

厚生労働科学研究研究費補助金

感覚器障害及び免疫・アレルギー等 研究事業

眼科領域におけるプロテオーム解析法による診断法の確立と疾患治療法への展開
(H12-感覚器-002)に関する研究

平成14年度 総括研究報告書

平成12年度～14年度 総合研究報告書

主任研究者 山下 英俊

平成15(2003)年 4月

1/3冊

目 次

I. 総括研究報告

眼科領域におけるプロテオーム解析法による診断法の確立と疾患治療法への展開
(H12-感覚器-002)に関する研究 1

山下英俊

II. 総合研究報告

眼科領域におけるプロテオーム解析法による診断法の確立と疾患治療法への展開
(H12-感覚器-002)に関する研究 10

山下英俊

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 21

IV. 研究成果の刊行物・別刷 別冊

厚生科学研究費補助金（感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業）
総括研究報告書

眼科領域におけるプロテオーム解析法による診断法の確立と疾患治療法への展開に関する研究

主任研究者 山下 英俊 山形大学医学部眼科学講座 教授

研究要旨

目的：プロテオーム解析法を用い、眼内液における蛋白質の発現パターンを体系化し、網羅的に記載して検討する。方法：採取されたサンプルの2次元電気泳動によりゲルを作製し、銀染色でスポットを検出する。スポットを切り出し、ゲル内消化後QTOF（四重極飛行時間型質量分析装置）で蛋白質を同定する。結果：黄斑円孔、糖尿病網膜症患者から手術中に得た硝子体液、血清の解析を行い、多くの蛋白質を同定した。硝子体液において黄斑円孔では約250のスポットを検出し、このうち78のスポットにおいて18個の蛋白質を同定した。糖尿病網膜症においては38個の蛋白質を同定し、このうち32個については血清由来と考えられたが、2個については血清サンプルにおいても、黄斑円孔硝子体サンプルでも同定されなかった。結論：糖尿病網膜症の硝子体においては、眼内血管透過性亢進による血清由来蛋白質が大部分を占め、微量ではあるが眼局所で産生されている蛋白質が眼内においてその発現を亢進させている。プロテオーム解析は疾患の病態に関与する蛋白質発現異常を網羅的に検討できる検査法としてその有用性が示されつつある。

分担研究者：

三嶋 弘 広島大学大学院医歯薬総合
研究科視覚病態学 教授
皆本 敦 広島大学大学院医歯薬総合
研究科視覚病態学 助教授
高村 浩 山形大学医学部眼科 助教授
吉里勝利 広島大学大学院理学研究科
教授

の蛋白質の発現、あるいは正常な蛋白質の発現パターンの消失を体系的、網羅的に記載し把握することにより複雑な病態を検討することが可能となる。これまでに応用されてきた検査法は特定の既知の因子のみを決め打ち的に検討する方法であり、ターゲットとした極めて限られた遺伝子発現や病原微生物を検討できるのみであり、実際の病態では極めて多くの因子が絡み合っただ病的な状態を作り出すのを体系的、網羅的に記載して検討することができなかった。本研究では多種多様な原因物質、因子が絡み合った病態において、疾患の病態に直接関与する蛋白質の発現異常を検討することにより実際の疾患異常の検討を行う。

昨年までに黄斑円孔の硝子体において17個、糖尿病網膜症の硝子体において27個の蛋白質を同定した。本年度は、検体試料の調整方法、スポット解析の各段階において、手技の改良を加え解析の精度、感度を向上させ、より多くの蛋白質の同定を目的に硝子体サンプルの解析を行った。またこれまでに確立された方法を用いて生理活性物質濃度を測定して比較した。

A. 研究目的

眼内液における蛋白質の発現パターンを体系化し、網羅的に検討する検査法を確立する。ポストゲノム時代に重要とされるプロテオミクス解析を先取りし臨床応用を目指すものである。

従来、眼疾患の診断においては、全身的検査、眼独自の病変検査（光学的診断法、放射線医学診断法などの非侵襲的検査法）、眼腫瘍などにおける病理組織学的検査が行われてきた。近年、分子生物学の進歩により微量の眼由来サンプルから病的遺伝子発現や病原微生物の同定が可能となったが、眼科医療への応用は限られている。

これまで眼科領域では、サンプル量が少なく限られた研究しか行われていない。近年のプロテオーム解析の進歩により、眼内液（前房水、硝子体液）、涙液を解析対象として多くの蛋白質の発現を体系的、網羅的に記載し検討することが可能となってきた。即ち、眼疾患に伴う種々

B. 研究方法

1. 対象

学内倫理委員会に提出し承認を受けた、説明および同意取得の方法に従って、手術前に対象

患者からインフォームドコンセントを得られた場合に、サンプルを採取した。

2. 対象疾患

プロテオーム解析に用いたのは硝子体手術の適応であった、

- 1) 黄斑円孔
特発性黄斑円孔27例27眼
- 2) 糖尿病網膜症
増殖糖尿病網膜症・糖尿病黄斑浮腫
35例35眼

計62例62眼において以下の方法によりサンプルを採取した。

ELISA法での解析にもちいたのは

24例26眼(特発性黄斑円孔5眼、特発性黄斑上膜4眼、増殖糖尿病網膜症13眼、網膜静脈閉塞症4眼)であった。

3. サンプル採取の方法

血清: 手術に際してルーチンとして確保された血管から2~3mlの末梢血を採取し遠心分離により血清サンプルを得た。

前房水: 硝子体・白内障同時手術例においては白内障手術に際して角膜輪部から注射針を用いて0.1~0.2mlの前房水を採取した。

硝子体: 硝子体切除時に硝子体手術器械付属の硝子体カッターを用いて0.5~0.8mlの硝子体液を採取した。

すべてのサンプルは解析に供するまで-80℃で凍結保存された。

4. 解析方法-1: プロテオーム解析(図1)

- 1) サンプルにlysis buffer(7mol/L urea, 2 mol/L thiourea, 4%3-3-cholamidopropyl-dimethylammonio-1-propanesulfonate, 2%ampholine pH3.5-10(Pharmacia Hoefer), 1%dithiothreitol)を加え量を400 μ lとした。

一部のサンプルは、サンプルの大部分を占めるアルブミン、IgGの除去カラムを用いアルブミン、IgGの除去後にlysis bufferを加えた。

- 2) Immobile DryStrip(pH4-7あるいは3-10, 18 cm, Pharmacia Hoefer)にサンプルを一夜かけて膨潤させた。
- 3) 1次元目の等電点電気泳動は、Multiphor II electrophoresis chamber(Pharmacia Hoefer)を用い行った。
- 4) 2次元目のSDS-PAGEはIso-Dalt system(Pharmacia Hoefer)を用いゲルを作製した。
- 5) 銀染色を行い、ゲルのスポットを検出した。
- 6) 検出されたスポットはスキャナーでコンピュータに画像を取り込み、Melanie II 2-D PAGE software packageを用い解析した。
- 7) 同じ疾患で再現性のあるスポットをゲルカッターで切り出し脱銀後、トリプシンで酵素消化しペプチドを抽出した。
- 8) Q-TOF(Micromass)(4重極飛行時間型質量分析装置)、Voyager TOF-MS(PreSeptive

Biosystems)を用いアミノ酸配列を決定後、データベース(GenomeNet WWW server of Kyoto University, Japan)で検索し蛋白質を同定した。

解析方法-2

ELISA法にてIL-6、VEGFの濃度を測定した。

(倫理面への配慮)

眼内液は手術に際して除去するかまたは手術の過程で流出するもののみを用いる。眼内液の採取に際しては必要最小限になるように努める。また採取を予定する患者には手術前に患者に本研究の意義、目的、方法を説明し、文書で承諾を得た患者のみからの液のみをサンプルとして用いる(informed consentの徹底)。

C. 研究結果

1. 解析結果の概要

- 1) 黄斑円孔の硝子体サンプルにおいて約250のスポットを検出し、その内78スポット、18個の蛋白質を同定した(図2)。
- 2) 糖尿病網膜症の硝子体サンプルにおいて約650のスポットを検出し、36個の蛋白質を同定した(図3、図4)。
- 3) Protein AによるIgG除去後のサンプルにおいて糖尿病網膜症の硝子体のみを検出される蛋白質(catalase, enolase)を同定した。(図5)

2. 同定された蛋白質について

- 1) serum albumin
- 2) transthyretin
- 3) antithrombin-III
- 4) α 1-antichymotrypsin
- 5) α 2-HS glycoprotein
- 6) hemopexin
- 7) α -1-antitrypsin
- 8) apolipoprotein A-1
- 9) APO-J
- 10) fibrinogen γ chain
- 11) haptoglobin-1
- 12) IgG heavy chain
- 13) IgG light chain
- 14) transferrin
- 15) prostaglandin-D2 synthase
- 16) glutathion peroxidase
- 17) interphotoreceptor retinoid binding-protein
- 18) pigment epithelium-derived factor (PEDF)
- 19) α 2-macroglobulin
- 20) IgA S Chain
- 21) α 1-B-glycoprotein
- 22) α 1-microglobulin
- 23) C3 α
- 24) ceruloplasmin
- 25) apolipoprotein E

- 26) complement C4
- 27) complement factor D
- 28) PRBP 29) complement factor I
- 30) IgM heavy chain
- 31) β 2-glycoprotein
- 32) Zn- α -glycoprotein
- 33) kininogen
- 34) apolipoprotein D
- 35) cathepsin D
- 36) prothrombin
- 37) catalase
- 38) enolase

