

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26640115

研究課題名(和文) 血液一滴の可能性を拓く - 血漿プロテオミクスで脳のストレス関連障害を語る -

研究課題名(英文) Study of stress-related disorder monitored by plasma proteomics

研究代表者

小寺 義男 (Yoshio, Kodera)

北里大学・理学部・准教授

研究者番号：60265733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：血液は体内のあらゆる情報を含んでいる。しかし、血清・血漿中のタンパク質分析は組織、臓器に比べて非常に難しく、まだまだ満足な分析が出来ているとは言い難い。本研究ではまず第一に、血漿タンパク質を詳細に分析するための前処理方法を開発し、安定同位体標識試薬、質量分析計と組み合わせた血漿タンパク質の高精度比較分析法を開発した。次にこの方法をストレス関連障害モデルマウスの血漿分析に応用し、ストレス関連障害と相関するタンパク質の検出に成功した。また、脳組織(海馬、視床下部)に対しても同様に詳細なプロテオーム変動を解析し、不安様行動に相関するタンパク質の同定に成功した。

研究成果の概要(英文)：Human plasma is by far the most commonly sampled diagnostic biospecimen and a potentially informative resource of extreme importance for characterizing proteomes. However, the existence of high-abundance proteins and the large heterogeneity of protein modification and fragmentation make precise analysis of proteins challenging. In this study, we developed the novel pretreatment method of plasma, which we call PF method, for preseparating plasma proteins. Based on this method, we achieved high-quality comparative analysis of plasma proteins and accurately detected alteration of plasma proteome profiling correlating with stress-related disorder.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：血漿 プロテオミクス 質量分析 ストレス障害 モデルマウス 血液

## 1. 研究開始当初の背景

血液は全身を巡り、細胞に不可欠な分子を輸送し、代謝の副産物を回収する。このため、体内のあらゆる情報を含んでいると言っても過言ではない。しかし、血清・血漿中のタンパク質分析は組織、臓器に比べて以下の点において非常に難しく、質量分析技術の進歩した現在においても満足な分析が出来ているとは言い難い。

### 【血清・血漿中のタンパク質分析の困難さ】

1. 血清・血漿中には濃度 60~80mg/mL のアルブミン(Alb)、数 10mg/mL の IgG をはじめとした約 20 種類の高濃度タンパク質(濃度数 mg/mL 以上)が総タンパク量の 99% を占めている。
2. これに加えて、組織由来成分、インターロイキンなどの濃度は非常に小さく(数 µg/mL ~ 数 pg/mL)、血清・血漿中のタンパク質の濃度範囲は  $10^{10}$  ~  $10^{11}$  と非常に幅広い(細胞は  $10^5$  程度)。
3. 血中タンパク質は血液中に存在する期間(例えば血清アルブミンで 20 日前後といわれている)の間に多様な切断と修飾を受けており、個々のタンパク質に由来する成分が非常に多様な状態で存在している。
4. 体中の情報を反映しているため、特にヒト血液においては、非常に大きな個人差が存在している。

以上の理由より、ストレス関連障害にともなう脳内の変動を血液中のタンパク質で検出するためには、血液試料を詳細かつ正確に比較分析するための前処理方法と質量分析技術を組み合わせた高精度な比較分析技術が必要不可欠である。

## 2. 研究の目的

本研究では、(1)血漿タンパク質の変動を詳細に、かつ、高精度に比較するための方法を確立し、(2)ストレス関連障害という脳疾患において変動する血中タンパク質を探索する。これと同時に、(3)脳組織中のタンパク質についても行動異常に相関するタンパク質を解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)血漿タンパク質の比較分析

血漿タンパク質の詳細な比較分析はい、独自の血漿タンパク質の前処理方法、安定同位体標識法、高精度液体クロマトグラフィー質量分析計(LC-MS)を組み合わせて行った。

#### 血漿タンパク質の前処理方法

本研究では、市販の高濃度タンパク質除去カラム Ms-3(アジレント・テクノロジー, CA, USA)と独自に開発した血清・血漿タンパク質分画物(PF法: plasma fraction method)(特願 2015-018394)とを組み合わせた方法を確立し、血漿タンパク質を3分画(PF1, PF2, PF3)した。

#### 安定同位体標識試薬

市販されている安定同位体標識試薬 Tandem Mass Tag (TMT, ThermoFisher Scientific, MA, USA)を6種類の試料中のタンパク質に標識し(TMT-6plex 使用)混合後に LC-MS/MS 分析を行った<sup>1)</sup>。血漿、脳組織ともに6匹以上の比較分析が必要であったため、6種類の試料を1セットとして TMT-6plex で比較分析した。セット間で共通の試料を1種類準備し、その試料を標準試料としてセット間の質量分析データを補正して、全試料の比較解析を行った。

#### LC-MS/MS 分析

LC-MS 用のナノ流速用の LC は、Easy-nLC 1000(ThermoFisher Scientific)を用いた。質量分析計は、四重極・フーリエ変換ハイブリッド質量分析計 Q-Exactive(ThermoFisher Scientific)を使用した。nanoLC 用のトラップカラムは AcclaimTM 3 µm PepMap100, 2 cm × 75 µm I.D(ThermoFisher Scientific)を用い、分析カラムは nanoHPLC Capillary C18 analytical column, 120 mm × 75 µm I.D(日京テクノス、東京、日本)を使用した。移動相の溶媒は A 液として 0.1% FA / 99.9% H<sub>2</sub>O、B 液として 90% ACN / 0.1% FA / 9.9% H<sub>2</sub>O を用いた。移動相の流速は 300 nL/min とし、120 分のグラジエントプログラムでデータ依存的 MS/MS 分析を行った。

### (2) 脳組織(海馬、視床下部)中のタンパク質の網羅的比較解析

まず初めにリン酸バッファー(1M KCl, プロテアーゼインヒビターを含む)を用いてホモジナイズし、超音波破碎機にて可溶性タンパク質を抽出した。その後、不溶性成分に対して、膜タンパク質のショットガンプロテオミクス用に開発された相関移動溶解法(PTS法, Masuda, T. et al. *J Proteome Res* 7:731-40, 2008)を用いて溶解した。量分画に対して、還元アルキル化後に酵素消化を行った。その後、血漿タンパク質分析と同様に TMT-6plex を標識し、比較分析を行った。

### (3) 不安障害モデルマウス

うつ様症状を示す慢性ストレス負荷マウス

強制水泳と3種類の慢性マイルドストレスを負荷してうつ様症状を示すモデルマウスを作製した。強制水泳試験における無動時間をうつ様状態の指標とした。

#### 不安障害を示すピロカルピンマウス

非選択的ムスカリン受容体刺激薬ピロカルピンをマウスの腹腔内に投与し、てんかん重積を引き起こし、1時間後にフェノバルを投与しててんかん重積を抑えることにより、一過的に不安様行動を示すマウスを作製した。本実験では、てんかん重積から4日、16日、28日後のマウスを対象とし、オーブ

ンフィールドテストによる移動距離と明所存在比率を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 血漿タンパク質の詳細な比較分析法の開発

図1に血漿プロテオーム解析の流れを示す。本研究では、微量成分を分析するためにマウス用の高濃度3タンパク質除去カラムと独自に開発したタンパク質分画法(PF1~PF3)を用いて調製した成分を対象に分析した。その結果、血漿中の約500種類を高精度(精度10%以内)に比較分析することが可能となった。不安様行動に相関するタンパク質の探索に成功した(図2)。

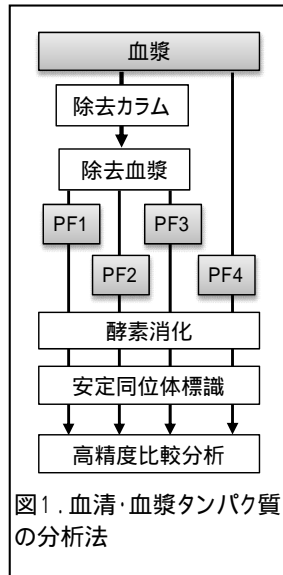


図1. 血清・血漿タンパク質の分析法

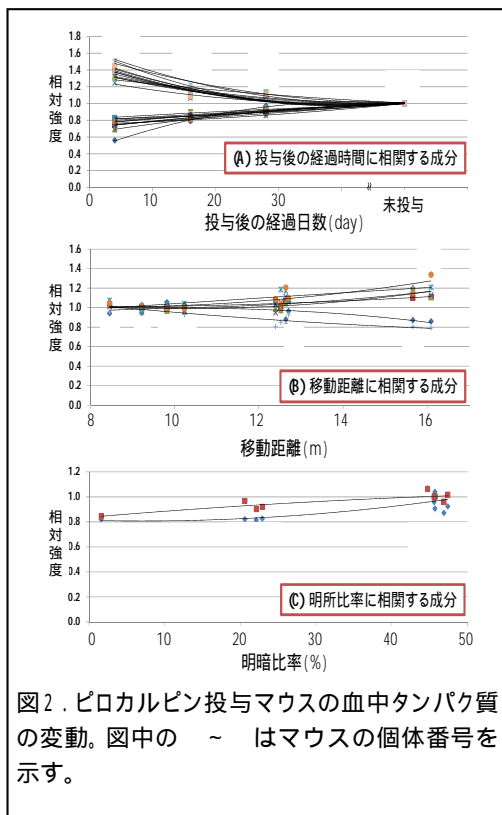


図2. ピロカルピン投与マウスの血中タンパク質の変動。図中の ~ はマウスの個体番号を示す。

##### (2) ストレス障害モデルマウスの脳組織中のタンパク質の比較解析

不安障害を示すピロカルピン投与マウスの海馬の解析

ピロカルピン投与後とそのコントロールマウス計11匹のマウスの海馬について、可溶性タンパク質分画と難溶性タンパク質分

画(図3)をそれぞれトリプシン消化して2セットのTMT-6plexで標識後にイオン交換カラムで再分画しLC-MS分析を行った。その結果、神経関連タンパク、ミエリン関連タンパク質を含む約3500タンパク質に対して高精度な比較分析に成功した。この結果をもとに不安様行動(移動距離の増大と暗所存在比率の低減)と相関して変動するタンパク質の同定に成功した。その結果をもとに、DAVID bioinformatics Database (<https://david.ncifcrf.gov/>)を用いてPathway解析を行った結果、Calcium signaling pathway(図4), Huntingtons disease, long-term potentiationに相関することが分かった。

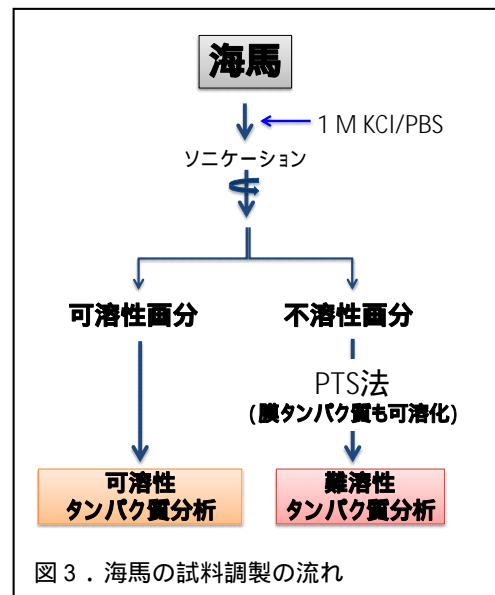


図3. 海馬の試料調製の流れ

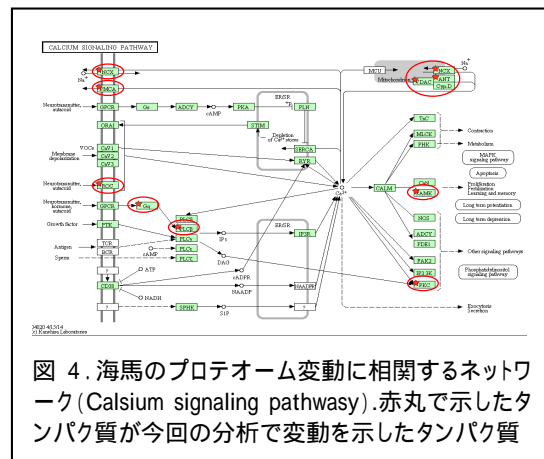


図4. 海馬のプロテオーム変動に相関するネットワーク(Calcium signaling pathway).赤丸で示したタンパク質が今回の分析で変動を示したタンパク質

##### ストレス誘発うつ様モデルマウスの視床下部の解析

視床下部についてアガロース2次元電気泳動法を用いたプロテオーム解析を行い、うつ様モデルマウスで発現量が減少し、KSの投与によって回復するタンパク質として metabotropic glutamate receptor 2と2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase 1 (CNPase1)を見出した。これらの結果はウェスタンブロッティング(WB)及び免疫組織

染色でも確認され、WB では CNPase1 の isoform である CNPase2 が CNPase1 と逆の挙動を示すことが明らかになった<sup>2)</sup>。さらに、2次元電気泳動法では同定困難な微量タンパク質を検出するため、視床下部について TMT-6plex を用いたプロテオーム解析を行ったところ、うつ様モデルで発現量が変化するペプチドが784種見出され、そのうち漢方薬香蘇散投与により回復するペプチドが235種検出された。そして、131種のペプチドが無動時間と相関することが明らかとなった。これらのペプチドから synaptosomal-associated protein 25 や myelin-associated glycoprotein など56種のタンパク質が同定された。

#### <参考文献>

- 1) Kodera Y, Hido Y, Kato R, Saito T, Kawashima Y, Minamida S, Matsumoto K, Iwamura M. Mass Spectrometry, 2014;3(Spec Iss 3):S0044. doi: 10.5702/massspectro-metry. S0044.
- 2) Nagai T., Hashimoto R., Okuda S.M., Kodera Y., Oh-Ishi M., Maeda T., Ito N., Hanawa T., Kiyohara H., Yamada H. Trad. Kampo Med. 2 (2), 50-59 (2015). DOI: 10.1002/tkm2.1018

#### 5. 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計16件)

Suzuki S, Kodera Y., Saito T, Fujimoto K, Momozono A, Hayashi A, Kamata Y, Shichiri M. Methionine sulfoxides in serum proteins as potential clinical biomarkers of oxidative stress. Sci Rep. 2016 Dec 8;6:38299, doi: 10.1038/srep38299. (査読有)

Kikuchi W, Nishimura M, Kuga T, Tsuchida S, Saito T, Satoh M, Noda K, Kodera Y., Tomonaga T, Nomura F. Fibrinogen alpha C chain 5.9 kDa fragment (FIC5.9), a biomarker for various pathological conditions, is produced in post-blood collection by fibrinolysis and coagulation factors. Clin Proteomics. 2016 Oct 7;13:27. (査読有)

Sogawa K, Takano S, Iida F, Satoh M, Tsuchida S, Kawashima Y, Yoshitomi H, Sanda A, Kodera Y., Takizawa H, Mikata R, Ohtsuka M, Shimizu H, Miyazaki M, Yokosuka O, Nomura F. Identification of a novel serum biomarker for pancreatic cancer, C4b-binding protein -chain (C4BPA) by quantitative proteomic analysis using tandem mass tags. Br J Cancer. 2016 Sep 22. doi: 10.1038/bjc.2016.295. (査読有)

Kaneko S, Matsumoto K, Minamida S, Hirayama T, Fujita T, Kodera Y., Iwamura M. Incremental Expression of 14-3-3 Protein Beta/Alpha in Urine Correlates with Advanced Stage and Poor Survival in Patients with Clear Cell Renal Cell Carcinoma. Asian Pac J Cancer Prev. 2016;17(3):1399-404. (査読有)

