

財団法人日中医学協会
2007年度共同研究等助成金—調査・共同研究—報告書

2008年 3月 14日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 加藤智啓 

所属機関名： 聖マリアンナ医科大学

所属部署： 大学院 医学研究科 疾患プロテオーム・分子病治療学 職名： 教授

所在地： 〒216-8511 神奈川県川崎市宮前区菅生2-16-1

電話： 044-977-8111 内線： 3522

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

ペプチドミクスを用いた膠原病病態関連ペプチドの日中患者間相違性の解析

3. 成果の概要 (100字程度)

本研究では、強皮症など自己免疫疾患において、質量分析等の新技術を使って血清中の小ペプチドを対象に疾患関連分子の探索を試み確立した。強皮症特異的ペプチドの検出解析を行い、またペプチドプロファイルが日中で一部異なる可能性を示した。現在検出ペプチドの同定を行っている。

※発表論文等

未 (追加実験後半年後を目途に投稿予定)。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 加藤 智啓 職名： 教授

所属機関： 聖マリアンナ医科大学 部署： 大学院 医学研究科 疾患プロテオーム・分子病治療学

中国側研究者氏名： 向 陽 職名： 教授

所属機関： 湖北民族学院医学院附属医院 部署： リウマチ科

ペプチドミクスを用いた膠原病病態関連 ペプチドの日中患者間相違性の解析

研究者氏名 加藤 智啓
日本研究機関 聖マリアンナ医科大学 教授
共同研究者氏名 向 陽
中国研究機関 湖北民族学院医学院附属医院
教授/副院長/風湿病研究所主任

要 旨

強皮症、全身性エリテマトーデスなどいわゆる膠原病すなわち全身性自己免疫疾患の多くは、厚生労働省の特定疾患にも指定されているなどの難治性疾患である。原因不明で早期診断指標や根本的治療法は確立されていない。そのため、診断や治療の手がかりとなりえる小ペプチドの探索する手段を確立し、実際に応用することを試みた。具体的には、血清中に多数存在するアミノ酸残基数が数十以下のペプチドの中で特に分子量 5kD 程度以下のペプチドを対象として、疎水結合あるいはイオン結合などを利用し、血清中からペプチドを分離精製した。さらに質量分析によりイオン化したペプチドを質量と共に直接検出を行った。強皮症を中心に検出解析を行なった結果、強皮症特異的なペプチドの検出が可能であることが判明した。さらに、その一部はアミノ酸配列も同定可能であった。さらに中国における強皮症患者血清を検討したところ、ペプチドプロファイルに若干の違いが認められた。現在、そのペプチド配列の同定を試みている。今後、症例数を増やしての検討と、その病態的意義の検討が必要である。技術的側面からみると、これまでは検出の困難さから血清小ペプチドは疾患関連疾患の探索となりうることはほとんどなく、その探索手法を格段に進ませることができたと言える。

Key Words ペプチドミクス、質量分析、膠原病、強皮症、ペプチド

緒 言：

強皮症、全身性エリテマトーデス、多発性筋炎あるいは関節リウマチといった全身性自己免疫疾患、いわゆる膠原病は原因不明の疾患である。多くは厚生労働省の特定疾患にも指定されているなど、一般に難治性かつ予後不良である。病因解明と治療法および早期診断法の確立が社会的要請である。このような背景は中国でも同様であり、我々はこれまで中国より多くの研究員を受け入れ、共同でこの課題に取り組んできた。膠原病は全身性自己免疫疾患であり、その特徴として自己成分に対する抗体である自己抗体の産生と自己反応性T細胞の存在を伴うことから、それらの検出と解析を中心に研究を行ってきた（参考文献 1-6, 7, 8, 15）。これら一連の成果は主に候補分子を設定しての研究〈候補分子アプローチ〉によるものである。

