

2. 動脈硬化関連疾患自己抗体マーカーの ACS 症例における定量評価

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業） 分担研究報告書

血中自己抗体検出と新規炎症マーカーを用いた急性冠症候群予知因子 および治療標的の探索

—動脈硬化関連疾患自己抗体マーカーの ACS 症例における定量評価—

研究分担者：日和佐 隆樹（千葉大学大学院医学研究院 遺伝子生化学 准教授）

研究要旨

我々はこれまで動脈硬化に関係する血清自己抗体マーカーを探索した結果、そのうちのいくつかは急性冠症候群（ACS）にも関連することが判明した。そこで本研究において、新たにプロテインアレイ法による一次スクリーニングを行ない、約 70 種類の候補マーカーを同定した。これらの精製タンパク質、または合成ペプチドを抗原として、血清抗体レベルを AlphaLISA 法により測定し、二次、及び三次スクリーニングの選別を行なった。その結果、ACS 患者検体における 3 種類の抗原に対する抗体レベルは健常者検体のみならず、疾患対照検体と比較しても有意に高かった。これらの自己抗体レベルを測定することにより ACS の発症を予測できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

ACS は発症前に予知することが最も重要である。しかしながら、発症前の患者検体を入手することは極めて困難であり、発症後の検体を調べてもそのほとんどは結果を見ているに過ぎない。その意味において、発症直後に特異的に出現する抗体は、発症が原因となって出現したとは考えられず、発症前から存在していたと推定される。即ち、そのような抗体は発症予測マーカーとなり得る。そこで、ACS の発症直後の検体に特異的に出現する抗体を同定し、予知マーカーとなり得るかどうかを検証する。

前年度の一次スクリーニングとして施行されたプロトアレイ解析において、約 70 種類の候補抗原が選別された。そこでこれらの中に有用マーカーが含まれているかどうかを二次、及び三次スクリーニングによって調べた。

B. 研究方法

二次スクリーニング用の抗原として用いるために、市販品のタンパク質抗原 33 種類を入手し

た。また、独自にサイトカイン類 11 種類を精製した。ペプチド抗原は 49 種類の抗原タンパク質のエピトープ部位として 95 種類を設計し、その未精製品を用いた。

それらの抗原に対する血清抗体レベルを AlphaLISA 法により調べた。タンパク質抗原は 10 µg/ml に希釈し、glutathione- ドナービーズ、または Nickel chelate- ドナービーズと抗ヒト IgG- アクセプタービーズを用いた Alpha (Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay) LISA 法により血清抗体レベルを解析した。ペプチド抗原は 400 ng/ml に希釈し、Avidin- ドナービーズと抗ヒト IgG- アクセプタービーズを用いた。

血清検体は HD コントロールとして健康診断受信者（柏戸クリニック）96 例、及び、ACS 群として、京都大学附属病院の ACS 検体 93 例、及び、千葉大附属病院の AMI 検体 3 例を用いた。

三次スクリーニングとして、二次スクリーニングで選別されたタンパク質 10 種類、及びペプチド 7 種類、動脈硬化関連マーカーである抗原ペプ

チド 3 種類、さらにサイトカイン 23 種類、プロテアーゼ類 6 種類、合わせて 49 種類の抗原を用いて同様に血清抗体レベルを AlphaLISA 法により調べた。用いた血清検体は、健常者検体 192 例、ACS 患者検体 380 例、疾患対照検体 196 例であった。

（倫理面への配慮）

急性冠症候群、及びその関連疾患の患者血清を用いる研究については、「動脈硬化関連疾患のバイオマーカーの開発」（実施責任者：日和佐隆樹）の課題名で千葉大学大学院医学研究院倫理委員会に申請し、平成 22 年 3 月 30 日に承認を受け、さらにその修正版が平成 27 年 2 月 20 日付けで承認されている（承認番号：千大医総第 110 号）。その申請書の記載に従って使用している。協力病院はそれぞれの倫理審査委員会の承認を得ている。検体はインフォームドコンセントを得て採取している。

