

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26253036

研究課題名(和文) 動脈硬化性疾患の早期診断を可能にする分子イメージング・リポーム解析技術の構築

研究課題名(英文) Establishment of Molecular Imaging and Lipidomics Technologies for Early Diagnosis of Atherosclerotic Disease

研究代表者

松浦 栄次 (MATSUURA, Eiji)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：20181688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,200,000円

研究成果の概要(和文)：B2-glycoprotein Iは、止血・血栓、血管新生を制御する多機能血漿タンパク質である。本タンパク質は、plasminによる限定分解を受けることで、特定のリン脂質、酸化脂質、タンパク質との結合能を制御し自らの生理活性を調節する。本研究では、plasminによる限定分解部位を新規に特定すると共に、plasmin抵抗性のドメインI、Vの組換えタンパク質を作製した。また、本タンパク質のPETによる血管新生部位への局在や生理機能を解析すると共に、アフィニティークラムとLC-MS/MSの組み合わせにより動脈硬化関連の酸化脂質を網羅的に解析できるメタボロミックス技術の構築を試みた。

研究成果の概要(英文)：B2-Glycoprotein I (B2GPI) is a multifunctional plasma protein consisting of five homologous domains that control thrombosis/hemostasis and angiogenesis. Its physiological activity and binding affinity to particular phospholipids, oxidized lipids and/or proteins are regulated by the enzymatic activity of plasmin. In the present study, we identified a novel cleavage site by plasmin and produced plasmin-resistant recombinant proteins of domain V and domain I. With these, we have confirmed their localization at angiogenic legions in mouse xenograft models via PET imaging, and their respective physiological functions in vitro and in vivo. In addition, a metabolomic-based approach involving the combination of B2GPI-affinity column and LC-MS/MS has also been constructed to comprehensively analyse oxidized lipids involved in the development of atherosclerotic diseases.

研究分野：病態検査学

キーワード：動脈硬化 Beta2-glycoprotein I 血栓・止血 血管新生 抗リン脂質抗体症候群 メタボロミックス
リポミクス LC-MS/MS

1. 研究開始当初の背景

抗リン脂質抗体症候群は、自己抗体による易血栓性が基本病態である。我々は、当該疾患の病因抗体がβ2-グリコプロテイン1(β2GPI)に対するものであることを発見し、β2GPIの構造と機能、および、抗β2GPI抗体による病態発現の機序を明らかにし、動脈硬化による閉塞性血管病変におけるβ2GPIを中心としてダイナミズムを確立した。β2GPIは、ドメインV(DV)を介し、活性化血小板の細胞膜外層に出現するホスファチジルセリンに結合し血液凝固を阻害する。過凝固に追隨して産生されるplasminにより限定分解を受けnicked β2GPIとなり脂質結合能を消失する。一方、このnicked β2GPIは、plasminogenに結合し線溶系を阻害し、また、nicked β2GPは、plasminogenの自己分解物(angiotatin, AG4.5)に結合しAG4.5活性を阻害する。β2GPIは、200 μg/mlという高濃度で血中を循環する。90%が不活型の環状構造(Circular closed form)で存在するが、活性化血小板に結合することで開環し(Open form)、血液凝固線溶血管新生といった、一連の血管内生理機能を制御する。このような背景のもと、β2GPIに関わる標的医療研究とし、動脈硬化性疾患の体外診断薬、抗β2GPI抗体のヒトsingle chain Fv(scFv)を用いた粥状動脈硬化薬のPETイメージング法、PET核種(⁸⁹Zr)の製造・精製装置の開発、抗がん剤・血管内皮細胞増殖阻害剤内包免疫DDSキャリアによるTheranostics(診断と治療の一体化)、質量分析イメージングによる脂質プロファイルの構築などに関する基礎的検討を実施している。本研究では、β2GPIの機能を利用して、リピドーム解析法を確立する。我々が提唱する先端医療“Theranostics”は、動脈硬化による閉塞性血管疾患の早期診断と予防・治療を同時施行出来る標的技術である。リピドーム解析法を含むメタボノミクス研究戦略は、Theranosticsを実現するために不可欠なものである。

