

2014 年功労賞受賞者論文 総説

疾患プロテオーム研究は難病克服にどこまで貢献出来るか？

大西 新 ^{*1,2}, 前田忠計 ^{*3}

*E-mail: arata@resvo-inc.com
tmaeda@kitasato-u.ac.jp

¹ 北里大学理学部物理学科 : 252-0373 神奈川県相模原市南区北里 1-15-1

² 株式会社 RESVO : 143-0016 東京都大田区大森北 3-15-5-201

³ 北里大学 名誉教授 : 252-0373 神奈川県相模原市南区北里 1-15-1

(受付 2016 年 12 月 5 日, 改訂 2017 年 2 月 22 日, 受理 2017 年 2 月 27 日)

プロテオミクスは生体中のタンパク質を網羅的に測定可能にするが、これを難病研究に適用する際に考慮すべきことがある。すなわち、病態が共通するために同一難病と診断された患者群には、病因論的に複数の疾患（または「疾患サブタイプ」）が含まれているケースである。この場合、プロテオーム解析を始める前に疾患サブタイプごとに患者群を層別化する必要があるが、解析開始以前には層別化マーカーが存在しない。ニワトリが先かタマゴが先かの関係である。そのような難病の一つが統合失調症である。我々は病因が明確な統合失調症として胎児期の母体の感染症に由来する統合失調症モデル動物を作成し、その血清プロテオーム解析から統合失調症層別化マーカー候補を発見した。このマーカーは、統合失調症（自閉症も含むと予想される）の超早期リスク診断血液マーカー候補でもある。本総説ではこの発見に至った経緯や我々のアプローチ法について議論する。

1 序：プロテオミクス研究がもたらしたもの

生体が作り出すタンパク質を網羅的に解析するプロテオミクスは、ヒトゲノム解読の終了とともに大きな発展を遂げた。近年では生体が作り出す数万種類のタンパク質を人工的に合成しアレイ上に配置したプロテインチップも開発された。このプロテインチップを使うと患者一人ひとりが有する疾患特異的抗体群のプロファイリングも可能である。生体におけるタンパク質は生体機能発現と制御の中心にあるので、これらを網羅的に解析することが可能であれば、生体機能破たんによって引き起こされる疾患の詳細な理解も可能になるだろうと期待される。

今までの疾患研究では、過去の臨床的知見に基づいて合理的仮説を複数考え、それらを一つ一つ検証する形で研究を行って来た。21 世紀に入りゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクスなどのオミクス科学の進展により、hypothesis driven ではなく discovery driven の（仮説なしで発見に基づいた）研究が行えるとの主張がなされた¹⁾。オミクス科学は仮説ベースで行われていた従来の研究手法を根本的に変え、仮説を立てずとも、実験から有用な情報を取得することを可能にした。この新たな実験手法の登場で研究者が予想もしていな

かった研究成果も数多く挙げた。

プロテオミクスが強力な実験手法であることは確かだが、まだプロテオミクスの可能性の一部しか使いこなせていないのではないかと我々は考えている。「仮説なしで発見に基づいた研究」を浅くとらえると「実験研究者は膨大なデータをひたすら作り出し、それらを統計解析すると真実が見えてくるだろう」と安易に考えるような誤解を生む。しかしながら、疾患において関与するタンパク質の種類は膨大であり、どのタンパク質の変動が病態メカニズムに深く関与しているのか推定することは非常に難しい（「風が吹くと桶屋が儲かる」と同様で、大きく変動していたとしても、原因では無く結果である可能性も高いため変動だけでは発症原因や病態メカニズムを解明することは難しい）。更に、ヒトはモデル動物とは違い遺伝的背景や生活習慣が一人一人大きく違うため、患者由来の生体サンプルを用いてプロテオミクス解析を行うと、タンパク質を変動させる要因が疾患以外にも多数含まれてしまい、病態に関与するタンパク質群を絞り込み同定することは困難だと思われる。これは正に雑音の中に信号が埋もれてしまった状態である。多変量解析、スパースモデリングなどの高度な数学的手法を用いたとしても、この雑音の中から信号を抽出するのはやはり難しい。難病を対象にして真に疾患に関与するタンパ

