

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390204

研究課題名(和文)革新的3次元プロテオーム解析法による心血管疾患の病態解明

研究課題名(英文)Elucidation of the cardiovascular disease by the innovative three-dimensional proteome analytical method

研究代表者

鈴木 亨 (Suzuki, Toru)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：90359620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円、(間接経費) 4,410,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では心血管疾患の解明に必要な経時的解析を考慮した革新的な3次元プロテオーム解析を行った。疾患関連因子について疾患プロテオーム解析の方法論に基づき、その生理活性の検討を行い、病態への関与を調べた。冠動脈カテーテル治療後の再造影検査を受けた症例では、再狭窄を生じていた患者の末梢血中で、BNPフラグメント比(BNP(5-32)/BNP(3-32))が有意に低くなっていた。また、この疾患関連因子の生成メカニズムについて検討を加え、ある種のプロテアーゼが関与している知見を得た。今後は、このプロテアーゼが臨床検体においてどのような活性を有しているかを検討することで、心血管疾患の病態解明をめざす。

研究成果の概要(英文)：We analyzed innovative three-dimensional proteome in consideration of the diachronic analysis that was necessary for the elucidation of the cardiovascular disease in this study. We performed the bioactive examination based on methodology of the disease proteome analysis about a disease-related factor and checked participation in disease condition of a patient. Our initial clinical experience shows that it is strongly associated with presence of restenosis. Reduced levels of the amino-terminal processed peptide, BNP(5-32), relative to BNP(3-32) (as the index parameter BNP[5-32]/BNP[3-32] ratio), were seen in patients with restenosis. In addition, we added examination about the generation mechanism of this disease-related factor and got the knowledge that certain protease participated in. We will consider what kind of activity this protease has in blood and will aim at the condition of a patient elucidation of the cardiovascular disease in future.

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：循環器内科学

キーワード：循環器・高血圧 蛋白質 プロテオーム ストレス トランスレショナル・リサーチ

1. 研究開始当初の背景

心血管疾患は長年にわたる炎症や変性の過程を経て生じるため、多様な病態を示す。従来から分子機能の解析など個々の要素の研究は進められてきたが、全貌解明までは至っていない。一方、ヒトゲノム配列の解読により、ヒトには遺伝子が2万個程度しか存在せず、ヒトの多様性において蛋白質の制御が中心的な役割を果たすことが明らかになった。現在におけるライフサイエンスの研究では、遺伝子研究からその応用・産物である蛋白質を対象とした研究へと主眼が移りつつある。疾患病態の多くは疾患関連蛋白質による制御がその中心的な役割を果たすため、心血管疾患のように多様な病態は蛋白質の解析が最も成果が期待でき、また必要としている領域のひとつと考えられる。

具体的には、病態には疾患関連蛋白質の生成ないし分泌・放出、またこれらによる標的細胞ないし分子への作用、さらに疾患蛋白質の相互作用制御ならびに修飾(リン酸化、ユビキチン化)とプロセッシング(活性体への変換また不活化分解等)が関わる。これら多段階にわたる複雑な疾患関連蛋白質の病態時の制御ならびに作用を包括的に解明しなければ、病態の一元的な理解はできない。また、疾患発症に最終的に関わる蛋白質のパスウェイないしネットワークは、ただでさえ複雑であるが、これらをまず理解しなければそこに至るまでの遺伝子、分子さらに細胞レベルで行われる制御ないしネットワークのプロセスを理解することは不可能と考える。仮に上流の解析ができたとしても最終的な作用点となる蛋白質レベルでの制御の解明は不可避である。よって、病態発症に関わる蛋白質の包括的な解析が病態の全貌解明への鍵となると考えられる。従来からも疾患関連蛋白質の包括的な解析が病態の理解を加速させる鍵となると広く考えられていたが、方法論が十分に確立されていなかったために実現しなかった。

