



## PRESS RELEASE

岡山大学記者クラブ

文部科学記者会

科学記者会

御中

令和 5 年 9 月 19 日

岡 山 大 学

### 新規で安価なプロテオミクス技術の開発に成功！ ～個別化医療の精度を上げる自己抗体バイオマーカー探索の強力ツールに～

#### ◆発表のポイント

- ・ ヒト細胞内総タンパク質を疎水性度と分子量で 2 次元分離する新規法を開発しました。これにより、患者さんのわずかな末梢血から、疾患の診断等に役立つ自己抗体を効率的に同定することが可能となります。
- ・ プロテオミクス解析用の 2 次元分離膜を安価に再現性よく大量に調製可能で、大規模スクリーニングを行うことが可能となります。
- ・ 実際に 26 種類の自己抗体バイオマーカーを発見しており、免疫モニタリングシステムの高精度化に貢献します。

岡山大学学術研究院ヘルスシステム統合科学学域（工）の二見淳一郎教授と、大学院ヘルスシステム統合科学研究科博士後期課程の伊達実鈴大学院生は、培養細胞中の総タンパク質から核酸などの不純物を取り除いた後、変性状態の総タンパク質を水溶性で抽出する独自の技術の開発に成功しました。この技術を活用し、総タンパク質を疎水性度（HYD）と分子量（MM）に基づいて、再現性よく HYD/MM-2 次元で分離する新しいプロテオミクス技術<sup>(1)</sup>を開発しました。

さらに、実際に肺がん患者からの微量の血漿検体を使用して、この技術を用いた実験を行い、26 種類の有望な自己抗体バイオマーカーを発見し、免疫プロファイリング・モニタリング技術開発に活用できることも示しました。この手法は一般的な生化学実験設備があれば再現性の高いプロテオミクス研究を行うことができ、大規模なスクリーニングにも適しています。

この研究成果は 2023 年 8 月 28 日、タンパク質科学会誌「*Protein Science*」にオンライン版として掲載されました。

#### ◆研究者からのひとこと

患者さんから提供していただく貴重な血液検体に含まれる自己抗体バイオマーカーを効率的に探す方法を開発しました。実験作業はまるで「宝探し」ですが、変性状態のタンパク質を取り扱う技術を駆使して、効率的に宝探しができる技術を開発することができました。この宝物を並べれば免疫に関わる様々な疾患に対する個別化医療を実現するツール開発につながると思います。



伊達大学院生（左）

二見教授（右）



PRESS RELEASE

■発表内容

<現状>

ヒト細胞内の膨大なタンパク質を分離し、解析するプロテオミクス研究には、各タンパク質の電荷特性を反映する等電点 (pI) による初回の電気泳動の後、分子量 (MM) による2回目の電気泳動によって、pI/MMの2次元分離技術が使用されています。この技術は約50年前に開発されましたが、サンプルの調製と柔らかい電気泳動ゲルの操作に多くのノウハウが必要なため、再現性の高い比較研究を行うには高度な技術スキルまたは高価な全自動システムが必要でした (図1)。

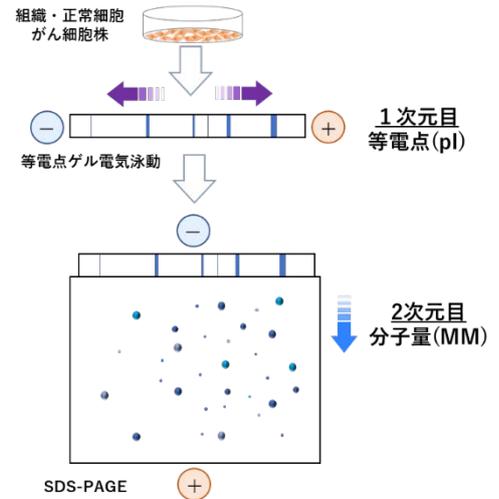


図1 pI/MMの2次元電気泳動 (従来技術)

当研究グループでは、細胞内のタンパク質全体から核酸などの不純物を取り除き、タンパク質を変性した状態で水溶性に抽出する技術を2014年に開発しました<sup>(2)</sup>。今回、この技術を改良し、一般的な生化学実験設備を使用して、低コストかつ再現性の高い新しいプロテオミクス技術を開発し、その方法論を学術論文として発表しました (図2)。

