

たなか たかひろ

氏名（本籍地） 田 中 崇 裕

学 位 の 種 類 博士（農学）

学 位 記 番 号 農博第 987 号

学位授与年月日 平成 22 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項

研 究 科 ， 専 攻 東北大学大学院（博士課程）農学研究科応用生命科学専攻

論 文 題 目 血漿プロテオームによる活動性結核の病態に関わるバイオマーカーの研究

博士論文審査委員 （主査）教 授 内 田 隆 史

教 授 西 森 克 彦

准教授 金 子 淳

論文内容要旨

第一章 緒言

結核は人類の三分の一が感染していると推定される主要な感染症であり、年間 200 万人近くが死亡している。その一方で、潜伏感染した人々の大多数は生涯を通して結核を発症しない。この疫学的観察結果は結核の病態における数十年来の謎となっている。ツベルクリン皮内テストは活動性結核と潜伏感染を区別できず、特異性と感度が低いという大きな問題点がある。新たに開発された QuantiFERON® TB Gold (QFT) (interferon- γ (IFN- γ) リリースアッセイ) は全血で *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) 特異的な免疫応答を IFN- γ を測定することで評価する試験で、特異性が改良されているが、発症と潜伏感染を区別できない。近年の報告で IFN- γ と結核の防御免疫の相関が乏しいことが示されている。BCG で免疫されたマウスでは CD8⁺ T-cell が急速に集積されるが、CD4⁺ T-cell により特異的に産生される IFN- γ は防御の強度よりも菌数を反映している。ヒトの場合、BCG 接種された幼児において、多くの BCG 特異的 CD4⁺, CD8⁺ T-cell は IFN- γ を産生しない。この事実はむしろ IFN- γ が病原体に対する暴露を示すバイオマーカーとして適していることを示している。このように現状では感染と発症の間に起こる動的变化に関して限られた知見しかなく、このことが結核の複雑な病態生理学的なプロセスを理解する上で大きな障害となっている。活動性結核患者の包括的研究を行うことで、結核に対する感受性と抵抗性に関連する物質を同定できる可能性がある。Agranoff らは結核と非結核性炎症とを区別するバイオマーカーとして serum amyloid A, transthyretin を特定して、これら二つを含む四つのマーカーの併用で最大 78% の診断精度を実現した。また、QFT アッセイ上清中の Cytokine のマルチプレックス解析は病態の複雑な全体像を把握する上で有益であるが、高分子タンパク質については解析が進んでいない。そこで我々は QFT アッセイの上清中に存在する活動性結核と関連するタンパク質の探索を行った。蛍光標識二次元ディファレンシャルゲル電気泳動 (2D-DIGE) と液体クロマトグラフ質量分析法 (LC-MS) により解析同定し、immunoblotting により確認した。

第二章 二次元電気泳動による定量解析

本研究は国立国際医療センターの倫理委員会の承認を得て行われている。微生物学的に確定診断を受けた 14 名の肺結核患者 (男性 9 名 : 女性 5 名、年齢 22-75 歳) と健康者ボランティア 13 名 (男性 8 名 : 女性 5 名、年齢 24-64 歳) から採血を行った (結核患者については治療開始から 7 日以内に限定し、悪性腫瘍、自己免疫疾患、HIV 陽性の患者については除外した)。

高分子領域においてタンパク質の網羅的変化を解析するため 2D-DIGE を用いた以下の2種類のカテゴリの比較解析モデルを示した。第一に刺激間の比較では活動性結核患者と健常者において全血を *Mtb* 特異抗原で刺激した際に血漿中に放出される物質を見ることで *ex vivo* での反応の違いを反映し、第二に疾病間の比較では活動性結核患者と健常者の未刺激血漿を比較することで *in vivo* での違いを反映するものとした (Fig. 1)。上記モデルにおいて結核患者4名、健常者4名の血液サンプルを用いて活動性結核患者で特異的に増減するタンパク質を探索した。血漿タンパク質の解析の解像度をあげるために、14種の主要血漿タンパク質をアフィニティカラムにより除去し、濃縮を行った。濃縮後のサンプルについて予備実験として、健常者サンプルについて一次元目の等電点電気泳動を pH 3-10 の直線勾配で分離した。その結果、刺激間の差はおもに pH 4-7 の範囲に現れることが確認された。2 D-DIGE 法によって解析したディファレンシャルゲルイメージを Fig. 2A,B に示した。結核患者と健常者の比較を行った367スポットから36スポット ($P < 0.05$)、結核患者において *Mtb* 抗原刺激での有無の比較を行った293スポットから20スポット ($P < 0.1$) をMS解析の候補分子として選び出した (Table 1)。