これに対して、近年、特定候補分子を設定せずに、疾患関連分子を網羅的に探索し、対象を絞っていく〈網羅的アプローチ〉が急速に進歩を遂げた。疾患感受性などを評価する遺伝子レベルの一塩基多型解析、疾患で発現されている mRNA を検出解析するいわゆる DNA アレイ、そして、疾患で増減あるいは修飾を受ける蛋白質を解析するプロテオミクスである。病因不詳の疾患の解明を目指した研究には、従来の候補分子的アプローチに加えて、特定の分子を設定しないで疾患関連分子を検索していく方法、すなわち仮説フリーの網羅的アプローチも必要かつ有効となる。そこで、我々は、これまで自己抗原など蛋白質を中心に研究を進めてきたことから、上記の全身性自己免疫疾患にこのプロテオミ

クスを応用することを計画した。そして、本研究の申請者/共同研究者を中心にこれを進め、関節リウマチと変形性関節症における自己抗原の探索や全身性血管炎、関節リウマチにおけるシトルリン化抗体の探索など多くの成果を挙げてきた（参考文献 7, 8, 11-14, 16）。

さらに最近になり、蛋白質が分解してできる小ペプチドを対象とした網羅的スクリーニング法が出現した。いわゆるペプチドミクスである。本研究において、申請者/共同研究者はこのペプチドミクスの手法確立を目指し、自己免疫疾患患者中の血清中のペプチドを検索同定する方法を開発した。そして、これにより、全身性自己免疫疾患の病態解明や早期診断に有用なペプチドを得ることを目的とし、さらには同一全身性自己免疫疾患における日中両国での相異性の有無を検討することを目的とした。具体的には、分子量 5kD 程度以下のペプチドは、アミノ酸残基数で 40 強までのペプチドに相当する。これらは、血清中の蛋白質において、アルブミンや免疫グロブリンなど主要な蛋白質を除いた残り 1% 程度のいわゆる deep proteome と呼ばれる部分のさらに一部であり、量的にも微量である。これまでの蛋白質解析手法では、分子量が小さすぎること、微量であることから、検索の対象にならなかった分子群である。我々は疎水性担体などを用いてそれらペプチドを濃縮精製、質量分析によるペプチドの直接的検出を行うことでこの難点を克服した。

対象と方法：

1) 血清ペプチドの分離精製

強皮症と含む自己免疫性疾患患者血清各約 5 μ l から、小ペプチドを直接的に疎水性結合、金属アフィニティー、あるいはイオン結合を利用して、担体付き磁気ビーズに吸着させた。これを洗浄後、結合した小ペプチドを、アセトニトリルを用いて抽出した。蛋白質同定用の分離としては約 150 μ l の血清から分子量別フィルターにより高分子を取り除いた後、前述と同様のペプチドの分離精製を行い同様の方法でペプチドを比較的大量に分離精製した。

2) ペプチドのイオン化と質量測定

上記精製ペプチドを、 α -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid などのマトリックスと混合し、マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型 (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization-Time of Flight、MALDI-TOF/TOF) 型質量分析器 (UltraFlex、Bruker社) を用いて、シングルMSモードで、その試料中に含まれる小ペプチドの検出と質量の測定を同時に行った。各試料中で検出されたイオン化ペプチドプロファイルは、ClinProt プログラムを用いたバイオインフォマティクスにより解析し、疾患に特異的なイオン化ペプチドピークを抽出した。

3) ペプチドのアミノ酸配列の同定と合成

これら検出した疾患特異的なペプチドのアミノ酸配列を同定するために、別途大量精製したペプチドを上記質量分析器の Collision-Induced Dissociation (CID) 機能を用いて de novo アミノ酸配列決定を行った。

4) その他

本研究計画は聖マリアンナ医科大学および湖北民族学院医学院附属医院の生命倫理委員会の承認を得ている。

結果：

検定した強皮症患者血清では 5 μ l の血清から MALDI-TOF 型質量分析により 100 個以上のイオン化ペプチドピークが検出された。また、全身性血管炎、全身性エリテマトーデスなど他の自己免疫疾患においても多くのイオン化ペプチドピークが出現しており、この方法によるペプチド分離精製が自己免疫疾患におけるペプチドの網羅的解析に有用であることが判明した。