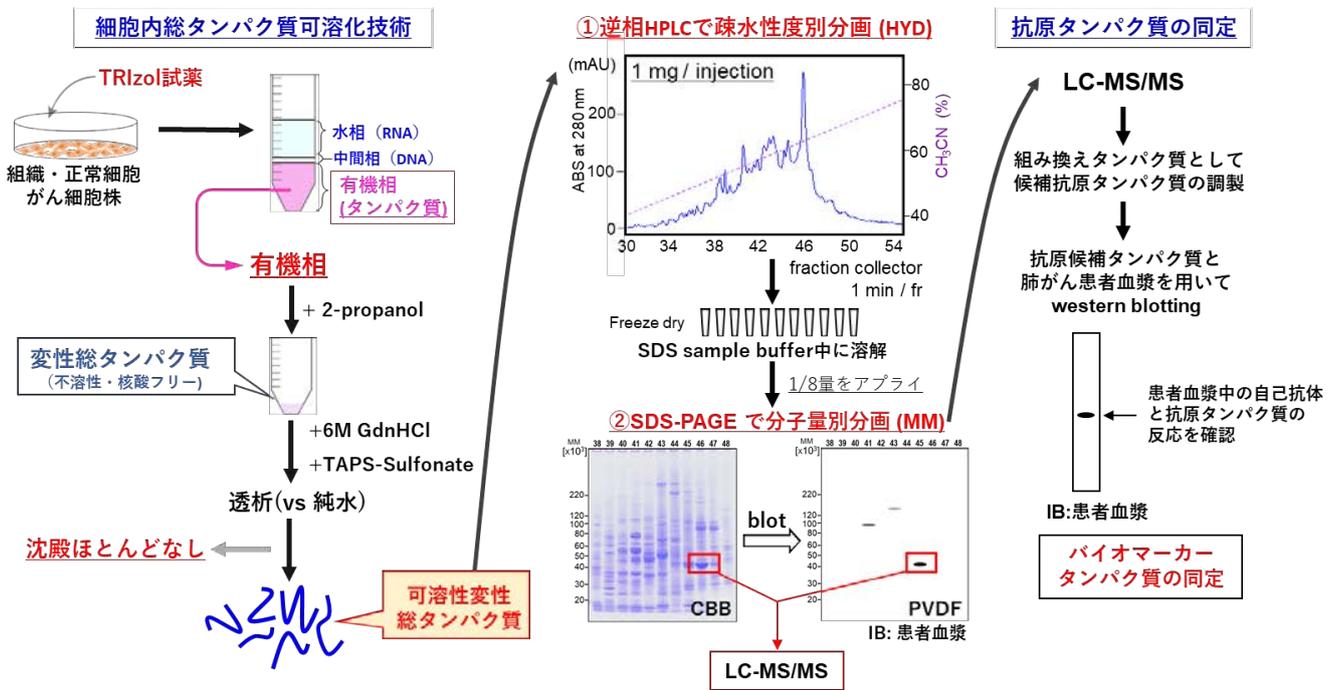


図2 HYD/MMの2次元電気泳動の手順と自己抗体バイオマーカー探索スキーム

この技術開発の背景には、当研究グループが実施中のプロジェクト「がんと免疫の戦いの戦況と履歴を知る自己抗体バイオマーカーの評価技術」<sup>(3)</sup>があります。このプロジェクトでは、さまざまなヒト血液検体から自己抗体バイオマーカーが認識する自己抗原 (ヒト細胞内タンパク質) を同定する必要があります。自己抗体は、がんへの免疫応答や自己免疫疾患時に、血中に出現することが



## PRESS RELEASE

知られており、疾患の診断だけでなく、治療法の選択や効果の予測にも役立つ可能性があります。しかし、自己抗体の出現パターンは個人差が大きいため、一定の網羅性と高い定量性を備えた評価システムが必要です。このシステム開発に向けて、患者さんの微量の血漿検体から自己抗体をどうやって効率的に同定するか？ 研究のきっかけは我々研究者のニーズの中にありました。

