

厚生労働科学研究費補助金（疾患関連たんぱく質解析研究事業）
分担研究報告書

疾患関連たんぱく質解析に関する研究

分担研究者 佐古田 三郎 大阪大学大学院 医学系研究科 教授

研究要旨 乳癌組織、閉塞性肺疾患の血清、運動ニューロン病の血清は随時プロテオーム解析を施行中であり、今後マーカー等について検討を行う。消化器癌は現在組織を集積中であり、近日プロテオーム解析を開始できる見込みである。リンパ腫は、正常組織使用の倫理的問題点を解決後、早急に解析に入る予定である。

A. 研究目的

難治性疾患として、腫瘍性疾患、閉塞性肺疾患、運動ニューロン疾患の組織や血清蛋白を網羅的に解析し、治療方法の開発、診断マーカー、治療評価マーカーなどを見出すことを最終目的とする。

今回は、臨床データが入力された検体について、プロテオーム解析を実際に進めていくことに重点をおいた。

B. 研究方法

乳癌、消化器癌、リンパ腫の組織、閉塞性肺疾患、運動ニューロン病の血清について、倫理委員会の定める手続きに従い、同意書を取得し、検体を集積し、感染症チェックを行う。組織については、切片を作成し、腫瘍組織と正常部分を区別して、プロテオーム解析を施行していく。

C. 研究結果

乳癌 9 例、閉塞性肺疾患 32 例、運動ニューロン病 20 例をプロテオーム解析中である。臨床データも随時収集、蓄積されている。したがって、それらの最初の結果について、平成 19 年度のはじめに検討できる予定である。

消化器癌は現在組織を集積中であり、近日プロテオーム解析を開始できる見込みである。

リンパ腫に関しては、腫瘍組織と同じ患者の正常組織を確保することには、倫理的に問題があり、慎重に検討した結果、リンパ腫以外の疾患で外科的に切除された検体に含まれるリンパ節で、診断

に必要な部分を除いた残余部分を使うことで、近日解析に入る予定である。

D. 考察

臨床データが入力された検体について、プロテオーム解析を実際に進めていく段階に達し、その結果が待たれる。

今後、最終目的である治療方法の開発、診断マーカー、治療評価マーカーなどについて、臨床データと比較検討していく予定である。

臨床データの入力に関しては、検体採取後の経過も重要であり、個人情報保護法を尊重しながら、最新のデータを入力し、さらに適宜更新していく。

E. 結論

プロテオーム解析を実際に進めていく段階に達した。さらに解析に必要な検体数を確保するために、検体の集積を続けていく予定である。今後、研究目的に記載した点について、最終目的に達すべく、詳細な解析に入る。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金（疾患関連蛋白質解析研究事業）
分担研究報告書

疾患関連蛋白質解析のための質量分析法の確立

分担研究者 高尾敏文 大阪大学蛋白質研究所 教授

質量分析法を用いた生体内蛋白質・ペプチドの構造解析をフェムトモルレベルの微量で精度よく行うための方法論の確立を目指し、質量分析に関連する分析的手法やハードウェアの開発、並びに、データを効率よく、確度よく解析するためのソフトウェアの試作を行ってきた。本年度は、分子量 10 kDa 以上の高分子量蛋白質画分について蛋白質プロファイルを効率よく得る方法をオンライン LC/ESI-MS/MS を用いて確立し、健常人由来尿蛋白質のデータベースを構築した。また、尿由来糖ペプチド、糖蛋白質の分離法、並びに、糖鎖構造解析法について検討した結果、LC/ESI-MS/MS による網羅的糖鎖構造解析が可能となった。

A. 研究目的

疾患関連の微量蛋白質の網羅的同定および翻訳後修飾の解析には、化学・分析的手法、並びに、質量分析に関するハード・ソフトウェアの開発研究は必要不可欠である。本研究では、尿を生体材料として、マーカー探索のためのペプチド・蛋白質の高効率の分離・抽出法を確立し、尿蛋白質・ペプチドのデータベースの構築、並びに、癌患者尿よりマーカー候補の探索を行う。

本年度は、上記目的を達成するために、以下の3つの研究内容を実施した。

- 1) 分子量 10 kDa 以上の蛋白質画分について、健常者および癌患者尿 10~15mL から約 300~400 種の蛋白質を同定し、個々人の尿蛋白質データベースの構築を行った。
- 2) 尿蛋白質・ペプチドは糖鎖修飾を受けているものが少なからずあり、それらを効率よく分離、特異的に検出・構造解析する方法を最新のオンライン nanoLC/ESI-MS/MS を用いて検討した。
- 3) 肺癌患者尿から同定したマーカー候補ペプチド (X) の精査 (健常者 (7 例) 及び患者尿 (24 例) における量的評価) を行った。定量解析は安定同位体 ^{18}O 標識により MS を用いて行った。

B. 研究方法

既設の2つのタンデム質量分析計 (ESI-MS/MS, MALDI-MS/MS) を用いて、尿から抽出、単離した蛋白質・ペプチドの測定を行ない、網羅的同定及び修飾構造解析を行った。質量スペクトルの解析には、一次構造解析支援ソフトウェア “SEQMS” (1998 年に開発) を、データベース検索による蛋白質同定には市販の検索エンジン “MASCOT” を用いた。MASCOT の検索結果は、さらに、同定精度の向上を目的に H17 年度試作したソフトウェアにより検証した後に、データベース構築に用いた。

尿ペプチドの分離は、内径 1 mm の強陽イオン交換担体カラム、内径 75 μm の逆相担体カラムを用いて行った。また、尿蛋白質は、予め限外ろ過膜により単離しておいた蛋白質画分 (10 kDa~) を酵素消化し、上記と同様のイオン交換クロマトグラフィー (82 分画) により分離後、各々の画分に対して nanoLC /ESI-MS/MS により蛋白質同定を行った。

ペプチドの定量は、安定同位体 ^{18}O 標識化ペプチド (酵素あるいは酸触媒を用いて調製) を尿試料に一定量スパイクして MS 測定し、観測されるイオンピークの強度比をもとに行なった。ピーク強度比の算出は、H16 年度に開発したソフトウェア

“Isotopica”を用いて¹⁸O/¹⁶Oの同位体比を求めることにより行った。

C. 研究結果

1) 尿蛋白質のプロファイリング法の確立とデータベース構築。

分子量10 k Da以上の蛋白質画分について、酵素消化の後、イオン交換クロマトグラフィー(82分画)→各々の画分について逆相カラムを用いたオンラインnanoLC/ESI-MS/MSにより、蛋白質プロファイルを効率よく得る方法を確立した。その結果、健常者および癌患者尿10~15mLから約300~400種の蛋白質を同定することができ、個々人の尿蛋白質データベースの構築が可能となった。

2) 糖鎖構造解析法の検討

尿蛋白質・ペプチドは糖鎖修飾を受けているものが少なからずあり、それらを効率よく分離、特異的に検出・構造解析する方法をオンラインnanoLC/ESI-MS/MSを用いて検討した。その結果、親水性クロマトグラフィーによる糖ペプチドの濃縮が可能であること、また、MS/MSによる特定のフラグメントイオン(オキシニウムイオン)をもとに糖ペプチドの特定を容易に行えることを見出した。さらに、分子量5kDa前後の比較的サイズの大きい糖ペプチドの解析においても糖鎖構造を同定できることがわかった。

3) 肺癌患者尿から同定したマーカー候補ペプチドの精査

大腸癌患者5例、膵臓癌4例、胃癌1例、肝臓癌5例、前立腺癌4例、肺癌5例、健常者尿7例の比較解析(10 k Da以下のペプチド画分)から、特定の癌種で、細胞質蛋白質由来の特異なペプチド(X)が比較的多量に尿中に排泄されていることを見出した。さらに検体を増やして調べた結果(前立腺癌患者8例、腎細胞癌4例、健常者4例)、半定量的だが、肺癌、前立腺癌患者の数例において、上記のペプチドが比較的多量に検出

された。現在、各種肺癌症例(24例)に対してさらに詳しく調べている。また、ペプチドの定量は、H17年度確立した安定同位体¹⁸Oで標識したペプチドを尿試料にスパイクし、内部標準とすることで行った。また、尿中ペプチド量は対クレアチニン(mg)量として求めた。

D. 考察

尿蛋白質プロファイルにおいては、一回の採尿試料を用いて約300~400種の蛋白質(その内約1/3が膜蛋白質由来)がルーチンに同定できるが、スペクトルの再現性、検索結果の信憑性には未だ問題がある。また、個体差や日間変動もどのくらいあるのか明らかとなっていない。尿蛋白質データベース構築においては上記2つの問題を解決していく必要があり、MSのハード・ソフトウェアの最適化、あるいは、多数の試料を分析することでこれらの問題を明らかにしていきたい。現在、LC/ESI-MS/MSの測定においては、同一試料を2~3回分析して同定率を上げる方法を評価している。

