

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659301

研究課題名(和文) 免疫複合体網羅解析に基づくバイオマーカー探索のための新規アプローチ

研究課題名(英文) Novel approach for discovery of biomarkers by comprehensive analysis of immune complexes

研究代表者

黒田 直敬 (Kuroda, Naotaka)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：50234612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：免疫複合体は液性免疫のトリガーとなる一群であり、疾患病因の根幹を解明するための有用な情報源となる。そこで我々は、免疫複合体中の抗原を網羅的に同定する“イムノコンプレキソーム解析法”を創製した。イムノコンプレキソーム解析法を用いて関節リウマチ(RA)患者、変形性関節症患者および健康人の比較を行った結果、RA患者でのみ特異的に検出される2種類の自己抗原タンパク質(トロンボスポンジン-1、血小板第4因子)を特定した。更に、既存の血液検査では陰性で臨床診断が困難な早期RA患者の解析を行った結果、トロンボスポンジン-1が患者の約50%で検出され、RAの早期診断に有望なバイオマーカーになることを見出した。

研究成果の概要(英文)：We proposed a novel proteomic strategy (immune complexome analysis) consisting of ICs separation from serum and direct tryptic digestion followed by nano-liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the identification and profiling of antigens in circulating immune complexes (CICs). We applied this strategy to the analysis of CICs in rheumatoid arthritis (RA). Sera samples from healthy donors and osteoarthritis patients were used as controls. CIC-associated thrombospondin-1 (TSP-1) was found in 81%, and CIC-associated platelet factor 4 (PF4) was found in 52% of established RA patients, but neither protein was found in CICs from any of the controls. Furthermore, CIC-associated TSP-1 was found only in early RA patients and was found in neither disease controls nor healthy donors. It was also found that seronegative early RA patients, who lack lacking RF and anti-CCP antibody markers, had CIC-associated TSP-1.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床化学

1. 研究開始当初の背景

抗体はBリンパ球から産生されるタンパク質の一種である。抗体は体外から侵入する細菌やウイルスを認識し、これらと結合することにより最終的に白血球やマクロファージを活性化することで生体防御に大きな役割を果たしている。このように抗体は、本来、非自己である生体異物を認識し、排除する働きを持つ。しかし、遺伝子の変異により生じるタンパク質に対しても抗体が産生される場合がある。近年、このようにして生じる自己抗体の測定ががんの早期診断法として注目を集めている。例えば、2007年に新規承認された抗p53抗体は食道がん、大腸がん、乳がんの早期マーカーとして期待されている。このように自己抗体により形成される免疫複合体は、がんを始めとする種々の疾患に関して多くの情報を与える可能性を有しているにもかかわらず、免疫複合体を形成する抗原側に着目し、これを予断なく網羅的に解析し、効率的にバイオマーカーを探索するアプローチはこれまで全く試みられていない。

2. 研究の目的

ヒト血中に存在する免疫複合体を簡便に捕捉・精製し、共存する生体成分の影響を受けることなく抗原をLC-MS/MSにより検出・同定できる測定操作の確立を行う。そのための基礎的検討を行ったのち、実際に自己免疫疾患患者血液の免疫複合体中の抗原を同定し、方法の信頼性を確認する。最終的には、健常人及び各種がん患者血液の実試料を用いて免疫複合体を形成している抗原の解析を行い、健常人と比較することでバイオマーカーの探索を行う。新たに見出したバイオマーカーに関しては、その測定の臨床検査法としての有用性をさらに精査する。最終的には、自己免疫疾患を始めとする他の疾患にも本法を適用し、その適用性・普遍性を評価する。

本研究では対象を免疫複合体を形成する抗原に絞り込むことで、バイオマーカーの探索精度を飛躍的に高めることができる。また、自己抗体と結合している抗原のみを簡便な操作により精製し、網羅解析することで、効率的かつ系統的にバイオマーカーの探索を行うことが可能となる。このような試みは、これまで全く報告されていない。一方、自己免疫疾患以外にも免疫複合体の解析結果が活用できる研究分野は、がん、感染症、臓器移植など極めて多岐に渡っている。従って、本技術が実用化された場合、生命科学研究のための画期的バイオマーカー探索法だけにとどまらず、普遍性を持つ臨床検査法としても、その大きな社会貢献が期待される。

