

論文の内容の要旨

論文題目 腸炎を発症したウマ血清中バイオマーカー探索とその迅速測定系の構築

氏名 南島 陽平

【序論】

ウマ腸炎 (equine colitis) は、外科的手術や食餌の変更等の様々なストレスを要因とする疾患であり、突発的で極めて進行が早く、致死率の高い疾患 (約30%) であることが知られている。ウマ腸炎は多彩な病態を示し、病態の詳細が未解明であることから、標準的な治療法が確立されていない。よって、腸炎の予後診断及び病態の解明に有用なバイオマーカーを発見できれば、ウマ臨床への貢献は大きいと考えられる。

近年、バイオマーカー探索の手法として、試料中のタンパク質を質量分析装置で網羅的に解析する手法が用いられている。特に、タンパク質のトリプシン酵素分解によって得られたペプチド断片のアミノ酸配列を質量分析装置で決定し、その配列を基にタンパク質を同定するボトムアップと呼ばれる手法が一般的となっている (図 1)。本手法は一度に数百種ものタンパク質を同定可能であり、同時に定量的データも取得可能である。しかしながら、質量分析を使用した大規模分析は、試料調製や分析機器による測定の時間効率が悪く、コストの面からも臨床への導入は困難である。このため、ウマ臨床においては、迅速且つ検出感度の高いEnzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を応用した血清中タンパク質の濃度測定が汎用されている。そこで本研究では、腸炎を発症したウマ血清中タンパク質を質量分析装置によって網羅的に解析し、その早期診断や予後の診断に有用なバイオマーカー探索を行った。続いて、得られたバイオマーカー候補となるタンパク質を迅速且つ簡便に定量可能な方法を開発するために、それらに対するモノクローナル抗体を作製することを目的とした。

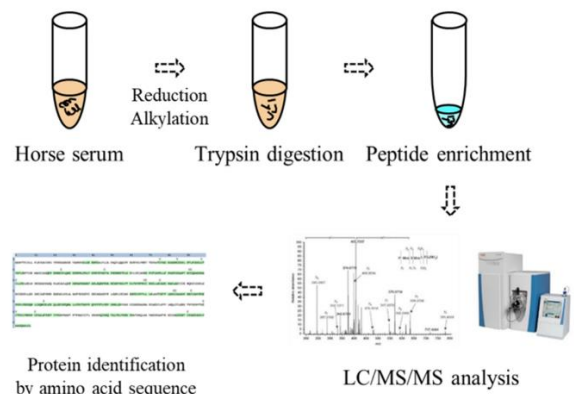


図 1. 質量分析法によるプロテオーム解析

【結果】

1. ウマ血清分析法の最適化

ヒトにおけるプロテオーム解析の報告 (Masuda et al. *J Proteome Res.* 2008) などを参考としてタンパク質分析法を確立し、健常馬由来の血清を測定すると、タンパク質同定数は 122 と少数であった。そこでタンパク質同定数向上のため、分析法の前処理及び分析条件の最適化を行った。まず、血清タンパク質を加水分解するトリプシン処理時間を12 時間、液体クロマトグラフィーにおける LC グラジエント (A; 0.1 vol%ギ酸, B; アセトニトリル, B 1.6% → 48%) を 60 分間に最適化した。また、質量分析装置に導入するペプチド量をコントロールするオートゲインコントロール (AGC) target について、Full MS については 300,000、

dd-MS² においては 100,000 とした。続いて、高濃度タンパク質存在下における低濃度タンパク質の同定率低下を抑えるための Dynamic exclusion time 値をタンパク質同定数が最も高くなるように調節し、10 msec とした。分析法の最適化後、同検体を分析すると、タンパク質同定数が 198 に改善した。続いて、ウマブール血清を繰り返し分析 (n=3) し、血清中に高濃度に含まれる serotransferrin、中程度の濃度で含まれる apolipoprotein C2、低濃度に含まれる CD14 の signal intensity を測定した。その結果、全てのタンパク質の定量値の変動係数 CV は 20%以下と良好な再現性を示した。また、カラムや LC 装置に残存するペプチドのキャリーオーバーの影響を軽減する目的で、サンプル間にシステムブランクの測定を 3 回挿入することとした。これにより、最も血清中に高濃度に含まれていた serum albumin の signal intensity が挿入前と比較して 3%以下となったため、定量値に与える影響は少ないと判断した。なお、本研究ではサンプル間の精度管理のため、サンプル調製前のウマ血清に内標準物質としてウシ由来 β -ラクトグロブリンを 1 μ g 添加し、これに由来するペプチドイオン TPEVDDEALEK (m/z 623.2959) の強度の変動係数 CV が全サンプル間で 20%以内に収まることを確認した。

