

201407022A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

医薬品開発時の有効性評価に有用なサロゲート
バイオマーカーの開発
—虚血性心疾患イベントのサロゲートマーカーの実現—

平成26年度 総括研究報告書

研究代表者 相澤 健一

平成27(2015)年 5月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

医薬品開発時の有効性評価に有用なサロゲート
バイオマーカーの開発
—虚血性心疾患イベントのサロゲートマーカーの実現—

平成26年度 総括研究報告書

研究代表者 相澤 健一

平成27（2015）年 5月

目 次

I. 総括研究終了報告

医薬品開発時の有効性評価に有用なサロゲートバイオマーカーの開発
－虚血性心疾患イベントのサロゲートマーカーの実現－

相澤 健一 ----- 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 13

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 17

I. 総括研究終了報告

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総括研究年度終了報告書

医薬品開発時の有効性評価に有用なサロゲートバイオマーカーの開発
－虚血性心疾患イベントのサロゲートマーカーの実現－

研究代表者 相澤 健一

自治医科大学医学部臨床薬理学 准教授

研究要旨

本研究では虚血性心疾患イベントのサロゲートマーカーの開発を目指す。循環器疾患の臨床試験は近年の大規模臨床試験の時代を先導してきたが、代表的なイベントである虚血性心疾患は発症率が低いため、有意な結果を得るために必要な症例数並びに追跡期間が大規模化していることが問題となっている。このため、長期間に及ぶイベント発症の追跡調査に代わり短期間に容易に病態変化を反映するバイオマーカー、すなわちサロゲートマーカーの開発が喫緊の課題である。

我々は、虚血性心疾患の発症および悪化を反映する世界で初めてとなるバイオマーカーを最近開発し、特許も出願済である。血液試料から虚血性心疾患患者に特異的な心血管系特異的ペプチドの変化を質量分析計で分析する革新的なものである。既に初期検討にて、心臓カテーテル治療後に生じる再狭窄を感度100%で除外診断可能な性能を有することを検証済みであり、心臓カテーテル検査に代替する検査法として期待されている。重要なことは、現在の狭窄のみならず将来の狭窄を生じる可能性（予測）についても感度100%で除外診断可能な点である。現在、先進医療申請に向けて測定法の最適化（前処理、検出法等）も実施中である。

本研究では、我々が開発したバイオマーカーを虚血性心疾患イベントのサロゲートマーカーとして応用すべく、その実現可能性を検討する。冠動脈疾患に対する大規模臨床試験（[1]動脈硬化生理検査としての血流依存性血管拡張反応検査（FMD法）の有用性検討、[2]薬物介入としての脂質異常治療薬の有効性検討、[3]糖尿病治療薬の有効性検討）を利用する。研究3年目（平成26年度）は動脈硬化生理検査の有用性検討のための臨床試験に加えて、脂質異常治療薬の有効性検討のための臨床試験、糖尿病治療薬の有効性検討のための臨床試験の検体の全国各施設からの収集と分析、さらに、東京大学医学部附属病院循環器内科入院患者の検体分析と診療情報によるイベント解析を実施した。また、本バイオマーカー検出の感度向上のため、改良型機種（LCMS-8050）を導入した。分析条件を改善した結果、健常者の感度（3pg/mL程度を検出）まで検出可能となった。

本研究により得られた成果は医薬品開発時の治験、臨床研究における有効性評価のためのサロゲートマーカー、薬剤内服時の効果判定として活用可能なコンパニオンバイオマーカー開発につながるものと期待される。

