

## 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 6月 3日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790692

研究課題名（和文） プロテオーム解析を用いた新規生理活性物質による新しい心血管病態機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of a new mechanism of the cardiovascular pathologies by novel physiologically activity substance identified by proteomic analysis

研究代表者

相澤 健一（AIZAWA KENICHI）

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：70436484

研究成果の概要（和文）：心血管疾患は我が国を含む先進諸国では死因の上位を占める主要な疾患である。心血管系はペプチド性生理活性物質による制御を通してホメオスターシスを維持し、その破綻時は病態発症を来す。プロテオミクス解析、特に質量分析計の技術進歩により微量蛋白質の高感度測定が近年可能になった。本研究では心血管疾患特異的生理活性物質を標的とし、冠動脈疾患病態における病態解析を行うことにより、バイオマーカーとしての診断的有用性が示された。

研究成果の概要（英文）：Cardiovascular diseases are main diseases to occupy the high rank of the cause of death in the developed nations including our country. The cardiovascular system maintains homeostasis through the control with the peptide-related bioactive substance and presents with the condition of a pathology onset at the time of the failure. In late years proteomics analysis particularly the technological change of the mass spectrometer allowed high sensitivity measurement of a very small amount of protein. Diagnostic usefulness as the biomarker was shown by assuming a cardiovascular disease-specific bioactive substance a target in this study, and analyzing the condition of a patient in the coronary disease condition of a patient.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：循環器・高血圧、ストレス、蛋白質、プロテオーム

## 1. 研究開始当初の背景

心血管疾患は我が国の死因の上位に位置し、先進諸国では首位を占める主要な疾患である。慢性心不全や高血圧症等の疾患は罹病

期間も長期に渡るため、医療経済学的にも重要な問題である。心血管系は、ペプチド性生理活性物質（アンジオテンシン、エンドセリン、TGF-β等）による制御を受けるが、これ

らのネットワークを通して、ホメオスタシスを維持し、また破綻時は病態発症を来す。生理活性物質は治療の標的となり、病態を反映する重要なペプチド因子は診断への応用が可能となる。

プロテオミクス解析により、質量分析計の技術進歩により微量蛋白質の高感度測定が近年可能になったが、我々は質量分析計を使用したプロテオミクス解析法を疾患病態の解析ならびに臨床応用を目指し、世界に先駆けて導入し使用してきた。具体的には、MALDI TOF-MS質量分析計を十数年前に導入した。質量分析計を導入した最初の国内臨床施設である。重要なことは、臨床施設で質量分析計を8機有し、またそれを使い分けられる専門的な知識と技術を有する研究室は他になく、これら先端技術を心血管病態解析に導入することで、新たな病態メカニズムの解明が期待できることである。

心血管領域における生理活性物質の重要な発見はいままで我国で行われてきた。心臓利尿ペプチドやエンドセリンの発見がそれにあたるが、すでにこれらの発見から約20年が経過している。世界トップクラスの蛋白質科学者（松尾壽之先生ら）が、心血管系の生理活性物質の探索を研究課題とされた結果であった。重要なことは、新規生理活性物質の探索研究は、蛋白質科学の高度な技術と知識が必要なことである。まだ未知の重要な生理活性ペプチドが存在すると考えられる。しかしながら、生理活性蛋白質やペプチドは非常に微量しか存在しないため、技術的な検出限界等が今までの発展を阻んだ最大の要因である。近年の質量分析技術（プロテオミクス解析法）の進歩により、蛋白質の解析の感度を著しく向上した。

心血管疾患の病態モデルとしては、従来心血管生理活性物質（アンジオテンシンII等）

を用いた薬物負荷、大動脈縮窄を用いた圧負荷動物モデルなどが代表的に用いられてきた。これらを細胞レベル、個体レベルで実施し、細胞内外から病態メカニズムを解析する手法が従来から心血管疾患病態の解析のスタンダードとして広く用いられてきた。蛋白質の場合、負荷前後の変化をみるための質・量両面でのサブトラクション法の開発が困難であった。従来から二次元電気泳動が用いられてきたが、多量の試料が解析に必要なため、少量しかとれない臨床試料や病態モデルの解析が困難だった。