2. 研究の目的

動脈硬化による心筋梗塞や脳梗塞など重篤な循環器疾患(血管閉塞)が起こる機序のうち、酸化脂質蓄積不安定プラークの形成、異所性石灰化については抗体(抗酸化LDL/β2GPI複合体ヒトscFv)PETイメージング法による病巣の可視化が可能となった(Sasaki T, Matsuura E, et al. *Autoimmun Rev* 16:159-167, 2017)

本研究では、血管新生による炎症細胞の動員、プラークの破綻に伴う血液凝固亢進を可視化できるβ2GPI-PET/SPECTプローブと、線溶系および病的血管新生の各々が可視化できる*in vivo*イメージング(診断)システムを確立し、さらに、抗体アレイによる血液中リポタンパク質精製システムを開発するとともに、LC-MS/MS、MALDI-TOF-MS解析により、β2GPIがスカベンジ(捕捉)する酸化脂質のデータベースとそのプロファイルを構築し、リピド-

ム解析(メタボロミクス)技術基盤を構築する。今回、開発予定の分子イメージング診断とDDSによる標的治療の融合(次世代標的医療“Theranostics”)は、動脈硬化による閉塞性血管疾患の早期診断、予防・治療を目指す標的医療技術によるものである。この体系的な脂質メタボローム研究戦略は、動脈硬化性疾患の早期診断・予防(治療)に不可欠である。

3. 研究の方法

(1) β2GPI、そのドメイン単位の欠失タンパク質(DI、DVおよびDV変異体)、およびそれらのnicked formの作製と血管新生への影響

形質転換大腸菌(Rosetta-gami(DE3))でIPTGにより、β2GPIのドメイン単位の欠失タンパク質であるDIを大量に精製した。β2GPIのintact DVと3種類のplasmin耐性DV変異体を超音波処理で破砕し、遠心により得られた上清よりNi-NTA担体を用いてHis-Tag融合タンパク質を精製した。β2GPI(血漿由来)および各種DV変異体のplasmin処理による限定分解体(nicked form)を得た。

ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)培養系を用いてこれらタンパク質の細胞傷害性および増殖抑制性を評価すると共に、皮膚繊維芽細胞との共培養により形成される管腔形成への影響をImage J画像処理ソフトウェアにより解析した。

(2) β2GPIへのキレート剤修飾および放射能標識 β2GPI-DVのリン脂質結合部位へのN化学修飾を防ぐためにintact β2GPI(iβ2GPI)とDOPGミセルと反応させた(iβ2GPI(masked))(*この方法は以下に示す実験でも適宜使用)。

2-S-(4-isothiocyanatobenzyl)-1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid(NOTA)と1:80のモル比で反応の後、NOTA-DOPG-iβ2GPI中のDOPGをブタノールで抽出除去した。gentisic acid(5 mg/ml)を含む0.1 M PBS(pH5.5)中でNOTA-iβ2GPI 0.2 mg、NOTA-iβ2GPI(masked) 0.2 mg、NOTA-nβ2GPI 0.165 mgを⁶⁴Cu(239~269 MBq)と反応させ、Ultra 10K限外ろ過ユニットで精製した。TLCオートラジオグラフィーにより放射化学的純度を測定した。

(3) β2GPIのPETイメージングおよび体内分布 CFPAC-1移植2週間後のBALB/c nu/nuマウス(n=3)に⁶⁴Cu-NOTA-iβ2GPI(20 MBq/20 μg)、⁶⁴Cu-NOTA-iβ2GPI(masked)(26 MBq/20 μg)、⁶⁴Cu-NOTA-nβ2GPI(15 MBq/21 μg)を尾静脈投与し、0、24、48時間後にPET/CT撮像を行った。撮像終了後、解剖し各臓器における放射能分布を測定した。同様に、3種類のプローブをBALB/c nu/nuマウス(n=3)に投与し、24時間後に各臓器の放射能分布をγカウンターで測定した。体内への分布は、%投与量/組織重量として表記した(%ID/g)