尿蛋白質・ペプチドには糖鎖が付加したものが多く存在することがこれまでの解析から明らかとなっている。また、ペプチドの解析にはMALDI-MS/MSを用いてきたが、糖ペプチドの同定には利用できないことがわかっている。糖鎖の解析には、しばしばESI-MS/MSが利用されている。MS/MSでは、一般に、糖鎖の組成、配列、そして分岐構造の情報が得られるが、尿蛋白質、ペプチドのルーチン解析においても、それらの情報が効率よく得られることがわかった。しかし、MS/MSで通常行う中性ガスによる衝突活性化開裂では、ペプチド鎖の開裂は殆んど起きないため、蛋白質同定が困難となる。現在、糖鎖(N-結合型)を切断する酵素(PNGaseF)で処理した後に蛋白質同定を行っているが、2回の分析が必要となることや糖鎖結合部位に関する情報が得られないといった問題がある。この問題を克服するために、

今後、新しい技術（電子捕獲解離法）を導入し、評価していく予定である。

また、糖ペプチドと糖修飾のないペプチドの混合物の分析では、MSにおける測定モードやパラメーターが異なること、LCでの分離が両者に対して一度には不十分であることから、糖ペプチドを特異的に濃縮する方法を種々検討した（レクチンカラム、ほう酸カラム、親水性樹脂等）。その結果、尿由来糖ペプチド・蛋白質の濃縮には親水性樹脂が有効であることがわかった。現在、種々分離条件の最適化を行っている。以上の研究をもとに、今後、糖鎖構造、並びに、それらにより修飾されている蛋白質と病態との関連について調べていく予定である。

具体的な疾患マーカーの探索については、本年度、1種類の候補ペプチドを見出しており、現在それに対して検体数を増やして検証作業を行っている。また、これまでに蓄積したデータの詳細な比較解析を引き続き進め、新たなマーカー候補ペプチドの洗い出しを行っていく予定であるが、個人間および個人内での変動や疾患による変動等を区別するためには、さらに多くの試料についてデータを蓄積していく必要がある。

^{18}O 標識による定量解析については、H16年度開発の“Isotopica”を用いることで、上記マーカー候補ペプチドの定量を正確に行うことができた。しかし、 ^{18}O 標識化ペプチドの調製については、現在行っている酵素や酸触媒を用いる方法には限界があり、アミノ酸配列によっては適用できない場合もある。この問題を解決すべく、 ^{18}O 標識ペプチド調製法を新たに確立する準備をしている。

E. 結論

尿 10~15mL を出発材料として分子量 10 k Da 以上の蛋白質画分に対して、イオン交換クロマトグラフィー（82分画）→nanoLC/ESI-MS/MSにより、約 300~400 種の蛋白質の同定が行えることがわかった。また、その内約 1/3 が膜蛋白質由

来であるという興味深いデータが得られた。

尿由来糖蛋白質・糖ペプチドの糖鎖構造を nanoLC/ESI-MS/MS により網羅的に解析できることがわかった。また、尿から糖ペプチドを効率よく分離、MSによる検出が行える方法を確立した。

健常者（7例）及び患者尿（24例）の比較解析より、肺癌患者尿よりマーカー候補ペプチド（X）を見出した。さらに、16例の患者尿についてペプチド X の存在様式を調べた。また、ペプチドの定量解析は、安定同位体 ^{18}O 標識法と MALDI-MS により再現性よく行うことができた。その結果、ペプチド X は特定の癌種において尿中への排泄量が増えていることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Takada R, Satomi Y, Kurata T, Ueno N, Norioka S, Kondoh H, Takao T, Takada S.: Mono-unsaturated Fatty Acid Modification of Wnt Protein: Its Role in Wnt Secretion., **Developmental Cell**, 11, 791-801 (2006) (co-corresponding author).
- ② Watari A, Takaki K, Higashiyama S, Li Y, Satomi Y, Takao T, Tanemura A, Yamaguchi Y, Katayama I, Shimakage M, Miyashiro I, Takami K, Kodama K, Yutsudo M.: Suppression of tumorigenicity, but not anchorage independence, of human cancer cells by new candidate tumor suppressor gene CapG. **Oncogene** 25, 7373-7380 (2006).
- ③ Yokosuka T, Yoshinari K, Kobayashi K, Ohtake A, Hirabayashi A, Hashimoto Y, Waki I, Takao T. Information-Based-Acquisition (IBA)

technique with an ion-trap/time-of-flight mass spectrometer for high-throughput and reliable protein profiling. **Rapid Commun Mass Spectrom.** 20, 2589-95 (2006).

- ④ Kita K, Okumura N, Takao T, Watanabe M, Matsubara T, Nishimura O, Nagai K.: Evidence for phosphorylation of rat liver glucose-regulated protein 58, GRP58/ERp57/ER-60, induced by fasting and leptin. **FEBS Lett.** 580, 199-205 (2006).
- ⑤ 高尾敏文：質量分析の可能性 -未知生体分子の探索ツールとして-、生体の科学、金原一郎記念医学医療振興財団／医学書院、Vol .56, 621-625 (2005)
2. 学会発表
- ① 高尾敏文：尿プロテオミクスによる疾患マーカー探索 (招待講演)、第 22 回臨床フリーラジカル会議 (京都)、4 月 1 日、2006
- ② 高尾敏文：網羅的解析からバイオマーカー探索へ、シンポジウム「網羅的解析のゆくえ」オーガナイザー、第 54 回質量分析総合討論会 (大阪)、5 月 17-19 日、2006
- ③ A. Taya, Y. Satomi, K. Suto, J. Fernández-de-Cossio, T. Takao: 安定同位体 ^{18}O 標識を利用したヒト尿の比較定量プロテオミクス、日本ヒトプロテオーム機構第 4 回大会(東京)、7 月 18-19 日、2006
- ④ 高尾敏文：質量分析の可能性、微量生体タンパク質の探索と翻訳後修飾解析、蛋白質科学シンポジウム「生命科学の発展を担う蛋白質科学」(東京)、10 月 5 日、2006
- ⑤ T. Takao, Y. Satomi, A. Taya, K. Suto, J. Fernández-de-Cossio: Proteomic analysis of human urine for biomarker discovery. (招待講

演) The 18th Annual meeting of the Korean society for molecular cellular biology, Seoul, Oct. 13, 2006.

- ⑥ 高尾敏文：プロテオミクスによるバイオマーカー探索 (教育講演)、第 39 回九州人工透析研究総会(大分) 九州人工透析学会、11 月 26 日、2006

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- ① 発明の名称：新規ペプチド
発明者：山崎基生、高橋憲行、南野直人、佐々木一樹、高尾敏文、里見佳典
PCT/JP2006/314969 号
- ② 発明の名称：新規ポリペプチド及びその用途
発明者：中里雅光、高尾敏文
PCT/JP2006/309192 号

2. 実用新案登録

なし

3. その他

(研究協力者)

- ✓ 里見佳典 (大阪大学蛋白質研究所助手)
- ✓ 須藤浩三 (ヒューマンサイエンス財団流動研究員)
- ✓ 田家亜由美 (文部科学省科学研究費特任研究員)
- ✓ 門田守人、山本浩文 (大阪大学大学院医学系研究科 消化器外科学)
- ✓ 中森正二 (国立病院機構 大阪医療センター)
- ✓ 野々村祝夫、中山雅志 (大阪大学大学院医学系研究科 泌尿器科学)
- ✓ 中里雅光、芦谷淳一、山口秀樹 (宮崎大学医学部附属病院 第三内科)

厚生労働科学研究費補助金（疾患関連たんぱく質解析研究事業）
分担研究報告書

大腸癌の N 型糖鎖及び酸性糖脂質の構造解析

分担研究者 今岡真義 大阪府立成人病センター 総長

研究要旨 癌の転移、浸潤などに糖鎖が深く関与することが知られている。そのため、癌細胞に発現している糖鎖構造を詳細に解析し、浸潤、転移などの悪性度に関与する糖鎖構造を明らかにしていく試みは重要な研究課題と考えられる。しかし、現在までのところ、ヒト癌組織において、糖鎖構造パターンを高精度に解析した例はない。そこで昨年度までに、糖鎖のなかでも、癌との関わりが示唆されているとともに、比較的解析の容易な N 型糖鎖と酸性糖脂質に焦点を絞り、それらの微量構造解析を行うための技術を確立した。解析方法としては、レーザーマイクロダイセクション法を用いて癌組織から癌細胞のみを高率に抽出し、N 型糖鎖と糖脂質の酸性糖鎖を抽出し、2-アミノピリジンで蛍光標識した後、HPLC による 2 次元糖鎖マッピング法と質量分析法を組み合わせ、糖鎖構造を解析する。今年度は、この解析技術を用いて、レーザーマイクロダイセクションの癌の糖鎖構造解析における有効性を評価するとともに、大腸癌に特徴的な糖鎖構造を明らかにした。

A. 研究目的

糖鎖は主に細胞表面および細胞外に分布し、タンパク質や脂質に物理化学的性質を与えるほかに、受精、発生、免疫システムなどの様々な生命現象に深く関与する。疾患とのかかわりでは、糖鎖そのものが細菌、細菌毒素やウイルスなどの受容体となり感染が成立する場合のほか、糖鎖構造の異常により引き起こされる疾患も最近明らかとなりつつある。癌との関わりでは、1) 癌化にともない糖鎖構造が変化すること、2) 予後や転移能と相関する癌の糖鎖構造があること、3) 癌特異的な抗体には、糖鎖構造を認識するものが多くあること、4) 癌細胞株に糖転移酵素を作用させ糖鎖構造を変化させると、転移能が促進あるいは抑制されることがあることなどから、癌化や癌の悪性度に糖鎖が深く関与することが知られてきた。そこで、癌研究分野においては、プロテオーム解析とともに、癌細胞の糖鎖構造を詳細に解析し、浸潤、転移などの悪性度に関与する糖鎖構造を明ら

