

自己抗体解析のためのプロテインアレイ開発

— 生体防御系を利用した総合的疾患診断に向けて —

川上 和孝¹、五島 直樹^{2*}

我々はポストヒトゲノム研究としてプロテオミクス研究を推進し、ヒトタンパク質の機能解析、タンパク質相互作用、タンパク質構造解析等を大規模に行うための技術基盤の整備を行ってきた。これまでに開発したヒトタンパク質発現リソース、タンパク質発現技術を利用し、プロテインアレイを作製することで血清中に含まれている自己抗体のプロファイリングを世界で最も正確に行うことができる。生体の異常に敏感に応答する生体防御システムを、疾患の検出に利用することは非常に理にかなっていると考えられる。我々が開発するプロテインアレイは生体防御システムを利用した早期診断を可能にし、安全・安心な国民生活を実現する。

キーワード: 自己抗体、プロテインアレイ、ヒトタンパク質、生体防御システム、抗原、診断、バイオマーカー

Development of a protein array for autoantibody profiling of blood

– Comprehensive disease diagnosis using the body's defense system –

Yoshitaka KAWAKAMI¹ and Naoki GOSHIMA^{2*}

We have performed functional proteomics on a large scale in the context of post-human genome research. We have also developed infrastructure for the analysis of protein functions, protein-protein interactions, and human protein structures. An accurate method for profiling autoantibodies in serum is developed using human protein expression resources and protein expression techniques. The human biological defense system responds to abnormalities with extraordinary sensitivity. Hence, this system is an effective tool for detecting human diseases at an early stage. Health safety and security can be achieved by establishing an early diagnostic method using the biological defense system and our protein array.

Keywords: Autoantibody, protein array, human protein, body's defense system, antigens, diagnosis, biomarker

1 緒言

疾患を発症する前または初期段階で診断できること、そして一つの検査でより多くの健康情報が得られる総合的診断を実現することは、安全・安心な国民生活を実現する上で極めて重要な課題である。この研究では、血液1滴に含まれている自己抗体の種類や量を分析することによって、これらの目的を達成することを目指す。本来、抗体は外来の細菌やウイルス等から自らを防御するために高等生物が進化的に獲得した生体防御システムである。この抗体は外来の抗原だけでなく、疾患による過剰なタンパク質の産生や細胞からのタンパク質の異常な放出に伴って、自己のタンパク質に対しても自己抗体を産生することが知られている。生体の異常に敏感に応答する生体防御システムを、疾患の検出に利用することは非常に理にかなっていると考えられる。特に、自己免疫疾患は自己に対する細胞や組織を攻撃する抗体の産生が原因となっておこる疾患であるため、自己抗体は疾患

マーカーであると同時に疾患原因でもある。本来なら、自己免疫疾患は自己抗体の検出によって発症前診断が可能であり、早期治療が可能で疾患である。しかし、実際は自己抗体の網羅的検査が確立されておらず、自己免疫疾患の症状が現れてから病院に行くケースが多くなっている。また、自己抗体の関与が示唆される難治性疾患も多数あり、網羅的な自己抗体の検出システムの開発は極めて重要である。糖尿病、がん、アルツハイマー、リュウマチ、拡張型心筋症等の疾患では、疾患マーカーとして自己抗体が利用できることを報告する論文も多くある^[1]。我々はこれまでに開発してきた世界最大のヒトタンパク質発現リソースおよびヒトタンパク質合成技術を駆使して抗原タンパク質を調製し、網羅的な自己抗体の検出システムの開発および自己抗体と疾患の関連付けを行ってきた。このように健康に密接に関わり個人ごとに異なる血液中の自己抗体を網羅的に解析(プロファイリング)する技術開発をさらに進めたいと考えている。

1 一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム 〒135-8073 江東区青海 2-4-32 TIME24 ビル 10 階、2 産業技術総合研究所 創薬分子プロファイリング研究センター 〒135-0064 江東区青海 2-4-7

1. Japan Biological Informatics Consortium TIME24 Bldg. 10F, 2-4-32 Aomi, Koto-ku 135-8073, Japan, 2. Molecular Profiling Research Center for Drug Discovery, AIST 2-4-7 Aomi, Koto-ku 135-0064, Japan * E-mail: n-goshima@aist.go.jp

Original manuscript received July 17, 2013, Revisions received January 27, 2014, Accepted January 27, 2014

2 ヒトタンパク質発現リソースの構築とその利用

1998年から開始された通商産業省（現経済産業省）のヒト完全長 cDNA プロジェクトを基盤として、我々は 2000 年から NEDO タンパク質機能解析プロジェクトにおいて、(1) ヒトタンパク質発現リソース (HUPEX: Human Proteome Expression-resource)、(2) ハイスループットタンパク質合成技術、(3) 発現リソースデータベース (HGPD: Human Gene and Protein Database) の整備をスタートさせた。当時、ゲノム DNA 配列を解読するためのヒトゲノム計画が国際的に進められていたが、日本は来るべきプロテオミクスの時代を先取りして、ヒトタンパク質の研究環境の整備を行い、ヒトタンパク質発現リソースの構築、データベース構築を行った^[2]^[3]。国家プロジェクトとしてヒトタンパク質の機能解析、タンパク質相互作用、タンパク質構造解析等を大規模に行うための技術基盤の整備を行った。その結果、ヒトタンパク質発現リソースはさまざまな国家プロジェクト研究、企業との共同研究、研究機関や大学とのアカデミックな共同研究等において利用され、それぞれの分野で大きな成果を生んでいる。その代表的成果が京都大学 iPS 細胞研究所の山中伸弥所長との共同研究 (JST 山中 iPS 細胞特別プロジェクト) であり、新しい iPS 細胞誘導促進遺伝子 Glis1 の発見につながった^[4]。さらに、岐阜大学医学部との共同研究では抜歯した歯の中にある歯髄細胞から高効率に iPS 細胞を誘導促進する因子の発見、慶応大学医学部との共同研究では心臓の線維芽細胞から心筋細胞を作り出すダイレクトリプログラミング促進因子の発見等、再生医療に役立つ因子探索において数々の成果を生んでいる。また、創薬スクリーニング系としてタンパク質相互作用の *in vitro* 可視化技術の開発、質量分析機による定量プロテオミクスのための標準タンパク質の生産等、それぞれの分野で大きな成果を生んでいる。こうした研究成果は、当初のヒトタンパク質リソース整備の構想の中で、リソースの活用として期待されていたものであった。これまでに我々が構築してきたヒトタンパク質リソース技術は、基礎的また産業的プロテオーム研究が円滑に進行することを支援するためのものである。しかし、このように一つの領域を究めてゆくと、当初は予想していなかった新しい視界が開けてくることがある。我々はプロテオーム領域の山を登って来て、振り返ったとき、プロテオームを構成するタンパク質群を抗原として考えると網羅的な抗体領域を調べることができると気付いたのである。図 1 に示すようにプロテオームからイムノーム（免疫系の全体）を調べることができると考えたのである（抗原がすべてタンパク質ではないが、多くの割合を占めている）。すなわち、ヒトタンパク質発現リソースを活用して血液中の自己抗体を網羅的に解析し、診断に利用するというアイデア（図 2）は、当初、我々

