

経口貧血改善薬による転写因子を介した
EPO 遺伝子ドーピングに対する血液スクリーニング法の開発

堀江 正樹

目 次

要約・・・1 ページ

諸言・・2 ページ

材料と方法・・4 ページ

結果・・7 ページ

 図 1・・9 ページ

 図 2・・9 ページ

 図 3・・10 ページ

 表 1・・11 ページ

 表 2・・11 ページ

考察・・12 ページ

結語・・13 ページ

参考文献・・14 ページ

経口貧血改善薬による転写因子を介した
EPO 遺伝子ドーピングに対する血液スクリーニング法の開発

堀江 正樹、 中 綾乃、 松本 健、今川 重彦、小寺 義男、飯田 薫子

要約

競技スポーツでのドーピング技術は時代と共に進化しており、現在では、遺伝子を直接操作する遺伝子ドーピングが新たな問題となっている。遺伝子ドーピングが危惧される物質に Erythropoietin (EPO) がある。造血ホルモンである EPO は、赤血球造血を促進して酸素運搬能を高めることにより持久力を亢進させる。EPO の遺伝子発現は、転写因子である HIF (hypoxia inducible factor) と、GATA により発現調節を受けている。近年開発された経口貧血改善薬はこの *Epo* 発現調節機構を応用し GATA の結合を阻害 (K-11706)、HIF を活性化 (FG-2216) させることにより EPO 遺伝子の発現を促進させ、ヘモグロビン濃度を上昇させる。我々の先行研究より、K-11706・FG 投与マウスにおいて、血清 EPO 濃度の上昇を確認した。そして、トレッドミルを用いた解析では、走行距離の増加を確認している。世界アンチドーピング機構 (WADA) は、上記薬剤及び *Epo* 産生制御に関わる転写因子を操作し、赤血球造血促進を促す技術が冒頭で述べた遺伝子ドーピングに利用される可能性を指摘・警告している。しかしながら、このドーピングに対する検出方法は確立されていない。

そこで我々は、このドーピングの検出方法として、GATA・HIF 転写因子を操作したことにより特異的に発現変化を起こす、生体内の遺伝子・タンパク質を検出マーカーに応用する検出方法を考案した。そこで本研究では、簡易的な検査方法の開発として、血漿タンパク質に注目し、マウス血漿のプロテオーム解析を行い、薬剤投与特異的に変動するタンパク質の探索を行った。その結果、K-11706、FG 化合物投与特異的に、存在量の変化する数種類のタンパク質の検出に成功した。さらに、K-11706 投与特異的に発現変化を示したバイオマーカー候補タンパク質 FetuinB, Prothormbin に対して、ウェスタンブロッティング法 (WB) による発現評価を行ったところ、FetuinB の有意な増加が確認された。FetuinB は陽性対照群との比較においても、K-11706 投与特異的な増加が確認され、有能なバイオマーカー候補として期待された。今後も、EPO 遺伝子ドーピングの検出および、HIF、GATA 標的薬剤共通の検出方法へ応用できる可能性を検討していく。

1. 緒言

エリスロポエチン (erythropoietin ; EP0) は、赤血球産生を促進する糖蛋白ホルモンである¹⁾。EP0 は胎児期には肝臓、成人では腎臓で生産され、赤芽球前駆細胞である burst forming unit of erythroid (BFU-E) ・ colony forming unit of erythroid (CFU-E) に作用し、これらの細胞が有する EP0 レセプター (EPOR) と結合する事によって細胞内シグナル伝達がおこり、赤血球への分化が促進される^{1,2)}。EP0 遺伝子の発現は、Hypoxia inducible factor (HIF) や GATA binding protein (GATA) 等の転写因子により調節が行われていることが報告されている³⁻⁷⁾。古くから高山などでの低酸素曝露や、コバルト投与によって赤血球増多症になる事が知られている⁸⁾が、これは、上記の通り低酸素状態や貧血状態に陥ると低酸素応答系転写因子である HIF や GATA が活性化し、HIF 結合部位 (HRE : hypoxia responsive element) を 3' エンハンサー領域にもつ *Epo* の発現が亢進する結果である事が報告されている^{7, 8)}。

EP0 の産生増加は赤血球造血を促進してヘモグロビン (Hb) を増加させる事により、筋肉への酸素運搬量が増加し、糖・脂質代謝が亢進する事でエネルギー変換量が増加するため持久系パフォーマンスの向上に繋がる^{1,9)}。近年この作用機序を利用した、高地トレーニングの有効性がマラソン選手などの活躍によって実証され注目を集めている¹⁰⁻¹²⁾。これらの成果は、医学・生物学的研究成果をスポーツ科学へ応用した代表的な 1 例であり、基礎医学的な研究が近代スポーツ科学の発展に大きく貢献していることがいえる。しかしながら、EP0 の持久力向上効果と発現調節機構の解明は医学・生物学・スポーツ科学の発展という面で多大なる利益をもたらす一方で、その知識・技術がドーピングにも利用されてしまっている^{13,14)}。遺伝子組み換えエリスロポエチン製剤 (rhEP0) の乱用などがその代表例となっている。