研究協力者

鈴木 亨 レスター大学医学部循環器内科 教授

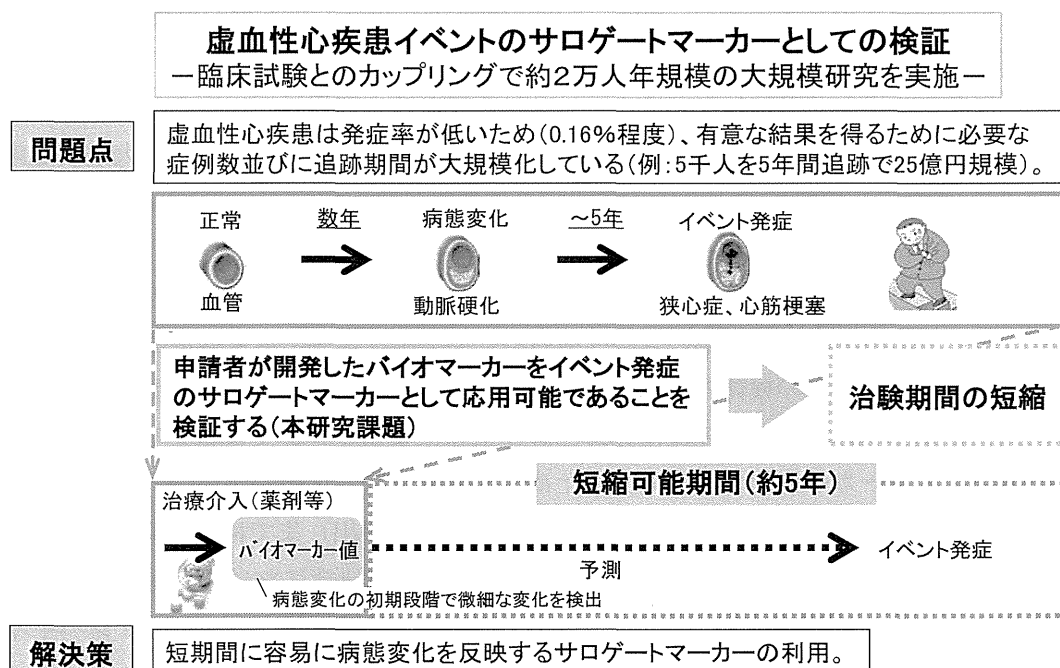
A. 研究目的

循環器疾患の臨床試験は近年の大規模臨床試験の時代を先導してきたが、その代表的なイベントである虚血性心疾患は発症率が低いため（0.16%程度）、有意な結果を得るために必要な症例数並びに追跡期間が大規模化している（例：5千人を5年間追跡で25億円規模）。長期間に及ぶイベント発症の追跡に代わり、短期間に容易に病態変化を反映するバイオマーカー、すなわちサロゲートマーカーの開発が喫緊の課題である。

我々は、虚血性心疾患の発症および悪化を反映する世界で初めてのバイオマーカーを最近開発し、特許も出願済である。心臓の慢性虚血時にみられる心血管系特異的ペプチドに着目し、心臓カテーテル治療後の再狭窄（約半年後に病変が再度進行ないし治療に対する反応として狭窄する現

象）を示した、あるいは将来的に示す症例では、このペプチドが減少することを見いだした。本バイオマーカーの開発自体は別途、平成23-25年度厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）にて実施中し、心臓カテーテル治療後に生じる再狭窄を感度100%により除外診断可能な性能（検出能ならびに予測能）を有すことを検証した。すなわち、心臓カテーテルに代替する血液検査として高い診断性能を有すのみならず、低侵襲・低コストの点でも優れていることを確認済みである。本研究に関連した重要なことは、現在の狭窄のみならず将来の狭窄を生じる可能性（予測）についても感度100%で除外診断可能な点である。

本研究では、我々が開発したバイオマーカーを応用し、虚血性心疾患イベントの発症を予測するサロゲートマーカーとしての臨床的有用性を確立するため、大規模臨床試験に乗せてその検証を行う。具体的には、研究期間中に冠動脈疾患に対する3つの大規模臨床試験（[1]動脈硬化生理検査としての血流依存性血管拡張反応検査(FMD法)



の有用性検討、[2]薬物介入としての脂質異常治療薬の有効性検討、[3]糖尿病治療薬の有効性検討)を利用することにより、冠動脈疾患ハイリスク患者の前向き研究とのカップリングで約2万人年規模の大規模研究を実施する計画である。

本研究により得られた成果は医薬品開発時の治験、臨床研究における有効性評価のためのサロゲートマーカー、薬剤内服時の効果判定として活用可能なコンパニオンバイオマーカー開発につながるものと考えられる。

B. 研究方法

本研究では我々が開発した新しいバイオマーカーの虚血性心疾患イベントのサロゲートマーカーとしての診断的意義また臨床的有用性を確立する。その新しいバイオマーカーは、心血管病態時に特異的に発現する蛋白質であるナトリウム利尿ペプチド(BNP)から、慢性虚血時に生じる特異なプロセッシング産物を質量分析計で測定することを測定原理とするものである。このバイオ

マーカーを研究期間3年間に前向きコホートにおいて経時的な解析を行い、病態変遷との関係を検討する。具体的な計画として、東京大学医学部附属病院で実施中の下記3つの冠動脈疾患に対する大規模臨床試験で解析する(図1)。いずれも前向きコホート研究に計画段階から参加することにより、サロゲートマーカーの検証に最適な大規模臨床試験とのカップリングを行うことが可能となっている。今回実施する臨床試験とのカップリング研究について、臨床試験自体の経費は各臨床試験の主催者の負担で行われるものである。先述したように、通常、イベント追跡のための臨床試験には膨大なコスト(数十億円程度)と長期間(3~5年程度)の観察が必要であり、研究経費と研究期間の限られた通常の学術研究単独では実施困難である。したがって、本研究のように、先行する臨床試験にカップリングすることが可能なタイミングと施設が整った研究環境は時宜を得ている。具体的な計画は下記の通りである(図1)。