3. 研究の方法

本研究は、モデル免疫複合体を用いる基礎的検討と血液試料を用いる解析法の構築・評価、及び実試料分析によるバイオマーカーの

探索に大別できる。既に市販のタンパク質とそれを認識する抗体を用いる検討によって、免疫複合体の抗原を高感度かつ精度よく網羅解析する手法は確立しており、本申請研究においては、以下の検討を行う。モデル免疫複合体を添加した血液試料から免疫複合体、更には抗原を効率的に精製する方法を検討する。自己抗体の存在が認められた患者血液中の免疫複合体を解析し、抗原の同定を行う。得られた結果を従来の抗原同定法による結果と比較し、本法の信頼性を評価する。

最終的には、健常人及び自己免疫疾患の血液を使用して免疫複合体を形成する抗原の網羅解析を行い、バイオマーカーの探索を行う。

4. 研究成果

平成23年度は免疫複合体の網羅的解析を行う新規測定法(イムノコンプレキソーム解析法)の確立を目的に、1)モデル免疫複合体を用いる基礎的検討、2)血液試料を用いる解析法の構築・評価、3)実試料分析によるバイオマーカーの探索を行った。

1) モデル免疫複合体を用いる基礎的検討
ミオグロビン及びアルブミンとそれを認識する抗体から作製したモデル免疫複合体を用い、プロテインG固定化磁気ビーズにより免疫複合体を血清中から効率よく回収・トリプシン消化するための条件検討(ビーズ量・還元アルキル化条件・トリプシン量)を行った。検討結果をもとに確立した前処理を行うことで、血清中の複数の抗原タンパク質をLC-MS/MS測定により、一斉に同定できることを確認した。

2) 血液試料を用いる解析法の構築・評価
健常人血清(13名)を対象にイムノコンプレキソーム解析を行い、患者群との差異解析を実施するための抗原データベースを作成した。

3) 実試料分析によるバイオマーカーの探索
液性免疫との関連性が明確で、自己抗原・抗体についての情報が豊富な自己免疫疾患患者(関節リウマチ、RA)を対象にイムノコンプレキソーム解析を実施した。健常人血清と晩期RA患者血清について比較した結果、健常人では全く検出されず、RA患者でのみ高頻度に検出される2種類のタンパク質(Thrombospondin-1及びPlatelet factor4)が存在することがわかった。特にThrombospondin-1の検出頻度は81%と高く、従来からRAの判定に利用されてきた抗CCP抗体(68%)よりも高い感度を示した。さらに、RAの症状が現れておらず、血液検査での判定が困難とされる早期RAについても解析を行った。その結果、Thrombospondin-1は早期RAの54%で検出され、血液検査でRA陰性とされた早期RAの50%に認められた。

一方、Platelet factor4 は早期 RA では 12%の頻度でしか検出されなかった(晩期 RA : 52%)ことから、疾患の進行度を反映する可能性が考えられた。

平成24年度は免疫複合体の網羅的解析を行う新規測定法(イムノコンプレキソーム解析法)の確立を目的に、4)LC-MS/MS条件の最適化、5)中枢神経症状を呈する自己免疫疾患の特異的なバイオマーカーの探索を行った。

4) LC-MS/MS条件の最適化

イムノコンプレキソーム解析法のLC-MS/MS分析におけるタンパク質及びペプチドの同定数の向上を目的に、キャピラリーカラム、グラジェント時間及びトリプシン消化法の検討を行った。グラジェント時間について検討したところ、タンパク質およびペプチドの同定数はグラジェント時間を長くすることで増加した。これは勾配が緩やかになることで、分離が向上したためと考えられる。また、キャピラリーカラム間の比較については、イオン化用ニードルとカラムが一体化したNano HPLC Capillary Columnが最良の結果を与えた。さらに、マイクロ波照射によるトリプシン消化の効率化を検証した結果、極めて短時間(1分)で従来の消化時間(12時間)と同等の消化効率を得られることがわかった。

5) 中枢神経症状を呈する自己免疫疾患の特異的なバイオマーカーの探索

血清以外の対象サンプルとして脳脊髄液を選定し、中枢神経症状を呈する自己免疫疾患(中枢神経性ループス、多発性硬化症、視神経脊髄炎)に特有の免疫複合体の探索を行った。各疾患にのみ認められる抗原タンパク質が、中枢神経性ループスで2種類(suprabasin及びrapamycin-insensitive companion of mTOR)、視神経脊髄炎で1種類認められた。特に、suprabasinは比較的高頻度(26名中9名)に検出され、中枢神経性ループスの診断に有用である可能性が示唆された。