かにする試みは重要な研究課題と考えられる。昨年度までにヒト癌組織の糖鎖構造、なかでも癌との関わりが示唆されているとともに、比較的解析が容易な N 型糖鎖と酸性糖脂質に焦点を絞り、それらの微量構造解析を行うための技術を確立した。今年度は、それらの技術を用いて、癌の高精度のプロテオーム解析や transcriptome 解析などに必須と考えられているレーザーマイクロダイセクション法を、癌の糖鎖構造解析に始めて応用し、その有効性を評価するとともに、実際の癌サンプル、大腸癌を用いてその糖鎖構造を解析することを目的とした。

B. 研究方法

N 型糖鎖はヒドラジン分解で N 型糖たんぱく質より切り出す。また、脂質成分をクロロフォルム：メタノール溶液で抽出し、DEAE を用いたイオン交換にて、酸性脂質を分離した。酸性脂質は Endoglycoceramidase II (TAKARA) で処理することにより糖鎖部分を切り出した。N

型糖鎖と酸性糖脂質の解析方法としては、糖鎖を高感度で検出するため糖鎖部分を 2-アミノピリジンで蛍光標識し (ピリジルアミノ化、PA 化)、C18 逆相カラム及び Amide 順相カラムの 2 種類の HPLC を用いて糖鎖構造を推定する 2 次元糖鎖マッピング法と質量分析法を組み合わせ、糖鎖構造を同定する。PA 化糖鎖の質量分析にはイオントラップ型質量分析計 LCQ Deca XP を用いた。PA 化糖鎖 10 fmol 以上で質量分析が可能であり、比較的構造の簡単な糖脂質であれば、MS³解析で糖鎖のシーケンス情報が得られる。

レーザーマイクロダイセクションにはライカ社製、AS LMD を用いた。手術で採取された大腸癌サンプルをクリオスタットで 10 μ m の切片を作成し、ホイルつきのスライドガラスに貼り付けた。切片をエタノール固定あるいはアセトン固定し、ヘマトキシリン染色後、レーザーマイクロダイセクション法で癌細胞を抽出した。

(倫理面への配慮)

本研究内容は、大阪府立成人病センターに設けられた倫理審査委員会において既に承認されている。今回使用した癌組織は、手術前に患者さんに対して文書を用いて説明し、同意の得られた患者さんのサンプルである。

E. 研究結果

1) 大腸癌の酸性糖脂質の構造解析

酸性糖脂質は、肝臓転移を伴った大腸癌症例 3 例の大腸癌原発部位、および肝臓転移部位の構造解析を行った。さらに正常大腸粘膜の解析も行った。癌組織では主要な 22 種類の酸性糖脂質を同定するとともに、個々の relative ratio も明らかにした。それらは、硫酸付加されたもの (SM3) 1 種類、lacto-series (Sialyl Le^a) 1 種類、6 種類の ganglio-series および 14 種類の neolacto-series の酸性糖脂質で構成されていた。癌特異抗原として知られている sialyl-Le^x, sialyl-Le^a なども検出された。ほとんどの糖鎖

はすでに報告されているものであったが、以下に示す 2 種類の新規のフコース含有糖鎖を見出すことができた。

NeuAc α 2-6(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc,

NeuAc α 2-6(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3-Gal β 1-4Glc.

レーザーマイクロダイセクションを用いずに癌組織をそのまま解析した場合であっても、大腸正常粘膜とでは、酸性糖脂質の構造に差は認められた。しかし、レーザーマイクロダイセクション法を用いることにより、以下に記すような癌細胞に特異的に蓄積される糖脂質の構造が、いっそう鮮明となった。癌部位においては非還元末端へのシアル酸付加が α 2-6 結合で付加されたものの割合が α 2-3 で付加されものよりもはるかに多く、また、フコースがラクトサミン鎖の GlcNAc や galactose 結合したものが、多く認められた。

2) 大腸癌の N 型糖鎖の構造解析

N 型糖鎖に関しては、レーザーマイクロダイセクションを用いない場合にも、大腸癌症例における癌原発部位と正常粘膜部位とでは糖鎖構造パターンにわずかな差は認められた。しかし、酸性糖脂質の場合と同様に、レーザーマイクロダイセクション法を用いることによってのみ、癌部において顕著に減少する 7 種類の糖鎖の存在が明らかになった。それらの糖鎖構造をすべて同定したところ、構造的特徴として bisecting GlcNAc 構造を有する二本鎖型の糖鎖である点が挙げられた

D. 考察

今年度は、昨年度までに確立した N 型糖鎖及び酸性糖脂質の微量構造解析の技術を用いて大腸癌および大腸正常粘膜の糖鎖構造解析を行った。酸性糖脂質においては、2 種類の新規糖鎖構造を見出した。さらに大腸癌細胞においては α 2-6 terminal sialylation 及び α 1-2, α 1-3

fucosylation が著増していた。一方、N型糖鎖では新規の構造を見出すことはできなかったが、bisectig GlcNAc 構造を有する糖鎖が大腸癌細胞では著減していることが明らかとなった。これらの結果は、レーザーマイクロダイセクション法を用いて、解析対象の癌細胞を高率に抽出した場合に極めて明瞭に認められた結果であり、レーザーマイクロダイセクション法を用いずに癌組織をそのまま whole tissue として解析した場合には、判断が難しい、あるいは見落とされた結果であった。よって、プロテオーム解析や transcriptome 解析と同様に、レーザーマイクロダイセクション法は糖鎖構造解析においても重要な tool であることが判明した。今後は他の癌の糖鎖構造を解析していくとともに、今回の解析で明らかとなった大腸癌に特徴的な糖鎖構造が、転移などに関与するかな否かを含めた機能解明を推し進めていく必要がある。

E. 結語

レーザーマイクロダイセクション法を用いて大腸癌細胞に発現する酸性糖脂質及び、N型糖鎖構造を、詳細に解析した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

①H. Korekane, K. Shida, K. Murata, M. Ohue, Y. Sasaki, S. Imaoka, Y. Miyamoto, Evaluation of laser microdissection as a tool in cancer glycomic studies, *Biochem Biophys Res Commun* 352 (2007) 579-586.

②H. Korekane, S. Tsuji, S. Noura, M. Ohue, Y. Sasaki, S. Imaoka, Y. Miyamoto, Novel fucogangliosides found in human colon adenocarcinoma tissues by means of glycomic analysis, *Analytical Biochemistry*, in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

平成18年度厚生労働科学研究費補助金
(疾患関連たんぱく質解析研究事業) 分担研究報告書

同位体標識法(cICAT)による各種疾患患者試料(血清・組織)のたんぱく質発現解析研究

分担研究者 金子 勲 (財) ヒューマンサイエンス振興財団
創薬プロテオームファクトリー
生体試料分析部門長

研究要旨:

1. 各研究協力機関から提供された、糖尿病、がん、認知症、腎疾患及び免疫・アレルギー疾患等の各種疾患試料(血清、組織等) 465 検体を受け入れ、そのうち血清試料 307 検体については、血清高発現たんぱく質(約 140 種類)の cICAT 法による解析研究(同定・比較定量)を完了し、その結果をデータベースに入力した。
2. 解析結果を関係研究協力機関に開示し、各たんぱく質の変化と臨床情報との関係を検討し、また、追加研究への対応について協議した。
3. その結果、小児ネフローゼ症候群(微小変化型)において、治療により変動した、たんぱく質と他のたんぱく質の相関解析を網羅的に行うことにより、発症に関与する可能性のある複数の疾患関連たんぱく質(MBLP-1 等)を見出した(特許 2 件出願)。
4. Laser Micro-Dissection により、部位特異的に分取したヒト組織のたんぱく質解析 cICAT ワークフロー法(700-1000 種類の同定・定量可能)を構築し、研究協力機関より提供された組織試料(胃がん・正常組織)の解析を開始した。各種ヒト胃がん細胞株を、cICAT 法で比較検討し、スキルス株(Kato-III)に、FGF-receptor 2 が選択的に発現されていることを見出した。
5. 低発現たんぱく質の解析に関しては、限外ろ過膜・抗体カラムを利用することにより、高発現血清たんぱく質に加え、新たな低発現たんぱく質の解析が可能になった。
6. 正確な質量が測定可能な SELDI-QStar 等を用いてスループット性の高い血清バイオマーカーの探索系を構築中。
7. 各種疾患試料のたんぱく質の同定・比較定量解析結果を継続的にデータベースに蓄積するとともに、その解析結果と数値化した臨床情報同士の相関解析を行い、疾患関連たんぱく質候補探索を可能にする解析付加情報の作成を開始した。

A. 研究目的:

現在、有効な治療法、あるいは治療薬がない疾患の多くは、実際の臨床と動物実験モデルとが大きくかけ離れている場合が多い(例えば、ネフローゼ等)。その原因は、ネズミ等とヒトは、まず、1)

寿命が大きく異なること(1・2年 vs 100年)、2) 四足歩行と二足歩行、3) 進化系統樹の違い、4) 大脳の発達度の違い等が挙げられる。従って、新たな創薬ターゲットおよび疾患関連バイオマーカー探索には、臨床情報と連結した多数の患者試料