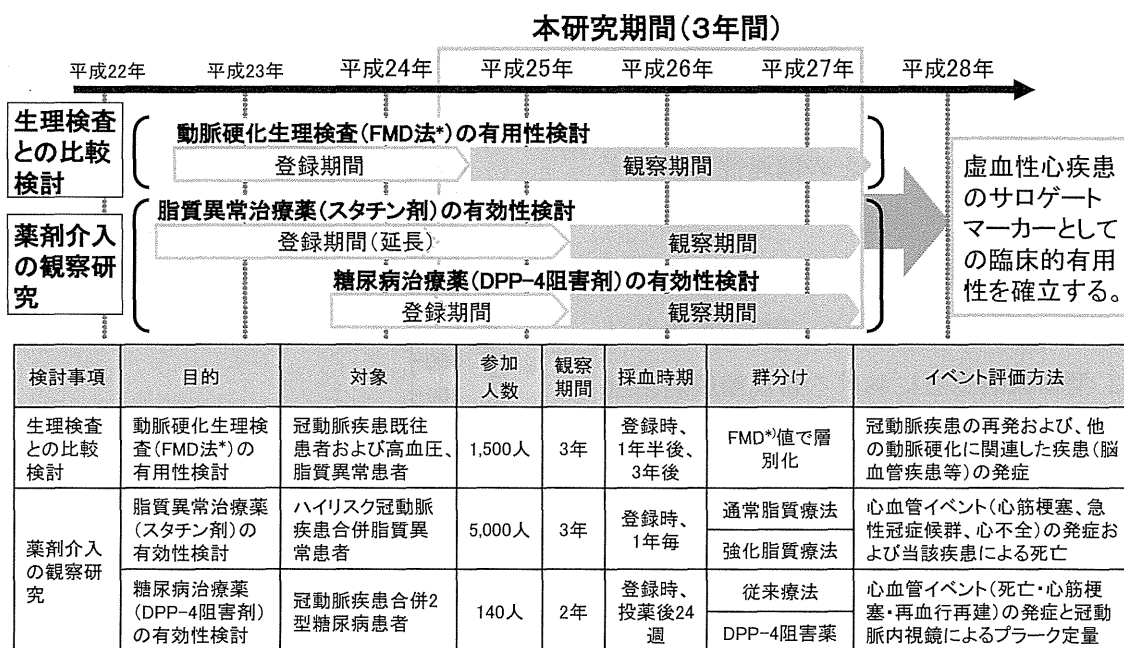


図1 3つの大規模臨床試験

(1)動脈硬化生理検査（FMD法）の有用性検討
 多施設共同研究「FMD 共同研究グループ」により、新たな動脈硬化の生理検査法である血流依存性血管拡張反応検査(FMD)の動脈硬化性心血管疾患診療指標としての有用性が検討されている。我々も同グループの運営委員を務めており、その共同研究施設として計画段階より研究参加している。全国約12施設にて登録期間2年に合計1,500例で3年間、すなわち4千5百人年規模で試験前と経時的な追跡（1年ごと）を実施する。イベント（外来通院中に冠動脈疾患の再発および、脳血管疾患等、他の動脈硬化に関連した疾患）発症の有無を追跡し、本バイオマーカーと虚血性心疾患イベント発症との関連性を検討する。

(2)脂質異常治療薬（スタチン剤）の有効性検討
 国内製薬会社による大規模臨床試験であり、糖尿病性網膜症合併高コレステロール血症患者を対象としたスタチンによる通常療法対強化療法の前向き比較研究である。約5,000人で約3年間、すなわち1.5万人年規模で心血管病の発症（冠動脈疾患、心血管疾患による死亡、入院など）を追跡する研究である。試験前と経時的な追跡（1年目、試験終了時等）を行い、本バイオマーカーと虚血性心疾患イベント発症との関連性を検討する。

(3)糖尿病治療薬（DPP-4阻害剤）の有効性検討
 医師主導の自主臨床試験であり、冠動脈疾患を発症した2型糖尿病患者における新規糖尿病治療薬ジペプチジルペプチダーゼ4（DPP-4）阻害薬投与群および従来糖尿病療法群の冠動脈プラーク・血流への影響に関する前向き無作為比較試験である。約140例で約2年間、すなわち280人年規模で冠動脈超音波により冠動脈プラークの容積測定に加え、心血管イベント（死亡・心筋梗塞・

再血行再建）の発症率を追跡する。試験前と試験終了時に追跡し、本バイオマーカーと虚血性心疾患イベント発症と関連性を検討する。

なお、本研究計画時は、3つの大規模臨床試験の活用を予定したが、昨今の臨床研究倫理不正の社会的背景により、脂質異常治療薬の有効性検討試験に関しては、研究途中でのデータ開示が出来なくなったため、東京大学医学部附属病院循環器内科入院患者の臨床検体と診療情報による解析を追加し、代替した。

（倫理面への配慮）

本研究（東京大学医学部附属病院循環器内科に循環器疾患で入院した症例および同院検診部を受検した健常例に対するプロテオーム解析による新規診断法の開発）はすでに当施設の倫理委員会の承認（平成21年6月19日承認、承認番号448(2)）を得ており、当院の倫理規定に従って遂行した。

