HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | Discovery Research of Novel Biomarkers in Osteoarthritis using Glycoproteomics [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review] |
| Author(s) | 石原, 武 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(生命科学) |
| Dissertation Number | 乙第6915号 |
| Issue Date | 2014-03-25 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/56248 |
| Rights(URL) | https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/ |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | Takeshi_Ishihara_abstract.pdf, 論文内容の要旨 |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

# 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（生命科学）　　氏 名　石 原　武

## 学 位 論 文 題 名

Discovery Research of Novel Biomarkers in Osteoarthritis using Glycoproteomics

(グライコプロテオミクスによる変形性関節症の新規バイオマーカー探索に関する研究)

変形性関節症(OA)に対する薬物治療は、現在、抗炎症あるいは疼痛治療薬による対症療法にとどまり、損傷を受けた軟骨組織を修復、再生することができる治療薬は未だ存在しない。そこで、我々は、軟骨再生薬の創製をめざし、軟骨の再生過程を評価できる分化マーカーを同定するため、グライコミクスやプロテオミクスなどのプロファイリング技術を駆使して、軟骨細胞の分化に伴い変動する糖鎖およびタンパク質の探索研究を行った。また、OA 治療薬の臨床研究で使用する血中バイオマーカーを同定するため、独自のグライコプロテオミクス技術を構築し、それを用いて、OA の進行度に相関する疾患マーカーの探索研究を行った。

軟骨分化マーカーの探索研究において、まず、マウス軟骨前駆細胞(ATDC5 cells)をインスリンで刺激することにより、軟骨細胞へ分化誘導を行った。分化誘導後、経時的に回収した細胞の抽出物を用いて、Glycoblotting 法により N 型糖鎖のプロファイリングを実施した。その結果、ハイマンノース型糖鎖が軟骨分化に伴い顕著に増加することがわかった。OA モデル動物において、OA 病態に伴い、ハイマンノースが減少するという知見があることから、ハイマンノース型糖鎖が軟骨細胞の指標となる可能性が示唆された。この糖鎖の変動の新知見を起点とし、次に、その糖鎖を提示するタンパク質の発現解析を行い、分化過程に伴い変動する分子の探索を行った。まず、ハイマンノース型糖鎖が結合しているタンパク質をレクチン(ConA)により精製し、LC/MS により網羅的に同定した。その結果、246 個の糖タンパク質を同定し、その約 52%が細胞表面タンパク質であった。これらタンパク質の、軟骨分化に伴う遺伝子変動を確認したところ、その 15 遺伝子が既知軟骨マーカーで

ある II 型コラーゲンに比べ、分化過程の早期に発現量が最大値に達することがわかった。この結果より、この 15 遺伝子は軟骨分化に何かしらの関与していることが示唆されるとともに、軟骨分化早期に検出できる分化マーカーであることがわかった。最後に、ヒト間葉系幹細胞を用いた軟骨分化系においても、これら 15 遺伝子の変動を確認したところ、5 つの遺伝子において、早期に発現上昇することが確認された。

OA の進行度に相関する疾患マーカーの探索研究において、まず、新規血中バイオマーカー探索を行うためのグライコプロテオミクス法を構築した。新規血中バイオマーカー探索を行う上で大きな課題となってくる点が、血中に含まれるタンパク質の含有量の約 99%がアルブミンや免疫グロブリンなどの典型的な血液構成タンパク質であること、また、全てのタンパク質の濃度のダイナミックレンジは $10^{10}$ あり、病変組織から染み出た、バイオマーカー候補となりうるタンパク質は、$10^{5}$pg/mL 以下とアルブミン($10^{10}$pg/mL)に比べ、非常に低濃度で存在している。そこで、我々は、MARS7 カラムを用いて、血漿サンプルから 7 つの高濃度タンパク質を除去し、トリプシン消化後、ヒドラジドビーズにより糖ペプチドを濃縮した。このサンプルを 2 次元液体クロマトグラフィー/MALDI-TOF-MS に供し、タンパク質の同定を行った。その結果、$10^{2}$ ~$10^{6}$ pg/mL のタンパク質が再現良く、同定できることが分かり、本解析法により、病変組織から染み出たバイオマーカー候補となりうるタンパク質を検出することが可能であることがわかった。また、MS シグナルによる定量解析も可能であることも確認した。次に、本解析法を用いて、病態の進行が見られた OA 患者の経時的な血漿サンプルを用いて、OA の進行度に相関する疾患マーカーの探索を行った。その結果、4 つの候補分子が同定された。

本研究において、グライコミクス、プロテオミクス技術を駆使することによって、軟骨再生薬の創製を目指した薬効評価マーカーとして、軟骨の分化過程を早期に評価できるマーカー、そして、疾患マーカーとして OA の進行度に相関するマーカーを見出した。これら見出されたマーカーは、軟骨再生薬の創製および OA 治療薬の開発において、活用できることが期待された。