(血清・組織等)と健常人試料に存在するたんぱく質を同定・比較定量し、疾患関連たんぱく質のデータベースを作成することが必要である。この場合、網羅的な解析と得られた結果の相関解析が重要である。本年度は、高発現血清たんぱく質(約 140 種類)解析フローに基づき(1, 2)、各研究協力機関から提供されたヒト血清試料の網羅的解析研究(探索・同定・比較定量)を引き続き実施し、得られた解析結果を研究協力機関に開示し、臨床情報との関連性を検討し、疾患関連たんぱく質を探索することを最優先としたい。一方、受容体などの創薬ターゲットの可能性を多く含むと考えられる組織たんぱく質の解析に関しては、

B. 方法:

1) 血清の調製法:

患者血清(研究協力機関で実施)の調製は、10 ml 真空採血管(ベノジェクト II 血清分離剤・凝固促進剤フィルム入り)を用いて採血した血液(通常は 10-20 ml 程度)を 37°C で 30 分静置(もしくは室温で 1 時間静置)したものを 4°C で、1,500 G (3,000rpm)で 10 分遠心分離を行うことにより、上清(血清)をえた。得られた血清は 0.2ml ずつ 1.5 ml チューブ(エッペンドルフ製)に分注し、冷凍保存した(-80°C)。必要に応じて融解し、実験に使用した。なお、本研究に使用するヒト標準血清(CTS02S)は、健常外国人(米国)の年齢 18~50 歳代の男性 5 名、女性 5 名より、採取した血清をプールしたものである(Uniglobe Research Coporation(CA, USA)より購入)。

2) ヒト血清試料の cICAT 法による解析法の一部

(1) cICAT 試薬の定量

市販の cICAT 試薬ロットの一部に含量バラツキがある場合があるので、試薬(H, L 鎖)の一部を分取し、C18 逆相カラムで定量し、H 鎖試薬、L 鎖試薬のバラツキが 10%以内のロットを反応に使用した。

(2) DTT クエンチング法:

Laser-Micro-Dissection(LMD)による部位特異的に分取した組織試料を用いる組織たんぱく質 cICAT 解析ワークフロー法を構築し、実際の臨床検体の解析を開始することが必要である。低発現血清たんぱく質に関しては、限外ろ過法、抗体カラム法などにより、高発現たんぱく質を除去することを検討する。また、正確な分子量が測定可能な SELDI-QStar を積極的に利用し、スループット性の高いバイオマーカー探索系を構築したい。以上、得られた各たんぱく質の比較定量値および臨床情報を統合データ解析システム(HiSpec)に入力し、疾患関連たんぱく質を探索する可能にするデータベース作成に着手する。

昨年度に用いた方法(2)の中で、cICAT 反応後のクエンチング剤に用いた TCEP 1mM の代わりに、DTT 10mM を使用した。それに伴い、分画用の SCX カラムのサイズダウンを行い、また溶出バッファーを KCl 系からギ酸/ギ酸アンモニウム系に変更した。

以下に、改良法を記す。アジレント社製抗体カラム(Multiple Affinity Removal Column, 10 x 100mm)で高濃度たんぱく質を除いた血清たんぱく質画分(final 1mg/ml)を、常法に従い(3), 50 mM Tris-HCl, 0.1% SDS (pH8.5)で可溶化し、TCEP(final 1mM, 95°C, 10 min)で変性還元後、2.2mM の cICAT 試薬(AB)、(¹²C(L 鎖)あるいは ¹³C(H 鎖)標識)を 37°C、2 時間反応させた(通常は標準血清を L 鎖試薬、疾患患者血清を H 鎖試薬で標識する)。未反応の試薬を 10mM DTT でクエンチングし、H 鎖試料と L 鎖試料を等量混合し、トリプシン(Promega, TPCK 処理)で 37°C、16 時間消化した。得られた消化物を、分取用 HPLC(Vision Workstation System(AB))を用いて、SCX column (Poly LC Sulfoethyl A column(4.6 x 100mm) にかけて、10mM KH₂PO₄, pH2.8, 25%CH₃CN (SCX-binding buffer)で吸着・洗浄

後、SCX-binding buffer + 0.5M KCl(SCX-elution buffer)で溶出させた。溶出画分を大型アビジンカラム (6.2 x 66.5mm) にかき、素通り部分を洗浄後、吸着した cICAT 試薬反応ペプチドを 30% CH₃CN/0.4% TFA で溶出した(Vision Workstation System)。溶出画分を乾燥後、95%TFA(5%Scavenger 含有)で 37℃、2 時間反応させてビオチン部分を切断し、cICAT 標識ペプチド(H 鎖、L 鎖)を得た。本ペプチドは減圧乾固した後、0.05%ギ酸/ 25% CH₃CN に溶解し、SCX column(4.6 x 100mm)にて、0.05%ギ酸/25% CH₃CN - 0.5 M ギ酸アンモニウム/5.88%ギ酸/25% CH₃CN 系(ギ酸アンモニウム 0 ~ 0.5M gradient)でペプチド画分を分画 (25~50 分画) し、それぞれ C18 column で脱塩し、減圧乾固した。得られた cICAT ペプチドは nano-LC/Q-Star XL (Applied Biosystems (AB), ESI-Q/TOF)で質量分析測定を行い、生データをチェック後、統合データベースシステム (HiSpec) を用いてペプチドおよびたんぱく質の同定・比較定量解析をした(1)。患者血清試料をルーチン測定する場合は、上述のプロトコールに従い操作し、標準血清

(CT02S)を L 鎖試薬、患者血清を H 鎖試薬でそれぞれ標識し、TFA 切断後、最終的に SCX column(2.1 x 35mm)で 25 分画した各画分を nano-LC/Q-Star XL にて、分析時間 90min の分析条件で測定し、HiSpec のバイオフィアオマティクス手法により、標準血清 (L 鎖標識) と患者血清 (H 鎖標識) の各たんぱく質の比較定量比(H/L)を計算した。

3) 凍結組織切片の調製および LMD による正常・病変部位特異的組織分取：

昨年を作成した組織解析ワークフロー(図 1)に従い、協力医療機関より提供された 10μm の切片 (100~400 枚) を切除用のスライドガラスに貼り付け、風乾後、95%エタノール液で組織を固定化し、ヘマトキシリンの 3 倍希釈液で軽く染色した。Laser Micro Dissection(LMD) (LEICA 社製 AS LMD) を用いて常法(4)により、病変部位あるいは正常部位を指定してレーザーを照射することにより部位特異的に切除し、試験管に集め、必要に応じて可溶化処理を行った。

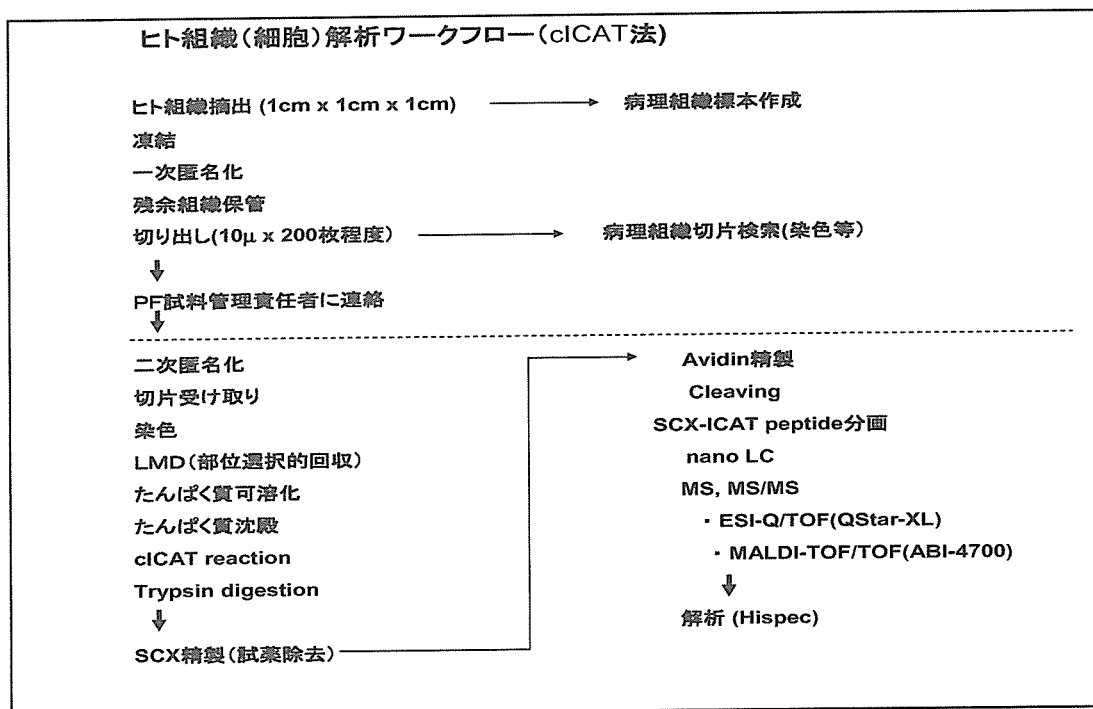


図 1. ヒト組織 (細胞) cICAT 解析ワークフロー

4) 組織可溶化・たんぱく質抽出法:

LMD で得られた部位選択的組織の乾燥重量を測定し、予想されるたんぱく質含量に合わせて、たんぱく質濃度 (約 1mg/ml) になるように可溶化溶液 (8M 尿素(Wako), 4% CHAPS, 1mM TCEP or 65mM DTT, 40mM Tris/HCl(pH8.3), 1/100 protease inhibitors(Sigma, P2714: 100x stock soln)) に懸濁し、Vortex を行い、超音波処理し、可溶化処理を行った。たんぱく質の定量は Lowry 法で行った。なお、一部の実験では可溶化液として、8M 尿素、2% SDS, 50mM Tris/HCl (pH8.3)溶液を用いた。得られた組織粗可溶画分 (Total lysate) を 20°C で、12,000rpm, 20 分間の遠心処理を行い、上清を組織全可溶画分とした。常法に従って、上述の組織全可溶画分溶液に冷アセトン (100%, 4°C) を加えて、攪拌し、白濁した懸濁液を -80°C で一晩放置し、アセトン沈殿を完結させた。その後 4°C で 12,000 rpm, 20 分の遠心処理を行い上清を除き沈殿画分 (crude proteins) を得た。この沈殿画分に 99.5% エタノールを加え、4°C で 12,000rpm, 20 分の遠心処理し、残存する不純物 (上清) を除き、たんぱく質沈殿画分を得た (約 100µg/tube, -30°C で保存)。この操作によるたんぱく質の回収率は約 80% であった。Kato-III, MKN-45, MKN-74 などのヒト胃がん培養細胞株の可溶化は組織可溶化法に準じた。

5) 細胞・組織たんぱく質の cICAT 法による解析

細胞由来たんぱく質各 100µg/tube 2 本をそれぞれ 1 unit の H 鎖 cICAT 試薬および L 鎖 cICAT 試薬反应用到に用意した。常法(2, 4)に従い、50 mM Tris-HCl, 0.1% SDS (pH8.5) で可溶化し、TCEP (final 1mM, 95°C, 10 min) で変性還元後、2.2mM の cICAT 試薬 (AB)、¹³C (H 鎖) あるいは ¹²C (L 鎖) 標識を 37°C、2 時間反応させた (反応液各 100 µl)。未反応の試薬を 10mM DTT でクエンチングし、H 鎖試料と L 鎖試料を等量混合し、トリプシン (Promega,

TPCK 処理) で 37°C、16 時間消化した。得られた消化物を、SCX column (Poly LC Sulfoethyl A column (4.6 x 35mm)) にかけて、10mM KH₂PO₄, pH2.8, 25%CH₃CN (SCX-binding buffer) で吸着・洗浄後、SCX-binding buffer + 0.5M KCl(SCX-elution buffer) で溶出させた。溶出画分をアビジンカートリッジカラム (2~4 個連結) にかけて、素通り部分を洗浄し、吸着した cICAT 試薬反応ペプチドを 30% CH₃CN/0.4% TFA で溶出した (Vision Workstation System)。溶出画分を乾燥後、95%TFA(5%Scavenger 含有) で 37°C、1~2 時間反応させてビオチン部分を切断し、cICAT 標識ペプチド (H 鎖、L 鎖) を得た。本ペプチドを減圧乾固した後、0.05%ギ酸/25% CH₃CN に溶解し、SCX column (2.1 x 35mm) にて、0.05%ギ酸/25% CH₃CN-0.5 M ギ酸アンモニウム/5.88%ギ酸/25% CH₃CN 系 (ギ酸アンモニウム 0~0.5M gradient) でペプチド画分を分画 (25~50 分画) し、それぞれ C18 column で脱塩し、減圧乾固した。なお、必要に応じて、得られた画分を、さらにアミド 80 カラムにより常法に従い分画した。

得られた cICAT ペプチドは Q-Star で質量分析測定を行い、血清の場合と同様に統合データベースシステム (HiSpec) を用いて、ペプチドおよびたんぱく質の同定・比較定量解析を行った。

6) Q-Star XL (ESI-Q/TOF) での測定:

SCX による分画・脱塩したペプチド (cICAT 標識) を 0.1%TFA-2% CH₃CN にて再溶解し、nano-LC (LC-Packings)/Q-StarXL (AB,ESI-Q/TOF) および nano-LC /Probot (LC-Packings) にて分析した。カラムは PepMap™ C18 100, 3µm, 100 Å, 75µm x 150mm(LC-Packings) を使用し、Q-Star XL 用移動相は A: 5%CH₃CN/0.1% HCOOH, B:

95% CH₃CN/0.1% HCOOH によるリニアグラジエント（流速：200 nl/min, 分析時間 75 分）である。ABI-4700 用移動相は、A: 5% CH₃CN/0.1% TFA、B: 95% CH₃CN/0.1% TFA によるリニアグラジエント（流速 300 nl/min, 分析時間 55 分）である。なお、Q-Star XL で分析する場合は、BSA トリプシン消化ペプチド断片（100fmol）を用いて nano-LC の調整を行い、規定のシーケンスカバレッジ（約 55%以上）が得られるのを確認した後、サンプルの測定を行った。なお、血清試料の一部高発現たんぱく質のペプチドが定量測定範囲を超えないように（飽和しないように）各画分の injection 量を調整した。測定は MS 1 秒、第一 MS/MS 3 秒、第二 MS/MS 3 秒の合計 7 秒が 1 サイクルの自動測定（IDA(Information Data Acquisition) Mode）であり、Peak detection threshold は 25 count, MS range は m/z 370-1430 である。測定データの信頼性を確保するために、実サンプルを 5~10 回測定する度に 1 回、QC 用の BSA 消化物(100fmol)を測定した。

7) 相関性解析の方法：

5 点以上のデータが得られているたんぱく質の cICAT 比(H/L 値)について、各たんぱく質間で網羅的に相関係数を算出し、 $R > 0.8$ ($R^2 > 0.64$) を示すたんぱく質ペアを抽出した。近似線の相関係数の算出には Excel を用いた。

8) 大規模網羅的解析を考慮したデータ品質管理

本プロジェクトでは、MS 測定担当の研究者とインフォマティクス担当研究者が協力し、大規模網羅的解析を考慮したデータ品質管理基準を検討・策定した。MS 測定は、機器に関して別途定

C. 研究成果 1：

1) 創薬プロテオームファクトリー施設 (PF) 倫理審査委員会での審査結果：

められた基準に従って調整する他、試料を測定する直前に 2 回、直後に 1 回、品質管理のために BSA 断片を測定し、その内容を確認している。現在、全ての血清高発現試料の MS 測定は、上記の品質管理基準に従っている。この管理基準によって定められたチェック項目のうち、液体クロマトグラフィーの動作品質を保証するための確認項目として、以下のデータを、測定ごとに複数の BSA ペプチド断片について確認する：

- 1) 各ペプチド断片のピークの溶出時間のうち、最大値を取る時間を確認する。
- 2) 各ペプチド断片のピークが最大値を取る時間のピークの強度を確認する。

確認されたデータは、さらに所定のフォーマットの表計算シートに読み込み、相対的な溶出時間などを確認し、液体クロマトグラフィーが安定動作しているかを確認する。

これら作業は、各測定後に 3 つの BSA 測定だけでなく、機器調整の段階でも行う必要があり、従来の機器付属のソフトウェアで手作業で行う場合は、時間がかかる、ミスが起こるなどの問題点をかかえていた。そこで、今年度の取り組みとして、上記 1)、2)の作業を自動化し、作業の効率化と時間短縮と、測定品質の向上を図った。

今回の自動化機能は、Web ベースのシステムであり、各質量分析計からシステムに接続し、BSA 断片測定ファイルを指定するだけの簡便な操作で所定の結果が得られる。システム側では、必要な XIC(Extracted Ion Chromatogram) の計算を、自動的に並列処理して結果を返すようにしている。

本年度は、2 回の PF 倫理審査委員会が開催され、7 研究協力機関およびヒューマンサイ

エンス研究資源バンク(HSSRB)からのヒト試料の受け入れおよび研究計画(新規および継続)について審議し、いずれも承認された。PF 倫理審査委員

会の構成メンバーおよび研究課題を下記に示す。

創薬プロテオームファクトリー施設 (PF) 倫理審査委員会：

- 同 委員長：岡田 善雄
(財)千里ライフサイエンス振興財団、外部委員)
- 同 委員長代行：横田 正幸
(財)ヒューマンサイエンス振興財団、内部委員)
- 同 委員：脇舩 光廣 (基盤研、外部委員)
- 同 委員：神崎 俊彦 (一般市民、外部委員)

- 同 委員：谷本 剛
(同志社女子大学薬学部、外部委員)
- 同 委員：玉岡 かおる (作家、外部委員)
- 同 委員：手嶋 豊
(神戸大学大学院法学研究科、外部委員)

研究課題

国立成育医療センター：

腎疾患および免疫・アレルギー疾患における原因たんぱく質の探索

国立精神・神経センター：

- 1) パーキンソン病およびパーキンソン症候群における原因たんぱく質の探索
- 2) パーキンソン病等の精神・神経疾患に関連する髄液微量たんぱく質解析

国立長寿医療センター：

痴呆、骨粗鬆症および褥瘡疾患における原因たんぱく質の探索

国立国際医療センター：

- 1) 糖尿病合併症動脈硬化性疾患における原因たんぱく質および疾患マーカーの探索 (1)
- 2) 糖尿病合併症動脈硬化性疾患における原因たんぱく質および疾患マーカーの探索 (2)
- 3) 閉塞性肺疾患の原因たんぱく質の探索