ここでは PDQuest software の t 検定による P 値のカットオフによって候補タンパク質のスポット抽出を行った。

第三章 質量分析による同定

2D-DIGE により得られた、候補タンパク質について個々の P 値を出すために JMP ver 7.0.1 による統計解析を行い、刺激間 ($P < 0.1$)、疾病間 ($P < 0.05$) となるように再度絞り込んだ。ここで得られた発現に有意差のあるスポットについて二次元ピックゲル上においてシグナル強度の強いものを合計41スポットを切り出した。続いて、*in gel digestion* を行い LC-MS 解析に供した。Mascot Search を用いてペプチドマスフィンガープリンティング解析を行い、14のスポットタンパク質を同定した (データベースには Swiss Plot を用いた)。同定したタンパク質の詳細は Table2 に示した。疾病比較で候補にあがった Spot HT6102 は retinol binding protein (RBP-4)、HT2406 は fetuin A、HT5401 は vitamin D binding protein (VDBP) と同定された。また、*Mtb* 抗原刺激により増加した T3107、T4203、T4208 のスポットは全て clusterin (CLU) と同定された。この際 T4208 については解析データベースにヒト EST を用いた。

第四章 Immunoblotting による確認及び ELISA による定量解析

LC-MS により同定したタンパク質について immunoblotting による確認を行った。活動性結核患者と健常者との比較で同定された HT6102、HT2406、HT5401 についてそれぞれ immunoblotting を行った (Fig. 4A)。それぞれバンドの強度を測定したところ RBP-4 の結核患者群における濃度は (64283 + 3861) であり、健常者群の (445894+16590) よりも有意に低値であった。fetuin A の濃度は結核患者群で (42710+7580) であり、健常者群の (343617+58923) よりも有意に低値であった。VDBP の濃度は結核患者において健常者群よりも増加しているように見えたが、分布が広がっており、優位な差があるとは言えなかった (健常者 33251+2572、結核患者 38971+110001) (Fig. 4B)。

刺激間の比較で同定された CLU はスポットが複数存在することから、二次元の immunoblotting を anti-CLU- α 、anti-CLU- β について行い、増加したスポットが CLU- α であることを確認した (Fig. 4C)。

続いて、RBP-4 と fetuin A については immunoblotting の結果から明確な差があると推測されたので検体数を増やして ELISA による解析をおこなった。RBP-4 は結核患者が健常者に比べて有意に減少していた (結核患者: median = 23.6 μ g/ml; range = 8.5-63.8 健常者: median = 44.6; range = 28.8-63.1) ($P = 0.003$)。fetuin A はインテンシティのレンジが広く、結核患者と健常者の間に有意な差が見られなかった。(結核患者: median = 58.4; range = 42.1-81.5、健常者: median = 52.0 mg/ml; range = 38.9-77.4)

第五章 総合考察

活動性結核患者血漿のプロテオミクス解析によるバイオマーカー探索を試みた。サンプルとしての血漿は、比較的少ない侵襲で、治療の経過に応じて繰り返し入手できる長所もあり、バイオマーカーを探索するためにきわめてリーズナブルである。本研究で解析の主軸においた 2D-DIGE では、そのままでは血漿中の 10% 程度のタンパク質しか解析できないため、血漿中の主要タンパク質の除去、等電点に応じた分画などの前処理が血漿のタンパク質解析には必須であった。全血を *Mtb* 特異抗原刺激したサンプルおよび非刺激サンプルの比較、健常群および活動性結核患者群の非刺激サンプルの比較に分けて活動性結核に関連するターゲットを設けることにより複数のバイオマーカー候補タンパク質を検出した。結核患者と健常人において明確な差が見られたタンパク質として RBP-4、fetuin A、VDBP を同定した。この 3 つのタンパク質はマクロファージの活性化をはじめとする免疫機能の調節に関与する。結核患者血漿におけ

