

# 心血管疾患の発症や進行に關与する 血清疾患マーカー蛋白質の同定

島根大学総合科学研究支援センター 生体情報RI実験分野  
教授 松本 健一

## はじめに

生活習慣の欧米化や高齢化により、動脈硬化や大動脈瘤や血管石灰化等の血管疾患や、心筋梗塞や狭心症や心臓弁膜症等の心疾患は急速に増加しつつある。動脈硬化や大動脈瘤の形成は、血管組織の大規模な破綻を引き起こす。大動脈瘤やその壊裂を含む大動脈疾患は、我国においても死因の上位に位置し、大動脈瘤破綻が生じた場合は、その60%以上は死に至る。そのため、分子レベルでその発症機構を理解し、さらには得られた知見を基にした治療法の開発が必要となっている。また、大動脈瘤の破綻前に検査などで偶然見つかかり手術を受けた場合、その危険率は1%以下に減少する。このように、心血管疾患の早期の診断法の確立も重要となっている。

大動脈瘤は加齢、性別（特に男性に発症）、喫煙、アテローム性動脈硬化、高血圧、遺伝的な要因等により発症リスクが高まることが報告されている。特に大動脈瘤の80%以上は、腎動脈下腹部大動脈に発症する。組織学的には、血管中膜の平滑筋細胞のアポトーシス、エラスチン弾性線維やコラーゲン膠原線維の破壊、血栓の付随、マクロファージやTh2細胞等の免疫担当細胞の侵入等が知られている<sup>(1)</sup>。また、生化学的には、炎症性サイトカインのTNF- $\alpha$ やIL-1 $\beta$ やIL-6の発現亢進、エラスチンやコラーゲンの分解を引き起こすエラスターゼやマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）の活性化亢進等が、これまでに知られている<sup>(2)</sup>。

本研究では、心血管疾患、特に腹部大動脈瘤（AAA）と胸部大動脈瘤（TAA）の患者の手術前と手術後の血清を用いて、術前と術後で発現量に差のある血清蛋白質が、これらの大動脈瘤疾患に關与し病態の診断に役立つ血清マーカーとなり得る可能性を考え、プロテオミクス解析の手法により網羅的な発現変動蛋白質の同定を試みた。

その結果、AAA患者血清とTAA患者血清において、術前血清に比べて術後血清において有意に発現減少し、これまで大動脈瘤疾患において殆ど解析がなされていなかった各々3個ずつの血清蛋白質を同定することができた。

## 材料と方法

AAAの患者7名（平均73.9歳）とTAAの患者7名（平均73.1歳）から、手術前（平均 7.9日）、

手術後（平均 9.3 日）の臨床検査の残余の血清を得た。また、コントロールとして、ボランティアの健常人 4 名（平均 42.3 歳）の血清を、約 2 週間の間隔で得た。各血清より、血清中に多量に存在するアルブミンや免疫グロブリン（IgG）を、アルブミン・IgG 除去スピニングにより除去した。次に、各患者由来の術前、術後サンプルを、変性、還元、アルキル化、トリプシン消化後、各々異なる isobaric tag for absolute and relative quantitation (iTRAQ) 試薬により標識を行い<sup>(3)</sup>、標識された各々のサンプルを混ぜ、過剰量の iTRAQ の除去とペプチドの分画のために、陽イオン交換クロマトグラフィーを行い、6 分画に分けた。次に、各分画をナノ液体クロマトグラフィー（Nano LC）（C18 トラップカラムを装着）により 171 分画に分け、matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) 用マトリックス溶液である  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid ( $\alpha$ -CHCA) と混ぜながら、直接 MALDI-time of flight (TOF) /TOF プレートに自動滴下した。次に、MALDI-TOF/TOF 質量分析器で mass spectrometry (MS) 解析を、そして続いて MS/MS 解析を行った。その MS/MS 解析結果に基づき、ProteinPilot ソフトウェアを用いて発現変動血清蛋白質の同定を行なった。尚、各蛋白質の術前蛋白質量に対する術後蛋白質量の相対量（術後／術前）の算出のために、iTRAQ 比を用いた（相対量は iTRAQ 比と一致するため）<sup>(4)</sup>。さらに、AAA 患者、TAA 患者の各々 7 名中 6 名以上において共通に同定され、かつ各々の蛋白質の術後／術前の iTRAQ 比が 1.3 倍以上または 0.77 倍未満の値を示す蛋白質を、有意な発現変動蛋白質として同定した。さらに、AAA 患者血清と TAA 患者血清において同定された発現変動蛋白質が、4 名の健常人の血清の内 2 名以上の血清の 2 時点の血清サンプルの比較において、その蛋白質の iTRAQ 比が 1.3 倍以上または 0.77 倍未満の変動値を示した場合は、その蛋白質は健常人においても有意に発現変動を示す蛋白質と見做し、それらの変動蛋白質を除外した。尚、本研究は、「テネインファミリー及び未同定蛋白質の網羅的発現変動解析による循環器疾患の病態解明と新規診断・治療法の開発」（代表者：島根大学医学部循環器呼吸器外科学講座・織田禎二教授；分担者：松本健一）の課題名で、島根大学・医の倫理委員会から承認を受けている。