国立循環器病センター：

- 1) 脳動脈閉塞による急性期脳卒中関連たんぱく質の探索
- 2) 腎血管性高血圧症関連たんぱく質の探索
- 3) 糖尿病治療前後の動脈硬化関連たんぱく質の探索
- 4) 冠動脈疾患を有する家族性高コレステロール血症の LDL-アフェレーシス治療施行前後のたん

ぱく質の探索

- 5) 急性期心不全関連たんぱく質の探索
- 6) 高コレステロール血症患者における疾患関連たんぱく質の探索
- 7) 急性心筋梗塞および類似疾患における疾患関連たんぱく質の探索
- 8) 心組織における心疾患関連たんぱく質の探索
- 9) 肺高血圧症関連たんぱく質の探索
- 10) 周産期心筋症の関連たんぱく質の探索

大阪府立成人病センター：

各種がん疾患における原因たんぱく質および疾患マーカーたんぱく質の探索

大阪大学医学部：

- 1) 運動ニューロン病患者における原因たんぱく質の探索
- 2) 乳がん疾患における原因たんぱく質および疾患マーカーたんぱく質の探索 (1)
- 3) 乳がん疾患における原因たんぱく質および疾患マーカーたんぱく質の探索 (2)
- 4) 慢性呼吸器疾患(COPD, 間質性肺炎)における原因たんぱく質の探索
- 5) 消化器癌 (胃癌、食道癌、大腸癌、肝細胞胆道癌、膵臓癌) の原因たんぱく質および疾患マーカーたんぱく質の探索

6) びまん性大細胞型リンパ腫のたんぱく質の探索
財団法人ヒューマンサイエンス振興財団(HS財団)
ヒト組織バンク:

ヒューマンサイエンス研究資源バンク
(HSSRB)から提供されるヒト各種組織を利用した疾患プロテオーム解析研究

2) 研究協力機関からのヒト試料の受け入れ:

前述の PF 倫理委員会で承認された研究課題に関して、平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金(疾患関連たんぱく質解析研究事業)の分担研究報告書および協力研究機関への配布試料(「創薬プロテオームファクトリー(PF)へのヒト試料等の提供について」(資料1)に基づき①)、協力研究機関より送

付されるヒト試料(臨床情報も含む)の受け入れを開始した。表1に各協力機関より送付された検体数の一覧表を示す。これまでに、各種疾患 22 症例 352 患者から 465 検体試料(血清、組織等)を受け入れ、そのうち、307 検体の血清試料の解析を完了した。

表1. 研究協力機関からのヒト試料の受け入れ状況一覧表

(平成19年1月31現在)

研究協力機関名称	ヒト試料種類	疾患名称	受け入れ状況	
			症例数	試料数
国立成育医療センター	血清	ネフローゼ	24	51
	血清	FSFG	2	7
	血清	IgA腎症	2	2
	血清	膜性増殖性糸球体腎炎	1	1
国立精神・神経センター	血清	パーキンソン病	12	12
	血清	パーキンソン病症候群(多系統萎縮症)	5	5
国立循環器病センター	血清	脳動脈閉塞による急性期脳卒中	8	16
	血清/血漿	腎血管性高血圧	15	30
	血清	糖尿病治療前後の動脈硬化	6	12
	血清	冠動脈疾患を有する家族性コレステロール血症	0	0
	血清	急性期心不全症	9	18
	血清	高コレステロール血症	10	20
	血清/血漿	急性心筋梗塞及び類似疾患	22	44
	組織	心疾患	0	0
	血清	肺高血圧症	0	0
	血清	周産期心筋症	0	0
国立長寿医療センター	血清	骨粗鬆症	18	18
		認知症	14	14
国立国際医療センター	血清	糖尿病合併動脈硬化症	120	120
	血清	閉塞性肺疾患	10	10
	血清	早期糖尿病腎症	0	0
大阪府立成人病センター	血清	胃がん	15	26
	組織	胃がん(正常部位、病巣部位)	11	11
大阪大学医学部	血清	運動ニューロン病(ALS)	14	14
	組織	乳がん	8	8
	血清	COPD	21	21
	血清	間質性肺炎	5	5
	組織	間質性肺炎	0	0
合 計			352	465
	内訳：			
	血清		319	414
	血漿		16	32
	組織		19	19

D. 研究成果2 (実験結果および考察).

1) 血清高発現たんぱく質解析法の改良:

昨年度に作成した cICAT 法により、臨床試料の血清高発現たんぱく質の解析を行ってきたが、大部分のペプチドでは問題なく正確な比 (H/L) が得られたが、一部のペプチドにバラツキが生じる場合があった。その原因を追求した結果、ABI 社が推奨する TCEP 1 mM によるクエンチング操作では充分でなく、立体構造上の関係で cICAT 試薬が反応しにくい部分がトリプシン処理後によりペプチドに分解されると、残存の cICAT 試薬が反応するためであることが分かった。そこで、TCEP の代わりに 10mM DTT を cICAT 反応後のクエンチング試薬として、TCEP 法と DTT 法で比較検討した。また、市販の cICAT 試薬 (H, L) 含量を測定し、ロット間のバラツキをなくした。その結果、前述の一部バラツキが生じたペプチドのバラツキ幅は小さくなり、よ

り正確 (97%) な比 (H/L) が得られた。ただし、トリプシンによるミスクリーブは TCEP 法より多い傾向がみられ、一長一短であるが、総合的に判断して DTT 法が優位であるとして、以後の検体試料は DTT 法で行うことにした (図 2)。従来の TCEP 法でも十分な解析が可能であるので、TCEP 法で測定した臨床検体は TCEP 法で測定したことを言及してまとめて解析した。なお、両者に大きな相違は見当たらないが、当面の間、両者を纏めて解釈することはしない。本改良にともない、cICAT の 25 分画用の SCX-HPLC の濃度勾配溶媒系を KCl 系からギ酸・ギ酸アンモニウム系に、またカラムサイズを 2.1 x 35 mm に変更した。なお、cICAT 法でこれまでに同定した血清高発現たんぱく質の一覧表を表 2 に示す。

臨床血清を用いた検証

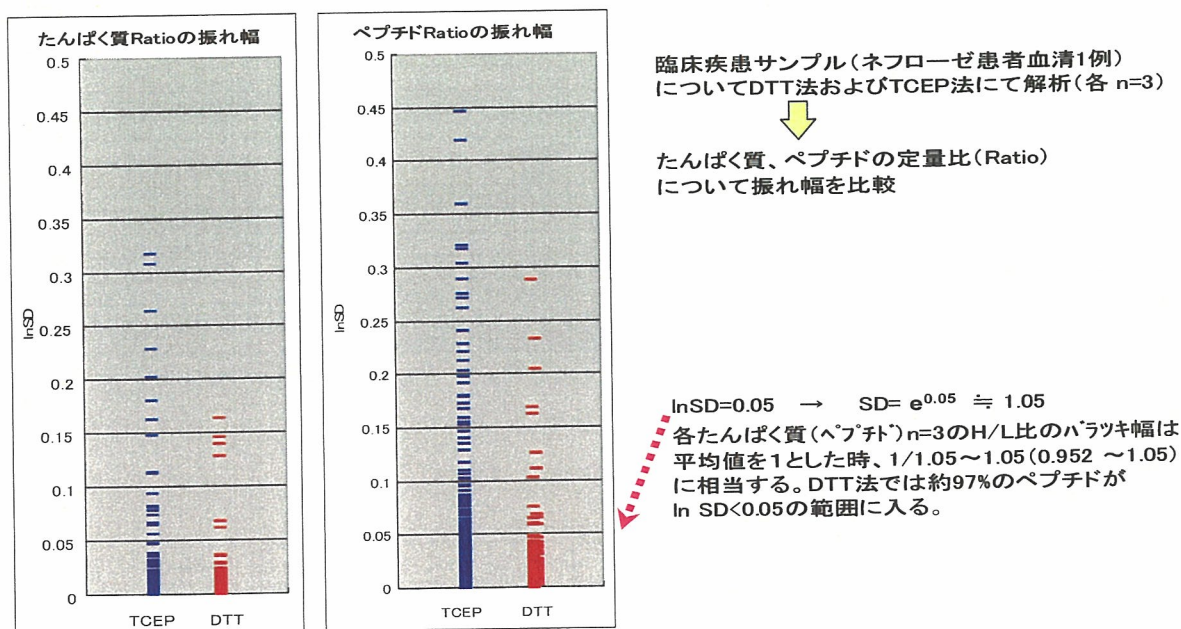


図 2. TCEP と DTT によるクエンチング条件の再検討

表 2. cICAT 法による高発現血清同定たんぱく質の分類表 (220 種類一覧)