ク質群を抽出同定するには、頭をひねる必要がある。我々は、患者由来のサンプルの多様性が雑音を生みだす要因であるのならば、サンプル均一化が雑音低減に有効だろうと考えた。

2 疾患モデル動物研究と難病

疾患モデル動物研究とは、病態の一部を実験動物によって再現しその病態メカニズムを解明する研究である。モデル動物研究はヒトからのアプローチが難しい因果関係の理解や分子レベルから生体レベルまで一貫した病態メカニズムの解明に有用であると考えられる。問題点は、モデル動物とヒトとの種差に由来する病態の違いがあるため、モデル動物の研究結果を直接ヒトへ外挿することが難しいことであるが、モデル動物を使うと患者由来のサンプルではコントロールが困難な遺伝的背景や外部環境要因の多様性を低減できる利点もある。

難病は発症メカニズムがそもそも不明確であるため、病因に基づく診断は難しい。この場合、患者の病態にもとづいて診断が行われるが、患者病態が共通していても病因論的に複数の疾患（または「疾患サブタイプ」）が一つの難病にくくられている可能性があるため、難病患者群の不均一性は高いと覚悟しておいたほうがよい。

2-1 疾患モデル動物とプロテオミクスを組み合わせた難病研究

ここで、我々が近年行った、疾患モデル動物とプロテオミクスを組み合わせた難病研究について紹介する⁶⁾。

精神・神経疾患の難病の一つである統合失調症は地域や人種を問わず人口の1%が発症する。国内においても約70万人が統合失調症に罹患しておりその内約20万人が長期入院を強いられている。しかしながら、生物学的根拠に基づいた検査方法や根本的治療方法は確立していない。統合失調症の早期治療介入は有効である²⁾から、その発症リスクを早期に発見する方法を確立すれば早期治療介入も現実化し得る。しかし、統合失調症を含む精神・神経疾患は構造化面接によって診断を行うため、精神症候が現れる前にリスクを判定することが非常に難しい。そのため、早期診断法と治療介入法の開発は困難を極めていく。

統合失調症の発症原因やそのメカニズムは詳しく分かっていないが、胎児期の母体の感染症によって発症リスクが上昇することが数多くの文献によって報告されている³⁾。(2016年開催のリオデジャネイロ五輪で騒がれたジカ熱もまた、妊婦がジカウイルスに感染することで胎児の脳神経発達が障害され、小頭症児出生のリスクが上昇する。) これらの疫学的報告において非常に興味深い点は、出生児の統合失調症発症リスクの上昇が特定のウイルスの母体感染に限定されてはおらず、様々なウイルス、細菌、寄生虫の

母体感染によってもリスクが上昇することである。すなわち、母体の強い免疫活性化そのものが出生児の統合失調症発症リスクを上昇させることを示唆している。この示唆を基に開発されたのが Maternal immune activation (MIA) モデル動物である。このモデル動物は California Institute of Technology の(故) Paul Patterson らによって最初に報告され、世界中の研究者によって検証が行われた結果、統合失調症や自閉症患者に見られる特徴に類似した病態を露呈することが明らかになっている⁴⁾。我々もまた、MIA モデルラットを作成し、その病態を検証したところ統合失調症患者に見られる病態に類似していることを確認した⁵⁾。

そこで、我々はこの MIA モデルラットを用いて統合失調症の層別化/早期診断血液マーカー探索を行い新規の血清マーカー候補を発見した⁶⁾。

2-2 MIA モデルラット血清のプロテオーム解析

MIA モデルラットは幼弱期には目立った障害は無いが成長し成熟期になると顕著な脳神経障害、免疫障害、行動障害を露呈する⁵⁾。そこで、その障害が顕著になる成熟期の MIA モデルラットの血清 (N=3) を採取し二次元電気泳動によって血清に含まれるタンパク質群を分離し統計解析 (Multiple t-test (uncorrected)) を行った。その結果、統計学的優位差 ($P < 0.05$) をもって変動しているスポットを3つ発見した。この3つの内分子量約25 k に存在した1つのスポット (Fig. 1) が質量分析計でタンパク質同定をするに十分な量があった。このスポットに含まれるタンパク質を LC/MS によって同定した結果、Igk-C (分子量; 12 k, カバー率; 100%, Mascot score; 122) であること