## 結 果

7 サンプルの AAA 患者血清において、術前と術後で発現変動し同定された総蛋白質数（1 サンプルにおいて 1 回でも同定された蛋白質の数）は 180 個、一方 TAA 患者血清においては 199 個、その内共通に同定された蛋白質は 141 個であった（図 1A）。また、7 サンプルの内 6 サンプル以上において共通に同定された蛋白質数は、AAA 患者血清においては 78 個、TAA 患者血清においては 86 個、その内共通に同定された蛋白質は 75 個であった（図 1B）。さらに上記の内、4 名の健常人血清の内 2 名以上において術後／術前の iTRAQ 比が 1.3 倍以上または 0.77 倍未満の値を示した発現変動の大きな蛋白質を除去すると、AAA 患者血清においては 63 個、TAA 患者血清においては 71 個、その内共通には 61 個の蛋白質が同定された（図 1C）。さらに上記の内、術後／術前の iTRAQ 比が 1.3 倍以上の値を示す発現変動蛋白質は、AAA 患者血清

においては6個、TAA患者血清においては9個であった。尚、AAA患者血清において同定されたこの6個の蛋白質はすべてTAA患者血清においても共通に発現増加蛋白質として同定された。一方、術後／術前のiTRAQ比が0.77倍未満の値を示す発現変動蛋白質は、AAA患者血清においては13個、TAA患者血清においては18個であった（図1D）。尚、AAA患者血清において同定された13個の蛋白質の内12個は、TAA患者血清においても発現減少蛋白質として同定された。

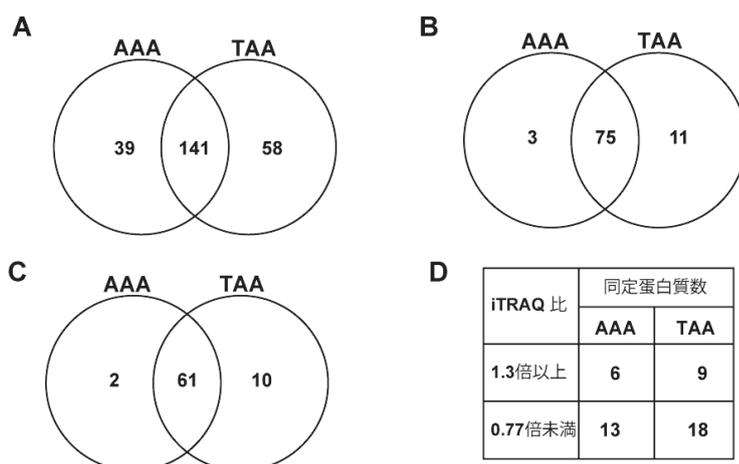


図 1. 各ステップにおいて同定された蛋白質数のベン図（本文参照のこと）  
AAA: AAA 患者血清 TAA: TAA 患者血清

AAA患者血清において術前に比べ術後に発現増加（iTRAQ比が1.3倍以上）した6個の蛋白質やTAA患者血清において発現増加した9個の蛋白質をさらに解析してみると、Serum amyloid A proteinを始めてとして、すべて炎症性マーカー蛋白質（acute phase protein）であった。また、AAA患者血清で術前に比べ術後に発現増加した6個の蛋白質のうち、2個以外は、またTAA患者血清で術後に発現増加した9個の蛋白質のうち、3個以外は、これまでにアテローム性動脈硬化組織や大動脈瘤組織における発現変動プロテオミクス解析等により報告された蛋白質であった。一方、AAA患者血清において術前に比べ術後に発現減少（iTRAQ比が0.77倍未満）した13個の蛋白質やTAA患者血清において発現減少した18個の蛋白質を解析してみると、両方の患者血清において各々5個ずつの炎症性マーカー蛋白質が同定された。また、AAA患者血清で術前に比べ術後に発現減少した13個の蛋白質のうち3個は、またTAA患者血清で術後に発現減少した18個の蛋白質のうち3個は、これまでにアテローム性動脈硬化組織や大動脈瘤組織における発現変動プロテオミクス解析において、報告が殆どなされていない蛋白質であった。尚、AAA患者血清において、これまで報告されているAAA疾患の血清マーカー蛋白質<sup>(5)</sup>は、この解析においては同定されなかった。