新たな EP0 遺伝子ドーピングへの使用が危惧されている物質として、経口貧血改善薬がある。これらは *Epo* の発現に関与する転写因子に作用し *Epo* 発現を増幅させる内服の貧血改善薬であり、興和株式会社で開発されている K-11706、Fibrogen 株式会社が開発している FG-2216 がその代表的な薬剤となっている。FG-2216 は HIF-PHD に作用し PHD 阻害剤として働くため、通常大気中でも HIF の分解を抑制し *Epo* の発現を促す^{15, 16)}。一方 K-11706 は GATA 転写因子の結合活性を抑制し、また HIF の結合活性を促進する事で *Epo* の発現を促す¹⁷⁻¹⁹⁾。これら HIF 安定化剤・GATA 抑制剤は次世代

型 EPO 促進薬として注目されているが、その反面、rhEPO 製剤と同様に造血促進効果を利用して持久力を向上させようとするドーピング目的での使用が危惧される²⁰⁻²²⁾。事実先行研究より、上記薬剤服用によるマウスでの持久力向上効果が、トレッドミルを用いたテストにより走行距離の増加として認められている²²⁾。これら薬剤は WADA が規定する遺伝子ドーピングの規定にあてはまる薬剤であり、さらに、転写因子に作用するという上記薬剤の作用機序が、遺伝子やタンパク質を直接移入する遺伝子ドーピングに応用されかねない。しかし、未だ上記薬剤のドーピング目的での使用や遺伝子ドーピングが行われた場合の検出システムは開発されていない。

現在報告されている多くの EPO 遺伝子ドーピングは、EPO 遺伝子情報を組み込んだ plasmid DNA を体内に注入するものである。これら導入された *Epo* を検出する方法としては、等電点電気泳動法²³⁾や single-copy primer-internal intron-spanning PCR 法によって、導入した *Epo* 及び内在性の *Epo* の塩基配列を識別する直接的な検出方法が報告されている²⁴⁾。しかしながら、これらの方法は、*Epo* を直接導入することなく、転写活性を操作することによって内因性の *Epo* 発現を増強する EPO 遺伝子ドーピングには対応できない。そこで私たちは、新規経口貧血改善薬を使用した EPO 遺伝子ドーピングの新規検出方法として、*Epo* 発現増強を目的として転写因子を操作する際に起こる副次的な血漿内タンパク質発現の変化を検出し、これらのタンパク質をバイオマーカーとして用いる、間接的なドーピング検出方法の開発を考えた。GATA・HIF 転写因子を介した薬剤および EPO 遺伝子ドーピングでは作用機序が同様なため、薬剤および遺伝子操作の方法に関係なく遺伝子発現の変化は同様に現れると考えられ、間接的な検出方法を用いることですべてに共通した検査方法が確立でき、本検査方法は高い新規性・汎用性が期待される。

本研究では本検査方法の可能性を探る基礎検討として、マウス血漿を用いたプロテオーム解析により、新規のバイオマーカー候補タンパク質となりうる薬剤反応性タンパク質を探索し、いくつかの薬剤反応性候補タンパク質のバイオマーカーへの使用の応用性を検討した。なお本研究課題は主に、私たちの研究室と興和株式会社の共同研究によって開発した経口貧血改善薬 K-11706 に焦点を絞って行った。

2. 方法と材料

a. 薬剤

本研究で使用している、経口貧血改善薬 (K-11706、FG-2216*) は興和株式会社 (KOWA, Tokyo, Japan) より供給されたものを使用した。本研究で使用している FG とは Fibrogen 社で開発された経口貧血改善薬 FG-2216 (Fibrogen, Inc., CA, USA) の薬剤特許情報を元に、KOWA にて同じ化合物を生成したものである。本薬剤が FG-2216 と同様の効果を示すことは同社にて確認済みであるが、特許の関係上「FG-2216」とは記載できない。そこで本研究で使用した化合物は「FG-2216*」と記載する。

b. 実験動物の造血促進処理と血算測定

本研究では、7 週齢の ICR マウス (CLEA JAPAN, Tokyo, Japan) を解析に用いた。マウスは K-11706 投与群・FG-2216*投与群・低酸素曝露 (Hypoxia) 群と遺伝子組み換えヒトエリスロポエチン製剤 (rhEPO) 投与群と対照群に分類した。K-11706 投与群は K-11706 を 100%polyethylene glycol (PEG, polyethylene glycol 400, average molecular weight 360-440; WAKO, Tokyo, Japan) 150 μ L に溶解し、3mg/kg の濃度で 28 日間胃管ゾンデを用いて経口投与した。FG-2216*投与群は FG-2216*を 0.5% carboxy methylcellulose (CMC) 溶液 150 μ L に溶解し、100mg/kg の濃度で 5 日間胃管ゾンデを用いて経口投与した。rhEPO (EPOGIN; TUGAI, Tokyo, Japan) 投与群は 4U/g を一日おきに 6 回腹腔内注射にて投与した。Hypoxia 群は低酸素チャンバー (NATUME, Tokyo, Japan) にて 13.6%O₂ (高度 3500m に相当) 条件下、曝露時間 20 時間/日で 4 日間曝露した。また各群の対照群として、薬剤群に対しては各薬剤の媒体のみを投与したマウスを、Hypoxia 群においては通常状態で飼育したマウスを用いた。各処理の終了後、マウス眼窩から採血を行い、血球計測器 (celltac α ; NIHONKODEN, Tokyo, Japan) によって赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン濃度 (Hb)、ヘマトクリット値 (Ht) を測定した (K-11706 対照群 n = 13、K-11706 投与群 n = 13、FG-2216*対照群 n = 9、FG-2216*投与群 n = 7、Hypoxia 対照群 n = 11、Hypoxia 群 n = 16、rhEPO 対照群 n = 10、rhEPO 投与群 n = 6)。

