

## クロマトグラフィー分離を基盤とした新しいプロテオーム解析による臨床薬学研究

大山 要

**Clinical Pharmaceutical Research Based on New Proteome Analysis Based on Chromatographic Separation**

Kaname Ohyama

*Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University; 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki 852-8588, Japan.*

(Received July 31, 2018)

Comprehensive identification of antigens in immune complexes (IC-antigens) is beneficial to provide insights into pathophysiology and could form the basis for novel diagnostic and treatment strategies for many immune-related diseases. Immune complexome analysis is a method for comprehensively identifying and profiling IC-antigens in biological fluids (such as serum and cerebrospinal fluid). We applied this strategy to the analysis of circulating ICs in autoimmune diseases (rheumatoid arthritis, Sjögren's syndrome, systemic scleroderma, and systemic lupus erythematosus), infectious diseases, and cancers. Fluorogenic derivatization-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (FD-LC-MS/MS) consists of fluorogenic derivatization of proteins, followed by HPLC of the derivatized proteins, isolation of the proteins differentially expressed in a certain group, enzymatic digestion of the isolated proteins followed by LC-tandem MS using a database-searching algorithm for protein identification. We have applied this method to understand the cardioprotective effect of pre-administration of docetaxel in adriamycin/docetaxel combination anti-cancer therapy, and the cellular processes that are affected by non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in mouse stomach tissue during ulcer formation.

**Key words**—immune complexome analysis; immune complex; toxicoproteomics; autoimmune disease; cancer; fluorogenic derivatization-liquid chromatography-tandem mass spectrometry

**1. 生体内特異的認識機構を利用する生体情報解析法の開発 (抗原-抗体複合体を中心に)**

免疫系は異物を“自己”と区別して認識・除去し、外敵から生体を守る生体防御機構である。しかし、この免疫系の破綻は重大な疾患を招く。例えば、自己免疫疾患では免疫系がなんらかの理由で“自己”に対しても反応し局所や全身性の炎症を引き起こす。また、がん細胞は異物として認識されるはずであるが、免疫系による除去が不十分なため体内で増殖することができると考えられている。よって、自己免疫疾患やがんの形成過程で免疫系が何を抗原として認識しているのか、という点が疾患毎にわかれば、この抗原に基づく研究は診断や病態解明に留まらず新しい治療法の開発へと一気に展開できる。一

方、自己免疫疾患ではサイトカインを標的とした分子標的治療、がんでは免疫チェックポイント阻害薬が目覚ましい治療成果をあげている。しかし、いずれの治療も全身の免疫を調節するため、免疫抑制 (感染症の再燃) 又は免疫賦活 (重症筋無力症や1型糖尿病) による副作用が懸念されている。そのため、疾患特異的な抗原を見つけられれば、免疫調節を“全体”から“点”へと移行させることが可能になるかもしれない。

生体内の免疫反応点、すなわち抗原の同定は、T細胞又はB細胞が産生する抗体が認識する抗原群から探索するというもので、そのほとんどがT細胞側からのアプローチである。<sup>1-3)</sup> 筆者は、抗体と抗原の結合親和性がT細胞受容体の1000倍以上である、末梢血中にも豊富に存在する、*in vivo*での抗原認識がそのまま反映される、という観点からB細胞側、特に免疫複合体の直接解析が有効だと考えた。そこで筆者は、生体内で安定的に存在し抗原認識そのものと言える免疫複合体を生体内から回収し

長崎大学生命医科学域 (薬学系) (〒852-8588 長崎市坂本 1-7-1)

e-mail: k-ohyama@nagasaki-u.ac.jp

本総説は、平成29年度日本薬学会九州支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

### Immune complexome analysis

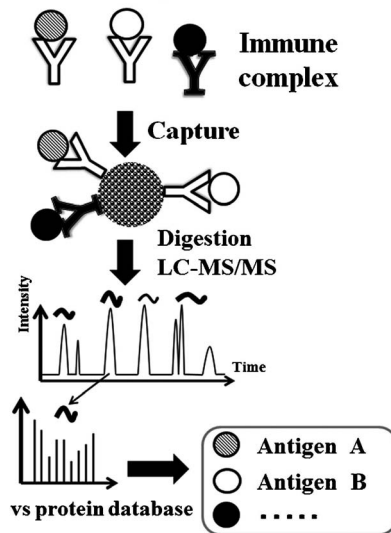


Fig. 1. Immune Complexome Analysis to Profile Antigens Included in Circulating Immune Complexes