一連の解析により以上38個の蛋白質が硝子体液から同定された。

3. 糖尿病網膜症に関連する蛋白質について
黄斑円孔、黄斑上膜ではIL-6、VEGFの濃度は 15.0 ± 35.2 pg/ml、全例測定限界以下 (15.6 pg/ml以下)であった。増殖糖尿病網膜症、網膜静脈閉塞症ではそれぞれ 131.5 ± 142.8 pg/ml、 1422.7 ± 2263.3 ng/mlであった。IL-6、VEGFともに後者のグループが前者に比較して高値を示した。プロテオーム解析で検出できた蛋白質のなかにIL-6、VEGFは含まれておらず、今回われわれが構築したプロテオーム解析法で検出できる蛋白質の検出限界は数ngであり、これら糖尿病網膜症などの病態に関連すると考えられている因子の検出ができなかった。

D. 考察

第1年度は、硝子体液、前房水、涙液のサンプルを用いて蛋白質の同定に至る検査法の確立を目指し、硝子体液から7個の蛋白質を同定した。第2年度は黄斑円孔の硝子体から17個の蛋白質、糖尿病網膜症の硝子体から27個の蛋白質を同定した。本年度は同定出来ないスポットの同定、新たなスポットの検出を目的に硝子体サンプルの検出を行った。

昨年まで使用していたQ-TOFに加え、より感度のよいVoyager TOF-MSを使用することにより多くの蛋白質を同定することができた。

正常コントロールと考えられる黄斑円孔眼の硝子体サンプルから18個の蛋白質が同定され、糖尿病網膜症の硝子体サンプルから38個の蛋白質を同定した。それらのうち、C. 研究結果2.の項で挙げた15)~18)の4種の蛋白質、prostaglandin-D2 synthase、glutathion peroxidase、interphotoreceptor retinoid binding-protein、pigment epithelium-derived factor (PEDF)は血清サンプルにおいては同定されず、硝子体ないしは眼局所特有に発現している蛋白質であるものとみなされた。特に神経栄養作用、血管新生抑制作用を有することが明らかとなっているPEDFのスポットがすべての硝子体サンプルで強く発現していることが確認され、この因子は眼内で正常な状態においても重要な作用を担っていることが示唆された重要な知見であった。ま

た、antioxidant enzymeであるglutathion peroxidase、眼圧調節因子であると考えられているprostaglandin D2の産生に関与するprostaglandin-D2 synthaseの同定は、硝子体がmetabolic repositoryとしての機能も有すると考える時に、PEDFの同定と同様に眼疾患の病態把握において重要な指標となりうる可能性が高いものと考えられる。

糖尿病網膜症の硝子体サンプルにおいては、黄斑円孔の硝子体サンプルで同定された18個の蛋白質に加えて、C. 研究結果2.の項で挙げた19)~38)の20個の蛋白質が同定された。これらのうち、19)~36)の18個については、血清サンプルでも確認されており、これは糖尿病状態において血管透過性亢進を生じた結果として、正常な硝子体には含まれないかあるいは極めて微量にしか存在しない血清蛋白質が、眼内に漏出している結果と解釈される。また我々は硝子体中に多く含まれるアルブミン、IgGを除去することにより、新たなスポットの検出を試みた。C. 研究成果1.3)で示した図の如く、糖尿病網膜症の血清、黄斑円孔の硝子体、血清では検出されず、糖尿病網膜症の硝子体のみで検出されるスポットを同定した。それらはcatalase、enolaseであった。これらの蛋白質は、血清サンプルに検出されないことから、硝子体ないしは眼局所において特異的に誘導されるか、あるいは増加しており、病態に密接に関連する蛋白質である可能性が考えられる。

E. 結論

正常コントロールと考えられる黄斑円孔眼の硝子体サンプル、糖尿病網膜症の硝子体サンプル、及びそれらのおのおのに対応する血清サンプルの解析を行い、正常硝子体蛋白質のプロファイルの作成と、糖尿病網膜症において眼局所で病態に関与している可能性のある因子の検索の2点を重点的に行ってきた。

これまで述べてきたごとく、硝子体のプロテオーム解析は糖尿病網膜症など多種多様な原因物質、因子が絡み合った病態において、疾患の病態に直接関与する蛋白質の発現異常を網羅的に検討できる検査法、病態研究法になりうる。ただ現時点ではIL-6、VEGFなどこれまでに病態に関連する因子の検出がプロテオーム解析で検出が困難であった。検査法、病態研究法として実用化するためには感度を向上させることが必要であると考えられる。

すべての蛋白質の同定ができていない現時点での本研究方法の臨床応用には慎重でなければならないが、症例の網膜症重症度、治療抵抗性と蛋白質発現パターンの統計学的な関連を検討することになり、重症度判定、治療効果の予測、治療方法決定などに役立つ情報が得られる可能性が示された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1)皆本 敦:1.糖尿病網膜症の病態と生理活性物質:タンパク質レベルでの分析、第8回日本糖尿病眼学会総会シンポジウム1:『糖尿病網膜症の分子病態からテーラーメイド医療へ』、大阪、平成14年3月1日。 2)山根 健、野間英孝、溝手秀秋、皆本 敦、三嶋 弘、山下英俊、高村 浩、吉里勝利:黄斑円孔と糖尿病網膜症における硝子体のプロテオーム解析、第8回日本糖尿病眼学会総会一般口演、大阪、平成14年3月1日。

3)山根 健、野間英孝、溝手秀秋、皆本 敦、三嶋 弘、山下英俊、高村 浩、吉里勝利:プロテオーム解析を用いた正常硝子体内発現蛋白質パターンの検討、第106回日本眼科学会、平成14年5月26日。

4)山根 健、皆本 敦、三嶋 弘、山下英俊、吉里勝利:プロテオーム解析を用いた硝子体内発現蛋白質パターンの検討、第一回ヒトプロテオーム学会、平成15年2月13日。

5)K. Yamane, H. Mizote, A. Minamoto, HK Mishima, H Yamashita, H Takamura, K Yoshizato: Proteome analysis of normal human vitreous fluid. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2002

6)山根 健、野間英孝、溝手秀秋、皆本 敦、三嶋 弘、山下英俊、高村 浩、吉里勝利、次田 皓、鍋谷卓司:プロテオーム解析を用いた糖尿病網膜症における硝子体内発現蛋白質パターンの検討、第107回日本眼科学会、平成15年4月18日。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

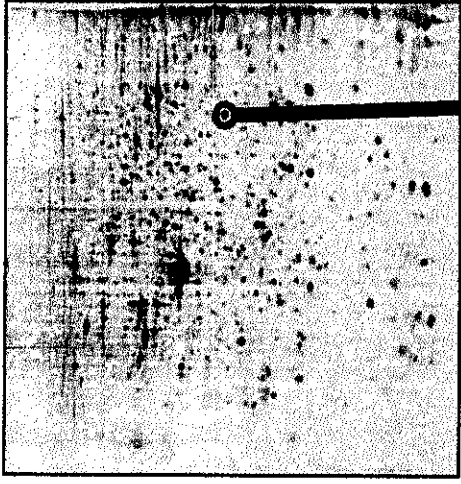
該当なし

3. その他

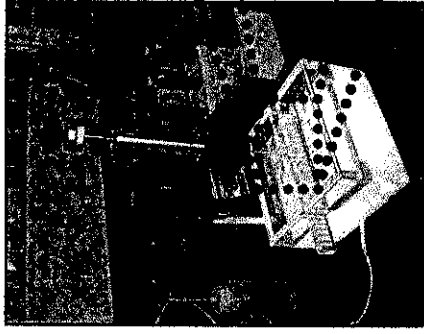
特記事項なし

二次元電気泳動

(1st dimension: Multiphor II/IPGPhor, Pharmacia Hoefor)
(2nd dimension/Western blotting: IsoDalt, Pharmacia Hoefor)



銀染色

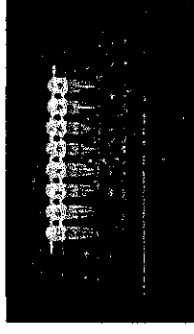


スポットの切り出し



ゲル内消化

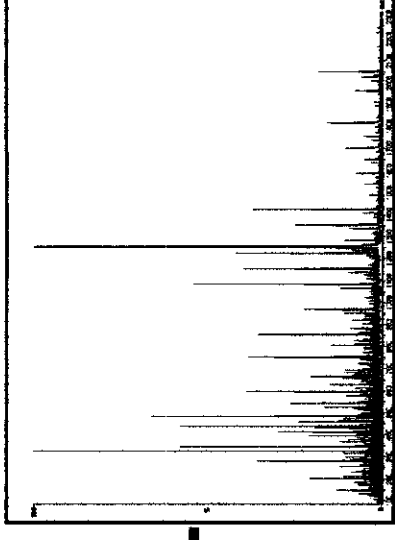
Trypsin, endoproteinase glu-c.



→ 二次元電気泳動像の解析と
プロテオームデータベースの構築



インターネットによるプロテ
オームデータベースの参照
(SwissProt, OMIM, etc.)