る RBP-4 の減少は ELISA によっても確認された。結核患者における刺激間比較で見出された CLU はアポトーシス、腫瘍発生、炎症、組織障害、自己免疫性疾患における有害物質のクリアランスに関わる細胞外シャペロンとして機能することが知られており、また TGF- β と NF κ B のシグナリングにおいて抑制性免疫調節因子として機能していることが明らかになっている。細胞内寄生菌の除去においては細胞性免疫が重要な役割を担っている。通常、細菌に対する免疫応答はマクロファージ等の食細胞により行われているが結核菌は食細胞内の小胞において寄生することが可能である。Th1 細胞はマクロファージへの抗原提示や CD40L、IFN- γ の分泌により活性化を引き起こし、食胞内で生き残る菌を殺すことができる。CLU はこの機構の抑制に働いている可能性が高い。低分子サイトカイン・ケモカイン領域では IL-10 や TGF- β が抑制性マクロファージや抑制性 T 細胞の産生する抑制性因子として知られているが、高分子領域ではあまり言及されていないことから CLU が何故増加しているのか興味を持たれる。現在、未変性状態での SDS-PAGE を行い、インキュベートした血漿中での CLU の複合体の形成の有無を確認中である。

本研究で得られた活動性結核患者血漿のバイオマーカー候補について、タンパク質の変化だけではなく、その発現メカニズムを明らかにし、多検体を定量的に測定する必要がある。現在は、ELISA 法によるタンパク質定量を行っているが、試料サンプルを多量に必要とするため、多検体において正確に定量する別の手法の開発が急務である。また、実際にこれらのマーカーが利用可能かどうか、大掛かりな調査を行う必要がある。現在までにベトナム人検体 550 例が収集済みである。疾病の進行におけるタンパク質発現の動態解析や有効なバイオマーカーの探索は結核の病態を理解する上で必要であり、新規の効果的な治療やワクチン開発にとって有用である。

Table 1

Comparison between non-stimulated and stimulated conditions				
		$P < 0.02$	$0.02 \leq P < 0.05$	$0.05 \leq P < 0.10$
TB Patients	Nil- <i>Mtb</i> antigens	0	2	2
	Nil-Mitogen	3	5	11
Healthy Controls	Nil- <i>Mtb</i> antigens	0	1	13
	Nil-Mitogen	2	83	8
Comparison between healthy control subjects and active TB patients				
Healthy Controls -TB Patients		18	12	24

Table 2

Comparison between non-stimulated and stimulated conditions										
Stimulant	Number	PDQ SSP No.	Swiss-Plot	Protein name	Mascot search score	Da	pI	<i>P</i> value	+/- ^a	
Mitogen	1	T3601	C1S_HUMAN	Complement-C1S	169	76684	4.86	0.0917	-	
	2	T3403	KNG1_HUMAN	Kininogen-1	139	71957	6.34	0.0156	+	
	3	T3105	ZA2G_HUMAN	Zinc- α -2-glycoprotein	45	33872	5.57	0.0866	-	
	4	T4512	A1BG_HUMAN	α -1B-glycoprotein	76	54273	5.58	0.0061	-	
<i>Mtb</i> antigens	5	T4203	CLUS_HUMAN	Clusterin	47	52495	5.89	0.0640 ^c	+	
	6	T3107	CLUS_HUMAN	Clusterin	50	52495	5.89	0.0687 ^c	+	
	7	T4208	EST	Clusterin	-	52495	5.89	0.0732 ^c	+	
Comparison between healthy control subjects and active TB patients										
	Number	PDQ SSP No. ^d	Swiss-Plot	Protein name	Mascot search score	Da	pI	<i>P</i> value	+/- ^b	
	8	HT5401	VTDB_HUMAN	Vitamin D binding protein	98	52964	5.40	0.0331	+	
	9	HT2406	FETUA_HUMAN	α -2-HS-glycoprotein	75	39325	5.43	0.0097	-	
	10	HT2303	CO4A_HUMAN	Complement C4A	86	192771	6.66	0.0419	+	
	11	HT6102	RET4_HUMAN	Retinol binding protein 4	72	23010	5.76	0.0064	-	
	12	HT1012	APOC3_HUMAN	Apolipoprotein C-III	105	10852	5.23	0.0271	-	
	13	HT5303	APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV	190	45399	5.28	<0.001	-	
	14	HT1016	APOC2_HUMAN	Apolipoprotein C-II	61	11284	4.72	0.0024	-	

^a average density of the spot is higher (+) or lower (-) in the stimulated condition than in the non-stimulated condition.

^b average density of the spot is higher (+) or lower (-) in active TB patients than in healthy controls.

^c average density of three spots T4203, T3107 and T4208 (= all clusterin) was significantly higher in the *Mtb*-antigen-stimulated condition than in the non-stimulated condition ($P = 0.0014$).

