

質量分析結果

Phosphopeptide (FDR)	Total Peptide	Phospho total(%)	Unique Phospho peptide	Unique Phospho protein
27607(1%)	29075	95.0%	10477	3933

予測 Kinase group (Ratio = 転移あり/転移なし)

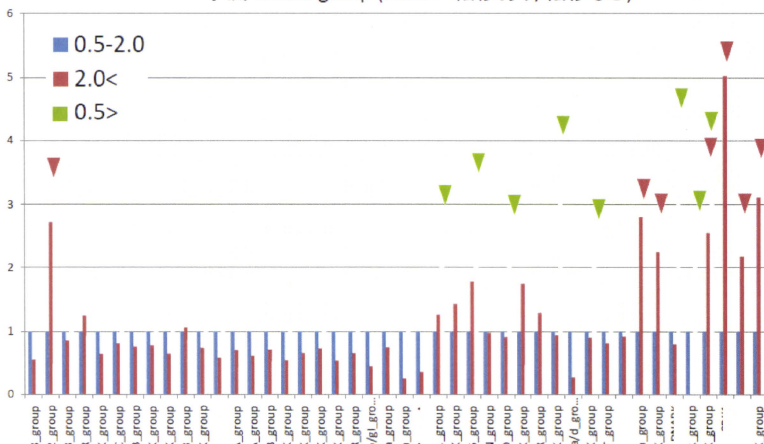


図3. バイオインフォマティクスを用いたキナーゼバスウェイ変動解析

大腸癌組織の癌部の転移なし群と転移あり群の間で発現変動を示したリン酸化タンパク質をNetworKINIによりキナーゼ-基質予測解析を行った。その結果、紫矢印で示したキナーゼバスウェイが増加し、緑矢印で示したキナーゼバスウェイが減少していることが推測された。

○変化の観測されたリン酸ペプチド (P値<0.1)

	タンパク	ペプチド	サイト	S	T	Y
ハイスケで増加 (2倍以上)	44	46	46	40	5	1
ハイスケで減少 (0.5倍以下)	53	67	71	65	5	1
合計	97	113	117	105	10	2

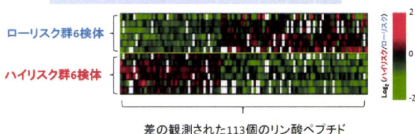


図4. 乳癌組織のリン酸化プロテオーム解析

乳癌組織ローリスク群とハイスケ群からリン酸化タンパク質を抽出し、iTRAQ法を用いてリン酸化ペプチドの発現を比較した。リン酸化ペプチドは全部で8,952種類同定され、そのうち113種類が両群間で2倍以上の発現変動を示した。

まれていた。また、これまでにバイオマーカーとしての報告がない膜タンパク質Xは、ポリープに比べてステージ2(癌部:転移なし)や4(癌

部:転移あり)で発現量が増加し、癌部で高発現していることが示された(図6)。

Data set	Identified proteins	FDR (%)
iTRAQ1	4,470	2.6
iTRAQ2	4,292	1.6
iTRAQ3	4,184	1.7
iTRAQ4	4,577	1.5
iTRAQ5	4,473	1.4
iTRAQ6	4,248	1.7
average	4,374	1.7

Total proteins	5642
Number of proteins with TMs	1582 28.0 %

polyp vs 癌 (転移なし)

ratio	P-value	Plasma membrane
> 2.0	< 0.1	91
< 0.5	< 0.1	42

癌 (転移なし) vs 癌 (転移あり)

ratio	P-value	Plasma membrane
> 1.5	< 0.1	67
< 0.65	< 0.1	22

図5. 大腸癌組織膜タンパク質のプロテオーム解析

大腸癌組織の非癌部、癌部および前癌病変(ポリープ)から膜タンパク質を抽出し、iTRAQ法を用いて膜タンパク質の発現を比較した。膜タンパク質は全部で5,672種類同定され、そのうち133種類がポリープと癌部の間で2倍以上の発現変動を示した。また、89種類が癌部の転移なし群と転移あり群の間で1.5倍以上の発現変動を示した。

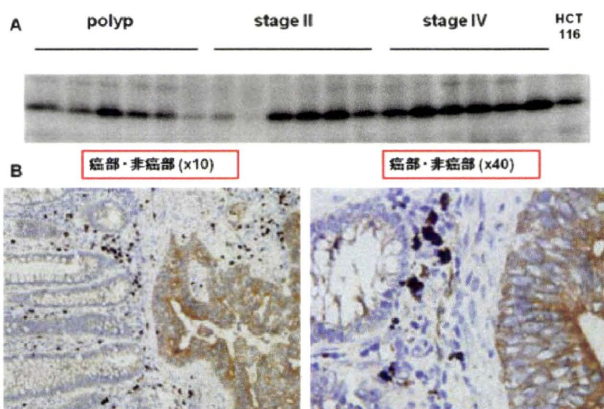


図6. 大腸癌組織における膜タンパク質 X の発現増大
大腸癌のプロテオーム解析によって癌部とポリープの間で差の見られた膜タンパク質 X について、ウエスタンブロット(A)と免疫染色(B)で検証を行った。

同様に、mammaprint でローリスク、ハイリスク群に分類された乳癌患者組織の膜画分を用いた大規模プロテオーム解析により 5122 種類のタンパク質が同定・定量できた。またローリスク群でハイリスク群より有意な差が示されたタンパク質 Y のウエスタンブロット法、免疫組織染色法を行ったところ発現量に差が見られた(図 7)。この結果より、Y タンパク質は、バイオマーカー候補タンパク質になることが示された。

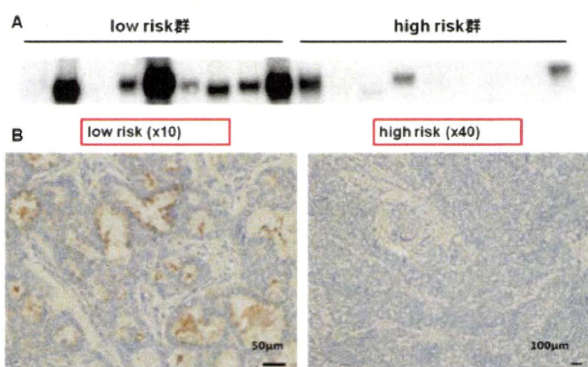


図7. 乳癌組織における膜タンパク質 Y の発現増大
乳癌のプロテオーム解析によってローリスク群とハイリスク群の間で差の見られた膜タンパク質 Y について、ウエスタンブロット(A)と免疫染色(B)で検証を行った。

2. SRM/MRM 法によるバイオマーカー候補タンパク質・ペプチドの検証

(1) 大腸癌・乳癌組織のバイオマーカー候補タンパク質の検証

6 種類の大腸がん由来株化細胞に含まれる 34 種類のリン酸化ペプチドを SRM 法により測定を試み、32 種類のリン酸化ペプチドを検出することができた(そのうち定量可能なレベルは 28 種類であった)。その一部を図 8 に示す。組織から

抽出・精製したリン酸化ペプチドに内部標準としてそれぞれ 1 fmol の安定同位体標識ペプチドを添加して SRM/MRM 法で定量し、内部標準ペプチドのピークエリアから内在性リン酸化ペプチド量を割り出すことに成功した。このことから、大規模リン酸プロテオーム解析によってバイオマーカー候補として発見されたリン酸化ペプチドのうち、多くのペプチドが SRM 法によって、大規模解析の 20 分の 1 の少ないサンプル量にも関わらず、ハイスループットに検出・定量することができると考えられ、大規模リン酸プロテオーム解析後のバリデーションの方法として有効であることが示唆された。

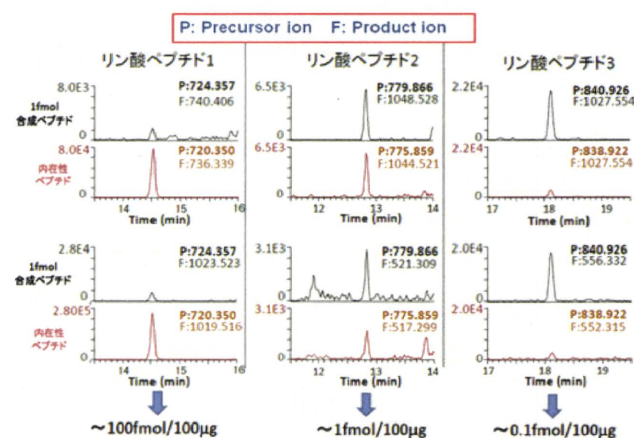


図8. 安定同位体標識を用いた SRM/MRM によるリン酸化ペプチドの定量

大腸癌組織のリン酸化プロテオーム解析でバイオマーカー候補となったリン酸化ペプチドを SRM/MRM 法で定量を行った。組織から抽出・精製したリン酸化ペプチドに内部標準としてそれぞれ 1 fmol の安定同位体標識ペプチドを添加して SRM/MRM 法で定量し、内部標準ペプチドのピークエリアから内在性リン酸化ペプチド量を割り出した。