て、そこに含まれる抗原タンパク質をナノ高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法 (nano-LC-MS/MS) で一斉に同定する「イムノコンプレキソーム解析法」(Fig. 1)を開発し、臨床検体の解析に応用してきた。<sup>4,5)</sup>

筆者はまずこの解析法で関節リウマチ患者 60 名と変形性関節症や他の自己免疫疾患患者の血清を解析して、関節リウマチ患者のみで特異的自己抗原 (Thrombospondin-1) が高頻度 (80%以上) に検出されること、<sup>4)</sup>そしてこの Thrombospondin-1 が血液検査陰性の早期関節リウマチ患者の半分以上で検出されることを発見した。<sup>6)</sup> Thrombospondin-1 の遺伝子導入で関節病変が改善すること、<sup>7)</sup>また Thrombospondin-1 が免疫複合体を形成したことでその機能が低下し血管新生が促進されること、を考慮すると発症との関連性が十分に考えられる。そして、筆者は患者の滑膜組織で Thrombospondin-1 が強発現し、Thrombospondin-1 が滑膜線維芽細胞で血管内皮細胞増殖因子や interleukin-6 の産生を誘導することを見い出している。<sup>8)</sup> さらに筆者は、関節リウマチ以外の 8 種類の自己免疫疾患 (全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、皮膚筋炎、強皮症など) の解析を行った。<sup>9,10)</sup> この解析では、シェーグレン症候群で Spectrin が検出され、既報と一致する結果が得られた。<sup>11)</sup> また、血清以外の試料の解析にも取り組んでおり、脳脊髄液を用いた中

枢神経ループス、多発性硬化症、視神経脊髄炎などの中枢神経性自己免疫疾患のイムノコンプレキソーム解析で特異的な抗原タンパク質を発見している。<sup>12,13)</sup>

一方、がん細胞を標的とした免疫賦活化での治療研究で、<sup>14,15)</sup> 腫瘍反応性の CD8 陽性又は CD4 陽性 T 細胞を特定する方法が複数報告されている。<sup>16,17)</sup> しかし、これらの多くは患者腫瘍組織の遺伝子解析であり、遺伝子変異数が多いメラノーマでは有効だが、遺伝子変異以外の抗原部位を特定できない。一方、イムノコンプレキソーム解析法では、様々な要因で変異したタンパク質ががん細胞破壊後に漏出し、これを認識し形成された免疫複合体から抗原として検出される。よって、イムノコンプレキソーム解析法で検出された変異タンパク質の細胞表面での局在が確認できれば、がん免疫療法での標的となり得る。そこで筆者は、肺がん患者 28 名、大腸がん患者 20 名、悪性リンパ腫患者 9 名及び健常人 11 名を解析し、その結果を自己免疫疾患患者とも比較した結果、肺がんでは 10 個、大腸がんでは 2 個の特異的自己抗原が見つかった。大腸がん検出された 2 個の抗原の検出頻度はいずれも 18% だったのに対し、肺がん検出された 10 個の抗原のうち 3 個が患者の 60% 以上で検出された。肺がん検出頻度 (80%) を示した Gelsolin は、追加解析した、腎がん・尿路がん・乳がんや間質性肺炎などの肺良性疾患でも検出されず、肺がんへの高い特異性が示された。<sup>18)</sup>

筆者の一連の成果を受け、免疫複合体の抗原側を固定化抗体でとらえる免疫複合体マイクロレイや免疫複合体の選択的な捕集法が報告されるなど、免疫複合体解析によるバイオマーカー探索が活発に研究され始めている。<sup>19-22)</sup> これに対し筆者は、免疫複合体中の抗原タンパク質を診断用としてだけでなく、“病原”としてとらえ、関節リウマチや中枢神経ループスで特定した特異的免疫複合体が病態形成の端緒となる可能性があることまで調べており、他グループに先駆けて創薬研究への応用も進めている。具体的には、抗原性の根幹であるエピトープを特定し、それを標的に免疫複合体の形成を阻害する薬物の作製を目指す研究を展開している。また、循環血中の免疫複合体解析よりも、実際の病変部位をそのまま解析した方が直接的な病態解明につながる

