第34回総会ポスター賞受賞記念論文

総説(推薦論文)

推薦者: 日本臨床免疫学会理事, 第34回総会長 尾崎承一

血漿のプロテオミクス解析

苗代康可^{*1,*2}, 鈴木知佐子^{*2}, 木村成寿^{*1}, 山本元久^{*2}, 高橋裕樹^{*2}
相馬 仁^{*1}, 堀 司^{*1,*3}, 篠村恭久^{*2}, 小海康夫^{*1}, 今井浩三^{*4}

—Plasma analysis of rheumatoid arthritis by SELDI—

Yasuyoshi NAISHIRO^{*1,*2}, Chisako SUZUKI^{*2}, Michitoshi KIMURA^{*1}, Motohisa YAMAMOTO^{*2}, Hiroki TAKAHASHI^{*2}, Hitoshi SOHMA^{*1}, Tsukasa HORI^{*1,*3}, Yasuhisa SHINOMURA^{*2}, Yasuo KOKAI^{*1} and Kohzoh IMAI^{*4}^{*1}Department of Biomedical Engineering, Sapporo Medical University School of Medicine^{*2}First Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine^{*3}Department of Pediatrics, Sapporo Medical University School of Medicine^{*4}President, Sapporo Medical University School of Medicine

(Received March 23, 2007)

summary

To identify protein biomarkers linking to disease activity and treatment responses of patients with rheumatoid arthritis (RA), proteomic study using mass spectrometric analysis of plasma proteins was performed. Proteomic profiling technologies can simultaneously resolve and analyze multiple proteins in plasma. Evaluation of multiple proteins of the plasma will be essential to discover protein biomarkers. In this study, we used protein chip surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry approach (SELDI-TOF MS). Through differential profiling of plasma proteins, we selected two prospective candidate biomarkers. One mass spectrometric peak distinguished patients with RA from healthy controls was transthyretin (TTR) and the other distinguished inactive patients with RA from patients with active RA was Serum Amyloid A (SAA). This study demonstrates that proteomic profiling using mass spectrometry of plasma greatly facilitates global discovery and verify clinically relevant sets of disease biomarker directly links to disease activity and treatment responses.

Key words—Rheumatoid Arthritis; Proteomics; SELDI-TOF MS; Plasma; Liposome

抄 録

プロテオミクスの技術が、近年、非常に発展してきている。プロテオミクス解析は複雑な、多種類のタンパク質混合物のプロファイルを一挙に解析することができる。さらに発現量のみではなく、タンパク質の修飾状態までも検出可能である。とくに、血漿のような、多くのタンパク質を含む、複雑なサンプルの解析に有効であると考えられ、関節リウマチにおける診断、疾患活動性および治療効果判定に有用と思われるバイオマーカーの検索が行われている。本稿では血漿のプロテオミクス解析に関する有用性、問題点を、関節リウマチを中心に、われわれの研究報告を含め解説する。

1. はじめに

関節リウマチ(以下RA)は世界人口の約1%と罹患率の高い疾患であり、患者本人のQOLの低下やそれに伴う社会的損失と社会経済にも大きな影響

を及ぼす。しかしながら、生物学的製剤が使用可能となり、従来の治療薬では考えられないほどの画期的な効果が得られており、わが国においてもその有効性が証明されつつある。ただし、年間の薬剤費が高価であり、結核をはじめとした感染症の副作用もあるといった問題点がある。そこで生物学的製剤をより効率よく利用するためのバイオマーカーの開発が希求されている。今回、我々がRAを対象に実際に行ったマーカーの検索を例に、血漿のプロテオミクス解析について解説する。