(2) アルツハイマー病のバイオマーカー候補ペプチド APL1 β の定量

1, 4, 16, 64 fmol/ml の SI ペプチドの定量により、SRM シグナル(Area 値)とペプチド量の線形相関が確認された。内在性ペプチドと SI ペプチドの Area 値の比率から、健常者由来の血漿 1ml 中に含まれる APL1 β 25, 27, 28 の絶対濃度がそれぞれ 1.57, 1.38, 0.71 fmol/ml (pM)であると定量する事が出来た。

D. 考察

今年度は、バイオマーカー研究の一番のネック

と言われている検証法の確立を最重要課題として取り組み、SRM/MRM法を用いることで、探索で同定されたバイオマーカー候補タンパク質・ペプチドを定量することが可能であることが明らかとなった。この結果、探索から検証までの一連の流れを滞りなく実現することが可能となり、バイオマーカーの実用化にかなり近づいたと考えられる。特に、SRM/MRM法により、血漿のような複雑な試料中において微量なタンパク質やペプチドが極めて高感度に検出でき、血漿タンパク質の全領域をカバーできるようになったのは、画期的なことである。今後の課題は、それらの探索、検証で得られた多くのバイオマーカー候補タンパク質・ペプチドをどう絞り込んでいき、いかに実用化につなげていくかが最重要課題である。そのためには、多検体を用いたさらなる検証と、バイオインフォマティクスや実験的手法によるバイオマーカータンパク質の機能的な裏づけが必須であり、残り2年間の研究期間内で実践していく予定である。

E. 結論

本年度は、バイオマーカー探索を継続するとともに、バイオインフォマティクスを駆使して、同定された多数のタンパク質の中からバイオマーカーとして有用なタンパク質の絞り込みを行った。さらに、バイオマーカーの実用化に必須である検証法、特にSRM/MRM法を用いた臨床検体中のタンパク質・ペプチドの正確な定量法を確立した。その手法を用いて、大腸癌・乳癌組織のプロテオーム解析で同定されたバイオマーカー候補タンパク質の検証を行うとともに、血漿中に微量に存在するアルツハイマー病のバイオマーカー候補ペプチドであるAPL1 β の検出・定量に成功した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ritchie, S. A., Heath, D., Yamazaki, Y., Grimmalt, B., Kavianpour, A., Krenitsky, K., Elshoni, H., Takemasa, I., Miyake, M., Sekimoto, M., Monden, M., Tomonaga, T.

Matsubara, H., Sogawa, K., Matsushita, K., Nomura, F. & Goodenow, D.B. Reduction of novel circulating long-chain fatty acids in colorectal cancer patients is independent of tumor burden and correlates with age.

BMC Gastroenterol., in press.

2. Etchuuya, R., Ito, M., Kitano, S., Shigi, F., Sobue, R. & Maeda, S. Cell-to-cell transformation in *Escherichia coli*: a Novel type of natural transformation involving cell-derived DNA and a putative promoting pheromone. *PLoS One* **6**, e16355 (2011).
3. Wu, D., Matsushita, K., Matsubara, H., Nomura, F. & Tomonaga, T. An alternative splicing isoform of eukaryotic initiation factor 4H promotes tumorigenesis in vivo and is a potential therapeutic target for human cancer. *Int. J. Cancer* **128**, 1018-30, (2011).
4. Kuga, T., Nozaki, N., Matsushita, K., Nomura, F. & Tomonaga, T. Phosphorylation states at different residues of lamin B2, B1, and A/C dynamically and independently change throughout the cell cycle. *Exp. Cell Res.* **316**, 2301-12 (2010).
5. Kawashima, Y., Fukutomi, T., Tomonaga, T., Takahashi, H., Nomura, F., Maeda, T. & Kodera, Y. High-yield peptide-extraction method for the discovery of subnanomolar biomarkers from small serum samples. *J. Proteome Res.* **9**, 1694-705 (2010).
6. Sawai, S., Umemur, H., Mori, M., Satoh, M., Hayakawa, S., Kodera, Y., Tomonaga, T., Kuwabara, S. & Nomura, F. Serum levels of complement C4 fragments correlate with disease activity in multiple sclerosis: Proteomic analysis. *J. Neuroimmunol.* **218**, 112-115 (2010).
7. Adachi, A., Okita, Y. & Adachi J. Efficiency of rice bran for removal of pesticides in artificial gastric fluid. *J. Health Sci.* **56**, 88-91 (2010).
8. Sasaki, K., Nishida, Y., Adachi, J., Okawa, K., Nakayama, A., Yoneda, M. & Morisawa, S. Proteomic analysis for the purpose of

understanding the mechanisms of benzene and X-ray induced leukemia using human bone marrow cells. *J. Proteomics Bioinform.* **3**, 66-73 (2010).

- Obata, Y., Fukumoto, Y., Nakayama, Y., Kuga, T., Dohmae, N. & Yamaguchi, N. The Lyn kinase C-lobe mediates Golgi export of Lyn through conformation-dependent ACSL3 association. *J. Cell Sci.* **123**, 2649-2662 (2010).
- Miyazaki, K., Wakabayashi, M., Hara, Y. & Ishida, N. Tumor growth suppression in vivo by overexpression of the circadian component, PER2. *Genes Cells* **15**: 351-358 (2010).
- Maki, N., Suetsugu-Maki, R., Sano, S., Nakamura, K., Nishimura, O., Tarui, H., Del Rio-Tsonis, K., Ohsumi, K., Agata, K. & Tsonis, P. A. Oocyte-type linker histone B4 is required for transdifferentiation of somatic cells in vivo. *FASEB J.* **24**, 3462-3467 (2010).
- 小寺義男、朝長 毅: 血清・血漿バイオマーカー探索のための新しい前処理法の開発。実験医学別冊「創薬研究のためのタンパク質・プロテオミクス解析」97-103,羊土社, 東京, 2010年.

G-2. 学会発表 (招待講演)

- 朝長 毅: 国内のプロテオミクス研究拠点の動向, 日本ヒトプロテオーム機構第8回大会・第6回日本臨床プロテオーム研究会連合会, 千葉, 2010年7月.
- 朝長 毅: 近年のプロテオミクス技術の進歩とそのがん研究への応用, 第69回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010年9月.
- 朝長 毅: 最近のプロテオミクスの進歩 ~ターゲットプロテオミクス: 翻訳後修飾解析とSRMを用いた絶対定量~, 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010年12月.
- 久家貴寿: リン酸化プロテオーム解析による大腸癌バイオマーカー探索と検証, 第7回千葉疾患プロテオミクス研究会, 東京, 2010年

11月.

(一般講演)

- 田上真次, 柳田寛太, 児玉高志, 佐野聖三, 朝長 毅, 武田雅俊, 大河内正康: アルツハイマー病の発症予期診断バイオマーカー開発を目的とした脳脊髄液中のペプチド解析 amyloid beta42のサロゲートマーカー, APL1beta28について, 日本ヒトプロテオーム機構第8回大会・第6回日本臨床プロテオーム研究会連合会, 千葉, 2010年7月.
- 斎藤達也, 川島祐介, 肥後大輔, 山岸陽子, 曾川一幸, 朝長 毅, 前田忠計, 野村文夫, 小寺義男: SRM分析法を用いた血清中の診断マーカー候補タンパク質・ペプチドの定量分析, 日本ヒトプロテオーム機構第8回大会・第6回日本臨床プロテオーム研究会連合会, 千葉, 2010年7月.
- 川島祐介, 福富俊之, 朝長 毅, 高橋広樹, 松井 崇, 野村文夫, 前田忠計, 小寺義男: 血清を対象とした疾患ペプチドミクス, 日本ヒトプロテオーム機構第8回大会・第6回日本臨床プロテオーム研究会連合会, 千葉, 2010年7月.
- 高木さやか, 尾路祐介, 中村三千代, 福田茉莉, 中塚伸一, 青柳さやか, 辰巳直也, 朝長 毅, 三好新一郎, 根津理一郎, 青笹克之, 杉山治夫: eEF21gG抗体は胃癌、大腸癌、乳癌、非小細胞肺癌の早期診断に有用なマーカーである, 第69回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010年9月.
- 松下一之, 朝長 毅, 梶原寿子, 北村淳史, 佐藤 守, 島田英昭, 伊藤昭博, 松原久裕, 吉田稔, 野村文夫: 新規抗癌剤スプライソスタチンAの細胞毒性にはc-Myc転写抑制因子FIRのスプライシング阻害を伴うc-Myc発現増大がみられる, 第69回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010年9月.
- 梶原寿子, 松下一之, 朝長 毅, 糸賀 栄, 佐藤 守, 島田英昭, 北村淳史, 松原久裕, 吉田 稔, 野村文夫: c-myc転写抑制因子FIRとスプライシング制御因子複合体U2 snRNPとの相互作用メカニズムについて, 第69回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010年9月.
- 北村淳史, 松下一之, 滝口裕一, 多田裕司, 山中満佳子, 廣島健三, 島田英昭, 田川雅俊, 松

