

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790160

研究課題名（和文）：広範な疾患と投与量の個別化に利用できるアルブミンバイオマーカーの探索技術の開発

研究課題名（英文）：Development of screening method for albumin biomarker for personalized medicine

研究代表者

大山 要（OHYAMA KANAME）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50437860

研究成果の概要（和文）：

修飾アルブミンを疾患や投与量個別化に利用できるバイオマーカー群と位置付け、これらを選択的に検出可能な蛍光プローブとアルブミン群を精密分離可能なキャピラリーカラムを開発した。

研究成果の概要（英文）：

Albumin with minor modification (i.e. Mercapto-albumin) are thought to be a target in fishing biomarker for several diseases and personalized medicine. A novel fluorescence probe specifically binding to human serum albumin and a polymer-monomolithic capillary column for separation of the modified albumin were developed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：臨床化学

1. 研究開始当初の背景

近年、翻訳後修飾を受けたアルブミン（修飾アルブミン）が本来の機能を変化させることが明らかにされている。例えば、酸化型アルブミンは抗酸化能が著しく減少し、肝硬変、糖尿病、腎不全、虚血性心疾患で増大することが報告されている。また、糖化アルブミン、S-ニトロソアルブミンや酸化型では薬物、L-Trp、長鎖脂肪酸との結合能が大幅に低下し、修飾型が増加する疾患では、薬物結合能低下による薬物動態への影響も懸念される。よって、既知・未知を含む全ての修

飾アルブミンが多岐にわたる疾患だけでなく、疾患時の投与量個別化にも利用可能なバイオマーカー群になると期待できる。しかし、相同性の高い全ての修飾アルブミンを一斉に測定できる分析法が開発されていない。

既存のアルブミン測定法は抗原抗体反応を利用する免疫学的測定法と、HPLCによる分離分析法に大別される。免疫学的測定法は特定のアルブミンを特異的に検出できる反面、未知な修飾型を検出できない。一方、HPLC法は対象ごとに分離検出することができ、酸化・還元型アルブミンの解析に利用されてき

たが、バイオマーカーの網羅的探索では多数の微量な修飾アルブミンが対象となるため、HPLC では分離能・感度ともに不十分である。

2. 研究の目的

本研究では、圧倒的な分離能を示すキャピラリー電気泳動装置 (CE)、アルブミンを選択的に認識する蛍光プローブ、超高感度検出が可能なレーザー誘導蛍光検出器 (LIF)、高分子化合物の分子量を決定できるエレクトロスプレーイオン化質量分析装置 (ESI-MS) を連結した総合分析システム (CE-LIF-ESI-MS) を開発し、修飾アルブミンの超高感度精密一斉分析を行う。具体的には、CE-LIF を健常人-患者間の差異解析や薬物血中濃度の高濃度-低濃度患者間の差異解析などに用い、差異解析にて検出された未知の修飾アルブミンは、CE-LIF に連結している ESI-MS で修飾形態を特定する。アルブミンを起源とするバイオマーカー (アルブミンバイオマーカー) の網羅的探索により、疾患において変動する修飾アルブミンや疾患時の薬物動態に関わる修飾アルブミンを特定することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

本研究ではまず、(1) DAPIM により認識された修飾アルブミンの分離・検出条件を最適化し、CE-LIF による一斉分析を実現する。次に、(2) 血清試料を用いた各修飾アルブミンの定量試験を行い、分析に必要な感度・精度などの基本的性能を明らかにする。引き続き、(3) CE-LIF-ESI-MS システムを構築し、血清中の未知修飾アルブミンの修飾形態を特定する。(4) 健常人及び患者血清を用いて、病態や薬物動態と関連するアルブミンバイオマーカーの探索を行う。なお、(2) において測定感度が不十分と考えられた場合には、DAPIM とアルブミンの結合様式を明らかにした上で、DAPIM 構造の一部改変を行い、結合能を改善し感度向上を図る。

4. 研究成果

平成 22 年度は開発した蛍光プローブ 4-[4-(4-dimethylaminophenyl)-5-phenyl-1*H*-imidazol-2-yl]benzoic acid methyl ester (DAPIM) がヒト血清アルブミンとの特異的な結合でその蛍光が著しく増大する蛍光特性を見出し、酸化・還元アルブミンの定量に有効であることを確認した。さらに現在、DAPIM-アルブミン複合体の X 線結晶構造解析を継続中であり、結合様式の解明を通じて DAPIM の構造改変により結合能の向上を図っている。また、修飾アルブミンの一斉分離を目的にモノリス型キャピラリーカラムを新たに調製し、キャピラリー電気クロマトグラフィーを用いて評価した。ここでは、タンパ

ク質分離でしばしば問題となる塩基性タンパク質の分離能改善を目的に、弱酸性の methacrylic acid (MAA) を用いてモノリスカラムを調製し、分離能・ピーク形状について調べた。まず、カラム性能を調べたところ、MAA で高い分離能が認められた (thiourea, 49,000 plate/m; aniline, 31,000 plate/m)。さらに MAA 含量を 10 倍、50 倍と変化させたところ、50 倍の MAA を用いた際に最大の分離能 (thiourea, 126,000 plate/m; aniline, 89,000 plate/m) が得られた。

