

プロテオミクス/ペプチドミクスによる 血管炎関連自己抗原とペプチドの検索

加藤 智啓

要 旨：全身性血管炎は一般に難治性かつ予後不良で、早期診断と根治的治療法開発が社会的要請である。近年、タンパク質やペプチドを対象とした網羅的手法が画期的な進歩を遂げており、血管炎の解析手段としても有効に働く可能性がある。ここでは、血管炎で高頻度に出現する抗内皮細胞抗体の対応抗原のプロテオミクスによる探索同定と、ペプチドミクスによる血管炎関連血中ペプチドの探索について自験例を含め紹介する。(J Jpn Coll Angiol, 2009, 49: 39-43)

Key words: proteomics, peptidomics, anti-endothelial cell antibody (AECA), peptide

はじめに

血管炎症を主体とする一群の疾患(いわゆる血管炎症候群)は、一般に難治性かつ予後不良であり、病態解明とそれに基づく治療法の開発さらに早期診断法の確立が必要である。そのために血管炎の病態解析はさまざまな方面から行われている。例えば、抗好中球細胞質抗体(anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody: ANCA)においては、proteinase 3 (PR3)-ANCAがWegener肉芽腫に関連し、myeloperoxidase (MPO)-ANCAが顕微鏡的多発性血管炎など数種の血管炎に関連することが判明し、ANCA関連血管炎という疾患概念が確立してきたことはよく知られるところである。しかしながら、ANCAの発見は必ずしも血管炎の解明を念頭になされたものではなく、発見されてしばらくしてから血管炎との関連が次第に明らかとなっていった経過がある。血管炎に対してANCAという特定の分子を対象に研究を進めていくような研究方法は候補分子アプローチといわれ、研究手法の主流でもある。一方、特定の分子を設定せずに与えられた疾患に関連する分子(あるいは遺伝子)を予断なく探索する方法<網羅的アプローチ>も可能である。従来、網羅的アプローチの探索力はそれほど大きいものでなかった

が、近年、技術の進歩により格段の有用性を示している。DNAにおいては疾患関連一塩基多型(single strand polymorphism: SNP)^{1,2)}と疾患との関連の探索や病巣での発現遺伝子を検出同定するDNAアレイ³⁾などがその代表である。網羅的手法は、まず核酸分野で大きく進歩したが、現在、それを追って、タンパク質を直接解析するプロテオミクスが進歩しつつある状況である。本稿ではこのプロテオミクスとそのペプチド特化部分であるペプチドミクスにより、血管炎の自己抗体と血清ペプチドを探索した結果について紹介する。

プロテオミクス

網羅的解析には、前述の如く、SNP解析などDNAレベルのもの、DNAアレイなど転写されたmRNAを検出するレベルのものがあるが、さらにmRNAから翻訳されて生成したタンパク質を探索するプロテオミクス、タンパク質の分解産物であるペプチドを扱うペプチドミクスがある。そのほかに低分子化合物を扱うメタボロミクスなどもある。近年、質量分析器の進歩とタンパクデータベースの充実化が、プロテオミクス・ペプチドミクスの有用性を格段に進歩させ、疾患解析への応用を進めやすい環境が整いつつある。mRNAからタンパク質が翻訳されるという点からは、プロテオミクスはmRNA発現解析と

聖マリアンナ医科大学大学院医学研究科疾患プロテオーム・分子病態治療学

2008年10月14日受理

表裏の関係にあるが、mRNA発現解析の代替法ではない。これはmRNA発現量と存在タンパク量が必ずしも比例関係にないこと、翻訳後修飾や機能、また抗原性などタンパク質としての特性から検出解析できることなどによる。また、タンパク質の分解産物は多数存在するにもかかわらずほとんど手のつけられていない分野でもある。一方、遺伝子発現解析に比べ労力がかかり、検索できる分子数が少ないことなどの克服すべき点もある。

プロテオミクスによるタンパク質の網羅的解析は大別して、等電点電気泳動および分子量によるSDS-PAGEを組み合わせた二次元電気泳動で検出し、質量分析器で同定する方法と直接的に質量分析法を使う方法がある。二次元電気泳動は近年高感度の蛍光標識試薬が開発され、網羅性は格段に進歩した⁴⁾(Fig. 1)。また、異なる波長の蛍光標識試薬での標識と同一ゲルでの展開により定量性も格段に増した。ゲル上のタンパク質の同定には質量分析データとタンパク質データベースとの照合が用いられる。質量分析は、2002年の田中耕一氏が同法に関してノーベル賞を受賞したことが記憶に新しいが、近年やはり検出の感度・精度共に格段の進歩を遂げた。タンパク質の酵素分解産物の質量リストをデータベースと照合するペプチド・マス・フィンガープリンティング法⁵⁾やさらなるペプチド断片の質量差からアミノ酸配列を予測する方法などがあり、アミノ酸配列の同定に関し、従前のエドマン法をはるかに上回る能力がある。これには近年のタンパク質データベースの充実化の貢献も大きい。