2. 質量分析法による腸炎バイオマーカーの探索

健康馬 36 頭及び腸炎発症馬 12 頭由来の血清を用いた。腸炎発症馬の血清は、ウマが診療所に来所した日 (day 1) から、退院若しくは死亡日まで 1 日 1 回経時的に採取し、得られた血清をプロテオーム解析に供した。解析の結果、292 種類のタンパク質が同定され、これらの定量的なデータを得た。本データを基に、腸炎-健康群間、さらに腸炎群における生存-死亡群間で Mann-Whitney の U 検定を実施した。なお、両群間で 2 倍以上の増減が見られ、且つ p 値が 0.05 以下を示したタンパク質について、有意差があったと見做した。

腸炎-健康群間で有意差を示したタンパク質を図 2 に示した。これらのタンパク質は全て腸炎群で増加していた。

これらのうち、hemoglobin subunit

alpha (HBA) 及びbiliverdin reductase B (BLVRB) は主に赤血球内に存在するタンパク質として知られる。ウマ腸炎の代表的な臨床症状の一つとして、全身循環へ腸内細菌が侵入し、溶血が起こることが知られているため、HBA及びBLVRBの濃度上昇に溶血に関連している可能性がある。また、ウマ腸炎は重篤化すると広範な腸管壁細胞の壊死を伴うことが知られている。今回見出された carbonic anhydrase 1 (CA1)、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)、peroxiredoxin 2 (PRDX2) について、特に腸細胞における存在量が多いとの報

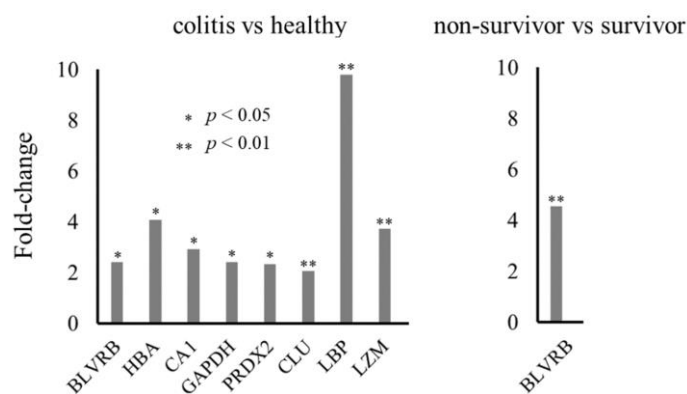


図 2. 有意差を示したタンパク質
(腸炎-健康群及び死亡-生存群間比較)

告はないものの、腸細胞の壊死に伴って血中濃度が上昇したものと推測される。**clusterin** (CLU)、**lipopolysaccharide binding protein** (LBP)、**lysozyme** (LZM) は免疫応答によって誘導されるタンパク質であり、CLU は主に炎症反応によって誘導されることが知られ、また、LZM 及び LBP の濃度上昇は、細菌による感染が強く疑われるとの知見がある。

健常-腸炎群間の比較において見出された 8 種類のタンパク質について、これらのタンパク質の変動と予後の関連性について調査するために、腸炎の死亡群 (n=5) 及び生存群 (n=7) 間で比較を行った。解析の結果、BLVRB の濃度が有意に死亡群で上昇していることが分かった (図 2)。このことから、BLVRB が腸炎の予後診断に有用である可能性が示された。

続いて、これらのタンパク質が腸炎に特異的なものであることを確認するために、呼吸器疾患を発病したウマ血清 (Respiratory disease 群、12 頭) を分析し、腸炎群 12 頭との比較を行った (図 3)。結果、腸炎群の CA1 について有意な濃度上昇 (fold-change >2, p 値 <0.05) が認められ、また、何れのタンパク質も腸炎群において濃度が上昇していた。

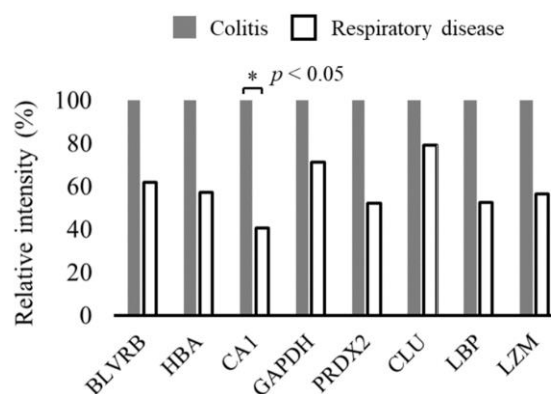


図 3. 腸炎-Respiratory disease 群間比較

3. ウマ腸炎のバイオマーカー候補タンパク質に対するモノクローナル抗体作製

健常及び腸炎群間の比較において有意差 (p 値 <0.01) を示した CLU、LBP 及び LZM、死亡及び生存群間で有意差を示した BLVRB、腸炎と Respiratory disease 群間で有意差を示した CA1、以上の 5 種のタンパク質をウマ腸炎の診断に有用なバイオマーカー候補とし、これらに対するモノクローナル抗体作製を試みた。まず、各タンパク質の cDNA をウマ肝臓及び腎臓の cDNA ライブラリより PCR によって取得し、pMXs レトロバイラルベクターに組み、ウマタンパク質を発現するレポーター細胞を作製した。本ベクターは c-Myc タグ、I 型膜貫通タンパク質であるマウス CD8 α の膜貫通領域、IL-2 シグナルを伝達するマウス CD3 ζ 鎖を細胞内に発現するように設計されたベクターであり、これを用いてウマタンパク質と CD3 ζ 鎖細胞領域が融合したキメラタンパク質をマウス T 細胞由来の BWZ.36 細胞表面に発現させ、免疫原としてラットに免疫した (図 4)。