は予想をしていなかったことである。しかし、我々は世界のどの研究者よりも多くのヒトタンパク質を抗原として利用できる、それを用いて血清中に抗体が存在するか否かを調べることが可能である。血清中の自己抗体を診断に利用するアイデア自体は、多くの研究者が論文に発表している^[1]。しかし、抗体を検出するための抗原を調製することが困難であったため、これまでは網羅的に自己抗体を解析することは困難であった。現在、我々は HUPEX を利用することで血清中に含まれている自己抗体のプロファイリングを世界で最も正確に行うことができる。自己抗体プロファイリングを実現するためには、単にヒトタンパク質発現リソースだけではなく、網羅的なタンパク質発現技術、タンパク質のアレイ化技術、抗体の検出方法の確立が必要である。これらの詳細について以下の項目で述べる。

3 自己抗体のプロファイリングを可能とするプロテインアレイの開発

3.1 網羅的なヒトプロテオーム発現リソースとタンパク質発現技術

我々は、汎用的クローニングシステムである Gateway クローニング技術を導入し、cDNA の Open Reading Frame (ORF) の両端に部位特異的組換え配列を付加したプラスミド DNA (エントリークローン) を作製して、タンパク質発現リソースを構築した^[2]。Gateway クローニング技術は試験管内で組換え酵素によって部位特異的 DNA 組換えを行うことにより、エントリークローンと発現ベクター (デスティネーションベクター) を混合するだけで発現クローンを作製することができ、ハイスループットなタンパク質発現を行う際には最適な DNA 組換え技術である^[5]。このリソースはヒト遺伝子の約 80 % をカバーする世界最大のタンパク質発現リソースであり^[2]、HUPEX と命名した。エントリークローンは、一つの cDNA に対して C 末端がネイティブタンパク質と同じアミノ酸配列を合成可能なエントリークローン (N-type) と C 末端にタグを融合することができるようにストップコドン

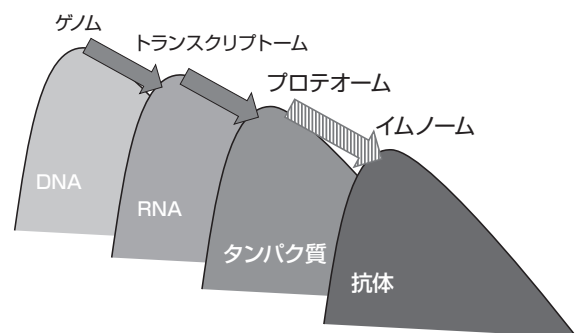


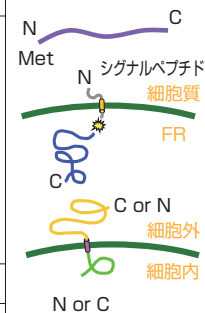
図 1 プロテオームからイムノームへ

ンスコドンに変えたエンタリークローン (F-type) の 2 種類を作製している^[6]。エンタリークローンの ORF のタイプは、遺伝子の ORF 全体を持つ全長 ORF 型、全長 ORF からシグナルペプチドを除去したプロセッシング ORF 型、1 回膜貫通ドメインを持つ膜タンパク質の細胞外ドメインまたは細胞内ドメインを発現可能なドメイン ORF 型等、さまざまなタイプのエンタリークローンを作製しており、研究目的に応じてこれらのリソースを自由に選択することができる。また、あらゆるタンパク質合成系でタンパク質合成が可能であるために、ORF の 5' 上流に大腸菌発現用の SD 配列や真核細胞発現用の Kozak 配列を付加している。これらのタンパク質発現リソースは、N-type と F-type のエンタリークローンを整備し、既知クローンおよび未知クローン、スプライシングバリエーションクローンを含めて約 60,000 種類を作製している(表 1)。これらのエンタリークローンを網羅的なプロテオーム研究に活用するため、各遺伝子に対して最長の ORF を持つクローンを代表クローンとして選定し、さらにタンパク質の機能(転写因子群、GPCR 群、キナーゼ群、未知遺伝子群等)によって機能分類し、ヒト遺伝子の代表クローン約 20,000 種類を研究に使用している。

ヒトタンパク質を使用して網羅的なプロテオーム研究を行

表 1 Gateway エンタリークローンの作製数

Type	確定エンタリークローン数	
	C 末 Stop 型	C 末 Fusion 型
全長 ORF 型	18,744	28,386
プロセッシング ORF 型	4,068	2,863
ドメイン ORF 型	2,719	-
Total	25,531	31,249
	56,780	



うためには、ヒトタンパク質発現リソースを構築するだけではなく、網羅的にタンパク質を合成するための技術が必要である。我々がタンパク質発現リソースの構築を開始した 2000 年頃に、時を同じくしてコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を愛媛大学の遠藤弥重太教授らが開発したのである^[7]。そこで、我々は、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を利用して、ハイスループットなタンパク質合成を行うための技術開発を行った(図 3)。コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系は、タンパク質合成の成功率、合成タンパク質の可溶性率、合成タンパク質の活性保有率等の点において、大腸菌や真核細