(4) β 2GPI DI および DV の放射標識の検討

タンパク質の溶媒を限外濾過膜にて 0.1 M NaHCO₃ buffer pH 9.0 に置換し、DMSO に溶解した 10mM deferoxiamine(DFO)-NCS 溶液を各タンパク質溶液に物質質量に対し 3 当量を加え、37 °C、60 分間インキュベートした。DMSO の最終濃度は 2%以下になるように調整した。その後、ゲル濾過カラムにて未反応の DFO-NCS を取り除いた。各タンパク質への DFO 修飾の確認を、MALDI-TOF-MS で行った。サイクロトロンにより製造し、精製した [⁸⁹Zr]ZrCl₄ を 1 M oxalic acid 溶液にて回収し ⁸⁹Zr-oxalate 溶液を得た。⁸⁹Zr-oxalate 溶液 (60 μ l, 14~15 MBq) に対して半量の 2 M Na₂CO₃ を加えた。22 μ l の 0.5 M HEPES、63 μ l の 5 mg/ml gentisic acid in 0.9% NaCl を加え、凝集阻害の目的で、終濃度が 0.05%となるように 0.1% polysorbate 80 を添加した。DFO- β 2GPI DI および DV を加えた後、37 °C、30 min インキュベートした。ゲル濾過カラムにて精製し、目的の ⁸⁹Zr 標識体を得た。得られた ⁸⁹Zr 標識 β 2GPI-DI および DV の比放射能を測定し、⁸⁹Zr 標識体の一部を SDS-PAGE (非還元) で解析した。

(5) 担がんマウスにおける ⁸⁹Zr-DI および DV の分布試験 ⁸⁹Zr-DI および DV、3MBq を担がんマウス (N=3) の静脈内へ投与し、投与後 3 時間後、24 時間後に小動物用 PET 装置にて撮像した。

(6) マイクロキャリアの β 2GPI およびドメイン結合およびアフィニティークラムによる酸化脂質の捕捉と LC-MS/MS 解析の検討

β 2GPI が捕捉する病態生理学的な酸化脂質群の LC/MS/MS によるプロファイルを作成するためのモデル実験として、各種脂質で構成されるミセル・リポソーム (PBS) を β 2GPI (あるいは β 2GPI-DV) 結合 Sepharose 4B カラムおよび HPLC により単離し、MS/MS による定性・定量を行った。 β 2GPI アフィニティークラムは PBS で平衡化し、各種脂質 vesicle を結合させた後、0.1 M glycine-HCl buffer (pH2,7) により溶出し、クロロホルム/メタノール系の溶媒で脂質抽出した。遠心分離後、有機相を分離し、繰り返し抽出を行い、エバポレーターにより低下下で真空乾燥させた。最終的にメタノール:イソプロパノール (5:2) で 0.2 mg/ml になるように調製し、LC-MS/MS にて解析した。酢酸アンモニウム (10 mM) とギ酸 (0.1 v/v) により溶出した。例えば、DPOC および Cardiolipin は MS/MS における MRM スキャンモード (DPOC: 808.65 \rightarrow 147.00 m/z, CE:-35V; Cardiolipin: 1449.10 \rightarrow 1449.10 m/z, CE:15V) で検出された。

4. 研究成果

(1) β 2GPI、DI、DV および 3 種類の DV 変異体と plasmin 処理による nicked form の血管新生への作用

本研究の開始後間もなく、plasmin により切断される DV での新たな開裂部位 ($K^{287}-C^{288}$) を MS 解析により発見した。 β 2GPI-DV は、各種セリンプロテアーゼに対し極めて高感受性で、容易に分解するこ

とが分かったため、そもそもの生理機能を有する安定型 DV を大量に精製するために、2つのリジン残基 Lys²⁸⁷/Lys³¹⁷ をそれぞれ P²⁸⁷/P³¹⁷ (DV(PP))、P²⁸⁷/E³¹⁷ (DV(PE))、A²⁸⁷/A³¹⁷ (DV(AA)) に置換した DV の 3 種類の DV 変異体を急遽作製した。大量発現・精製を行った DI、DV、および 3 種類の DV 変異体について、競合 ELISA、10~20% SDS-PAGE トリシングル、および、MALDI-TOF-MS により確認したところ、DV の変異体は未変異 DV に比べて、高安定性を示し、自己消化に対して抵抗性を有するとともに、十分な生理活性 (脂質結合活性) を有することが判明した。その中でも、DV (PE) が最も安定 (plasmin 耐性) であることが判明した。