当研究室では、病態解析の高感度解析を可能にするために、前処理と検出の二段階の技術の開発ならびにワークフローの開発に努めてきた。病態負荷前後のサブトラクション解析を可能にする目的で、蛍光色素ラベル法(2D-DIGE)等の技術を導入し、臨床解析用に最適化してきた。また、生理活性ペプチドの質的变化の検出を目標とし、イムノ・マス測定法の開発も行った。予備検討にて、血管細胞に代表的生理活性物質であるアンジオテンシンII負荷前後の解析を行い、増減する蛋白質の単離に成功した。微量サンプルの解析が可能のため、細胞、組織のみならず、臨床検体（血液）も解析が可能である。この技術を用いて、心血管細胞全般を包括的に解析するとともに臨床検体での解析を実施する。

## 2. 研究の目的

本研究はプロテオミクス手法を用いて心血管領域の新規生理活性物質の疾患病態における作用解析を行う先進のプロテオミクス解析法を薬剤、化合物、生理活性物質の解析へ応用するアプローチである。具体的には、心血管疾患の新しい生理活性物質ないしバイオマーカーを単離・同定し、これらを標的とした新規治療法の開発を目的とする。質量

分析技術を中心に心血管領域の生理活性物質を探索することで、今までは発見できなかったあるいは微量過ぎて検出できなかった物質を明らかにしたいと考えている。明らかにした新しい分子メカニズム等に対する薬剤の影響の検討、さらに制御化合物の開発を目指す。最終的には、重要な生理活性物質が発見された場合、心血管疾患の新しい診断ないし治療法の糸口とすることが目標である。

### 3. 研究の方法

生理活性物質の単離・同定がもっとも重要な課題である。生理活性を指標に精製、純化を進める研究アプローチとは異なり、微量サンプルから病態特異的な蛋白質ないしペプチドの単離が目的となる。実際には、生理活性物質の単離よりも生理活性を有さないバイオマーカーの候補となる因子を単離する可能性が高い。ここで注意したいのは、蛋白質のフラグメントである。アンギオスタチンやエンドスタチンがコラーゲンやフィブリノーゲン等の一般的な蛋白質の分解により生成される生理活性ペプチドであるように、既知蛋白質を単離した場合でも、生理活性を有するフラグメントである可能性のため、単離されたフラグメントの内容に細心の注意を払う。質量分析計は質量を測定するため、従来は検出しにくかった部分蛋白質の検出に適している。活性を中心とした精製を基準としてきた従来の精製はオーソドックスなアプローチであるが、このように質量分析を通して今までには検出できなかった因子の発見に期待したい。既知の生理活性物質が単離された場合は、機能解析を進めるが、フラグメント因子については、リコンビナントを作製し、心血管細胞ないし病態モデルへ導入して、機能を解析する。

診断バイオマーカー候補については、臨床的検討を行う。心血管疾患を中心に臨床試料で検討する。狭心症、心筋梗塞を中心とする虚血性心疾患ならびに心不全等の患者試料（血液）で検討する。経時的に採血し、解析する。質量分析技術は鋭敏につき、個体差を検出するため、同一症例の経時的な変化で検討することが極めて重要である。当院循環器内科および検診部と協力しながら進めることになるが、すでにプロテオミクス解析に関しては、院内倫理委員会の承認を得ている。また、臨床意義を検討する上で、臨床データベースが整備されている必要がある。当院循環器内科では8年前から虚血性心疾患症例全例について600項目より構成されるデータベースを運用している。経時的な変化にも対応しており、すでに3,000例以上の情報が蓄積している。また、検診部では正常対照として健常者の血液採取を実施している。年間約1,500人の受診者がおり、十分なサンプルサイズである。このように、当研究室では当院臨床部門と連携し、既に臨床情報とバイオマーカーのバイオインフォマティクス解析の融合を実践している。従来のバイオマーカーに関する研究は、臨床情報が乏しかったため、臨床意義の検討が不十分だった例が多い。その点では、本研究では臨床情報の管理が十分可能な現場で行うため、臨床へのフィードバックを十分に活かしながら進めることが特徴のひとつである。

臨床応用が可能なアッセイを構築する。プロテオミクス診断は、従来の診断検査のように中央検査部で実施するという体制も考えられるが、当面はオンサイトで研究者自身が実施することになると考えられる。そのため、プロトコルの確立が最重要課題である。操作の面では、蛋白質分離を最適化することがポイントとなる。標的蛋白質が同定されれば、

