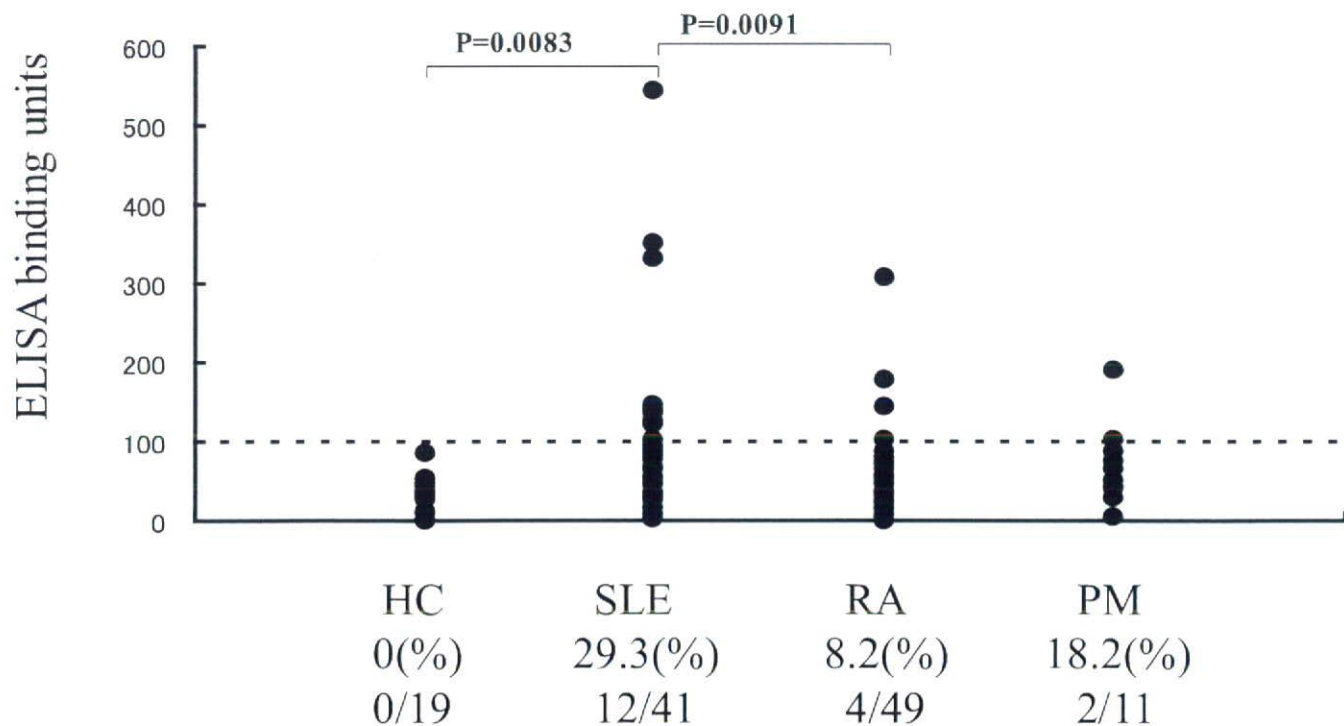


図7 健常者とSLE患者内で観察された抗アルドラーゼA抗体量の比較解析

ELISA anti-aldolase A antibody

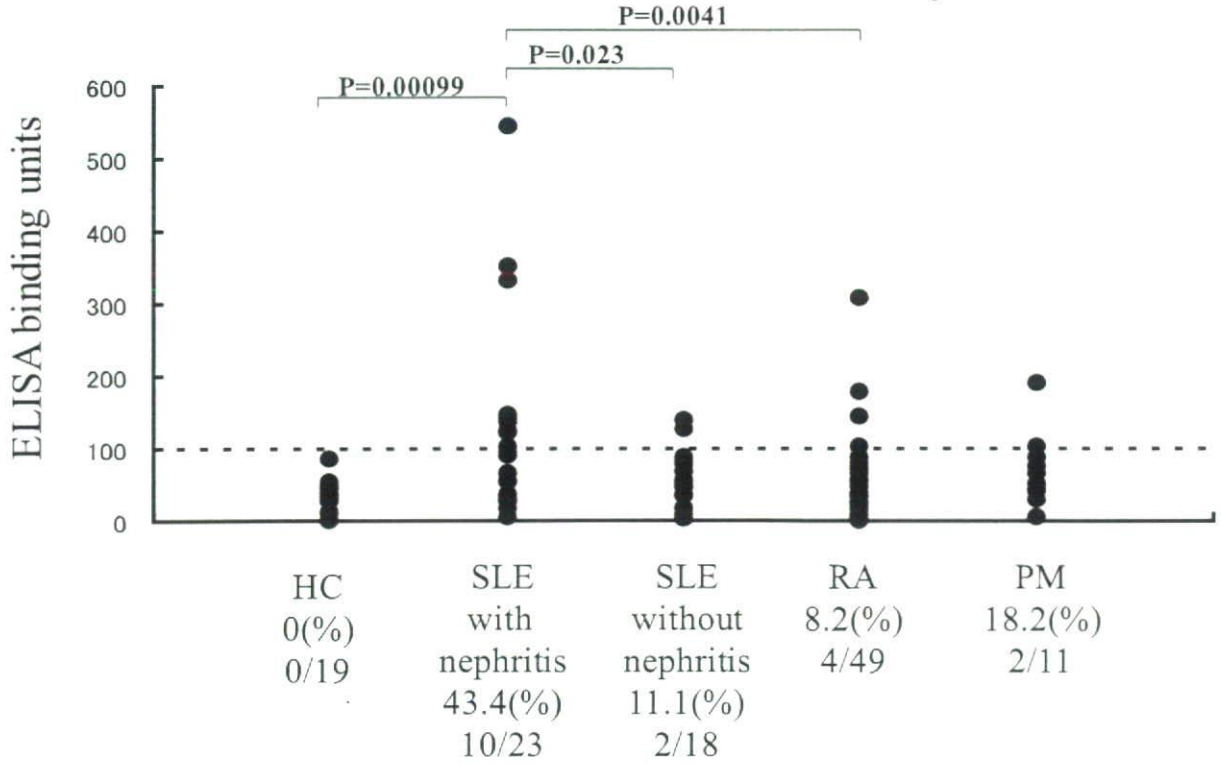