c. 血漿内高存在量タンパク質の除去と血漿サンプルの作製

マウス血漿は、マウスから採取した血液に EDTA を加え、3000 rpm、20 分 25° C の条件で遠心分離を行い採取した。血漿 25 μ l は albumin/IgG affinity removal column (Calbiocame, Tokyo, Japan) を用いて、血漿内高存在量タンパク質である albumin と IgG タンパク質を除去した後、ultrafiltration column (Sartorius, Gottingen, Germany) を用いて 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) への溶媒置換を行った。

d. 逆相カラムと高速液体クロマトグラフィーを用いたマウス血漿タンパク質の分画 ; Reversed phase-High performance liquid chromatography (RP-HPLC)

マウス血漿分画には逆相カラム (3.0 ID $\times$ 150 mm, Intrada WP-RP; Imtakt Corp., Kyoto, Japan) を接続した HPLC システム (Nanospace SI-2; Shiseido Fine Chemicals, Tokyo, Japan) を用いた。HPLC 動作設定は基本流量 400 μ L/min、65 分を 1 サイクルとし、溶媒は 0.1% TFA (solvent A) と 90% acetonitrile / 0.08% TFA (solvent B) を用いた。サンプル採取時間は動作時間 17.8 から 37.8 分とし、30 秒ずつ 40 分画に分けて採取した。採取したサンプルは凍結乾燥した。

e. SDS-PAGE と二次元電気泳動 (Agarose two-dimensional electrophoresis : 2-DE) 解析

SDS-PAGE は HPLC 分画サンプルを PAGE sample buffer (PSB) によって溶解し、10-20% gradient アクリルアミドゲル (Perfect NT Gel W; DRC Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて行った。分画サンプルは、各分画によってタンパク質量にばらつきがあるため、Fraction 1-5 を混ぜて、分画サンプル No. 1 に、Fraction 6-8 は分画サンプル No. 6、Fraction 26-30、31-35、36-40 を各分画サンプル No. 26、31、36 とした。二次元電気泳動用の分画サンプル溶解液には、イモビロン抽出液 [7 M urea, 2 M thiourea, 0.1 M dithiothreitol, 2.5% Pharmalyte (pH 3-10), 2% CHAPS, and Complete Mini EDTA-free (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)] を用いた。二次元電気泳動に使用したゲルは、1 次元目に円柱状のガラス管 (長さ 7cm、内径 2mm) 充填したアガロースゲル (IEF) を、二次元目には 10-20% gradient アクリルアミドゲル (Perfect NT Gel W 2DE; DRC Co., Ltd.) を用いて行った。泳動後のゲルは Coomassie brilliant blue (CBB, PhastGel Blue R; GE Healthcare,

Little Chalfont, UK) 染色液にて染色を行った。

f. タンパク質スポットおよびバンドの切り出しと、質量分析計によるスポットタンパク質の同定

SDS-PAGE または 2-DE gel から切り出されたゲル片は、脱色液 (destained with 50% acetonitrile (ACN) / 50 mM NH_4HCO_3 , dehydrated with 100% ACN) にて脱色を行い、洗浄後、ゲル内タンパク質消化液 [0.5 ng/ μL trypsin (Roche Diagnostics)、50 mM Tris-HCl buffer (pH 9.1)] を投与し 37° C で 18 時間ゲル内タンパク質消化を行った。消化後、ゲル内タンパク質を抽出液 (5% formic acid/10% ACN) によって抽出し、0.1% TFA 溶液にて最終サンプル量 50 μL した。作成したサンプルは液体クロマトグラフィー質量分析器 (LC-MS/MS) である Nanospace SI-2 (Shiseido Fine Chemicals, Tokyo, Japan)、HPLC system (LCQ Deca: ThermoQuest, CA, USA と ion-trap mass spectrometer (Thermo Finnigan, CA, USA) の複合機器によってアミノ酸シーケンスを行い、タンパク質データベースによって解析物の同定を行った。

g. ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE によるタンパク質の分離は、血漿サンプル 0.03-0.06 μg を PSB に溶解し、12.5% アクリルアミドゲルを用いて行った。タンパク質のゲルからメンブレンへの転写は PVDF メンブレンを用いて、10V にて 15 時間行った。ブロッキングは 5% milk/TBS-T (TBS with 0.1% Tween) を用い室温で 1 時間。抗体の免疫反応は、Prothrombin 抗体 (goat Polyclonal; Santa cruz biotechnology, CA, USA) を TBS-T で 10000 希釈、Fetuin-B 抗体 (Seep Polyclonal; Abcam, MA, USA) を 1000 倍希釈し、室温で 2 時間反応させた。二次抗体は goat-IgG secondary antibody または seep-IgG secondary antibody (Jackson Immuno Research, PA, USA) を TBS-T で 20000 倍希釈して、室温で 1 時間反応後、洗浄を行い ECL kit (Milipore, CA, USA) にて化学発光させた。

h. 統計解析

それぞれのデータは平均値±標準誤差で表されている。統計解析は Tukey-Kramer method である Post-hoc test を用いて行い、それぞれ $p < 0.05$ を有意とした。