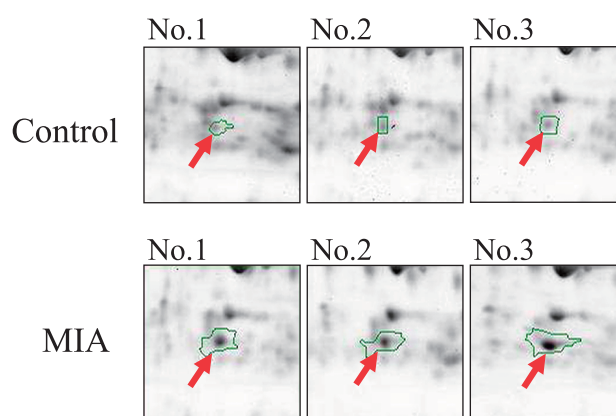


Fig. 1 The candidate two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) spots in MIA rat sera

Locally expanded 2-DE patterns in the vicinities of a spot, the volume of which varied consistently in each of the three control (upper panels) and three MIA (maternal immune activation) model rat sera (lower panels). Red arrows in the panels indicate the spots chosen as a marker candidate. Green lines in the panels indicate spot boundaries.

が明らかになった (Fig. 2). これらの結果は, MIA モデルラットの血清において Igk-C を含むタンパク質が特異的に増加していることを示している.

Igk-C の分子量は 12 k であるが, 我々がタンパク質同定したスポットの二次元電気泳動ゲル上での位置は分子量約 25 k である. この食い違いは次のように理解できる. Igk-C は免疫グロブリン κ 軽鎖の定常領域であるが, ほぼ同じ分子量の変常領域と定常領域が連結して免疫グロブリン κ 軽鎖を構成するために, 二次元電気泳動的には分子量

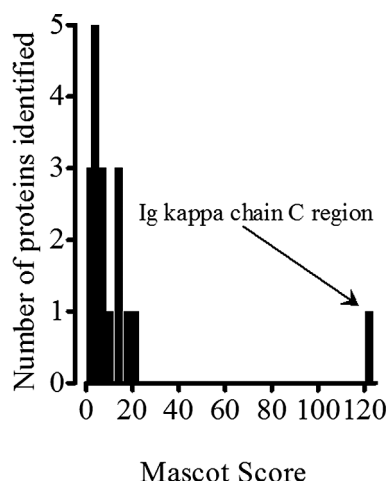


Fig. 2 Identification of the protein extracted from the candidate 2-DE spots

Mascot score distribution by MS/MS identification of the protein extracted from the candidate 2-DE spots surrounded by the green lines in Fig. 1. The protein in the spot was identified to be the Ig- κ chain C region.

24 k のタンパク質として検出される. 次に我々は免疫グロブリン κ 軽鎖を特異的に認識するポリクローナル抗体を作成し, MIA モデルラットの血清に含まれるタンパク質を Western blot 法によって調べた. その結果, MIA モデルラット由来の血清ではコントロールラット由来の血清に比べ幼弱期から成熟期まで継続的に平均約 1.5 ~ 2 倍程度の増加を確認した (Fig. 3). これらの結果から, 我々は MIA モデルラットの血清において免疫グロブリン κ 軽鎖が継続的に増加していたと結論付けた.

