

その2.

Description	Ratio			
	EVVC27	EVVC28	EVVC31	EVVC32
76 coagulation factor V precursor; labile factor; factor V	1.02	1.31	0.88	1.15
77 complement factor D preproprotein; adipsin; properdin	0.84	0.98	0.70	1.09
78 cholesteryl ester transfer protein, plasma precursor	0.84	0.90	1.03	0.78
79 plasma carboxypeptidase B2 isoform a preproprotein;	0.93	0.88	0.71	1.57
80 gelsolin isoform a	0.98	0.83	0.77	0.92
81 quiescin Q6	1.14	1.14	0.79	1.02
82 alpha-2-glycoprotein 1, zinc; Alpha-2-glycoprotein, zi	1.45	1.42	0.75	0.70
83 dopamine beta-hydroxylase precursor; dopamine		0.96	N/A	1.73
84 pro-platelet basic protein precursor; connective tissue	1.03			0.49
85 coagulation factor IX; Coagulation factor IX (plasma		1.16	1.17	1.40
86 plasminogen-related protein B; type B plasminogen			0.75	
87 complement component 1 inhibitor precursor	1.11	1.26	0.74	0.67
88 proteoglycan 4; megakaryocyte stimulating factor;	1.12	0.74	1.06	0.88
89 apolipoprotein E precursor; apolipoprotein E3	0.96	0.90	0.79	1.08
90 CD5 antigen-like (scavenger receptor cysteine rich	1.31	0.77	0.77	1.80
91 serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A,	0.98	1.06	0.72	0.74
92 cell adhesion molecule with homology to L1CAM	1.44	0.73	0.84	
93 CD14 antigen precursor	0.95	0.83		1.10
94 procollagen C-endopeptidase enhancer; procollagen,	0.75	0.96	0.70	1.39
95 H factor (complement)-like 3; factor H-related gene 2	0.73	1.22	1.27	0.71
96 apolipoprotein C-IV		0.97	0.78	0.87
97 sex hormone-binding globulin; Sex hormone-binding g	0.67	1.09	1.02	0.96
98 complement component 1, q subcomponent, alpha	0.93	0.71	0.71	0.77
99 angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5 precursor	1.06	0.95		1.13
100 fibrinogen, beta chain preproprotein	N/A	2.67	0.41	0.30
101 CD163 antigen isoform a; macrophage-associated		1.12		1.50
102 lecithin-cholesterol acyltransferase precursor	1.19			0.94
103 tenascin XB isoform 1; tenascin XB1; tenascin XB2;			1.00	0.50
104 complement component 1, q subcomponent, gamma	0.68	0.58	0.64	0.91
105 cysteine-rich secretory protein 3; specific granule	1.38	1.00	0.81	0.78
106 beta-2-microglobulin precursor	0.75	0.80		1.25
107 insulin-like growth factor binding protein 2 (36kD)		1.55		
108 orosomucoid 2; alpha-1-acid glycoprotein, type 2	2.23	0.81	2.31	1.13
109 insulin-like growth factor binding protein 7	0.85	1.12	0.88	
110 apolipoprotein F precursor	1.44		1.68	0.68
111 heparin cofactor II	1.05	0.89	0.76	1.00
112 immunoglobulin J chain		0.92		
113 transforming growth factor, beta-induced, 68kDa;	0.91		0.89	0.84
114 lumican	0.93	0.93	0.84	0.81
115 EGF-containing fibulin-like extracellular matrix	1.11	1.10		
116 cartilage acidic protein 1; chondrocyte expressed		1.47	0.69	0.89
117 serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade F	1.06	0.57	0.72	0.88
118 cathelicidin antimicrobial peptide	0.97	1.01	0.89	0.42
119 dynein, axonemal, heavy polypeptide 8			0.99	
120 a disintegrin and metalloproteinase with	1.00		0.94	
121 inter-alpha (globulin) inhibitor H2; inter-alpha	0.75	0.99	1.02	0.96
122 protein C (inactivator of coagulation factors	1.16	1.21		0.84
123 carboxypeptidase N, polypeptide 1, 50kD precursor	1.26	0.93	1.14	
124 heparan sulfate proteoglycan 2; heparan sulfate		0.85		
125 vanin 1 precursor; Vannin 1; pantetheinase	2.43	0.45		
126 transmembrane protease, serine 6; membrane-c			0.99	
127 Xaa-Pro dipeptidase; proline dipeptidase		0.89		0.75
128 butyrylcholinesterase precursor	1.10	0.84		
129 platelet glycoprotein Ib alpha polypeptide precursor;	1.63	1.07	0.77	
130 transferrin; PRO2086 protein			N/A	
131 galectin 3 binding protein; L3 antigen; Mac-	0.84	1.12	0.43	1.16
132 complement component 1, q subcomponent, beta	0.84	0.78	0.73	0.85
133 pancreas-enriched phospholipase C			N/A	
134 nuclear receptor binding SET domain protein 1			0.74	
135 prenylcysteine oxidase 1; prenylcysteine lyase	0.73			
136 PREDICTED: similar to RIKEN cDNA 2610209A20			0.81	
137 leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A		1.11	1.34	
138 ficolin 2 isoform a precursor; ficolin (collagen	1.18	1.39	1.13	0.54
139 L-plastin; Lymphocyte cytosolic protein-1	0.98	1.02		0.71
140 plastin 1; I isoform; Plastin-1	0.98	1.02		0.71
141 ARHGAP15; uncharacterized bone marrow protein			1.25	
142 mannan-binding lectin serine protease 2 isoform 1		0.57		
143 thrombospondin 4 precursor	0.98	0.50		
144 Fc fragment of IgG, low affinity IIIb, receptor for		0.98		
145 polybromo 1	N/A	N/A		
146 selenoprotein P precursor	1.05	1.20		0.80
147 calcium binding protein 39-like	1.31		0.93	1.01
148 defensin, alpha 1 preproprotein; myeloid-related		0.90	0.53	
149 paraoxonase 1; Paraoxonase	0.88	0.94	0.94	0.97
150 serine protease inhibitor, Kazal type, 5; lymphoe			1.05	

その結果、Refseq の DB を用いて、cICAT ペプチドレベルで Rank 1, score 20 以上を示すたんぱく質を同定たんぱく質とすると、いずれの血清の場合も約 100-150 種類の血清たんぱく質の同定と比較定量比(H/L)が可能であった(表2)。なお、番号順位はたんぱく質レベルでの Mascot score 順に並べた。また、比較定量値が 0.5 未満または 2.0 以上のケースの場合は黄色で示し、定量比がペプチドピークの重複などにより正確な値が算出されなかった場合は N/A で示した。標準血清(外国人プール

血清、L 鎖試薬で標識)と外国人個別別の血清(H 鎖試薬で標識)とで比較したところ、少数の例外を除くと、殆どのケース(96.1%)において H/L 比が 0.60~1.67 以内であった。一方、cICAT 法の誤差範囲の閾値を超えて変化(H/L: < 0.5, >2)しているケースは全体の僅か 2.88%であった。また、同定されたたんぱく質数と H/L 比の度数分布を調べると、各個体血清ともほぼ標準血清と同じ分布をした(H/L 比 = 1 付近が最頻値)(図3)。

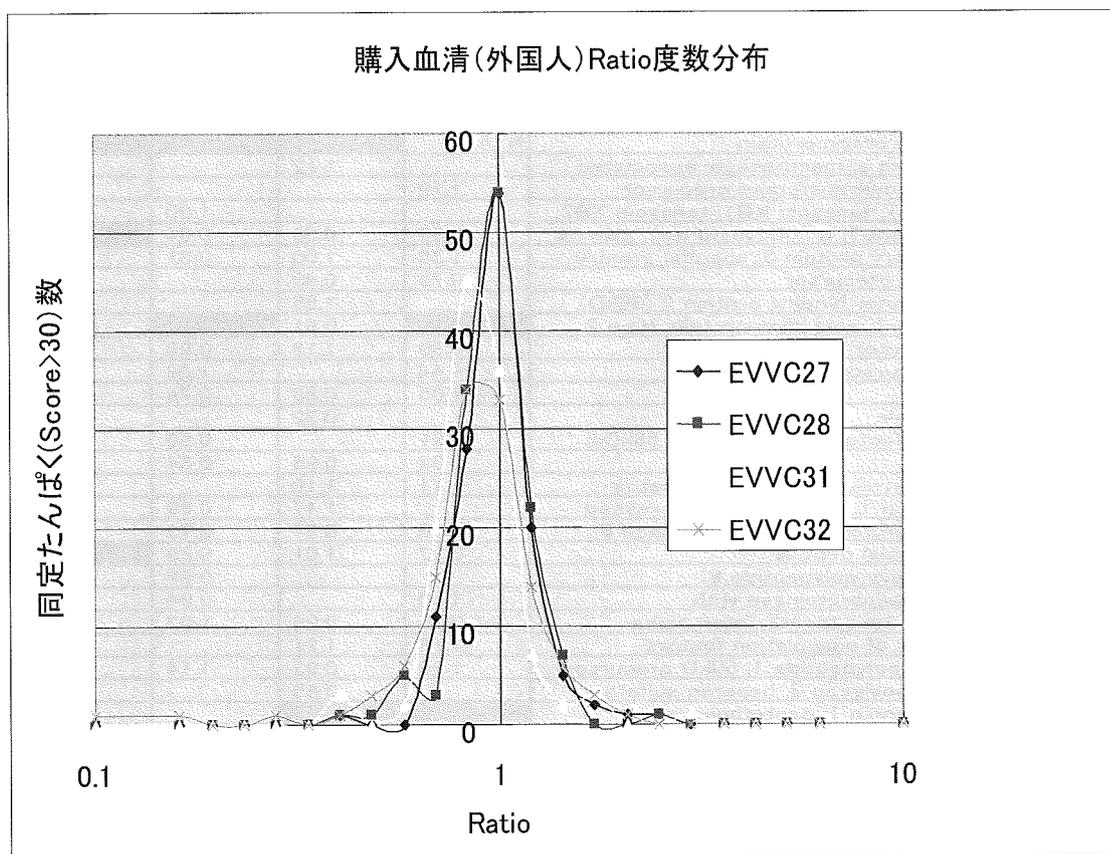


図3. 外国人個別別血清中の同定たんぱく質数と Raio(H/L)の度数分布

cICAT 法で定量比測定誤差が 30%程度(3)であることを考慮すると、以上のことは、標準血清中の多くのたんぱく質が外国人個別別血清と比較しても殆ど差がないことを示す。一方、特定のたんぱく質に注目し、外国人個別別で比