^{*1}札幌医科大学教育研究機器センター分子機能解析部門^{*2}札幌医科大学内科学第一講座^{*3}札幌医科大学小児科学講座^{*4}札幌医科大学

2. Proteomic analysis

ヒトゲノムプロジェクトの終結により、すべてのヒト遺伝子が明らかになり、次の目標はすべての体内のタンパク質を明らかにすることに移った。mRNA 発現量の変化がそのままタンパク質の発現量の変化と相関しない場合も多く、その機能の多くは、リン酸化、糖付加、アセチル化などの翻訳後修飾によって司られており、実際に生体内で機能しているのはこれらのタンパク質であるため、タンパク質発現解析ひいてはプロテオミクス解析の重要性が改めて認識されてきており、近年、目覚しく発展を遂げている^{1,2)}。ゲノミクスの成功により作成された莫大な遺伝子のデータベースと近年の MS spectrometric technology の進歩により、格段に早くタンパク質を同定できるようになりプロテオミクス研究の発展に拍車をかけている。しかしゲノミクスの成功を導いた核酸を増幅する技術、すなわち PCR に相当する技術がプロテオミクスに存在しない。その結果、プロテオミクスの発展が試料のタンパク質濃度と測定器の感度に限定されているといっても過言ではない。プロテオミクスによる解析技術はいまだ発展の途中であるが、試料中に存在する異常なタンパク質や、修飾されたタンパク質を直接解析する方法として非常に優れている。また、核酸の解析とは異なり、発現レベルの変化の解析以外にも翻訳後修飾の変化を解析することが可能であり、さまざまな視点からタンパク質を解析することができるため、細胞溶解液、血液、涙液、唾液、尿、髄液、関節液、乳汁といったさまざまな試料中タンパク質から種々のバイオマーカーの検索が行われている。

3. plasma analysis

プロテオミクスの技術により、血漿には 3000 種類を超えるタンパク質の存在が明らかになっている³⁾。血漿は、血液還流により全身諸臓器および病巣からのタンパク質を運搬している。血漿中には、各組織からのタンパク質の放出があり、そのタンパク質のプロファイリングから健常人と疾患群間での差異を捕らえることができる。サンプルとしての血漿は、比較的少ない侵襲で、治療の経過に応じて繰り返し入手できる長所もあり、バイオマーカーを探索するためにきわめてリーズナブルであると考えられる。しかし核酸と異なり、タンパク質は親水性や疎水性などの化学的な性質が多様であり、含まれて

Fig. 1 血漿中に存在するタンパク質の濃度と種類
→は SELDI-TOF MS による解析の検出限界を示す。

いるタンパク質のサイズも数千ダルトンから数百万ダルトンのものまで多種多様である。さらに 10^{-10} M 未満の濃度が低いタンパク質から 10^{-6} M 以上の濃度で血漿の大部分を占めるものまで含まれており解析を困難なものにしている (40 mg/ml の濃度で存在しているアルブミンからわずか 1 ng/ml で存在しているサイトカインまでさまざまである) (Fig. 1)。さらにこの低濃度領域には多くの種類のタンパク質が存在し、 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ M には数十種類のタンパク質が存在するが、さらに低濃度になればなるほど存在するタンパク質の種類は増える (Fig. 1)。以下に説明する SELDI-TOF MS の測定感度は非常に良いとされながらも検出限界は 10^{-8} M 程度であり、そのままでは血漿中の 10-20% 程度のタンパク質しか解析できず、アルブミンのような多量に存在するタンパク質の除去、等電点に応じた分画などの前処理が血漿のタンパク質解析には必要になる。

4. Plasma analysis of rheumatoid arthritis by SELDI

われわれは surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (以下 SELDI-TOF MS) を利用し RA 患者のインフリキシマブ投与前後の血漿を解析した。SELDI-TOF MS は表面化学を利用し、チップ上のタンパク質をイオン化し、質量分析器により分子量を測定する。測定した結果を Fig. 2 に示す。二つのピークが治療前後および健常人との比較により変化していた。

ProteinChip はタンパク質解析に適した様々な化学的性質 (陰イオン交換基、陽イオン交換基、逆相

Fig. 2 SELDI-TOF MS による関節リウマチ患者および健康人血漿の解析結果

a: trace image b: gel image

→で示す 11508 m/z および 13879 m/z に変化が見られた。

i: リウマチ患者 A 血漿治療前, ii: リウマチ患者 A 血漿治療後, iii: リウマチ患者 B 血漿治療前, iv: リウマチ患者 B 血漿治療後, v: 健康人 A, vi: 健康人 B

基, 順相基, 金属イオン固定基, 抗体, 受容体タンパク, DNA) を chip 表面上に持たせてあり, その化学的性質に親和性を持つタンパク質を特異的に補足, 濃縮することができる (Fig. 3a). chip 表面上に補足されたタンパク質は UV パルスレーザーを受け, イオン化し, 真空中を検知器に向かい飛行する. 分子量の大きいものほど飛行時間は長くなり, 飛行時間から分子量が算出される (飛行時間型質量分析) (Fig. 3b). 一度の解析で protein chip に捕捉された複数のタンパク質の質量電荷比を同時に測定することが可能であり, 多数のタンパク質の発現量および質量電荷比が, ピークとして検出され, さらにゲルのイメージに変換することもできる (Fig. 2b). 必要な検体はごく少量であり (p mol レベル), 血液, 尿, 髄液, 関節液, 涙液, 唾液, 乳汁といった臨床検体を直接利用でき, 解析に要する時間も短く臨床への応用がしやすい利点がある.

