

## ヒト高血圧の病態モデルとしての妊娠中毒症のプロテオーム解析

●濱田 洋実

筑波大学臨床医学系産婦人科

### 〈研究の目的と進め方〉

妊娠中毒症（現在の妊娠高血圧症候群）は、高血圧のひとつの病態モデルと考えられ、ヒトにおける血圧調節機構を解明するのに適した病態である。本症においては、妊娠が終了すると速やかに高血圧が軽快することから、発症時と軽快時を同一個人で比較することが可能である。そこで本研究においては、プロテオーム解析の手法を用いて本症に関連する蛋白を特定することを目的とした。

### 〈研究開始時の研究計画〉

まず第一に、妊娠中毒症患者の血清中の全蛋白質を解析するために、二次元電気泳動法による解析を行う。対象は、本研究に関して口頭ならびに文書で十分に説明をした後に、文書によるインフォームド・コンセントが得られた日本人妊婦とする。まず妊娠初期に末梢血を採取し、血清を分離した後ゲノムDNAを抽出する。その後、これらの妊婦の妊娠経過中の血圧の推移のデータを経時的に収集していく。対象妊婦の中の妊娠中毒症発症者について、発症した時点で再度血清を採取する。こうして得られた妊娠中毒症患者の妊娠初期（発症前）の血清および発症後の血清、ならびに正常妊婦の妊娠初期の血清について、その全蛋白質を解析する。具体的には、電気泳動システムを用いて得られた電気泳動像を、デジタル化して解析を行う。得られた蛋白質のスポットの分析を行い異常蛋白を同定していく。

ついで、仮に上述の解析により未知の異常蛋白が同定されれば、そのアミノ酸分析を行いアミノ酸配列を決定した上で、遺伝子を同定する。さらに、その遺伝子多型を探求して、その遺伝子が妊娠中毒症の疾患関連遺伝子であるか検討していく。

### 〈研究期間の成果〉

正常妊婦、妊娠中毒症妊婦、妊娠中毒症褥婦（妊娠中毒症軽快後）からインフォームド・コンセントを得て採血し、その血清を検体とした。これらの検体について二次元電気泳動法により全蛋白質の解析を行った。サンプル調整液に血清10  $\mu$ lを添加し、蛋白を変性した後、Immobiline DryStrip, IPGphorを使用し、一次元目の泳動をおこない。終了したゲルをDTTとヨードアセトアミドにて平衡化した後、二次元目として10% SDSポリアクリルアミドゲルを用いて、泳動した。銀染色にて蛋白質の検出を行い、デンストメトリーGS710にて、コンピューターへの取り込みを行い、PDQuestを使用し、画像解析を行った。以上の解析の結果、等電点3~10、分子量20~100kdの範囲で数百個のスポットを確認することができた。このうち、妊娠中毒症発症時と正常妊婦、妊娠中毒症発症時と妊娠中毒症の軽快後を比較して、ともに明らかに量的変化のあるスポットの検出に成功した。

このスポットについて、標準ゲルの2-D PAGE像のデータベースを検索し、質量分析を行い、さらに抗Clusterin抗体を使用したWestern blot法を行った結果、Clusterinであることが確認された (Figure)。

ついで、妊娠中毒症妊婦80名と正常妊婦80名を対象としたImmunoassay法による解析にて、血清中の量的変化を検討したところ、妊娠中毒症群で有意に高値を示した (妊娠中毒症群 vs 正常妊婦群:  $1.62 \pm 0.46$  vs  $1.30 \pm 0.46$ ,  $p < 0.001$ ) (論文1)。

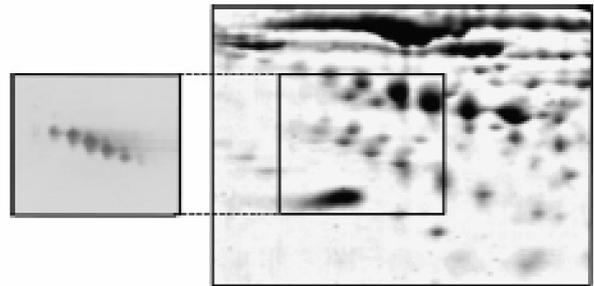


Figure. Western blot analysis. Anti-clusterin- $\beta$  antibodies are bound to the spots judged to be clusterin by reference to the SWISS 2DBASE, and the overexpressed spots in the magnified image are confirmed as clusterin. (Proteomics 4(2): 537-543, 2004)

### 〈国内外での成果の位置づけ〉

本研究により、それまで全く知られていなかった妊娠中毒症関連蛋白が明らかとなったため、国内外で反響を呼び、現在多くの施設で追試や発展的研究が行われている。本症発症機序の解明や治療方法の開発につながることを期待されている。

また、プロテオーム解析の有用性を示す研究成果としても注目されている。

### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

Clusterinは既知の蛋白であったが、その遺伝子多型と妊娠中毒症の関連に関する解析は達成できなかった。

### 〈今後の課題〉

妊娠中毒症はヒト高血圧の病態モデルであり、Clusterinの本症患者の血圧上昇における役割を明らかにしていくことが最大の課題であり、それがヒトにおける血圧調節機構の解明につながると考えられる。

### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文

1. 0602051115

Watanabe, H., Hamada, H., Yamada, N., Sohda, S., Yamakawa-Kobayashi, K., Yoshikawa, H., and Arinami, T., Proteome analysis reveals elevated serum levels of clusterin in patients with preeclampsia, Proteomics, 4(2), 537-543 (2004)