較すると、cICAT 法定量比測定誤差の閾値を越えて変化している個体が存在することが観察された。例えば、4 個体間で、Lipoprotein, Lp(a)の場合は、定量比が大きく変動(1.36, 0.42, 1.82, 0.12)し、また、自立神経失調遺伝

子産物である Dopamine-beta-Hydroxylase の定量比も同様に変動していた (0.5, 0.94, 0.31, 1.64)。また、Apolipoprotein F も変動が大きかった。なお、Lipoprotein, Lp(a) は個体間で変動が大きい (ポワソン分布をせず、L 字型分布を示す) ことがすでに ELISA 等による検査結果で報告されている(5)。

日本人 4 人の個別別血清に関しても、同様に標準血清を L 鎖試薬で標識し、個別別血清を H 鎖試薬で標識し、比較定量比 (H/L) を比較検討した (非公開)。その結果、後述する血小板由来たんぱく質のケースを除くと、発現比率 (H/L) が 0.60~1.67 の範囲に入るケースは全体の 93~95%(平均 94.3%)を示し、外国人個別別血清の場合 (平均 96.1%) と殆ど同じであった。また、H/L 値の度数分布も標準血清と差がなかった。このことは、標準血清中の多くのたんぱく質が日本人個別別血清と比較しても殆ど差がないことを示す。なお、日本人 4 人において、H/L 値が <0.5, >2.0 を示すケースは 2.4~4.1%の範囲であった (平均 3.5%)。この中には、外国人個体間で変動が観察された Lipoprotein, Lp(a)等も含まれていた。

前述のごとく、日本人血清中の Thrombospondin 1, Platelet factor 4, Pro-platelet basic protein, Glycoprotein V (platelet)等の血小板由来のたんぱく質に関しては、共通して標準血清との定量比が大幅に増

加(4倍以上)していた。しかし、この現象は、外国人血清の調製法と日本人血清の調製法の相違に基づくものと考えられた。日本人血清は前述の方法で記載したように行い、血液凝固促進剤を血液に添加し、生じた血餅を遠心して得た上清を血清としたものである。一方、外国人血清の調製は血漿を凝固させフィブリンを除いたものを血清としていると思われ、実際に外国人血清の血小板由来たんぱく質 (Platelet factor 4) の定量を測定した結果(6)、殆ど存在しないことが確認された。従って、日本人血清で共通して血小板由来たんぱく質が高いのは、凝集した血小板より遊離した血小板由来たんぱく質が血清に混入したためであり、日本人と外国人血清の本質的な相違ではないと考えた。以上のことより、血小板由来のたんぱく質を除けば、外国人購入血清(pool)を標準血清として用い、日本人患者疾患血清サンプルを解析することが一応可能であると結論した。但し、将来、詳細な比較検討を行う場合には、やはり日本人の血清を用いた標準血清あるいは対照血清 (Disease control serum, Age-match control serum など) を使用することが必要と考えられる。

なお、標準血清および臨床血清検体も含め今までに cICAT 法で一度以上同定された血清たんぱく質 222 種類の分類別一覧表を表 3 に示す (表 3)。

表3. ヒト高発現血清たんぱく質 222 種類の分類別一覧表

## 血清同定タンパク質(222種類)

補体系(30)	Blood transport and binding protein(20)	Protease inhibitor(15)	その他(82)
complement component C1q, A chain	afamin	alpha 2 macroglobulin	aggrecaen 1 isoform 1 precursor
complement component C1q, B chain	beta-2-glycoprotein 1	alpha-1-antiproteinase, antitrypsin	amyloid beta A4 protein precursor isoform
complement component C1q, C chain	cholesteryl ester transfer protein, plasma	alpha-1-antichymotrypsin	atractin isoform 2
complement component 1, r subcomponent	fc fragment of IgG binding protein	alpha-2-macroglobulin	beta actin
complement component 1, r subcomponent-like precursor	hyaluron binding protein 2	antithrombin III	beta globin
complement component 1, s subcomponent	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	bikunin	cadherin 1 type 1 preproprotein
complement component 2	insulin-like growth factor 2	complement component 1 inhibitor	carnosinase glutamate carboxypeptidase like protein
complement component 3	insulin-like growth factor binding protein 2	cystatin C	cartilage acidic protein 1
complement component 4A	insulin-like growth factor binding protein 3	heparin cofactor II	cartilage oligomeric matrix protein
complement component 5	insulin-like growth factor binding protein 4	inter-alpha (globulin) inhibitor H1	cathelicidin antimicrobial peptide
complement component 6	insulin-like growth factor binding protein 5	inter-alpha (globulin) inhibitor H2	CD14 antigen
complement component 7	insulin-like growth factor binding protein 6	inter-alpha (globulin) inhibitor H3	CD163 antigen isoform a
complement component 8, alpha polypeptide	insulin-like growth factor binding protein 7	inter-alpha (globulin) inhibitor H4	CD44 antigen isoform 1 precursor
complement component 8, beta polypeptide	insulin-like growth factor binding protein, alpha	kallistatin precursor	CD5 antigen-like
complement component 8, gamma polypeptide	lactotransferrin	tissue factor pathway inhibitor	CD59
complement component 9	retinol-binding protein 4, plasma		cell adhesion molecule with homology to L1
complement factor H	selenoprotein P precursor	<b>apolipoprotein(8)</b>	chitobiase, di-N-acetyl-
factor H-related protein 1	tetranectin	apolipoprotein A-II	chromosome 20 open reading frame 3
factor H-related protein 2	transthyretin, prealbumin	apolipoprotein B	collectin sub-family member 10
factor H-related protein 3	vitamin D-binding protein	apolipoprotein C-IV	cysteine-rich secretory protein 3
factor H-related protein 4		apolipoprotein E	defensin, alpha 1 preproprotein
factor H-related protein 5	<b>Enzyme(24)</b>	apolipoprotein E	delta globin
complement factor B	a disintegrin-like and metalloprotease (repro	apolipoprotein F	dermeidin precursor
complement factor I	angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5	apolipoprotein Lp(a)	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix prote
properdin P factor, complement	biotinidase	apolipoprotein M	extracellular link domain containing 1
complement factor D	butyrylcholinesterase		similar to Ig kappa chain
complement component 4 binding protein, alpha	carboxypeptidase N 83 kDa chain	<b>Common circulating blood protein(14)</b>	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor for (CD
complement component 4 binding protein, beta	carboxypeptidase N, polypeptide 1, 50kD	alpha 1B-glycoprotein	fetuin B; fetuin-like protein
complement receptor type 2	carboxypeptidase U(carboxypeptidase B2)	alpha 1-microglobulin	fibroblast activation protein, alpha subunit
complement component c1q receptor	dipeptidylpeptidase IV	alpha-2-glycoprotein, zinc	fibronectin
	dopamine beta-hydroxylase	alpha-2-HS-glycoprotein	ficolin 2 isoform a
<b>血液凝固・線溶・キニン系(20)</b>	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphod	beta-2-microglobulin	ficolin 3 isoform 1
coagulation factor II	fucosidase	ceruloplasmin	folistatin like 1 precursor
coagulation factor V	lecithin-cholesterol acyltransferase	clusterin isoform 1	galectin 3 binding protein; L3 antigen
coagulation factor V II precursor isoform	lysosome precursor		haptoglobin related protein
coagulation factor IX	mannan-binding lectin serine protease 1	gelsolin isoform a	heparan sulfate proteoglycan 2
coagulation factor X	mannan-binding lectin serine protease 2	hemopexin	HGF activator preproprotein
coagulation factor XI	matrix metalloproteinase 2 preproprotein	orosomuroid 1	hypothetical protein MGC45378
coagulation factor XII	matrix metalloproteinase 3 preproprotein	orosomuroid 2	immunoglobulin J chain
coagulation factor XIII A chain	matrix metalloproteinase 9 preproprotein	peptidoglycan recognition protein L	immunoglobulin superfamily, member 4
coagulation factor XIII B subunit	metalloproteinase inhibitor 1 precursor	vitronectin	interleukin 1 receptor accessory protein is
protein C	pancreatic ribonuclease		intracellular adhesion molecule 2 precursor
protein S	paraoxonase 1	<b>血小板由来(8)</b>	keratin 1
protein Z	plasma glutathione peroxidase 3	glycoprotein V (platelet)	keratin 6A
histidine-rich glycoprotein	prenylcysteine oxidase 1, prenylcysteine ly	glycoprotein VI (platelet)	L1 cell adhesion molecule isoform 1 precu
plasminogen	tryptophan/serine protease	latent transforming growth factor beta bindi	leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1
plasma kallikrein B		multimerin 1	leukocyte immunoglobulin-like receptor, sub
kininogen(H+L)		platelet factor 4	lipopolysaccharide-binding-protein precursor
		pro-platelet basic protein	L-plastin 1
fibrinogen, alpha chain isoform alpha-E pre		secreted protein, acidic, cysteine-rich (oste	
		thrombospondin 1	
		triggering receptor expressed on myeloid ce	
<b>分類参照: Molecular &amp; Cellular Proteomics 1:947-955,2002</b>			
1. グレーのタンパク質は、現在の測定系で再現性よく同定・比較定量できるタンパク質			

## 2) cICAT 法によるパーキンソン病患者血清と標準血清の血清たんぱく質の比較・検討

国立精神・神経センターより提供されたパーキンソン病患者 10 名(EVLC01, EVLC02, EVLC03, EVLC04, EVLC05, EVLC06, EVLC07, EVLC08, EVLC09, EVLC10)の血清に関して、cICAT 解析プロトコールに従い、患者血清 (H 鎖試薬で標識) と標準血清 (L 鎖試薬で標識) との血清各たんぱく質の同定・比