平成 23 年度は、先に開発した蛍光プローブ DAPIM のヒト血清アルブミン (HSA) への特異性を検証するため、競合結合試験及び Scatchard plot により結合サイトの特定及び結合定数の算出を行った。その結果、DAPIM は HSA の site II に結合し、結合定数は $3.65 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ であった。特に結合定数は、これまでに報告されている HSA 用プローブに比べ 10-100 倍以上高く、DAPIM が極めて特異性の高いプローブであることが明らかとなった。次に、アルブミンバイオマーカーの探索では蛍光プローブの定量性が極めて重要であることから、DAPIM を用いて HSA の定量を行った。HSA 標品を対象に定量性を確認した後、ヒト血清試料中の HSA を定量し、従来法であるブロモクレゾールグリーン法 (BCG 法) と比較した。DAPIM を用いた定量結果は、BCG 法で得られた結果と良好な相関性を示した。このことから、DAPIM が血清中でも選択的に HSA と結合し、その結合量が HSA 量に依存的であることが明らかとなり、アルブミンバイオマーカー探索において DAPIM が有用であることが明らかとなった。しかし、今回得られた検出感度は、DAPIM の高い結合定数から想定していた感度に比べ低かったため、極微量のマーカーを探索対象とするには現在進行中の DAPIM の X 線構造解析の結果を基にした、DAPIM の構造改変が必要と思われる。一方、前年度にアルブミンバイオマーカーの精密分離を目的に調製したポリマーモノリスカラムについて、作製条件 (モノマー種類・反応時間等) の最適化を行い、分離能が約 2 倍改善した。以上の研究成果から、アルブミンバイオマーカーを特異的に検出可能な蛍光プローブと多種類のアルブミンを分離可能と予想される高性能モノリスカラムが得られ、両者を備えたアルブミンバイオマーカー探索用分析システムの開発につながる成果となった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- [1] K. Ohyama, D. Horiguchi, N. Kishikawa, N. Kuroda: Monolithic poly(butyl methacrylate-ethylene dimethacrylate-methacrylic acid) column for capillary electrochromatography. *Journal of Separation Science*, **34**, 2279-2283 (2011)
- [2] K. Ohyama, Y. Ueki, A. Kawakami, N. Kishikawa, M. Tamai, M. Osaki, S. Kamihira, K. Nakashima, N. Kuroda*: Immune complexome analysis of serum and its application in screening for immune complex antigens in rheumatoid arthritis. *Clinical Chemistry*, **57**, 905-909 (2011)
- [3] N. Kishikawa, K. Ohyama, J. Yao, A. Miyamoto, T. Imazato, Y. Ueki, K. Nakashima, E. Maehata, N. Kuroda*: Automated analysis of the serum antioxidative activities against five different reactive oxygen species by sequential injection system with a chemiluminescence detector. *Clinica Chimica Acta*, **411**, 1111-1115 (2010)
- [4] K. Ohyama, M. Tomonari, T. Ichibangase, H. To, N. Kishikawa, K. Nakashima, K. Imai, N. Kuroda: A toxicoproteomic study on cardioprotective effects of pre-administration of docetaxel in a mouse model of adriamycin-induced cardiotoxicity. *Biochemical Pharmacology*, **80**, 540-547 (2010)

[学会発表] (計 4 件)

- [1] 大山 要, 馬場雅子, 川上 純, 玉井慎美, 岸川直哉, 植木幸孝, 上平 憲, 中島憲一郎, 黒田直敬: 早期関節リウマチ患者のイ

ムノコンプレキソーム解析. 第 23 回日本臨床化学会九州支部総会, 福岡, 2012 年 2 月

[2] 大山 要, 植木幸孝, 川上 純, 岸川直哉, 上平 憲, 中島憲一郎, 黒田直敬: 慢性関節リウマチ患者血清の LC-MS/MS によるイムノコンプレキソーム解析. 第 18 回クロマトグラフィーシンポジウム, 福岡, 2011 年 6 月

[3] 大山 要, 堀口大輔, 岸川直哉, 中島憲一郎, 黒田直敬: メタクリル酸をイオン性モノマーとする CEC 用モノリスカラムの評価第 21 回クロマトグラフィー科学会議, 西宮, 2010 年 10 月

[4] K. Ohyama, K. Oyamada, N. Kishikawa, Y. Ohba, M. Wada, K. Nakashima, N. Kuroda: Characterization of peptide chiral selectors prepared by solid-phase synthesis in HPLC enantioseparation. 22th International Symposium on Chirality, Sapporo, Japan, July (2010)

[図書] (計 0 件)

該当なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 免疫複合体の網羅的解析方法および新規関節リウマチバイオマーカー

発明者: 黒田直敬, 大山 要, 岸川直哉

権利者: 国立大学法人長崎大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-215402

出願年月日: 平成 23 年 9 月 29 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/analysis/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大山 要 (OHYAMA KANAME)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教

研究者番号：50437860

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし