

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：34519

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659341

研究課題名(和文) 新しいペプチドーム解析法を用いた飲酒による血圧変動起因物質の探索

研究課題名(英文) Research in substances inducing changes in blood pressure after alcohol drinking by using a new method for peptidome analysis

研究代表者

若林 一郎 (Wakabayashi, Ichiro)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：70220829

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)：アルコールの循環器系への作用を解明するために、飲酒後に血圧と連動して変化するペプチドを探索した。飲酒45分後には血圧は低下し、この低下は飲酒後2～3時間持続した。飲酒後の後期には飲酒前に比べて、m/z 2662とm/z 2380のペプチドは有意に減少し、m/z 1467のペプチドは有意に増加した。m/z 1467とm/z 2662はフィブリノゲン鎖由来断片ペプチドと同定され、m/z 2380は補体C4a由来断片ペプチドであることが明らかになった。このうちm/z 1467とm/z 2662のペプチドは、アルコール依存症患者で断酒後に変動すると報告されているペプチドとアミノ酸配列が一致していた。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the mechanism for the action of alcohol on the circulatory system, we tried to find the peptides that change in relation to blood pressure after alcohol drinking. Blood pressure significantly decreased at 45 minutes after drinking, and the decrease in blood pressure was still observed at 2～3 hours after drinking. Drinking caused a significant decrease in levels of the peptides with m/z 2662 and m/z 2380 and a significant increase in a level of the peptide with m/z 1467. The peptides with m/z 1467 and m/z 2662 were identified to be parts of fibrinogen alpha chain, while the peptide with m/z 2380 was identified to be a part of complement 4a. The peptides with m/z 1467 and m/z 2662 were the same as the peptides that have been reported to change after abstinence in chronic alcoholic patients.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：アルコール 循環動態 血圧 フラッシング ペプチドーム解析

1. 研究開始当初の背景

法医学で遭遇する内因性急死の剖検死体からはアルコールがしばしば検出される。そこで内因性急死の原因として飲酒が誘因となって心疾患や脳血管疾患が発症し突然死を起こす可能性が指摘されている (alcohol-induced sudden death)。突然死の中年男性のうち約3分の1が大酒家であるといわれており、飲酒と突然死との関連性が指摘されている。特に大量飲酒者や binge drinker (酔っぱらう目的で短時間に大量に飲酒する者)では突然死のリスクが上昇する。そこで飲酒が誘因となる突然死の原因としてアルコールの循環器系への作用が推測される。しかしアルコールの循環器系への作用については不明な点が多く、飲酒による血圧の変動が報告されているものの、そのメカニズムは未だ解明されていない。血圧調節因子としてさまざまな血管作動性ペプチドが存在するが、これらペプチドの飲酒時血圧変動への関与についても不明である。

2. 研究の目的

最近開発された BLOTCHIP®を用いた新しいペプチドーム解析の技術を用いて、飲酒後に血圧と連動して変動するペプチドを探索した。

3. 研究の方法

(1) 対象者

27~46歳の健常男性10名を対象に、飲酒後の血圧変化と関連する血中ペプチドを探索した。

(2) 飲酒負荷実験

被験者に白ワイン(体重 kg あたり 3 ml)を10分以内に飲んでいただき、その45分後と2-3時間後に血圧、脈拍をそれぞれ3回ずつ測定しその平均値を比較した。そして、負荷前を含めた3つの時点で静脈採血を行い、血清を分離して、-80℃で保存した。

(3) BLOTCHIP®解析システムによる飲酒後の血清検体のプロファイリング

被験者より採取した各血清検体を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、レーンごとニゲルを切断し BLOTCHIP®に電気転写し、MALDI 型質量分析計により質量分析を行った。そして得られた積算スペクトルを用いて、経時的な3群の中で各2群間のディファレンシャルプロファイリング解析を行った。

(4) ペプチドの精製と精密質量の測定

ディファレンシャルプロファイリング解析において有意差が見られ、かつアルコール負荷に連動して変化していることが推測されるペプチドについて、新たに検体から除蛋白、脱脂、脱塩を行った後、高速液体クロマトグラフィー装置を用いた逆相クロマトグ

ラフィーによる分取精製を行い、得られた各画分を濃縮後、MALDI-TOF-MSにて精密質量を測定した。

(5) ペプチドの構造解析

(4)により精製されバイオマーカーの候補となったペプチドの同定のため、精製されたペプチドについて MS/MS 測定および MASCOT サーチによる構造解析を行った。

(6) 血清補体価の測定

血清検体の C3 レベルを免疫比濁法により測定した。

4. 研究成果

(1) 飲酒後の血圧変動

飲酒負荷実験の予備実験において、飲酒後の血圧変動の時間経過を検討した。その際に、予想以上に血圧上昇の相には個人差が大きく、ペプチドーム解析用の検体採取を統一的行うことが困難と判断し、飲酒後短時間の血圧低下因子のみを探索することにした。

