

**Figure S3.** Processing of BNP. Time course for BNP(1–32) proteolysis in serum (**A, C**) and plasma (**B, D**). Plasma sampling tube contains ethylenediaminetetraacetate-2Na and aprotinin. Commercially available BNP(1–32) was added at 200 fmol/mL immediately after drawing blood from a healthy volunteer (**A, B**) and from a patient (**C, D**). (**E**) Processed endogenous BNP was not detectable in plasma from a healthy volunteer. (**F**) The degradation patterns of endogenous BNP in serum (upper 4 panels) and plasma (lower 4 panels) from a patient. Detected signals are summarized in (**G**). + indicates signals which were detected, and – indicates signals which were not detected.

## 新しい動脈硬化のバイオマーカー開発 ——新しいプロテオーム技術を用いて

東京大学大学院医学系研究科循環器内科  
同 ユビキタス予防医学講座

あいざわけんいち  
相澤健一  
すずきとほる  
鈴木亨

### はじめに

われわれは動脈硬化疾患のバイオマーカー探索を主な研究テーマとしている。急性疾患として、平滑筋ミオシン、クレアチンキナーゼ BB アイソザイム、最近ではカルポニン（平滑筋トロポニン様蛋白）および D-ダイマーが急性大動脈解離のバイオマーカーであることを相次いで明らかにしてきた。慢性疾患として、酸化 LDL の測定系を開発した。これらの酵素免疫法を用いたアッセイの一部はすでに一般臨床の現場で用いられているが、最近、この十年間においてはプロテオミクス（質量分析）等の新しい技術が注目されている。

われわれはこの分野に最新の技術（免疫質量分析法、プロテインチップ法）を導入し、その臨床応用を行い貢献してきた。一例として、冠動脈再狭窄の除外診断に役立つ有望なバイオマーカーを開発した。このアッセイは心臓特異的蛋白がプロセスされたペプチド産物を質量分析計で測定するものだが、冠動脈再狭窄、すなわち強い冠動脈疾患患者におけるペプチダーゼ反応を検出するものである。予備試験では感度100%であり、再狭窄の除外診断として信頼できる結果を得た。本バイオマーカーを用いた再狭窄の予知が可能か検討したところ、同様の結果を得た。予備試験結果ではあるが、本結果は期待できるものであり、はじめ

てのプロテオームを用いたバイオマーカーとして臨床応用可能なバイオマーカーとなる見込みである。

本稿の前半では、酸化 LDL を中心とした動脈硬化におけるメカニズムおよびバイオマーカーについて、後半では、最近のプロテオミクス解析技術を用いたエピジェネティクス研究の成果と、同技術を心血管病態の解析（バイオマーカー等）を中心とした医療に応用する試みを中心に概説する。

### 動脈硬化形成に重要な蛋白の変性

動脈硬化は多因子が関与する複雑な病態である。脂質異常のみならず、血管内皮細胞機能障害、血管平滑筋細胞障害、脂肪細胞の機能不全、炎症、石灰化などさまざまな要素が関係する。中でも、最近、社会的にも注目を浴びるメタボリックシンドロームを背景として発症する心血管疾患等の生活習慣病は、その発症前に非常に長い潜伏期間を有するが、この間に経年的な蛋白質の変性病態が進行する。このように、長い潜伏期間において蛋白質は、発現調節、プロセッシング、化学修飾、相互作用等の多段階にわたる制御を受けるが、病態・老化変性等の場合、さらに経時的変化による制御が加わる（図1）。よって、蛋白質の

[Key words] バイオマーカー, 急性大動脈解離, 酸化 LDL, 冠動脈再狭窄

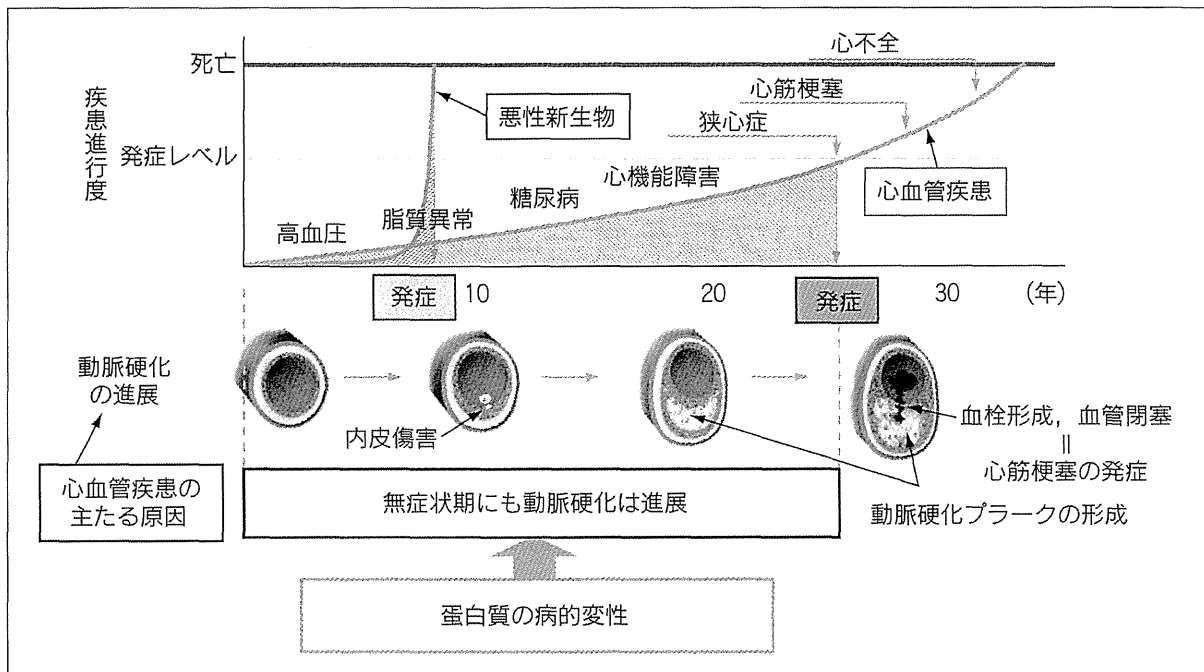


図1 心血管病の形成過程と蛋白質の変性

心血管疾患等の生活習慣病は、発症前に非常に長い潜伏期間を有するが、この間に経年的な蛋白質の変性が進行する。

質的・量的変化の時空間的な制御の理解は、ヒトの多様性や疾患発症の個人差をはじめテーラーメイド（個別化）医療の解明の鍵となると考えられる。とくに成人後に罹る疾病（心血管疾患，生活習慣病）については，発症時期の情報として蛋白質の動態ならびにその変化に関する情報は重要である。