と考え、組織に沈着している免疫複合体を回収し、その抗原を特定する“組織沈着した免疫複合体のイムノコンプレキソーム解析法”の確立にも取り組んでいる。

一方、イムノコンプレキソーム解析法は免疫が関連するあらゆる疾患の解析に応用できる。よって、筆者は感染症、肝臓移植、不妊症カップルの解析も進めている。特に感染症では、デング出血熱や重篤な心肥大と巨大結腸症を起こすシャーガス病に注目し解析を行っている。患者体内の免疫複合体に含まれるウイルスあるいは原虫由来の抗原タンパク質を一斉に同定し、感染抵抗者と重症感染者を差異解析することで、感染抵抗者のみあるいは感染抵抗者で多量に認められる抗原タンパク質の有無を調べている。既にシャーガス病では、原虫の細胞表面に存在するプロテアーゼが感染抵抗者で高頻度に検出される抗原として見つかり、<sup>23)</sup> そのエピトープ解析やエピトープを標的とするワクチン開発に向けた共同研究を計画している。

以上のように、イムノコンプレキソーム解析法が、病態解析における更なる応用だけでなく、解析で見つかった特異的抗原は治療研究の標的にもなる可能性があり、発展性と将来性に富んだ研究であると考えている。

## 2. タンパク質の精密クロマトグラフィー分離による薬物毒性機序の研究

Fluorogenic derivatization-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (FD-LC-MS/MS)法は、タンパク質の発蛍光誘導体化と長時間の精密なクロマトグラフィー分離による差異解析を行うため、タンパク質変動を超高感度 (femto モルレベル) かつ網羅的に捉えることができる。<sup>24,25)</sup> 筆者はこの FD-LC-MS/MS 法で薬物毒性の機序をトキシコプロテオミクスの観点から考える研究に取り組んできた。筆者はまず、血液疾患や乳がんの治療に用いるアントラサイクリン系抗がん剤アドリアマイシンが、その繰り返し投与で心毒性を生じる機序を FD-LC-MS/MS 法で調べた。具体的には、心毒性を誘発する抗がん剤 (アドリアマイシン) と別の抗がん剤 (ドセタキセル) を同時あるいは間欠投与した後のマウス心臓組織に発現する全タンパク質の差異解析を行った。その結果、両群間で解糖系や TCA 回路などのエネルギー産生系に関与する複数の酵素の発

現量に有意な変化が認められた。特に、解糖系酵素である GAPDH の変動は大きく、間欠投与群ではその発現量が7倍多く、心毒性が顕著に抑制されることが判明した。つまり、アドリアマイシンの投与で心臓での GAPDH 量が著しく減少し ATP 産生が抑制されることで心臓機能が弱まる可能性が示された。<sup>26)</sup>

アスピリンなどの非ステロイド性抗炎症薬 (non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs) は、安全性の高い薬剤として広く使用されているが、一方で NSAIDs 潰瘍による胃腸障害が臨床で大きな問題となっている。NSAIDs 潰瘍は、NSAIDs がシクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase; COX)-2 だけでなく、胃粘膜保護に係わる COX-1 も非選択的に抑制することが原因と考えられてきた。しかし、COX-2 選択的 NSAIDs でも依然 NSAIDs 潰瘍の発生が認められていることから、COX 経路以外の潰瘍発現メカニズムの存在が予想されている。そこで筆者は、FD-LC-MS/MS 法で NSAIDs (ジクロフェナク) 投与後に潰瘍形成が確認されたマウス胃組織のプロテオーム解析を行った。<sup>27)</sup> NSAIDs 投与群と対照群とした生食投与群との比較で統計的に有意な差がある 10 個のタンパク質が同定された。いずれのタンパク質も NSAIDs 投与群で発現が上昇しており、なかでも小胞体ストレス応答 (GRP78)、カスパーゼ (HSP27)、MAPK 経路 (gastrin) などアポトーシスに関連するタンパク質の変動が大きかった。胃粘膜表面のアポトーシス障害は胃潰瘍と密接に係わるとの報告があることから、解析結果は妥当なものと考えられる。GRP78 や HSP27 は anti-apoptosis であり、gastrin は pro-apoptosis であるため、それぞれの機能促進あるいは抑制による NSAIDs 潰瘍に対する予防効果の可能性が示唆された。<sup>27)</sup>

さらに最近では、脳マイクロダイアリシスにおけるサンプリングが脳に及ぼす組織障害を FD-LC-MS/MS で解析する研究に取り組んでいる。脳マイクロダイアリシス法は、脳に挿入した微小透析プローブを介し神経伝達物質や薬物が含まれる細胞外液や髄液を人工脊髄液を灌流することで連続的に回収する方法として汎用されているが、組織侵襲の大きいサンプリング法である。筆者はプローブ挿入後の灌流でどのようなダメージが発生するか調べ、そのダ

メージを最小限にすることが解析上重要と考えて、プローブ挿入後の灌流の有無でのラット脳組織のタンパク質がどのように変動するのかを網羅的に解析している。この解析結果は、これまで漠然と想像されていたマイクロダイアリシスによる組織侵襲をタンパク質の網羅的解析で明らかにした初めての研究になると期待している。