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) 培養系により、これら β 2GPI タンパク質の細胞毒性および細胞増殖抑制試験を行ったところ、VEGF 依存的な HUVEC 増殖実験において、DI、DV および 3 種類の DV 変異体の添加により対照群と比べて 18~30% の細胞増殖抑制があることが認められた。一方、興味深いことに、繊維芽細胞と HUVEC の共培養により形成される管腔の総距離への影響を ImageJ 画像処理ソフトウェアにより解析した。

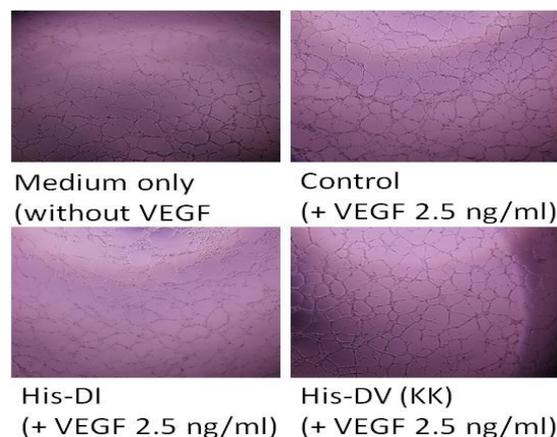


図 1. DI、DV の血管新生への作用

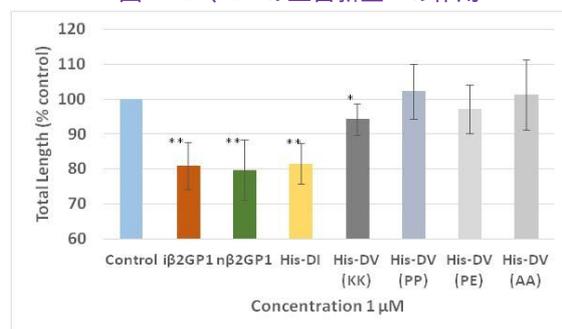


図 2. 管腔形成における総距離の比較

全長の i β 2GPI および nicked β 2GPI およびの結果は 2009 年に報告した我々 (Nakagawa ら) の結果 (Blood, 2009, 114: 2553-2559) を支持するものと判断した。

* : <0.05, ** : <0.01

この様に、図 1 では、DI を添加した場合のみ全長と同様の強い管腔形成抑制効果が見られ、また、DV でもごく弱い抑制効果が見られたが、

(6)マイクロキャリア(リポソーム)へのβ2GPI結合法およびβ2GPIアフィニティークラムによる酸化脂質の補足への検討 各種脂質含有 vesicle をβ2GPI 結合 Sepharose 4B カラムおよび HPLC により分離し、LC-MS/MS により酸化脂質の定性・定量が可能となった(図6)。

Oxidized Lipid Biomarkers	
5-Hydroxyeicosatetraenoic acid (5-HETE)	
8-Hydroxyeicosatetraenoic acid (8-HETE)	
11-Hydroxyeicosatetraenoic acid (11-HETE)	
12-Hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE)	
15-Hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE)	
9-oxo-octadecadienoic acid (9-OxoODE)	
13-oxo-octadecadienoic acid (13-OxoODE)	
9-Hydroperoxyoctadecadienoic acid (9-HpODE)	
13-Hydroperoxyoctadecadienoic acid (13-HpODE)	
13-Hydroxyoctadecadienoic acid (13-HODE)	
5-Hydroperoxyeicosatetraenoic acid (5-HpETE)	
12-Hydroperoxyeicosatetraenoic acid (12-HpETE)	
15-Hydroperoxyeicosatetraenoic acid (15-HpETE)	
7-Ketocholesterol	
9/13-Hydroperoxyoctadecadienoic acid cholesteryl esters (9/13-HpODE CE)	
9/13-Hydroxyoctadecadienoic acid cholesteryl esters (9/13-HODE CE)	
7-Ketocholesteryl-9-carboxynonanoate (oxIig-1)	