3. 結果

a. マウス血漿を用いたプロテオーム解析

本実験で用いられたプロテオーム解析手法は、川島ら²⁶⁾によって報告された、血漿中の微量タンパク質の検出に特化した方法を参考にした。マウスから採取された血漿は、アルブミン/IgG 除去、RP-HPLC による血漿タンパク質の一次分離を行った後、薬剤投与群と対照群のマウス血漿タンパク質の発現差異を、すべての分画サンプルで確認するために、各分画サンプル 5 μ を用いて SDS-PAGE を行った。発現差異が確認された分画は解析量を増やして再度、SDS-PAGE および、fraction 12, 17 に関しては含有タンパク質量が多かったため、2 次元電気泳動 (2-DE) によるタンパク質の分離を行った。発現差異が確認された分画のタンパク質分離像を図 1 および図 2 に示す。その結果、42 個のタンパク質バンド・スポットの変動を確認した。そのうち 24 個のタンパク質バンドおよびスポットは K-11706 投与により増加しており (図 1 spot ID No. 4, 6, 7, 9-11、図 2 spot ID No. 3-18, 22, 23)、18 個のタンパク質に関しては K-11706 投与により減少していた (図 1 spot ID No. 1-3, 5, 8, 13-18、図 2 spot ID No. 1, 2, 19-21)。すべての Fraction におけるタンパク質バンド・スポットの比較検討を行った後、図上、矢印で示されたタンパク質スポットは切り出し、トリプシンでのゲル内消化によるタンパク質の抽出を行い、質量分析計でのアミノ酸解析およびタンパク質データベースによって、タンパク質バンド・スポットの同定を行った。同定されたタンパク質名は表 1 および 2 に示す。

b. マーカー候補タンパク質のバリデーション

血漿内に含まれるタンパク質は、約 90% を albumin や IgG タンパク質によって占められている²⁷⁾。さらに凝固因子などの、血漿の主要タンパク質と呼ばれるものを含めると血漿内タンパク質の 99% がそれらで占められることとなる²⁸⁾。これら主要タンパク質は疾患や薬剤投与によって、その発現量および血漿内存在量に変動することもあるが、通常の状態でも発現を確認でき発現量の個体差が大きいことから、その発現量だけで比較を行うバイオマーカータンパク質として使用することは難しいとされている^{29, 30)}。

そこで私たちは、同定されたタンパク質の中からマウス血漿に少量含まれるタンパク質である

Fetuin-B と Prothrombin に注目し、マウス個体数を増加させ、ウエスタンブロッティング法 (WB) を用いた発現量のバリデーションを行った。その結果 Fetuin-B、Prothrombin 共に、normal、vehicle と比較して、K-11706 投与によって有意に (図 3A、B 4.17-、7.18- 倍、 $p<0.01$) 発現量が増加していることが確認された。さらに、K-11706 投与以外の方法で EPO 発現増加を促進させるサンプルとの比較を行うため、rhEPO 投与群と低酸素暴露群との比較を行った。その結果、Fetuin-B は K-11706 投与特異的に有意な発現量の増加 (図 3C、D 0.62-、0.31- 倍、 $p<0.01$) を確認し、その発現量の増加が K-11706 投与特異的なものであることが示された。しかしながら、Prothrombin 発現の増加は低酸素暴露群との比較において K-11706 投与特異性が確認されたものの (図 3A、B 0.23- 倍、 $p<0.01$)、rhEPO 投与群との比較においては有意な差異は認められなかった (図 3C、D)。

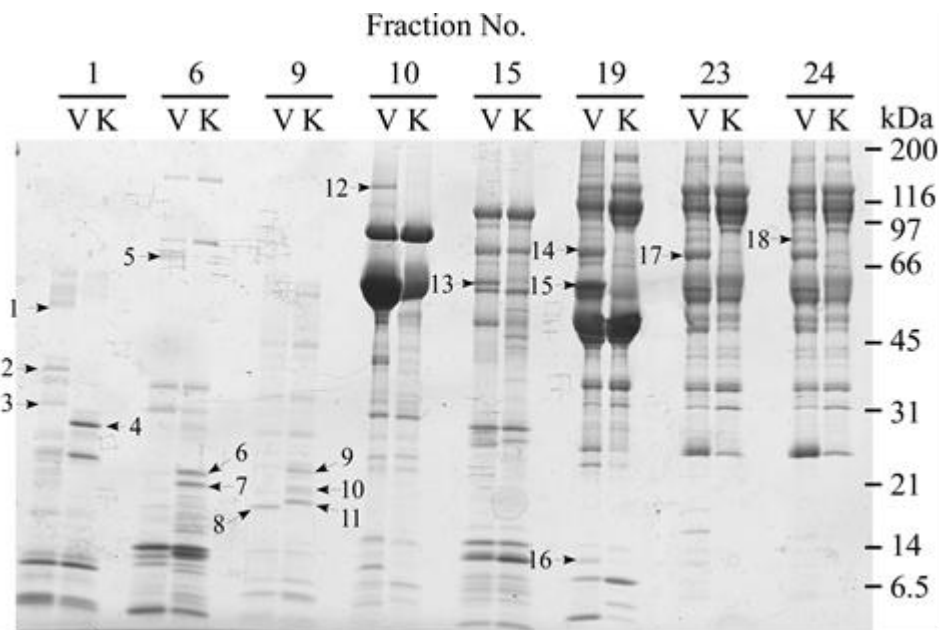


図 1. SDS-PAGE 解析によって K-11706 投与特異的に血漿内存在量の変動が確認されたタンパク質
 SDS-PAGE 後、CBB 染色を行った。V: Vehicle を投与したマウス血漿サンプル、K: K-11706 を投与したマウス血漿サンプル（各レーンのサンプル数は n=3 を混合した）。