- 原久裕, 長谷川 謙, 朝長 毅, 巽 浩一郎, 野村文夫: 悪性胸膜中皮腫細胞移植マウスモデルを用いたc-myc転写抑制因子FIRセンダイウイルスベクターの治療効果, 第69回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010年9月.
8. 風見隆浩, 朝長 毅, 佐藤 守, 久家貴寿, 松下一之, 野村文夫: annexinA2の核内高発現は染色体不安定性に関与する, 第69回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010年9月.
 9. 足立 淳, 松田知成: E3ユビキチンリガーゼである芳香族炭化水素受容体(AhR)の標的タンパク質の探索, 日本ヒトプロテオーム機構第8回大会・第6回日本臨床プロテオーム研究会連合会, 千葉, 2010年7月.
 10. 足立 淳, 鳴海良平, 佐野聖三, 久家貴寿, 白水 崇, 松本雅記, 中山敬一, 茂木 章, 井倉 毅, 高田 穰, 朝長 毅: DNA損傷応答ネットワークにおけるリン酸化・ユビキチン化修飾ダイナミクスのプロテオーム解析, 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010年12月.
 11. 松田俊, 足立 淳, 井原 賢, 井倉正枝, 井倉毅, 松田知成: 芳香族炭化水素受容体(AhR)複合体のプロテオーム解析, 日本環境変異原学会第39回大会, 筑波, 2010年11月.
 12. 久家貴寿, 鳴海良平, 松本雅記, 中山敬一, 松原久裕, 松下一之, 野村文夫, 朝長 毅: 大腸癌臨床検体を用いた定量的大規模リン酸化プロテオーム解析, 日本ヒトプロテオーム機構第8回大会・第6回日本臨床プロテオーム研究会連合会, 千葉, 2010年7月.
 13. 久家貴寿, 松下一之, 野村文夫, 松原久裕, 中山敬一, 朝長 毅: 大腸癌の大規模リン酸化プロテオーム解析, 第69回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010年9月.
 14. 久家貴寿, 鳴海良平, 村岡 賢, 足立 淳, 松本雅記, 中山敬一, 松原久裕, 松下一之, 野村文夫, 長野一也, 角田慎一, 朝長 毅: 大規模リン酸化プロテオーム解析による大腸癌バイオマーカー探索, 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010年12月.
 15. 盛永敬郎, 阿部紘平, 長谷川智津, 久家貴寿, 岡本 彩, 久保田翔, 福本泰典, 中山祐治, 朝長 毅, 山口直人: Src型チロシンキナーゼ Lyn 会合分子の探索, 第54回日本薬学会関東支部大会, 東京, 2010年10月.
 16. 久保田 翔, 福本泰典, 盛永敬郎, 石橋賢一, 青山和正, 中山祐治, 久家貴寿, 朝長 毅, 山口直人: Src型チロシンキナーゼ Lynの核内基質の探索, 第54回日本薬学会関東支部大会, 東京, 2010年10月.
 17. 盛永敬郎, 阿部紘平, 長谷川智津, 久家貴寿, 岡本 彩, 青山和正, 福本泰典, 中山祐治, 朝長 毅, 山口直人: Lynの細胞内輸送に関わる会合分子の解析, 第9回次世代を担う若手フェーマ・バイオフィォーラム2010, 京都, 2010年10月.
 18. 盛永敬郎, 阿部紘平, 長谷川智津, 久家貴寿, 久保田 翔, 久保田将一, 福本泰典, 中山祐治, 朝長 毅, 山口直人: 接着細胞の浮遊化における膜係留型Lynの細胞内局在変化, 第32回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 富山, 2010年11月.
 19. 盛永敬郎, 阿部紘平, 長谷川智津, 久家貴寿, 青山和正, 久保田 翔, 福本泰典, 中山祐治, 朝長 毅, 山口直人: 接着細胞の浮遊化における内膜局在化Lynのダイナミクス, 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010年12月.
 20. 久保田 翔, 福本泰典, 盛永敬郎, 石橋賢一, 青山和正, 中山祐治, 久家貴寿, 朝長 毅, 山口直人: Lynのクロマチンにおけるチロシンリン酸化シグナリングの解析, 第131回日本薬学会年会, 静岡, 2011年3月.
 21. 久米秀明, 鳴海良平, 石濱 泰, 松原久裕, 松下一之, 野村文夫, 朝長 毅: 大腸癌組織膜タンパク質のプロテオーム解析, 日本ヒトプロテオーム機構第8回大会・第6回日本臨床プロテオーム研究会連合会, 千葉, 2010年7月.
 22. 久米秀明, 松原久裕, 松下一之, 野村文夫, 朝長 毅: 大腸癌組織膜タンパク質のプロテオーム解析, 第69回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010年9月.
 23. 久米秀明, 鳴海良平, 石濱 泰, 松原久裕, 松下一之, 野村文夫, 朝長 毅: 大腸癌の新たなバイオマーカーとなる膜タンパク質の探索, 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010年12月.
 24. 原 康洋, 朝長 毅: 乳癌転移に関わる

microRNA (miR-31)のターゲットタンパク質のプロテオーム解析, 日本ヒトプロテオーム機構第8回大会・第6回日本臨床プロテオーム研究会連合会, 千葉, 2010年7月.

25. 原 康洋, 朝長 毅: 乳癌転移に関わる microRNA (miR-31)のターゲットタンパク質のプロテオーム解析, 第69回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010年9月.
26. 鳴海良平, 久家貴寿, 松本雅記, 中山敬一, 石飛真人, 稲治英生, 宮本泰豪, 加藤菊也, 朝長毅: 定量的リン酸化プロテオミクスによる乳癌の予後不良群と予後良好群の比較, 日本ヒトプロテオーム機構第8回大会・第6回日本臨床プロテオーム研究会連合会, 千葉, 2010年7月.
27. 鳴海良平, 久家貴寿, 松本雅記, 中山敬一, 石飛真人, 稲治英生, 宮本泰豪, 加藤菊也, 朝長毅: 定量的リン酸化プロテオミクスによる乳癌組織の予後不良群と予後良好群の比較, 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010年12月.
28. 越中屋里香, 久家貴寿, 久米秀明, 鳴海良平, 足立 淳, 朝長 毅: 細胞核のプロテオーム解析による染色体不安定性関連タンパク質の探索, 日本ヒトプロテオーム機構第8回大会・第6回日本臨床プロテオーム研究会連合会, 千葉, 2010年7月.
29. 越中屋里香, 久家貴寿, 久米秀明, 鳴海良平, 足立 淳, 朝長 毅: 大腸癌細胞の細胞核プロテオーム解析による染色体不安定性に関連するタンパク質の探索, 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010年12月.
30. 佐野聖三, 田上真次, 大河内正康, 柳田寛太, 武田雅俊, 朝長 毅: MRM法におけるアルツハイマー病サロゲートマーカーAPL1Bの定量法の検討, 日本ヒトプロテオーム機構第8回大会・第6回日本臨床プロテオーム研究会連合会, 千葉, 2010年7月.
31. 金川章子, 尾野雅哉, 朝長 毅: 2DICAL法を用いた腎癌血漿バイオマーカーの探索, 日本ヒトプロテオーム機構第8回大会・第6回日本臨床プロテオーム研究会連合会, 千葉, 2010年7月.

(国際学会・一般講演)

1. Adachi, J. & Mann, M.: The human urinary proteome analysis and high-accuracy proteome database, MAPU. HUPO2010, Sydney, Australia, Sept., 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

I. 研究協力者

石濱 泰 京都大学大学院薬学研究科 教授
近藤 格 国立がんセンター研究所プロテオームバイオインフォマティクスプロジェクトプロジェクトリーダー
小寺 義男 北里大学大学院理工学研究科生体分子動力学講座 准教授
大河内 正康 大阪大学大学院・医学系研究科・精神医学教室 講師
田上真次 大阪大学大学院・医学系研究科・精神医学教室 講師
足立 淳 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
原 康洋 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
久米 秀明 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
久家 貴寿 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
白水 崇 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
村岡 賢 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
金川 章子 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
佐野 聖三 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
鳴海 良平 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
越中屋 里香 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
渡邊 史生 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
川崎 直子 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト

疾患関連タンパク質の解析基盤の研究

研究分担者 角田 慎一 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

本研究課題では、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の開発を目的に、バイオ医薬品の中心である抗体医薬の開発に資する基盤技術の開発を進めるとともに、がん治療の有効な標的として期待されるがん血管に発現する疾患関連タンパク質を効率よく絞り込む方法「血管プロテオミクス」の確立と応用を行った。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タンパク質の中からの効率の良い薬物標的の絞り込みに向け、ピオチン化試薬を利用したケミカルプロテオミクスを駆使することで、血管に発現するタンパク質を効率良く精製するとともに、がん血管をターゲットとしたがん治療薬の開発を可能とするものである。本研究では特に、転移がん治療に資する抗体医薬のターゲット分子の探索を目的に、リンパ腫を対象疾患として、がん血管に発現する変動タンパク質の同定とそれらの分子に対する抗体の治療薬としての可能性に関する検討を行った。種々の検討の結果、リンパ腫の血管において発現変動しているタンパク質群を MALDI-TOF-MS/MS 解析により数十種類同定すると同時に、それらに対する特異抗体が新規がん治療薬として利用できる可能性が示唆された。