### 多様な LDL の変性と酸化 LDL の測定

LDL は 540 kD の巨大分子であるアポ蛋白 B（アポ B）とコレステロール，リン脂質，中性脂肪などの脂質から構成され，活性酸素により不飽和脂質の過酸化が生じる。この過程で，脂肪酸の分解産物として各種のアルデヒドやケトンが生じるが，これらの反応性分子がアポ B を修飾し，LDL を変性させた結果，酸化 LDL が生じる。すなわち，酸化 LDL は LDL が多様な酸化修飾を受けているため，不均一な成分構成からなる（図 2）。

酸化 LDL の臨床的意義を明らかにするうえで，

末梢血中の酸化 LDL の濃度を測定することは心血管疾患のリスク管理のうえで有用性が高い。最近，LDL におけるホスファチジルコリンの酸化を抗酸化ホスファチジルコリン抗体と抗アポ B 抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法で測定する系が開発された<sup>1-4)</sup>。この測定法によると，血中の酸化 LDL 値は冠動脈疾患患者で有意に高値であり，総コレステロール (TC)，中性脂肪 (TG)，LDL コレステロールなどの従来の脂質マーカーに比較しても感度・特異度とももっとも高い相関を示した<sup>3)</sup>。とくに，若年男性において顕著な相関があり，若年男性の心血管イベント抑制を目標とした早期介入に役立つものと思われる。その他，いくつかの横断的な研究により，臨床的な冠動脈疾患と LDL の酸化修飾の関与が示された。酸化 LDL 値は狭心症（不安定・安定いずれも）患者群と比較し，心筋梗塞患者群で高値を示した<sup>1,4)</sup>。

脂質酸化物のうちもっとも代表的なものが LDL であり，量も豊富である。これがアポ B のリジン残基に結合したものが，マロンジアルデヒド化

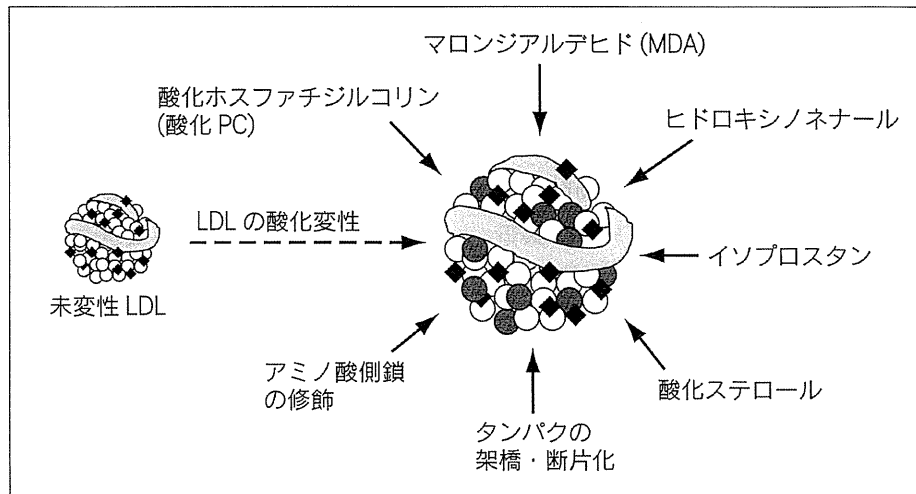


図2 多様な LDL の酸化修飾  
LDL はホスファチジルコリン (PC) の酸化や、MDA 化など、多様な酸化修飾を受ける。

LDL (MDA-LDL) である<sup>5,6)</sup>。MDA-LDL は酸化 LDL を直接的にみたものではないが、血中の酸化 LDL がきわめて微量なのに比べると、量的に豊富であり、測定が容易である。

### 酸化 LDL (MDA-LDL) 測定の臨床的意義

最近、末梢血中の MDA-LDL の測定法が開発され、臨床的意義が検討された。糖尿病患者において、経皮的冠動脈インターベンション (PCI) 治療を行った症例について再狭窄群、非再狭窄群における MDA-LDL 値の比較をした。MDA-LDL 値は、PCI 治療の再狭窄や冠動脈イベント発症と関連した<sup>7)</sup> (図 3)。血清中 MDA-LDL 値は、冠動脈疾患既往歴のある糖尿病患者における予後予測マーカーとして、また糖尿病患者における経皮的冠動脈形成術等による治療後の再狭窄予測マーカーとして有用と考えられる。MDA-LDL は2008年6月に保険収載された。保険点数は検体検査料200点、判断料144点で、冠動脈疾患既往歴のある糖尿病患者において、冠動脈疾患発症に関する予後を予測する目的で測定する場合、3ヵ月に1回算定できる。また、糖尿病患者において PCI 時に、治療後の再狭窄に関する予

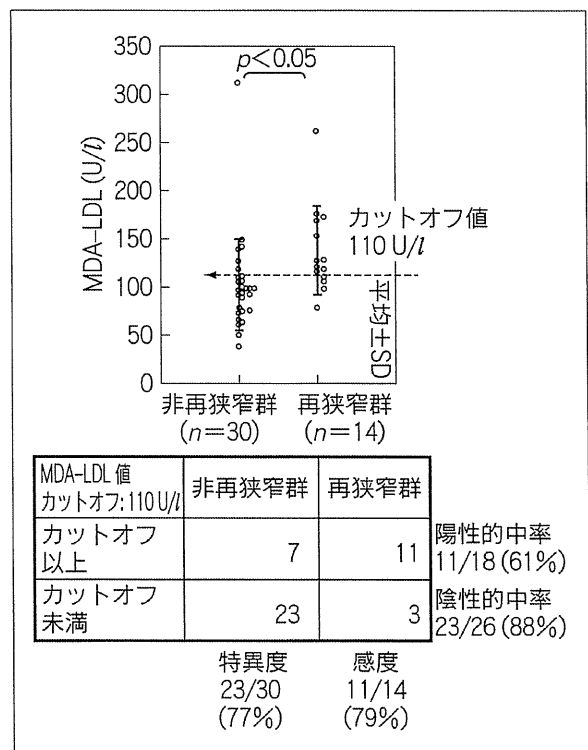


図3 経皮的冠動脈インターベンション治療を行った糖尿病患者の再狭窄群、非再狭窄群における MDA-LDL 値の比較  
糖尿病患者では MDA-LDL 値は、経皮的冠動脈インターベンション治療の再狭窄や、冠動脈イベント発症と関連した。  
(文献7より引用)