我々は、世界でも有数のプロテオーム解析技術の先駆者として、黎明期より技術開発に着手し、病態解析へいち早く導入してきたことで広く知られている。世界ヒトプロテオーム機構(HUPO)の心血管領域のメンバーに属する唯一の日本人でもあり、心血管系の疾患関連蛋白質を包括的に解析するための技術ならびに実績を有する。

2. 研究の目的

本研究では、我々が長年にわたって培ってきたプロテオーム解析術を駆使し、疾患病態制御の理解を目的とした蛋白質解析を実施し、心血管疾患の病態制御の理解を目指す。最終的には、心血管疾患の病態関連蛋白質の新規発見ないし病態メカニズムの

解明ならびに臨床応用を目的としている。

新規の病態関連蛋白質を単離・同定するために我々が今までに開発してきた技術や手法を全て活用する。プロテオーム解析法はまだ10年程度の歴史の浅い分野であるが、中心的な役割を果たす質量分析技術ならびにそれを駆使するためのノウハウは飛躍的に進歩しており、我々はそのフロントラインに立つ。従来は包括的なショットガン解析のスループットが十分でなかったため、我々は特定蛋白質に着目したフォーカスプロテオミクスを実施してきた。その成果として、島津製作所と共同で世界で初めてとなる虚血性心疾患の予後予測を可能としたプロテオーム・バイオマーカーを開発した(Clin Chem. 2013に発表、特許申請済)、またNEC社と共同で迅速解析が可能な新しい2次元分離チップを開発し(H18-21 NEDO プロジェクト)解析法の技術開発にも貢献してきた。研究計画の項で詳述するが、従来は技術が伴わないことを主な理由として十分な経時的解析が行われてこなかったため、病態解析等で必要とされる時間的な変化の解析がされなかった。本研究では、病態解析に経時的な変化ならびに制御を考慮した新しい3次元のプロテオーム解析を実施する計画である。研究期間中に心血管疾患の病態関連蛋白質の新規発見ないし病態メカニズムの解明を目標としており、臨床応用(診断・治療)の糸口としたい。

疾患プロテオーム解析はまだ十分に進んでいない領域である。プロテオーム解析は技術的な検証を含め、定常状態の細胞ないし組織を中心に行われている段階であり、まだ疾患病態の解析までは十分に進んでいない。比較的進んでいるのが脳神経や癌の領域であり、それぞれの領域において一定の成果が得られ、疾患プロテオミクス解析の有用性が示されている。他方、心血管領域でのプロテオーム解析は現時点では内外ではほとんど行われていない状況にあり、ジョンズホプキンス大学のエイク教授、ロンドン大学のダン教授、カリフォルニア大学ロサンゼルス校のピング教授、そして我々の研究グループが世界の4大拠点と考えられている。

ヒトプロテオーム機構(HUPO)は2011年9月の年会でヒトプロテオームプロジェクトの発足を発表した。5年後までには染色体単位の蛋白質解析を行い、10年後の2020年までには病態を含む全貌解析を目指している。我が国からは糖鎖解析等で参加している研究者もいるが、前述したように心血管領域では私だけである。重要なことは、これから数年の間に世界ではヒトのプロテオームの解明を目指して、数多くのグループが同時に研究を進め、情報交換をしつつ、技術や結果について議論をしながら、統一的理解を目指すことである。私はHUPOに関わっている立場からこれら

の情報を入手かつ活用できる数少ない研究者であり、さらに心血管領域の病態解析については逆に世界に向けて発信できると考えている。

2002年に質量分析計の開発により我が国の研究者がノーベル賞を受賞したが、世界のHUPOでは限られた領域を除けば日本人がリーダーシップをとれていない。質量分析技術ないし研究は我が国で今でも発展中であるが、分析化学の装置としてのカラーが強く、臨床解析を最終的に目指している海外の研究と方向性が異なる面がある。我々は今後、いずれ広く行われるようになることが予想される病態ないし臨床解析の分野を心血管領域から進めて、世界に先駆けて同領域から臨床的な有用性を示し、情報発信するとともにリーダーシップをとる構えである。