質量分析によるタンパク質同定

(ESI: Q-TOF, Micromass)

(Voyager: TOF-MS, PreSeptive Biosystems)

図1. 二次元電気泳動によるプロテオーム解析の基本的流れ

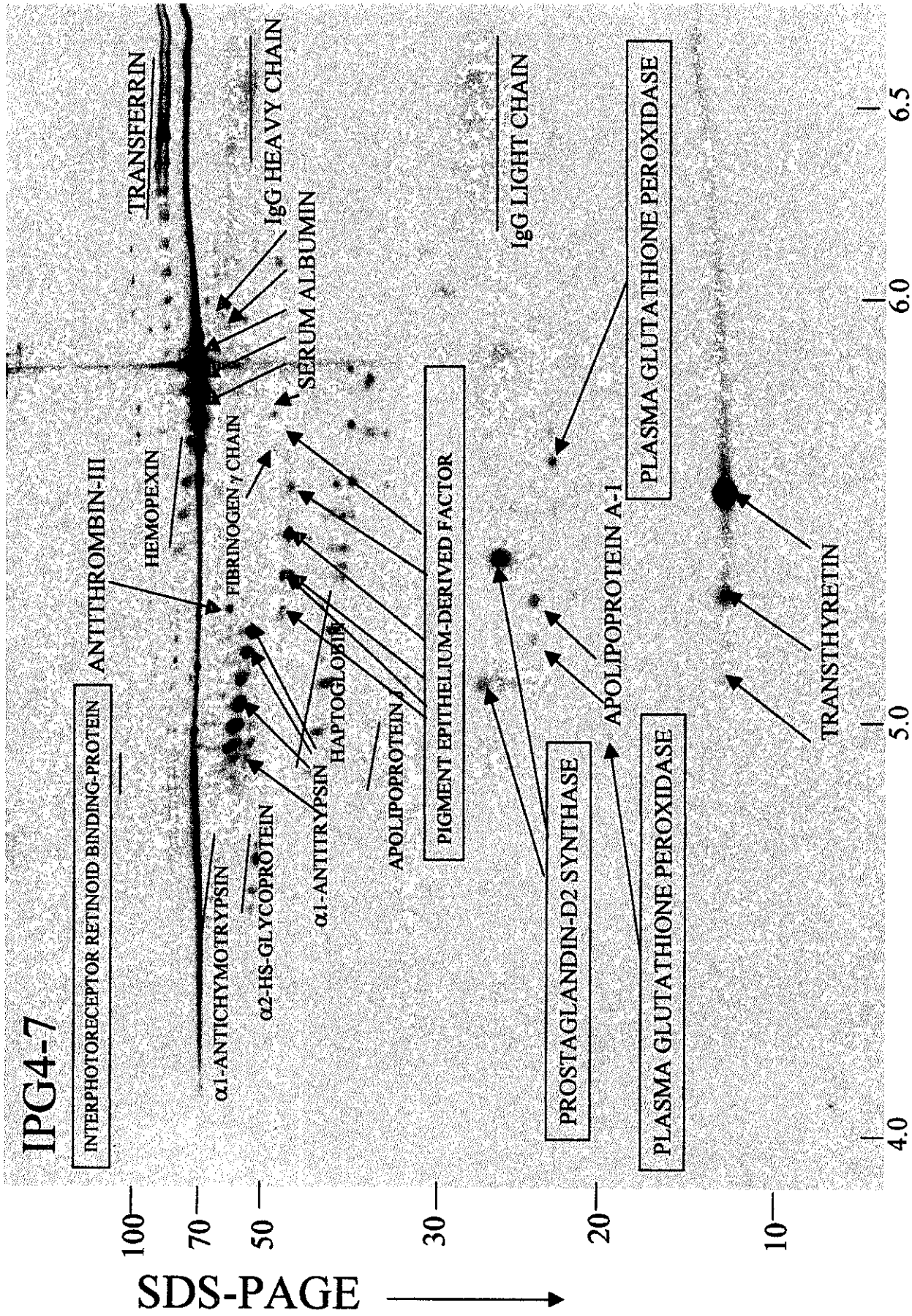


図2：81歳、男性、Gass分類3期（蛋白量27.29 μ g）黄斑円孔（硝子体）の2次元電気泳動のゲルイメージ（pH勾配4-7）

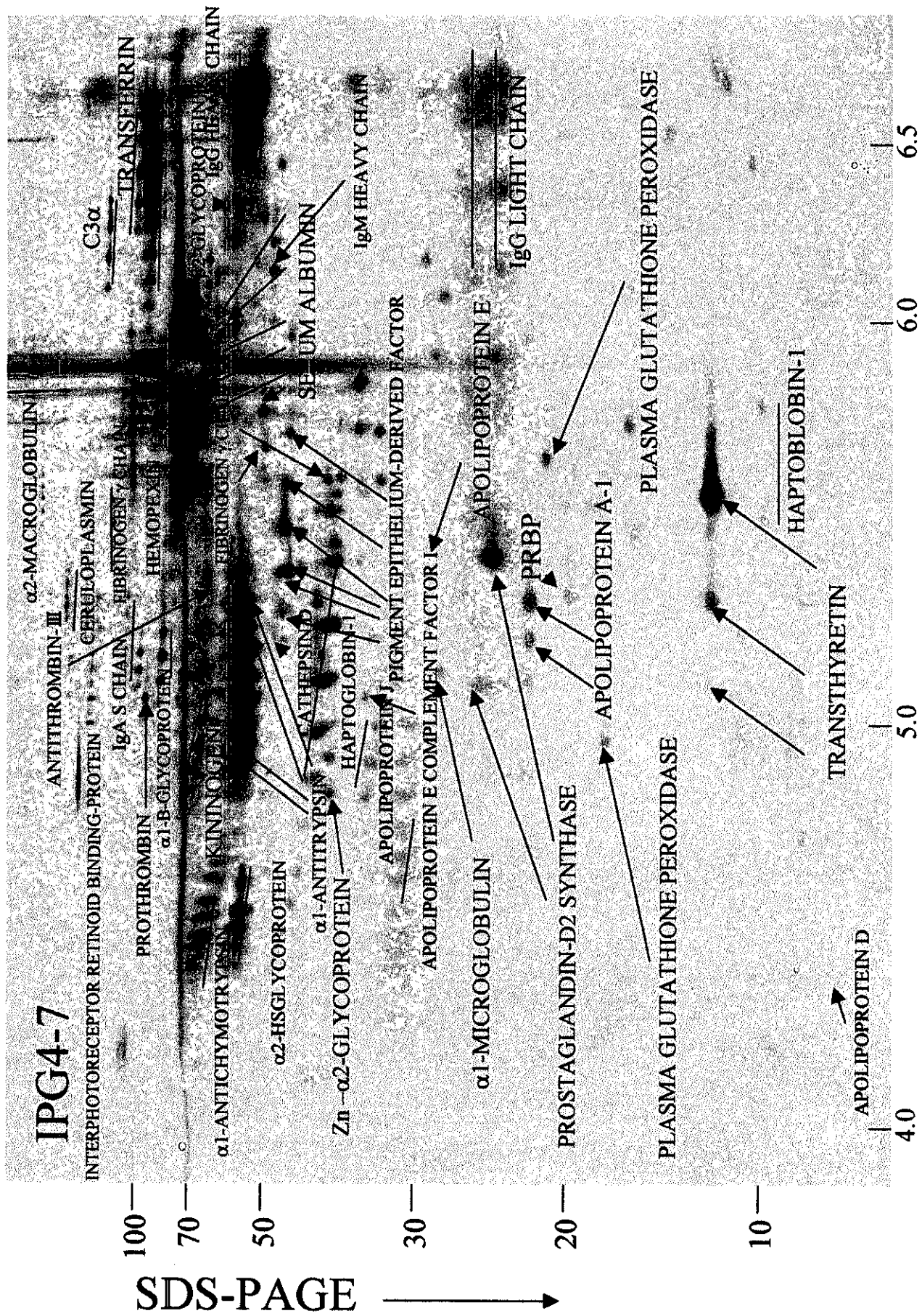


図3： 71歳、男性、福田分類 B4期 (蛋白量186.59 μg) 糖尿病網膜症 (硝子体) の2次元電気泳動のゲルイメージ (pH勾配4-7)