このように FD-LC-MS/MS 法は、薬物毒性機序に限らず、物理的侵襲を含め、あらゆる外部刺激に対する生体反応をタンパク質変動の観点から、高感度かつバイアスなしに調べられる、非常に有用なツールである。よって、今後も更なる応用研究を展開できると考えている。

**謝辞** 本研究を遂行するにあたり、ご助言を賜りました長崎大学生命医科学域（薬学系）黒田直敬教授、中嶋幹郎教授、岸川直哉准教授に謹んで感謝申し上げます。本研究は、塩川明菜さん、馬場雅子さん、吉見春香さん、相原希美さんの精力的な仕事の成果であります。深く感謝申し上げます。本研究に際し、有益なご協力を頂きました、武蔵野大学薬学研究所 今井一洋先生、一番ヶ瀬智子先生に深謝いたします。また本研究は、以下の共同研究者からの検体提供と解析結果へのご助言を得て遂行されました、深く感謝申し上げます。川上 純教授、玉井慎美准教授、中村英樹講師、一瀬邦弘講師、岩本直樹助教、鈴木貴久博士（以上、長崎大学病院リウマチ・膠原病内科）、中村洋一先生（栃木県立がんセンター）、江口 晋教授、日高匡章助教、藤田文彦先生（長崎大学病院第二外科）、宮田康好准教授（長崎大学病院泌尿器科）、今泉芳孝講師（長崎大学病院血液内科）、中嶋秀樹助教（長崎大学病院脳神経内科）、北島道夫准教授、村上直子先生（以上、長崎大学病院産婦人科）、平山謙二教授、Nguyen Tien Huy 准教授、水上周作助教（以上、長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学分野）、山本元久助教、高橋裕樹准教授（以上、札幌医科大学医学部消化器・免疫・リウマチ内科学講座）、伊藤公成教授、増山律子准教授（以上、長崎大学歯学部）、藤 秀人教授、友成真理博士（富山大学薬学部）。本研究は、科学研究費補助金（基盤研究 B、挑戦的萌芽研究、若手研究 B）、武田科学振興財団、東京生化学研究会、永尾武難病研究基金、加藤難病研究助成基

金、薬学研究奨励財団、島原科学振興会からの研究助成並びに、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科融合型研究推進事業、長崎大学高度化推進経費、長崎大学熱帯医学共同研究拠点一般共同研究、長崎大学重点研究課題の各事業からの研究助成を受けて遂行されました。ここに感謝申し上げます。

**利益相反** 開示すべき利益相反はない。

## REFERENCES

- 1) Ito Y., Hashimoto M., Hirota K., Ohkura N., Morikawa H., Nishikawa H., Tanaka A., Furu M., Ito H., Fujii T., Nomura T., Yamazaki S., Morita A., Vignali D. A. A., Kappler J. W., Matsuda S., Mimori T., Sakaguchi N., Sakaguchi S., *Science*, **346**, 363–368 (2014).
- 2) Robbins P. F., Lu Y. C., El-Gamil M., Li Y. F., Gross C., Gartner J., Lin J. C., Teer J. K., Cliften P., Tycksen E., Samuels Y., Rosenberg S. A., *Nat. Med.*, **19**, 747–752 (2013).
- 3) Linnemann C., van Buuren M. M., Bies L., Verdegaal E. M. E., Schotte R., Calis J. J. A., Behjati S., Velds A., Hilkmann H., Atmioui D., Visser M., Stratton M. R., Haanen J. B. A. G., Spits H., van der Burg S. H., Schumacher T. N. M., *Nat. Med.*, **21**, 81–85 (2015).
- 4) Ohyama K., Ueki U., Kawakami A., Kishikawa N., Tamai M., Osaki M., Kamihira S., Nakashima K., Kuroda N., *Clin. Chem.*, **57**, 905–909 (2011).
- 5) Baba M., Ohyama K., Kishikawa N., Kuroda N., *Anal. Biochem.*, **443**, 181–186 (2013).
- 6) Ohyama K., Kawakami A., Tamai M., Baba M., Kishikawa N., Kuroda N., *Ann. Rheum. Dis.*, **71**, 1916–1917 (2012).
- 7) Jou I. M., Shiau A. L., Chen S. Y., Wang C. R., Shieh D. B., Tsai C. S., Wu C. L., *Arthritis Rheum.*, **52**, 339–344 (2005).
- 8) Suzuki T., Iwamoto N., Yamasaki S., Nishino A., Nakashima Y., Horai Y., Kawashiri S., Ichinose K., Arima K., Tamai M., Nakamura H., Origuchi T., Miyamoto C., Osaki M., Ohyama K., Kuroda N., Kawakami A., *J. Rheumatol.*, **42**, 943–947 (2015).
- 9) Ohyama K., Baba M., Tamai M., Aibara N.,