較解析を行った (最終 SCX column 分画で 25 分画した画分を用いて解析)。その結果、約 100 種類の高発現血清たんぱく質の同定と比較定量が可能であった。同定されたたんぱく質数と H/L 比の度数分布を図 4 に示し、標準血清各たんぱく質と患者血清たんぱく質との比較定量比 (H/L: 患者血清/標準血清) との関係を図 5 に示す。

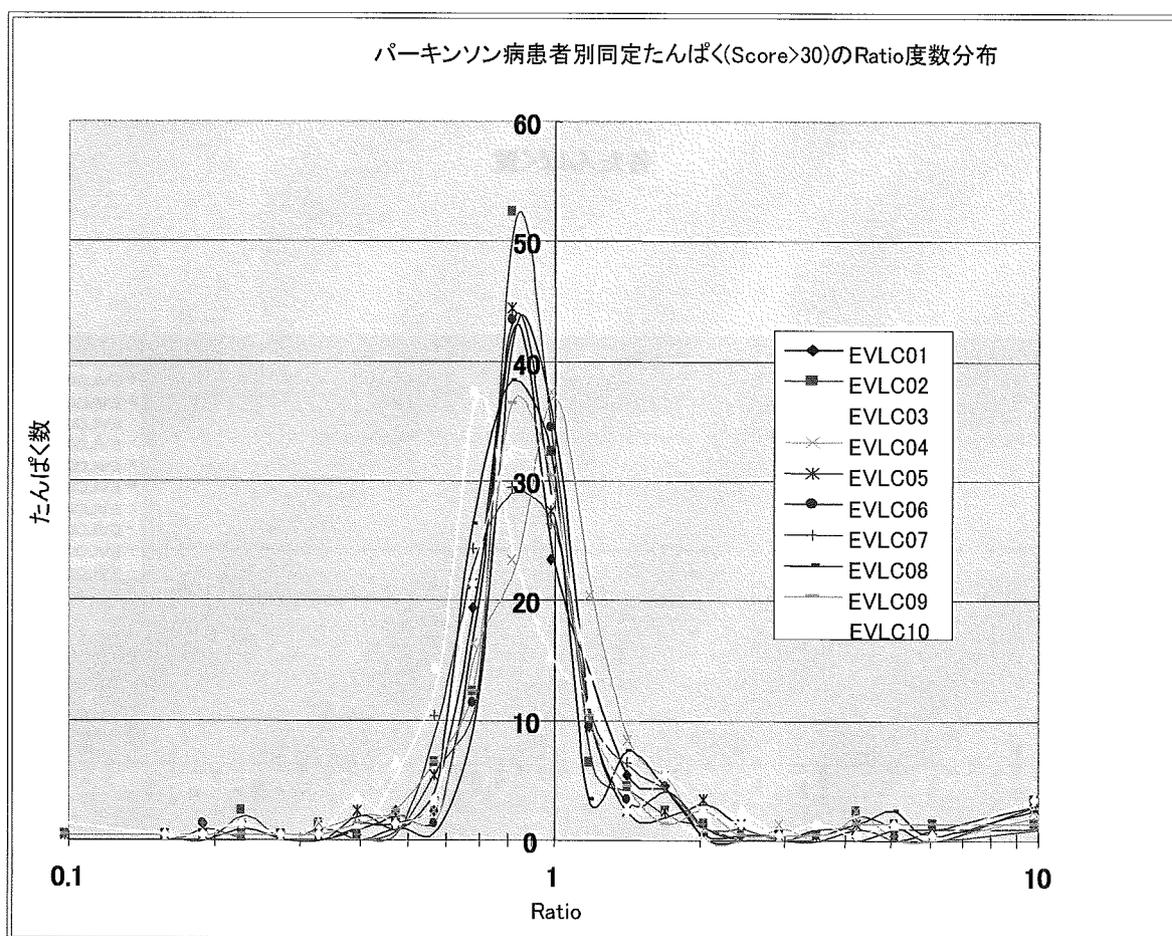


図 4. パーキンソン病患者別同定たんぱく質の Ratio (H/L) 度数分布

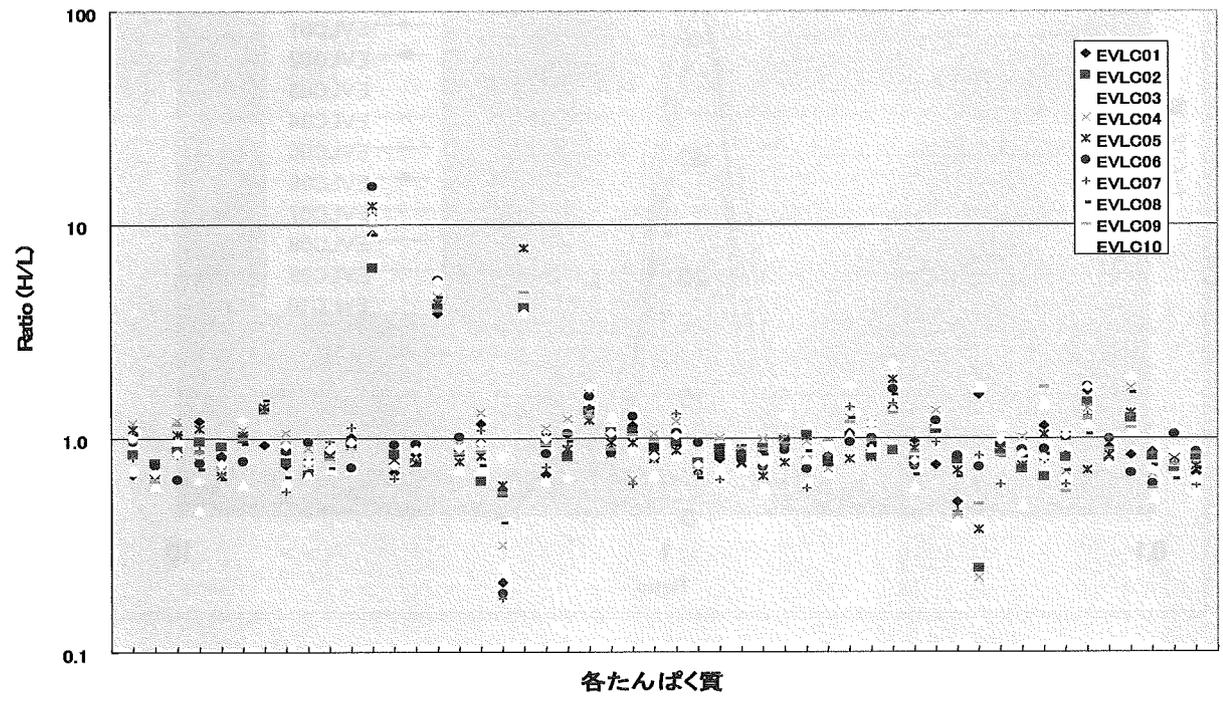
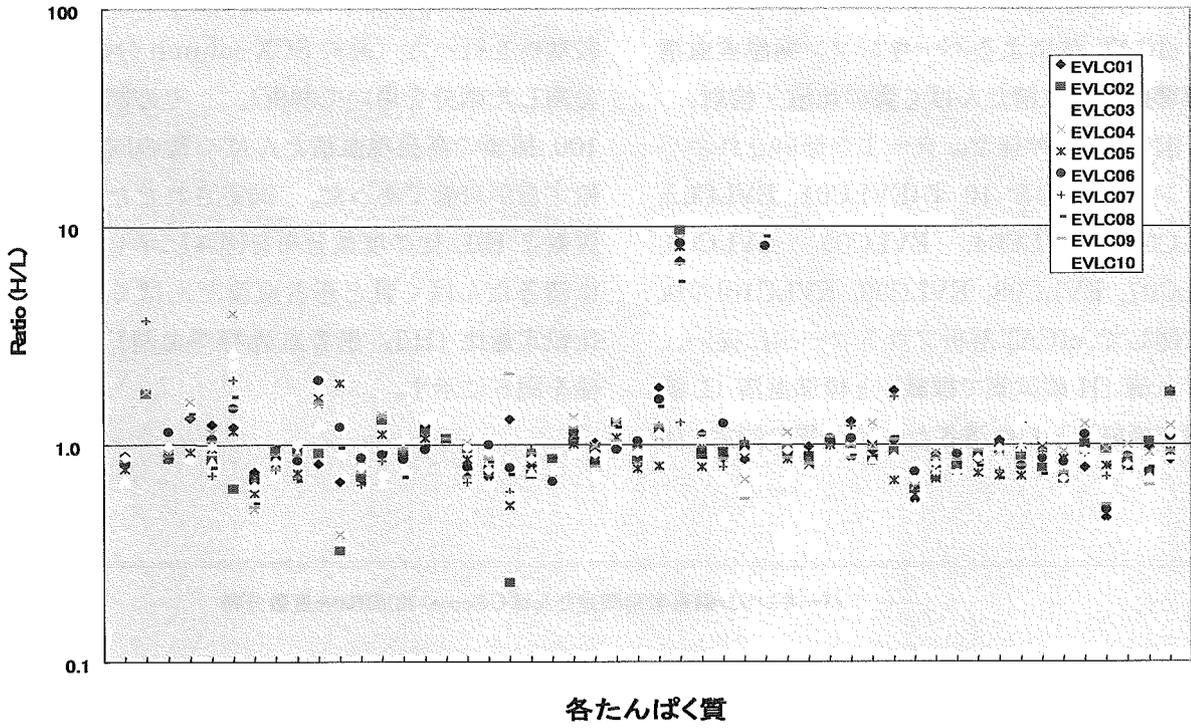