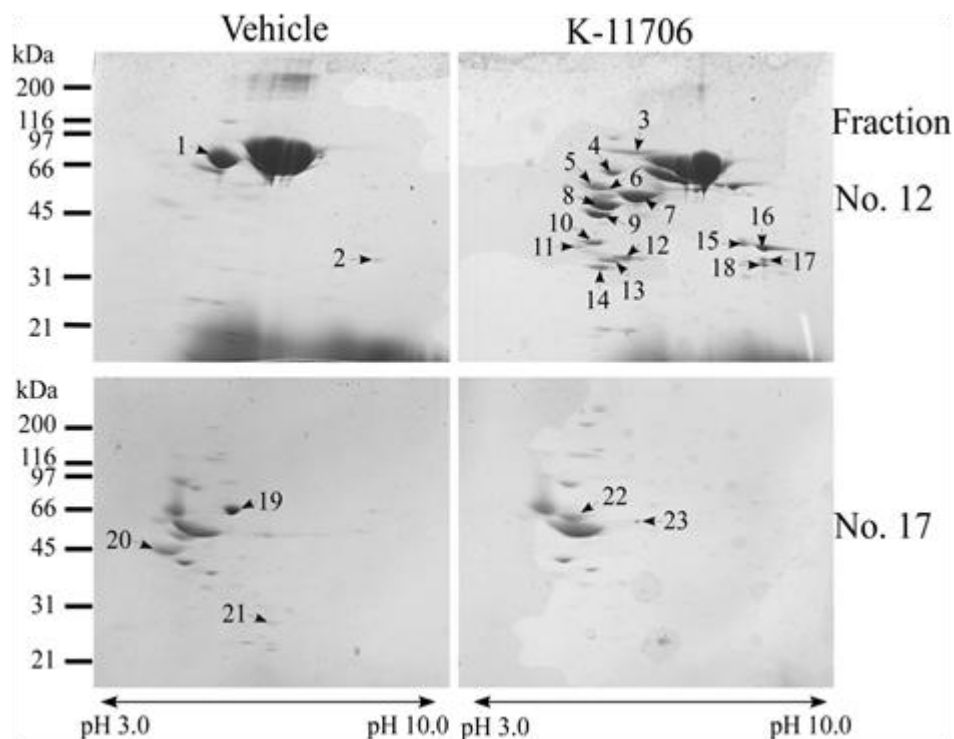


図 2. 2-DE での解析によって K-11706 投与特異的に血漿内存在量の変動が確認されたタンパク質
 2-DE 後、CBB 染色を行った。Vehicle を投与したマウス血漿タンパク質泳動像（左）、K-11706 投与したマウス血漿タンパク質泳動像（右）（各パネルのサンプル数は n=3 を混合した）。