C. 研究結果

研究初年度（平成24年度）は検体収集の先行している[1]動脈硬化生理検査の有用性検討の臨床

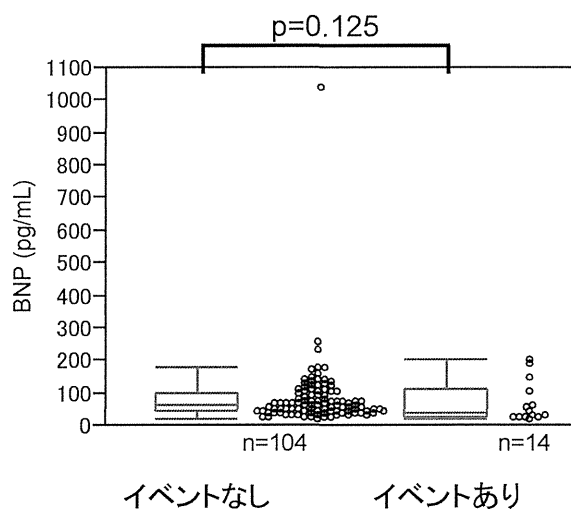


図2 BNP値とイベントとの相関

試験における検体の分析を行った（644例/目標600例）。分析を行った検体の臨床情報と質量分析計による検体の測定結果との相関を調べた。すなわちイベント有りの群とイベント無しの群の2群において本バイオマーカーの値とがどのように相関しているかを検討した。従来の測定手法による血液中のBNP量（BNP値）との相関をまず検討したところ、イベントの有無との相関は認められなかった（図2）。次に、本バイオマーカーとイベントの有無との相関を検討した。その結果、統計的に有意ではないが、カットオフ値を決めることにより、このマーカーが「除外診断マーカー」として有用である可能性を示唆するデータを得た（図3）。

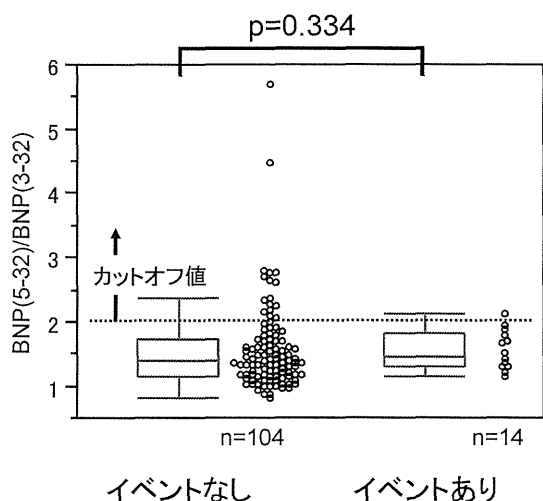


図3 本バイオマーカーとイベントとの相関

[2]脂質異常治療薬の有効性検討、[3]糖尿病治療薬の有効性検討に関しても、今後計画にしたがい分析例数を増やし、臨床情報との相関について検討していく計画である。

研究初年度（平成24年度）は[2]脂質異常治療薬の有効性検討においては100例（目標100例）、[3]糖尿病治療薬の有効性検討においては9例（目標9例）、それぞれ計画通りの分析を行った。

研究2年目（平成25年度）は動脈硬化生理検査の有用性検討のための臨床試験に加えて、脂質異常治療薬の有効性検討のための臨床試験、糖尿病治療薬の有効性検討のための臨床試験の検体の全国各施設からの収集と分析を進めた。全体として、当初計画分析数（620例）を上回る数の分析を終えた（1483例）。

研究3年目（平成26年度）は3つの臨床試験の検体の全国各施設からの収集と分析を進め、当初計画通りの分析を終えた。さらに、東京大学医学部附属病院循環器内科入院患者（931例）を対象に、解析を追加した。本バイオマーカーとイベントの有無との相関を検討した。その結果、動脈硬化生理検査の有用性検討の臨床試験結果と同様に、カットオフ値を決めることにより、このマーカーが「除外診断マーカー」として有用である可能性を示唆するデータを得た（図4）。

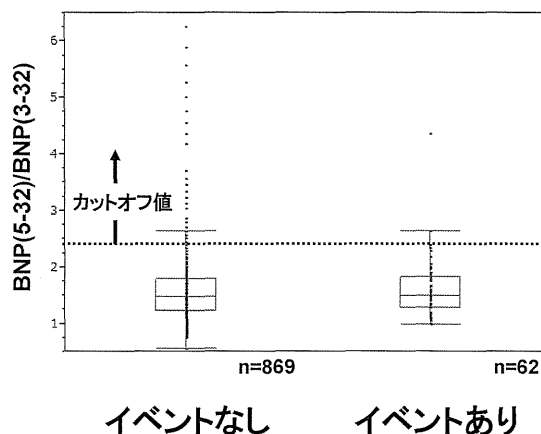


図4 本バイオマーカーとイベントとの相関

本研究開始当初、本バイオマーカーはBNP値で約30 pg/mL以上の検体において検出が可能だった。临床上、18.3 pg/mLが正常値の上限となっており、この値以上は、何らかの心疾患疑いとなっている。この検出感度をさらに向上させることは、具体的な症状を呈していないものの動脈硬化の