平成25年度は自己免疫疾患患者総数(140万人)の8割以上を占める7種類の自己免疫疾患について血清解析(全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、皮膚筋炎、強皮症、混合性結合組織病、血管炎症候群、ミクリッツ病)を行った。各疾患7~14名の患者を解析した結果、疾患特異的な自己抗原は65種類見つかったが、検出頻度は最大で33%と低かった。一方、それぞれの自己抗原について各疾患との関連性を論文情報をもとに考察すると、3種類の自己抗原がすでに自己抗原候補として報告されていたことから、本解析の妥当性が示唆された。また、ミクリッツ病はこれまで自己免疫疾患か否かという点で議論されてきたが、同一の手法で解析した結果を自己免疫疾患と比較すると、疾患特異的な自己抗原の数が従来の自己免疫疾患に匹敵し、自己抗体のサブタイプ別に考察すると、皮膚筋炎・混合性結合組織病・血管炎症候群

に類似していることがわかった。

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 3 件)

[1] M. Baba, K. Ohyama, N. Kishikawa, N. Kuroda: Optimization of separation and digestion conditions in immune complexome analysis. *Analytical Biochemistry*, **443**, 181-186 (2013)査読有

[2] K. Ohyama, A. Kawakami, M. Tamai, M. Baba, N. Kishikawa, N. Kuroda: Serum immune complex containing thrombospondin-1: a novel biomarker for early rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **71**, 1916-1917 (2012)査読有

[3] 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)査読有

〔学会発表〕(計 12 件)

[1] 大山 要, 吉見春香, 馬場雅子, 岸川直哉, 黒田直敬: イムノコンプレキソーム解析における免疫複合体の捕集方法についての検討-Protein G, Protein A 固定化磁気ビーズの比較-第7回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 仙台, 2013年11月

[2] 馬場雅子, 大山 要, 一瀬邦弘, 玉井慎美, 岸川直哉, 川上 純, 黒田直敬: イムノコンプレキソーム解析による自己抗原プロファイリングに基づく自己免疫疾患へのアプローチ. 第7回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 仙台, 2013年11月

[3] 馬場雅子, 大山 要, 岸川直哉, 黒田直敬: イムノコンプレキソーム解析法におけるペプチド分離およびトリプシン消化の最適化. 第6回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 京都, 2012年11月

[4] 大山 要, 川上 純, 玉井慎美, 馬場雅子, 岸川直哉, 黒田直敬: 免疫疾患に関連する免疫複合体抗原のスクリーニングへのイムノコンプレキソーム解析法の応用. 第6回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 京都, 2012年11月

[5] 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

[6] 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

[7] 馬場雅子, 大山 要, 川上 純, 岸川直哉, 中島憲一郎, 黒田直敬: 早期および晩期関節リウマチ患者のイムノコンプレキソーム解析. 第 28 回日本薬学会九州支部大会, 福岡, 2011 年 12 月

[8] 塩川明菜, 大山 要, 一番ヶ瀬智子, 藤秀人, 岸川直哉, 今井一洋, 黒田直敬: FD-LC-MS/MS 法を用いる新規トキシコプロテオミクス. 第 5 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 名古屋, 2011 年 11 月

[9] 大山 要, 川上 純, 馬場雅子, 岸川直哉, 上平 憲, 植木幸孝, 中島憲一郎, 黒田直敬: イムノコンプレキソーム解析による関節リウマチ患者のバイオマーカー探索. 第 24 回 バイオメディカルシンポジウム (BMAS2011), 鳥取, 2011 年 9 月

[10] 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

[11] 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: 免疫複合体網羅解析 (イムノコンプレキソーム解析) に基づくバイオマーカー探索. 日本薬学会第 131 年会, 静岡, 2011 年 3 月

[12] 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: イムノコンプレキソーム解析法の創製と慢性関節リウマチ患者への応用. 第 22 回日本臨床化学会九州支部総会, 福岡, 2011 年 2 月

〔図書〕(計 1 件)

[1] K. Ohyama, N. Kuroda: Immune complexome analysis. *Advances in Clinical Chemistry volume 60*, Ed. by G. Makowski, Elsevier, Chapter 4, 129-141 (2013)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

[1] 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

[2] 名称: 中枢神経ループス (NPSLE) 診断用バイオマーカー

発明者: 一瀬邦弘, 大山 要, 川上 純, 黒田直敬, 中嶋秀樹, 岸川直哉, 馬場雅子

権利者: 国立大学法人長崎大学

種類: 特許

番号: 特願 2013-55543

出願年月日: 平成 25 年 3 月 18 日

国内外の別: 国内

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

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田直敬 (NAOTAKA KURODA)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 50234612