図5. パーキンソン病患者各血清たんぱく質別 Ratio (H/L)分布

なお、知的財産権確保のため、たんぱく質名は表記しなかった。パーキンソン病患者での H/L 比の度数分布は、標準血清および日本人健常人血清の場合に比べ、やや低値にシフトするものが多く観察された（最頻値が 0.7~0.8 前後）。しかし、後述する血小板由来たんぱく質等を除いて、同定・比較定量が可能であった約 120 種類に関して、パーキンソン病患者（10 名）血清と標準血清と比較したところ、発現比率（H/L）値が 0.60~1.67 の範囲のケースは平均 92%（87.4~95%）であり、大部分のパーキンソン病患者の血清高発現たんぱく質は標準血清のものと大きく変化していないことが分かった。一方、H/L 値が <0.5, >2.0 を示すケースは 10 人の平均で 4.2% 存在し、その範囲は 1.7~6.7% であった。この中には、前述の Lipoprotein, Lp(a), 男女間で差がある pregnancy-zone protein, 凝固系たんぱく質等の他に、患者間である程度共通の変動が見られるたんぱく質も数種類存在するが、いずれも他の疾患でも観察される変動であり、パーキンソン病に選択的である可能性は現段階では少ない。なお、標準血清との比が大きすぎていたたんぱく質群の多くは、血小板由来たんぱく質であり、上述の日本人健常人血清で観察されたのと同様に血清の調製法の違いに基づくものであり疾患によるものではない。以上のことより、パーキンソン病患者 10 名の血清高発現たんぱく質について標準血清と比較したが、その中では本疾患に特異的と思われる血清たんぱく質は見出せなかった。今後は、血清低発現たんぱく質の解析が必要であり、また、病変部位に近い脳脊髄液の解析が必要であると思われる。

なお、本解析結果および匿名化番号照合表を国立精神・神経センターに提示し、解析結果に関して打ち合わせを行った。同センターの意見

としては、1) パーキンソン病患者での H/L 比の度数分布が低値にシフトする理由は、パーキンソン病患者が高齢者であるための可能性が考えられるので、いずれ age-match control serum あるいは disease-match control serum との比較が必要であろう、2) そのためにも、パーキンソン病症候群患者血清（10 例）を解析して頂きたい、3) 今回の高発現たんぱく質解析結果では疾患によると思われる大きな変化のあるたんぱく質は見られていない、4) 従って、より低発現の血清たんぱく質の解析をお願いしたい、5) パーキンソン病の病変部位は脳黒質、線条体なので、脳脊髄液を解析したほうが妥当と考えられる、6) 脳脊髄液の解析の基礎検討用として、非連結・匿名化された保存検体があるが、プロテオームファクトリー内で解析することが可能かなどの意見が述べられた。これに対して、PF 側の意見として、2) に関しては検体が送付されれば解析を進めたい、4) に関しては、低発現たんぱく質解析法を現在、鋭意検討中である、6) に関しては、現在の PF 倫理委員会の規定では患者の再同意が必要であるが、今後の検討課題として前向きに考えたいことを述べた。

### 3) cICAT 法によるネフローゼ患者血清と標準血清の血清たんぱく質の比較・検討

国立成育医療センターより送付されてきた 6 名のネフローゼ患者（EVQC01, EVQC05, EVQC08, EVQC11, EVQC17, EVQC20：小児（3-4 歳）も含む）の血清（合計 17 検体）に関して、cICAT 解析プロトコールに従い、患者血清（H 鎖試薬で標識）と標準血清（L 鎖試薬で標識）との血清各たんぱく質の同定・比較解析を行った（最終 SCX column 分画で 25 分画した画分を用いて解析）。なお、患者 6 名のうち 5 名は治療前（発症中、たんぱく尿 3+）、

治療中（ステロイド投与中、たんぱく尿 - or 土）、治療後（ステロイド投与終了、たんぱく尿 - or 土、緩解期）の3時点での経時変化を、また1名は治療前と治療中の2時点の経時変化も調べた。その結果、約110~120種類の高発現血清たんぱく質の同定と比較定量が可能であった。同定された患者血清たんぱく質（治療前）数とH/L比の度数分布を図6に、標準血清各たんぱく質と患者血清たんぱく質（治療前）との比較定量比（H/L: 患者血清/標準血清）との関係を図7に示す。なお、知的財産権確保のため、たんぱく質名は表記せず、番号で示した。そのうち、前述のごとく、血小板由来たんぱく質群の変動は疾患によるものではなく血清の調製法の違いによるので考察から除外した。そこで、血小板由来たんぱく質等を除いた約110種類に関して、治療前ネフローゼ患者(6名)血清と標準血清で比較した場合、その発現比率（H/L）値が0.60~1.67の範囲のケースが占める割合は全体の84.0%(82.2~86.3%)であり、日本人健常人(94.3%)やパーキンソン病患者(92%)の場合よりも低かった。これは、ネフローゼ患者の中には小児(3-4歳)の患者も含まれているためかも知れない。同様な低下傾向が、治療中ネフローゼ血清と標準血清を比較した場合(82.2%)および治療後と標準血清と比較した

場合(82.4%)でも観察された。一方、cICAT法の定量誤差範囲の閾値を超えて、H/L値が<0.5, >2.0を示すケースの割合は、治療前では8.4%、治療中では11.4%、治療後では9.44%であり、いずれも日本人健常人(3.5%)およびパーキンソン病患者(4.2%)場合よりも多かった。これらの中には、患者である程度共通に変動がみられるたんぱく質、特定の患者に変動があるもの、疾患とは特に無関係と考えられるもの、および治療前、治療中、治療後で変動がみられるものが存在した。なお、たんぱく尿に関しては治療中でも改善が見られている。図8には、一部の患者で治療前・中・後で変化が観察される数種類のたんぱく質の経時変化を示す。この中には、一部補体関連たんぱく質も含まれる。重症の腎炎を発症している一部のネフローゼ患者の場合には補体関連たんぱく質が変動することがすでに報告(7-9)されているが、腎糸球体炎症を伴わない軽微な小児ネフローゼ患者(MCD)の場合は定かではない。これらの変化が、疾患特有なものなのか、非特異的なものなのか、薬剤投与のためなのか等の詳細な検討は、今後、協力研究機関と相談の上、症例数を増やし解析することおよび他の腎疾患（Focal and segmental glomerulosclerosis (FSFG)、IgA腎症）等を比較解析することによって明らかになるものと考えられる。