- Ichinose K., Kishikawa N., Kawakami A., Kuroda N., *Clin. Biochem.*, **48**, 181–185 (2015).
- 10) Ohyama K., Baba M., Yamamoto M., Tamai M., Ichinose K., Kishikawa N., Takahashi H., Kawakami A., Kuroda N., *Mod. Rheumatol.*, **26**, 248–250 (2016).
- 11) Haneji N., Nakamura T., Takio K., Yanagi K., Higashiyama H., Saito I., Noji S., Sugino H., Hayashi Y., *Science*, **276**, 604–607 (1997).
- 12) Ichinose K., Ohyama K., Furukawa K., Higuchi O., Mukaino A., Satoh K., Nakane S., Shimizu T., Umeda M., Fukui S., Nishino A., Nakajima H., Koga T., Kawashiri S., Iwamoto N., Tamai M., Nakamura H., Origuchi T., Yoshida M., Kuroda N., Kawakami A., *Clin. Immunol.*, **193**, 123–130 (2018).
- 13) Aibara N., Ichinose K., Baba M., Nakajima H., Satoh K., Atarashi R., Kishikawa N., Nishida N., Kawakami A., Kuroda N., Ohyama K., *Clin. Chim. Acta*, **484**, 26–31 (2018).
- 14) Hodi F. S., O'Day S. J., McDermott D. F., Weber R. W., Sosman J. A., Haanen J. B., Gonzalez R., Robert C., Schadendorf D., Hassel J. C., Akerley W., van den Eertwegh A. J., Lutzky J., Lorigan P., Vaubel J. M., Linette G. P., Hogg D., Ottensmeier C. H., Lebbé C., Peschel C., Quirt I., Clark J. I., Wolchok J. D., Weber J. S., Tian J., Yellin M. J., Nichol G. M., Hoos A., Urban W. J., *N. Engl. J. Med.*, **363**, 711–723 (2010).
- 15) Hinrichs C. S., Rosenberg S. A., *Immunol. Rev.*, **257**, 56–71 (2014).
- 16) Schumacher T. N., Schreiber R. D., *Science*, **348**, 69–74 (2015).
- 17) Overwijk W. W., *Nat. Med.*, **21**, 12–14 (2015).
- 18) Ohyama K., Yoshimi H., Aibara N., Nakamura Y., Miyata Y., Sakai H., Fujita F., Imaizumi Y., Chauhan A. K., Kishikawa N., Kuroda N., *Int. J. Cancer*, **140**, 370–380 (2017).
- 19) Rho J. H., Lampe P. D., *J. Proteome Res.*, **12**, 2311–2320 (2013).
- 20) Bhat S., Mary S., Banarjee R., Giri A. P., Kulkarni M. J., *Proteomics Clin. Appl.*, **8**, 19–34 (2014).
- 21) Kamhieh-Milz J., Sterzer V., Celik H., Khorramshahi O., Fadl Hassan Moftah R., Salama A., *J. Proteomics*, **157**, 59–70 (2017).
- 22) Cheng Y., Zhao X., Chen Y., Li Y., Jia R., Xhu L., Huang C., Sun X., Deng H., Li Z., *PLoS ONE*, **13**, e0199047 (2018).
- 23) Ohyama K., Huy N. T., Yoshimi H., Kishikawa N., Nishizawa J. E., Iihoshi N., Roca Y., Avilas C., Gianellar A., Lora J., Velarde F. U. G., Kuroda N., Hirayama K., *Parasite Immunol.*, **38**, 609–617 (2016).
- 24) Masuda M., Toriumi C., Santa T., Imai K., *Anal. Chem.*, **76**, 728–735 (2004).
- 25) Ichibangase T., Moriya K., Koike K., Imai K., *J. Proteome Res.*, **6**, 2841–2849 (2007).
- 26) Ohyama K., Tomonari M., Ichibangase T., To H., Kishikawa N., Nakashima K., Imai K., Kuroda N., *Biochem. Pharmacol.*, **80**, 540–547 (2010).
- 27) Ohyama K., Shiokawa A., Ito K., Masuyama R., Ichibangase T., Kishikawa N., Imai K., Kuroda N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **420**, 210–215 (2012).