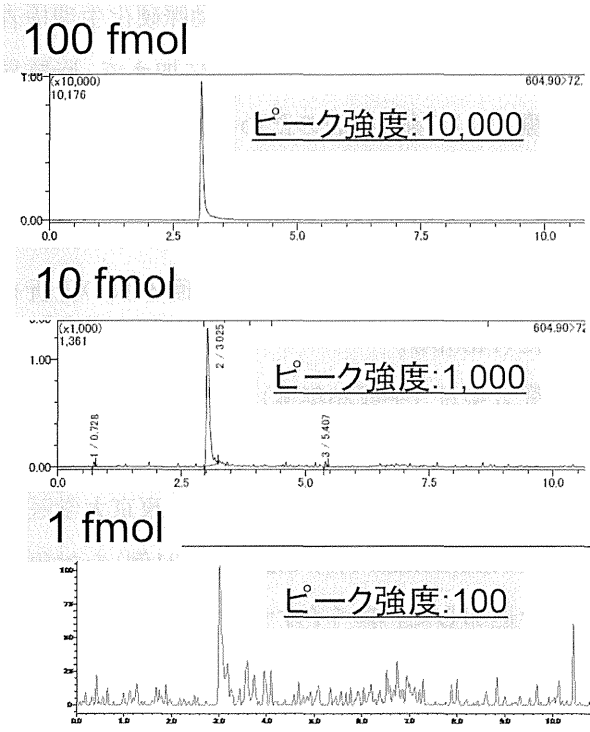


図5 検出感度の検討

進展を検出する可能性があり、本研究にとって有意義である。そのため、最近、検出感度の向上が進み、さらに今後、測定自動化が可能となる期待のある液体クロマトグラフ質量分析計を用いて、分析条件の検討を行い、検出感度の向上をめざした。

この質量分析計は質量分析部が3つ直列につながった三連四重極型となっているものであり、測定する因子をアルゴンガスなどと衝突させ、その結果生じた断片を検出するというマルチプルリアクションモニタリング (MRM) 法という高感度な検出法が可能となっている。

条件検討の結果、標品を用いた分析においては1 fmolという微量を検出することが可能となった。この検体においては約15 pg/mLが検出する感度に相当し、検出感度の向上をはかることができた (図4)。今後、健常者も対象とし、より詳細な検討を行うために、高感度測定系が必要であ

る。症状を呈していない検体においては、15 pg/mL (約1fmol) 以下であることが多いため、今後、さらに検出感度の向上をめざす。

研究2年目に改良型機種 (LCMS-8050) を用いて、標品をサンプルとして感度測定を行った。その結果、目標とする感度 (20pg/mL程度を検出) を得ることができた (図5)。

研究3年目 (本年度) は、更に条件を改良して、健常者の感度 (3pg/mL (約0.25fmol) 程度) まで検出可能となった (図6)。

具体的な改善点は以下のとおりである。前年度の移動相条件は測定開始が20%程度のアセトニトリル比率で、そこからグラジエント溶出を行っていた。これは、BNPピークとアセトニトリル増加によるベースラインの上昇を分離するための措置だった。しかし、検出したい2つのピーク (BNP5-32、BNP3-32) を分離することができ

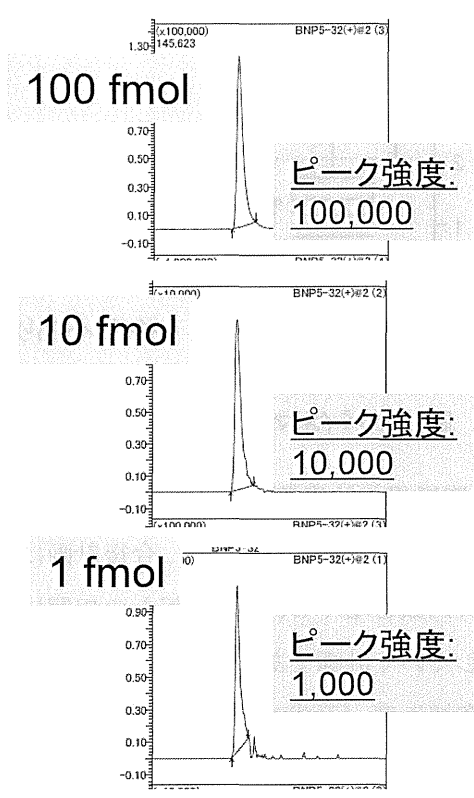


図6 健常者まで検出可能な感度に到達

ず、加えて血漿測定を行う際には夾雑物と分離できないので、夾雑物の影響を受ける可能性が大きい。そこで、測定初期の移動相のアセトニトリル比率を下げることで可能な条件を検討した。

1) 前年度と同様の条件である逆相C18カラムで検討を行っていたが、移動相中のアセトニトリル濃度が15%程度までしかBNPを保持できず、また、移動相組成の勾配を極端に変化させないと鋭いピークが得られない。これだと、2つのペプチドを分離して検出することはできない。逆相カラムでは保持が難しいため、HILICカラム（親水性相互作用クロマトグラフィ）を検討した。移動相中のアセトニトリル比率が高い状態でカラムに保持する。これは、MSの感度改善につながる。しかし、移動相組成の勾配を急にしないと鋭いピークが得られないのは逆相カラムと同様であった。

2) 装置側と別に、BNPの希釈液を検討した。通常は、測定初期の移動相組成を希釈液として用いるので、0.1%ギ酸溶液を使用した。このギ酸濃度を薄くすると感度が改善する傾向があったので、水に変更するとBNP5-32、3-32が若干分離した。そこで、pHを中性付近とする為、pH8に調整したTris（トリスヒドロキシメチルアミンメタン）を緩衝液として添加した。また、イオンペア試薬として0.1%SDS（ラウリル硫酸ナトリウム）を加えたところ、今まで分離できなかった2つのピークの分離が可能となるとともに、検出下限値の改善につながった。