以上のことより、炎症性マーカー蛋白質やこれまでにアテローム性動脈硬化組織や大動脈瘤組織における発現変動プロテオミクス解析等によりすでに報告されている蛋白質以外に、

AAA患者とTAA患者の血清において、術後に発現減少がみられた各々3個ずつの血清蛋白質を新たに同定することができた。これらの新たに同定された蛋白質は、AAAやTAAの病態の診断に役立つ血清マーカー蛋白質となり得る可能性が高いと考えられた。

次に、上記で述べたAAA患者血清において同定された63個の血清蛋白質とTAA患者血清において同定された71個の血清蛋白質を、術後/術前のiTRAQ比が1.0倍以上を示す術後発現増加蛋白質と1.0倍未満を示す術後発現減少蛋白質に分け、機能分類をPanther software (version 7.2) (<http://www.pantherdb.org/>) を用いて行った(図2)。その結果、機能分類においては、AAA患者血清とTAA患者血清において、ほぼ同じ傾向を示し、iTRAQ比が1.0倍以上の術後増加蛋白質としては、defense/immunity protein、enzyme modulator等が、iTRAQ比が1.0倍未満の術後減少蛋白質では、transfer/carrier protein、enzyme modulator、defense/immunity protein、hydrolase等が顕著であった(図2)。また、同様のAAA患者血清蛋白質とTAA患者血清蛋白質を用いて、術後/術前のiTRAQ比が1.0倍以上を示す術後増加蛋白質と1.0倍未満を示す術後減少蛋白質に分け、パスウェイ解析をPanther softwareを用いて行った(図3)。その結果、パスウェイ解析においても、AAA患者血清、TAA患者血清において、ほぼ同じ傾向を示し、特に両患者血清において、blood coagulation経路に属する蛋白質の術後における発現減少が顕著であった(図3)。

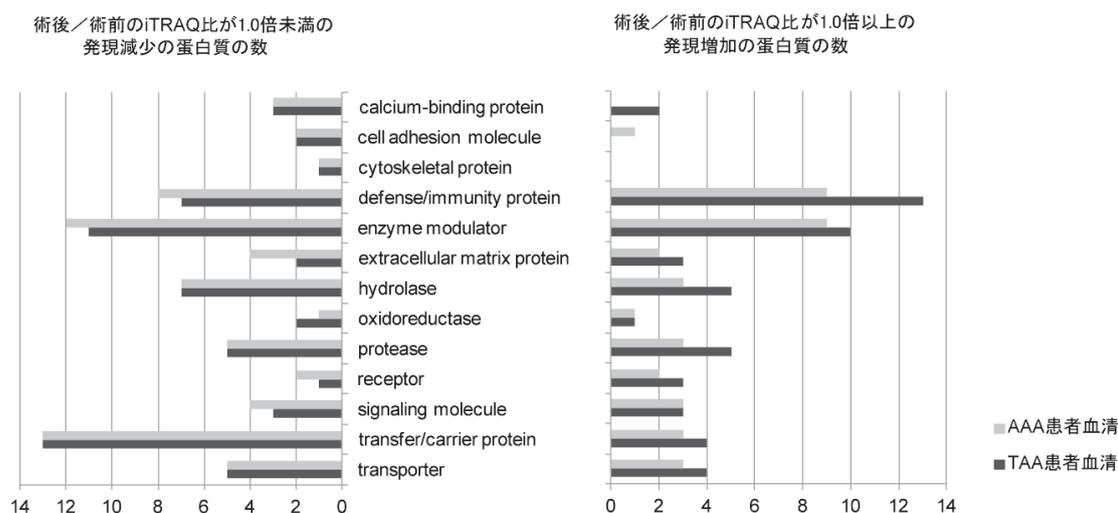


図 2. 同定された血清蛋白質の Panther software を用いての機能分類

## 考 察

AAA患者及びTAA患者の血清において、術前に比べ術後で発現増加した蛋白質の多くが、Serum amyloid A proteinやC-reactive protein等の炎症性マーカー蛋白質であったことは、大動脈瘤疾患に伴う術後の発現増加というよりも寧ろ、術後平均9.3日のサンプリングを考慮すると、手術の侵襲による全身的な免疫応答反応の結果、多くの炎症性マーカー蛋白質の発現が術後に増加したと考えられる。