3. 研究の方法

心血管疾患の病態関連蛋白質の新規発見ないし病態メカニズムの解明、さらに臨床応用(診断・治療)を目的とする。我々が今までに開発してきた技術や手法を全て活用する。とくに開発してきた複数の差分解析分離法とそれらと組み合わせた最新の質量分析計を最大限活用し、今までにない革新的で経時的な疾患病態解析のアプローチを用いて実施する。重要なことは、開発した差分解析分離法(方法論については次項で詳述)は全て液相での分離を可能にしており、ゲル泳動法と比し、解析時間を短縮したことである。すなわち、ゲル泳動の場合は、泳動・膜トランスファー・切り出し・溶出と数日間にわたる行程が必要であるが、液相の場合はワンステップで行えるため、数時間で解析が可能である。スループットが数日から数時間へと短縮したことにより、従来法よりも処理能力、具体的には処理可能なサンプル数が10倍以上向上したため、この技術的な進歩が本計画で実施する経時的解析を可能にした。

病態発症時における多段階にわたるプロセシングや翻訳後修飾等の制御を探りながら、最も重要な新しい心血管病態制御因子ならびにメカニズムに迫るために、系統的かつ包括的に病態解析を実施するうえで、質的・量的変化に加え経時的制御の3つの軸からなる3次元での経時的な疾患病態プロテオーム解析を行う。分析試料として、心血管疾患を有する患者血液検体、モデル動物(遺伝子改変マウス等)、また病態を反映する細胞モデル系(培養細胞系等)の3種類を用いる。また、分析手法として、分離・濃縮を行うターゲット・プロテオームの方法と、未知の心血管病態制御因子探索のために高速液体クロマトグラフ(LC)/エレクトロスプレー(ESI)型質量分析計を用いた網羅的プロテオーム解析の方法をとる。

従来のプロテオーム解析では、本研究計画のような経時的な視点が欠如していた。3点以上の経時的な比較は、疾患解析においては我々を含め、報告がない。3点での差分解析を可能にする試薬(安定同位体)は最近市販されるようになったが、まだ疾患解析に使用されていない。本研究で導入しながら、我々が開発してきた差分解析法との併用等を検討する。最良(最速、高感度)の方法ないし組み合わせを用いる。このように、経時的な疾患解析を行うために必要な基礎技術の開発は進みつつある中で、我々はその最前線にいる。

従来のプロテオーム解析では、主に質(等電点pI値、分子量等)と量の2つの状態を比較する2次元電気泳動等を用いた差分解析が広く行われてきた。我々も内外の企業とともに臨床応用に向けて差分解析技術の開発を進めてきた。代表的な成果のひとつとして、新しい液相2次元電気泳動類似解析法を導入し、肥満と動脈硬化等を示す生活習慣病のモデル動物(OLETFラット)を解析して、新規の動脈硬化促進因子を発見した(方法論はBiochem Biophys Res Commun, 2006に報告)。現在も取得したfetuinや新規因子の解析を続けているが、動脈硬化のメカニズムの理解につながる発見として期待している。同解析法を用いて心血管疾患の代表的な病態刺激であるtransforming growth factor beta (TGF β)による新規の血管における炎症制御パスウェイも明らかにした(J Biol Chem, 2009)。また、NEDO産業技術研究助成事業では日本電気株式会社(NEC)と共同で臨床解析用の液相2次元電気泳動解析法の迅速解析を可能にするプロテインチップの開発を進めた。この手法を用いて動脈硬化性疾患で特異的に出現する酸化LDLの新しいペプチドを明らかにした。このように、我々は差分解析技術を複数開発ないし導入しており、本研究で行う経時的な病態解析に必要な技術を有する。