補体系(30)	Blood transport and binding protein(20)	Protease inhibitor(15)	その他(82)
complement component C1q, A chain	afafin	alpha 2 macroglobulin	aggreacan 1 isoform 1 precursor lumican
complement component C1q, B chain	beta-2-glycoprotein 1	alpha-1 antiprotease, antitrypsin	amyloid beta A4 protein precursor isoform lysosomal-associated membrane protein 1
complement component C1q, C chain	cholesteryl ester transfer protein, plasma	alpha-1-antichymotrypsin	attractin isoform 2 lysosomal-associated membrane protein 2 precursor
complement component 1, r subcomponent	fc fragment of IgG binding protein	alpha-2-antiplasmin	beta actin macrophage stimulating 1(hepatocyte growth factor)
complement component 1, r subcomponent-like precursor	hyaluronan binding protein 2	antithrombin III	beta globin melanoma cell adhesion molecule
complement component 1, s subcomponent	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	bikunin	cadherin 1 type 1 preproprotein neural cell adhesion molecule 1
complement component 2	insulin-like growth factor 2	complement component 1 inhibitor	carnosinase glutamate carboxypeptidase like protein PDZ and LIM domain(elfin);carboxy terminal LIM
complement component 3	insulin-like growth factor binding protein 2	cystatin C	cartilage acidic protein 1 peptidoglycan recognition protein 1,TNF superfamily
complement component 4A	insulin-like growth factor binding protein 3	heparin cofactor II	cartilage oligomeric matrix protein peptidylprolyl isomerase A isoform 1;cyclophilin
complement component 5	insulin-like growth factor binding protein 4	inter-alpha (globulin) inhibitor H1	cathelicidin antimicrobial peptide perostin,osteoblast specific factor
complement component 6	insulin-like growth factor binding protein 5	inter-alpha (globulin) inhibitor H2	CD14 antigen phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase
complement component 7	insulin-like growth factor binding protein 6	inter-alpha (globulin) inhibitor H3	CD163 antigen isoform a pigment epithelium-derived factor
complement component 8, alpha polypeptide	insulin-like growth factor binding protein 7	inter-alpha (globulin) inhibitor H4	CD44 antigen isoform 1 precursor plasminogen-related protein
complement component 8, beta polypeptide	insulin-like growth factor binding protein, alpha	kallistatin precursor	CD5 antigen-like platelet glycoprotein Ib alpha polypeptide
complement component 8, gamma polypeptide	lactotransferrin	tissue factor pathway inhibitor	CD59 pregnancy zone protein
complement component 9	retinol-binding protein 4, plasma		cell adhesion molecule with homology to L1 procollagen C-endopeptidase enhancer
complement factor H	selenoprotein P precursor	apolipoprotein(8)	chitinase, di-N-acetyl- profilin 1
factor H-related protein 1	tetranectin	apolipoprotein A-II	chromosome 20 open reading frame 3 proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 precursor
factor H-related protein 2	transthyretin; prealbumin	apolipoprotein B	collectin sub-family member 10 prostaglandin D2 synthase 21kDa
factor H-related protein 3	vitamin D-binding protein	apolipoprotein C-IV	cysteine-rich secretory protein 3 ptecoglycan 4
factor H-related protein 4		apolipoprotein D	defensin, alpha 1 preproprotein quiescinq Q6
factor H-related protein 5	Enzyme(24)	apolipoprotein E	delta globin retinoic acid receptor responder (tazarotene inducible)
complement factor B	a disintegrin-like and metalloprotease (reproducible)	apolipoprotein F	dermcidin precursor S100 calcium-binding protein A8
complement factor I	angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5	apolipoprotein Lp(a)	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein selectin L
properdin P factor, complement	biotinidase	apolipoprotein M	extracellular link domain containing 1 sex hormone-binding globulin
complement factor D	butyrylcholinesterase		extracellular matrix protein 1 isoform 1 similar to Ig kappa chain
complement component 4 binding protein, alpha	carboxypeptidase N 83 kDa chain	Common circulating blood protein(14)	Fc fragment of IgG, low affinity IIIb, receptor for (CD32)
complement component 4 binding protein, beta	carboxypeptidase N, polypeptide 1, 50kD	alpha 1B-glycoprotein	fetuin B; fetuin-like protein small inducible cytokine A16 precursor
complement receptor type 2	carboxypeptidase U(carboxypeptidase B2)	alpha-1-microglobulin	fibroblast activation protein, alpha subunit soluble mannose binding lectin precursor
complement component c1q receptor	dipeptidylpeptidase IV	alpha-2-glycoprotein, zinc	fibulin 1 isoform C SPARC-like 1; hevinq mast9
	dopamine beta-hydroxylase	alpha-2-HS-glycoprotein	ficolin 2 isoform a tarsh protein
血液凝固・線溶・キニン系(20)	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1	beta-2-microglobulin	ficolin 3 isoform 1 tenascin XB isoform 1
coagulation factor II	fucosidase	ceruloplasmin	folistatin like 1 precursor thrombospondin 4
coagulation factor V	lecithin-cholesterol acyltransferase	clusterin isoform 1	galectin 3 binding protein; L3 antigen transforming growth factor, beta-induced, 68kDa
coagulation factor V II precursor isoform	lysozyme precursor	fibronectin 1 isoform 3	haptaglobin related protein vascular cell adhesion molecule 1 isoform a precursor
coagulation factor IX	mannan-binding lectin serine protease 1	gelsolin isoform a	heparan sulfate proteoglycan 2 selectin L
coagulation factor X	mannan-binding lectin serine protease 2	hemopexin	HGF activator preproprotein
coagulation factor XI	matrix metalloproteinase 2 preproprotein	orosomucoid 1	hypothetical protein MGC45378
coagulation factor XII	matrix metalloproteinase 3 preproprotein	orosomucoid 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 isoform 1
protein C	pancreatic ribonuclease		intracellular adhesion molecule 2 precursor
protein S	paraoxonase 1	血小板由来(9)	keratin 1
protein Z	plasma glutathione peroxidase 3	glycoprotein V (platelet)	keratin 6A
histidine-rich glycoprotein	prenylcysteine oxidase 1; prenylcysteine lyase	glycoprotein VI (platelet)	L1 cell adhesion molecule isoform 1 precursor
plasminogen	tryptophan/serine protease	latent transforming growth factor beta binding protein 1	leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1
plasma kallikrein B		multimerin 1	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily 1
kininogen(H+L)		platelet factor 4	lipopolysaccharide-binding-protein precursor
von Willebrand factor		pro-platelet basic protein	L-plastin 1
fibrinogen, alpha chain isoform alpha-E precursor		secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteocalcin)	
fibrinogen, beta chain preproprotein		thrombospondin 1	
fibrinogen, gamma chain isoform gamma-A		triggering receptor expressed on myeloid cells 1	

分類参照: Molecular & Cellular Proteomics 1:947-955,2002

2) 各医療機関試料の解析状況

(1) 国立国際医療センター:

同センターより提供された糖尿病患者血清のうち TCEP 法で処理した 20 検体 (基礎検討用試料を含む) および DTT 法で処理した 15 検体糖尿病患者血清の解析結果(同定と比較定量値)を開示し、臨床情報との関係及び追加要望に関して協

議した。このうち、TCEP 法で解析した 10 検体の同定された、たんぱく質数と H/L 比の度数分布を図 3 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 4 に示す。また、臨床情報 (血糖値、BMI、年齢、血清脂質値等) と各たんぱく質及び各たんぱく質同士の相関解析を

行った。単純に、標準血清と比較すると、CD5 antigen-like(Scavenger receptor)等が増加傾向を示したが、後述するネフローゼで顕著な変化を示した ZAG には大きな変化は認められなかった(表 3)。

本疾患の検体は、同一患者の治療前後検体などではなく、慢性疾患でしかも多様な患者背景(年齢、合併症の有無、治療法)がある検体である。従って、比較する対照血清をどのようにするかが問題である。今後、DTT 法による 40 検体を解析後、患者背景を考慮して上で、層別解析

が可能なのかを検討する。また、比較定量値(H/L)は、外国人プール血清を標準血清(L)とし、患者血清(H)として計算したもののなので、日本人健常人との比較定量値ではない。しかし、表 3 および昨年の報告書に記したように(2)、血清高発現たんぱく質トップ 140 種類を、日本人 4 人と外国人 4 人との比較解析の結果、血小板由来のたんぱく質等(ficolin 2 も含む)を除くと、殆どのたんぱく質(94%)において両群に差はなかったが、今後は可能な限り日本人健常人の血清検体を解析し、日本人健常人の標準血清を構築したい。