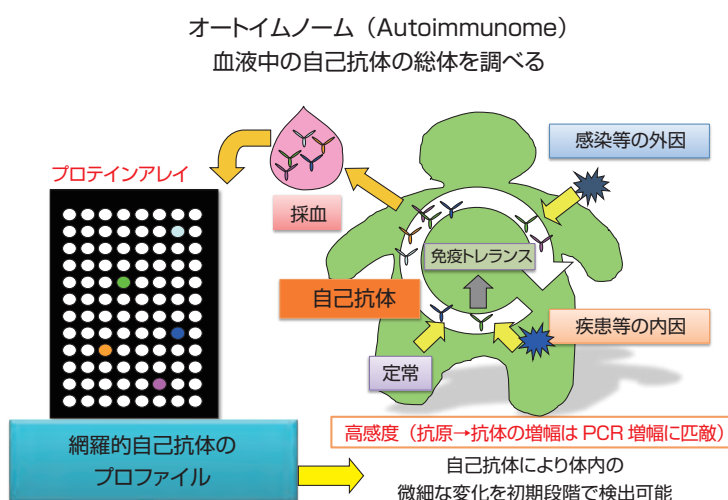


図 2 自己抗体と疾患

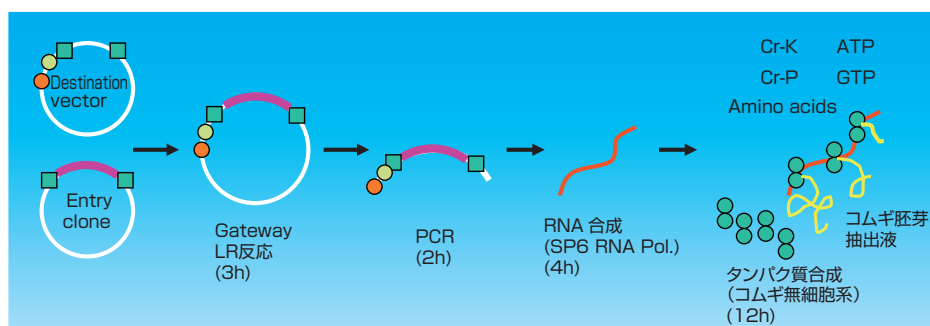


図 3 Gateway エンタリークローンを利用したコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系

注) 実験医学 Vol.23 No.4 (増刊) 株羊土社 第 3 章 3「ヒトタンパク質の網羅的発現のための基盤構築」五島直樹 他 図 6 を改変

胞を用いた他のタンパク質合成系に比べて優れており、そして、98 % 以上の割合でタンパク質を合成することができる¹⁶⁾。DNA 構築からタンパク質合成までの全反応を *in vitro* 系 (96 穴、もしくは 384 穴 plate) で行い、各反応済みの溶液を次の反応溶液に移すだけの分注操作のみ行えるように反応の最適化を行った。その結果、タンパク質合成の全工程を 1 週間で完了することが可能な技術を開発した。また、タンパク質合成の工程で作製される LR 産物、PCR 産物、mRNA は、-80 °C で長期間保存することができる。そして、同一タンパク質を再合成する場合は、保存しておいた mRNA を使用することによって、18 時間後にはタンパク質を再合成することができる。このタンパク質合成技術と分注機器を組み合わせることにより、約 20,000 種類のタンパク質を一度に合成し、すべてのタンパク質をアレイ化技術によって同時にアッセイ系に利用することができるようになった。

エントリークローンの遺伝子情報、クローンの取得状況、コムギ胚芽無細胞系や大腸菌系のタンパク質発現の結果については、Human Gene and Protein Database (HGPD: <http://www.HGPD.jp/>) に格納されており、自由に検索可能である。また、作製されたエントリークローンは、製品評価技術基盤機構(NITE) 生物遺伝資源部門(NBRC) (<http://www.nbrc.nite.go.jp/hgentry.html>) から入手できる¹³⁾¹⁸⁾。

3.2 タンパク質のアレイ化技術の開発

プロテインアレイ技術は、タンパク質-タンパク質、タンパク質-低分子、タンパク質-核酸等の相互作用を網羅的に解析する上で、また酵素-基質タンパク質の解析においても有用である。これまでのプロテインアレイでは、ニトロセルロース膜のシートや表面にニトロセルロースがコートされているか、特殊処理されたスライドガラスの表面上にタンパク質を

固定する方法がとられている。固定化方法の特徴から、タンパク質は基質表面上に乾燥状態で固定されることから、立体構造は保たれていない。そのため、従来のプロテインアレイでは、搭載されているタンパク質の機能を解析することはできない。我々は、構築したヒトタンパク質発現リソースおよびハイスループットタンパク質合成技術を生かし、アレイ上で生体反応を再現し、解析することを目指している。そのためにはアレイ上のタンパク質がその機能を発揮する立体構造を維持した状態でタンパク質をアレイ基板上に固定する工夫が必要である。

我々はタンパク質の立体構造と機能が保持されているプロテインアレイの開発を行った。まず、磁性ビーズを用いたタンパク質精製技術に着目した。もともと我々のタンパク質合成技術を用いれば、タンパク質にさまざまなタグを付加して合成することができる。タグを付けて合成した目的タンパク質を、リガンドが付いている磁性ビーズを使用して精製することは容易なことである。まず、目的タンパク質を合成時の立体構造を維持した状態で磁性ビーズに結合させる。通常では、磁性ビーズに結合させたタンパク質を溶出し、回収して利用するが、我々は磁性ビーズにタンパク質を結合させた状態でアレイ化する方法を考えた。そこで、特殊な磁性ビーズ結合用のウェルプレートの開発を行い、ハイスループットタンパク質合成技術と磁性ビーズを用いたタンパク質精製かつアレイ化技術を組み合わせ、タンパク質の立体構造を保ちながらアレイ化する技術を開発した(図 4A)。このようにヒトプロテオームに対して俯瞰的なタンパク質機能解析が可能なタンパク質を搭載したプロテインアレイを、「プロテインアクティブアレイ」と命名した(図 4B)。