^d PDQ SSP No. = PDQ software special spot number

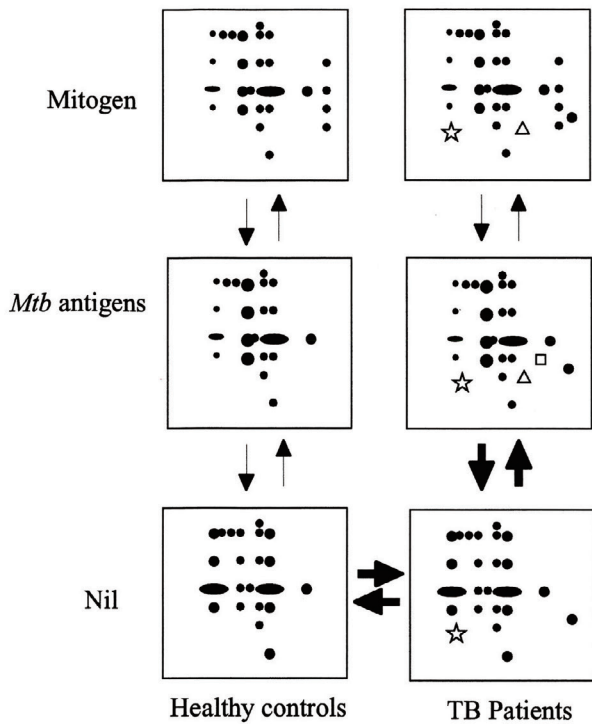


Figure 1 Schematic representation of protein expression profiles to be compared. Comparison between the presence and absence of stimuli: different spot patterns after stimulation with *Mtb* antigens in TB patients. Comparison between healthy controls and TB patients: spot patterns presumably reflect plasma proteomics between active TB patients and healthy controls.

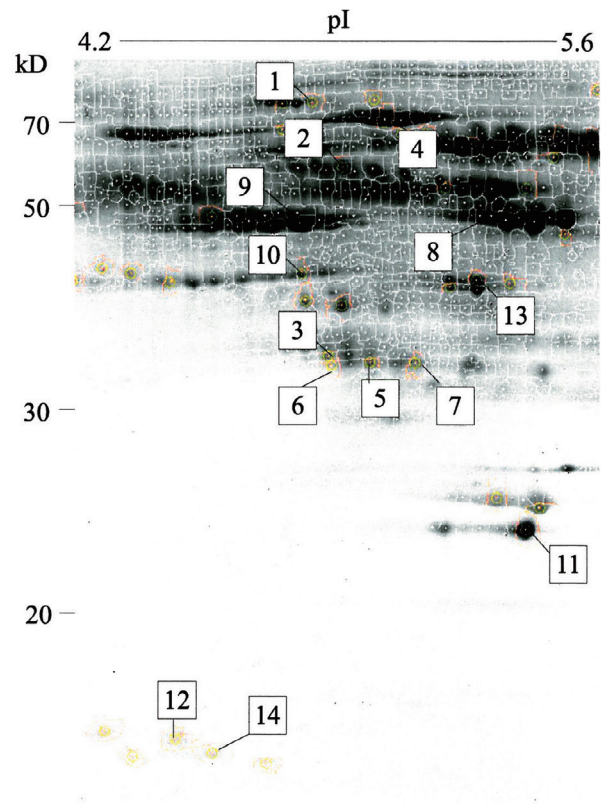


Figure 3 Representative 2D-DIGE gel image obtained from Cy2-labeled pooled samples of TB patients and healthy controls. Differentially expressed proteins that have been successfully identified by LCMS are represented on the gel using PDQuest software. Proteins are labeled with number and outlined in Table 2.