図8 腎炎を併発したSLE患者の血清中に観察される抗アルドラーゼA抗体

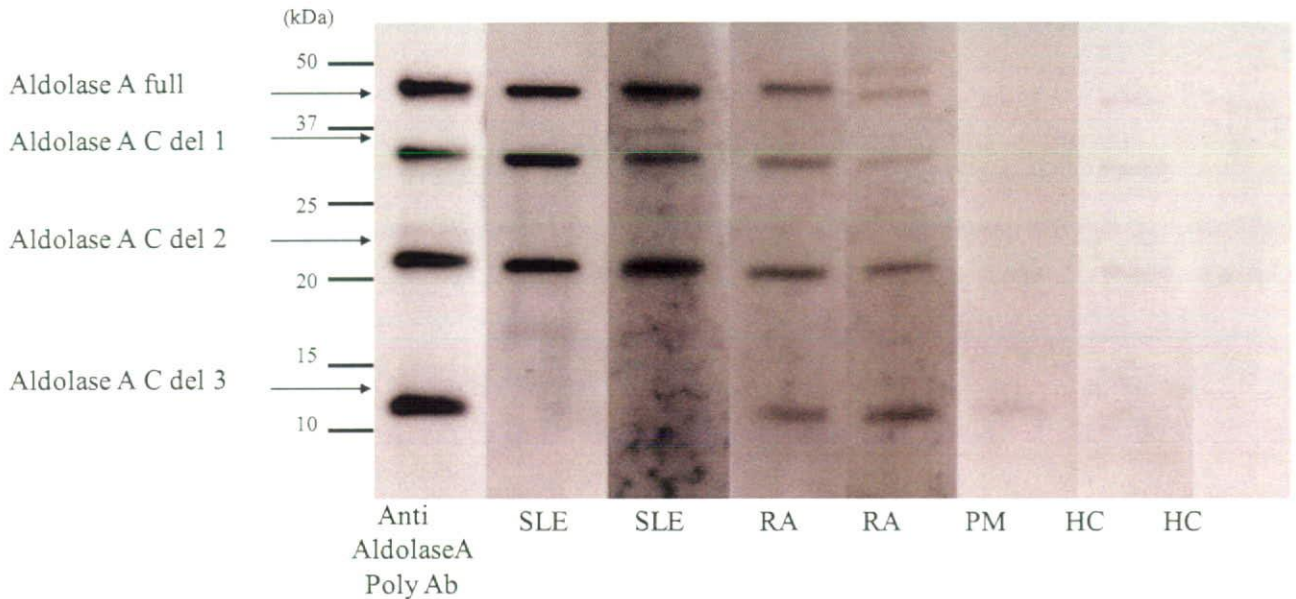
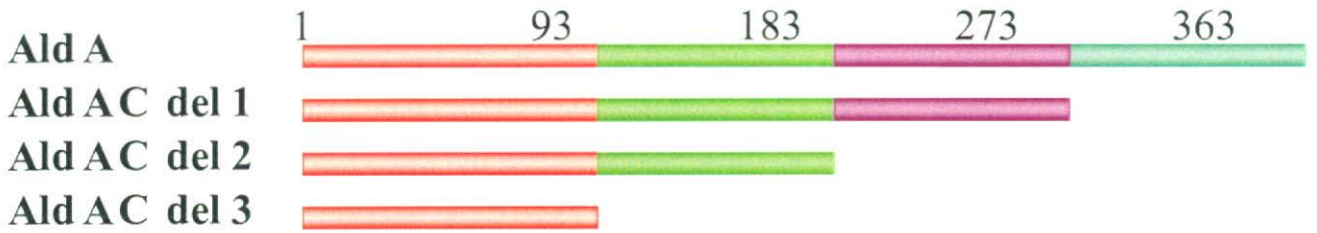