包括的な解析には液体クロマトグラフィ- LC系の定量化法として開発が進められているSRM/MRM法(single/multiple reaction monitoring)等についても検討する。具体的な成果として、新しい生理活性ペプチドの発見を期待しているが、既知の蛋白質の重要なプロセシング産物の発見も期待している。ただ、SRM/MRM法の開発・導入は世界でも端緒についたばかりのため、まだLC系の解析をこの方法論に限定するのは時期尚早と考えており、現時点では従来よりのショットガン法等も平行して行う考えである。ターゲット・プロテオームの標的因子として、心臓利尿ホルモン、アンギオテンシン、トロポニン、アポリポプロテインなどを中心に追求する。特に、これらの因子については存在量に加え、その存在様式、すなわち翻訳後修飾やプロセシング体について検討する計画である。過去

にフィブリノーゲンやコラーゲン等のありふれた蛋白質の特異的なプロセシング産物に血管新生抑制作用（抗癌剤として臨床応用）が見出された例がある。また、プロセシング後にはじめて酸化修飾される循環生理ペプチドもある。

本研究では疾患病態の細胞、動物モデルさらにヒト血液サンプルによる検索を行うが、動脈硬化性心血管疾患はヒト固有のものであり、細胞や動物モデルで十分にミミックできない面があるため、ヒト由来の検体の解析は不可欠である。病態に関わる因子やパスウェイの多くは、病態発時に活性化されるものの、安定化後には沈静化ないし不活化することが多い。この変化を経時的な解析を通して特定することにより、重要な因子ないしパスウェイが絞り込めると考えている。

質量分析を応用した臨床プロテオーム診断法の開発を行う。我々は免疫沈降による濃縮（イムノ）と質量分析計（マス）を組合せたイムノマス法を用いた予備検討にて、心臓利尿ペプチド（BNP）のプロセシングを直接的に評価することにより冠動脈狭窄の診断法を開発済みである（*Clin Chem*, 2013に発表、特許申請済）。本研究では検査法の開発を進めつつ、SRM /MRM 法等の新しいLC系のペプチド定量法についても検討する。ペプチド定量法の臨床診断応用も目的であるが、生体内での質的・量的評価法の開発を通して疾患病態の理解も一層深める。

4. 研究成果

平成23年度は、分析試料として、心血管疾患を有する患者血液検体、動物モデル（遺伝子改変マウス等）また病態を反映する細胞モデル系（培養細胞系等）の3種類を用いた。特に、経時的な観点を重視して試料を収集し、分析を進めた。すなわち、細胞ないし動物モデルでは薬剤介入後あるいは病態刺激後の経時的な解析、またヒトでも同様に治療介入等による経時的な変化を追求した。分析手法として、分離・濃縮を行うターゲット・プロテオームの方法と、網羅的プロテオーム解析の方法をとった。また、診断法の開発のために、上記と並行して分析条件の最適化を図り、検出感度および精度の向上を目指した。診断に質量分析計を用いることを考えた場合、どの質量分析計が本診断法に適しているのかということについても検討した。

平成24年度は、臨床検体の分析を引き続き行う一方で、これまでに得られた疾患関連因子について、その生理活性の検討を行い、疾患病態への関与を調べた。具体的には、ヒト由来培養内皮細胞を用い、その因子の有無での細胞内シグナル伝達物質の促進や阻害を分子レベルで検討した。さらに、その因子の生成メカニズムについて、

ヒト心筋培養細胞を用いて検討を行った。すなわち、そのメカニズムにはある種のプロテアーゼが関与しているということを作業仮説として、システムチックにプロテアーゼの阻害剤を培養細胞の系に加え、検討した。また一方、診断法の開発のために、上記と並行して臨床検体の分析条件の最適化を図り、検出感度の向上を目指した。診断に質量分析計を用いることを考え、マトリックス支援レーザー脱離型質量分析計（MALDI）と液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS）のどちらが本診断法に適しているのかということについても比較検討した。