血管炎における抗内皮細胞抗体の対応抗原の探索

血管炎症候群で高頻度に検出される自己抗体には前述のANCAと抗内皮細胞抗体(anti-endothelial cell antibodies: AECA)がある⁶⁾。ANCAについては主要な対応抗原が同定され、現在その病因論的役割が研究されているのは上述の通りである。一方、抗内皮細胞抗体は血管内皮細胞に直接結合による障害を通して血管炎に関与する機序が考えられている。しかしながら、抗内皮細胞抗体の対応抗原が詳しく特定されてないために、抗内皮細胞抗体の血管内皮細胞への結合と障害機序を分子レベルで解析できないのが現状である。また、さまざまな抗原に対する抗体を含んでいるゆえに、特定の血管炎との関連もはっきりしない可能性が大きい。従って、抗内皮細胞抗体の対応抗原を同定し、個別研究にもついで

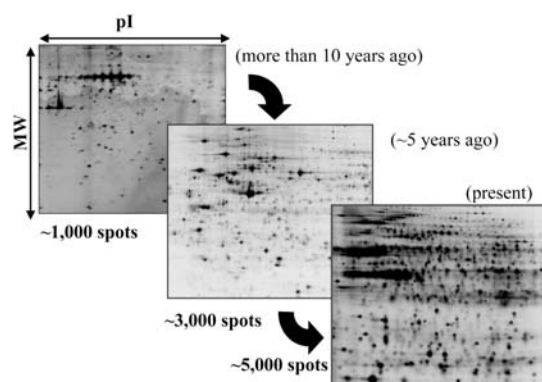


Figure 1 Improvement of 2- dimensional electrophoresis.

くことが、抗内皮細胞抗体の病態的意義と診断的意義を確定する第一歩である。そのためにプロテオミクスを用いたディファレンシャルウェスタンブロット法を用いた。

具体的にはヒト臍帯静脈由来内皮細胞(HUVEC)と対照細胞としてHela細胞を用い、それぞれから尿素などを含む溶液でタンパクを抽出し、二次元電気泳動法で分離展開した。その後、ニトロセルロース膜に転写し、血管炎(Wegener肉芽腫症, Henöch-Schoenlien紫斑, 血管型ベーチェット病, 結節性多発動脈炎, 悪性関節リウマチ等)患者血清を用いてウェスタンブロットを行った。これにより自己抗原スポットが検出されるが、その際、HUVEC由来タンパク質を用いたパネルとHela由来のタンパク質を用いたパネルを比べることで、血管内皮細胞に優位に発現するタンパク質でかつ自己抗原となっているタンパク質スポットを検出した。これらは抗内皮細胞抗体の対応抗原候補と考えられるが、実に150個以上のスポットが検出され、対応抗原の多様性が改めて明らかとなった。この中で50個以上のスポットのタンパク質名をMALDI-TOF/TOF型質量分析器とマスコトプログラムで同定した。さらに同定された抗原候補タンパク質について、順次、報告されているmRNA配列から、PCR法を用いてcDNAを増幅、大腸菌で組換えタンパク質を発現精製した。これら組換えタンパク質を用いて抗原性の確認とともに、ウェスタンブロット法とELISA法にて血管炎患者、その他の膠原病患者、および健康人の血清を広く検討した。組換えタンパク質にて検討した中では、peroxiredoxin 2 に対する自己抗体が血管炎患者の60%以上で検出されることが判明した。Peroxiredoxinは抗酸化

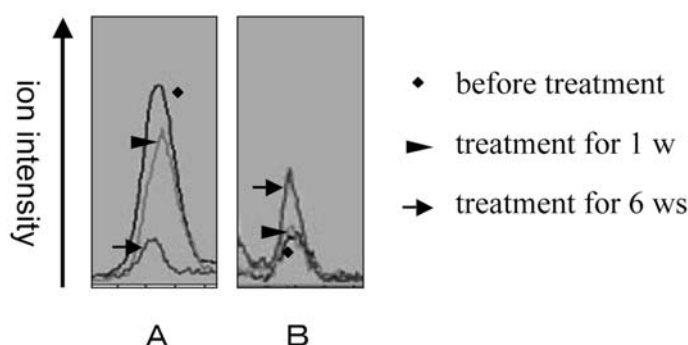


Figure 2 Detection of serum peptides whose intensities were changed by treatment in patients with MPO-ANCA associated vasculitis.