プロテインアクティブアレイに使用する磁性ビーズを選定す

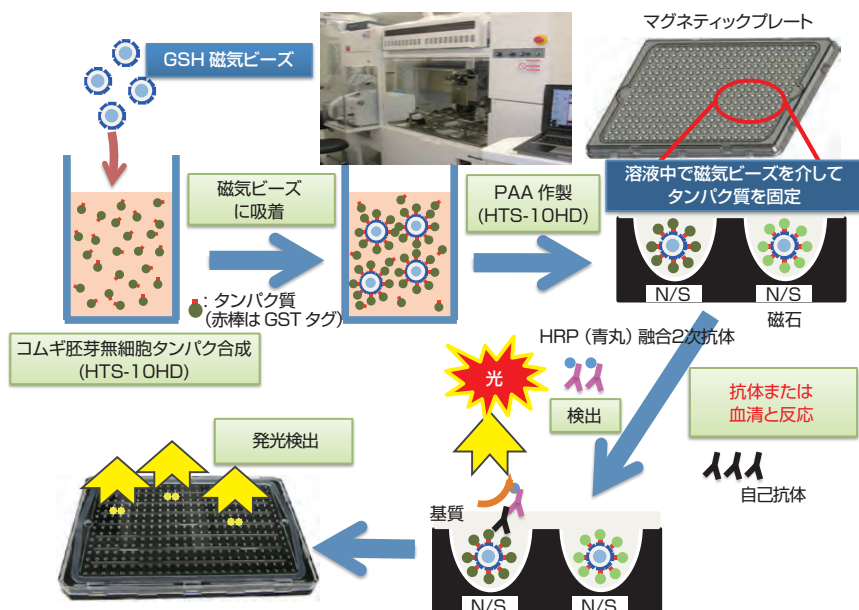


図 4A 磁性ビーズによるプロテインアクティブアレイ作製と抗体検出

コムギ胚芽無細胞系で合成した GST 融合目的タンパク質を、GSH 磁気ビーズ表面に捕捉し、この懸濁液をプレートの底に磁石を持つマグネティックプレート (オリジナル) に分注し、非吸着画分を洗浄して除く。このようにして、溶液中で磁気ビーズを介してタンパク質を固定したプロテインアクティブアレイを作製する。プロテインアクティブアレイに抗体 (Y) または血清を添加し、アレイ上のタンパク質に結合させ、結合した抗体を HRP 融合 2 次抗体によって化学発光によって検出する。

注) 新機能抗体開発ハンドブック (株) エヌ・ティー・エス 第一章 5 節「アレイを用いた自己抗体解析」五島直樹 図 3 を改変

際には、①磁性ビーズのリガンドの種類、②ビーズの素材とサイズ、③目的タンパク質の吸着量、④非特異的吸着、⑤懸濁液の分注方法等の観点から各種磁性ビーズを比較検討する必要がある。一般的には、His タグや GST タグ、Streptavidin タグ吸着用磁性ビーズ等が使用されている。磁性ビーズのリガンドは、タンパク質合成に活性を持った発現タンパク質が得られやすいという観点で 5' FLAG-GST タグを使用していることから、GST タグ吸着用磁性ビーズを選定した。そして、先ほどあげた②から⑤の観点を踏まえて、Promega 社の MagneGST Protein Purification System の Glutathione-Particles を選定した。

プロテインアクティブアレイを作製する際に、発現タンパク質が結合した磁性ビーズを固定することができ、洗浄や共通試薬の供給時には分注機等を使用しなくてもよい特殊なウェルプレートが必要となる。そこで、我々は、ウェル下部に磁石が内蔵されており、磁力によって磁性ビーズが強力にウェルのボトムに強力に結合するようにウェル底の厚さを極限まで薄くしたプロテインアクティブアレイ用のウェルプレートを開発した。通常、ELISA 等のアッセイでは、各ウェルが一つ一つ独立したプレートを使用するが、磁性ビーズアレイ用のウェルプレートでは、ウェルが一つずつ独立はしているが、血清を希釈した反応溶液がウェル間で隔たれることなく反応させるように設計した。そして、血清サンプル等の取扱時のバイオハザードを防ぐことができ、さらに、少量の均一溶液で反応させることのできる専用のカバープレートの開発も行った。このカバープレートを装着することにより、シリンジを使用して微量な反応液を磁気ビーズ表面の目的タンパク質に満たすことができるので、血清サンプルを開放系ではなく閉鎖系で扱うことができる特徴を持っている。

以上のようなデバイスの工夫によってプロテインアクティブアレイの作製工程は非常にシンプルで短時間に作製可能である。まず、96 ウェルプレートを使用したコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系によって合成したタンパク質に磁性ビーズを加え、磁性ビーズ表面にタンパク質を結合させる。そして、プロテインアクティブアレイ用ウェルプレートにタンパク質が結合した磁性ビーズ懸濁液を分注し、磁性ビーズを介して磁力でタンパク質をウェルプレートに結合させ、目的タンパク質のアレイ化を行う。長期保存の場合には、保存液を加えて-80℃で保存する。保存実験の結果、上記の保存条件によって6か月間は品質を保つことができることが確認されている。

3.3 プロテインアクティブアレイの検出方法の確立

プロテインアクティブアレイのアッセイは、最初のプローブ（ヒトのタンパク質との結合を見ようとする血清、低分子化合物、タンパク質等）の反応から検出までの工程を約8時間で完了することができる。また、1日の処理可能なサンプル数は、4サンプル/人となっている。検出には、蛍光色素がラベルされた2次抗体や、発光検出のために HRP ラベルされた2次抗体を使用している。検出は市販の化学発光画像検出器や蛍光画像検出器等、ウェスタンブロットティング画像を取得可能な機器を利用することができる。プローブおよび反応溶液の洗浄工程には、送液ポンプを使用しており、将来的には自動化も可能である。

3.4 プロテインアクティブアレイのスクリーニング方法の確立

我々は、タンパク質合成技術と分注機器を組み合わせることにより、約20,000種類のタンパク質を短期間に合成することができる。この特徴を生かして効率的かつ経済的にタンパク質をスクリーニングするためには、プロテインアクティ