さらに、強皮症に特異的と考えられるペプチドも検出され、疾患関連ペプチドの検索にも有用な

ことが判明した。

日中間の強皮症患者血清中のペプチドプロファイルの比較では、図1に日本人患者（J）と中国患者（C）との比較の例を示した。図1においては、主要ペプチドピークのうち、同色で示したペプチドピークは両国の患者で認められ、分子量が極めて近いことから同一のペプチドと推定された。他のペプチドピークは必ずしも一致しなかった。MALDI-TOF/TOF型質量分析器を用いたペプチド同定では、日本人患者で高頻度、高強度で認められたペプチドピークのひとつである質量1864のペプチドが補体第3成分のf断片であるペプチドからカルボキシル末端のアルギニン残基が離脱したペプチド（SSKITHRIHWESASLL）であることが判明した（図2）。また、さらにカルボキシル末端のアミノ酸残基が様々に欠如した派生ペプチド群が検出された、そのほか、補体第4成分の断片でかつメチル化されたペプチドなどが含まれていた。興味深いことには、メチル化されていない同配列の補体第4成分の断片には強皮症特異性はなく、側鎖修飾の違いが疾患特異性に貢献していることが判明した。日本人患者と中国人患者で共通に認められるペプチドピーク（図中矢印）のペプチド配列の決定を現在試みているが、いまだ同定に至っていない。そのペプチドのアミノ酸残基配列の同定を行っている。

図1 日中強皮症患者血清中ペプチド検出と比較

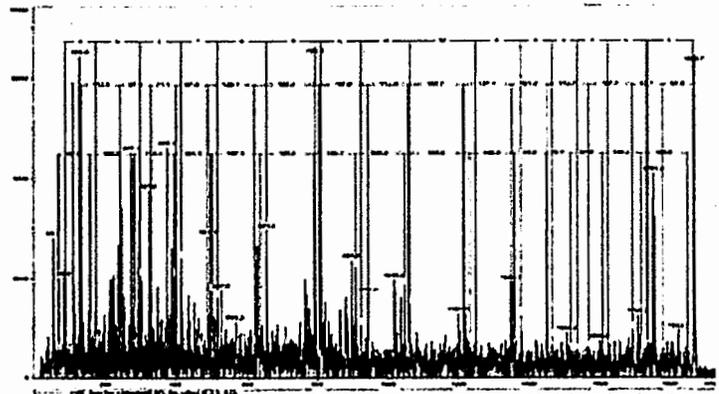
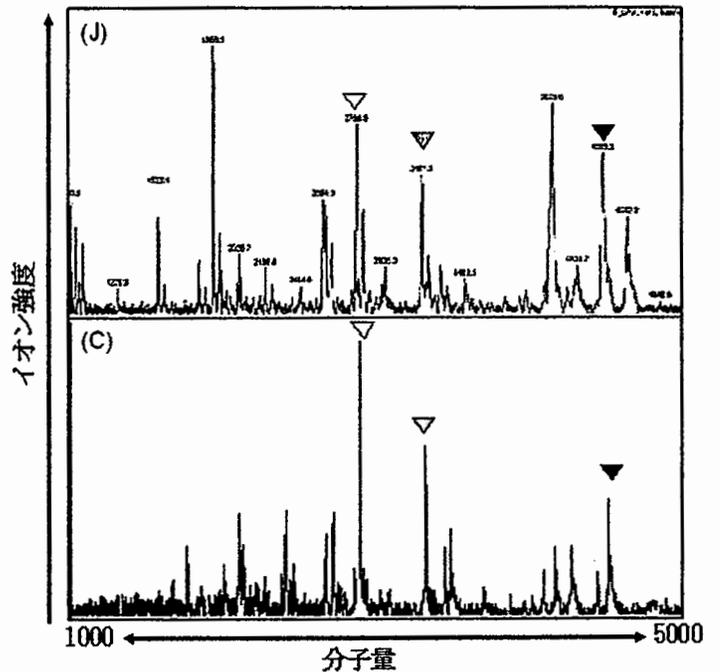