C．研究結果

二次スクリーニングの結果、プロトアレイ選別マーカーのうち、タンパク質抗原 8 種類、及びペプチド抗原 5 種類に対する血清抗体レベルは ACS 患者検体において健常者検体よりも有意に高かった。ペプチド抗原 5 種類のうち、3 種類はタンパク質抗原で有意差を示したものと共通しており、この 3 種類（PIK、GDN、SEL）は有用マーカーであると考えられた。これらの精製品の供給を理化学研究所に依頼した。

その他、サイトカイン類 4 種類に対する抗体レベルも ACS 患者検体において高かった。

上記の二次スクリーニングにおいて選別された抗原についてさらに別の検体セットを用いてバリデーションテストを行なった。ペプチドは精製品を用いた。さらに ACS に影響を及ぼす可能性のあるサイトカインやプロテアーゼ類についても調べた。その結果、タンパク質抗原 5 種類、ペプチド抗原 3 種類について、健常者検体、及び疾患対

照検体に比べ、ACS 患者検体は有意に高いレベルを示した。この中には NRD も含まれていた。これら 8 種類が現時点での最有力マーカーである。

一方で、前回の ACS 患者検体 6 例を用いたプロトアレイの結果をもとに、今回、別の健常者検体 5 例を解析し、両者の比較により新たに 17 種類の候補抗原を同定した。

D．考察

二次スクリーニングで選別された抗原タンパク質のうち 3 種類、及び三次スクリーニングで選別された抗原のうち 2 種類は Akt を介するシグナル伝達経路に関係するタンパク質であった。このシグナル経路が心筋細胞のアポトーシスを抑制するという既報に関係すると推定される。

NRD は抗原だけでなく抗体レベルも ACS マーカーとして有用であると考えられた。

最初のプロトアレイ法により選別された候補マーカーのうち、現段階までに有用マーカーとして残ったのは 2 種類である。それは当初の段階で特異マーカーとして選別されたものが少なかったためと思われる。そこで、今回、別の健常者検体のプロトアレイ解析を行ない、前回の ACS 患者検体の結果と比較し、新たに 17 抗原を同定した。これらの中により有用なマーカーが含まれていると期待される。

ACS はさまざまな要因により発症すると考えられており、それぞれの要因によって対応するマーカーが異なることもあり得る。従って、詳細で正確な診断のためには、より多くのマーカーを同定することが必要である。