後予測を目的として測定する場合は、術前1回算定できる。今後、広く日常診療に用いられるものと考えられる。

大規模臨床スタディにおいて、MDA-LDLおよび被修飾LDLに対する自己抗体が頸動脈の動脈硬化進展に関与することも示されている。最近の研究では、従来のリポ蛋白や伝統的な冠動脈リスク因子に比べ、血漿中の酸化LDL濃度が心血管疾患イベント発症のもっともよい予知因子であることが示された<sup>8)</sup>。今後も、動脈硬化のさまざまな段階において酸化LDLを測定することにより、酸化LDLの有害作用を示す特異的な作用が病態生理の分子メカニズムが解明されるであろう。

さらに、酸化LDLの増加は安定プラークから脆弱な不安定プラークへの移行に関与する可能性もある。最近の研究により、酸化LDLはヒトの血管内皮細胞と単球由来のマクロファージにおけるMMP (matrix metalloproteinase)-1およびMMP-9を促進することが明らかになった。また、酸化LDLはヒトの冠動脈において、MMP-1, MMP-3を制御することも示されている。この作用は、内皮受容体であるLOX-1を介して行われる。さらに、酸化LDLはCD40/CD40Lシグナル伝達経路を契機とし、炎症様反応を引き起こし、内皮障害を惹起すると考えられている。このように、酸化LDLは血管壁における脂質の蓄積だけでなく、MMPや組織因子の発現およびアポトーシス誘導など、幅広い炎症作用を示すことにより、動脈硬化プラークの不安定化や破綻および血栓形成に関与すると考えられている。

## プロテオミクス解析とは

プロテオミクス解析とは通常、静的状態における蛋白質とその機能を包括的に解析し、その機能を理解することを目的とする。疾患関連因子の発現する時間的差異を明らかにすることは病態生理を理解するうえで重要である。何故なら、単一遺伝子に基づく遺伝性疾患は生後間もないころか

ら、そのフェノタイプを生じる。一方、癌や生活習慣病などの後天的疾患の発症には遺伝的素因以上に環境因子の影響が大きいと考えられる。遺伝子発現調節機構が重要であることはもちろんである一方、青年期以降における変化は主に蛋白レベルにより制御されていると考えられる。

DNAに書き込まれた遺伝情報はRNAを介して蛋白質へ翻訳される。実際、ヒトゲノムの配列の解読が終了した現在では、RNAの発現プロファイルと蛋白質の発現プロファイルは必ずしも一致するわけではなく、その相関は50%以下であるともいわれている<sup>9)</sup>。したがって、蛋白レベルの研究が、疾患の発症や伸展を理解するうえで理想的かつ重要である。本稿の後半では、蛋白に影響を及ぼす分子レベルでの変化に着目して、疾患における蛋白制御機構を明らかにする。さらに、制御機構の理解に留まらず、関連蛋白に着目した診断ツールの開発および治療薬のターゲットとしての可能性を概説する。

## プロテオミクスを支える質量分析の技術革新

質量分析法とは、質量分析装置(MS)を用いて蛋白質やペプチドのような試料をイオン化し、得られたイオンを質量/電荷(m/z)に従い分離して、その強度を測定することにより試料の質量を決定する方法である。本邦においては田中耕一氏がMALDI-TOF/MS(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-time of flight Mass Spectrometry)の原理を開発し、2002年にノーベル化学賞(生体高分子の同定および構造解析のための手法の開発)を受賞したことで広く知られるようになった。試料にレーザーを照射することにより、エネルギーを受けてイオン化した蛋白質は一定の電圧で加速され、真空管の対局にあるイオン検知器へ向かって飛行する。イオン検知管に到達するまでの時間は軽い分子ほど早く、重い分子ほど遅いので、飛行時間を計測することによって、物質の質量数を求めることができる。1サンプル

の測定に要する時間は約1分であり、他の方法に比べて非常に短い時間で測定可能である。MSを使えば、蛋白質を同定したり、蛋白質の動態を調べたり、翻訳後の修飾や蛋白質-蛋白質相互作用などを分析することができる。

## プロテオミクスを用いた バイオマーカー蛋白の探索

最近、プロテオミクスを疾患の早期診断や、病因の解明、さらに創薬研究への適応など、医療技術に応用する試みがなされている。心血管および癌などの疾患の早期診断や進行状況のモニタリングを可能にするバイオマーカー蛋白質の同定は、医療現場に直接応用することが可能であり、臨床的価値が高い。この考えは、古くからあったものではあるが、近年の質量分析機器の性能が向上により、それに答えることが可能になりつつある。いわば、古くからある疑問に対し、新たな道具で答える試みである。

われわれの研究グループは、前述したようなプロテオミクスを血中の新規疾患関連蛋白の発見とその機能解析について行っている。血液中から新規蛋白を同定し、診断目的のバイオマーカーとして活用する。また、生理活性物質については治療目的に利用することを目標としている。われわれは今までも血管平滑筋をマーカーとして急性大動脈解離の血液診断<sup>10~13)</sup>および、酸化LDLをマーカーとして虚血性心疾患の診断等を開発してきた<sup>3,4,14)</sup>。このような背景とノウハウを元に、今から約10年前より、質量分析計を用いたプロテオミクス手法による新規の心血管病態に関連する蛋白を同定・解析を行っている。

実際にプロテオミクス技術を用いて血中から蛋白を同定する場合に、大きく2つの重要な点がある。ひとつは、質量分析計(MALDI-TOF/MSを基本とした高感度の測定機器)、もうひとつは試料の分画方法である。血液検体を扱ううえでは試料の分画が、質量分析計の感度以上に重要である。血液中にはアルブミン、IgG、ハプトグロビ