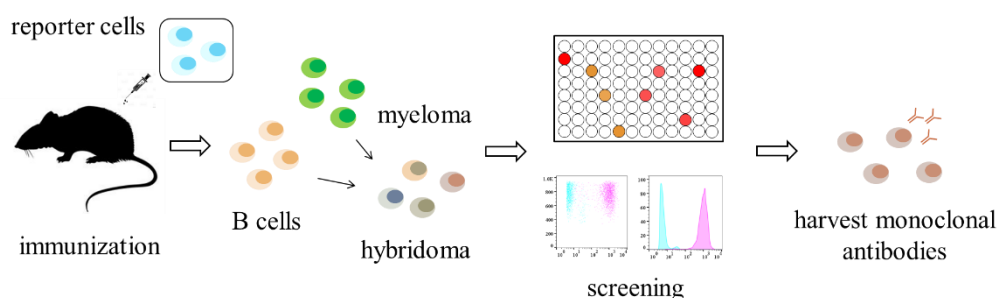


図 4. 抗ウマタンパク質モノクローナル抗体の作製手順

免疫後、ラット膝窩リンパ節、鼠径リンパ節及び腸骨リンパ節由来のB細胞とマウスミエローマ細胞を融合し、ハイブリドーマを作製した。続いて、ウマタンパク質に対して特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマを選定するスクリーニングを、レポーター細胞の産生する β -ガラクトシダーゼ活性によって検出するレポーターアッセイによって実施し、計48個のスクリーニングポジティブな well を得た。本 well から得られたハイブリドーマについて、限界希釈法により単一のハイブリドーマに分離した。この培養上清中の抗体のレポーター細胞に対する結合をフローサイトメトリーによって解析することによって、biliverdin reductase Bに対して特異的に結合するハイブリドーマが得られたことを確認した(図5)。

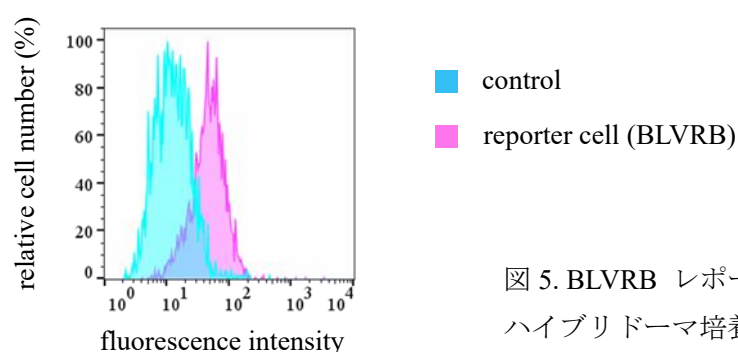


図 5. BLVRB レポーター細胞に対する
ハイブリドーマ培養上清中抗体の結合性解析

【総括】

本研究により、ウマ血清を使用した質量分析計によるプロテオーム解析法を確立した。これにより腸炎発症馬及び健常馬における血清タンパク質の網羅的解析を実施し、8種のタンパク質(BLVRB、HBA、CA1、GAPDH、PRDX2、CLU、LZM、LBP)が腸炎群において有意に濃度上昇していることを明らかにした。さらに、腸炎群における死亡及び生存群間の比較や呼吸器疾患を発症したウマとの比較を実施し、腸炎のバイオマーカー候補としてBLVRB、CA1、CLU、LZM、LBPの5種のタンパク質を選択した。これらのバイオマーカーとしての有用性を証明するために、サンプルサイズの拡大が必要であると考え、これらを迅速且つ簡便に定量可能な測定系確立のため、モノクローナル抗体の作製を試みた。検討の結果、BLVRBに対して特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマを得た。今後は、本ハイブリドーマから得られた抗体の精製を行い、ウマ血清検体中のBLVRBに対する結合特異性の評価を行う等、抗体の実用化に向けた検討を実施する予定である。

【発表論文】

1. **Minamijima Y**, Niwa H, Uchida E, Yamamoto K, Comparison of the proteome in sera between healthy thoroughbreds and thoroughbreds with respiratory disease associated with transport using mass spectrometry-based proteomics. Journal of Equine Science (in press, 2021)
2. **Minamijima Y**, Tozaki T, Kuroda T, Urayama S, Nomura M, Yamamoto K, A comprehensive and comparative proteomic analysis of horse serum proteins in colitis. (投稿中)