今回開発した、高感度測定系により、健常者の感度（3pg/mL程度を検出）まで検出可能となった。健常者も分析対象となることから、循環器疾患有病者のみならず、健常者の心血管疾患発症の一次

予防ないし、イベント予知のみならず、医薬品開発時の候補物質のスクリーニングや薬剤によるヒトにおける副作用発現予測などに活用可能と期待される。

本研究により得られた成果は医薬品開発時の治験、臨床研究における有効性評価のためのサロゲートマーカー、薬剤内服時の効果判定として活用可能なコンパニオンバイオマーカー開発につながるものと考えられる。

医薬品の開発・製品化においては、製品化から市販に至るまでには数百億円以上のコストが必要とされており、第1～3各相の治験も含まれる。今回開発するサロゲートマーカーによりイベント予知が可能となれば試験期間の短縮により実施費用の削減が可能となる。本検査の費用を仮に1件5,000円と試算しても99%減となり、2万人年規模の検査費用は3,300万円に抑えられ、その差は実に19.6億円超となる。

昨今の新成長戦略や医療イノベーション会議等において、日本発の革新的医薬品の創出が求められている中、本研究はそれらの施策に資するものである。

本サロゲートマーカーはイベント予知のみならず、医薬品開発時の候補物質のスクリーニングや薬剤によるヒトにおける副作用発現予測などに活用可能と考えられる。分子標的薬のより効果的な使用を目的とした、その標的分子の発現等を診断するためのコンパニオン診断薬の創出に資する新規バイオマーカーの開発に関する研究であり、新薬開発も促進すると考えられる。

D. 健康危険情報

該当無し

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Son BK, Sawaki D, Tomida S, Fujita D, Aizawa K, Aoki H, Akishita M, Manabe I, Komuro I, Friedman SL, Nagai R, Suzuki T. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is required for aortic dissection/intramural haematoma. Nat Commun. in press
2. Aizawa K, Fujii J, Seko Y. Diabetes mellitus is important as a risk factor of atrial fibrillation. Integr Mol Med. 2014, 1:73-75
3. Suzuki T, Eagle KA, Bossone E, Ballotta A, Froehlich JB, Isselbacher EM. Medical management in type B aortic dissection. Ann Cardiothorac Surg. 2014;3:413-417
4. Dean JH, Woznicki EM, O'Gara P, Montgomery DG, Trimarchi S, Myrmel T, Pyeritz RE, Harris KM, Suzuki T, Braverman AC, Hughes GC, Kline-Rogers E, Nienaber CA, Isselbacher EM, Eagle KA, Bossone E. Cocaine-related Aortic Dissection: Lessons from the International Registry of Acute Aortic Dissection. Am J Med. 2014;127:878-885
5. 相澤健一. 動脈硬化のバイオマーカー. 循環器内科. 科学評論社. 75:234-240, 2014.
6. 相澤健一. 診断マーカーと測定しておくべき血液検査. 虚血性心疾患 up-to-date. medicina. 医学書院. 51:616-620, 2014.
7. 相澤健一. カルシウム拮抗薬. 診断と治療増刊号〜心不全のすべて. 医学書院. 103 巻増刊号 172-174, 2015.
8. 相澤健一. 内服薬のチェックポイント. はじめましょう「有病者の口腔ケア」—歯科衛生士のための有病者チェックポイント— (103 巻増刊号), 2015.
9. 石田純一、相澤健一. BNP、NTproBNP を用いた心機能評価、他疾患と心疾患の鑑別. 診断と治療増刊号〜心不全のすべて. 医学書院. 103 巻増刊号 84-90, 2015.
10. 鈴木亨. 国内外の大動脈レジストリー研究. 改定第 2 版最新医学・別冊 新しい診断と治療の ABC 大動脈瘤・大動脈解離 2014 ; 42, 13-25
11. 澤城大悟、鈴木亨. 真性大動脈瘤切迫破裂の診断と対策 急性大動脈症の診療の新展開. 「ICU と CCU」 2014 ; 38(6) ; 379-386

2. 学会発表

1. 相澤健一. 薬物性心筋傷害バイオマーカー探索—プロテオミクスによる新規バイオマーカーの開発—. 第35回日本臨床薬理学会学術集会. 愛媛県松山市. 平成27年12月4日
2. Suzuki T. Translational Research in Cardiovascular Medicine - U.K. Perspective. The 79th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (JCS 2015, Osaka, Japan, 2015/4/24)

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 鈴木亨、日本電気株式会社 宮崎賢司 他、
積水メディカル株式会社：心疾患診断マーカー 特許出願2011-175982（出願日2011年8月11日）出願人：東京大学、NEC、積水メディカル

2. 鈴木亨、藤本宏隆：血液試料を用いて心筋虚血状態を評価する方法 国際出願PCT/JP2008/65444（2008年8月28日）出願人：国立大学法人東京大学、株式会社島津製作所