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ターゲットタンパク質を探索・同定しようとする研究が、世界的規模で推進されている。疾患の発症や悪化といった病態に連動して発現が変化する「疾患関連タンパク質」があるが、とりわけ疾患の発症や悪化に直接関与している「創薬ターゲットタンパク質」、疾患治療に関与している「医薬品シーズタンパク質」が同定・バリデーションされることで、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。しかしこれまでのところ、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。この理由として、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タンパク質が、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タンパク質（疾患関連タンパク質）の中から真に有用な創薬ターゲットタンパク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。

がん血管内皮細胞は、古くからがん治療の標

的細胞として注目されており、がん血管の新生・増殖を効率良く阻止・抑制することで、がんの増殖を抑制出来ると考えられてきた。実際、がん血管の増殖を抑制することを目的としたバイオ医薬品も開発されており臨床的にも目覚ましい効果を示しつつあるところである。しかし、このようながん血管の新生・増殖を制御する分子の発見は極めて例が少なく、がん血管の新生・増殖に特異性を持つがん血管抑制薬の開発が期待されている。そのような背景のもと、我々は、新規創薬ターゲットタンパク質の絞り込みを目指した独自のケミカルプロテオミクスを推進し、血管に発現するタンパク質を効率良く濃縮できる *In vivo* biotinylation 法を検討している。本方法では、血管に発現するタンパク質をピオチン化試薬にて一挙にラベル化し、アビジンビーズなどで簡便に精製することで、他の組織血管発現タンパク質との比較解析から、特異性の高いタンパク質を見出す事ができる。この方法を利用し、がん血管に特異的に発現する分子を網羅的に探索・同定することができる。

本研究では、上記プロテオミクスの手法を駆使し、臨床的にも転移などで根治が難しいリンパ腫を対象疾患として、がんの転移薬にも効果

を示す、新規がん血管療法の確立に向けた、バイオ医薬品候補の創製を試みた。

B. 研究方法

B-1. 血管プロテオミクスの確立

(1) B 細胞移植マウスモデルの作製

マウス B 細胞リンパ腫 A20 細胞は ATCC より購入した。8 週齢の雌性 BALB/c マウスに対して、 2×10^6 cells/ml に調整した B 細胞リンパ腫を尾静脈より播種し、播種 26 日後のマウスを B 細胞リンパ腫転移モデルとして使用した。陰性コントロールとして同期間飼育した腫瘍非移植マウスを用いて、上記のリンパ腫転移モデルマウスとともに以下の実験に供した。

(2) In vivo biotinylation 法 (Figure 1A)

NHS-LC-Biotin は Pierce 社より購入した。NHS-LC-biotin は、フィルターにて濾過した 10% Dextran PBS (pH7.4) にて溶解し、使用前は 40°C の温浴にて加温しておいた。マウスをネプタールにて麻酔し、胸腔を切開したマウスの心臓の左心室より、1 mg/ml の濃度に調整した NHS-LC-Biotin を環流させた。環流後、NHS-LC-Biotin の反応を止めるため、10% Dextran 50 mM Tris-HCl (pH7.4) を環流させた。環流後、肝臓・脾臓・腸間膜リンパ節をそれぞれ回収し、-80°C の低温フリーザーにて保存した。

(3) ビオチン化タンパク質の精製

回収した臓器を Lysis buffer (2% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH7.4), 10 mM EDTA, complete (Roche)) 中でホモジネートした後、4,000 rpm, 4°C で遠心して溶解しきれなかった組織を除いた。さらに、ソニケーションにてタンパク質を溶解し、95°C で 20 分加熱した。加熱後のサンプルを 12,000 rpm, 20 分遠心し、完全に溶解できなかった組織を除いた。その後タンパク定量して濃度を決定した。

(4) ビオチン化タンパク質の消化

ヨードアセトアミドにて還元アルキル化した 5 mg (タンパク質量換算) の組織ホモジネートを、SA Sepharose (GE Healthcare) に添加することで、ビオチン化タンパク質をレジンに結合させた。非ビオチン化タンパク質を洗浄後、200 μ l の Digestion Buffer (50 mM Tris-HCl (pH8), 1mM CaCl₂) に懸濁し、1.6 μ g のトリプ

シンにて一晩消化した。消化後のサンプルは OMIX にて脱塩し、以下の実験に供した。

B-2. B 細胞リンパ腫における創薬ターゲットタンパク質の同定

(1) 質量分析機によるタンパク質の同定と定量

トリプシン消化後のペプチドを逆相クロマトグラフにて分離し (Ultimate nanoscale HPLC)、FAMOS microautosampler (LC Packings) にて MALDI プレートにスポットティングした。なお、溶液は、0.1% TFA 含有 H₂O ならびに、0.1% TFA 80% Acetonitrile を用いた。C18 のカラムを用いて分離した各ペプチドフラクションを MALDI-TOF-MS/MS にて解析し、各フラクションに含まれるペプチドの定性・定量分析を行った。なお、定性解析としてペプチド配列の解析には、Protein Pilot を用いて、また定量解析には、DeepQuanTR を用いた。

(2) 組織染色

凍結組織をクリオスタットにて 10 μ m の厚みに切り出した後、冷アセトンにて固定した。固定組織切片を同定されたタンパク質に対する抗体にて免疫組織染色を行った。なお、本検討で用いた抗体を以下に示す。rat anti-mouse activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166), rat anti-mouse CD98, rat anti-mouse BST-2 (129c), rat anti-mouse BST-2 (927) 以上 eBioscience より購入; rat anti-mouse endoglin, goat anti-mouse EMILIN-1, rabbit anti-mouse PECAM-1 以上 Santa Cruz Biotechnology より購入; rat anti-mouse transferrin receptor 以上 Abcam より購入; rat anti-mouse CD205 以上 AbD Serotec より購入; goat anti-mouse clusterin 以上 R&D Systems より購入; rat anti-mouse PECAM-1 以上 BD Biosciences より購入; mouse anti-human BST-2 以上 Abnova より購入。

B-3. 創薬ターゲットタンパク質の動態解析とその機能解析

(1) ヒトリンパ組織における発現挙動解析

Schleswig-Holstein 大学病院より提供をうけたヒトリンパ腫組織を用いて免疫組織染色を行った。6 μ m に薄切した凍結組織切片を抗 BST-2 抗体にて染色した。2 次抗体として HRP 標識抗マウス IgG 抗体を用いて、発色基質には Fast

Red (Sigma)を用いた。

(2) 抗 BST-2 抗体による腫瘍増殖抑制効果に関する検討

抗 BST-2 抗体の投与に伴う腫瘍増殖抑制効果の判定には、マウス A20 細胞 1×10^7 cells を皮下に移植したマウスを用いた。腫瘍移植 5 日後のマウスに対して、抗体を 5 mg/kg の投与量で尾静脈より投与し、陰性コントロールとして同アイソタイプ抗体を投与することで比較検討した。抗体の投与は 1 週毎に計 3 回行った。腫瘍体積の測定には以下の計算式を用いた。

腫瘍体積 = (長径) x (短径)² x 0.5

C. 研究結果

A20 リンパ腫移植マウスに対してピオチン化試薬を環流して、血管に存在するタンパク質をラベル化した。血管タンパク質がラベル化されているかどうかの確認のために、HRP 標識アビジンにて組織染色を行った。その結果、血管周囲が染色されていることが確認出来、がん転移組織においても血管がラベル化されていることが確認された。この組織に対して抗 CD31 抗体にて二重染色を行った結果、上記ピオチン化タンパク質との共存が確認されており、転移巣のがん血管がラベル化されていることが確実視された (Figure 1B)。この組織からピオチン化タンパク質を回収し、トリプシンにて消化した。消化後のペプチドを MALDI-TOF/MS/MS にて測定し、Protein Pilot にて定性解析するとともに、DeepQuantER にて定量解析を行った。2 種類以上のペプチドが同定されたタンパク質として、肝臓から 520 種類、リンパ組織から 295 種類、脾臓から 368 種類のタンパク質が同定された (Figure 2)。

発現量が上昇したタンパク質の内、同定された上位のタンパク質の中から候補となるタンパク質を 8 種類選択した。選択したタンパク質に対する抗体を用いて、移植したがん組織に対して免疫染色を行った (Figure 3)。これまでに報告のある腫瘍関連抗原である Transferrin Receptor や Endoglin 等の抗原の発現は低かったのに対して、BST-2 ならびに EMILIN-1 等の抗原は、血管に対して特異的かつ高い発現量を示すことが明らかとなった。

このうち BST-2 に対してさらなる検討を行

った。BST-2 の発現は正常の組織 (脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、リンパ節、腎臓、小腸、腎臓さらに筋肉) には見られなかったために、BST-2 抗体を用いた抗体医療の可能性に関する検討を行った (Figure 4)。上記の検討は、マウス腫瘍に関する検討であったため、よりヒトに近い検討を行うために、マウスに対してヒトのリンパ腫細胞株を移植した検討を行った。Ramos、DoHH-2、SU-DHL-4 細胞をマウスに移植し、BST-2 の発現を確認した (Figure 4)。その結果、リンパ腫の血管と BST-2 との共存が確認された。また、この血管に発現する BST-2 への集積性を確認するために、投与した抗体が実際に集積するかどうかに関する検討を行った。その結果、投与した抗体は腫瘍の血管に集積することが明らかとなった。