新規の場合はそれに対する抗体を作製し、免疫沈降の操作により分離する。いわゆるイムノ・マス法の開発となるが、分離には従来の抗体法、検出には質量分析計を用いるハイブリット型の測定系を想定している。特異的な抗体が作製されれば、これを用いたイムノアッセイも考えられるが、特異的な免疫沈降分離のスペックの方が重要である。検査開発にあたっては、感度やパフォーマンスと同等に重視されるのが再現性である。質量分析計は感度が良いが、再現性を確保したプロトコルの確立は困難と考えられてきた。この点では、上記の抗体操作を加えると同時に、試薬、操作の面でも最適化し、再現性が得られるような系を構築する。

方法論を確立した上で、実際の心血管疾患（虚血性心疾患、心不全等）患者の血液サンプルについて検討し、蛋白質の同定を同時に行う。本解析方法を用いて、心血管細胞全般を包括的に解析するとともに臨床検体での解析も実施し、測定法の臨床的有用性についてまで検証する計画である。

#### 4. 研究成果

東京大学医学部附属病院入院患者の心臓カテーテル検査を行う予定の患者全員に対し、医師が本研究について説明した。このうち同意の得られた者から心臓カテーテル検査時に、血液採取した。

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。対象とした 110 名の患者について心臓カテーテル治療後（約半年）の再狭窄群と非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、通常の因子 X 検査でほ

ぼ同じ値になった検体であるにも係わらず、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 23 検体においては、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。なお、カットオフ値=1.37 において、 $AUC=0.79$ 、感度=87%、特異度=60%、陽性尤度比=2.16、陰性尤度比=0.22 であった。多変量解析の結果、この比が診断にかかわる独立した唯一の因子であり、そのオッズ比は 0.55 (95%CI, 0.30-0.83) であった（表 2）。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。

分析結果と他の臨床パラメータとの相関検査を行った。因子 X 値のシグナル強度比の値が「有意な狭窄の有無」以外の臨床情報と相関しているかどうかを検討した。その結果、因子 X 値のシグナル強度比の値は「有意な狭窄の有無」以外、今回検討した臨床情報のいずれとも相関を示さなかった。

本研究では酸化ストレスの評価法を開発し、心血管病態への関与について検討した。質量分析計を応用した蛋白質の酸化ストレスの測定法を開発し、その病態意義を検討した。

エンザイムイムノアッセイで同じ測定値を示す検体について、本測定系で測定すると、質的に異なるマス・シグナルが認められた。具体的には、因子 X から 16Da 大きいシグナルを検出した。この 16Da はおそらく、そのペプチド中に 1 箇所あるメチオニンシルホ

キシドに由来するものと推測される（データ非表示）。その理由として、化学的に脱酸化処理を行うと、このシグナルが消失したことから、そのことが示唆される。

実際に本測定系の臨床的意義を因子 X の酸化について着目した。因子 X 由来のシグナルで認められた 16Da の差に着目して（因子 X+16Da）／（因子 X）の比をとり、因子 X の酸化状態を示すインデックスを作成した。このインデックス、すなわち因子 X のシグナル強度比の値と臨床情報との相関を調べたところ、有意な狭窄の有無との相関が高いことが判明した。インデックスは酸化されたものの割合を示すが、酸化の増加が病態の原因となっているか、あるいはその結果なのかは現時点では明らかではない。今後の検討課題である。

本測定法は従来測定不能であった血液からの冠動脈狭窄の診断への応用を可能にする全く新しい次元の測定法と考えられる。今回得られた成果は、心血管領域でのプロテオーム性バイオマーカーの開発に成功した、数少ないケースであること、また翻訳後修飾（酸化修飾）の検出ならびに臨床意義を示した最初の例となるものである。今後のさらなる技術開発ならびに臨床応用が期待される。

## 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 1 件）

Ataxia telangiectasia mutated (ATM)-mediated DNA damage response in oxidative stress-induced vascular endothelial cell senescence. Zhan H, Suzuki T, Aizawa K, Miyagawa K, Nagai R. **Journal of Biological Chemistry**. 査読有. 285, 2010, 29662-29670.

〔学会発表〕（計 15 件）

①Aizawa K, Suzuki T, Zhan H, Sawaki D, Ishida J, Nagai R. Regulation of cardiac hypertrophy by DNA damage response as mediat-

ed by KLF5. 第 7 6 回日本循環器学会学術集会. 2012年3月17日. 福岡.