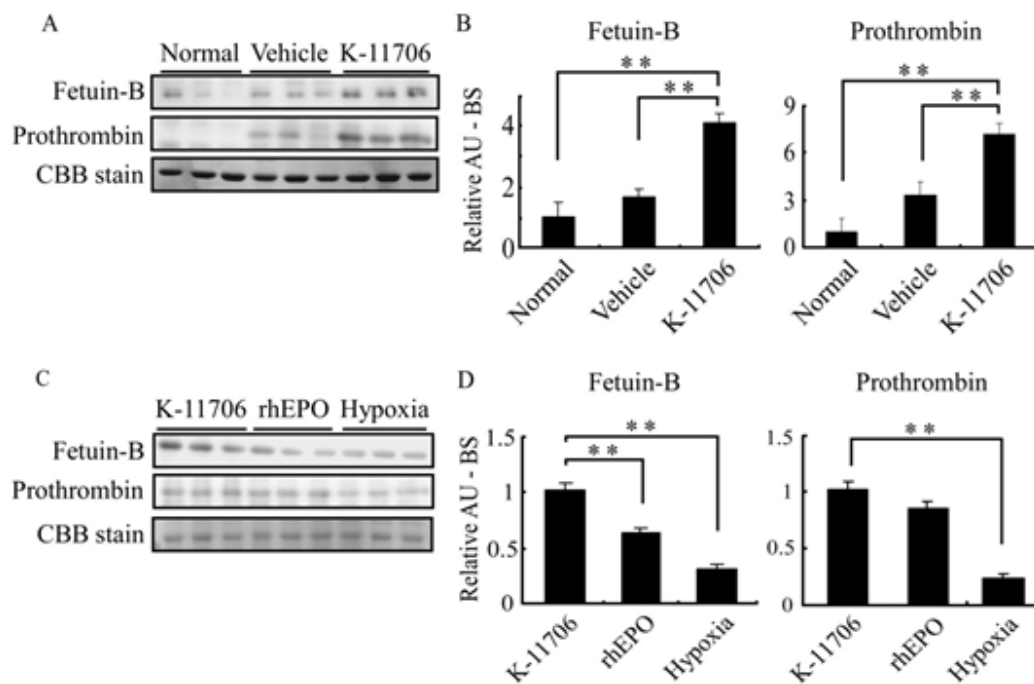


図 3. ウェスタンブロット法を用いたマーカー候補タンパク質のバリデーション結果

A; 各群における Fetuin-B、Prothrombin の発現 (対照群 Normal; non-treatment control、vehicle; vehicle control との比較) B; A の解析より得られたタンパク質バンドの数値化グラフ (各群 n=6) C; 各群における Fetuin-B、Prothrombin の発現 (陽性対照群との比較) D; C の解析より得られたタンパク質バンドの数値化グラフ (各群 n=3)。Error bar represent 1 SE. ** $p<0.01$

表 1. SDS-PAGE により確認された K-11706 投与特異的に発現変動を示すタンパク質

No.	Accession	Reference	Concentration	Score	Coverage [%]
1	Q61129	Complement factor I precursor	down	80.21	10.88
2	Q08284	Fibrinogen A-alpha-chain	down	74.22	20.99
3	P19221	Coagulation factor II / Prothrombin	down	60.16	7.74
4	Q08284	Fibrinogen A-alpha-chain	up	74.21	18.73
5	P08607	C4b-binding protein precursor	down	40.11	11.99
6	Q8K0E8	Fibrinogen beta chain	up	110.24	16.27
7	Q8VCM7	Fibrinogen gamma chain precursor	up	48.19	17.66
8	P19221	Coagulation factor II / Prothrombin	down	36.14	5.61
9	Q8VCM7	Fibrinogen gamma chain precursor	up	60.22	12.80
10	Q8VCM7	Fibrinogen gamma chain precursor	up	46.23	14.35
11	Q8VCM7	Fibrinogen gamma chain precursor	up	46.09	11.34
12	P06909	Complement factor H precursor	down	54.18	7.05
13	P07724	Albumin	down	204.20	29.78
14	Q61838	Alpha-2-macroglobulin precursor	down	226.26	14.57
15	P07724	Albumin	down	258.21	36.27
16	P02088	Hemoglobin subunit beta-1	down	120.19	57.81
17	Q61838	Alpha-2-macroglobulin precursor	down	166.22	10.89
18	Q61838	Alpha-2-macroglobulin precursor	down	130.29	7.71

Coverage; sequence coverage.

Concentration; protein concentration increased or decreased in plasma treated with K-11706

表 2. 2-DE により確認された K-11706 投与特異的に発現変動を示すタンパク質

No.	Accession	Protein name	Concentration	Score	Coverage [%]
1	P07724	Serum albumin precursor	down	264.23	38.37
2	Q92111	Serotransferrin precursor / Transferrin	down	168.24	18.95
3	P19221	Prothrombin precursor	up	200.19	22.98
4	P07724	Serum albumin precursor	up	240.25	28.33
5	Q9QXC1	Fetuin-B precursor	up	160.23	31.85
6	Q9QXC1	Fetuin-B precursor	up	158.25	28.33
7	Q8K0E8	Fibrinogen beta chain precursor	up	328.24	52.26
8	Q8VCM7	Fibrinogen gamma chain precursor	up	284.24	59.00
9	Q8K0E8	Fibrinogen beta chain precursor	up	228.24	30.75
10	Q8K0E8	Fibrinogen beta chain precursor	up	156.22	23.27
11	Q8VCM7	Fibrinogen gamma chain precursor	up	216.25	29.98
12	Q8VCM7	Fibrinogen gamma chain precursor	up	290.24	29.98
13	Q8VCM7	Fibrinogen gamma chain precursor	up	220.27	29.06
14	Q8VCM7	Fibrinogen gamma chain precursor	up	256.25	30.58
15	Q8K0E8	Fibrinogen A-alpha-chain	up	102.23	18.01
16	Q8K0E8	Fibrinogen A-alpha-chain	up	168.21	23.08
17	Q8K0E8	Fibrinogen A-alpha-chain	up	156.48	18.44
18	Q8K0E8	Fibrinogen A-alpha-chain	up	130.22	18.27
19	P07724	Serum albumin precursor	down	146.23	22.57
20	P29699	Alpha-2-HS-glycoprotein precursor / Fetuin-A	down	76.24	14.33
21	P01837	Ig kappa chain C region	down	50.19	49.99
22	P32261	Antithrombin-III precursor / ATIII	up	288.4	42.63
23	Q8K0E8	Fibrinogen beta chain precursor	up	280.24	41.95

Coverage; sequence coverage.