その結果を踏まえ、血管に集積する抗体が腫瘍増殖抑制効果を示すかどうかに関する検討を行った (Figure 5)。1 週間毎に 3 回抗体投与した結果、2 種類の抗体のいずれも、皮下移植した腫瘍の増殖抑制効果が確認された。さらに、ヒトのリンパ腫組織に BST-2 が発現しているかどうかに関する検討を行った。非ホジキンリンパ腫、播種性大 B 細胞リンパ腫、パーキンソン腫、マンデル細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ腫等の組織に対して BST-2 抗体を用いた免疫染色を行った結果、いずれの組織においても BST-2 が発現していることが明らかとなった。

D. 考察

本研究では、ケミカルプロテオミクスの技術を用いて、腫瘍血管に発現するタンパク質のプロテオーム解析を通じて、がん治療を目的とした創薬ターゲットの探索を行った。これまで、mRNA の発現等ジーンチップを用いた解析が行われており、腫瘍組織で高い発現を示す分子群の同定が行われてきている。しかし、血管を標的としたプロテオーム解析はまだまだ例が少なく、より特異的かつ選択的なターゲット分子の同定に期待が寄せられている。本研究で同定されたタンパク質群は、これまでの報告からも知られている分子群も数多く含まれていたが、血漿に含まれるタンパク質が同定されたことは、腫瘍部位での血液凝固を証明する意味でも興味

深い知見であると考えられる。

今回同定された BST-2 は TypeII の膜糖タンパク質であり、ミエローマ細胞に高発現するタンパク質として知られていた。本研究ではこのミエローマに発現するタンパク質が血管にも発現していることが明らかとなり、リンパ腫の新しいターゲットと分子として期待される。さらに、BST-2 に対する抗体が腫瘍増殖抑制効果を持っていたことから、今後、この分子に体する抗体医薬品の創製に期待が寄せられる。

E. 結論

本研究では、リンパ腫をターゲットとした新しいがん治療標的の探索を目指し、血管プロテオミクスを行った。その結果、新しい分子として BST-2 の発現があることを見出し、これらに対する抗体は新しいがん治療薬として利用できる可能性が示唆された。今後、さらなるターゲット分子の探索を行うとともに、新規バイオ医薬の開発に資する基盤技術の開発を行いたいと考えている。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Imai, S., Nagano, K., Yoshida, Y., Okamura, T., Yamashita, T., Abe, Y., Yoshikawa, T., Yoshioka, Y., Kamada, H., Mukai, Y., Nakagawa, S., Tsutsumi, Y. & Tsunoda, S. Development of an antibody proteomics system using a phage antibody library for efficient screening of tumor-related biomarker proteins. *Biomaterials* **32**, 162-169 (2011).

G-2. 学会発表

1. 角田慎一: プロテオミクスとプロテインエン지니어リングを活用した新規バイオ医薬の開発, 彩都バイオサイエンスセミナー, 2010 年 10 月.
2. 角田慎一: Search for cancer drug targets by antibody proteomics technology., 第 69 回日本癌学会総会, 大阪, 2010 年 9 月.
3. 鎌田春彦: 抗体工学を駆使した創薬ターゲットの探索技術, 日本薬学会第 131 年会, 静岡(静岡), 2011 年 3 月.
4. 山下琢矢, 長野一也, 岡村賢孝, 渡邊貴信, 金崎聡一郎, 今井直, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康史: 転移の制御を目指した肺がん関連蛋白質の探索, 第 26 回日本 DDS 学会学術集会, 大阪(大阪), 2010 年 6 月.
5. 渡邊貴信, 長野一也, 山下琢矢, 岡村賢孝, 金崎聡一郎, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康史: 新規乳がん分子標的治療法の開発を目指した Ephrin receptor A10 に対する scFv 抗体の創製, 第 26 回日本 DDS 学会学術集会, 大阪(大阪), 2010 年 6 月.
6. 金崎聡一郎, 長野一也, 山下琢矢, 岡村賢孝, 渡邊貴信, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康史: Ephrin receptor A10 の新規乳がん創薬標的としての有用性評価, 第 26 回日本 DDS 学会学術集会, 大阪(大阪), 2010 年 6 月.
7. Nagano, K., Yamashita, T., Imai, S., Abe, Y., Yoshikawa, T., Yoshioka, Y., Kamada, H., Tsutsumi, Y. & Tsunoda, S.: Identification and evaluation of novel breast cancer related biomarker proteins by antibody proteomics technology., 21st Meeting of the European Association for Cancer Research, Oslo (Norway), June, 2010.
8. Tsunoda, S., Nagano, K., Yamashita, T., Imai, S., Abe, Y., Yoshikawa, T., Yoshioka, Y., Kamada, H. & Tsutsumi, Y.: Identification and evaluation of tumor lymphatic endothelial cell-specific proteins by antibody proteomics technology., 21st Meeting of the European Association for Cancer Research, Oslo (Norway), June, 2010.
9. Kamada, H., Hirose, K., Inoue, M., Abe, Y., Nagano, K., Tsutsumi, Y. & Tsunoda, S.: Conformational and functional analysis for quality control of protein drugs using ion mobility mass spectrometry., HUP02010 World Congress, Sydney (Australia), Sept., 2010.
10. Nagano, K., Yamashita, T., Watanabe, T., Kanasaki, S., Yoshikawa, T., Yoshioka, Y., Abe, Y., Kamada, H., Tsutsumi, Y. &

Tsunoda, S.: Identification of lymph node metastasis-related proteins in lung cancer by antibody proteomics technology., HUPO2010 World Congress, Sydney (Australia), Sept., 2010.

11. Yamashita, T., Nagano, K., Watanabe, T., Kanasaki, S., Yoshikawa, T., Yoshioka, Y., Itoh, N., Abe, Y., Kamada, H., Tsutsumi, Y. & Tsunoda, S.: Identification of lymph node metastasis-related proteins in lung cancer by antibody proteomics technology., HUPO2010 World Congress, Sydney (Australia), Sept., 2010.
12. Watanabe, T., Yamashita, T., Nagano, K., Kanasaki, S., Yoshikawa, T., Yoshioka, Y., Itoh, N., Abe, Y., Kamada, H., Tsutsumi Y. & Tsunoda, S.: Proteomics-based analysis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in mice., HUPO2010 World Congress, Sydney (Australia), Sept., 2010.

H. 知的財産の出願・登録状況

H-1. 特許取得

発明の名称：抗体、乳がんの治療に用いられる医薬組成物、腫瘍検査方法、及び、腫瘍検査用試薬

出願日：2011年3月15日

発明者：角田慎二、長野一也、堤 康央

出願人：独立行政法人医薬基盤研究所

特願2011-57029号

H-2. 実用新案登録

該当無し

H-3. その他

該当無し

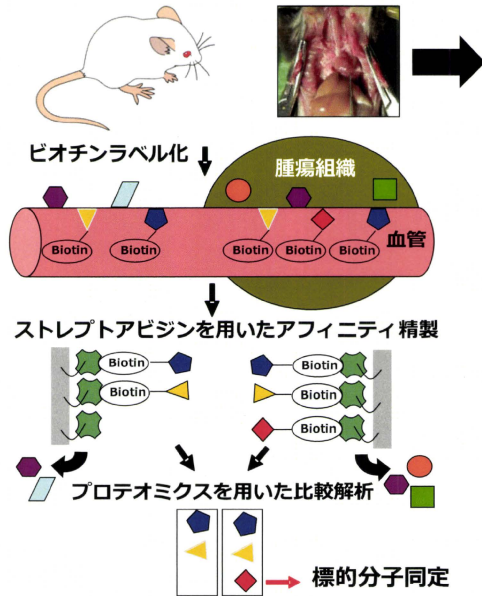
I. 研究協力者

鎌田 春彦 医薬基盤研究所 バイオ創薬プロジェクト

阿部 康弘 医薬基盤研究所 バイオ創薬プロジェクト

長野 一也 医薬基盤研究所 バイオ創薬プロジェクト

(A)



(B)

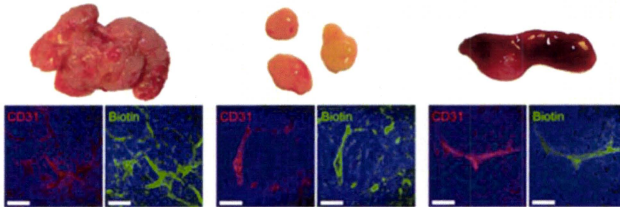


Figure 1. In vivo biotinylation of the bloodstream accessible tissue compartment in a syngeneic mouse model of B-cell lymphoma. (A) Healthy and lymphoma-bearing mice were subjected to the terminal perfusion with a reactive ester derivative of biotin, leading to the covalent modification of proteins accessible from the bloodstream. Tumors and corresponding normal organs were excised and homogenized for the preparation of total protein extracts. Biotin-tagged proteins were enriched on streptavidin Sepharose, on-resin digested with trypsin, resulting peptides were separated by nanocapillary reverse-phase HPLC, and submitted to the comparative proteomic analysis. (B) Streptavidin-based detection of biotinylated structures (green) in perfused lymphoma tissues harvested from liver, lymph nodes, and spleen, in relation to vascular endothelium (CD31, red). Scale bars represent 50 μ m.