### <研究成果の内容>

本研究では、肺がん患者の末梢血（岡山大学病院バイオバンク保存検体を利用）中に存在し、肺がん細胞に対する免疫応答の履歴を示す自己抗体バイオマーカーを探索するモデルで検証しました。はじめに、肺がん由来の細胞株を培養し、タンパク質成分のみを取り出すために TRIzol という市販の試薬を使用します。取り出したタンパク質は変性し、不溶性であるため、高濃度の変性剤で溶解し、タンパク質内部の Cys 残基に可逆的に正電荷を化学修飾しました。次に、これを純水に対して透析して細胞内の総タンパク質を全て水溶性で取得しました。その後、逆相 high performance liquid chromatography (HPLC) で疎水性度によって分画し、試験管内に分取しました。1 回の HPLC で 8 回分のサンプルが得られるため、均質な市販の SDS-PAGE ゲルを用いて分子量で分離すれば、高い再現性で HYD/MM ゲルが作成できます。このゲル内のタンパク質は、疎水性の polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜に転写することで、抗原抗体反応の解析に利用できます。

こうして調製された PVDF 膜と、患者由来の微量の血漿を混合すると、血漿中の自己抗体が肺がん細胞内の特定のタンパク質と結合します。これを酵素標識された抗ヒト抗体で検出し、可視化することで、標的抗原の位置を特定できます。別に調製された HYD/MM-2 次元分離ゲルから標的抗原をカミソリで切り出し、岡山大学自然生命科学研究支援センターの分析計測部門に設置された LC-MS/MS 装置を使用して標的抗原を同定します。標的候補となった抗原は、大腸菌で組換えタンパク質を生産し、再び患者由来の血漿との反応性を確認することで検証を行います。この一連の流れにより、26 種類の自己抗原を同定することができました。

### <社会的な意義>

今回の技術開発は、プロテオミクス研究手法の拡張を意味します。世界中のライフサイエンスに関わる研究室は、異なる研究機器を備えています。一般的な生化学実験設備である逆相 HPLC 装置を活用するこの手法は特に新たにプロテオミクス研究を検討するチームにおいて強力なツールとして役立つ可能性があります。

当研究グループではこの技術を活用することで、免疫に関連するさまざまな疾患の自己抗体バイオマーカーの同定を加速します。免疫応答は個々人で異なるため、自己抗体出現パターンの個人差は非常に大きい特徴がありますが、疾患と相関して出現頻度の高い自己抗体群を選抜すれば、薬剤の選択や副作用リスク評価といった個別化医療の診断精度の向上が見込まれます。当研究グループでは末梢血中の自己抗体を包括的に定量評価できる MUSCAT-assay 技術を開発中であり<sup>(3)</sup>、より精度の高い診断薬の社会実装を目指します。



## PRESS RELEASE

### ■論文情報

論文名 : Hydrophobicity and molecular mass-based separation method for autoantibody discovery from mammalian total cellular proteins

掲載紙 : *Protein Science*

著者 : Mirei Date, Ai Miyamoto, Tomoko Honjo, Tsugumi Shiokawa, Hiroko Tada, Nobuhiro Okada, Junichiro Futami

DOI : 10.1002/pro.4771

URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pro.4771>

### ■研究資金

本研究は、日本学術振興会（JSPS）の科学研究費助成事業（基盤B :22H01881）および科学技術振興機構（JST）の大学発新産業創出プログラム（START）（JPMJST1918）の支援を受けて実施しました。

### ■補足・用語説明

#### （1）プロテオミクス技術

細胞や組織に存在する全てのタンパク質を解析する技術。例えばヒトには約2万5千種類のタンパク質をコードする遺伝子があり、実際には選択的スプライシングや修飾・分解により50万種類を超えるタンパク質が存在すると言われますが、この全てを漏らさず網羅的に解析できれば疾患メカニズムなどが解明できます。膨大な数のタンパク質を解析するためには、できるだけ重複しないように種類別に分離する必要があり、プロテオミクス技術の開発が重要となります。

（2）Denatured Mammalian Protein Mixtures Exhibit Unusually High Solubility in Nucleic Acid-Free Pure Water *PLoS One* 9,e113295(2014)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113295>

（3）岡山大学プレスリリース：「がんと免疫の戦歴と戦況を評価する技術が実用化に近づく～網羅的な自己抗体バイオマーカー測定の定量性を保証するシステムを構築～」(2022.5.27)

[https://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release\\_id965.html](https://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id965.html)



＜お問い合わせ＞

岡山大学学術研究院ヘルスシステム統合科学学域

バイオ・創薬部門（工学部 化学・生命系）

教授 二見 淳一郎

（電話番号）086-251-8217



岡山大学は持続可能な開発目標（SDGs）を支援しています。