ンなど約20の蛋白が恒常的に大量に存在するため、目的の微量蛋白の検出が困難になる。現在では、これらの大量な蛋白を除去する前処置の方法が確立され、キット化されている。しかしながら、目的の蛋白がたとえばアルブミンに結合して存在する場合には、この前処置は目的蛋白の解析を困難にする。このような場合、前処置としてイオン交換や、金属アフィニティー精製などが必要である。これを簡便に行えるようにしたものがProteinChip<sup>TM</sup>システムである。さまざまなリガンドをチップの上に固定し、これに血清などの体液資料を添加する。リガンドに結合した蛋白質に直接レーザーを照射し、MALDI-TOF/MS法で質量分布のスペクトラムを得る方法である。チップの表面加工が特徴的なことからSurface-Enhanced Laser Desorption/Ionization-time of flight Mass SpectrometryつまりSELDI法と呼ばれる(Bio-Rad)。プロテオミクス技術が医療分野で実践的な真価を発揮するためには、このような簡便な方法が向いているであろう。これまでに、卵巣腫瘍や前立腺腫瘍等の腫瘍性疾患においてバイオマーカーを同定した報告がある<sup>15,16)</sup>。

伝統的には、二次元電気泳動法や免疫学的手法を用いた分離方法が主流である。二次元電気泳動法は等電点電気泳動(一次元目)とSDS-PAGE(二次元目)を組み合わせたゲル内電気泳動であり、蛋白の分離能が高い。また、質量分析計の苦手とする高分子領域(5 kD以上)の蛋白も容易に分離可能である。一方、熟練を要し、時間がかかること、また再現性に乏しいことが欠点である。最近では、二次元電気泳動を液相で行うことが可能なシステムPF-2D<sup>TM</sup>システム(Beckman Coulter)も開発されてきており、ハイ・スループットの解析も可能になりつつある。われわれもこの方法を用い糖尿病モデル動物を用いて、脂質異常症に関するディファレンシャル解析に成功した<sup>17)</sup>。

一方、特異抗体を用いた免疫分離法も効果的な分離法である。この手法は、目的の蛋白が決まっている場合に有効である。疾患時には蛋白の修飾

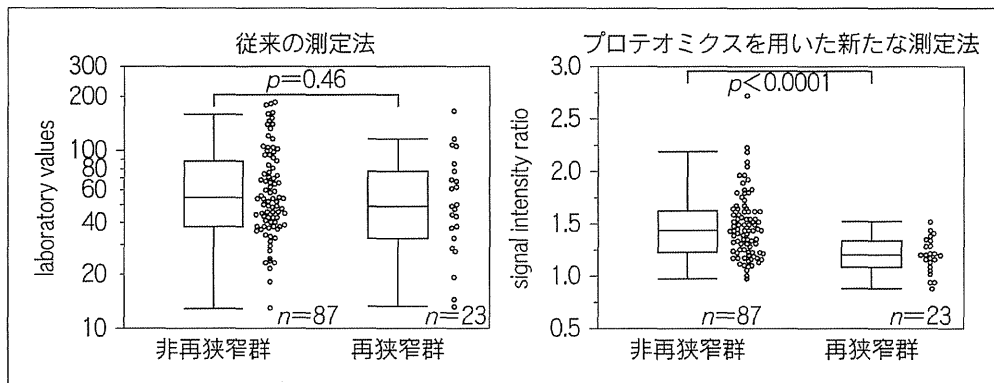


図4 非再狭窄群と再狭窄群の臨床背景比較

左図は従来のEIA法で測定した因子X値との相関を示し、右図は再狭窄と因子X値シグナル強度比との相関を示す。

とともに、蛋白の断片化が行われることがあり、蛋白の特徴的な変化を検出することが重要と考えられる。たとえば、心筋トロポニンNの断片化および修飾が心疾患に特徴的に認められ、臨床的指標として役に立っている<sup>18,19)</sup>。

### プロテオミクス診断の可能性

患者から採取した血液を遠心分離し、血漿成分から抗体により因子Xを分離濃縮し、溶出後、質量分析を行った。その結果、因子X特異的抗体はN末端アミノ酸がプロセスされた因子Xを特異的に認識した。予備検討として、対象とした110名の患者について再狭窄群と非再狭窄群の臨床背景比較を行った結果、両群において有意な差は認められなかった。さらに、従来の測定法における因子X検査でほぼ同じ値になった検体であるにも関わらず、筆者らによるプロテオミクスを用いた新たな診断法では、その冠動脈治療後の再狭窄の有無に応じて検出された因子Xフラグメントのシグナル強度比が異なっていた。再狭窄が生じていた患者においては、その中央値が1.19 (四分位範囲, 1.09-1.33) であり、一方、再狭窄を生じていなかった患者87検体では、その中央値が1.43 (同, 1.22-1.61,  $p=0.0001$ ) であった (図4)。以上のことから、この方法によりこれまでと異なった分子形態の因子Xが検出され、ま

た、これらの新規な因子Xは冠動脈治療後の再狭窄診断に有用なバイオマーカーであることが示された。

### おわりに

質量分析技術を医療に応用する試みはいまだ端緒に着いたばかりで歴史が浅いが、今後、医療における中心的役割を有す可能性も高いと思われる。中でも、心血管疾患のプロテオミクス解析は現在世界的に注目されている。実際、米国においてNHLBI (National Heart, Lung, and Blood Institute) において、臨床プロテオミクス・ワーキンググループが活動を開始した<sup>19)</sup>。また、HUPO (Human Proteome Organization) による血漿プロテオーム解析も行われ、ヒトの血漿からの蛋白の網羅的同定が試みられ、心血管関連の蛋白の包括的同定が行われた<sup>20)</sup>。ほかにも、心血管疾患に特異的な蛋白プロファイリングを行った研究も行われつつある<sup>21,22)</sup>。今後も同様のデータを蓄積していくことにより、疾患特異的マーカーの同定のみならず、疾患関連蛋白の病態における動態 (相互作用, 修飾, 分解等) を包括的に把握することが可能となるであろう。疾患病態制御機構の解明は最終的には治療薬の開発に繋がるものと期待される。