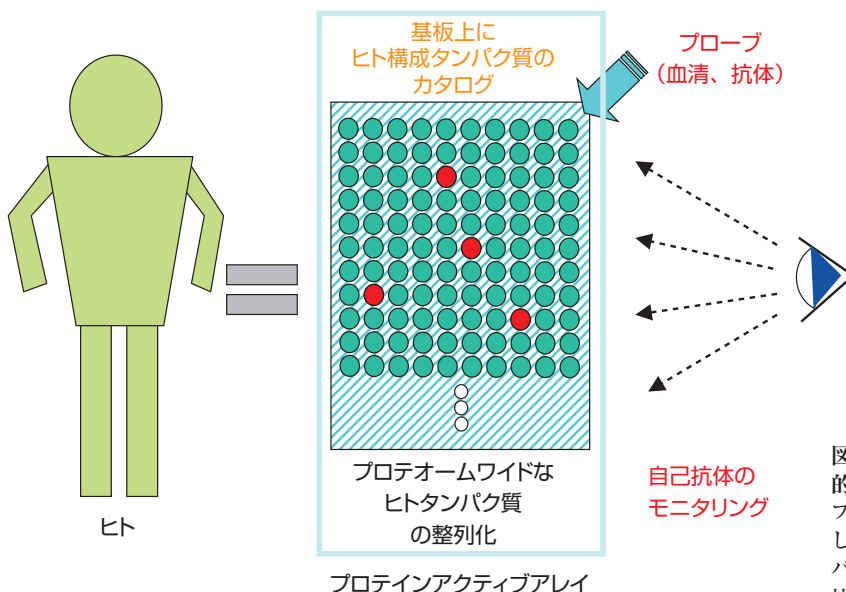
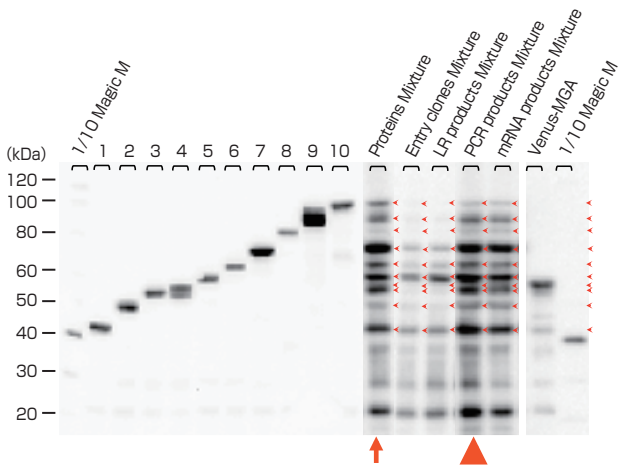


図 4B プロテインアクティブアレイによる俯瞰的解析
 プロテオームワイドなタンパク質を基板上に整列化し、プローブとなる血清や抗体を添加し、ヒトタンパク質に対する抗体の結合を俯瞰的に調べ、自己抗体のモニタリングを行う。

ブアレイの高密度化またはスクリーニングの効率化が必要である。個別に発現した約 20,000 種類のタンパク質を使用してプロテインアレイを作製し、抗原同定を行うことは労力とコストがかかり、多数サンプルの測定および実用的使用の上で支障が生じる。そこで、10 種類のタンパク質混合物を使用してアレイを作製して 1 次スクリーニングを行い、ヒットが含まれているタンパク質混合物のみを使って 2 次スクリーニングを行うことで、労力とコストを 10 分の 1 程度に減少できると考えた。

10 種類のタンパク質混合物の作製方法は何種類も考えられる。単純に 10 種類のタンパク質をそれぞれ個別に合成し、出来上がった個別のタンパク質を混合するという方法は、労力とコストがかかる。そこで、我々は 10 種類のタンパク質の共発現を行う上で、タンパク質合成のどの過程で 10 種類の一つにすることが可能なかを検討した。上述した我々のタンパク質合成システム (図 3) において、各反応過程の Entry clones、LR 反応産物、PCR 産物、mRNA をそれぞれ 10 種類混合して、タンパク質合成を行った。得られた発現タンパク質を SDS-PAGE 法で分離して、Western Blotting 法で検出を行った。Western Blotting は、抗体に Anti-GST HRP-Linked mouse mono Ab (NACALAI)、1.0 % SKIM MILK in PBST に 5000 倍希釈し、抗体反応を行い ECL plus (GE Healthcare) により 5 分間反応させて Fluor-S MAX (BIO-RAD) で化学発光検出を行った。



Sample no.	ID	5SG(STOP)	FLJ No	ORF Len (bp)	PCR product (bp)	MW(kDa)	Native 型 Entry を入れた場合発現
1	TEST0003	test clone No.56	FLJ21903	378	3105	14.7	44.4
2	TEST0001	test clone No.5	FLJ20819	624	3351	23.5	53.2
3	TEST0011	EGFP		720	3447	26.9	56.7
4	TEST0012	Venus-MGA		762	3489	28.2	58.0
5	TEST0009	Ubiquitin	FLJ34456	858	3585	33.3	63.0
6	TEST0007	kinase	FLJ34101	966	3693	37.0	66.7
7	TEST0008	phosphatase	FLJ34434	1176	3903	43.3	73.1
8	TEST0005	転写因子	FLJ16264	1374	4101	53.0	82.8
9	TEST0010	自己リン酸化	FLJ37986	1638	4365	61.4	91.2
10	TEST0002	test clone No.8	FLJ20768	1842	4569	66.9	96.7

図 5 タンパク質共発現の比較

その結果、10 種類のタンパク質の共発現は、PCR 産物の以降の混合で、10 種類のタンパク質すべてが効率よく発現した。コストや操作の煩雑さを考慮すると、最上流の PCR 産物で 10 種類の混合物を作製して、タンパク質合成を行う方法がよいと結論した (図 5)。

混合した PCR 産物をもとに合成した 10 種類の共発現タンパク質を使用して作製したプロテインアクティブアレイを用いて、抗原が決定されている抗体の抗原抗体反応の検討を行った。その結果、10 種類の共発現系タンパク質を用いて作製したプロテインアクティブアレイによって、抗原同定を行うことができた。

これにより、10 種類の共発現タンパク質による 1 次スクリーニング (Comprehensive-PAA : C-PAA)、C-PAA で得られた 10 種類のタンパク質を個別展開させて抗原同定を行う 2 次スクリーニング (Expanded-PAA : E-PAA) の 2 ステップのスクリーニング方法を採用した。そして、この 2 ステップのスクリーニング方法により、スクリーニングの簡略化を図った (図 6)。

このアレイ化技術を利用して、我々は、機能別カテゴリーに分別した約 20,000 種類のタンパク質を搭載しているプロテインアクティブアレイを作製した。そして、このプロテインアクティブアレイの作製技術は、株式会社セルフサイエンスに技術移転し、プロテインアクティブアレイの製品化を目指している。

3.5 卵巣がん由来傍腫瘍性小脳変性症患者由来血清中の自己抗体解析

プロテインアクティブアレイを用いて、傍腫瘍性小脳変性症患者の血液中の自己抗体解析を行った。本患者は、東京大学附属病院神経内科に手のしびれを初期症状として来院した。患者血清は PBS-T で 1,000 倍希釈した溶液を使用し、HRP ラベルされた Anti-Human IgG Antibody を使用して化学発光検出により自己抗体の検出を行った。検出