図2 質量1864ペプチドのアミノ酸配列同定

考察：

本研究は、申請者と共同研究者とで連続と続けてきた疾患プロテオミクス・ペプチドミクス研究のひとつである。近年、血清中のペプチドは、例えば脳性ナトリウム利尿ペプチド (brain natriuretic peptide, BNP) などのように病態マーカーとして優れているものが臨床でも使用されるようになり、脚光を浴びている。しかしながら、蛋白質が分解してできるペプチドがどの程度疾患特異性があり、また病態に関与しているかなど、ほとんどわかっていなかった。今回の検索で、少なくとも強皮症を中心とする自己免疫疾患では、疾患に特異性の高いペプチドが検出されることが判明した。すなわち疾患関連ペプチドを検索することは、全身性自己免疫疾患の病因解明による新規治療法の開発と、診断あるいは治療モニタリングなど臨床経過把握に役立つ可能性が大きいと言える。さらに日中間では同じ強皮症患者でも血清ペプチドプロファイルに違いがある可能性が示された。両方で検出されるペプチドは強皮症の共通病態経路によるものと考えられ、一方、日中患者の一方のみで認められるペプチドピークもあり、環境因子

遺伝的素因の違いを反映している可能性も考えられる。今後、そうしたペプチド配列の同定をいっそう進め、合成ペプチドの使用などにより、その病態的意義を探っていく必要がある。

参考文献：

1. Tong JK, Masuko-Hongo K, Nishioka K, Kato T, Sugata F, Akaogi J, Iino S. *J. Clin. Microbiol. (lett)* 1998;36:2797-9
2. Wang M, Keino H, Matsumoto I, Kurokawa M, Kato T, Nishioka K, Sumida T. *J Rheumatol.* 2000;27:311-8.
3. Yu X, Matsui T, Otsuka M, Sekine T, Yamamoto K, Nishioka K, Kato T. *J. Immunol.* 2001;166:1360-1369
4. Yuan G-H, Masuko-Hongo K, Sakata M, Tsuruha J, Onuma H, Nakamura H, Aoki H, Kato T, Nishioka K. *Arthritis Rheum.* 2001;44:1056-70.
5. Yuan GH, Masuko-Hongo, Kato T, Nishioka K. *Arthritis Rheum.* 2003; 48: 602-11.
6. Yao Z, Kurokawa MS, Masuko-hongo K, Tsuruha J, Sakata M, Nakamura H, Nishioka K, Kato T. *Ann Rheum Dis.* 2004 Mar;63(3):252-8.
7. Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Ohmi S, Fukuda H, Nishioka K, and Kato T. *Arthritis & Rheum* 2004; 50 1511-1521.
8. Kato T, Xiang Y, Nakamura H, Nishioka K. *Curr Opinion Rheumatol* 2004;16:604-608
9. Shan ZZ, Masuko-Hongo K, Dai SM, Nakamura H, Kato T, Noshioka K. *J Bio Chem* 2004; 279: 37939-37950.
10. Du H, Masuko-Hongo K, Xiang Y, Boa CD, Wang XD, Chen SL, Kato T, Nishioka K. *Rheumatol Int.* 2005 26(1):35-41.
11. Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Ohmi S, Fukuda H, Nishioka K, and Kato T. *J Immunol* 2006 :176: 3196-3204
12. Xiang Y, Kato T. *Lupus* 2006;7:431-435
13. Xiang Y, Kato T. *Curr. Opn. Orthopaedics* (in press)
14. Xiang Y, Masuko K, Sekine T, Nakamura H, Yudoh K, Nishioka K, Kato T. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;11:1163-1173
15. Dai SM, Shan ZZ, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K, Yudoh K. *Arthritis Rheum* 2006;54:818-831
16. Matsuo K, Xiang Y, Nakamura H, Masuko K, Yudoh K, Noyori K, Nishioka K, Saito T, Kato T. *Arthritis Res* 2006;27(8):R175
17. Xiang Y, Matsui T, Matsuo K, Shimada K, Tbhma S, Nakamura H, Masuko K, Yudoh K, Nishioka K, Kato T. *Arthritis Rheum* 2007;6:2018-2030

作成日：2008年 3月 14日