Additional Lipid Moieties (To be Analysed)	
Phosphocholine, 1-Palmitoyl-2-(5-Oxo-Valeroyl)-sn-Glycero-3- (POVPC)	
12:0-13:0 PC (1-Dodecanoyl-2-Tridecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine)	
12:0-13:0 PE (1-Dodecanoyl-2-Tridecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine)	
12:0-13:0 PI (1-Dodecanoyl-2-Tridecanoyl-sn-Glycero-3-Phospho-(1'-myo-Inositol))	
12:0-13:0 PG (1-Dodecanoyl-2-Tridecanoyl-sn-Glycero-3-Phospho-(1'-rac-Glycerol))	
12:0-13:0 PS (1-Dodecanoyl-2-Tridecanoyl-sn-Glycero-3-Phospho-L-Serine)	
12:0-13:0 PA (1-Dodecanoyl-2-Tridecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphate)	
Cardiolipin (CA) Mixtures (containing 14:1(3)-15:1 CA, 15:0(3)-16:1 CA, 22:1(3)-14:1 CA, & 24:1(3)-14:1 CA)	
Ceramide/Sphingoid Lipid Mixture (containing: Sphingosine (C17 base), Sphinganine (C17 base), Sphingosine-1-P (C17 base), Sphinganine-1-P (C17 base), Lactosyl(β) C12 Ceramide, 12:0 Sphingomyelin, Glucosyl(β) C12 Ceramide, 12:0 Ceramide, 12:0 Ceramide-1-P, 25:0 Ceramide)	

Additional Lipid Moieties (To be Analysed)	
24-hydroxycholesterol	
25-hydroxycholesterol	
27-hydroxycholesterol	
7α-hydroxycholesterol	
7β-hydroxycholesterol	

表1. LC-MS/MS データベースの構築に用いた酸化脂質類

本研究で、β2GPI の補足する病態生理学的な酸化脂質のプロファイル・リポドーム解析の技術基盤を確立し(表1)、Cu²⁺-oxLDL に含まれる脂質の病理組織における分布をイメージング質量顕微鏡により解析した。

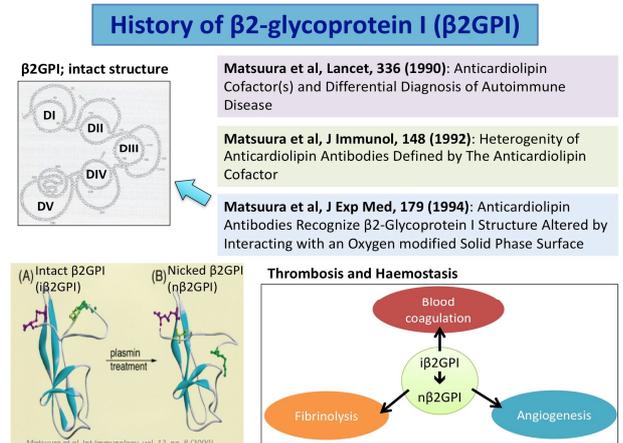
5. まとめ

動脈硬化性疾患は、脂質代謝異常であると共に慢性の炎症反応(免疫反応)とそれに伴うことは周知の事実である。生体内では、これら現象に伴い現れる局所あるいは全身性の酸化反応による代謝物(酸化脂質を中心とする二次代謝物)をより体系的に解析できることで、動脈硬化性の疾患の病態とその重傷度を把握することが出来る。しかしながら、臨床現場では、HDL コレステロール、LDL コレステロール、

中性脂肪ほか、限られた脂質マーカが測定できるに過ぎない。

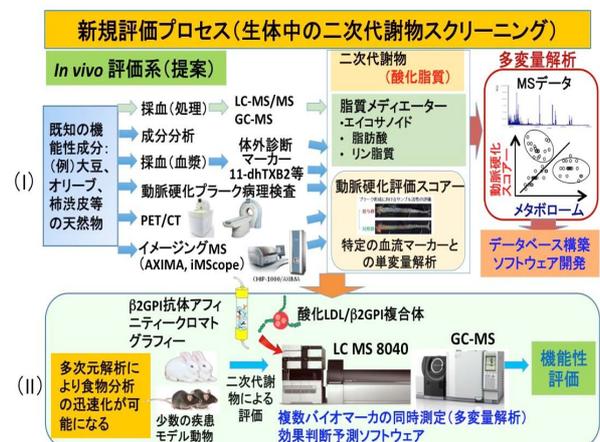
前述の通り血漿タンパク質(β2GPI)は、前述の通り、「抗リン脂質抗体症候群」と呼ばれる自己免疫病における自己抗体の病院抗原として発見され、極めてユニークな構造と複数機能を有し手いる。当該タンパク質全長、plasmin 分解物、ドメインIあるいはVの安定化変異体を用いることで、血液凝固・線溶あるいは血管新生を in vivo イメージングすることが出来るほか、リポドーム解析を加速する。国民の死因の上位を占める脂質代謝異常に立ち向かう「メタボロミクス」=「動脈硬化の標的医療戦略」を構築するにあたり、極めて独創性に富む重要なアプローチである。