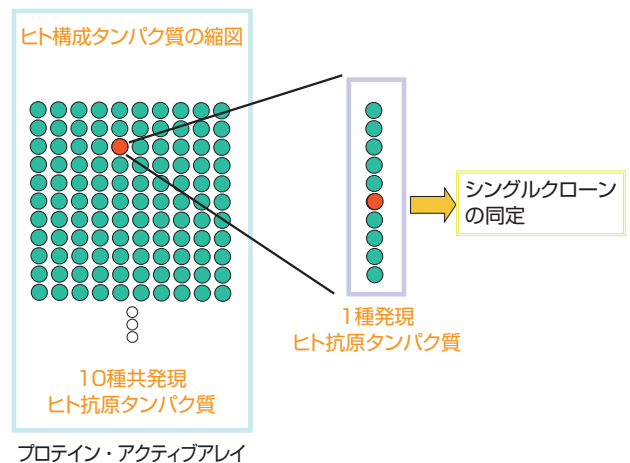


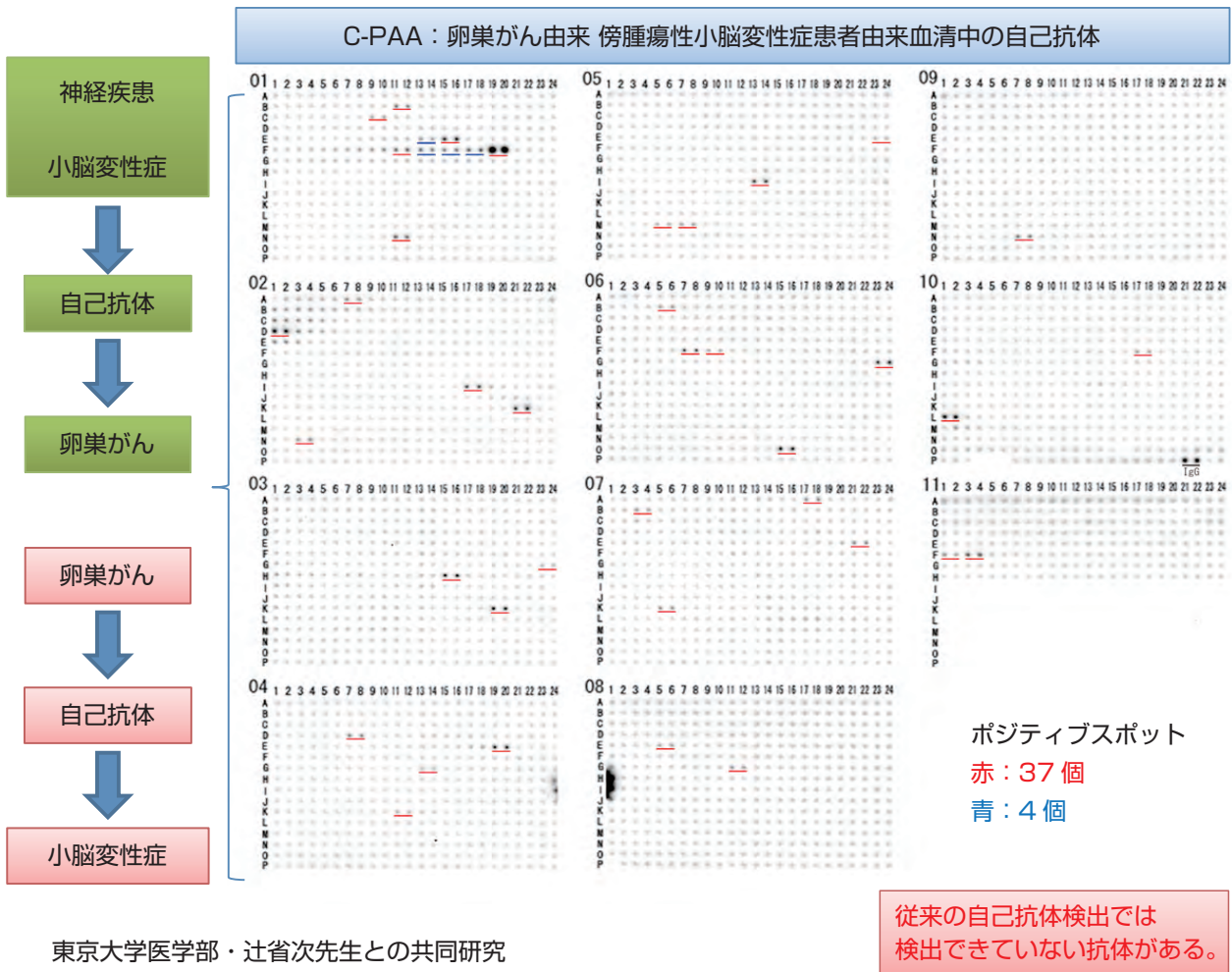
図 6 C-PAA、E-PAA による抗原同定

表 2 傍腫瘍性神経疾患患者血清の自己抗体解析

精製抗体 no.	FLJ no.	GeneSymbol	Description
1	FLJ96281AAAF	DUSP11	dual specificity phosphatase 11 (RNA/RNP complex 1-interacting)
2	FLJ44773AAAF	A1BG	
3	FLJ81708AAAF	SSX2	synovial sarcoma, X breakpoint 2
4	FLJ81661AAAF	SSX1	synovial sarcoma, X breakpoint 1
5	FLJ82512AAAF	SSX3	synovial sarcoma, X breakpoint 3
6	FLJ81139AAAF	SSX5	synovial sarcoma, X breakpoint 5
7	FLJ13227AAAF	NXT2	nuclear transport factor 2-like export factor 2 (NXT2)
8	FLJ25823AAAF	CT45A4	cancer/testis antigen family 45, member A4
9	FLJ44051AAAF	LOC100128002	
10	FLJ13132AAAF	BAT5	
11	FLJ45293AAAF	CTNNA2	catenin (cadherin-associated protein), alpha 2
12	FLJ94954AAAF	LIMS1	LIM and senescent cell antigen-like domains 1
13	FLJ81000AAAF	SSX4B	synovial sarcoma, X breakpoint 4B
14	FLJ81065AAAF	TRIM21	tripartite motif-containing 21
15	FLJ96747AAAF	GD320	
16	FLJ96595AAAF	MGLL	
17	FLJ83136AAAF	CT45A5	cancer/testis antigen family 45, member A5
18	FLJ31021AAAF	LOC100129917	hypothetical protein LOC100129917
19	FLJ93657AAAF	RPL9L	ribosomal protein L3-like (RPL9L)
20	FLJ93363AAAF	MLL2	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 3
21	FLJ92129AAAF	RPL6	60S ribosomal protein L6
22	FLJ92146AAAF	RGS16	regulator of G-protein signaling 16
23	FLJ96402AAAF	RGS5	regulator of G-protein signaling 5
24	FLJ96688AAAF	RGS1	regulator of G-protein signaling 1
25	FLJ30022AAAF	RGS3	regulator of G-protein signaling 3
26	FLJ20416AAAF	NXF2B	nuclear RNA export factor 2B
27	FLJ31197AAAF		
28	FLJ37690AAAF		
29	FLJ39521AAAF		
30	FLJ38906AAAF		
31	FLJ25862AAAF		
32	FLJ27182AAAF		
33	FLJ44385AAAF		
34	FLJ56587AAAF		
35	FLJ41898AAAF		
36	FLJ82376AAAF	IRX2	Iroquois homeobox 2