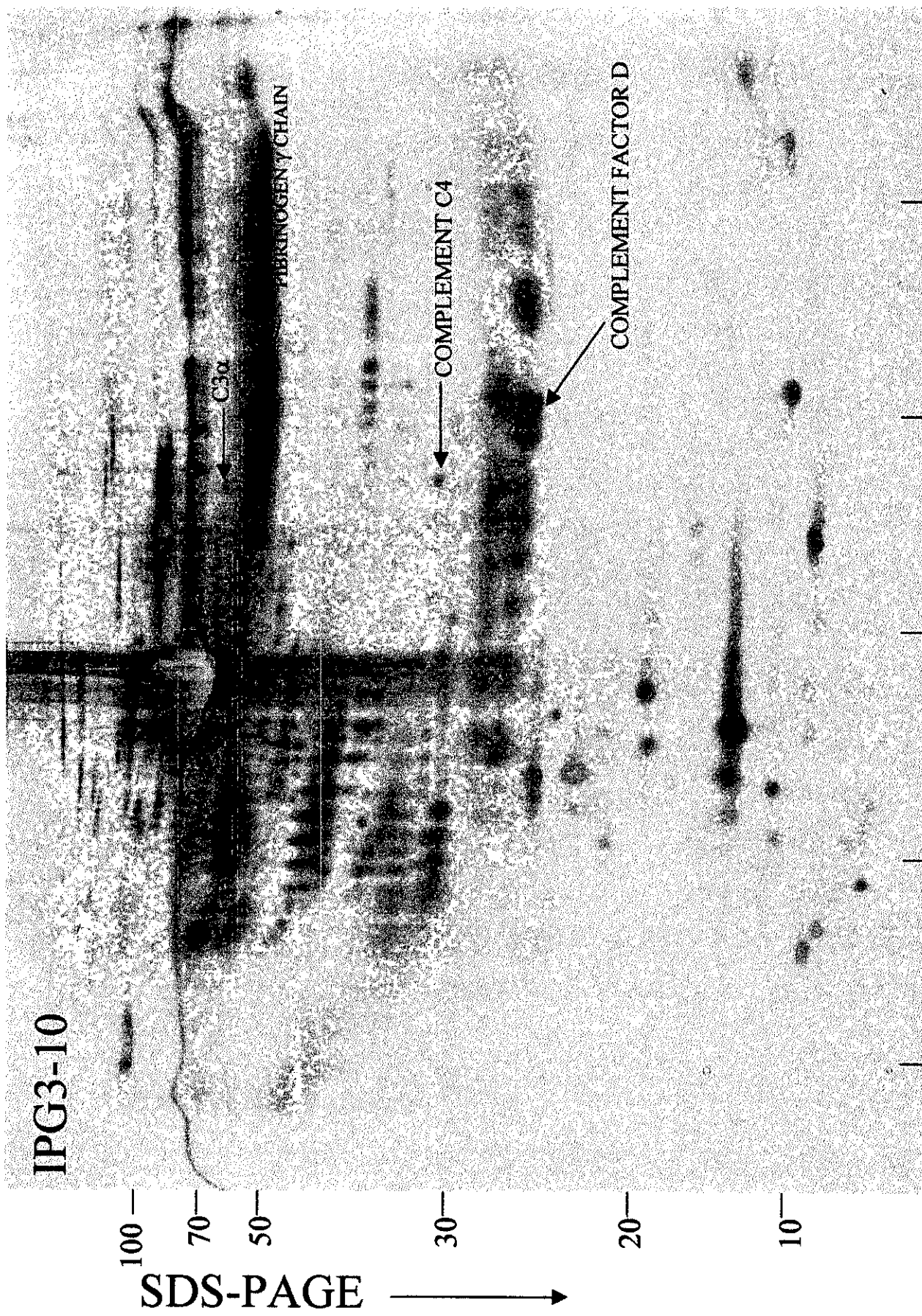
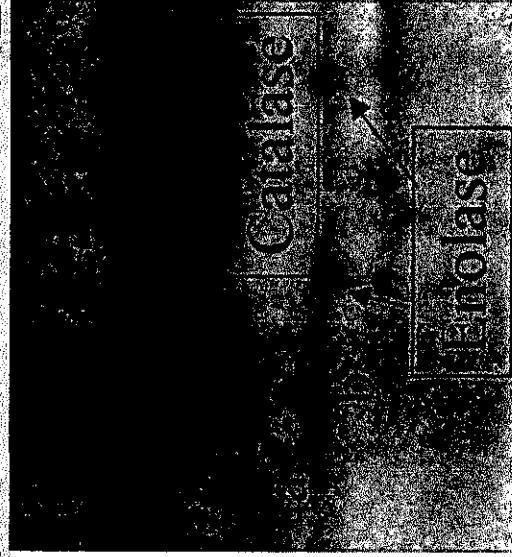
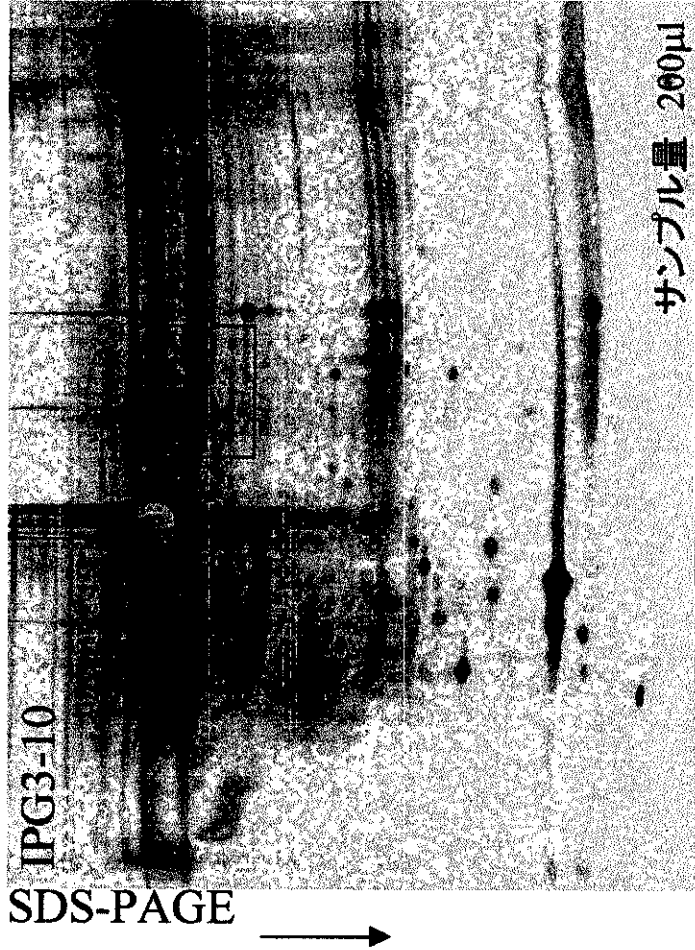
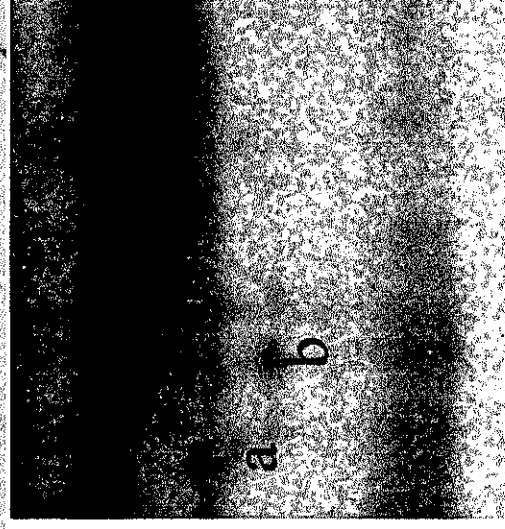
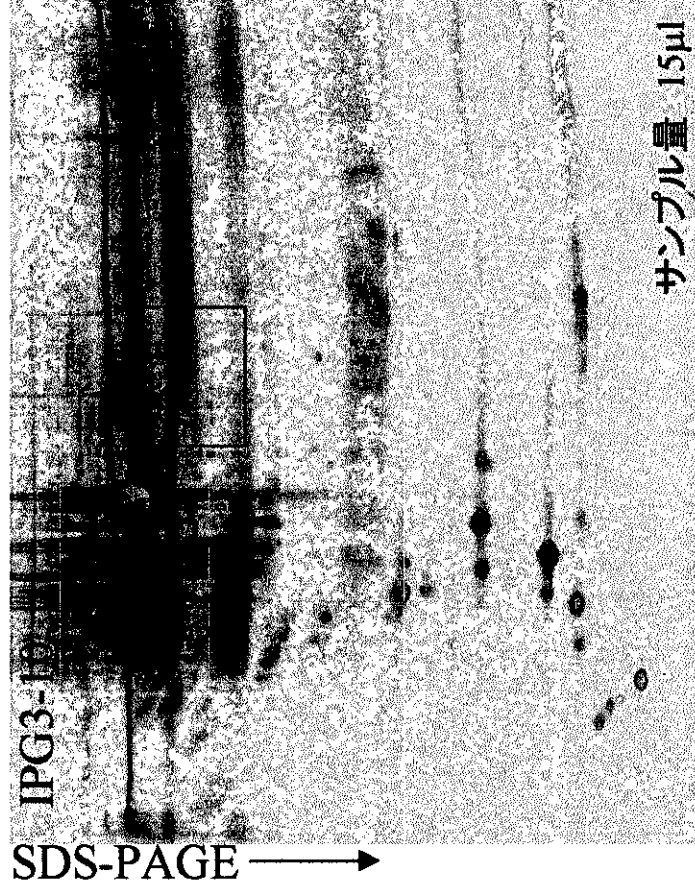


図4：59歳、男性、福田分類B5期（蛋白量246.12 μg）
 糖尿病網膜症（硝子体）の2次元電気泳動のゲルイメージ（pH勾配3-10）



硝子体



血清

図5 Protein AによるIgG除去後の硝子体と血清の比較 (糖尿病網膜症)