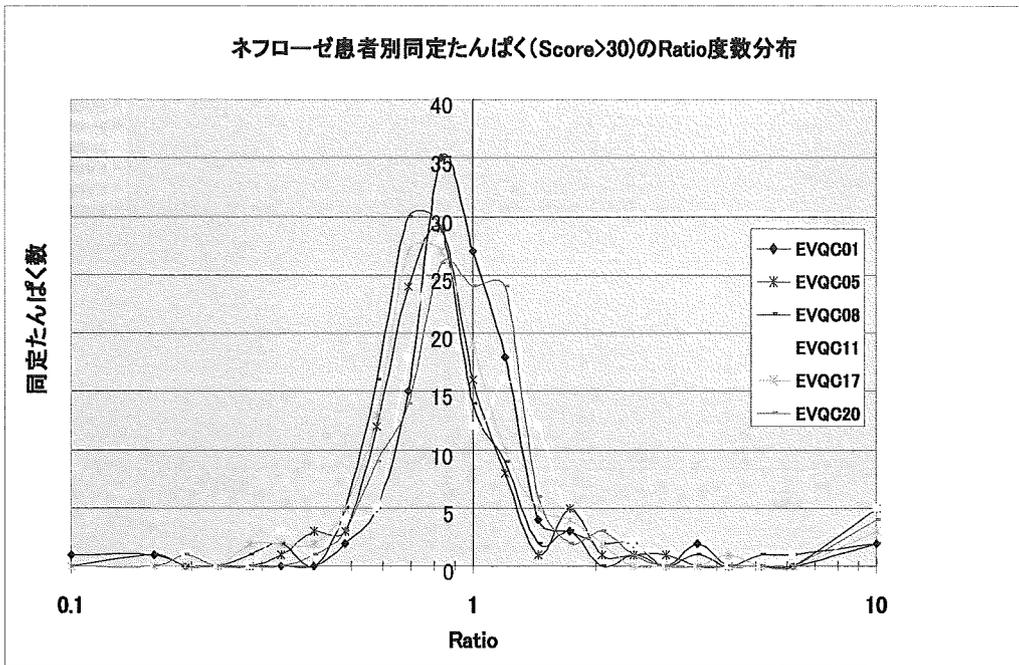


図6. ネフローゼ患者別同定たんぱく質の Ratio(H/L)度数分布

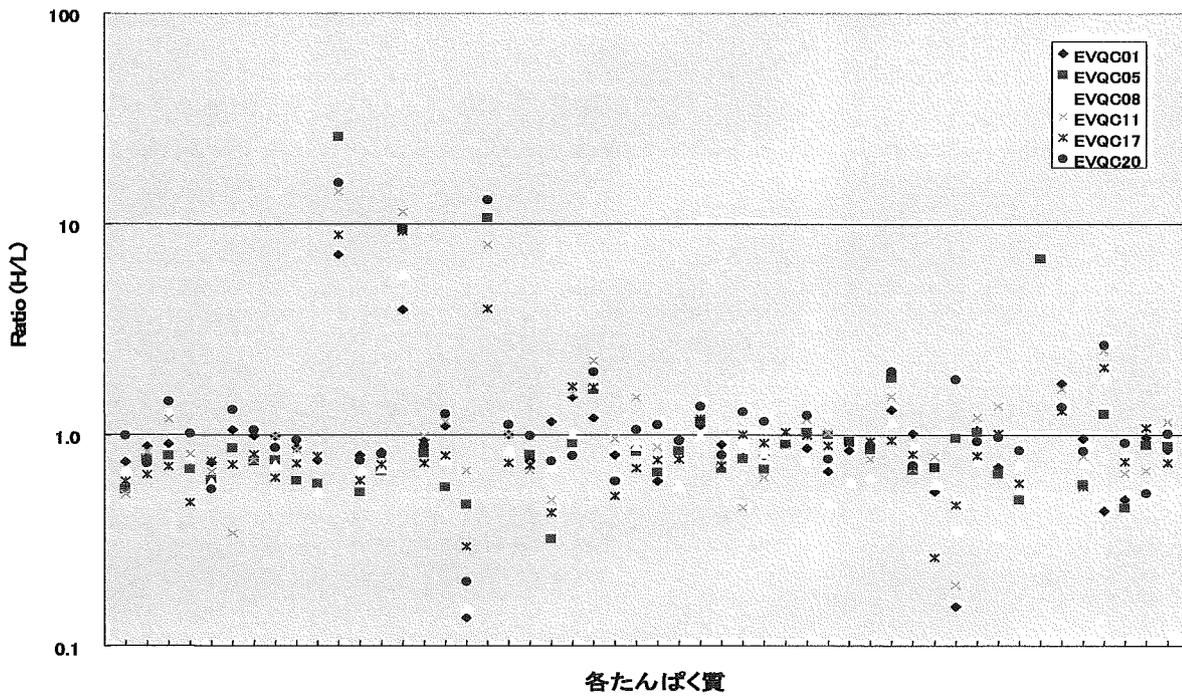
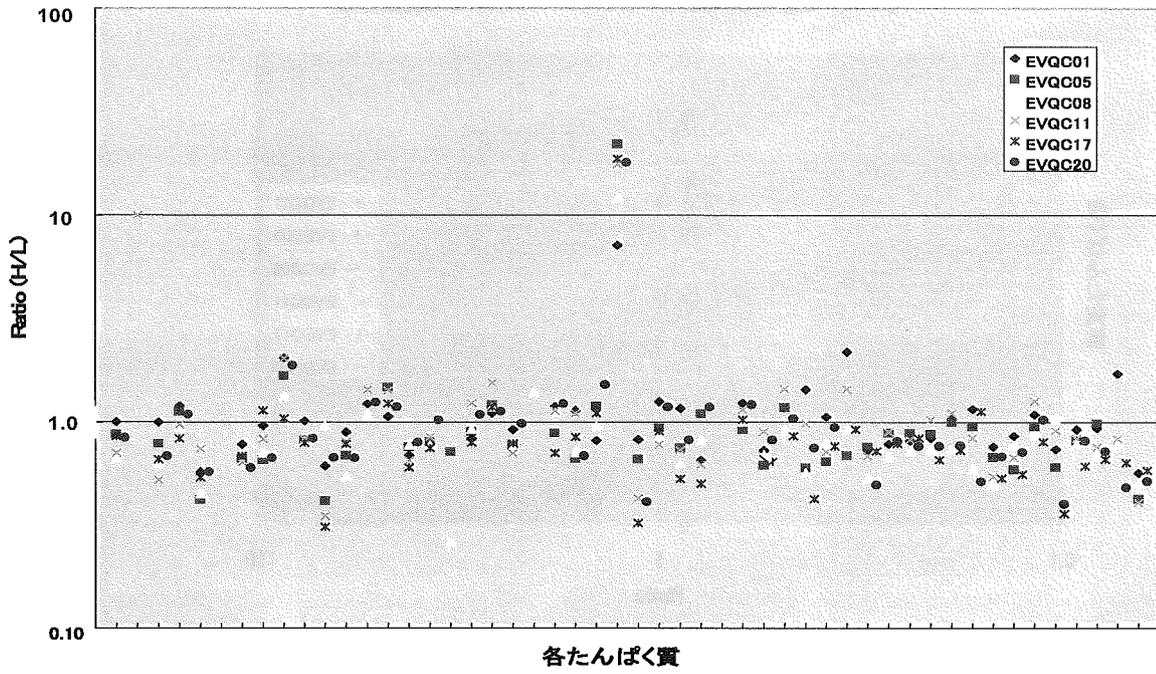


図7. ネフローゼ患者（治療前（発症期））の各血清たんぱく質別 Ratio (H/L)分布

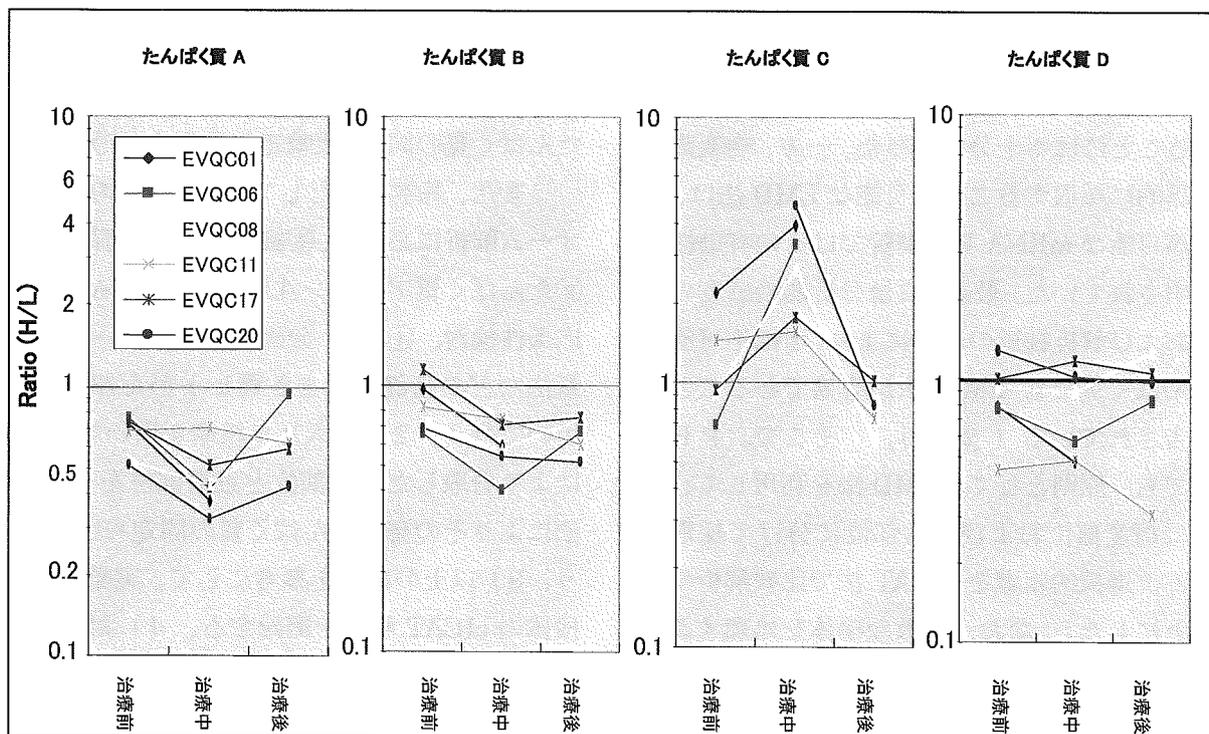


図8. ネフローゼ患者血清たんぱく質の治療前・中・後の経時変化

なお、本解析結果および匿名化番号照合表を国立成育医療センター側に提示し、解析結果に関して打ち合わせを行った。国立成育医療センター側の意見として、1) 今回送付したネフローゼ患者は殆どが再発ではあるが、腎糸球体の炎症は僅か(微小変化)であり補体関連たんぱく質が関与しているとは考えがたい、2) 実際の経時変化をみても病態との関連はあるとは思えない、3) Ratioが標準とずれていることの理由は小児のためかも知れないので他の小児疾患患者或いは正常小児血清との比較はいずれ必要になるであろう、4) plasma hemopexin (isoform)は軽微ネフローゼ患者(minimal change disease, MCP)の再発・緩解期で変化することが報告されている(10)。ネフローゼ患者の血清および血漿での本たんぱく質の挙動について詳細な検討を実施して欲しい、5) 治療前と治療後で大きく変動するたんぱく質が疾患に関与すると考えられる等の意見が提出された。今後、さらに患者血清検体を

測定し、臨床情報との関係を調べ、必要に応じて打ち合わせを行うことにした。

## 2. 細胞・組織たんぱく質解析法の検討:

### 1) 組織たんぱく質解析ワークフロー構築:

現在、PFでは主として患者血清のcICAT法によるプロテオーム解析を行ない、研究協力機関より送付される臨床検体をルーチン業務で解析する体制を構築している。しかし、創薬ターゲット探索には、血清だけでなく、ヒト臨床組織のたんぱく質の解析が非常に重要であることは云うまでもない。実際、研究協力機関より、各種がん組織、心筋組織、皮膚筋肉組織等の病変部および正常部位組織の比較解析がPF側に依頼されている。そこで、研究協力機関と協議して、cICAT法による組織たんぱく質の解析フローの構築を目指した(図9)。

従来、組織たんぱく質の解析研究においては、手術で切除された病変組織ブロック全体を破碎・ホモジネートして解析することが多か

ったが、それでは病変組織に正常組織が混在するため、病変部位と正常部位を正確に比較解析することには不十分であった。一方、病変部位特異的に採取することが可能な LMD 法は、増幅が可能な mRNA 発現解析ではその有効性が証明されていた。最近、質量分析器の感度の上昇および解析技術の進歩により、増幅不可能なたんぱく質でも LMD 法が有効であることが報告されている (2, 11)。そこで、PFとしても、原則として、LMD 法を利用して、正確に病変部位および正常部位に分けて採取した部位選択的組織を cICAT 法で比較解析することにした。なお、多数な検体を処理するルーチン業務を考慮にいて、100 $\mu$ g protein を 1 アッセイ用に使用する解析ワークフローを設定した (図 9)。なお、一次匿名化から切片作成までは研究協力機関で行い、PF 側では送付された検体(切片)の 2 次匿名化、LMD による部位選択的回収、たんぱく質可溶化、cICAT

反応、cICAT ペプチドの質量分析測定および統合データ解析システム(HiSpec)を用いた発現たんぱく質の同定・比較定量解析を行う (図 9)。

また、基本方針として、1) 組織のプロテオーム解析に必要な、①細胞・組織の可溶化法、②たんぱく質アセトン沈殿法、③cICAT の反応条件検討、④SCX 分画法、⑤同定・比較定量法などの基礎検討を各種ヒトがん細胞株を用いて行う、2) 購入ヒト組織を用いて LMD により分取した病変部位と正常部位を cICAT 法によりその発現たんぱく質の同定・比較を行う、3) 以上の結果を参考にして、実際の臨床検体の cICAT 解析を開始する、4) 対象疾患としては、まず始めは日本人に多い胃がんから開始し、次いで他のがん(乳がん)や他疾患の病変組織を検討することとした。なお、本報告書では、1) に関して、今までに得られた予試験的な結果を報告する。