(2) 飲酒後短時間(3時間以内)の血圧および脈拍の変化

被験者に白ワイン(体重 kg あたり 3 ml)を10分以内に経口投与し、その45分後と2-3時間後にはいずれも全体として負荷前に比べて有意な血圧の低下を認めた(図1)。脈拍は負荷前に比べて45分後には上昇する傾向を認めたが、その差は有意ではなく、また負荷前と負荷120-180分後の脈拍には有意な差を認めなかった(前, 70.5 ± 7.8/min; 45分後, 75.8 ± 14.5/min; 120~180分後, 72.7 ± 9.8/min)。

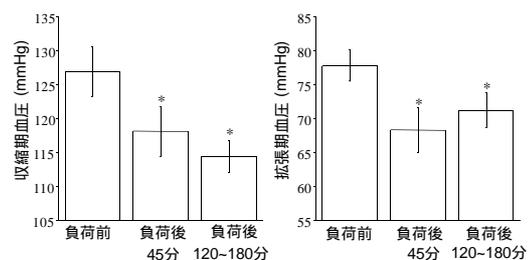


図1. 飲酒後の血圧の変化. *, 負荷前値との間の有意差 ($p < 0.01$).

(3) バイオマーカーの精製

2群間で有意差を認めたピークが計33個見つかった。これらのペプチドにつき全平均積算スペクトルを算出し、経時変化パターンの分類を行い、最終的に18個のペプチドがアルコール負荷に連動して変化していることが示唆された。質量分析計による構造解析時の測定範囲が、 m/z 3000程度までであることから、このうち13個のペプチドが同定候補になった。そして、BLOTCHIP®を用いリフレクターモード測定によりペプチドの質量を測定したところ、7種のペプチドが BLOTCHIP®上で精密質量を測定可能であった。

(4) バイオマーカーの同定

精製したペプチドについてさらに構造解析をおこなった。逆相クロマトグラフィーにより精製した4種のペプチド(m/z 1467, 1618, 2380, 2662)の中から、経時変化の小さい m/z 1618を除いた3種(m/z 1467, 2380, 2662)について(図2)、MS/MS構造解析を実施したところ、 m/z 1467と m/z 2662はいずれもフィブリノゲン鎖由来断片ペプチドであると同定された。さらに、 m/z 2380は補体C4a由来断片ペプチドであることが判明した。このうち、 m/z 2380と m/z 2662は飲酒負荷前に比べて、負荷後120-180分後に減少したのに対して、 m/z 1467は負荷後120-180分後に増加した。これらのペプチドは飲酒負荷による血圧変動と連動して変化しており、さらに断片の生成には血中のプロテアーゼが関与することから、飲酒、血圧、ペプチド、プロテアーゼの関連性が推測された。

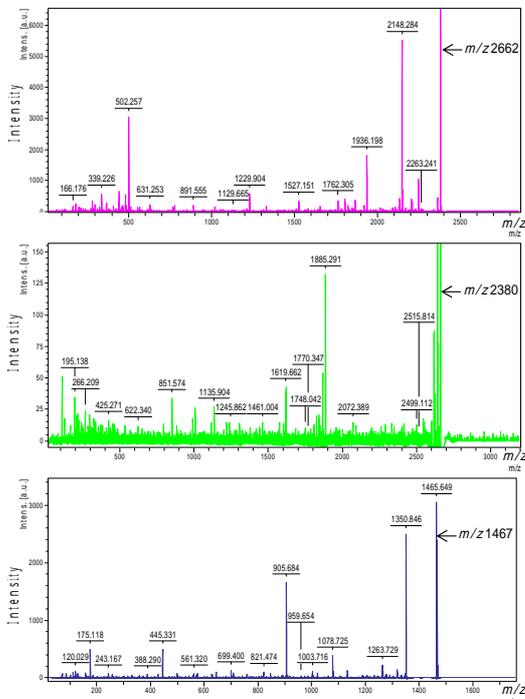


図2. m/z 1467, 2380, 2662のMS/MSスペクトル.