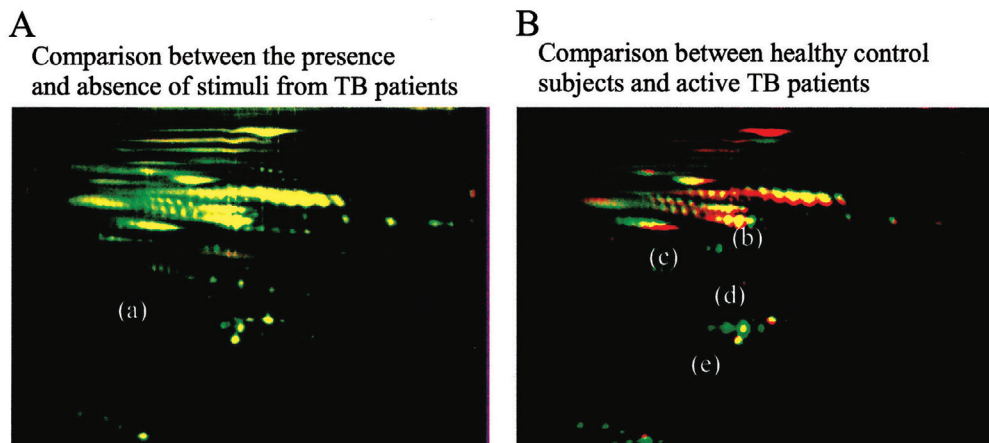


Figure 2 2D-DIGE-based protein expression analysis. Pseudo-colored images were generated using the “Multi-Channel Viewer” function of PDQuest software. A: Analysis based on difference in stimulation. Red color indicates increased proteins in supernatants from active TB patients stimulated with *Mtb* antigens. Spots (a): T3107, T4203 and T4208 corresponding to Table 2. B: Analysis based on difference in disease. Red color indicates increased proteins in supernatants from active TB patients and healthy control subjects without stimulation. Spot (b): HT5401, Spot (c): HT2406, Spot (d): HT5303, Spot (e): HT5303 corresponding to Table 2.

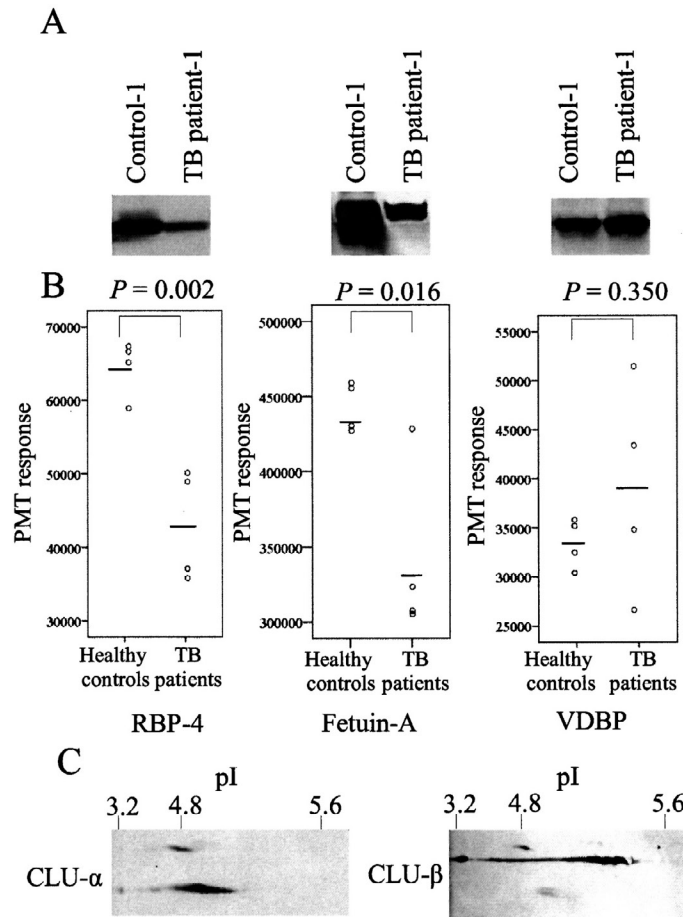


Figure 4 Samples used in proteomic analysis after removing 14 major proteins were analyzed by western blotting and protein levels of RBP-4, fetuin-A and VDBP were compared. (A) representative immunoblot of the samples from healthy control subjects (Control-1) versus TB patients (TB patient-1). (B) Band densities were quantified in TB patients ($n = 4$) and healthy control ($n = 4$). (C) two-dimensional-immunoblot of pooled samples against clusterin- α and clusterin- β .

論文審査結果要旨

田中君の博士論文が PLoS One に多少追加実験することで掲載されること
がわかったので、論文の質は保障されている。ただ、予備審査から本審査ま
での期間で全ての指摘事項がクリアされたわけではないので、その理由と今
後の研究の方針などについて説明を主査がした。

本論文は結核という人類の敵を相手にした研究で、成果は日本だけでなく
全世界、特に発展途上国において大変役に立つと期待されている。ただ、危
険度が高く、特別な場所で扱いに慣れた人が実験しないとイケない。その為、
本研究科では実験ができず、国立国際医療センターの施設で、ベトナムおよ
び日本の患者の検体を用いて実験するという変則的な研究となった。

しかし、田中君の努力と受け入れ先の好意がマッチして予想を超える成果
を挙げる事ができた。

これら一連の研究の経緯を考慮し、田中君の研究に対する真剣な姿勢、高
い技術、そして新しい結核の診断マーカーの発見という成果を評価し、3A、
合格（全員）という結論に至った。