RA 患者血漿を対象とした我々の解析の結果, それらのピークは serum amyloid A (SAA) と Trans-thyretin (TTR) であることが, アミノ酸シーケンサーによる解析にて明らかになった. SAA の SELDI における測定値は, 生化学的検査における

Fig. 3 protein chip および TOF MS の原理

a: イオン交換基, 逆, 順相基, 金属イオン固定基, 抗体, DNA 受容体タンパク, などが直径 2 mm のスポットに固定され, 親和性を持つタンパク質が濃縮, 捕捉される.

b: chip 表面上に補足されたタンパク質は UV パルスレーザーを受け, イオン化し, 真空中を検知器に向かい飛行する. 小さい分子ほど detector に早く到達する.

測定値と相関し (data not shown), CRP の生化学的検査における測定値とも相関した (Fig. 4). TTR においては, SELDI による測定のみが CRP に相関し (Fig. 3), TTR の生化学的検査における測定値は, 治療前後で一定の傾向を示さなかった (data not shown). 今回, われわれが行った proteomics による RA の血漿解析において見つかったバイオマーカー候補は, 既知のタンパク質ではあるが RA の状態を適切に反映しているものと考えられ, これらのマーカーもあわせて臨床診断することでより迅速かつ適切な疾患活動性の評価が行えるものとする.

SELDI-TOF MS によるバイオマーカー検索は非常に有効と考えられ, がんなど, 他の疾患領域においても, さかんに行われている. SELDI-TOF MS によって RA 患者血清を解析した報告としては, de Seny D らによる報告がある. 彼らは, RA の biomarker 候補として 5 つの peak を見出し, そのひとつが MRP-8 であったと報告している⁴⁾.

5. 二次元電気泳動 (TWO-DIMENSIONAL POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS: 2D-PAGE)

血漿のプロテオミクス解析に有効な手段として以

Fig. 4 関節リウマチ患者 10 名の治療前後の TTR および SAA の SELDI-TOF MS による測定値および Latex Agglutination 法による CRP 測定値の変化
太線は平均値を示す。

前よりある技術である。原理は、タンパク質の等電点と分子量の違いにより二次元に分離する方法である。この二つのパラメーターは、相関しないため翻訳後修飾を受けたタンパク質を含め複雑な多くの種類のタンパク質混合物も効率的に分離できる。分離されたタンパク質は、銀染色やクマシーブルー染色などによって描出され、サンプル間で比較される。複数のゲル間における比較の際、データのばらつきや再現性に乏しいという問題を抱え、定量的なタンパク質発現解析手段としては実用的ではないとされていたが、現在では同一ゲル中に多重蛍光標識した複数のタンパク質サンプルを流すことが可能となり、これらの問題は解決されている。二次元電気泳動では、一度に数百ものタンパク質を描出することができ、切り出したスポットをゲル内消化し得られたペプチド混合物を質量分析することでタンパク質の同定が可能である。二次元電気泳動法により、RA のバイオマーカーを検索した報告としては、Takeuchi らによる報告がある。彼らは、二次元電気泳動法により、リウマチ患者血清中から、infliximab 投与前後で発現が変化する 50 もの spot を見出し、同定の結果、それらの中に、CRP, C3, Apo J, Apo A-I, RBP, transthyretin が含まれていたことを報告している⁹⁾。RA においては自己抗原の検索も盛んに行われており、Matsuo らは滑膜組織を抗原にし二次元電気泳動法をもちいて、患者血清中から自己抗体の対応抗原の検索を行っている。その結果、シトルリン化 F-actin cappon protein alpha-1 subunit (CapZ α -1 などの自己抗原の同定に成功し