A: Example of peptides whose intensity was decreased by the treatment.

B: Example of peptides whose intensity was increased by the treatment.

作用を持つタンパク質ファミリーでperoxiredoxin 1-6 までの 6 つのタイプがある⁷⁾。また、血管内皮で多く発現されていることも以前に報告されているものであった⁸⁾。われわれは細胞表面にも検出され得ることも確認した。peroxiredoxin 2 に対する自己抗体が存在することは、血管炎において血管内皮細胞が酸化に対する抵抗性が現弱し、傷害が進む因子になり得ると考えられた。また、cyclophilin A に対する自己抗体が大型血管炎でも高頻度に検出されることも明らかとなった。cyclophilin A はシクロスポリン A に結合することや HIV のキャプシドタンパク質とも結合することが知られている⁹⁾。さらに興味深いことに cyclophilin A はそれのみで peroxiredoxin 2 と結合し、peroxiredoxin 2 を還元させ、その結果 peroxiredoxin 2 の抗酸化能を増強させることが報告されている¹⁰⁾。すなわち、抗酸化を担うタンパク質に対して自己抗体が産生されている面がある。今後これらの自己抗体に病態的意義があるかどうか検討が必要である。

以上、細胞種あるいは組織特異的に発現する自己抗原を同定するために、二次元電気泳動後とディファレンシャルウェスタンブロット法の組み合わせは新たな血管炎関連自己抗体の探索に有効であるといえる。

ペプチドミクス

ペプチドミクスは、小ペプチドの検出と同定を質量分析器で行う手法である。疾患解析において、タンパク質の分解産物である小ペプチドはこれまで技術的な困難さからほとんど解析されてこなかったが、本手法はこれを可能にした。各種体液に応用し、疾患特異的に存在するペプチドなどが見つければ診断的意義は大きいといえる。通常は血清、尿、髄液などの体液から疎水

性担体を用いてその中に含まれる小ペプチドを直接回収してくる。それをまず MALDI-TOF 型質量分析器で検出するが、その際、各種疾患群のサンプルを数十検討し、ClinProt などの専用プログラムで各疾患群特異的のペプチドを選択する。検索対象は分子量が 10 kD 程度以下のペプチドがよく行われる。その後、疾患特異的と思われるペプチドを再度 MALDI-TOF/TOF 型質量分析器で解析し、de novo シークエンスと呼ばれる方法でアミノ酸配列を決定する。実際にアミノ酸配列決定に適したペプチドの質量は 3 kD 程度以下でそれ以上に大きいものは何らかの前処理が必要で困難を伴うことが多い。

ペプチドミクスによる 血管炎血清ペプチドの検索

本方法が自己免疫疾患血清に対しても有効であることは、われわれが以前に強皮症患者血清ペプチドの解析を試み、確認していた。その検索では補体である C3 の断片である C3f の分解産物やメチル化された C4 断片が増加していることが明らかとなっている¹¹⁾。MPO-ANCA 関連血管炎では、病態に関連するペプチドを探索する目的で、治療前、治療開始 1 週間、治療開始 6 週間での血清群を検索した。この際、血清解析では検出には 5 μ l という少量で可能であり、MB-C18 という疎水性担体でペプチドを分離回収した。MALDI-TOF 型質量分析器による検出で、治療に伴い増加するペプチドと治療に伴い減少するペプチドが共に複数個見出し、治療に伴い血清ペプチドスペクトラムが変化することが判明した。その例を Fig. 2 に示す。また、治療前の血清中のペプチド強度と臨床症状との相関を検討した結果、少なくとも 5 本のペプチド (A-E) で臨床症状との相関が認められた。ペ