質量分析装置が、臨床診断の主流となるか否か

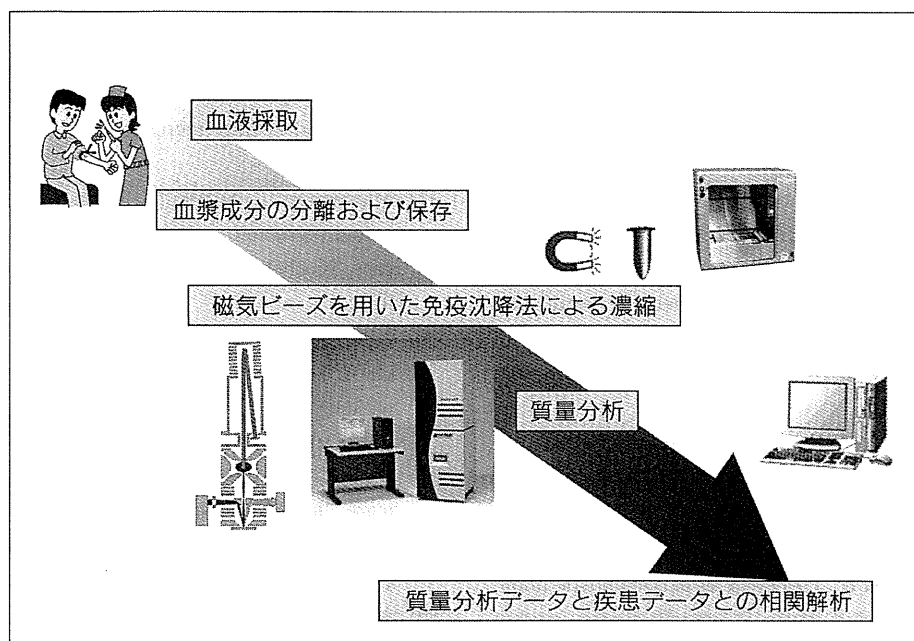


図5 プロテオミクスを用いた臨床血液診断システムの開発の流れ

は現段階では答えは出ていないが、費用対効果が示され、従来の検査技術では測定不能な重要な情報を与えることになれば、十分に現実味はある。たとえば、疾患における蛋白の断片化や翻訳後修飾等については質量分析装置の利用価値が非常に高いところである。定量性、再現性、機器の可搬性等の問題についても解決が必要である。このように、現在の先端的なプロテオーム解析法はまだ端緒に着いたところであり、高度な熟練と知識を必要としている。実際、まだ誰もが簡単に利用できるものではないが、今後、簡易型の質量分析システム、またはロボットを用いた再現性とスループットの高い測定法の開発が期待される(図5)。

## 文 献

- 1) Ehara S, Ueda M, Naruko T et al: Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation* 2001; **103**: 1955-1960
- 2) Kohno H, Sueshige N, Oguri K et al: Simple and practical sandwich-type enzyme immunoassay for human oxidatively modified low density lipoprotein using antioxidantized phosphatidylcholine monoclonal antibody and antihuman apolipoprotein-B antibody. *Clin Biochem* 2000; **33**: 243-253
- 3) Suzuki T, Kohno H, Hasegawa A et al: Diagnostic implications of circulating oxidized low density lipoprotein levels as a biochemical risk marker of coronary artery disease. *Clin Biochem* 2002; **35**: 347-353
- 4) Toshima S, Hasegawa A, Kurabayashi M et al: Circulating oxidized low density lipoprotein levels: a biochemical risk marker for coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; **20**: 2243-2247
- 5) Haberland ME, Fong D, Cheng L: Malondialdehyde-altered protein occurs in atheroma of watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Science* 1988; **241**: 215-218
- 6) Fogelman AM, Shechter I, Seager J et al: Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; **77**: 2214-2218
- 7) Shigematsu S, Takahashi N, Hara M et al: Increased incidence of coronary in-stent restenosis in type 2 diabetic patients is related to elevated serum malondialdehyde-modified low-density lipoprotein. *Circ J* 2007; **71**: 1697-1702
- 8) Meisinger C, Baumert J, Khuseynova N et al: Plasma oxidized low-density lipoprotein, a strong predictor for acute coronary heart disease events in apparently healthy, middle-aged men from the general population.



- Circulation 2005; **112**: 651–657
- 9) Gygi SP, Rochon Y, Franza BR et al: Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 1720–1730
  - 10) Katoh H, Suzuki T, Hiroi Y et al: Diagnosis of aortic dissection by immunoassay for circulating smooth muscle myosin. *Lancet* 1995; **345**: 191–192
  - 11) Suzuki T, Katoh H, Watanabe M et al: Novel biochemical diagnostic method for aortic dissection: results of a prospective study using an immunoassay of smooth muscle myosin heavy chain. *Circulation* 1996; **93**: 1244–1249
  - 12) Suzuki T, Katoh H, Kurabayashi M et al: Biochemical diagnosis of aortic dissection by raised concentrations of creatine kinase BB-isozyme. *Lancet* 1997; **350**: 784–785
  - 13) Suzuki T, Katoh H, Tsuchio Y et al: Diagnostic implications of elevated levels of smooth-muscle myosin heavy-chain protein in acute aortic dissection: the smooth muscle myosin heavy chain study. *Ann Intern Med* 2000; **133**: 537–541
  - 14) Amaki T, Suzuki T, Nakamura F et al: Circulating malondialdehyde modified LDL is a biochemical risk marker for coronary artery disease. *Heart* 2004; **90**: 1211–1213
  - 15) Zhang Z, Bast RC Jr, Yu Y et al: Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2004; **64**: 5882–5890
  - 16) Adam BL, Qu Y, Davis JW et al: Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res* 2002; **62**: 3609–3614
  - 17) Matsumura T, Suzuki T, Kada N et al: Differential serum proteomic analysis in a model of metabolic disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **351**: 965–971
  - 18) Labugger R, Organ L, Collier C et al: Extensive tropinin I and T modification detected in serum from patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2000; **102**: 1221–1226
  - 19) Granger CB, Van Eyk JE, Mockrin SC et al: National heart, lung, and blood institute clinical proteomics working group report. *Circulation* 2004; **109**: 1697–1703
  - 20) Berhane BT, Zong C, Liem DA et al: Cardiovascular-related proteins identified in human plasma by the HUPO plasma proteome project pilot phase. *Proteomics* 2005; **5**: 3520–3530
  - 21) Westbrook JA, Wheeler JX, Wait R et al: The human heart proteome: two-dimensional maps using narrow-range immobilised pH gradients. *Electrophoresis* 2006; **27**: 1547–1555
  - 22) Mayr U, Mayr M, Yin X et al: Proteomic dataset of mouse aortic smooth muscle cells. *Proteomics* 2005; **5**: 4546–4557