2-3 MIA モデル動物における実験結果のヒトへの外挿

げっ歯類において血清中の免疫グロブリン κ 軽鎖の増加は B 細胞の過活動を意味している^{7),8)}. この知見をヒトに外挿すると MIA に由来する統合失調/自閉症の患者では新生児期から発症後まで継続的に B 細胞の過活動が起こっていると推定される. ヒトの場合, B 細胞が過活動になった場合, Free Ig κ light chain (κ FLC) とそのアイソフォームである Free Ig λ light chain (λ FLC) の産生が増加する⁹⁾. ヒト血清サンプルは研究用に市販されているが, 我々はその中から孤発性統合失調症患者血清サンプルを購入した. 購入にあたり, 患者ドナーについては, B 細胞が活性化する自己免疫疾患やガンに罹患していないケースに絞り込み, これに加えて健常人血清をコントロールサンプルとして選択購入した. 購入した血清サンプルの κ FLC と λ FLC 濃度を測定した結果, 患者サンプルにおいて κ FLC と λ FLC の増加が観察された (Fig. 4). 患者サンプルと MIA モデル動物の実験結果から, 血中における κ FLC と λ FLC は統合

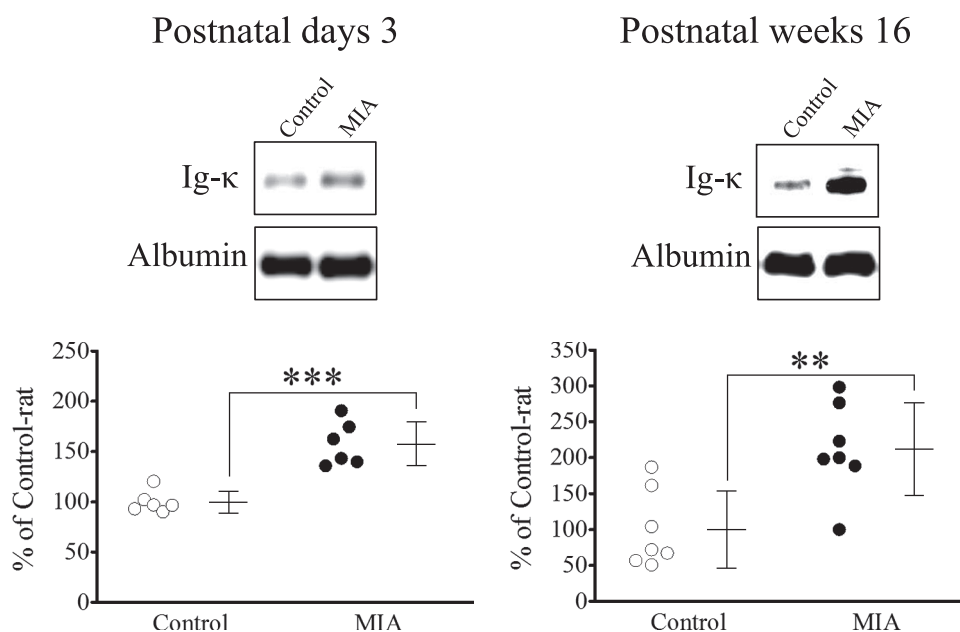


Fig. 3 Serum Ig- κ light chain Western blot analysis of MIA rat

Serum Ig- κ light chain of MIA rat increased as early as from postnatal days 3 (left panel) to matured postnatal weeks 16 (right panel).

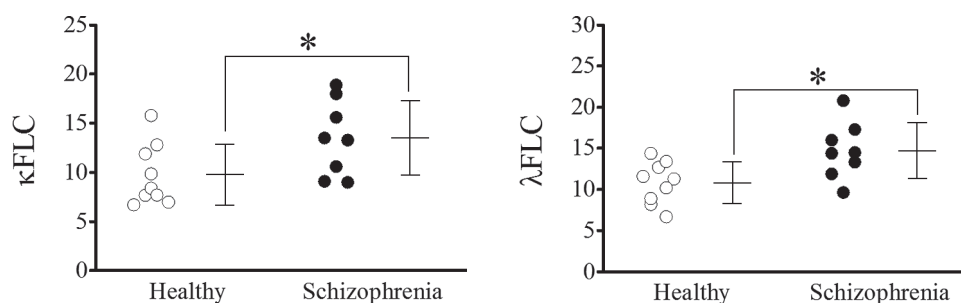


Fig. 4 Free Ig light chains (FLC) in sporadic schizophrenia patient sera

Both κ FLC and λ FLC concentrations increased in sporadic schizophrenia patient sera. Numbers of sera samples of patients and healthy controls are N=8 and N=9, respectively.