平成25年度は、臨床検体の分析を引き続き行う一方で、これまでに得られた疾患関連因子について、疾患プロテオーム解析の方法論に基づき、その生理活性の検討をさらに行い、疾患病態への関与を調べた。冠動脈カテーテル治療後の再造影検査を受ける連続105症例について横断研究を行った。再狭窄を生じていた患者群において、BNPフラグメント比（BNP(5-32)/BNP(3-32）が有意に低くなっていた。再狭窄を生じていた患者群において、BNPフラグメント比が有意に低値を示した〔再狭窄群（n=22）：非狭窄群（n=83）=1.19（四分位範囲 1.11-1.34）：1.43（四分位範囲 1.22-1.61）, P<0.001〕。また、この疾患関連因子の生成メカニズムについてさらに検討を加え、関与しているプロテアーゼについて検討し、ある種のプロテアーゼが関与している知見を得た。今後は、このプロテアーゼが臨床検体においてどのような活性を有しているかを検討することで、心血管疾患の病態解明をめざす。

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 6 件）

1. Fujimoto H, Suzuki T, Aizawa K, Sawaki D, Ishida J, Ando J, Fujita H, Komuro I, Nagai R. Processed B-Type Natriuretic Peptide Is a Biomarker of Postinterventional Restenosis in Ischemic Heart Disease. *Clin Chem*. 2013; 59: 1330-1337.
2. Enokoku K, Ikeda H, Kato R, Kume Y, Yoshida H, Ono T, Aizawa K, Suzuki T, Yamzaki T, Yatomi Y. Inverse correlations between serum ADAMTS13 levels and systolic blood pressure, pulse pressure, and serum C-reactive protein levels observed at a general health examination in a Japanese population: a cross-sectional study. *Clin. Chim. Acta*, 2013; 421:147-151.
3. Sawaki D, Suzuki T. Targeting

- Transforming Growth Factor-beta signaling in aortopathies in Marfan Syndrome. *Circ J*, 2013; 77:898-899.
4. Suzuki T, Bossone E, Sawaki D, Jánosi RA, Erbel R, Eagle K, Nagai R. Biomarkers of aortic diseases. *Am Heart J*, 2013; 165:15-25.
 5. Ishida J, Suzuki T, Aizawa K, Sawaki D, Nagai R. Comparison of Analytical Performance of Two Single-step Measurement Devices of B-type Natriuretic Peptide. *Int Heart J*, 2012; 53:320-3.
 6. Suzuki T, Tomiyama H, Higashi Y. Vascular dysfunction even after 20 years in children exposed to passive smoking - alarming results and need for awareness. *Arteriosclerosis, Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32:841-842.

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 鈴木亨. 質量分析技術の臨床応用 - 冠動脈疾患のバイオマーカーの開発 - . 最先端研究開発支援プログラム (FIRST) 永井プロジェクト 第 3 回公開シンポジウム (東京) 2014.3.12.
2. 鈴木亨. 質量分析技術を用いた診断法の開発: 循環器疾患における挑戦. 最先端研究開発支援プログラム (FIRST) 田中 ms3d プロジェクト(東京)2014.1.26.
3. 鈴木亨. 「BNP の臨床応用の現状と最新知見」(4) BNP の血中の分子型について. 第 17 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 (大阪) 2013.11.22.
4. 鈴木亨. FMDJ 研究から見てきたこと 1 (血液バイオマーカー). 第 36 回日本高血圧学会総会 フォーカスセッション (大阪) 2013.10.24.
5. 鈴木亨. 質量分析器具を用いたプロテオーム診断の臨床応用 循環器疾患を中心に. 第 38 回日本医用マススペクトル学会年会 (名古屋) 2013.9.26.
6. 相澤健一, 鈴木亨, 藤本宏隆, 澤城大悟, 石田純一, 安東治郎, 藤田英雄, 小室一成, 永井良三. プロセッシングを受けた B 型ナトリウム利尿ペプチドは, 虚血性心疾患における心臓カテーテル治療後再狭窄のバイオマーカーである. 第 38 回日本医用マススペクトル学会年会 (名古屋) 2013.9.26.
7. 鈴木亨. 招待講演「質量分析器具を用いたプロテオーム診断の臨床応用-循環器疾患を中心に」. JASIS 2013(分析展 2013 (第 51 回)) / 科学機器展 2013 (第 36 回)(千葉) 2013.9.4-6.
8. Aizawa K, Suzuki T, Fujimoto H, Sawaki D, Ishida J, Ando J, Fujita H, Komuro I, Nagai R. Processed B-type