厚生科学研究費補助金（感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業）
（総合）研究報告書

眼科領域におけるプロテオーム解析法による診断法の確立と疾患治療法への展開に関する研究

主任研究者 山下 英俊 山形大学医学部眼科学講座 教授

研究要旨

目的：プロテオーム解析法を用い、眼内液における蛋白質の発現パターンを体系化し、網羅的に記載して検討する。**方法：**採取されたサンプルの2次元電気泳動によりゲルを作製し、銀染色でスポットを検出する。スポットを切り出し、ゲル内消化後QTOF（四重極飛行時間型質量分析装置）で蛋白質を同定する。**結果：**黄斑円孔、糖尿病網膜症患者から手術中に得た硝子体液、血清の解析を行い、多くの蛋白質を同定した。硝子体液において黄斑円孔では約250のスポットを検出し、このうち78のスポットにおいて18個の蛋白質を同定した。糖尿病網膜症においては38個の蛋白質を同定し、このうち32個については血清由来と考えられたが、2個については血清サンプルにおいても、黄斑円孔硝子体サンプルでも同定されなかった。**結論：**糖尿病網膜症の硝子体においては、眼内血管透過性亢進による血清由来蛋白質が大部分を占め、微量ではあるが眼局所で産生されている蛋白質が眼内においてその発現を亢進させている。プロテオーム解析は疾患の病態に関与する蛋白質発現異常を網羅的に検討できる検査法としてその有用性が示されつつある。

分担研究者：

三嶋 弘 広島大学大学院医歯薬学総合
研究科視覚病態学 教授
皆本 敦 広島大学大学院医歯薬学総合
研究科視覚病態学 助教授
高村 浩 山形大学医学部眼科 助教授
吉里勝利 広島大学大学院理学研究科
教授

種々の蛋白質の発現、あるいは正常な蛋白質の発現パターンの消失を体系的、網羅的に記載し把握することにより複雑な病態を検討することが可能となる。これまでに応用されてきた検査法は特定の既知の因子のみを決め打ち的に検討する方法であり、ターゲットとした極めて限られた遺伝子発現や病原微生物を検討できるのみであり、実際の病態では極めて多くの因子が絡み合っただ病態を作り出すのを体系的、網羅的に記載して検討することができなかった。本研究では多種多様な原因物質、因子が絡み合った病態において、疾患の病態に直接関与する蛋白質の発現異常を検討することにより実際の疾患異常の検討を行う。

プロテオーム解析の技術を用い正常に近いとされる黄斑円孔の硝子体の解析を行い、硝子体内蛋白質のデータベースを構築する。多種多様な因子が絡み合っている糖尿病網膜症の硝子体内に発現している蛋白質の解析を行い、病態に密接に関連する蛋白質の検出を行う。またこれまでに確立された方法を用いて生理活性物質濃度を測定して比較する。

プロテオーム解析法の鍵となる技術は、2次元電気泳動と質量分析によるタンパク質同定である。再現性を得るのが難しいとされる2次元電気泳動において、眼内液の科学的な解析に足る十分な再現性を確保するための泳動条件の最適

A. 研究目的

眼内液における蛋白質の発現パターンを体系化し、網羅的に検討する検査法を確立する。ポストゲノム時代に重要とされるプロテオミクス解析を先取りし臨床応用を目指すものである。

従来、眼疾患の診断においては、全身的検査、眼独自の病変検査（光学的診断法、放射線医学診断法などの非侵襲的検査法）、眼腫瘍などにおける病理組織学的検査が行われてきた。近年、分子生物学の進歩により微量の眼由来サンプルから病的遺伝子発現や病原微生物の同定が可能となったが、眼科医療への応用は限られている。

これまで眼科領域では、サンプル量が少なく限られた研究しか行われていない。近年のプロテオーム解析の進歩により、眼内液（前房水、硝子体液）、涙液を解析対象として多くの蛋白質の発現を体系的、網羅的に記載し検討することが可能となってきた。即ち、眼疾患に伴う

化を行い、十分な再現性が得られるプロトコルを確立する。また、質量分析装置 (Q-TOF) を用いたタンパク質同定作業のためには、染色後の泳動ゲルから効率良くタンパク質を抽出し、サンプル由来のペプチドをロスすることなくQ-TOFにアプライするための処理条件もあわせて検討し、より小さいスポットの同定を目指した。これとともに、リン酸化タンパク質の網羅的解析法などの新しいプロテオーム解析技術の開発もあわせて実施する。

B. 研究方法

1. 対象

学内倫理委員会に提出し承認を受けた、説明および同意取得の方法に従って、手術前に対象患者からインフォームドコンセントを得られた場合に、サンプルを採取した

2. 対象疾患

プロテオーム解析に用いたのは硝子体手術の適応であった、

- 1) 黄斑円孔
特発性黄斑円孔27例27眼
- 2) 糖尿病網膜症
増殖糖尿病網膜症・糖尿病黄斑浮腫
35例35眼

計62例62眼において以下の方法によりサンプルを採取した。

ELISA法での解析にもちいたのは

24例26眼 (特発性黄斑円孔5眼、特発性黄斑上膜4眼、増殖糖尿病網膜症13眼、網膜静脈閉塞症4眼) であった。

3. サンプル採取の方法

血清：手術に際してルーチンとして確保された血管から2~3mlの末梢血を採取し遠心分離により血清サンプルを得た。

前房水：硝子体・白内障同時手術例においては白内障手術に際して角膜輪部から注射針を用いて0.1~0.2mlの前房水を採取した。

硝子体：硝子体切除時に硝子体手術器械付属の硝子体カッターを用いて0.5~0.8mlの硝子体液を採取した。

すべてのサンプルは解析に供するまで-80℃で凍結保存された。

4. 解析方法-1：プロテオーム解析 (図1)

- 1) サンプルにlysis buffer (7mol/L urea, 2 mol/L thiourea, 4%3-3-cholamidopropyl-dimethylammonio-1-propanesulfonate, 2%ampholine pH3.5-10 (Pharmacia Hoefer), 1%dithiothreitol) を加え量を400 μ lとした。

一部のサンプルは、サンプルの大部分を占めるアルブミン、IgGの除去カラムを用いアルブミン、IgGの除去後にlysis bufferを加えた。

- 2) Immoblie DryStrip (pH4-7あるいは3-10, 18 cm, Pharmacia Hoefer) にサンプルを一夜か

けて膨潤させた。

- 3) 1次元目の等電点電気泳動は、Multiphor II electrophoresis chamber (Pharmacia Hoefer) を用いた。
- 4) 2次元目のSDS-PAGEはIso-Dalt system (Pharmacia Hoefer) を用いゲルを作製した。
- 5) 銀染色を行い、ゲルのスポットを検出した。
- 6) 検出されたスポットはスキャナーでコンピューターに画像を取り込み、Melanie II 2-D PAGE software packageを用い解析した。
- 7) 同じ疾患で再現性のあるスポットをゲルカッターで切り出し脱銀後、トリプシンで酵素消化しペプチドを抽出した。
- 8) Q-TOF (Micromass) (4重極飛行時間型質量分析装置)、Voyager TOF-MS (PreSeptive Biosystems) を用いアミノ酸配列を決定後、データベース (GenomeNet WWW server of Kyoto University, Japan) で検索し蛋白質を同定した。

解析方法-2

ELISA法にてIL-6、VEGFの濃度を測定した。

(倫理面への配慮)

眼内液は手術に際して除去するかまたは手術の過程で流出するもののみを用いる。眼内液の採取に際しては必要最小限になるように努める。また採取を予定する患者には手術前に患者に本研究の意義、目的、方法を説明し、文書で承諾を得た患者のみからの液のみをサンプルとして用いる (informed consentの徹底)。

5. リン酸化蛋白質の検出

脱リン酸化酵素によって、リン酸基を外すことにより等電点は塩基性側に变化する。この変化は二次元電気泳動像ではタンパク質スポットの左右方向への移動として現れることになる。脱リン酸化酵素で処理したサンプルと未処理のものをそれぞれ二次元電気泳動し、その電気泳動像を比較することによってリン酸化タンパク質を特定した。

C. 研究結果

1. 解析結果の概要

- 1) 黄斑円孔の硝子体サンプルにおいて約250のスポットを検出し、その内78スポット、18個の蛋白質を同定した (図2)。
- 2) 糖尿病網膜症の硝子体サンプルにおいて約650のスポットを検出し、36個の蛋白質を同定した (図3、図4)。
- 3) Protein AによるIgG除去後のサンプルにおいて糖尿病網膜症の硝子体のみを検出される蛋白質 (catalase, enolase) を同定した (図5)。

2. 同定された蛋白質について

- 1) serum albumin
- 2) transthyretin
- 3) antithrombin-III

- 4) α 1-antichymotrypsin
- 5) α 2-HS glycoprotein
- 6) hemopexin
- 7) α -1-antitrypsin
- 8) apolipoprotein A-1
- 9) APO-J
- 10) fibrinogen γ chain
- 11) haptoglobin-1
- 12) IgG heavy chain
- 13) IgG light chain
- 14) transferrin
- 15) prostaglandin-D2 synthase
- 16) glutathion peroxidase
- 17) interphotoreceptor retinoid binding-protein
- 18) pigment epithelium-derived factor (PEDF)
- 19) α 2-macroglobulin
- 20) IgA S Chain
- 21) α 1-B-glycoprotein
- 22) α 1-microglobulin
- 23) C3 α
- 24) ceruloplasmin
- 25) apolipoprotein E
- 26) complement C4
- 27) complement factor D
- 28) PRBP
- 29) complement factor I
- 30) IgM heavy chain
- 31) β 2-glycoprotein
- 32) Zn- α -glycoprotein
- 33) kininogen
- 34) apolipoprotein D
- 35) cathepsin D
- 36) prothrombin
- 37) catalase
- 38) enolase