Otsuka S, Ohkido T, Itakura M., Watanabe S, Yamamori S, Iida Y, Saito M, Miyaoka H, Takahashi M. Dual mechanisms of rapid expression of anxiety-related behavior in pilocarpine-treated epileptic mice. Epilepsy Res. 2016 Jul;123:55-67. doi:10.1016/j.eplepsyres.2016.04.007. Epub 2016 Apr 25. (査読有)

Ito N., Nagai T., Hirose E., Kiyohara H., Oikawa T., Yamada H., Hanawa T.: Antidepressive-like effect of volatile components of kososan in a mouse model of stress-induced depression. Trad. Kampo Med. 3 (2), 87-93 (2016). DOI: 10.1002/tkm2.1042 (査読有)

Nagai T., Hashimoto R., Okuda S.M., Kodera Y., Oh-Ishi M., Maeda T., Ito N., Hanawa T., Kiyohara H., Yamada H.: Antidepressive-like effect of a Kampo (traditional Japanese) medicine, kososan (Xiang Su San) in a stress-induced depression-like mouse model: Proteomic analysis of hypothalamus. Trad. Kampo Med. 2 (2), 50-59 (2015). DOI: 10.1002/tkm2.1018 (査読有)

Beppu M, Sawai S, Satoh M, Mori M, Kazami T, Misawa S, Shibuya K, Ishibashi M, Sogawa K, Kado S, Kodera Y., Nomura F, Kuwabara S. Autoantibodies against vinculin in patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. J Neuroimmunol. 2015 Oct 15;287:9-15. (査読有)

Taoka Y, Matsumoto K, Ohashi K, Minamida S, Hagiwara M, Nagi S, Saito T, Kodera Y., Iwamura M. Protein expression profile related to cisplatin resistance in bladder cancer cell lines detected by two-dimensional gel electrophoresis. Biomed Res. 2015;36(4):253-61. (査読有)

Mizusawa K, Kawashima Y, Sunuma T, Hamamoto A, Kobayashi Y, Kodera Y., Saito Y, Takahashi A. Involvement of melanin-concentrating hormone 2 in background color adaptation of barfin

flounder *Verasper moseri*. Gen Comp Endocrinol. 2015 Apr 1;214:140-8. (査読有)

Matsuoka Y, Nishi D, Tanima Y, Itakura M, Kojima M, Hamazaki K, Noguchi H, Hamazaki T. Serum pro-BDNF/BDNF as a treatment biomarker for response to docosahexaenoic acid in traumatized people vulnerable to developing psychological distress: a randomized controlled trial. Transl Psychiatry. 2015 Jul 7;5:e596. doi: 10.1038/tp.2015.89. (査読有)

Sawai S, Satoh M, Mori M, Misawa S, Sogawa K, Kazami T, Ishibashi M, Beppu M, Shibuya K, Ishige T, Sekiguchi Y, Noda K, Sato K, Matsushita K, Kodera Y, Nomura F, Kuwabara S: Moesin is a possible target molecule for cytomegalovirus-related

Guillain-Barré syndrome. Neurology. 83(2): 113 - 117, 2014. (査読有)

Kume H, Muraoka S, Kuga T, Adachi J, Narumi R, Watanabe S, Kuwano M, Kodera Y, Matsushita K, Fukuoka J, Masuda T, Ishihama Y, Matsubara H, Nomura F, Tomonaga T: Discovery of colorectal cancer biomarker candidates by membrane proteomic analysis and subsequent verification using selected reaction monitoring (SRM) and tissue microarray (TMA) analysis. Mol Cell Proteomics. 13(6):1471 - 1484, 2014. (査読有)

Kawashima Y, Kodera Y, Singh A, Matsumoto M, Matsumoto H: Efficient extraction of proteins from formalin-fixed paraffin-embedded tissues requires higher concentration of tris(hydroxymethyl)aminomethane. Clin Proteomics. 11;4: 6 pages, 2014, doi: 10.1186/1559-0275-11-4.(査読有)