ている⁶⁾。

6. Liposome

われわれは、今後血漿中のタンパク質群からバイオマーカーを検索するにあたり、いかに機能的に重要な分子を濃縮収集してることが重要と考え、リポソームをバイオプローブとして使用する方法を考案した。リポソームは生体膜上で起こる種々の現象をモデル的に引き起こすために作成された人工生体膜である⁷⁾。われわれは、リポソームが提供する膜構造のタンパク質への親和性をもちいた網羅的なタンパク質の解析の可能性を検討し、血漿タンパク質の解析を通じてバイオマーカー探索への応用の可能性を検討した⁸⁾ (Fig. 5)。本法では Ca^{2+} 依存的にリポソームに結合するタンパク質群を濃縮収集する方法である。 Ca^{2+} は神経伝達物質の分泌に大きく関わり細胞の分化、増殖などの重要な因子である。しかし種々の病態で認められる持続的な Ca^{2+} 濃度の上昇は酵素等の異常活性化により細胞障害を引き起こしうる。関節リウマチで特異的に出現する抗 CCP 抗体の対応抗原にシトルリン化タンパク質があるが、このシトルリン化を引き起こすペプチジルアルギニン・デイミナーゼ (PAD) は Ca^{2+} による活性化機構が明らかになっている⁹⁾。障害された細胞が何らかのタンパク質分泌を起こす可能性があり、そのタンパク質の中に血液中にまで運ばれるものが存在すれば、病態マーカーとなりうる¹⁰⁾。血液中には約 2 mM の高い Ca^{2+} が存在しているため、リポタンパク質や細胞膜と結合している可能性があ

リポソームの作製

リポソーム結合タンパク質の定量分析

Fig. 5 リポソームによるバイオマーカー検索の strategy 模式図

リポソームの作製：リン脂質（egg PC；Phosphatidyl Choline, PS；Phosphatidyl Serine）はクロロホルム/メタノール（2：1）に溶解し（10 mg/ml），必要量の PC と PS を 9：1 に混ぜ，N₂（gas）で乾固．細胞膜に存在する酸性リン脂質（PS）の含量が約 10％であり，リポソームの組成は 10％PS と残りは主要な中性脂質である PC とした．

リポソーム結合タンパク質の定量分析：定量分析の手段として SELDI-TOF MS のほか二次元電気泳動等の解析方法が利用できる

Fig. 6 リポソーム結合タンパク質の SELDI-TOF MS による解析

健康人二名とリウマチ患者治療前一名の血漿からリポソーム結合タンパク質を分離し，SELDI-TOF MS により解析した．（duplicate）

る．われわれは，Ca²⁺ 依存的にリン脂質と相互作用する血漿タンパク質に注目し，実際に RA 患者血漿中の Ca²⁺ 依存的 Liposome 結合タンパク質を SELDI-TOF MS により解析した結果（Fig. 6），上記の SAA, TTR のほかにも，健康人と比して発現が増加している peak の存在が明らかになり，現在同定中である．

7. おわりに

血漿のプロテオミクス解析についてわれわれの研究結果も交え述べた．血漿中にはいまだ解析されていない未知の低濃度領域が存在し，質量分析技術の

発展は道の領域の解析を可能にしようとしている．今後プロテオミクスがさらに発展し新たな診断マーカーや治療標的分子の同定がなされることが期待される．

文 献

- 1) Griffin, T. J., et al. : Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics*, 1 : 323-333, 2002.
- 2) Chen, G., et al. : Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas.

- Mol Cell Proteomics*, **1** : 304–313, 2002.
- 3) Omenn GS, et al. : Overview of the HUPO Plasma Proteome Project : results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. *Proteomics*. **5**(13) : 3226–3245, 2005.
 - 4) de Seny D, et al. : Discovery of new rheumatoid arthritis biomarkers using the surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry ProteinChip approach. *Arthritis Rheum.* **52**(12) : 3801–3812, 2005.
 - 5) Takeuchi T, et al. : Serum protein profile of rheumatoid arthritis treated with anti-TNF therapy (infliximab). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* Feb 24, 2007.
 - 6) Matsuo K, et al. : Identification of novel citrullinated autoantigens of synovium in rheumatoid arthritis using a proteomic approach. *Arthritis Res Ther.* **8**(6) : R175, 2006.
 - 7) Torchilin, V.P, et al. : , Oxford University Press, Preparation of liposomes in Liposomes, second edition, A practical approach, pp3–29, 2003.
 - 8) 木村成寿, ほか : リポソームをリガンドとして用いた血漿蛋白質のプロテオミクス解析. *生物物理化学* **50** : 231–236, 2006.
 - 9) Arita K, et al. : Structural basis for Ca^{2+} -induced activation of human PAD4. *Nat Struct Mol Biol.* **11**(8) : 777–783, 2004.
 - 10) Trump BF, Berezsky IK. Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J.* **9**(2) : 219–228, 1995.