②Ishida J, Suzuki T, Aizawa K, Sawaki D, Matsumura T, Friedman SL, Nagai R. Krüppel-like factor 6 (KLF6) exacerbates glucose intolerance and obesity. 第 7 6 回日本循環器学会学術集会. 2012年3月16日. 福岡.

③Zhan H, Suzuki T, Aizawa K, Sawaki D, Ishida J, Miyagawa K, Nagai R. Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM)-mediated DNA Damage Response Regulates Doxorubicin-induced Cardiotoxicity. 第 7 6 回日本循環器学会学術集会. 2012年3月16日. 福岡.

④Son BK, Suzuki T, Sawaki D, Aizawa K, Matsumura T, Munemasa Y, Zhan H, Okamoto Y, Ishida J, Nagai R. Aortic remodeling stimulates aneurysm formation in apoE<sup>-/-</sup> mice through gp130/STAT3 signaling. 第 7 6 回日本循環器学会学術集会. 2012年3月16日. 福岡.

⑤Sawaki D, Suzuki T, Aizawa K, Matsumura T, Munemasa Y, Ishida J, Friedman SL<sup>2)</sup>, Nagai R. KLF6 Modulates Recruitment and Polarization of Inflammatory Cells through Cardiomyocytes in Initiation of Cardiac Fibrosis. 第 7 6 回日本循環器学会学術集会. 2012年3月16日. 福岡.

⑥Zhan H, Suzuki T, Aizawa K, Miyagawa K, Nagai R. Ataxia telangiectasia mutated (ATM)-mediated DNA damage response in oxidative stress-induced vascular endothelial cells senescence. 第 7 5 回日本循環器学会学術集会. 2011年8月3-4日. 横浜.

⑦Sawaki D, Suzuki T, Aizawa K, Matsumura T, Munemasa Y, Ishida J, Friedman SL, Nagai R. Krüppel-like Factor 6 modulates initiation of cardiac fibrosis. 2010 FASEB Summer Research Conferences. 第 7 5 回日本循環器学会学術集会. 2011年8月3日. 横浜.

⑧Ishida J, Suzuki T, Aizawa K, Sawaki D, Matsumura T, Friedman SL, Nagai R. Krüppel-like Factor 6 (KLF6) is Involved in Glucose Intolerance and Obesity. 第 7 5 回日本循環器学会学術集会. 2011年8月3-4日. 横浜.

⑨Aizawa K, Suzuki T, Zhan H, Miyagawa K, Nagai R. Ataxiatelangiectasia mutated (ATM)-mediated DNA damage response in oxidative stress-induced vascular endothelial cells senescence. 2011 Gordon Research Conferences; Mammalian DNA Repair.

2011/2/6-11. Ventura, CA, USA.

⑩相澤健一、鈴木亨、永井良三. 心血管病態におけるプロテオミクス解析法を用いた新規シグナル伝達経路の同定. 第58回日本心臓病学会学術集会. 2010/9/17-19. 東京.

⑪Aizawa K, Suzuki T, Matsumura T, Sawaki D, Ishida J, Nagai. Identification of a new regulatory pathway of pathologic vascular injury as mediated by KLF5 by proteome analysis. 2010 FASEB Summer Research Conferences. 2010/8/8-13. Steamboat Springs, CO, USA.

⑫Sawaki D, Suzuki T, Aizawa K, Matsumura T, Munemasa Y, Ishida J, Friedman SL, Nagai R. Krüppel-like Factor 6 modulates initiation of cardiac fibrosis. 2010 FASEB Summer Research Conferences. 2010/8/12. Steamboat Springs, CO, USA.

⑬Ishida J, Suzuki T, Aizawa K, Sawaki D, Matsumura T, Friedman SL, Nagai R. Krüppel-like factor 6 (KLF6) is involved in adiposity. 2010 FASEB Summer Research Conferences. 2010/8/11. Steamboat Springs, CO, USA.

⑭Aizawa K, Suzuki T, Zhan H, Matsumura T, Sawaki D, Ishida J, Miyagawa K, Nagai R. Ataxia telangiectasia mutated mediates oxidative stress-induced premature cell senescence in vascular endothelial cells. 16th International vascular Biology Meeting. 2010/6/20-24. Los Angeles, CA, USA.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：

国内外の別：

[その他]  
ホームページ等  
ユビキタス予防医学講座ホームページ  
<http://plaza.umin.ac.jp/upm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相澤 健一 (AIZAWA KENICHI)  
東京大学・医学部附属病院・特任助教  
研究者番号：70436484

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