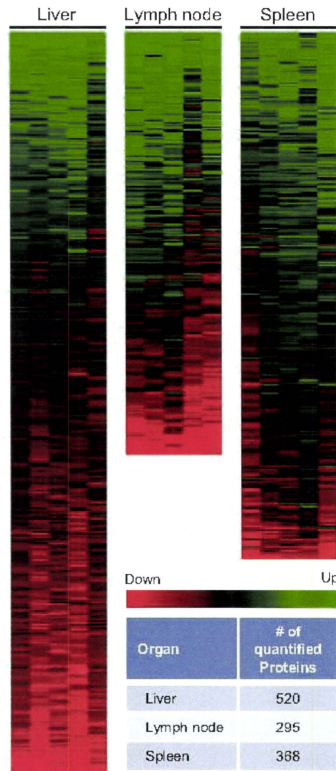


Figure 2. Selection of proteins overexpressed at all 3 lymphoma localizations.

A selection of proteins that were consistently found up-regulated at nodal and extranodal lymphoma localizations is shown. Protein abundances in 5 lymphoma samples are displayed for each organ/lymphoma pair with a color code related to the corresponding DeepQuanTR score (maximum \Rightarrow 6-fold up-regulation; minimum \Rightarrow 6-fold down-regulation). Proteins up-regulated in comparison to the average protein expression in the corresponding normal host organ are displayed in green, downregulated proteins in red. Proteins are sorted in descending order according to the average regulation score calculated from all 3 localizations.

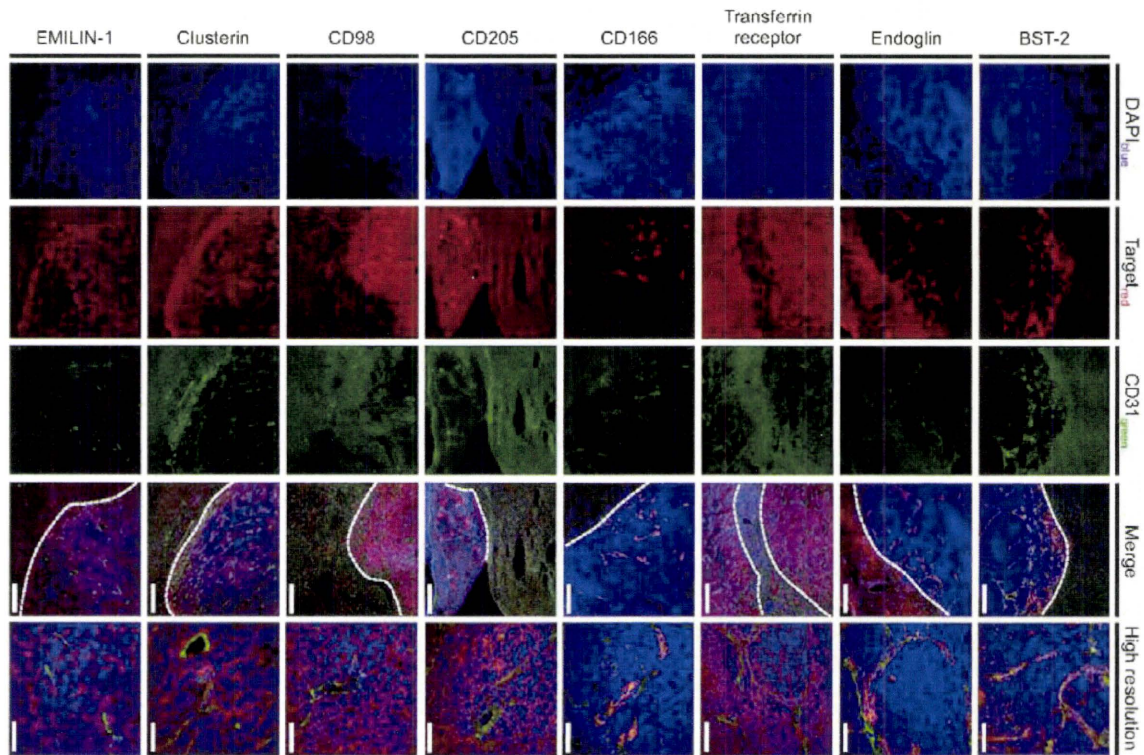


Figure 3. Validation of DeepQuanTR results.

Immunostainings of the lymphoma/normal liver border (scale bars represent 200 μ m) and with higher magnification of hepatic lymphoma lesions (scale bars represent 50 μ m) using antibodies against 8 candidate antigens found to be up-regulated in the proteomic analyses are presented. Proteins of interest are shown in red, CD31 in green, and nuclei in blue. Lymphoma nodules are easily identified by a higher cellular density. Costaining with CD31 revealed that proteins from different localizations within the bloodstream-accessible tissue compartments (vascular endothelial cells, subendothelial matrix and stroma, perivascular tumor cells) have been modified by in vivo biotinylation and identified using DeepQuanTR. Dotted lines in merged images indicate the tumor/liver border. Slides were viewed with an LSM510 Meta confocal microscope (Carl Zeiss). Images were acquired with the LSM510 Meta confocal laser scanning microscope and software provided by the manufacturer (Carl Zeiss). Images were manipulated using ImageJ software, Version 1.42q.

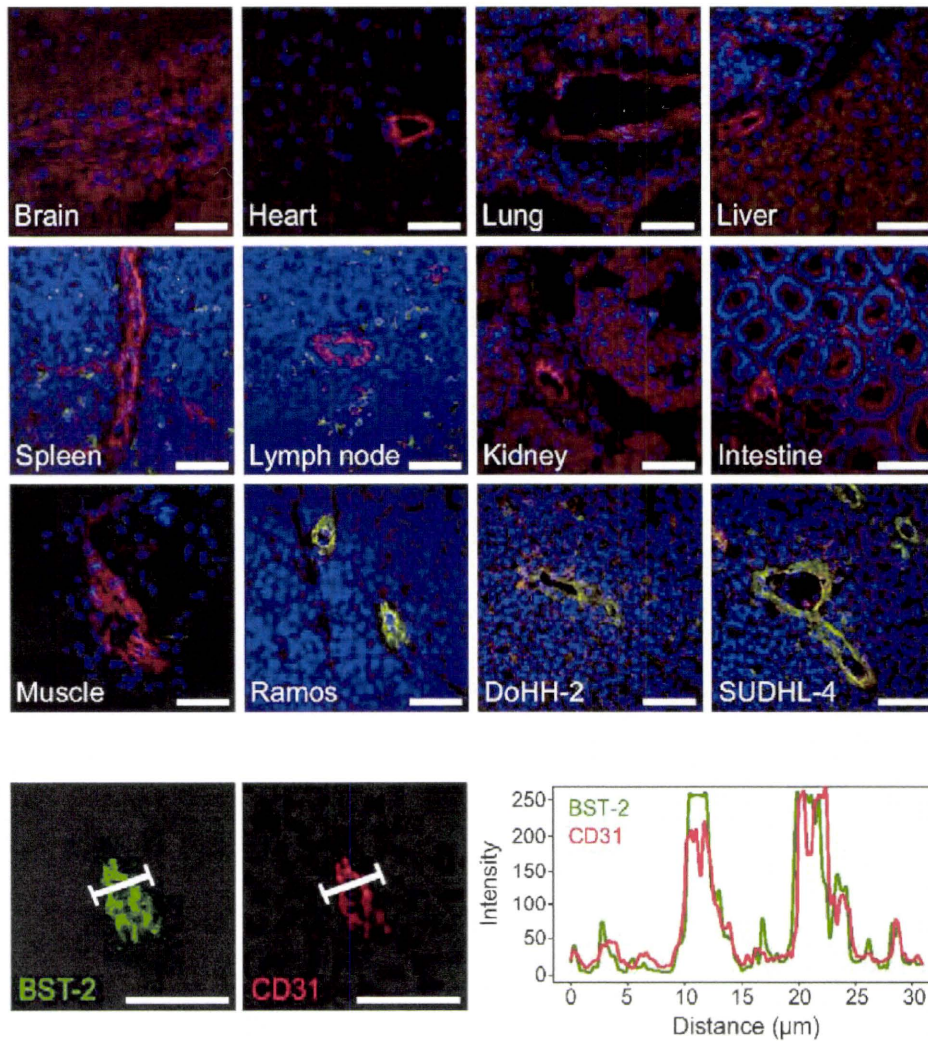
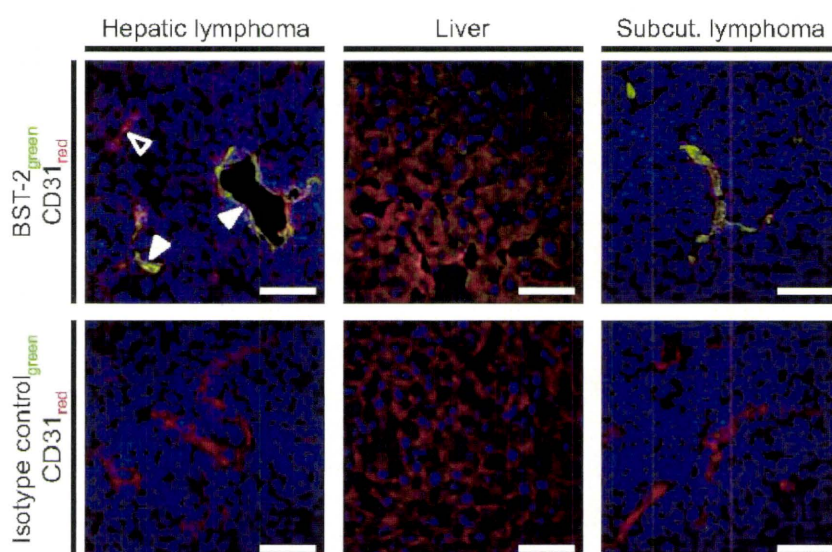