➡ がん関連

➡ 小脳関連



東京大学医学部・辻省次先生との共同研究

図 7 傍腫瘍性神経疾患患者血清の自己抗体検出

結果から、約 37 種類の自己抗体が検出された（図 7）。検出された自己抗体の一覧を表 2 に抗原として示す。LIMS1 や TRIM21 は健常人でも高頻度（80 % 以上）に検出される自己抗体である。TRIM21 は肺がんのマーカー自己抗体との報告^[9]もあるが、我々のこれまでの研究では健常人でも高頻度（65 % 以上）に検出されている。SSX1、SSX2、SSX3、SSX4B、SSX5 の SSX ファミリー^[10]、CTA45A4 および CTA45A5 の癌抗原（CTA）、リパーゼの MGLL^[11] は最近にがんとの関連が報告されており、今回検出された自己抗体の抗原タンパク質は、いずれもがんとの関連が報告されているものである。一方、IRX2 は小脳形成に関わる因子^[12]であり、CTNNB2 は神経伝達の細胞間コミュニケーションが関係あるタンパク質^[13]である。このことから、プロテインアクティブアレイを使用することにより、血清中の自己抗体を網羅的に検出できることが示され、がんと小脳変性症に関連する両方の抗体が検出されている。血中の自己抗体の解析によりがん関連の抗体が検出されたことで、本患者はがんの詳細な検査をすることになり、卵巣がんが発見された。神経症状を発症して神経内科にいられた患者からがんが発見されるケースは珍しくない。まず、がんが発症し、その結果、多くの自己抗体が産生されるようになり、その中のいくつかの自己抗体が神経疾患につながるものになっていると考えられる。現在、これら検出された自己抗体が、新しいバイオマーカーとなりえるかどうかについて、平成 25 - 27 年度 JST 先端計測・機器開発プログラムを採択し、複数の患者および健常人の自己抗体データを取得、解析することによって、検討を進めているところである。プロテインアクティブアレイによる自己抗体のプロファイリングが安価に迅速にできるようになれば、さまざまな診断の精度を高めるための非常に有効な手法になると考えられる。

4 今後の課題

抗体は、抗原量に対して PCR の増幅に匹敵するほど多量に生産されると言われている。そして、抗体は血液を通して全身を循環しており、抗体を調べることで身体の微細な変化を観ることができると考えられる。実際、プロテインアクティブアレイを用いることで身体の自己抗体の変化をプロファイリング可能になってきており、自己抗体の検出システムは技術的には実用段階に入りつつある。

今後、プロテインアクティブアレイを用いた網羅的な自己抗体の検出システムにより、がん患者、自己免疫疾患および種々の疾患について網羅的に自己抗体をプロファイリングし、より多くの疾患と自己抗体の関連データを蓄積していこうと考えている。そうすることで、血中の自己抗体のプロファイリングを行うことで総合的疾患診断を行うことができ、疾

患の進行や治療、早期発見、診断・治療の指針、治療効果の評価をすることができるようになって考えている。プロテインアクティブアレイの開発としては、よりタンパク質アレイの高密度化を行い、少量の血液で高感度な測定が経済的に行えるような改良を進めている。そして、一般的な病院や研究施設等でも簡便に使用できるようなシステムにして行きたいと考えている。

参考文献

- [1] R. H. Scofield: Autoantibodies as predictors of disease, *Lancet*, 363 (9420), 1544-1546 (2004).
- [2] N. Goshima, Y. Kawamura, A. Fukumoto, A. Miura, R. Honma, R. Satoh, A. Wakamatsu, J. Yamamoto, K. Kimura, T. Nishikawa, T. Andoh, Y. Iida, K. Ishikawa, E. Ito, N. Kagawa, C. Kaminaga, K. Kanehori, B. Kawakami, K. Kenmochi, R. Kimura, M. Kobayashi, T. Kuroita, H. Kuwayama, Y. Maruyama, K. Matsuo, K. Minami, M. Mitsubori, M. Mori, R. Morishita, A. Murase, A. Nishikawa, S. Nishikawa, T. Okamoto, N. Sakagami, Y. Sakamoto, Y. Sasaki, T. Seki, S. Sono, A. Sugiyama, T. Sumiya, T. Takayama, Y. Takayama, H. Takeda, T. Togashi, K. Yahata, H. Yamada, Y. Yanagisawa, Y. Endo, F. Imamoto, Y. Kisu, S. Tanaka, T. Isogai, J. Imai, S. Watanabe and N. Nomura : Human protein factory for converting the transcriptome into an in vitro-expressed proteome, *Nat. Methods*, 5 (12), 1011-1017 (2008).
- [3] Y. Maruyama, A. Wakamatsu, Y. Kawamura, K. Kimura, J. Yamamoto, T. Nishikawa, Y. Kisu, S. Sugano, N. Goshima, T. Isogai and N. Nomura: Human Gene and Protein Database (HGPD): a novel database presenting a large quantity of experiment-based results in human proteomics, *Nucl. Acids Res.*, 37 (suppl. 1), D762-D766 (2009).
- [4] M. Maekawa, K. Yamaguchi, T. Nakamura, R. Shibukawa, I. Kodanaka, T. Ichisaka, Y. Kawamura, H. Mochizuki, N. Goshima and S. Yamanaka: Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1, *Nature*, 474, 225-229 (2011).
- [5] J. L. Hartley, G. F. Temple and M. A. Brasch: DNA cloning using in vitro site-specific recombination, *Genome Res.*, 10, 1788-1795 (2000).
- [6] 河村義史, 五島直樹, 野村信夫: ヒト蛋白質工場: 網羅的なヒト蛋白質の発現基盤, *蛋白質 核酸 酵素*, 54 (9), 1173-1181 (2009).
- [7] K. Madin, T. Sawasaki, T. Ogasawara and Y. Endo: A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: Plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97 (2), 559-564 (2000).
- [8] Y. Maruyama, Y. Kawamura, T. Nishikawa, T. Isogai, N. Nomura and N. Goshima: HGPD: Human Gene and Protein Database, 2012 update, *Nucl. Acids Res.*, 40 (D1), D924-D929 (2012).
- [9] M. Kuboshima, H. Shimada, T. Liu, F. Nomura, M. Takiguchi, T. Hiwasa and T. Ochiai: Presence of serum tripartite motif-containing 21 antibodies in patients with esophageal squamous cell carcinoma, *Cancer Sci.*, 97 (5), 380-386 (2006).
- [10] B. J. Taylor, T. Reiman, J. A. Pittman, J. J. Keats, D. R. de Bruijn, M. J. Mant, A. R. Belch, L. M. Pilarski: SSX cancer testis antigens are expressed in most multiple myeloma patients: co-expression of SSX1, 2, 4, and 5 correlates with