失調症 / 自閉症の層別化や超早期リスク診断に有用である可能性が示唆される。

3 モデル動物の知見をヒトへ外挿する研究手法の利点と問題点

統合失調症は生物学的根拠に基づいた診断手法が確立していないため、患者血液サンプルのプロテオーム解析が種々行われてきたが^{10),11)}、血液中の κ/λ FLCと統合失調症の関係については本研究が初めての報告である。患者由来のサンプルでは遺伝的背景や環境的要因を均一化することが難しいが、モデル動物由来のサンプルでは均一化することが可能である。この均一化によって患者由来サンプルでは発見されなかったマーカー分子を発見できる可能性が上がる。

疾患モデル動物には薬理モデルや遺伝子改変モデルなど様々な存在するが、モデル動物の多くはヒトで見られる疾患の一部分を切り取って再現したものが多い。ヒト疾患の多くは遺伝的要因と環境的要因の両者が関与する多因子疾患である。上記の疾患モデル動物は、ヒトの当該疾患の一部分を切り取って再現したものと理解するのが妥当である。ヒトの当該疾患が難病であり、病因論的に複数の疾患サブタイプを含んでいる場合、モデル動物のプロテオーム解析から得られたマーカータンパク質は、疾患サブタイプごとに患者群を層別化するマーカーとして考えるのがよい。そのマーカーが患者群層別化マーカーとして有効であれば、疾患サブタイプごとに治療法を開発できるだろう。難病患者群の中で、疾患サブタイプごとの患者数は大小さまざまだろう。患者数の少ない疾患サブタイプに対して疾患モデル動物を作成した場合、発見されたマーカータンパク質をもとに層別化できる患者数は小さくなる。

モデル動物を用いた研究において最も問題になるのはヒトとの種差である。げっ歯類モデルとヒトでは遺伝子の相関性は平均して約85%であることから、げっ歯類疾患モデルのプロテオームの解析結果をそのままヒトへ外挿することは難しい。

上記の様にモデル動物のプロテオーム解析の結果をヒトへ外挿する研究手法には幾つかの問題点がある。この問題点を解決するには以下の2点について考慮する必要がある。1) 疾患モデルを選定する際は出来る限り、ターゲットとする疾患と相関性が高いモデルを選ぶ。2) モデル動物で発見されたマーカー候補タンパク質が生体内でどの様に働いているか理解し、そのメカニズムを考慮してヒトへ外挿する。この2つの点について考慮し研究を進めることで、患者サンプルのプロテオーム解析では発見できなかった知見と洞察をモデル動物から得ることが可能になるだろう。

4 結語

プロテオミクスは過去の知見を基にした仮説ベースによる研究では発見不能の知見を得て、discovery drivenの研究を可能にした。しかし、様々な要因によって起こるタンパク質変動も観測するため、雑音が増えてしまう問題点もある。雑音を低減し、この有用な信号を重点的に抽出するためには、モデル動物や患者サンプルから得られるデータをもとに「賢い洞察」が必要になる。すなわち、観察されたプロテオーム変動を基にして、生体内で起こっている疾患関連現象を推定し作業仮説を立て仮説ベースの研究を行うことも重要だと筆者たちは考えている。Discovery drivenのプロテオーム研究であっても、「賢い洞察」にもとづくhypothesisが不必要になるわけではない。

謝辞

日本プロテオーム学会和文誌「和名：日本プロテオーム学会誌（英名：Proteome Letters）」に執筆の機会を与えてくださった編集委員長および2名の副委員長に感謝します。