(以下の2つの概念図を参照)



研究期間や、研究費規模を勘案して、当該基盤研究(A)では、分子イメージング技術とリポドーム解析を中心に動脈硬化性疾患の早期診断法の確立に向けた脂質メタボローム研究を中心に行った。

今後、本研究によって得られた知見と基盤技術により、VEGF 受容体に対する指向性β2GPIを担持する siRNA 保持 DOS キャリアをモデル動物に静脈投与し、治療法を探る新規事業を計画する。我々の開発する分子イメージング診断と DDS による標的治療の融合(次世代標的医療“Thera-Diagnostics(TD)”)が近い将来、医療の中核をなしていくものと期待している。



【参考文献】

1. Sasaki T, Kobayashi K, Kit S, Kojima K, Hirano H, Shen L, Takenaka F, Kumon H, Matsuura E. In vivo distribution of single chain variable fragment (scFv) against atherothrombotic oxidized LDL/ β 2-glycoprotein I complexes into atherosclerotic plaques of WHHL rabbits: Implication for clinical PET imaging. (Original) *Autoimmun Rev* 16:159-167, 2017. (査読あり)

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)

1. Arum Tri Wahyuningsih, Shen L, Kobayashi K, Sasaki T, Takenaka F, Hanada T, Akehi M, Akahoshi A, Ozeki E, Ando E, Matsuura E. The function of β 2-glycoprotein I in angiogenesis and its in vivo distribution in tumor xenografts. *Acta Med Okayama* 70:13-24, 2016. (査読あり)

〔学会発表〕(計4件)

1. Matsuura E. Harnessing autoimmunity (disease-specific autoantibodies and its variant) in theranostics of disease. Joint meeting of Lupus and Asian Congress on Autoimmunity, Melbourne, Australia, March 26-29, 2017. (招聘講演)
2. Matsuura E. Okayama Medical Innovation Center (OMIC) and molecular imaging. The 1st Asian Researcher Symposium 2016. Depok, Indonesia. April 24-28, 2016. (招聘講演)
3. Matsuura E. Immuno-thera-diagnostics (theranostics) in autoimmunity and oncology. International Congress on Autoimmunity, Leipzig, Germany, April 6-10, 2016. (招聘講演)
4. Matsuura E. The role of lipoprotein oxidative inflammation and β 2-glycoprotein I in innate immunity of early atherosclerosis. International Congress on Autoimmunity, Leipzig, Germany, April 6-10, 2016. (招聘講演)

〔図書〕(計1件)

1. Matsuura E, Tan XW, Shen LH, Nuriza UA, Lopez LR. Inflammasomes and inflammatory cytokines in early atherosclerosis. *The Heart in Systemic Autoimmune Diseases (Second edition)*, Eds, Atzeni F, Doria A, Nurmohamed M, Pauletto P, Elsevier, Amsterdam, Netherlands. pp155-167, 2017.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松浦 栄次 (MATSUURA, Eiji)
岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授
研究者番号:20181688

(2)研究分担者

保田 晋助 (YASUDA, Shinsuke)
北海道大学・医学(系)研究科(研究院)
・准教授
研究者番号:00374231

(3)連携研究者

佐々木 崇了 (SASAKI, Takanori)
岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教
研究者番号:10461253

小林 和子 (KOBAYASHI, Kazuko)
岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教
研究者番号:20304298

竹中 文章 (TAKENAKA, Fumiaki)
岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教
研究者番号:10642522

小関 英一 (OZEKI, Eiichi)
(株)島津製作・基盤技術研究所・研究員
研究者番号:30192529

藤分 秀司 (FUJIWAKE, Hideshi)
(株)島津製作所・分析計測事業部・研究者
研究者番号:50395696

小淵浩嗣 (KOBUCHI, Hirotsumu)
岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・講師
研究者番号:10304297