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
相澤 健一	動脈硬化のバイオマーカー	循環器内科	75(2)	234-240	2014
相澤 健一	診断マーカーと測定しておくべき血液検査	medicina	51(4)	616-620	2014

III. 研究成果の刊行物・別刷



解説

動脈硬化のバイオマーカー*

相澤 健一^{**,**}

Key Words : atherosclerosis, biomarker, restenosis, BNP, mass-spectrometry

はじめに

成人発症の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。過去の基礎研究の発展により、動脈硬化の形成過程に関与するさまざまな変性蛋白質が明らかになり、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、その中でバイオマーカーの果たしてきた役割は大きい。一例として、動脈硬化の進展因子となる血中酸化LDLの測定法が開発され、臨床現場でも利用可能となった。

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分子は遺伝子ではなく蛋白質であり、蛋白質は相互作用、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。蛋白質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。最近10年間においてはプロテオミクス(質量分析)などの、より新しい技術が注目されている。われわれはこの分野に新しい技術(免疫質量分析法、プロテインチップ法)を導入し、その臨床応用を行ってきた。

最近われわれは、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B型ナトリウム利尿ペプチド(BNP)がプロセスされたペプチド産物を、末梢血から質量分析計で測定するものであり、感度100%で再狭窄の除外診断が可能となる信頼できる結果を得た。本結果は循環器領域で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となる見込みである。

本稿では、動脈硬化を中心とし、心血管疾患におけるプロテオミクス解析技術を用いた最近の研究の成果と、同技術を心血管病態の解析(バイオマーカーなど)を中心とした医療に応用する試みを中心に概説する。

動脈硬化とバイオマーカー

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、さらに経時的変化による制御が加わる。代表的な病態である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。なかでも、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な

* Biomarkers for atherosclerosis.

** Kenichi AIZAWA, M.D., Ph.D.: 東京大学大学院医学系研究科循環器内科[〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1]; Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo 113-8655, JAPAN

*** 朝日生命成人病研究所循環器科[〒103-0002 東京都中央区日本橋馬喰町2-2-6]; The Institute for Adult Diseases, Asahi Life Foundation, Tokyo 103-0002, JAPAN

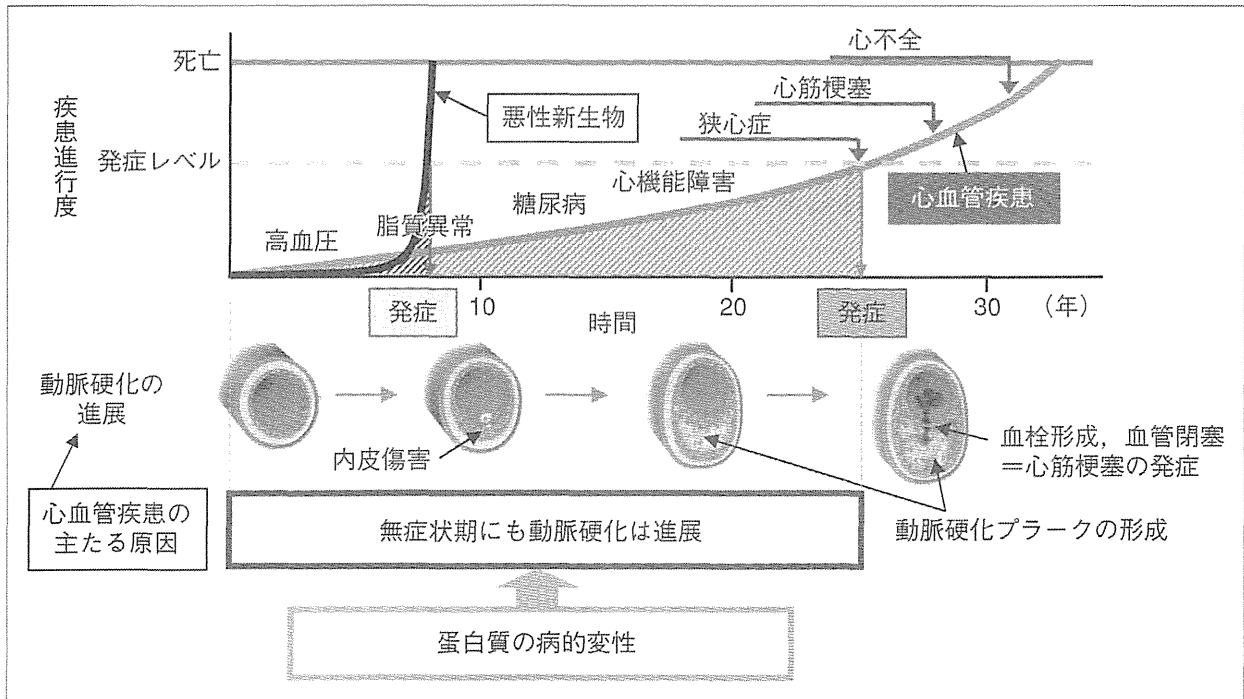


図1 心血管病の形成過程と蛋白質の変性

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が、この間に経年的な蛋白質の変性が進行する。

どの生活習慣病は、その発症前に非常に長い潜伏期間を有すが、この間に経年的な蛋白質の変性に基づく病態が進行する。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、さらに経時的変化による制御が加わる。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)。よって、蛋白質の質的・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。特に成人後に発症する動脈硬化を背景とした疾病(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。