Figure 4. Expression of BST-2 in normal mouse organs and lymphoma xenografts. (A) Three-color confocal images of BST-2 staining (clone 129c, green), CD31 staining (red), and 4,6-diamidino-2-phenylindole counterstaining (blue) are shown. Although being undetectable in the vasculature of brain, heart, lung, liver, spleen, lymph nodes, kidney, intestine, and skeletal muscle, BST-2 was readily detectable in different lymphoma xenografts (Ramos, DoHH-2, SUDHL-4) in the same experiment, colocalizing to CD31 (yellow). As expected, a scattered cellular, but not vascular, expression of BST-2 was observed in lymphoid tissues. (B) Graphs displaying the spatial distribution of BST-2 and CD31 fluorescent signals in confocal microscopy were virtually superimposable. Scale bars represent 50 μ m. Slides were viewed with an LSM510 Meta confocal microscope (Carl Zeiss). Images were acquired with the LSM510 Meta confocal laser scanning microscope and software provided by the manufacturer (Carl Zeiss). Images were manipulated using ImageJ software, Version 1.42q.

(A)



(B)

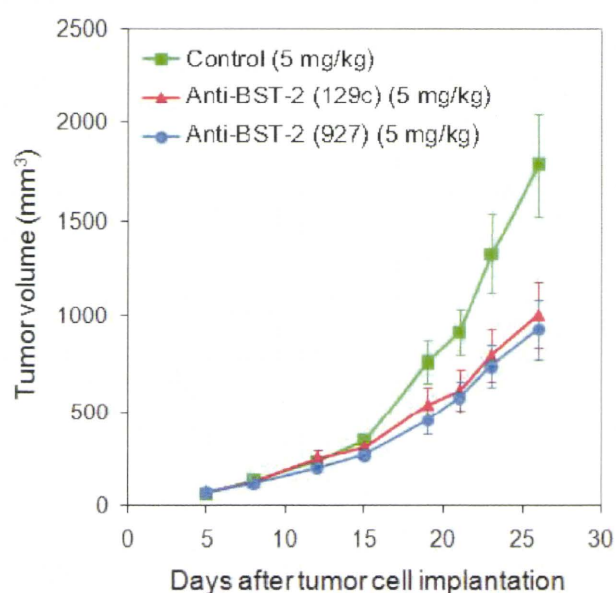


Figure 5. Monoclonal antibodies specific to BST-2 accumulate on lymphoma blood vessels and inhibit lymphoma growth in vivo. (A) A monoclonal rat anti-BST-2 antibody (clone 927) was intravenously injected into BALB/c mice bearing systemic or subcutaneous A20 lymphomas. Tumors and normal liver were excised 6 hours after injection, sectioned, and examined for the presence of rat IgG using donkey anti-rat Alexa Fluor 488 (green). Endothelial cells (CD31) were outlined in red. Although the anti-BST-2 antibody efficiently homed to lymphoma neovasculature in vivo (solid arrowheads), an isotype-matched control IgG did not accumulate on lymphoma blood vessels under identical experimental conditions. (B) Tumor growth curves of A20 lymphomas subcutaneously implanted into BALB/c mice, treated with anti-BST-2 antibody (5 mg/kg, 5 mice), anti-BST-2 antibody 927 (5 mg/kg, 5 mice), or isotype-matched control antibody (5 mg/kg, 4 mice). Treatment was administered intravenous once weekly for a period of 3 weeks. Both BST-2 antibodies significantly inhibited lymphoma growth ($P < .014$ and $P < .008$, respectively).

プロテオミクス手法による自己免疫疾患の活動性を把握する血清バイオマーカーの探索

研究分担者 仲 哲治 独立行政法人医薬基盤研究所 免疫シグナル
プロジェクトプロジェクトリーダー

研究要旨

近年、関節リウマチ等の自己免疫疾患に対して抗体医薬品が開発され、優れた治療効果を示している。その一方で、抗体医薬品による治療を受ける患者に対して疾患活動性を的確に把握できるバイオマーカーや抗体医薬品の奏功性予測マーカーの開発が必要とされている。

本研究では最新の定量的プロテオミクス手法(iTRAQ法)を用いてinfiximab(抗TNF-alpha抗体)治療前後の関節リウマチ患者血清タンパク質を比較解析した。その結果、leucine rich alpha-2 glycoprotein(LRG)がinfiximab治療前血清にて上昇している事を明らかにした。LRGは関節リウマチ、クローン病の活動性スコアとCRPよりも強く相関し、疾患活動性マーカーとして有用性を示した。さらに血中LRGはクローン病患者においてinfiximab感受性患者よりもinfiximab抵抗性患者にて高値を示したことから、infiximab治療奏功性マーカーとなりうる可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、関節リウマチなどの自己免疫疾患に対して優れた治療効果を発揮する抗体医薬品が開発され、臨床応用されている。代表的な抗体医薬品としてTNF-alphaに対するキメラ抗体であるInfiximab、完全ヒト型モノクローナル抗体であるAdalimumab、TNF-alpha受容体の細胞外ドメインとIgG Fcとの融合タンパク質であるetanercept、そして我が国初の抗体医薬品である抗IL-6受容体抗体(tocilizumab)などが開発されている。しかしながら、自己免疫疾患患者においては抗体医薬品に治療抵抗性を示すケースも見られることが報告されており(Ehrenstein.M et al. J.Exp.Med. (2007))、どの患者にどの抗体医薬品が奏功性を示すかは抗体医薬品を投与しない限り分からないというのが現状である。すなわち、抗サイトカイン療法の奏功性を予測するバイオマーカーや、活動性を正確に把握できるようなバイオマーカーが必要とされている。

本研究では質量分析計を用いたハイスルーブットな最新の定量プロテオミクス手法の一つであるiTRAQ法を用いて関節リウマチやクローン病などの自己免疫疾患患者において抗体医薬品投与前、投与後の血清を解析し、血清バイオマーカータンパク質を同定する事を目的とした。

B. 研究方法

iTRAQ法による関節リウマチ血清タンパク質の定量的プロテオーム解析

(1) 試料

抗TNF-alpha阻害抗体投与前、投与後の関節リウマチ、クローン病、及びベーチェット病患者血清は大阪大学医学部附属病院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) iTRAQ法による血清タンパク質の定量解析

血清タンパク質を解析する前に、アルブミンやIgGなど血清中に高発現する14種類のタンパク質は抗体アフィニティークラム(MARS Hu-14 (Agilent社))を用いて除去した。抗TNF-alpha阻害抗体投与前、投与後の関節リウマチ患者血清、及び5人の健康人血清を混合したコントロール血清について、抗体アフィニティークラム処理後得られた素通り画分を濃縮し、タンパク質定量キット(DC Protein Assay kit (Bio-Rad Laboratories社))にてタンパク質定量を行い、血清タンパク質の前処理を行った抗TNF-alpha阻害抗体投与前及び投与後の関節リウマチ患者血清、及び、5人の健康人血清を混合したコントロール血清タンパク質100 μ g

つをトリプシン消化後、iTRAQ(isobaric tag for relative and absolute quantitation)試薬にて標識した(iTRAQ114: 抗 TNF-alpha 阻害抗体投与前、iTRAQ115: 抗 TNF-alpha 阻害抗体投与後、iTRAQ117: 健康人コントロール血清)。iTRAQ 試薬で標識後、1 つに混合し、陽イオン交換 HPLC にてペプチドを 24 分画し、脱塩後、質量分析計(LTQ Orbitrap XL)により血清タンパク質を解析した。質量分析計により得られたデータは Proteome discoverer ソフトウェアで解析することにより抗 TNF-alpha 抗体阻害抗体投与前後において発現変動を示すタンパク質の同定と定量を網羅的に行った。

(3) ELISA 法による血中 LRG 濃度の定量と疾患活動性との相関についての解析

同定されたタンパク質について、抗 TNF-alpha 阻害抗体投与前にて高発現を示す血清タンパク質を抽出する。Human LRG immuno assay kit (IBL 社)を用いて、関節リウマチ、クローン病、パーチェット病などの患者血清中の LRG 濃度を定量し、従来の炎症マーカーである CRP との相関関係を統計学的に調べた。抗 TNF-alpha 阻害抗体有効例、無効例の患者血清中の LRG を定量し、抗体医薬品の選択を可能とするバイオマーカータンパク質の有用性を統計学的に評価した。

(倫理面への配慮)

インフォームドコンセント

本研究は大阪大学医学部医学倫理委員会、及び、医薬基盤研究所研究倫理審査委員会にて承認された研究計画書、「個人情報保護法」、「臨床研究に関する倫理指針(平成 20 年厚生労働省告示第 415 号)」に準じて実施した。対象患者に対し、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し、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