(5) 血清補体価の変動の有無

m/z 2380が補体C4a由来断片ペプチドであることが判明したため、飲酒に伴う補体C4自体の変動を検討した。飲酒負荷前値の 27.8 ± 1.9 mg/dlに対して、飲酒負荷後45分および120-180分後には、それぞれ 28.5 ± 1.8 mg/dlおよび 28.4 ± 1.9 mg/dlとわずかながらC4aの有意な上昇を認めた。

(6) アルコール依存症患者に関する既報のペプチドとの対比

アルコール依存症患者の入院時と入院し断酒3ヶ月後の血液をClinProtTMを用いた

ペプチドームで解析した過去の報告では、入院時には m/z 1466および m/z 1616の2つのペプチドが増加し、逆に m/z 2660のペプチドが減少していた(Sogawa et al., Proteomics Clin Appl 2009, 3: 821-828)。質量分析の結果、このうち、 m/z 1466はフィブリノペプチドA断片、 m/z 1616はリン酸化フィブリノペプチドA断片と同定され、さらに、 m/z 2660はフィブリノペプチドC鎖と同定され、すなわち、いずれのペプチドもフィブリノゲン関連ペプチドであった。そして、 m/z 1466と m/z 2660のペプチドは、本研究で得られた m/z 1467と m/z 2662のペプチドと m/z レベルが酷似していたが、実際のアミノ酸配列は完全に一致し、同一のペプチドであることが判明した。さらに、上記の既報でリン酸化フィブリノペプチドA断片と同定された m/z 1616のペプチドは本研究でも変動することが認められた(同定は試みなかったが) m/z 1616ペプチドに相当すると推測される。一方、これら2つのペプチド以外に、本研究では補体C4aの断片と考えられるペプチド(m/z 2380)が新たに検出された。

(7) 検出されたペプチドと飲酒後の血圧変動との関連性に関する考察

今回BLOTCHIP®を用いたペプチドーム解析では33種類のペプチドが得られたが、このうち、血圧の低下と連動して増加するペプチドは m/z 1467のみであり、この場合飲酒後早期の45分の時点では増加しておらず、飲酒120~180分後に遅れて増加した。同様に飲酒後遅れて変化(減少)するペプチドとして、 m/z 2380と m/z 2662が検出された。

このうち、 m/z 1467と m/z 2662はフィブリノペプチド由来のペプチドであったが、構造上から異なった断片であり、また飲酒後の変動のパターンも逆であった。上記のアルコール依存症患者に関するSogawaらの論文では、血圧のデータは示されていないが、一般にアルコール依存症患者の断酒後には血圧が上昇することが知られている。アルコール依存症患者の入院時の血圧の低い時点では m/z 1466のペプチドは増加し、 m/z 2660のペプチドが減少していたということから、血圧との関連性においてのこれらのペプチドの変動は本研究における m/z 1467と m/z 2662の変動パターンと一致する。これらのフィブリノペプチドの断片が実際に飲酒後の血圧変化とどのような機序を介して関連するかどうかについては今後の検討課題である。また、飲酒者では非飲酒者に比べて血漿中のフィブリノーゲンが低下することや飲酒によりプラスミノゲンアクチベーターが上昇することが報告されているが(Brien et al., BMJ 2011;342:d636; Sumi et al., Alcohol Alcohol 1988; 23: 33-43)、これらの知見と本研究で同定された2つのフィブリノーゲン関連ペプチド断片の飲酒後の変動との関連性は不明である。

本研究では、飲酒後に有意に変動するペプチドとして、フィブリノペプチド断片以外に、補体 C4a の断片であるペプチド (m/z 2380) が新たに検出された。血清 C4 レベルが、飲酒後有意に増加しており、 m/z 2380 が減少していることから、C4 の分解が飲酒により抑制される可能性がある。さらに m/z 2380 が飲酒後遅れて減少することから、飲酒後の血圧変動の調節と C4 の分解との関連性が示唆された。

本研究で検出された飲酒後の血圧変化と連動する3つのペプチド断片について、これらはいずれも飲酒後血圧が低下し、血圧低下が持続している時点で有意に増加または減少している。したがって、これらのペプチド断片が飲酒後の血圧低下の直接の原因となるとは考えられず、むしろ血圧低下を調節する機構に関与する(血圧を元に戻す)ことが推測される。

(8) 結論および今後の研究の展望

飲酒後血圧低下に遅れて有意に変動する3つのペプチドを同定することができた。このうちの2つのペプチドは、既報によりアルコール依存症患者の入院後の断酒により変動するペプチドと一致している点で興味深い。一方、新たに補体 C4a の断片ペプチドが飲酒後の血圧低下に遅れて変動することが明らかになり、これは飲酒後の血清 C4 レベルの変化とも連動する可能性が示唆された。

本研究では、ペプチド断片の生理活性を明らかにするまでには至らなかったが、3つのペプチド断片の合成ペプチドを作成し、それぞれの生理活性を現在検討中である。また、BLOTCHIP®を用いた解析で得た33種類のペプチドの中に、飲酒後45分から減少するペプチドが6種類存在し、これらについての同定も今後試みる予定である。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若林 一郎 (WAKABAYASHI, Ichiro)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：70220829

(2) 研究分担者

羽竹 勝彦 (HATAKE, Katsuhiko)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40164842

丸茂 幹雄 (MARUMO, Mikio)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：40333950

武田 裕司 (TAKEDA, Yuji)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：90302299