一連の解析により以上38個の蛋白質が硝子体液から同定された。

3. 糖尿病網膜症に関連する蛋白質について
黄斑円孔、黄斑上膜ではIL-6、VEGFの濃度は15.0 \pm 35.2pg/ml、全例測定限界以下(15.6pg/ml以下)であった。増殖糖尿病網膜症、網膜静脈閉塞症ではそれぞれ131.5 \pm 142.8pg/ml、1422.7 \pm 2263.3 ng/mlであった。IL-6、VEGFともに後者のグループが前者に比較して高値を示した。プロテオーム解析で検出できた蛋白質のなかにIL-6、VEGFは含まれておらず、今回われわれが構築したプロテオーム解析法で検出できる蛋白質の検出限界は数ngであり、これら糖尿病網膜症などの病態に関連すると考えられている因子の検出ができなかった。

4. リン酸化蛋白質について
ラット線維芽細胞を用いて検討を行った。銀染色によって視覚化された1315スポットのうち63スポット(4.8%)が等電点の変化を示した(図

6、7)。

D. 考察

第1年度は、硝子体液、前房水、涙液のサンプルを用いて蛋白質の同定に至る検査法の確立を目指し、硝子体液から7個の蛋白質を同定した。第2年度は黄斑円孔の硝子体から17個の蛋白質、糖尿病網膜症の硝子体から27個の蛋白質を同定した。第3年度は度は同定出来ていないスポットの同定、新たなスポットの検出を目的に硝子体サンプルの検出を行った。Q-TOFに加え、より感度のよいVoyager TOF-MSを使用することにより正常コントロールと考えられる黄斑円孔眼の硝子体サンプルから18個の蛋白質が同定され、糖尿病網膜症の硝子体サンプルから38個の蛋白質を同定した。それらのうち、C.研究結果2.の項で挙げた15)~18)の4種の蛋白質、prostaglandin-D2 synthase、glutathion peroxidase、interphotoreceptor retinoid binding-protein、pigment epithelium-derived factor (PEDF)は血清サンプルにおいては同定されず、硝子体ないしは眼局所特有に発現している蛋白質であるものとみなされた。特に神経栄養作用、血管新生抑制作用を有することが明らかとなっているPEDFのスポットがすべての硝子体サンプルで強く発現していることが確認され、この因子は眼内で正常な状態においても重要な作用を担っていることが示唆された重要な知見であった。また、antioxidant enzymeであるglutathione peroxidase、眼圧調節因子であると考えられているprostaglandin D2の産生に関与するprostaglandin-D2 synthaseの同定は、硝子体がmetabolic repositoryとしての機能も有すると考える時に、PEDFの同定と同様に眼疾患の病態把握において重要な指標となりうる可能性が高いものと考えられる。

糖尿病網膜症の硝子体サンプルにおいては、黄斑円孔の硝子体サンプルで同定された18個の蛋白質に加えて、C.研究結果2.の項で挙げた19)~38)の20個の蛋白質が同定された。これらのうち、19)~36)の18個については、血清サンプルでも確認されており、これは糖尿病状態において血管透過性亢進を生じた結果として、正常な硝子体には含まれないかあるいは極めて微量にしか存在しない血清蛋白質が、眼内に漏出している結果と解釈される。また我々は硝子体中に多く含まれるアルブミン、IgGを除去することにより、新たなスポットの検出を試みた。C.研究成果1.3)で示した図の如く、糖尿病網膜症の血清、黄斑円孔の硝子体、血清では検出されず、糖尿病網膜症の硝子体のみで検出されるスポットを同定した。それらはcatalase、enolaseであった。これらの蛋白質は、血清サンプルに検出されないことから、硝子体ないしは眼局所において特異的に誘導されるか、あるいは増加しており、病態に密接に関連する蛋白質である可能

性が考えられる。

リン酸化は翻訳後修飾の一つであり、細胞の分裂増殖の調節や酵素の活性、細胞内シグナル伝達などに関わる重要な生命現象である。二次元電気泳動を用いたリン酸化蛋白質の網羅的な検出の手法を確立した。今後硝子体においてもこの手法により、硝子体内蛋白質のより詳細な解析が可能となる。

E. 結論

正常コントロールと考えられる黄斑円孔眼の硝子体サンプル、糖尿病網膜症の硝子体サンプル、及びそれらのおのおのに対応する血清サンプルの解析を行い、正常硝子体蛋白質のプロファイルの作成と、糖尿病網膜症において眼局所で病態に関与している可能性のある因子の検索の2点を重点的に行ってきた。

これまで述べてきたごとく、硝子体のプロテオーム解析は糖尿病網膜症など多種多様な原因物質、因子が絡み合った病態において、疾患の病態に直接関与する蛋白質の発現異常を網羅的に検討できる検査法、病態研究法になりうる。ただ現時点ではIL-6, VEGFなどこれまでに病態に関連する因子の検出がプロテオーム解析で検出が困難であった。検査法、病態研究法として実用化するためには感度を向上させることが必要であると考えられる。

すべての蛋白質の同定ができていない現時点での本研究方法の臨床応用には慎重でなければならないが、症例の網膜症重症度、治療抵抗性と蛋白質発現パターンとの統計学的な関連を検討することになり、重症度判定、治療効果の予測、治療方法決定などに役立つ情報が得られる可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1) 皆本 敦: 1. 糖尿病網膜症の病態と生理活性物質: タンパク質レベルでの分析、第8回日本糖尿病眼学会総会シンポジウム1: 『糖尿病網膜症の分子病態からテーラーメイド医療へ』、大阪、平成14年3月1日。

2) 山根 健、野間英孝、溝手秀秋、皆本 敦、三嶋 弘、山下英俊、高村 浩、吉里勝利: 黄斑円孔と糖尿病網膜症における硝子体のプロテオーム解析、第8回日本糖尿病眼学会総会一般口演、大阪、平成14年3月1日。

3) 山根 健、野間英孝、溝手秀秋、皆本 敦、三嶋 弘、山下英俊、高村 浩、吉里勝利: プ

ロテオーム解析を用いた正常硝子体内発現蛋白質パターンの検討、第106回日本眼科学会、平成14年5月26日。

4) 山根 健、皆本 敦、三嶋 弘、山下英俊、吉里勝利: プロテオーム解析を用いた硝子体内発現蛋白質パターンの検討、第一回ヒトプロテオーム学会、平成15年2月13日。

5) K. Yamane, H. Mizote, A. Minamoto, HK Mishima, H Yamashita, H Takamura, K Yoshizato: Proteome analysis of normal human vitreous fluid. The Association for Research Research in Vision and Ophthalmology. 2002

6) 山根 健、野間英孝、溝手秀秋、皆本 敦、三嶋 弘、山下英俊、高村 浩、吉里勝利、次田 皓、鍋谷卓司: プロテオーム解析を用いた糖尿病網膜症における硝子体内発現蛋白質パターンの検討、第107回日本眼科学会、平成15年4月18日。

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

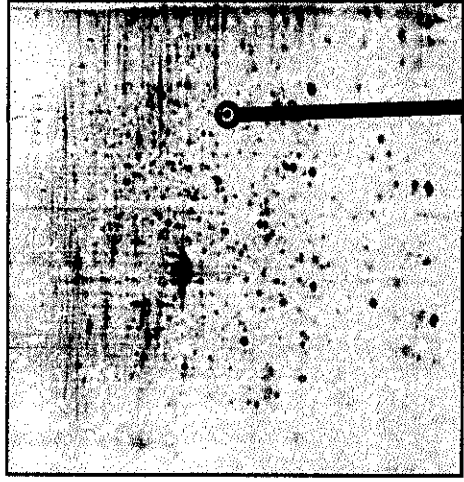
該当なし

3. その他

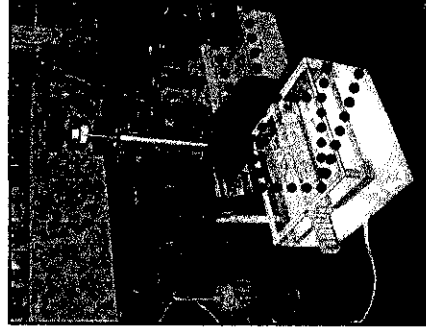
特記事項なし

二次元電気泳動

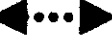
(1st dimension: Multiphor II/IPGPhor, Pharmacia Hoefel)
(2nd dimension/Western blotting: IsoDalt, Pharmacia Hoefel)



銀染色



→ 二次元電気泳動像の解析と
プロテオームデータベースの構築

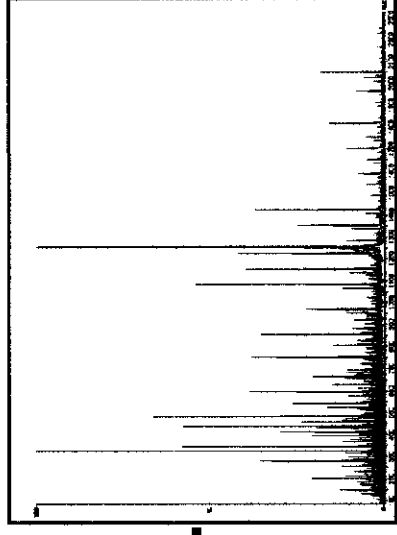


インターネットによるプロテ
オームデータベースの参照
(SwissProt, OMIM, etc.)