Concentration; protein concentration increased or decreased in plasma treated with K-11706

4. 考察

本実験でのプロテオーム解析の結果、K-11706 投与によって凝固因子や血漿構成タンパク質、免疫タンパク質などを中心としたタンパク質の発現変化を確認した。K-11706 は造血を促す薬剤であるため、EPO 発現増加によって生じるタンパク質の発現変化ではなく、K-11706 投与特異的な変化をとらえる必要がある。そこで私たちは、EPO 産生を促進させる低酸素暴露群、rhEPO 投与群等の陽性対照群を作成し、K-11706 投与群とのタンパク質発現比較を行った。その結果、Fetuin-B は陽性対照群との比較においても、K-11706 投与特異的な発現増加を確認した。しかしながら、prothrombin は低酸素暴露群との比較においては有意に増加していたものの、rhEPO 群との比較においては有意な変化が確認されなかった。これらの結果から、Fetuin-B が K-11706 投与特異的に発現変動を起こすことが示唆され、バイオマーカー候補タンパク質としての可能性を示した。

Fetuin は主に肝臓で産生され、血中に放出される、血漿タンパク質として知られており³¹⁾、通常は血液中のバリウムイオンと結合してその輸送、血清カルシウム濃度の恒常性および鉱化作用に働きかけることが報告されている³¹⁻³⁴⁾。さらに、外傷や炎症等が起きるとマクロファージによって吸収されるため、その存在量は減少する³¹⁻³⁴⁾。また近年、Fetuin-A と Fetuin-B の存在が報告されており、上記の働きは主に Fetuin-A が担っていること³⁵⁾、Fetuin-B については cystatin-like superfamily のメンバーであり、皮膚扁平上皮がん細胞において、細胞増殖の抑制に関与していることが報告されているなど³⁵⁾、Fetuin-A と Fetuin-B は別の働きを担っている可能性が示唆されている。しかしながら、Fetuin-B の機能を解析した報告は少なく、その機能は未知となっている。また、本研究における K-11706 投与と Fetuin-B の発現増加における関係性も、現在のところ不明である。そこで今後は、このメカニズムを解明することが必要であると考えている。

また、FG-2216*投与の結果は未発表データのため、詳細は控えさせて頂くが、血漿プロテオーム解析により、対照群に比べ投与群にて血漿内発現量が変化した 17 種類のタンパク質を同定した。そして現在、K-11706 の解析と同様に陽性対照群を作製し、比較検討を行っている。

本実験結果は、薬剤の使用を確認するような有能なバイオマーカーの探索に、プロテオーム解析はとても優れた方法であることが示され、また本解析によって発見された Fetuin-B は今後、K-11706 のような GATA 阻害剤の使用を確認するドーピングマーカーとして使用できる可能性を示唆した。

しかしながら、本研究は実験動物段階の基礎研究であり、将来的な研究としてヒトを対象とした検討は必須である。そこで今後は、本研究結果のヒトでの再現性検討および、その他、様々な薬剤についても同様の解析を行い、バイオマーカーを用いたドーピング検査の確立を目指して研究を行っていきたいと考えている。

5. 結語

薬剤使用の有無を判断するタンパク質バイオマーカーの探索に、プロテオーム解析のようなタンパク質発現の網羅的解析が有用なことを示し、本実験結果より得られたタンパク質 Fetuin-B が K-11706 のような GATA inhibitor の使用の有無を示す有能なバイオマーカーとなり得ることが示唆された。

6. 謝辞

本研究を行う貴重な機会を与えてくださりました、上月スポーツ・教育財団関係者の皆様に深く感謝申し上げます。

7. 参考文献

- (1) Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med.* 43): 649-659, 2004.
- (2) Beru N, McDonald J, Lacombe C. Expression of the erythropoietin gene. *Mol Cell Biol.* 6: 2571-2575, 1986.
- (3) La Ferla K, Reimann C, Jelkmann W, Hellwig-Bürgel T. Inhibition of erythropoietin gene expression signaling involves transcription factors GATA-2 and NF- κ B. *FASEB J.* 16: 1811-1813, 2002.
- (4) Imagawa S, Yamamoto M, Miura Y. Negative regulation of the erythropoietin gene expression by the GATA transcription factors. *Blood.* 89:1430-1439, 1997.
- (5) Obara N, Suzuki N, Kim K, Nagasawa T, Imagawa S, Yamamoto M. Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood.* 111: 5223-5232, 2008.
- (6) Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 4304-4308, 1993.
- (7) Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol.* 12: 5447-5454, 1992.
- (8) Schuster SJ, Badiavas EV, Costa-Giomi P, Weinmann R, Erslev AJ, Caro J. Stimulation of erythropoietin gene transcription during hypoxia and cobalt exposure. *Blood.* 73: 13-16, 1989.
- (9) Gareau R, Caron C, Brisson GR. Exercise duration and serum erythropoietin level. *Horm Metab Res.* 23: 355, 1991.
- (10) Stray-Gundersen J, Chapman RF, Levine BD. Living high-training low altitude training improves sea level performance in male and female elite runners. *J Appl Physiol.* 91: 1113-1120, 2001.
- (11) Wehrlin JP, Zuest P, Hallén J, Marti B. Live high-train low for 24 days increases hemoglobin mass and red cell volume in elite endurance athletes. *J Appl Physiol.* 100: 1938-1945, 2006.
- (12) Dick FW. Training at altitude in practice. *Int J Sports Med.* 1: 203-206, 1992.
- (13) Gareau R, Audran M, Baynes RD, Flowers CH, Duvallet A, Senfical L, Brisson GR. Erythropoietin abuse in athletes. *Nature.* 14: 113, 1996.
- (14) Eichner ER. Blood doping : infusions, erythropoietin and artificial blood. *Sports Med.* 37: 389-391, 2007.
- (15) Ivan M, Haberberger T, Gervasi DC, Michelson KS, Gunzler V, Kondo K, Yang H, Sorokina I, Conaway RC, Conaway JW, Kaelin WG Jr. Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 299: 13459-13464, 2002.
- (16) Hsieh MM, Linde NS, Wynter A, Metzger M, Wong C, Langsetmo I, Lin A, Smith R, Rodgers GP, Donahue RE, Klaus SJ, Tisdale JF. HIF prolyl hydroxylase inhibition results in