## b. バイオマーカーの探索・発見・同定の試み

相澤健一（東京大学大学院医学系研究科循環器内科）

鈴木 亨（東京大学大学院医学系研究科ユビキタス予防医学講座）

### INTRODUCTION

心血管疾患におけるバイオマーカーは診断・治療に際し、必須の役割を果たし、その必要性は増加の一途である。過去約十年における基礎研究の発展により、動脈硬化の過程に関与するさまざまな変性蛋白が明らかになり、心血管疾患の病理進展の背景に対するわれわれの理解は深まったが、バイオマーカーの役割が大きい。一例として、動脈硬化の進展因子となる血中酸化低比重リポ蛋白 (low density lipoprotein ; LDL) の測定法が開発され、臨床現場でも利用可能となった。

一方、近年のヒトゲノム配列解析により、生体において生理活性を有する分子は遺伝子ではなく蛋白であり、蛋白は相互作用、翻訳後修飾、プロセッシングなどで制御されていることが判明した。蛋白解析は遺伝子に比べ複雑で困難なため遅れを取ってきたが、近年の質量分析装置の飛躍的な発達により現実のものになりつつある。

本稿では、最近のプロテオミクス解析技術を用いたバイオマーカーの探索・発見・同定、および医療に応用する試みを概説する。

### 蛋白質の変性と病態

心血管疾患におけるバイオマーカーは診断・治療に際し、必須の役割を果たし、その必要性は増加の一途である。蛋白質は発現調節、プロセッシング、化学修飾、相互作用などの多段階にわたる制御を受けるが、病態・老化変性などの場合、さらに経時的变化による制御が加わる。例えば、動脈硬化は多因子が関与する複雑な病態である。脂質異常のみならず、血管内皮細胞機能障害、血管平滑筋細胞障害、脂肪細胞の機能不全、炎症、石灰化などさまざまな要素が関係する。その発症前に

非常に長い潜伏期間を有するが、この間に経年的な蛋白質の変性病態が進行する。このように、長い潜伏期間における蛋白質の酸化修飾・変性は、疾患発症において中心的な役割を果たす(図1)。

### 動脈硬化形成に重要な変性蛋白

LDLは多様な酸化修飾を受ける(図2)。酸化変性によって生じる酸化LDLは、動脈硬化の形成と進展において重要な役割を果たしている。脂質酸化

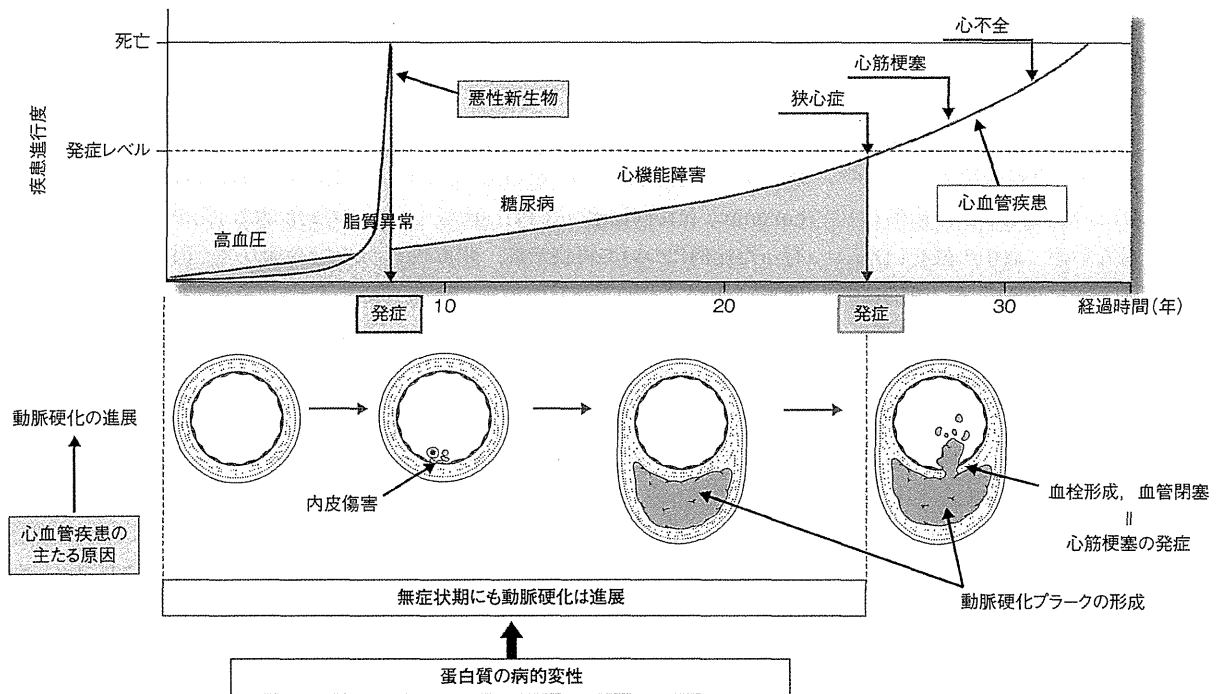


図1 心血管病の形成過程と蛋白質の変性

心血管疾患などの生活習慣病は発症前に非常に長い潜伏期間を有するが、この間に経年的な蛋白質の変性が進行する。

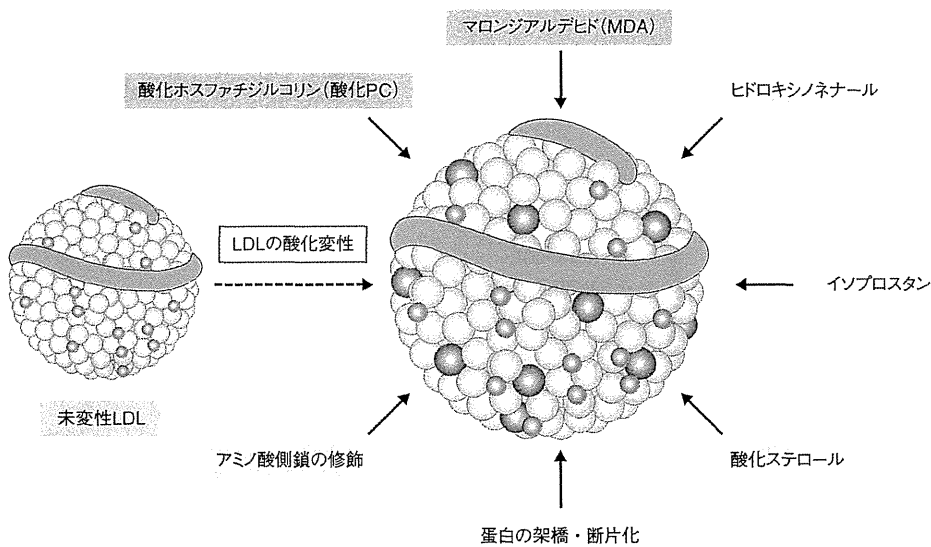


図2 多様なLDLの酸化修飾  
LDLはホスファチジルコリン (phosphatidylcholine; PC)の酸化や、MDA化など、多様な酸化修飾を受ける。