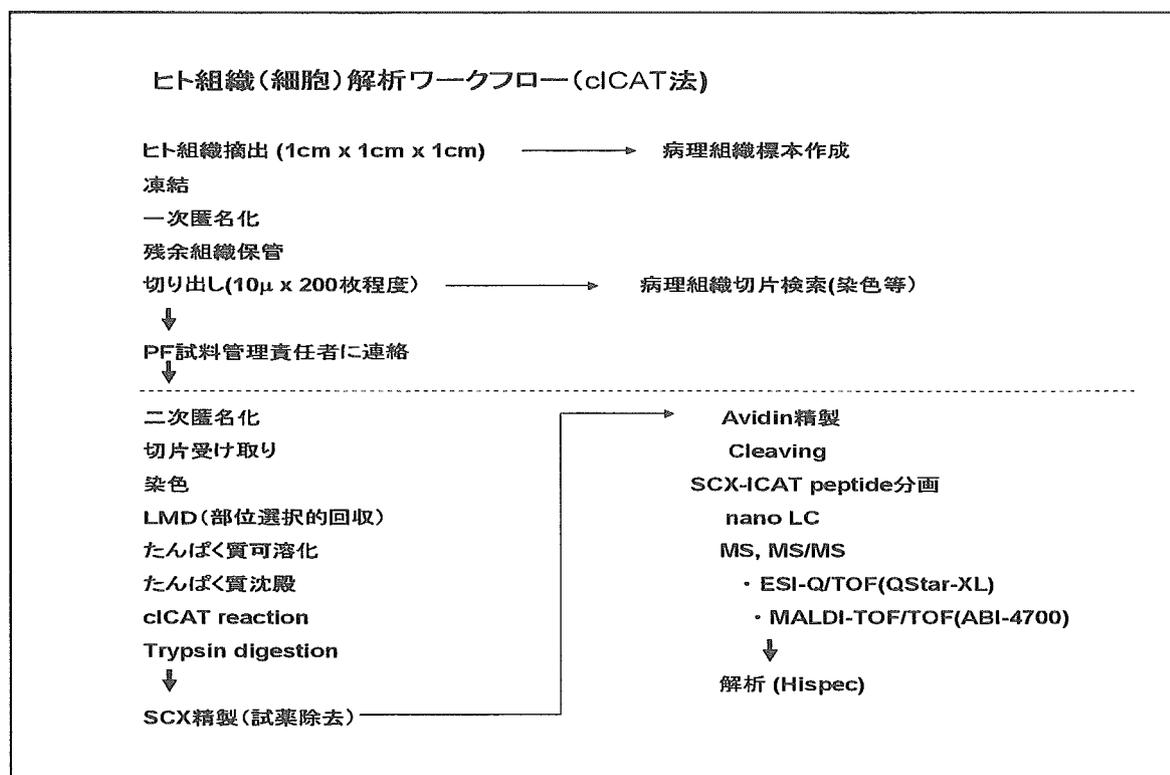


図9 ヒト組織(細胞)解析ワークフロー(cICAT法)

2)細胞の可溶化およびたんぱく質抽出法の検討:

組織・細胞の可溶化法には使用する界面活性化剤 (SDS, CHAPS 等)、変性剤 (尿素、グアニジン塩酸等)、還元剤(DTT, TCEP 等)などの組み合わせにより、種々の方法が報告されており、それぞれ長所・欠点がある。また、疾患、臓器、組織、結合組織の有無、細胞種の違いにより、それぞれに最適化した可溶化法を検討する必要があると考えられる。今回は、比較的複雑性が少ないと考えられる培養ヒトがん細胞株 (KATO-III, MKN-45, MKN-74, HeLa)を用いて可溶化法の検討を行い、その後の一連の cICAT 法による細胞組織たんぱく質の発現解析を行った。ヒトがん細胞株の由来および性質を下記に示す。

1) KATO-III: スキルス印環型胃腺がん株; 浮遊型、極めて悪性。日本人男性 55 歳由来。

2) MKN-45: 低分化型充実型胃腺がん株; 浮遊型、悪性。日本人女性 64 歳由来

3) MKN-74: 中分化型管状胃腺がん株; 付着型、島形成型、日本人男性 37 歳由来

4) HeLa: 子宮頸部腺がん株; 付着型、外国人女性 31 歳由来

なお、細胞の可溶化法は、文献 (12) の方法を参考にして、B.研究方法の3)に記載した方法で、出来る限り多くのたんぱく質を可溶化することを目指した。すなわち、9.8M 尿素, 4% CHAPS, 1mM EDTA, 1mM TCEP, protease inhibitors 溶液で可溶化処理をした細胞粗可溶画分 (Total lysate) を遠心(12,000rpm,

20min)し、上清 (CHAPS/尿素可溶画分) と沈殿に分け、さらに、沈殿部分を 0.1% SDS, 50mM Tris-HCl, 1mM TCEP (pH8.5) 溶液で、95°C, 10 分間加熱処理後、遠心処理を行い、上清 (CHAPS/尿素不溶/SDS 可溶画分) と沈殿残渣画分に分画した。可溶化率を調べるために、上述の細胞粗可溶画分 (Total lysate)、CHAPS/尿素可溶画分、CHAPS/尿素不溶/SDS 可溶画分の各たんぱく質含量を測定した。その結果、KATO-III を実験に用いた場合、細胞粗可溶画分中のたんぱく質含量 5.9mg を 100% とすると、93.2%(5.5mg)は CHAPS/尿素可溶画分に含まれ、残りの 8.3%(0.49mg)が CHAPS 尿素不溶/SDS 可溶画分に含まれることが分かった(実験により多少変動する)。最後の残渣画分(フィルム状固形物)は不溶のためたんぱく質定量が不可能であったが、CHAPS/尿素可溶画分たんぱく質含量 (5.5mg) と CHAPS 尿素不溶/SDS 可溶画分たんぱく質含量(0.49mg)を合計する(5.99mg, 101.5%)と、細胞粗可溶画分の含量 (5.9mg, 100%) にほぼ等しくなることから、殆どの細胞たんぱく質はこの両可溶画分に溶出されたと考えられた。他の細胞株でもほぼ同様な結果が得られ、約 75~90%が CHAPS/尿素可溶画分に、残りの 10~25%が CHAPS 尿素不溶/SDS 可溶画分に含まれることが分かった。以上のことより、本可溶化法により、細胞たんぱく質の大部分を可溶化できるものと考え、CHAPS/尿素可溶画分と CHAPS 尿素不溶/SDS 可溶画分を pool したものを「細胞全可溶画分」とし、以後の実験に用いた。

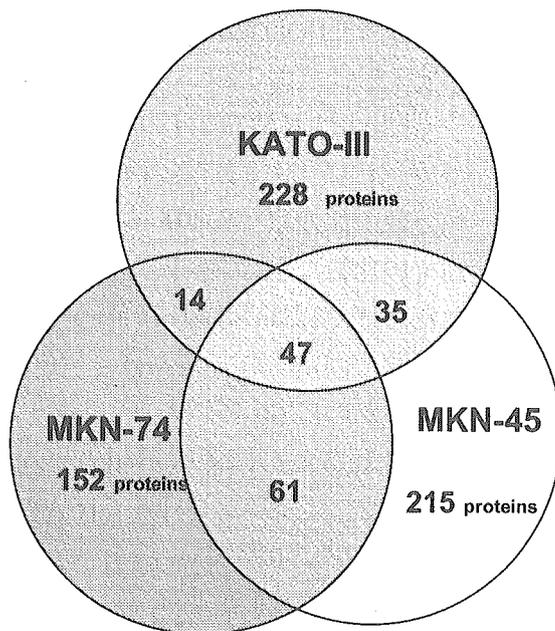
本細胞可溶化画分中からのたんぱく質の単離はアセトン沈殿法により行った。本細胞可溶化画分には通常より高濃度の尿素、CHAPS が含まれているので、通常のアセトン沈殿法では夾雑物の除去が不十分であった。そこで、「方

法」で記載したように、アセトン沈殿物をさらにエタノールで洗浄することにより、夾雑物を除去したたんぱく質画分を得ることができた。なお、細胞全可溶画分からのたんぱく質の回収率は約 80%であった。また、尿素的分解物であるイソ尿素によると考えられるカルバミル化したペプチドは殆ど検出されなかった (1.5%以下)。

### 3) トリプシン断片法 (ショットガン法、non-ICAT 法) によるヒト培養がん細胞株の解析:

ヒトがん細胞株 KATO-III, MKN-45, MKN-75, HeLa より上述の方法により得た細胞たんぱく質各 100 $\mu$ g を常法(4, 11, 13)より、還元カルバミドメチル化後、トリプシン消化を行い、得られたペプチドを SCX カラムクロマトで 10 分画に分け、脱塩後、nano-LC/QSTAR XL で質量分析測定を行い、統合データベースシステム (HiSpec) でペプチドおよびたんぱく質の同定解析をおこなった。その結果、Refseq data base を用い、MASCOT で Rank 1, Peptide Score 20 以上を選択すると、KATO-III では、228 種類 (Rank 指定なし、Score 30 以上では 198 種類)、MKN-45 では 215 種類 (Rank 指定なし、Score 30 以上では 189 種類)、MKN-74 では 152 種類 (Rank 指定なし、Score 30 以上では 130 種類)、HeLa では 627 種類 (Rank 指定なし、Score 30 以上では 914 種類) のたんぱく質が同定された。なお、ここで言う「同定」とは、MASCOT によって上述の基準以上のスコアでヒットしたことを意味しており、偽陽性の結果の排除等の精査を経た最終的な同定数については、別途検討する必要がある。また、上述の同定たんぱく数は複数回の実験の中の代表例を示したものである。

がん細胞株により発現たんぱく質が大きく異なる。



すべてに共通の47種:

heat shock proteins, actin, myosin, keratin 1, villin, nucleolin, nucleophosmin, elongation factors, Zink finger, pyruvate kinases, annexin A2, PKC, solute carrier family 2, prolyl 4-hydroxylase, aspartate aminotransferase, etc

図 10. トリプシン断片法（ショットガン法）によるヒト胃がん細胞株(KATO-III, MKN-45, MKN-74)の同定たんぱく質数の比較(ベン図)