プチドAのイオン高強度群では末梢神経障害と腎障害が有意に高頻度に出現していた。同様に、ペプチドBとCのペプチド高強度群では末梢神経障害が、ペプチドDとEのペプチド高強度群では腎障害が有意に高頻度に出現していた。以上の結果より、MPO-ANCA関連血管炎患者血清中には治療により量的変化を示すペプチド群が存在し、かつ、個々のペプチドにより、末梢神経障害と腎障害など特定の症状と相関のあるものが存在することが判明した。ペプチドのイオン強度が末梢神経障害と腎障害など特定の症状と相関することから、病態的意義を持つ可能性も考えられた。現在、これらのアミノ酸配列を順次同定しており、同定に従ってさらなる検討を加える予定である。

終わりに

プロテオミクス/ペプチドミクスは、タンパク質とその分解産物を対象に、質的または量的観点から、網羅的疾患関連分子を探索する方法である。本項では、血管炎における抗内皮細胞抗体の対応抗原の解析と、MPO-ANCA関連血管炎における治療反応性ペプチドあるいは症状相関ペプチドの検出に応用した。どちらの場合に、既存の知識や経験からは得られない情報であり、そこに網羅的検索の意義がある。もちろんこうして得られた疾患関連分子の意義は網羅的検索に続く個別的検索を待たねばならないが、抵抗内皮細胞抗体は対応抗原の種類あるいはその組み合わせによって、内皮細胞への影響が異なることは容易に想像される。今後peroxiredoxin 2を含め、個別的解析により、抗原別および組み合わせによる内皮細胞障害の機序の解明を行っていく必要がある。

文 献

- 1) Shen R, Fan JB, Campbell D et al: High-throughput SNP genotyping on universal bead arrays. *Mutat Res*, 2005, **573**: 70–82.
- 2) Nataraj AJ, Olivos-Glander I, Kusukawa N et al: Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis*, 1999, **20**: 1177–1185.
- 3) Okoniewski MJ, Miller CJ: Comprehensive analysis of affymetrix exon arrays using BioConductor. *PLoS Comput Biol*, 2008, **4**: e6.
- 4) Marouga R, David S, Hawkins E: The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem*, 2005, **382**: 669–678.
- 5) Ferguson PL, Smith RD: Proteome analysis by mass spectrometry. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2003, **32**: 399–424.
- 6) Belizna C, Duijvestijn A, Hamidou M et al: Antiendothelial cell antibodies in vasculitis and connective tissue disease. *Ann Rheum Dis*, 2006, **65**: 1545–1550.
- 7) Flohé L, Budde H, Hofmann B: Peroxiredoxins in antioxidant defense and redox regulation. *Biofactors*, 2003, **19**: 3–10.
- 8) Lee SC, Na YP, Lee JB: Expression of peroxiredoxin II in vascular tumors of the skin: a novel vascular marker of endothelial cells. *J Am Acad Dermatol*, 2003, **49**: 487–491.
- 9) Wang P, Heitman J: The cyclophilins. *Genome Biol*, 2005, **6**: 226.
- 10) Lee SP, Hwang YS, Kim YJ et al: Cyclophilin a binds to peroxiredoxins and activates its peroxidase activity. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 29826–29832.
- 11) Xiang Y, Matsui T, Matsuo K et al: Comprehensive investigation of disease-specific short peptides in sera from patients with systemic sclerosis: complement C3f-des-arginine, detected predominantly in systemic sclerosis sera, enhances proliferation of vascular endothelial cells. *Arthritis Rheum*, 2007, **56**: 2018–2030.

Identification of Vasculitis-related Autoantigens and Peptides by Proteomics and Peptidomics

Tomohiro Kato

Department of Clinical Proteomics and Molecular Medicine, St. Marianna University Graduate School of Medicine,
Kanagawa, Japan

Key words: proteomics, peptidomics, anti-endothelial cell antibody (AECA), peptide

Establishment of early diagnosis and effective treatment has been of great concern in management of systemic vasculitis. Recently, proteomics of a comprehensive analysis of proteins and peptidomics of a comprehensive analysis of peptides have been greatly advanced. Recent improvement of 2-dimensional electrophoresis and mass spectrometry has promoted the proteomics and peptidomics. These comprehensive methods have started to be applied to the analyses of systemic vasculitis and have been found to be powerful tools. We here describe the application of proteomics and peptidomics to analyses of vasculitis, that is, identification of targets of anti-endothelial cell antibodies and surveillance of serum peptides. The anti-endothelial cell antibodies are frequently detected in patients with vasculitis, but the targets of the antibodies remain to be clearly elucidated. Up to now, serum peptides rarely have been investigated in systemic vasculitis.

(J Jpn Coll Angiol, 2009, **49**: 39–43)