物のうち最も代表的なものがLDLであり、量も豊富である。これがアポBのリジン残基に結合したものが、マロンジアルデヒド化LDL (malondialdehyde-LDL ; MDA-LDL)である<sup>1,2)</sup>。

MDA-LDLは酸化LDLを直接的にみたものではないが、血中の酸化LDLが極めて微量なのに比べると、量的に豊富であり、測定が容易である。最近、末梢血中のMDA-LDLの測定法が開発され、臨床的意義が検討された。その結果、血中のMDA-LDLは冠動脈疾患患者において有意に高値を認めた<sup>3)</sup>。ほかの典型的な脂質マーカーと比較し、有用性が示された(図3)。

### 酸化LDL(MDA-LDL)測定の臨床的意義

糖尿病患者において、経皮的冠動脈インターベンション(percutaneous coronary intervention ; PCI)治療を行った症例について再狭窄群、非再狭窄群におけるMDA-LDL値の比較をした。MDA-LDL値は、PCI治療の再狭窄や冠動脈イベント発症と関連した<sup>4)</sup>。血清中MDA-LDL値は、冠動脈疾患既往歴のある糖尿病患者における予後予測マーカーとして、また糖尿病患者における経皮的冠動脈インターベンションなどによる治療後の再狭窄予

測マーカーとして有用と考えられる。

大規模臨床スタディにおいて、MDA-LDLおよび被修飾LDLに対する自己抗体が頸動脈の動脈硬化進展に関与することも示されている。最近の研究では、従来のリポ蛋白や伝統的な冠動脈リスク因子に比べ、血漿中の酸化LDL濃度が心血管疾患イベント発症の最もよい予知因子であることが示された<sup>5)</sup>。

さらに、酸化LDLの増加は安定プラークから脆弱な不安定プラークへの移行に関与する可能性もある。最近の研究により、酸化LDLは人の血管内皮細胞と単球由来のマクロファージにおけるマトリックスメタロプロテイナーゼ(matrix metalloproteinase ; MMP)-1およびMMP-9を促進することが明らかになった。また、酸化LDLは人の冠動脈において、MMP-1、MMP-3を制御することも示されている。このように、酸化LDLは血管壁における脂質の蓄積だけでなく、MMPや組織因子の発現およびアポトーシス誘導など、幅広い炎症作用を示すことにより、動脈硬化プラークの不安定化や破綻および血栓形成に関与すると考えられている。

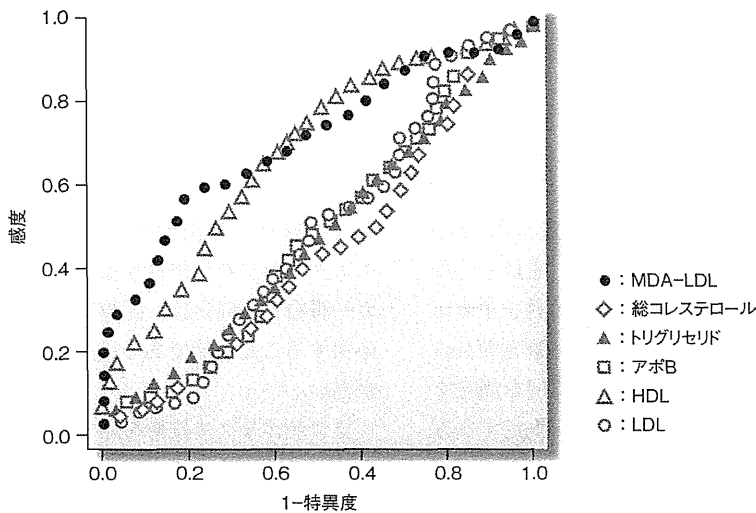


図3 酸化LDLとMDA-LDLの心血管疾患ROC曲線(文献3, 14より引用)  
酸化LDLとMDA-LDLは虚血性心疾患の最も優れた脂質マーカーである。

### プロテオミクス解析とは

プロテオミクス解析とは通常、静的状態における蛋白質とその機能を包括的に解析し、理解することを目的とする。疾患関連因子の発現する時間的差

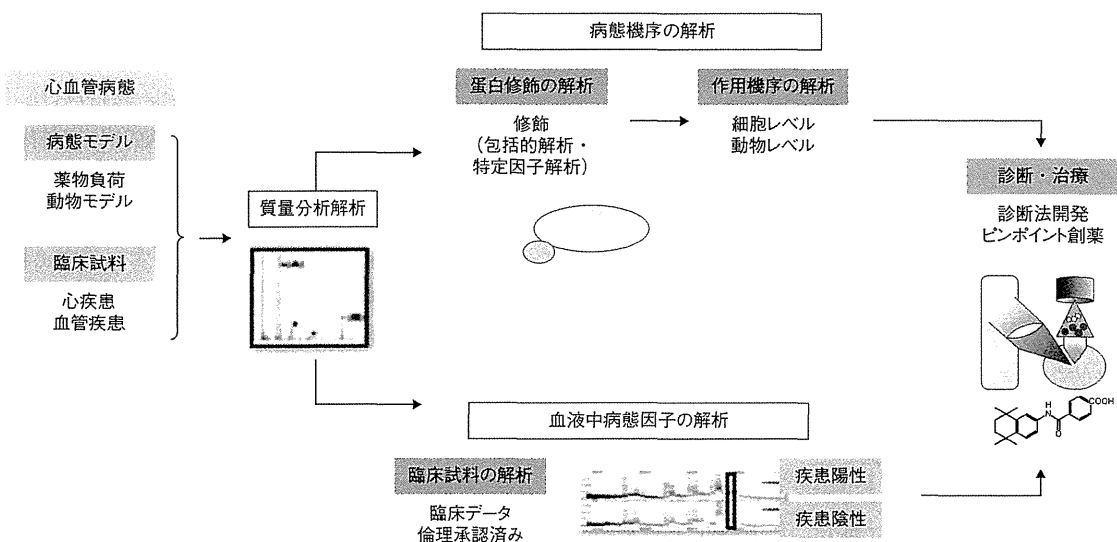


図4 心血管疾患をモデルとした、疾患プロテオミクス解析の流れ(文献15より引用)