E．結論

現段階において選別された 3 種類の有用マーカーは ACS の発症予測に適用できると推定された。

F．研究発表

1．論文発表

1. Adachi-Hayama, M., Adachi, A., Shinozaki,

- N., Matsutani, T., Hiwasa, T., Takiguchi, M., Saeki, N., Iwade, Y. (2014) Circulating anti-filamin C antibody as a potential serum biomarker for low-grade gliomas. **BMC Cancer** 14, 452.
2. Morii, S., Kato, M., Seki, N., Shinmen, N., Iwase, K., Takiguchi, M., Hiwasa, T. (責任著者) (2014) Inhibition of cell growth by nuclear receptor COUP-TFI: possible involvement of decorin in growth inhibition. **Biochem. Physiol.** S4-001.
 3. Machida, T., Kubota, M., Kobayashi, E., Iwade, Y., Saeki, N., Yamaura, A., Nomura, F., Takiguchi, M. and Hiwasa, T. (責任著者) (2015) Identification of stroke-associated-antigens via screening of recombinant proteins from the human expression cDNA library (SEREX). **J. Translat. Med.** 13, 71.
 4. Goto, K., Sugiyama, T., Matsumura, R., Zhang, X. M., Kimura, R., Taira, A., Arita, E., Iwase, K., Kobayashi, E., Iwade, Y., Saeki, N., Mori, M., Uzawa, A., Muto, M., Kuwabara, S., Takemoto, M., Kobayashi, K., Kawamura, H., Ishibashi, R., Sakurai, K., Fujimoto, M., Yokote, K., Nakayama, T., Harada, J., Kobayashi, Y., Ohno, M., Chin, H., Nishi, E., Machida, T., Iwata, Y., Mine, S., Kamitsukasa, I., Wada, T., Aotsuka, A., Katayama, K., Kikkawa, Y., Sunami, K., Takizawa, H., Nakamura, R., Tomiyoshi, G., Shinmen, N., Kuroda, H., Hiwasa, T.. (責任著者) (2015) Identification of cerebral enfarction-specific antibody markers from autoantibodies detected in patients with systemic lupus erythematosus. **J. Mol. Biomark. Diagnos.** 6: 2.
 5. Shimada, H., Ito, M., Kagaya, A., Shiratori, T., Kuboshima, M., Suzuki, M., Liu, T. L., Nabeya, Y., Matsubara, H., Matsushita, K., Nomura, F., Takiguchi, M., Hiwasa, T. (責任著者) (2015) Elevated serum antibody levels against cyclin L2 in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **J. Cancer Sci. Ther.** 7(2), 60-66.
 6. Kuroiwa, N., Iwase, K., Morii, S., Takiguchi, M., Hiwasa, T. (責任著者) (2015) Up-regulation of growth-inhibitory or tumor suppressive genes by overexpression of C/EBP α or C/EBP β in *ras*-transformed NIH3T3 cells. **Integr. Mol. Med.** 2(2): 150-157.
- ## 2. 学会発表
1. 日和佐隆樹、後藤憲一郎、松村竜太郎、杉山隆夫、瀧口正樹 (2014) 全身性エリテマトーデス患者の自己抗体から選別された脳梗塞血清抗体マーカー . 第 10 回日本臨床プロテオーム研究会 (2014.5.10、東京)
 2. 日和佐隆樹、佐藤万里子、木村理沙、瀧口正樹、峯清一郎、竹本稔、小林一貴、河村治清、石橋亮一、横手幸太郎、中村利華、富吉郷、新免奈津子、黒田英行 (2014) 脳梗塞および糖尿病の診断に有用な血清 BMP-1 抗体マーカー . 第 19 回日本病態プロテアーゼ学会 (2014.8.8-9、大阪)
 3. 島田英昭、谷島聡、小池淳一、松下一之、野村文夫、日和佐隆樹、田川雅俊 (2014) 消化管癌患者における RalA 抗原に対する免疫反応 . 第 73 回日本癌学会学術総会 (2014.9.25-27、横浜)
 4. 日和佐隆樹、峯清一郎、木村理沙、佐藤万里子、張曉萌、瀧口正樹、小林英一、岩立康男、佐伯直勝、後藤憲一郎、松村竜太郎、杉山隆夫、町田利生、工藤孝、土居洋文、中村利華、富吉郷、新免奈津子、黒田英行 (2014) 動脈硬化性脳梗塞に対応する血清抗体マーカーの同定 . 第 87 回日本生化学会 (2014.10.15-18、京都)
 5. 日和佐隆樹 (2014) 動脈硬化関連疾患の血清

抗体マーカーの開発．第 87 回日本生化学会
(2014.10.15-18、京都)(フォーラム)

6. 日和佐隆樹 (2014) 動脈硬化症に対応する血清抗体マーカーの同定．第回日本分子生物学会
(2014.11.25-27、横浜)(フォーラム)

G．知的所有権の取得状況

1．特許取得

1. 「デオキシハイプシン・シンターゼ遺伝子を指標として用いる動脈硬化の検出方法」2014 年 11 月 7 日出願、発明者：中村利華、黒田英行、富吉郷、日和佐隆樹、瀧口正樹、佐伯直勝；出願者：千葉大学及び藤倉化成株式会社、出願番号：特願 2014-226847 号
2. 「動脈硬化診断用ポリペプチドマーカー、及び該マーカー等を用いる動脈硬化の検出方法、並びに動脈硬化診断用キット」2014 年 11 月 12 日特許査定（中国）、発明者：中村利華、黒田英行、富吉郷、日和佐隆樹、瀧口正樹、佐伯直勝、町田利生；出願者：千葉大学及び藤倉化成株式会社、出願番号：特願 2008-209210

2．実用新案登録

該当なし

3．その他

1. 分担執筆：日和佐隆樹 (2014) 疾患抗体マーカーの開発．医学のあゆみー臨床プロテオミクス．251 巻．953-957 頁．