- endogenous erythropoietin induction, erythrocytosis, and modest fetal hemoglobin expression in rhesus macaques. *Blood*. 110: 2140–2147, 2007.
- (17) Umetani M, Nakao H, Doi T, Iwasaki A, Ohtaka M, Nagoya T, Matakai C, Hamakubo T, Kodama T. A novel cell adhesion inhibitor, K-7174, reduces the endothelial VCAM-1 induction by inflammatory cytokine, acting through the regulation of GATA. *Biochem Biophys Res Commun*. 272: 370–374, 2000.
 - (18) Imagawa S, Nakano Y, Obara N, Suzuki N, Doi T, Kodama T, Nagasawa T, Yamamoto M. A GATA-specific inhibitor (K-7174) rescues anemia induced by IL-1b, TNF-a, or L-NMMA. *FASEB J*. 17: 1742–1744, 2003.
 - (19) Nakano Y, Imagawa S, Matsumoto K, Stockmann C, Obara N, Suzuki N, Doi T, Kodama T, Takahashi S, Nagasawa T, Yamamoto M. Oral administration of K-11706 inhibits GATA binding activity, enhances hypoxia-inducible factor 1 binding activity, and restores indicators in an in vivo mouse model of anemia of chronic disease. *Blood*. 104: 4300–4307, 2004.
 - (20) Elliott S. Erythropoiesis-stimulating agents and other methods to enhance oxygen transport. *Br J Pharmacol*. 154: 529–541, 2008.
 - (21) Jelkmann, W. Erythropoiesis stimulating agents and techniques: a challenge for doping analysis. *Curr. Med. Chem*. 16: 1236–1247, 2009.
 - (22) Imagawa S, Matsumoto K, Horie M, Ohkoshi N, Nagasawa T, Doi T, Suzuki N, Yamamoto M. Does K-11706 enhance endurance performance and why? *Int J Sports Med*. 28: 928–933, 2007.
 - (23) Lasne F, Martin L, de Ceaurriz J, Larcher T, Moullier P, Chenuaud P. “Genetic Doping” with erythropoietin cDNA in primate muscle is detectable. *Mol Ther*. 10: 409–410, 2004.
 - (24) Beiter T, Zimmermann M, Fragasso A, Armeanu S, Lauer UM, Bitzer M, Su H, Young WL, Niess AM, Simon P. Establishing a novel single-copy primer-internal intron-spanning PCR (spiPCR) procedure for the direct detection of gene doping. *Exerc Immunol Rev*. 14: 73–85, 2008.
 - (25) Reiter B, Fulford J, Marshall VM, Yarrow N, Ducker M, Knutsson M. An evaluation of the growth promoting effect of the lactoperoxidase system in newborn calves. *Anim Prod*. 32:297–306, 1981.
 - (26) Kawashima Y, Fukuno T, Satoh M, Takahashi H, Matsui T, Maeda T, Kadera Y. A simple and highly reproducible method for discovering potential disease markers in low abundance serum proteins. *J Electrophoresis*. 57: 13–18, 2009.
 - (27) Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*. 1: 845–867, 2002.
 - (28) Echan LA, Tang HY, Ali-Khan N, Lee K, Speicher DW, Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma. *Proteomics*. 5: 3292–3303, 2005.
 - (29) Guerrier L, Righetti PG, Boschetti E, Reduction of dynamic protein concentration range of biological extracts for the discovery of low-abundance proteins by means of hexapeptide ligand library. *Nat Protoc*. 3: 883–890, 2008.

- (30) Kawashima Y, Fukutomi T, Tomonaga T, Takahashi H, Nomura F, Maeda T, Koder Y. High-yield peptide-extraction method for the discovery of subnanomolar biomarkers from small serum samples. *J Proteome Res.* 9: 1694-1705, 2010.
- (31) Osawa M, Umetsu K, Sato M, Ohki T, Yukawa N, Suzuki T, Takeichi S. Structure of the gene encoding human α 2-HS glycoprotein (AHSG). *Gene.* 196: 121-125, 1997.
- (32) Dziegielewska KM, Andersen NA, Saunders NR. Modification of macrophage response to lipopolysaccharide by fetuin. *Immunol Lett.* 60: 31-35, 1998.
- (33) Wang H, Zhang M, Bianchi M, Sherry B, Sama A, Tracey KJ. Fetuin (α 2-HS glycoprotein) opsonizes cationic macrophage deactivating molecules. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 14429-14434, 1998.
- (34) Banine F, Gangneux C, Lebreton JP, Frebourg T, Salier JP. Structural and functional analysis of the 5' -transcription control region for the human α 2-HS glycoprotein gene. *Biochim Biophys.* 1398: 1-8, 1998.
- (35) Hsu SJ, Nagase H, Balmain A. Identification of Fetuin-B as a member of a cystatin-like gene family on mouse chromosome 16 with tumor suppressor activity. *Genome.* 47: 931-946, 2004.