このうち、ヒト胃がん細胞株同士で同定たんぱく質を比較すると、互いに異なる分布（ベン図）を示しており、スキルス印環型腺がん株の Kato-III（228 種類）と低分化型充実型腺がん株の MKN-45（215 種類）では 82 種類が共通、Kato-III と中分化型管状腺がん株 MKN-74 株（152 種類）では 61 種類が共通、MKN-45 と MKN-74 では 108 種類が共通であり、3 細胞株で共通に観察されたたんぱく質は 47 種類であった（図 10）。以上の結果は、がん細胞株により発現たんぱく質が大きく異なることを示すと考える。

しかし、nano-LC/QSTAR XL での分析では非常に多数のピークが観察されている。これに対して、QSTAR XL の IDA Mode には限界があり、全てのペプチドを分析しているわけ

ではなく、取りこぼすピークがあるので、細胞株間で共通に発現していても片方にのみが観察される可能性は十分に留意する必要があると考える。実際に、MIF は本ショットガン法の解析では、KATO-III にのみに観察されていたが、後述する cICAT 解析により、他の細胞株でもほぼ同レベルで発現されることを観察している。このことは、本ショットガン解析法のみではたんぱく質の同定は可能であるが比較発現定量解析には不十分であることを示す。

4) cICAT 法によるヒト培養がん細胞株の解析:

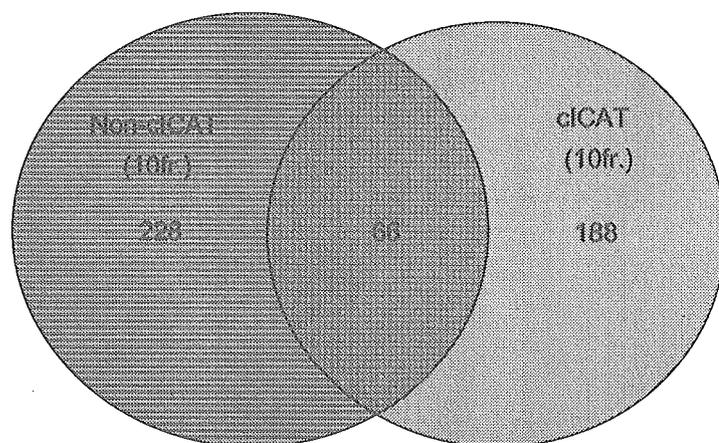
そこで、cICAT 法による細胞たんぱく質の発現解析を検討した。まず、同一細胞株

(KATO-III)を用いて、L鎖とH鎖で標識し、その発現たんぱく質の同定と比較定量を行った。すなわち、B. 研究方法の4)に記述した方法に従い、KATO-III 細胞たんぱく質(100 $\mu$ g)をL鎖試薬とH鎖試薬で各々標識(2h, 37 $^{\circ}$ C)し、トリプシン処理(16h, 37 $^{\circ}$ C)、アビジンカラム処理、TFA処理(1h, 37 $^{\circ}$ C)を行い、得られたcICATペプチドをSCXカラムクロマトで10分画し、各画分のcICATペプチドをNano-LC/Q-Star XLで質量分析測定を行い、統合データベースシステム(HiSpec)ペプチド/たんぱく質の同定およびH鎖とL鎖の比較定量比(H/L)解析を行った。なお、検索対象DBとしては、血清の場合と同様にRefSeqを用いた。その結果、Refseq data baseを用い、MASCOTでRank 1, Peptide Score 20以上を選択すると、188種類の細胞たんぱく質の同定および比較定量が可能であった。また、殆どのたんぱく質のH鎖とL鎖の比率(H/L)はで約1であり、同定されたた

んぱく質数とH/L比の度数分布を調べると、その最頻値は1.0であった。このことは、cICAT法による細胞たんぱく質の比較定量法も基本的には満足するものであることを示す。

図11はKATO-IIIのcICAT法とショットガン法により同定されたたんぱく質の種類と数の比較(べん図)を示す(SCX10分画での比較)。その結果、cICATで同定されたたんぱく質(188種類)のうち、ショットガン法で同定されたたんぱく質(228種類)と共通したのは66種類のみであり、両方法で同定されるたんぱく質が相当異なることが分かった。このことは、cICAT法で同定されるペプチドがCys含有ペプチドに限局されることを反映したものと考えられる。なお、共通の66種類の中には、MIF, pyruvate-kinases, prolyl 4-hydroxylase, calreticulin, cyclophilin A, chaperonin, heat shock 90D, tublin等が含まれる。

SCX10分画での比較



\* cICAT法とショットガン法では同定されるたんぱく質が異なる(本条件下)。

図11. KATO-IIIのcICAT法とショットガン法により同定されたたんぱく質の種類と数の比較(べん図)

次に、cICAT法を用いて、異なるがん細胞株同士(KATO-III, MKN-45, MKN-74 etc)

での発現たんぱく質の比較定量が可能かどうか検討した。すなわち、KATO-IIIをL鎖試

薬で、MKN-45 を H 鎖試薬で標識し、同様な方法で得られた SCX10 分画の各画分の cICAT ペプチドを Nano-LC/QSTAR XL で質量分析測定を行い、統合データベースシステム (HiSpec) ペプチド/たんぱく質の同定および H 鎖と L 鎖の比較定量比解析を行った。その結果、Refseq data base を用い、MASCOT

で Rank 1, Peptide Score 20 以上を選択すると、本解析で 292 種類の細胞たんぱく質の同定が可能であり、そのうち 261 種類の比較定量が可能であった。残りの 31 種類に関しては、ピークの重複および片方しか存在しなかったために正確な定量比が算出されなかった。

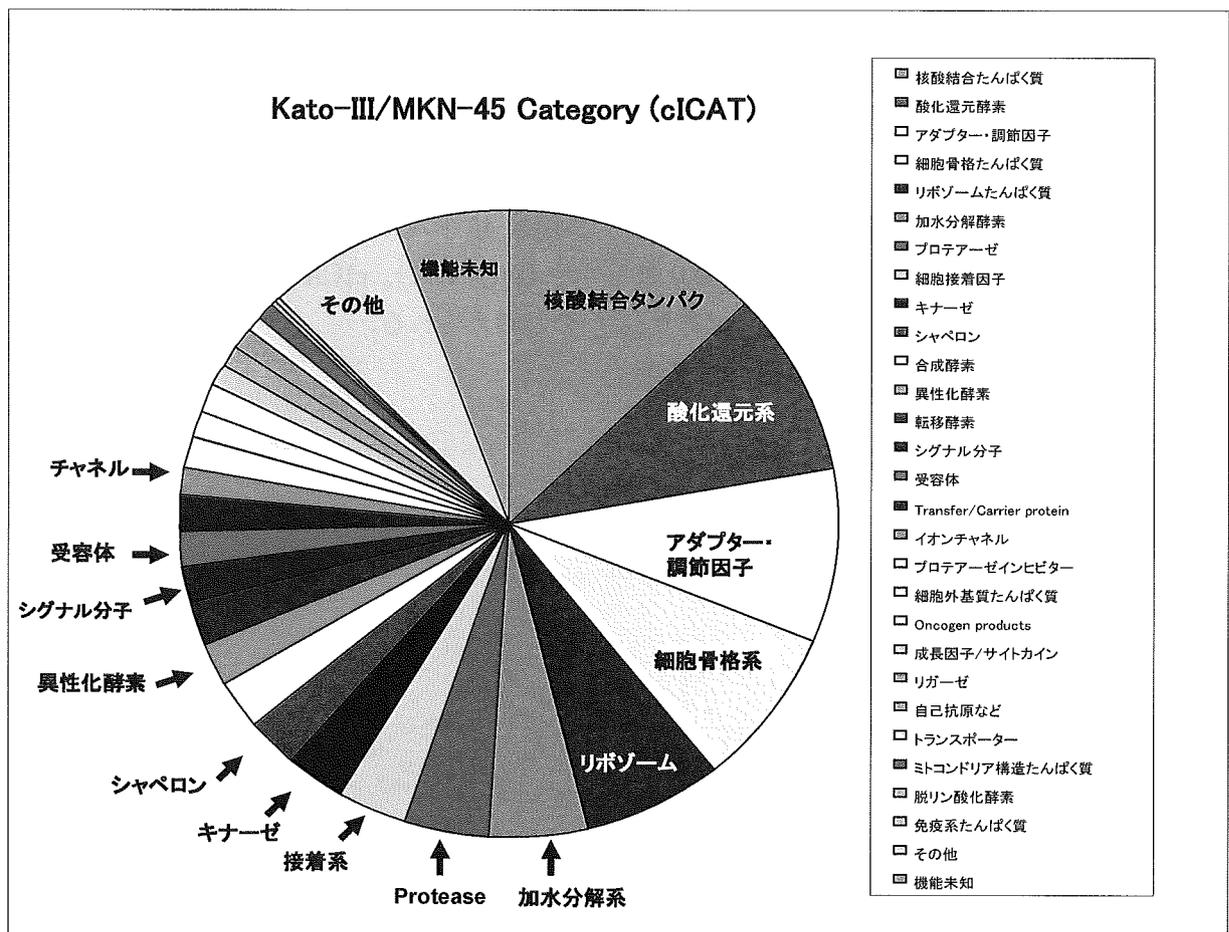


図 12. KATO-III と MKN-45 の cICAT 解析で同定したたんぱく質(292 種類)のカテゴリー分類

図 12 には、本解析で同定可能であったたんぱく質(292 種類)のカテゴリー分類を示す。

上位は、核酸結合たんぱく質系、酸化還元系たんぱく質系、アダプター系、細胞骨格系、リボゾームたんぱく質系、加水分解酵素系、たんぱく質分解酵素系、接着分子系、キナーゼなどが占め、下位になると微量成分と推定される細胞膜に存在する受容体系、イオンチャネル系、トランスポーター系が認められた。

図 13 は、KATO-III と MKN-45 の同定各たんぱく質の発現比較定量比(KATO-III/MKN-45)を示す。なお、知的財産権確保のため、たんぱく質名は表記せず、番号で示した。その結果、比が 0.5 以上、2.0 未満のたんぱく質が 231 種類 (88.5%) であり、cICAT 法の定量誤差範囲の閾値を超えて変動