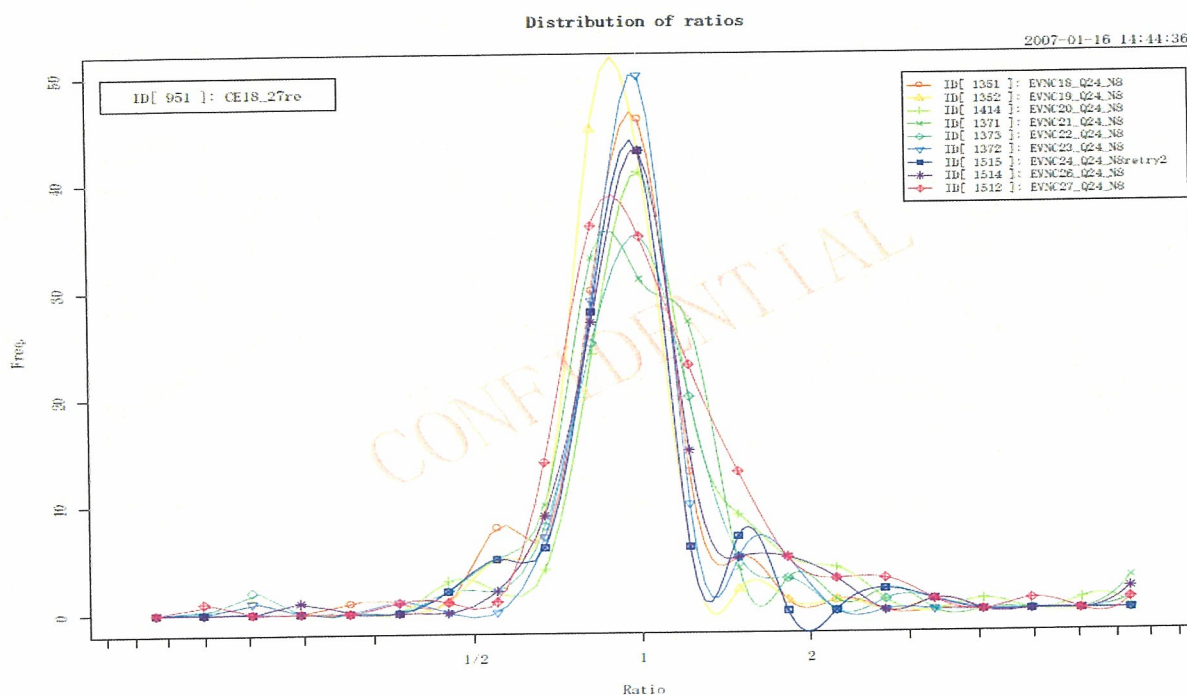


図 3. 糖尿病患者血清解析で得られた全たんぱく質の Ratio (H/L)の分布パターン

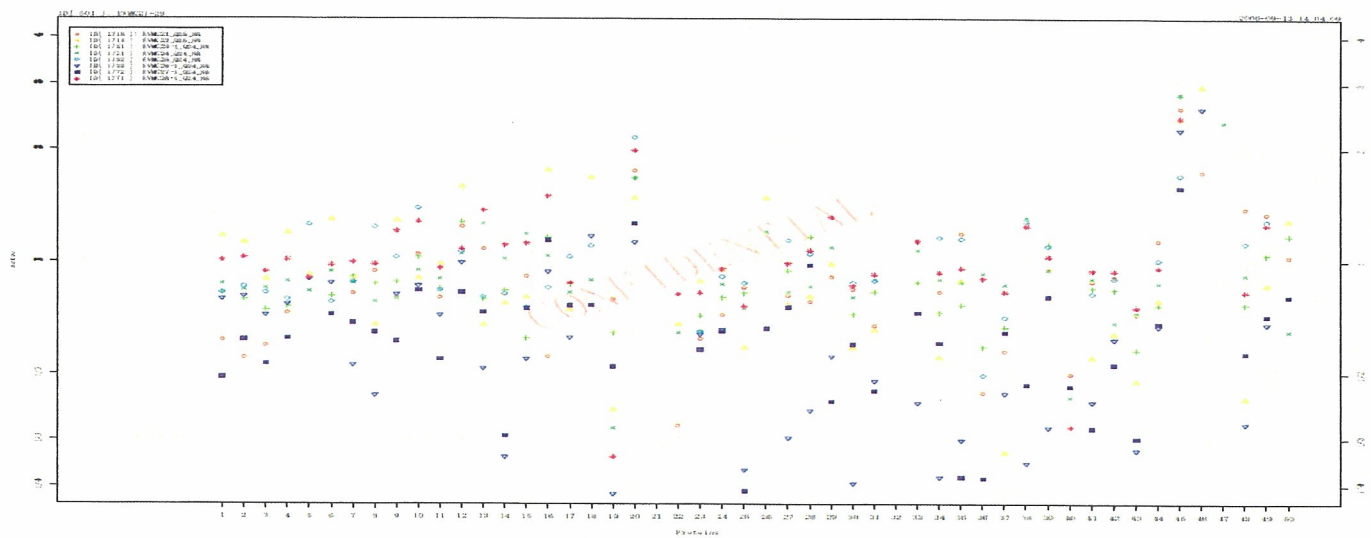


図 4-1. 糖尿病患者の血清各たんぱく質毎の Ratio (H/L) の分布 (1)

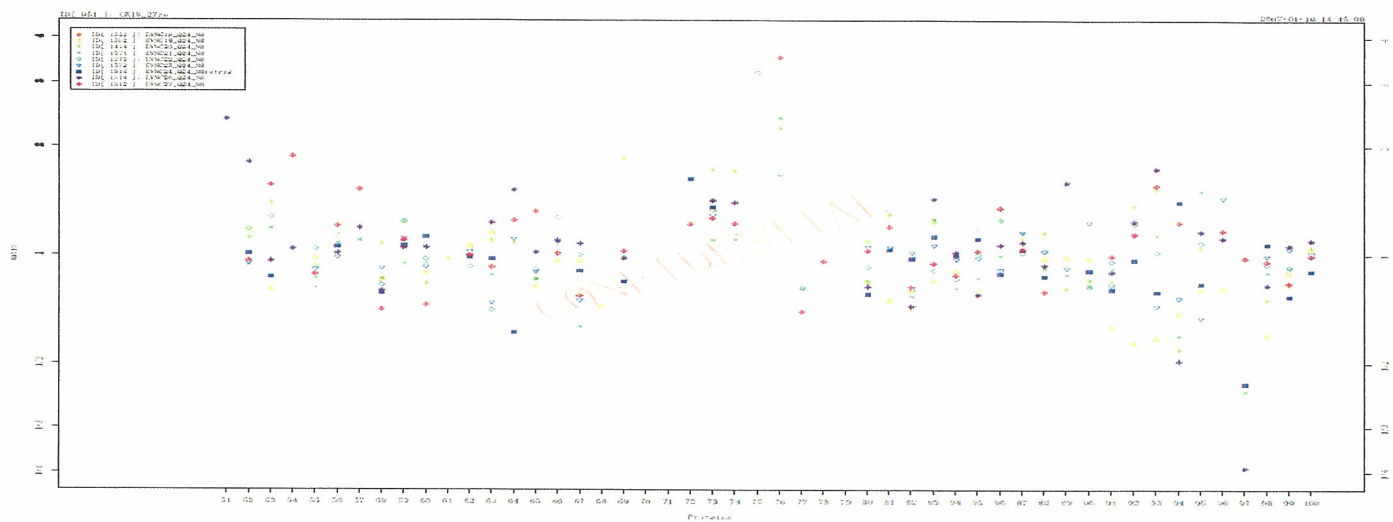


図 4-2. 糖尿病患者の血清各たんぱく質毎の Ratio (H/L) の分布 (2)

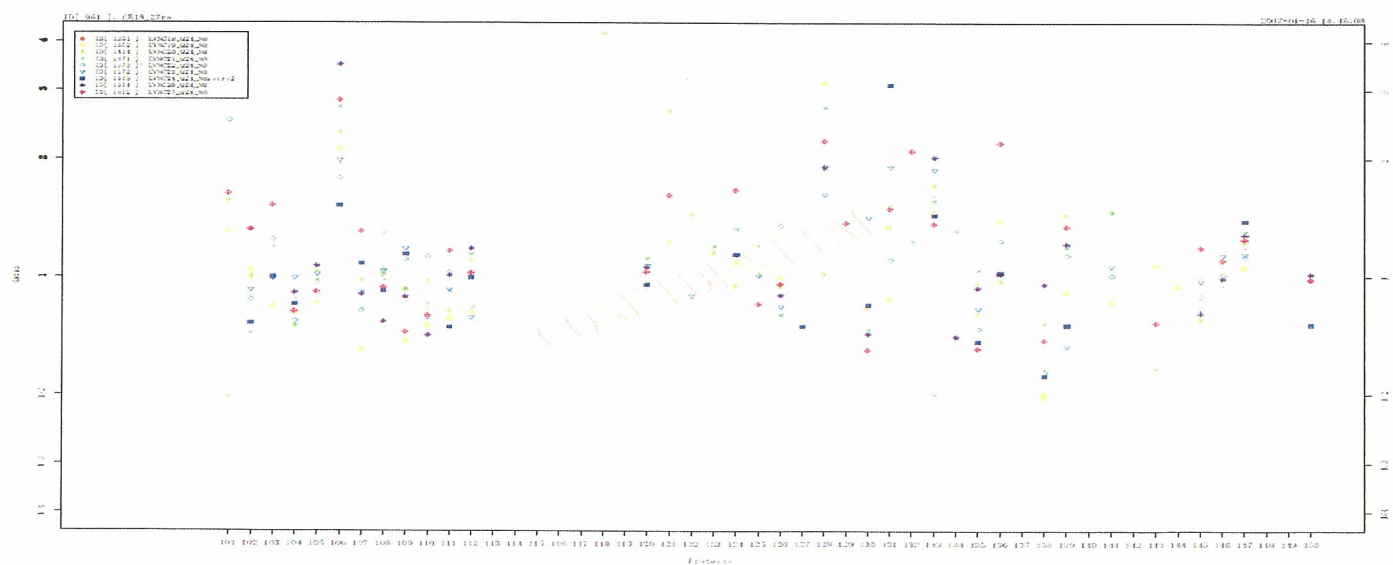


図 4-3. 糖尿病患者の血清各たんぱく質毎の Ratio (H/L) の分布 (3)