- natriuretic peptide is a biomarker of post-interventional restenosis in ischemic heart disease. HUPO 12th Annual World Congress (Yokohama, Japan). 2013.9.14-18.
9. 鈴木亨. モーニングレクチャー 心血管バイオマーカー. 第 78 回日本循環器学会総会・学術集会 (東京) 2013.3.21-23.
 10. Aizawa K, Suzuki T, Fujimoto H, Sawaki D, Ishida J, Ando J, Fujita H, Nagai R, Komuro I. Processed B-type natriuretic peptide measured by immuno-mass spectrometry is a biomarker of postinterventional restenosis in ischemic heart disease. 第 78 回日本循環器学会総会・学術集会 (東京) 2013.3.21-23.
 11. Mizuno Y, Suzuki T, Kohro T, Imuro S, Yamazaki T. B-type Natriuretic Peptide and Subclinical Atherosclerosis in Healthy Population. American heart association scientific sessions 2012 (Los Angeles, USA). 2012.11.3-7.
 12. Suzuki T: Biomarkers of aortic disease. ESC CONGRESS 2012 (Munich, Germany). 2012.8.25-29
 13. 鈴木亨. セッション「橋渡し研究」. CBI/JSBi 2011 合同大会. 神戸. 2011.11.10
 14. Fujimoto H, Suzuki T, Aizawa K, Sawaki D, Ishida J, Nagai R. Processed B-type natriuretic peptide is a biomarker of post-interventional restenosis in ischemic heart disease. HUPO 2011 10TH World Congress. Geneva, Swiss Confederation. 2011.9.4.
 15. 藤本宏隆, 鈴木亨, 相澤健一, 澤城大悟, 石田純一, 永井良三. プロセスされた B 型ナトリウム利尿ホルモンは冠動脈疾患における経皮的冠動脈インターベンション後再狭窄のマーカーである. 第 36 回日本医用マススペクトル学会年会. 大阪. 2011.9.15

〔図書〕(計 2 件)

1. 相澤 健一, 鈴木 亨. 新しい動脈硬化のバイオマーカー開発: 新しいプロテオーム技術を用いて(3.動脈硬化のバイオマーカーの臨床的意義, <特集> 第 76 回日本循環器学会学術集会). 循環器専門医: 日本循環器学会専門医誌. 20(2); 237-244, 2012
2. 相澤 健一, 鈴木 亨. バイオマーカーの探索・発見・同定の試 (5. 今後のバイオマーカーの展望, 特集: 循環器病のバイオマーカー企画・構成 / 井上

晃男) . Heart View. 16(12); 306-310,
2012

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: 心疾患診断マーカー
発明者: 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
権利者: 東京大学、NEC、積水メディカル
種類: 特許出願
番号: 2011-175982
出願年月日: 2011年8月11日
国内外の別:

名称: 血液試料を用いて心筋虚血状態を評
価する方法
発明者: 鈴木亨、藤本宏隆
権利者: 国立大学法人東京大学、株式会社
島津製作所
種類: 特許出願
番号: PCT/JP2008/65444
出願年月日: 2008年8月28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

鈴木 亨 (SUZUKI TORU)
東京大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号: 90359620

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

なし