図9 抗アルドラーゼA抗体のエピトープマッピング結果

厚生労働科学研究費補助金（疾患関連創薬バイオマーカー探索研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究者 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

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を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と見られ、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。

A. 研究目的

ゲノム遺伝子配列の決定に続き、生体で実在、機能するたんぱく質、ペプチド、代謝化合物などの実験的解析（プロテオーム、ペプチドーム、メタボローム解析）に基づくファクトデータベース構築が大きな課題となっている。これは細胞や組織が実際に産生し、血液、尿などに存在するたんぱく質、ペプチド、代謝化合物などの情報を包括的に利用できれば、医薬品をはじめ各種産業に利用可能な物質を見出す上で極めて有用と考えられるからである。更に、正確な臨床情報を伴った血液、尿などの体液、組織や細胞試料のプロテオーム、ペプチドーム、メタボローム解析を疾患発症から経時的に実施できれば、有用なバイオマーカーの発見が可能と考えられ、病態、治療、予後などの診断が正確に行えると共に、医薬品開発が迅速に実施可能となると期待される。しかし、生体内で多彩な機能を発現するたんぱく質、ペプチド、化合物は極めて多様な性質を示す混合物であり、かつ組織や体液中の濃度差は極めて大きいことが障害となり、例えばプロテオーム解析においても低濃度たんぱく質までを定量的解析すること、翻訳後修飾や切断、傷害を受けた微量たんぱく質の構造情報を得ることは依然として非常に困難であ

る。本研究では、第1期プロテオーム研究で培ってきた前処理方法、解析技術を改良し、循環器疾患患者の組織、血液、細胞などに含まれる微量たんぱく質やペプチドの定量解析、修飾などの構造変化の解析を可能とする探索技術を開発することにより、高血圧、心疾患、動脈硬化などの病態、治療、予後などの診断、創薬に使用可能なバイオマーカーの発見を目指す研究を行う。

本年度の研究では、低濃度たんぱく質の定量比較を可能とするため、主要たんぱく質の除去と微量たんぱく質の効率的濃縮方法を、抗体や各種アフィニティクロマトグラフィーを基盤として作成することを計画した。また、脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)の様な生理活性ペプチドやたんぱく質断片もバイオマーカーとなるため、これらの同時分析が可能なシステムの構築を検討した。更に、心血管系細胞が特異的に産生するたんぱく質やペプチドを探索するため、培養細胞上清の解析にも着手した。

B. 研究方法

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）を組み合わせで分離し、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）で行われないことになったため、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ク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で行った。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で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。

C. 研究結果

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クラム、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分析を行った結果、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