質量分析によるタンパク質同定

(ESI: Q-TOF, Micromass)

(Voyager: TOF-MS, PreSeptive Biosystems)



ゲル内消化

Trypsin, endoproteinase glu-c.

スポットの切り出し



図1. 二次元電気泳動によるプロテオーム解析の基本的流れ

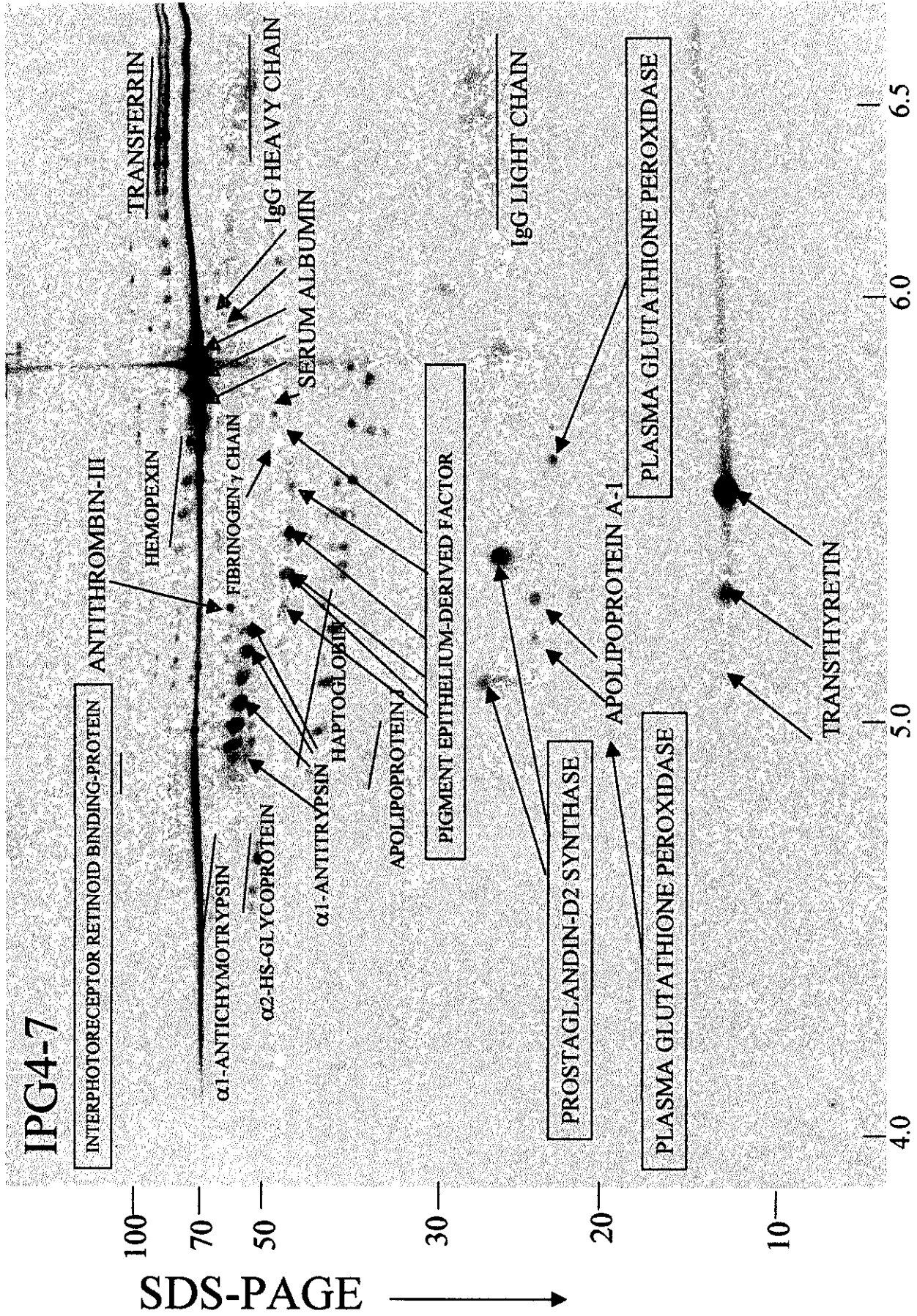


図2: 81歳、男性、Gass分類3期 (蛋白量27.29 μ g) 黄斑円孔 (硝子体) の2次元電気泳動のゲルイメージ (pH勾配4-7)

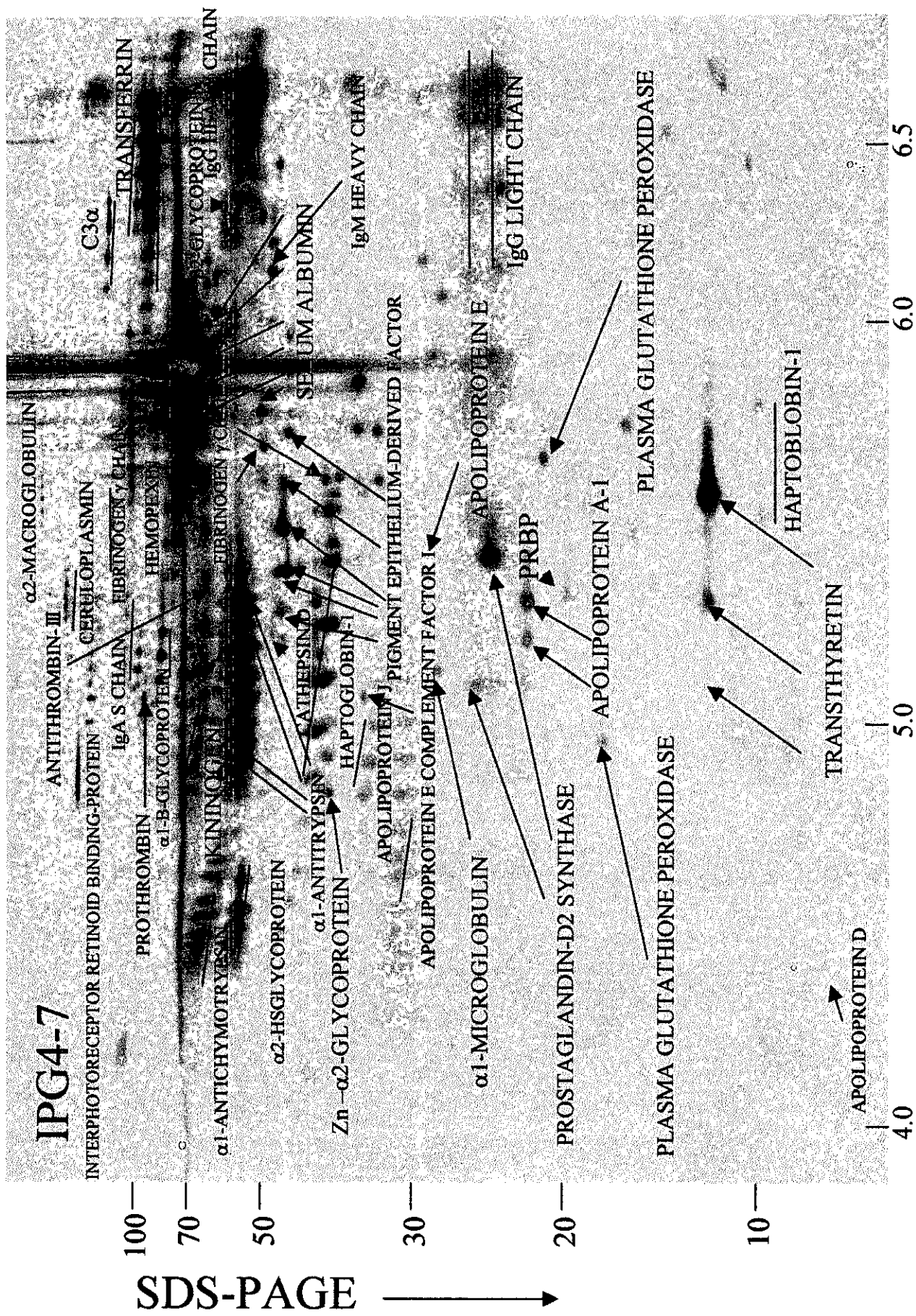


図3： 71歳、男性、福田分類 B4期 (蛋白量186.59 μg) 糖尿病網膜症 (硝子体) の2次元電気泳動のゲルイメージ (pH勾配4-7)