(0.5 未満、2.0 以上) しているものは 30 種類 (11.4%) であった。そのうち、KATO-III に選択的なもの(L/H が 2.0 以上)は 21 種類(8%) であり、MKN-45 に選択的なもの(H/L が 0.5 未満)は 9 種類(3.4%)存在した。なお、上述の比が、 $0.5 < \text{L/H} < 2.0$  である 231 種類の中には house keeping gene product が多数含まれていた。また、閾値を大きくこえたものに関しては今後詳細に検討する予定である。なお、前述のごとく、ショットガン法では KATO-III のみに観察された MIF は本 cICAT 法の解析では、KATO-III により多く存在するものの MKN-45 にも相当量存在することが確認された (L/H: 1.87)。cICAT 法の長所を反映したものと考えられる。

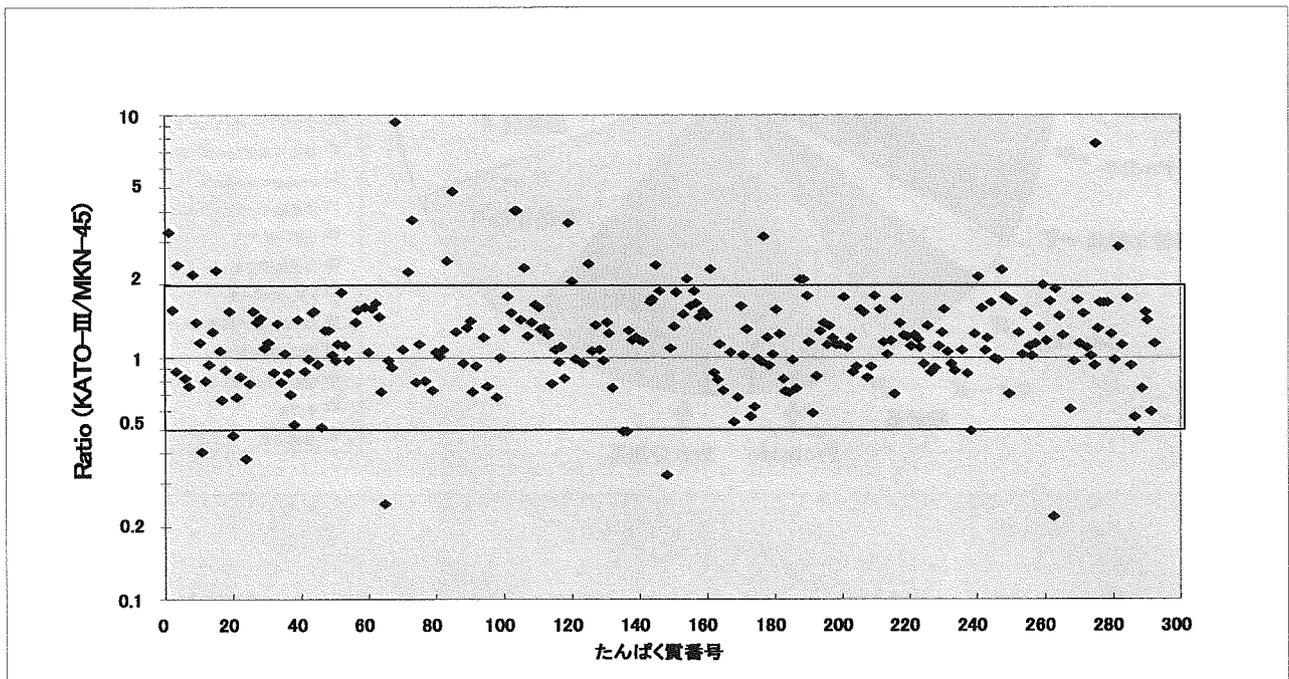


図 13. KATO-III と MKN-45 の同定各たんぱく質の発現比較定量比(KATO-III/MKN-45)

なお、同様に、KATO-III と MKN-74 の同定たんぱく質と発現比較定量比を解析した結果、162 種類のたんぱく質が同定され、そのうち、146 種類が比較定量可能であった。KATO-III に選択的 (KATO-III/MKN-74 が 2 以上) なものは、10 種類であり、MKN-74 に選択的 (KATO-III/MKN-74 が 0.5 未満) なものは 7 種類であった。また、KATO-III と HeLa を比較した結果、242 種類のたんぱく質が同定され、207 種類が比較定量可能であった。なお、上述の同定たんぱく数および比較定量比は複数回の実験の中の代表例を示したものである。

以上の結果より、cICAT 法により細胞たんぱく質の同定および比較定量が基本的には可能であると考えた。但し、現段階では、SCX クロマトの分画数は 10 分画であるが、より詳細な解析には SCX カラムのスケールダウン、cICAT 反応・TFA 切断条件、cICAT ペプチドの溶出条件の最適化を検討し、最終的には血清の場合と同様に 25 分画を用いて解析する予定である。以上の基礎的実験を行った上で、その後、実際のヒト組織の解析に着手したい。

### 3. 低発現血清たんぱく質の解析検討：

現在、cICAT 法を用いて、各疾患患者の血清中の高発現たんぱく質 (上位 100 種類程度) の発現解析研究を鋭意行っているが、疾患のバイオマーカー探索および創薬ターゲット探索を行うためには、より低発現の血清たんぱく質の比較・解析研究が非常に重要である。そのため、現在、以下に述べる基本概念で予備的研究を実施中である。

#### 1) 基本概念：

血清 (血漿) 中の各たんぱく質はプロセッシングや分解、修飾を受けて多様な状態、質的に異なる状態で存在していることは周知の事実である。また、疾病により各たんぱく質の総和量は変化しなくても、質的に変化している可能性も示唆されている。疾患に関連して変動するたんぱく質をより多く見出すためには、このような質的に異なるたんぱく質を分離・検出することが必要である。また、血清 (血漿) たんぱく質の各濃度は非常にダイナミックレンジが大きく、albumin を含む上位 22 種類で約 99% を占める。現在、血清たんぱく質のルーチン解析においては Agilent 抗体カラムにより上位 6 種のたんぱく質を除去して cICAT 測定を行っているが、測定に使用している Q-Star XL の検出ダイナミックレンジは  $10^2$  程度であるため常に同定・定量できるのは約 100~130 種類の高発現たんぱく質である。より低発現なたんぱく質を検出するためには、高発現たんぱく質を除去することが肝要である。

以上の問題を解決するために、血清 (血漿) 試料をたんぱく質レベルで様々な方法で分画することを試みた。たんぱく質レベルで分画することで、質的に異なるたんぱく質を分離し、あるいはより低発現なたんぱく質を検出することが可能になると考える。ただし、すべてを満足できるような血液たんぱく質の分画方法は存在しない。様々な観点から切り口を変えて分画を試み、疾患に関連して変動するたんぱく質の探索を行う。

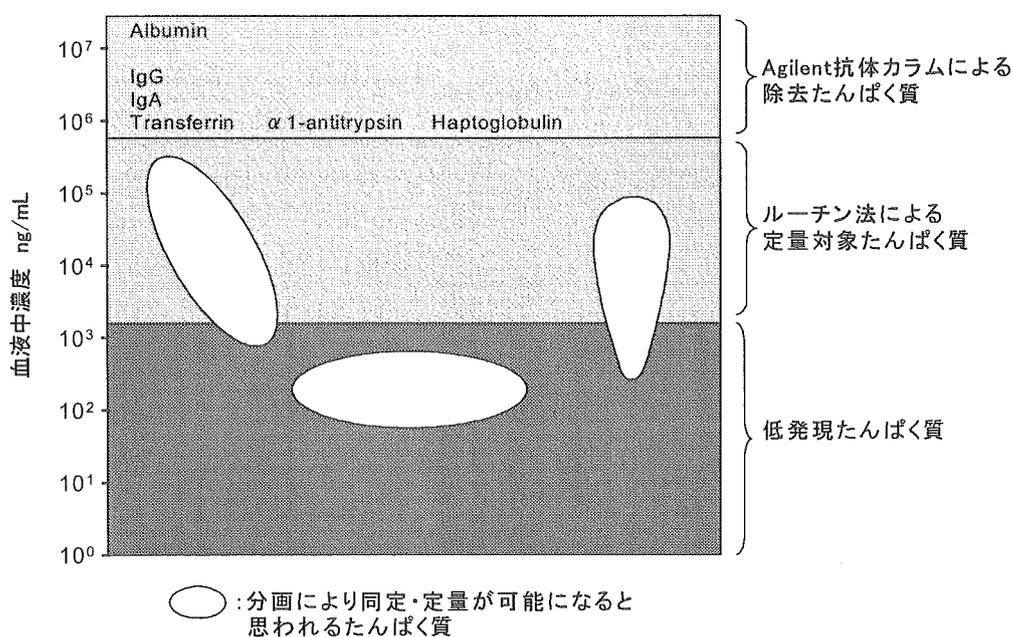


図 14 低発現たんぱく質解析の概念図

たんぱく質の比較定量解析は cICAT 法を原則として用いた。cICAT 化反応させる前に以下に示す方法でたんぱく質レベルの分画を行い、その後に cICAT ルーチン法に準じて試料を調製した。なお、ペプチド画分 (Mw 10kDa 以下) に関しては、cICAT 法だけでなく、SELDI-TOF 法(14)も用いた。

H17 年度は、逆相分画法、溶媒抽出による低分子量分画法、アフィニティー分画法について条件検討を行った。詳細な方法については、各項目で記述する。

## 2)たんぱく質分離用逆相カラムによる分画法の検討

標準血清 (CT02S) 160 $\mu$ L を 5 倍希釈後に

Agilent 抗体カラムに通して、6 種タンパク質が除去されたフロースルー画分 6mL を得た。これに尿素 1080mg 次に TFA0.2%を添加して試料を変性させた。このうち 1/10 量をたんぱく質分離用逆相カラム (Agilent 社 mRP-C18 4.6 $\times$ 50mm) に注入し、グラジエント法により分離・溶出して、5 分画に分画した(15)。この操作を 10 回繰り返して、血清 160uL 相当量を処理した。各画分は凍結乾燥の後、50mM Tris, 0.1%SDS, pH8.5 400 $\mu$ L もしくは 50mM Tris, 5M 尿素, pH8.5 400 $\mu$ L で再溶解し、定法に従って ICAT 化を行った。逆相分画によるクロマトを以下に示す。現在、同定たんぱく質や再現性等について検討中である。