利益相反

筆頭著者の大西は（株）RESVOの株式5%以上を所有しています。

文 献

- 1) Issa NT, Byers SW, Dakshanamurthy S. Big data: the next frontier for innovation in therapeutics and healthcare. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2014;7:293–298.
- 2) Cheng SC, Schepp KG. Early Intervention in Schizophrenia: A Literature Review. *Arch Psychiatr Nurs*. 2016;30:774–781.
- 3) Estes ML, McAllister AK. Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. *Science*. 2016;353:772–777.
- 4) Patterson PH. Immune involvement in schizophrenia and autism: etiology, pathology and animal models. *Behav Brain Res*. 2009;204:313–321.
- 5) Oh-Nishi A, Nagai Y, Minamimoto T, Suhara T. Neuronal dysfunction in cingulate area in maternal immune activation rodent model of schizophrenia. *Society for Neuroscience Abstract*. 2011:900.05.
- 6) Oh-Nishi A, Koga K, Maeda T, Suhara T. A possible serologic biomarker for maternal immune activation-associated neurodevelopmental disorders found in the rat models. *Neurosci Res*. 2016;113:67–70.
- 7) Davies DR, Padlan EA, Segal DM. Three-dimensional structure of immunoglobulins. *Annu Rev Biochem*. 1975;44:639–667.
- 8) Redegeld FA, van der Heijden MW, Kool M, Heijdra BM, Garssen J, Kraneveld AD, van Loveren H, Roholl P, Saito T, Verbeek JS, Claassens J, Koster AS, Nijkamp FP. Immunoglobulin-free light chains elicit immediate hypersensitivity-like responses. *Nat Med*. 2002;8:694–701.
- 9) Nakano T, Matsui M, Inoue I, Awata T, Katayama S, Murakoshi T. Free immunoglobulin light chain: its biology and implications in diseases. *Clin Chim Acta*. 2011;412:843–849.
- 10) Sabherwal S, English JA, Focking M, Cagney G, Cotter DR. Blood biomarker discovery in drug-free schizophrenia: the contribution of proteomics and multiplex immunoassays. *Expert Rev Proteomics*. 2016;13:1141–1155.
- 11) Martins-de-Souza D, Guest PC, Rahmoune H, Bahn S. Proteomic approaches to unravel the complexity of schizophrenia. *Expert Rev Proteomics*. 2012;9:97–108.

How Much Can the Disease Proteomics Contribute for Overcoming Intractable Diseases?

Arata Oh-Nishi*^{1,2}, Tadakazu Maeda*³

*E-mail: arata@resvo-inc.com

tmaeda@kitasato-u.ac.jp

¹Department of Physics, Kitasato University School of Science, Kitasato 1-15-1, Minami-ku, Sagamihara, Kanagawa 252-0373, Japan

²RESVO. Inc., Omorikita 3-15-5-201, Ota-ku, Tokyo 143-0016, Japan

³Professor Emeritus, Kitasato University, Kitasato 1-15-1, Minami-ku, Sagamihara, Kanagawa 252-0373, Japan

(Received: December 5, 2016; Revised: February 22, 2017; Accepted: February 27, 2017)

Proteomics can comprehensively analyze proteins in our body, but we have to carefully think about how to apply proteomics technologies to intractable diseases. Even when a group of patients showing common pathologies are diagnosed to be suffering from the same intractable disease, the disease might be composed of etiologically different diseases, or disease subtypes. In this case, stratification of the patient group is necessary before we begin using proteomics technologies to search for the diagnosis maker, but patient stratification is almost impossible without any diagnosis marker in hand. We are stuck in front of the “Chicken and Egg” problem. Schizophrenia is one of such intractable diseases, and we recently could successfully sidestep the “Chicken and Egg” problem by using a rat model of schizophrenia. The model rats we used had been delivered from immunologically activated rats during their pregnancy. Serum proteome analysis of the model rats let us find a stratification marker candidate, which would also be an early risk maker for schizophrenia as well as autism. In this paper, we give brief explanation on the combined use of serum proteome analyses of the schizophrenia model rat and patient for our finding a serum biomarker of the disease.

Keywords: biomarker; intractable disease; maternal immune activation (MIA); MIA rodent model; proteomics; schizophrenia.