血清 8ml を提供していただく。試料は、基盤研、免疫シグナルプロジェクトの鍵のかかる冷凍庫内に保管する。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

(1) iTRAQ 法による抗 TNF-alpha 抗体阻害前後の関節リウマチ血清タンパク質の定量的プロテオーム解析

Infliximab 治療前後の同一の関節リウマチ患者血清について iTRAQ 法を用いた血清プロテオーム解析を行った結果、326 個の血清タンパク質を同定した。Infliximab 治療 12 週後(低疾患活動期)と比べ、Infliximab 治療前(高疾患活動期)において 1.5 倍以上に高発現を示すタンパク質が 31 個、逆に 0.67 倍以下に発現低下を示すタンパク質を 40 個同定した(表 1)。治療前に高発現するタンパク質には CRP の様な既知の炎症マーカータンパク質も含まれていた。本解析の結果、Infliximab 治療 12 週後と比べ、Infliximab 治療前に高発現を示すタンパク質の 1 つとして leucine rich alpha 2 glycoprotein (LRG) の血中濃度が 3.89 倍に上昇していることを明らかにした。異なる関節リウマチ患者血清の抗 TNF-alpha 阻害抗体治療前後の血清タンパク質を解析した結果、同様に LRG の血中濃度が治療前にて高発現していることから、LRG は治療前(高疾患活動性期)にて発現が上昇するタンパク質であることが判明した。LRG は血清タンパク質であるが、これまで詳細な機能は報告されていない。そこで、我々は LRG が関節リウマチの活動性マーカーなどのバイオマーカーとなり得るのではないかと考え、ELISA 法を用いて、さまざまな患者血清中の LRG 濃度を解析することにした。

(2) 血清 LRG のバイオマーカーとしての有用性の評価

Infliximab及びetanercept(完全ヒト型可溶性TNF α レセプター製剤)治療前後の血清LRG濃度をELISA法にて測定した。その結果、治療前が高値を示していた血清LRG濃度治療後には多くの例で減少していることが判明した(図1)。

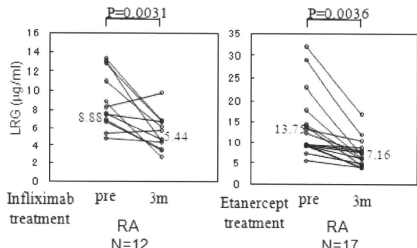


図1 血中LRG濃度は抗TNF α 阻害抗体による治療前の患者血清では高値を示すが、治療後により低下する

続いて、抗TNF阻害抗体治療前の血清LRG濃度を、関節リウマチ以外にもクローン病、ベーチェット病について解析した結果、いずれの疾患群においても血中LRG濃度は健康人よりも有意に高値を示した。このことから、LRGは関節リウマチに特異的な分子ではないものの、様々な自己免疫疾患患者において疾患活動性と相関することが示唆された(図2)。

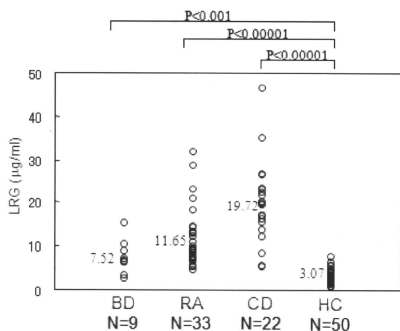


図2 血中LRG濃度は関節リウマチのみならず、ベーチェット病、クローン病においても高値を示す

ベーチェット病、関節リウマチ、クローン病患者血清中のLRG濃度とCRP濃度の相関関係を調べた結果、LRGはCRPと正の相関関係を

示した(図3)。しかしながら、LRGはIL-6との間には相関関係が認められず、LRGは炎症時に発現が認められるが、CRPとは異なる機序で発現が制御されていることが示唆された。次に、関節リウマチ患者において、血中LRGが関節リウマチの活動性スコアと相関するか調べるために、血清中のLRG濃度と関節リウマチ患者の疾患活動性スコア(DAS28-CRP)との相関関係を解析した。その結果、血中LRG濃度はDAS28-CRPと正の相関を示し、CRPよりも優れた相関関係を示したことから、関節リウマチの新たな疾患活動性マーカーとしての有用性が明らかとなった(図4)。

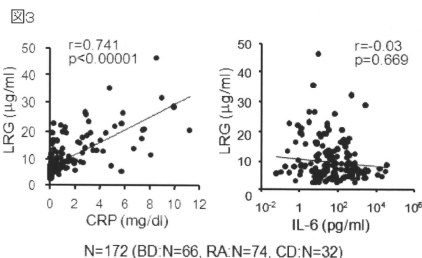


図3 血中LRG濃度はCRPと正の相関を示すが、血中IL-6濃度とは相関関係を示さない

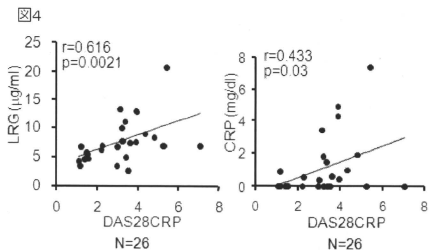


図4 血中LRG濃度は従来の疾患活動性マーカーであるCRPよりも関節リウマチの活動性スコア(DAS28CRP)と強く正の相関関係を示す

血中LRG濃度が関節リウマチ以外の自己免疫疾患において活動性マーカーとしての有用性を調べるため、クローン病の活動性スコア(CDAI)との相関関係を解析した。その結果、CRPはCDAIと相関関係を示さなかったが、LRG濃度はCDAIと相関関係を示した(図5)。従って、

LRG はクローン病においても疾患活動性マーカーとしての有用性が示された。

クローン病患者において、CRP 値が正常値 (CRP<0.2) でありながら、疾患活動性の高い (CDAI 値>150) 患者について、血中 LRG 濃度を調べた結果、多くの患者において LRG 濃度が高値を示したことから、血中 LRG 濃度は CRP では検出できない疾患活動性の高い患者を検出することも可能と考えられた (図 6)。

クローン病患者において infliximab 治療有効例、無効例それぞれ 6 例ずつについて、infliximab 治療前の患者血清中の LRG 濃度を測定した結果、LRG 濃度は infliximab 治療有効例に比べ、無効例で高値を示したことから、血中 LRG 濃度は infliximab 治療奏功性予測マーカーとしての有用性が示唆された (図 7)。

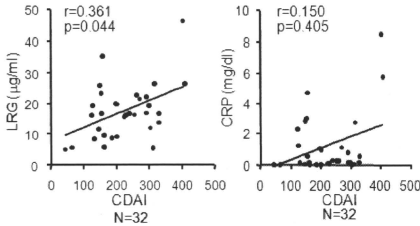


図 5 クローン病において、CRP はクローン病の活動性スコア(CDAI)と相関関係を示さないが、血中 LRG 濃度は CDAI 正の相関関係を示す

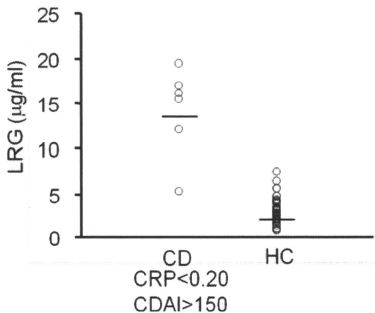


図 6 血中 LRG 濃度は CRP が正常値であるが活動期のクローン病患者において高値を示す

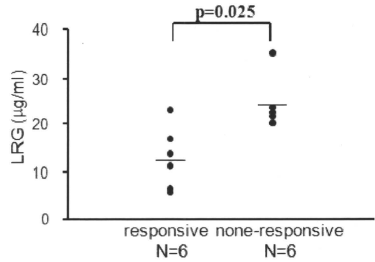


図 7 クローン病患者において血中 LRG 濃度は抗 TNF-alpha 阻害抗体の予想マーカーとしての有用性が示唆された

E. 結論

本研究にて、抗 TNF-alpha 阻害抗体投与前及び投与後の関節リウマチ患者血清を iTRAQ 法にて解析した結果、LRG が治療前患者血清で高値を示すことを明らかにした。関節リウマチ、クローン病において、従来の疾患活動性マーカーである CRP よりも血中 LRG 濃度は疾患活動性と強く相関することから、新規疾患活動性マーカーとしての有用性が示唆された。また、クローン病においては、血中 LRG 濃度は抗 TNF-alpha 阻害抗体の奏功性予測マーカーとなり得る可能性が示唆された。LRG はその他の自己免疫疾患においても疾患活動性マーカーとしての有用性が期待される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Serada, S., Fujimoto, M., Ogata, A., Terabe, F., Hirano, T., Iijima, H., Shinzaki, S., Nishikawa, T., Ohkawara, T., Iwahori, K., Ohguro, N., Kishimoto, T. & Naka, T. iTRAQ-based proteomic identification of leucine-rich alpha-2 glycoprotein as a novel inflammatory biomarker in autoimmune diseases. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 770-774 (2010).
2. Kim, A., Serada, S., Enomoto, T. & Naka, T. Targeting annexin A4 to counteract