Nishimura M, Satoh M, Nishimura S, Kakinuma S, Sato K, Sawai S, Tsuchida S, Kazama T, Matsushita K, Kado S, Kodera Y, Nomura F: Human apolipoprotein e resequencing by proteomic analysis and its application to serotyping. PLoS One 9(1): e85356, 2014 doi: 10.1371/journal.pone.0085356 (査読有)

Kodera Y, Hido Y, Kato R, Saito T, Kawashima Y, Minamida S, Matsumoto K, Iwamura M: Establishment of a strategy for the discovery and verification of low-abundance biomarker peptides in plasma using two types of stable-isotope tags. Mass Spectrometry, 2014;3(Spec Iss 3): S0044. doi: 10.5702/massspectro

-metry. S0044. (査読有)

〔学会発表〕(計 43 件)

永井隆之, 小寺義男, 斎藤達也, 大石正道, 伊藤直樹, 花輪壽彦, 山田陽城, 清原寛章, 香蘇散煎剤の抗うつ様作用のプロテオーム解析, 第 33 回和漢医薬学会学術大会, 口頭発表/シンポジウム, 2016 年 8 月 27 日, 星薬科大学, 東京都.

Y. Kodera, T. Saito, Y. Kawashima, Y. Tani, M. Shichiri, Peptidome Analysis of Human Plasma, 口頭発表/シンポジウム, 日本プロテオーム学会 2016 年大会, 2016 年 7 月 28 日, 北里大学薬学部, 東京

小寺義男, 様々な前処理技術を用いた血漿プロテオミクス・ペプチドミクス, ホテルニューアカオ, 口頭発表, 第 43 BMS(Biological Mass Spectrometry) コンファレンス), 2016 年 7 月 5 日, ホテルニューアカオ, 静岡・熱海

小寺義男, 斎藤達也, 川島祐介, 谷祐至, 七里眞義, 血漿ペプチドミクス, 第 64 回質量分析総合討論会, 口頭発表/シンポジウム, 2016 年 5 月 18 日, ホテル阪急エキスポパーク, 大阪・吹田市.

小寺義男, 血液一滴の可能性を拓く - 質量分析計と前処理技術を組み合わせた血清・血漿のプロテオミクス・ペプチドミクス解析 -, 第 62 回質量分析総合討論会, 口頭発表(基調講演)/シンポジウム, 2014 年 5 月 14 日, ホテル阪急エキスポパーク, 大阪・吹田市

〔図書〕(計 3 件)

山田陽城、清原寛章、松本 司、矢部武士、永井隆之、伊藤直樹：薬学生のための漢方医薬学(改訂第 3 版, 2017)(山田陽城、花輪壽彦、金 成俊、小林義典編集) 南江堂(東京)第 4 章 pp. 193-254 疾患研究の基盤となる国際コンソーシアムの動向 【次世代オミックス疾患解析の基盤となる国際連携】 Human Proteome Organization(HUPO), 小寺義男, 山本格, 成松久, 石濱泰, 朝長毅, 山田哲司, 病理と臨床 Vol.34: 1-7, 2016

小寺義男。「血清バイオマーカー探索のためのサンプル調製」 医学のあゆみ, 医歯薬出版, 東京, 第 251 巻, 989-993, 2014.

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: 酸化ストレスマーカー及びその使用  
発明者: 小寺義男, 七里眞義  
権利者: 同上

種類：特許  
番号：特願 2016-232947  
出願年月日：2015 年 11 月 30 日  
国内外の別：国内

名称：タンパク質分離方法、タンパク質  
分析方法、及びタンパク質分離キット  
発明者：小寺義男，川島祐介，前田忠計  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特願 2015-018394  
出願年月日：2015 年 2 月 2 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

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

小寺 義男 (KODERA, Yoshio)  
北里大学・理学部・准教授  
研究者番号：60265733

##### (2)研究分担者

永井 隆之 (NAGAI, Takayuki)  
北里大学・感染制御学府・准教授  
研究者番号：00172487

##### (3)研究分担者

板倉 誠 (ITAKURA, Makoto)  
北里大学・医学部・准教授  
研究者番号：30398581