adverse prognosis and high frequencies of SSX-positive PCs, *J Immunother.*, 28 (6), 564-575 (2005).

- [11] E. Leah: Lipidomics: Growing on a free-fat diet, *Nat. Rev. Cancer*, 10, 160 (2010).
- [12] K. Matsumoto, S. Nishihara, M. Kamimura, T. Shiraishi, T. Otaguro, M. Uehara, Y. Maeda, K. Ogura, A. Lumsden and T. Ogura: The prepattern transcription factor *Irx2*, a target of FGF8/MAP kinase cascade, is involved in cerebellum formation, *Nat. Neurosci.*, 7 (6), 605-612 (2004).
- [13] M. Zhang, J. Zhang, SC. Lin and A. Meng: β -Catenin 1 and β -catenin 2 play similar and distinct roles in left-right asymmetric development of zebrafish embryos, *Development*, 139 (11), 2009-2019 (2012).

執筆者略歴

川上 和孝 (かわかみ よしたか)

2008年大阪市立大学大学院理学研究科後期博士課程を単位取得退学。産業技術総合研究所バイオメディカル情報研究センター・テクニカルスタッフとして、地域イノベーション創出研究開発事業「ランダム免疫法による効率的な血清腫瘍マーカーの開発」、「自己抗体を活用した効率的な特定のがんの総合診断システムの開発」に参加した。また、厚生労働省「CHP/NY-ESO-1ポリペプチドがんワクチンの術後食道癌症例を対象とした多施設共同前期第Ⅱ相臨床試験」に従事した。2013年5月よりバイオ産業情報化コンソーシアムの研究員として福島医薬品関連産業支援拠点化事業に参加し、現在に至る。この論文においてプロテインアレイの作製ならびに自己抗体測定を担当。



五島 直樹 (ごしま なおき)

1987年大阪府立大学大学院農学研究科生化学専攻修了(農学博士)。理化学研究所流動研究員。京都薬科大学助手。広島大学大学院・理学研究科助教授。現在、産業技術総合研究所創薬分子プロファイリング研究センター定量プロテオミクスチーム研究チーム長。2000年よりNEDO「タンパク質機能解析プロジェクト」に参加し、ヒト完全長 cDNA の Gateway 化、網羅的タンパク質発現をもとにゲノムワイドなタンパク質機能解析を行う。2006年NEDO「ケモバイオプロジェクト」、NEDO「TRプロジェクト」、JST「山中iPS細胞特別プロジェクト」においてヒトタンパク質発現リソースを活用し各成果を上げる。2006年九州地域コ



ンソ、2008-2010年関東地域イノベーションでプロテイン・アクティブアレイの開発を行い、血液サンプル中の自己抗体プロファイリングを実施し、自己抗体バイオマーカー探索を行っている。この論文においてプロテインアレイ研究の統括ならびに医療現場との連携を担当。

査読者との議論

議論1 全体的なコメント

質問・コメント (三石 安: 産業技術総合研究所東北センター)

ヒト完全長 cDNA プロジェクトからつづく国家プロジェクトの成果を活用して、当初予想していなかった、血清中の自己抗体のプロファイリングにより、疾病の早期診断が可能になるとの論文、興味深く読み進みました。疾患がある場合に何らかの自己抗体が通常より過剰に発現しており、疾患マーカーとして利用できるとの発想は理解できましたが、技術的成果の部分の書き込みがあまりしすぎていて肩すかしをくらった感じです。このままでは、プロテインアクティブアレイを作製して血清中に含まれる結合タンパク質を網羅的に解析できるようになったことにとどまってしまうように思います。タンパク質の網羅的解析ができるようになったことは素晴らしいことではありますが、この論文では是非、血清中の自己抗体の種類や含有量から疾病の有無や程度が推定されるというところまで書き込んでください。

回答 (五島 直樹)

当初の原稿に記述した結果の詳細は、マーカーとしての検討も含めて専門雑誌に投稿を考えております。そのため、プロテインアレイ技術の開発を中心にしたこの論文のデータとして、卵巣がん由来傍腫瘍性小脳変性症患者由来血清中の自己抗体解析と入れ替えてコメントのご指摘に対応しました。

議論2 プロテインアクティブアレイの概念について

質問・コメント (湯元 昇: 産業技術総合研究所)

この研究の目標は「網羅的な自己抗体の検出システムの開発」であり、「世界最大のタンパク質発現リソースの構築」という大きなブレークスルーを軸に、網羅的タンパク質発現技術、タンパク質のアレイ化技術、抗体の検出技術、スクリーニング技術といった要素技術を統合したというシナリオはバイオ分野の読者には良くわかります。ただ、分野外の人にとっては、プロテオームアレイが実態としてどのようなものをイメージすることは困難と思います。そこで、開発されたプロテインアクティブアレイの概念図を入れて頂けないでしょうか。

回答 (五島 直樹)

プロテインアクティブアレイの概念図を図4Bに追加し、図4の図の説明を記述しました。