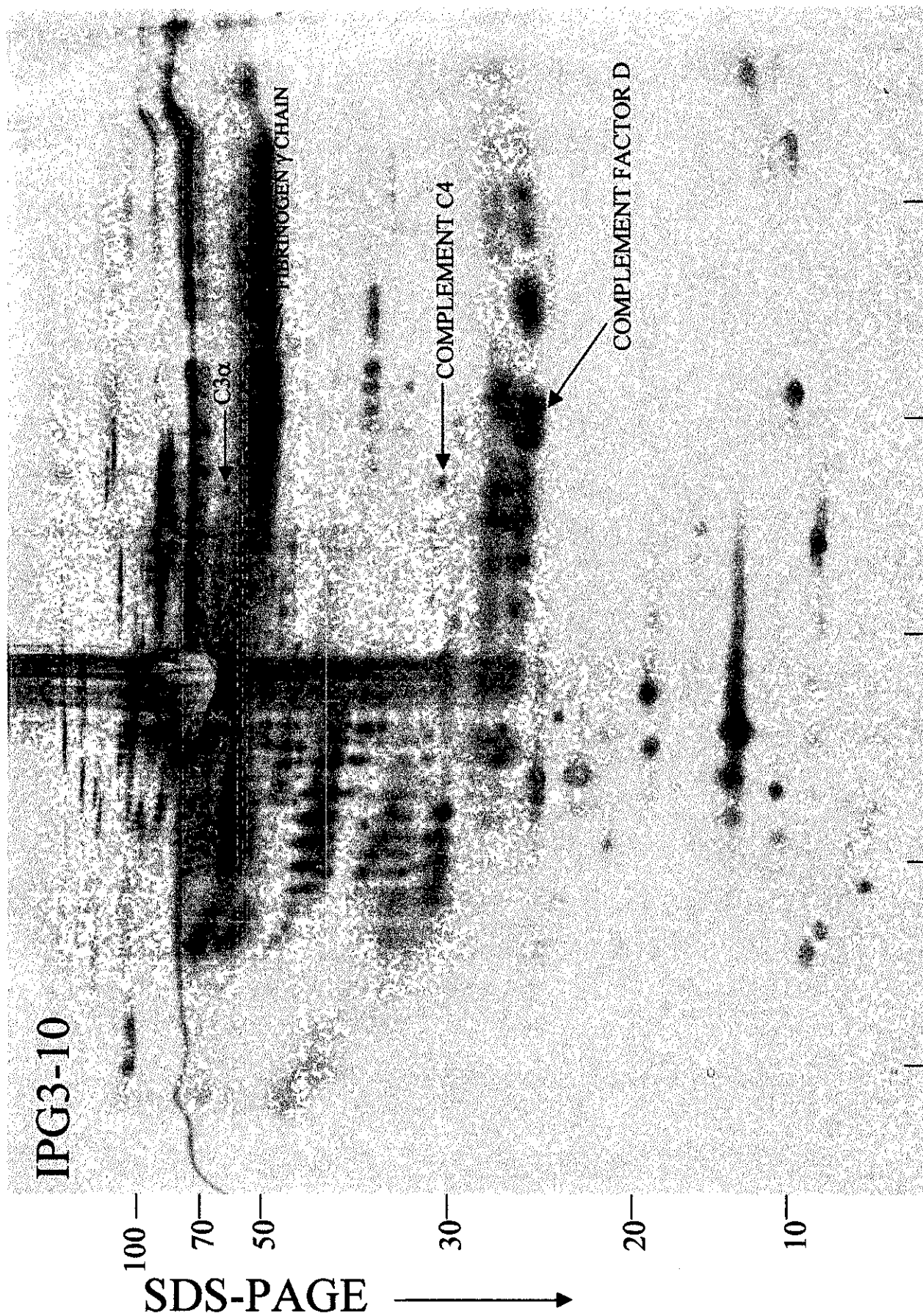
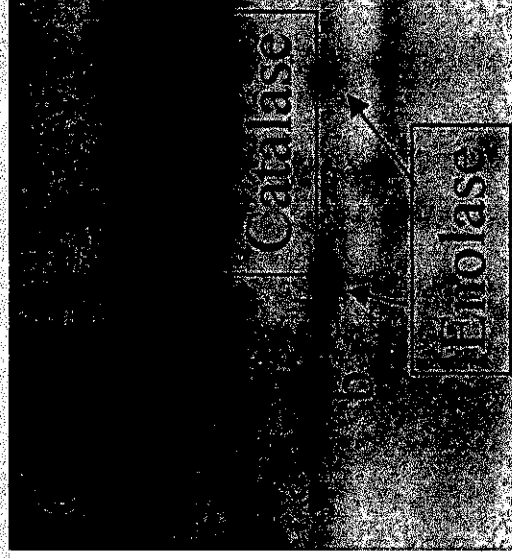
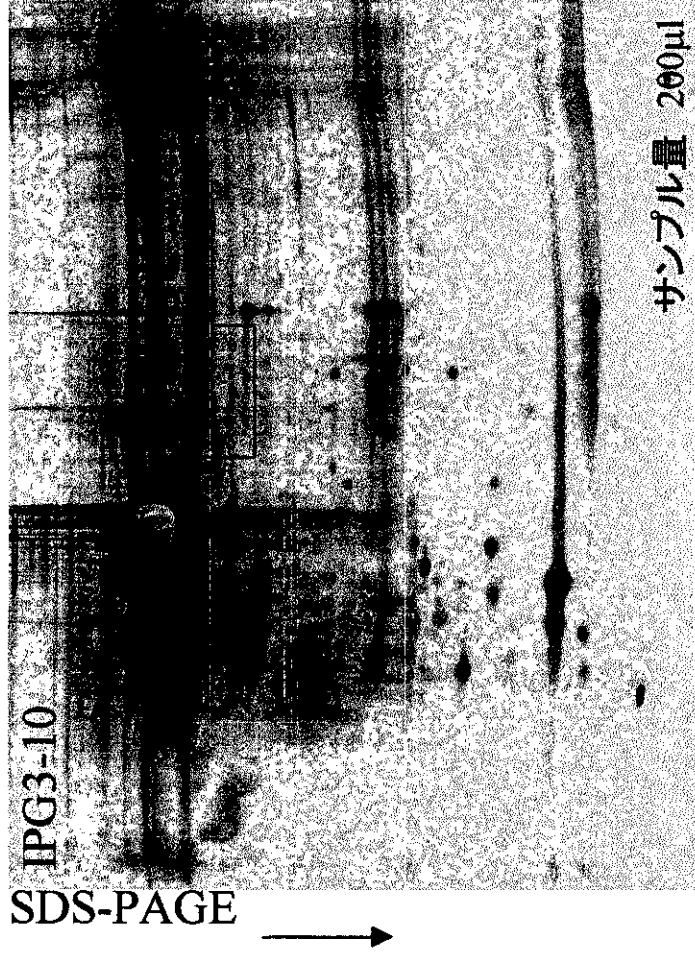
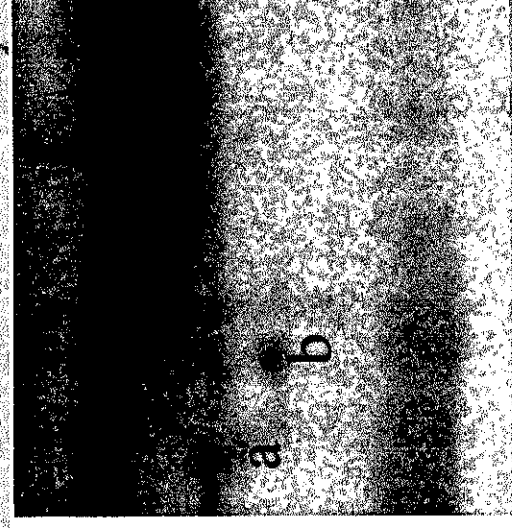
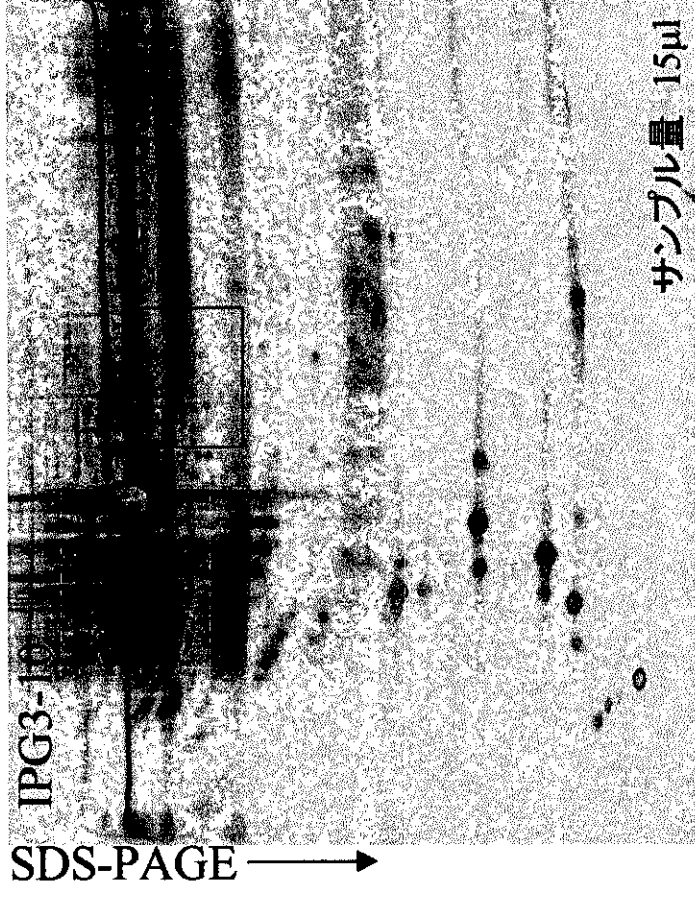


図4：59歳、男性、福田分類 B5^{6.0}期（蛋白量246.12 μg）
糖尿病網膜症（硝子体）の2次元電気泳動のゲルイメージ（pH勾配3-10）



硝子体



血清

図5 Protein AによるIgG除去後の硝子体と血清の比較 (糖尿病網膜症)