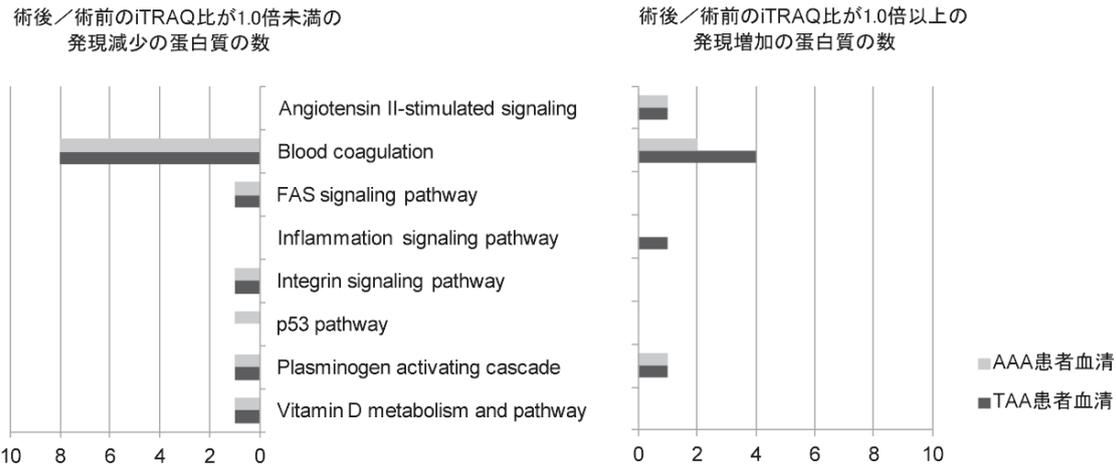


図 3. 同定された血清蛋白質の Panther software を用いてのパスウェイ解析

また、アテローム性動脈硬化組織や大動脈瘤組織において、病態に伴い発現変動することがすでに報告されている幾つかの蛋白質も、術前・術後における血清中における発現変動蛋白質として今回同定された。このことにより、病変組織のプロテオーム変化に伴う血清プロテオームの変化も示唆される。

また、AAA、TAAの両患者血清において、術前に比べ術後において有意に発現減少した新たな3個の血清蛋白質を各々同定することができた。現在、これらの血清マーカー候補蛋白質の発現が、実際にAAAやTAAの病態に関連しているか否かを調べるために、正常人血清や患者術前・術後血清を用い、上記蛋白質を特異的に認識する抗体を用いてのWestern blot法により各蛋白質の発現変動の確認を行っているところである。

## 要 約

AAA患者とTAA患者の、手術前と手術後の血清プロテオームの比較を行った。その結果、術前に比べ術後において、有意に発現減少している各々3個ずつの蛋白質を、AAA患者血清とTAA患者血清において同定することができた。今後、これらの血清蛋白質が、AAAやTAA疾患の新たな血清マーカー蛋白質としてなり得るかどうかを、詳細に検討する必要がある。

## 文 献

1. Annambhotla, S., Bourgeois, S., Wang, X., Lin, P.H., Yao, Q. & Chen C.: Recent advances in molecular mechanisms of abdominal aortic aneurysm formation. *World J. Surg.* 32: 976-986, 2008.
2. Kuivaniemi, H., Platsoucas, C.D. & Tilson, M.D. 3rd.: Aortic aneurysms: an immune disease with a strong genetic component. *Circulation* 117: 242-252, 2008.

3. Ross, P.L., Huang, Y.N., Marchese, J.N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlet-Jones, M., He, F., Jacobson, A. & Pappin, D.J.: Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell. Proteomics* 3: 1154-1169, 2004.
4. Matsumoto, K., Maniwa, T., Tanaka, T., Satoh, K., Okunishi, H., & Oda, T.: Proteomic analysis of calcified abdominal and thoracic aortic aneurysms. *Int. J. Mol. Med.* 30: 417-429, 2012.
5. Golledge, J., Tsao, P.S., Dalman, R.L. & Norman, P.E.: Circulating markers of abdominal aortic aneurysm presence and progression. *Circulation* 118: 2382-2392, 2008.