動脈硬化病変における多様なLDLの変性と酸化LDLの測定

低密度リポ蛋白質(low density lipoprotein : LDL)は多様な酸化修飾を受ける。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)。なかでも, 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(MDA-LDL)である¹⁾²⁾。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がきわめて微量なことに比べると, 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。血中のMDA-LDLは冠動脈疾患患者において有意に高値であった³⁾。ほかの典型的な脂質マーカーに比較し, 有用性

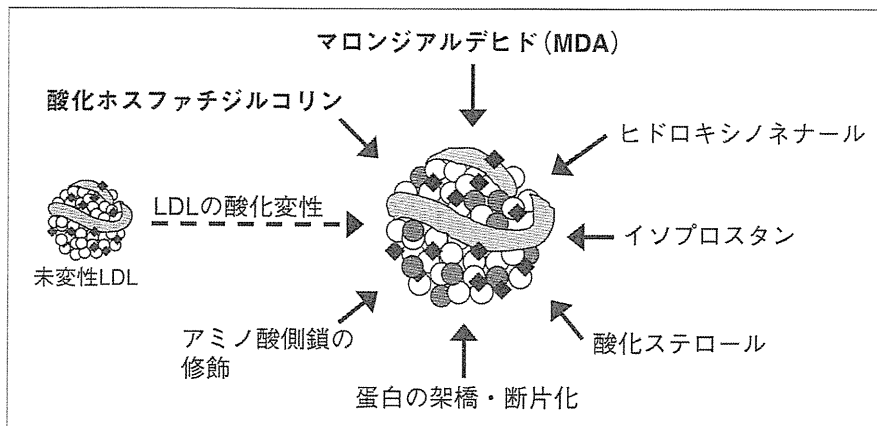


図2 多様なLDLの酸化修飾

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。

が示された。また、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値の比較をした研究では、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⁴⁾(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。MDA-LDLは2008年6月に保険収載された。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か月に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後予測を目的として測定する場合は、術前1回算定可能である。

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良い予知因子であることが示された⁵⁾。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、炎症様反応をひき起こし、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上で重要である。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⁶⁾。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上で理想的かつ重

要である。本稿の後半では、蛋白質に影響を及ぼす分子レベルでの変化に着目して、疾患における蛋白質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、関連蛋白質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鍵となる可能性がある。

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。本邦においては島津製作所の田中耕一氏が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、ほか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。

プロテオミクス技術を用いて血中から蛋白質

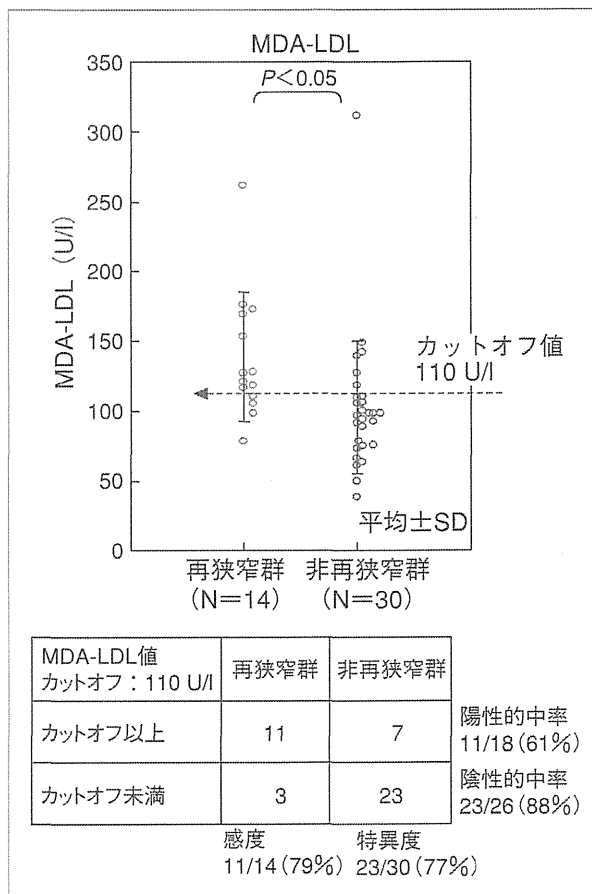


図3 経皮的冠動脈インターベンション(PCI)治療を行った糖尿病患者の再狭窄群, 非再狭窄群におけるMDA-LDL値の比較
糖尿病患者では、MDA-LDL値は経皮的冠動脈インターベンション(PCI)治療の再狭窄や、冠動脈イベント発症と関連した。(文献⁴⁾より引用)

を同定する場合に、質量分析計(MALDI-TOF/MS)を基本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。血液検体を扱う上では試料の分画が、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。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、目的の蛋白質が決まった場合に有効である。疾患時には蛋白質の修飾とともに、蛋白質の断片化が行われることがある。たとえば、心筋トロポニンC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⁷⁾⁸⁾。特異抗体を用いてこのような蛋白質の特徴的な変化を検出することが重要と考えられる。