異を明らかにすることは病態生理を理解するうえで重要である。

DNAに書き込まれた遺伝情報はRNAを介して蛋白質へ翻訳される。実際、ヒトゲノムの配列の解読が終了した現在では、RNAの発現プロファイルと蛋白質の発現プロファイルは必ずしも一致するわけではなく、その相関は50%以下であるともいわれている<sup>6)</sup>。したがって、蛋白レベルの研究が疾患の発症や伸展を理解するうえで理想的かつ重要である。

本稿の後半では、蛋白に影響を及ぼす分子レベルでの変化に着目して、疾患における蛋白制御機構を明らかにする。さらに、制御機構の理解に留まらず、関連蛋白に着目した診断ツールの

開発および治療薬のターゲットとしての可能性を概説する(図4)。

### プロテオミクスを支える 質量分析の技術革新

質量分析法とは、質量分析装置(mass spectrometer; MS)を用いて蛋白質やペプチドのような試料をイオン化し、得られたイオンを質量/電荷( $m/z$ )に従い分離して、その強度を測定することにより試料の質量を決定する方法である。MSを使えば、蛋白質を同定したり、蛋白質の動態を調べたり、翻訳後の修飾や蛋白質-蛋白質間相互作用などを分析することができる。

### プロテオミクスを用いた バイオマーカー蛋白の探索

最近、プロテオミクスを疾患の早期診断や、病因の解明、さらに創薬研究への適応など、医療技術に応用する試みがなされている。心血管および癌などの疾患の早期診断や進行状況のモニタリングを可能にするバイオマーカー蛋白の同定は、医療現場に直接応用すること可能であり、臨床的価値が高い。

プロテオミクス技術を用いて血中から蛋白を同定する場合に、質量分析計(MALDI-TOF/MSを中心とした高感度の測定機器)、および試料の分画方法が重要である。血液検体を扱ううえ

では試料の分画が、質量分析計の感度以上に重要である。プロテオミクス技術が医療分野で実践的な真価を発揮するためにはこのような簡便な方法が向いているであろう。これまでに、卵巣腫瘍や前立腺腫瘍などの腫瘍性疾患においてバイオマーカーを同定した報告がある<sup>7,8)</sup>。

一方、特異抗体を用いた免疫学的分離法も効果的な分離法である。この手法は、目的の蛋白が決まった場合に有効である。疾患時には蛋白の修飾とともに、蛋白の断片化が行われることがある。例えば、心筋トロポニンの断片化および修飾が心疾患に特徴的に認められ、臨床的指標として役に立っている<sup>9,10)</sup>。特異抗体を用いてこのような

蛋白の特徴的な変化を検出することが重要と考えられる。

### おわりに

質量分析技術を医療に応用する試みはいまだ端緒に着いたばかりで歴史が浅いが、今後、医療における中心的役割を果たす可能性も高いと思われる。なかでも、心血管疾患のプロテオミクス解析は現在特に注目されている。米国においてNHLBI(National Heart, Lung, and Blood Institute)において、臨床プロテオミクス・ワーキンググループが活動を開始した<sup>10)</sup>。また、HUPO(The Human Proteome

Organization)による血漿プロテオーム解析も行われ、ヒトの血漿からの蛋白の網羅的同定が試みられ、心血管関連の蛋白の包括的同定が行われた<sup>11)</sup>。

ほかにも、心血管疾患に特異的な蛋白プロファイリングを行った研究も行われつつある<sup>12,13)</sup>。今後も同様のデータを蓄積していくことにより、疾患特異的なバイオマーカーの同定のみならず、疾患関連蛋白の病態における動態(相互作用, 修飾, 分解など)を包括的に把握することが可能となるであろう。疾患病態制御機構の解明は最終的には治療薬の開発につながるものと期待される(図4)。

### 文献

- Häberland ME, Fong D, Cheng L: Malondialdehyde-altered protein occurs in atheroma of watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Science* 241: 215-218, 1988.
- Fogelman AM, Shechter I, Seager J, et al: Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 2214-2218, 1980.
- Arnaki T, Suzuki T, Nakamura F, et al: Circulating malondialdehyde modified ldl is a biochemical risk marker for coronary artery disease. *Heart* 90: 1211-1213, 2004.
- Shigematsu S, Takahashi N, Hara M, et al: Increased incidence of coronary in-stent re-stenosis in type 2 diabetic patients is related to elevated serum malondialdehyde-modified low-density lipoprotein. *Circ J* 71: 1697-1702, 2007.
- Messinger C, Baumert J, Khuseynova N, et al: Plasma oxidized low-density lipoprotein, a strong predictor for acute coronary heart disease events in apparently healthy, middle-aged men from the general population. *Circulation* 112: 651-657, 2005.
- Gygi SP, Rochon Y, Franz BR, Aebersold R: Correlation between protein and mrna abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 19: 1720-1730, 1999.
- Zhang Z, Bast RC Jr, Yu Y, et al: Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res* 64: 5882-5890, 2004.
- Adam BL, Qu Y, Davis JW, et al: Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res* 62: 3609-3614, 2002.
- Labugger R, Organ L, Collier C, et al: Extensive troponin i and t modification detected in serum from patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 102: 1221-1226, 2000.
- Granger CB, Van Eyk JE, Mockrin SC, Anderson NL: National heart, lung, and blood institute clinical proteomics working group report. *Circulation* 109: 1697-1703, 2004.
- Berhane BT, Zong C, Liem DA, et al: Cardiovascular-related proteins identified in human plasma by the hupo plasma proteome project pilot phase. *Proteomics* 5: 3520-3530, 2005.
- Westbrook JA, Wheeler JX, Wait R, et al: The human heart proteome: Two-dimensional maps using narrow-range immobilised ph gradients. *Electrophoresis* 27: 1547-1555, 2006.
- Mayr U, Mayr M, Yin X, et al: Proteomic dataset of mouse aortic smooth muscle cells. *Proteomics* 5: 4546-4557, 2005.
- Suzuki T, Kohno H, Hasegawa A, et al: Diagnostic implications of circulating oxidized low density lipoprotein levels as a biochemical risk marker of coronary artery disease. *Clin Biochem* 35: 347-353, 2002.
- Suzuki T, Nagai R: Cardiovascular proteomic analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 855: 28-34, 2007.



