

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

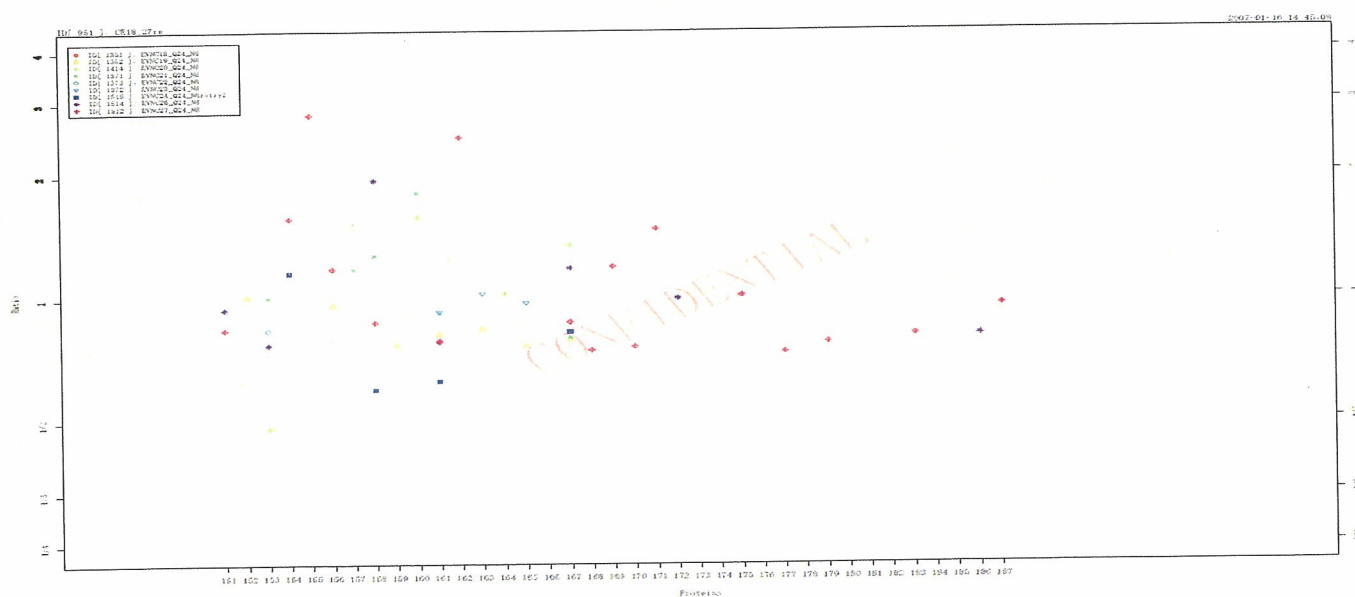


図 4-5 糖尿病患者の血清各たんぱく質毎の Ratio (H/L) の分布 (5)

(2) 国立循環器病センター

cICAT 法でのクエンチング剤の変更経緯を説明し、TCEP 法よりも DTT 法が総合的には優位であることを説明した (図 2)。DTT 法による脳動脈閉塞による急性期脳卒中症、腎血管性高血圧症、糖尿病治療前後の動脈硬化症、冠動脈疾患を有する家族性コレステロール血症、急性期心不全症の血清の解析を行い、そのうち、脳動脈閉塞による急性期脳卒中症、糖尿病治療前後の動脈硬化症、急性期心不全症の血清症の解析結果(同定と比

較定量値)を同センターに提示した。治療前後のたんぱく質の変動を示し、また、同定・定量した各たんぱく質同士との相関解析結果も示した。いくつかのたんぱく質の変動が観察されたが、臨床情報がその時点では未だ送付されてなかったので詳細な関係は不明であった。今後は、臨床情報を送付して頂き、治療に伴うたんぱく質の変化と臨床情報との相関性解析を行いたい。また、今回、とりあえず、各疾患 3~5 例ずつ解析した結果を提示したが、しかし、解析した各疾患群の例数が少

ないので詳細な解析が困難であった。今後は、疾患毎に解析を終了してから、纏めて提示することとした。

(3) 国立成育医療センター：

昨年度に引き続き、同センターより提供された小児ネフローゼ症の血清試料 21 検体の血清各たんぱく質の同定・比較解析を行った。そのうち、ステロイド治療を施した微小変化型ネフローゼ患者血清の解析結果を同センターに開示し、たんぱく尿および血清たんぱく質濃度などの臨床情報と、各たんぱく質の発現比率との相関性を詳細に検討した。その結果、血清循環糖たんぱく質であり脂質代謝に参与する zinc α 2-glycoprotein (ZAG)(5, 6)及び補体第3経路(レクチン経路)の活性化に参与する蛋白質分解酵素(MBL-associated serine protease (MBLP1)の isoform 2 (MBLP1-isoform 2)(7, 8)がステロイド治療効果を反映するモニターたんぱく質であることを示した。このうち、MBLP1は炎症系の原因に近い上流蛋白質であり、発症原因が不明な本疾患のメカニズムの解明に役立つ可能性を示す。なお、ZAGとMBLP1-isoform 2に関しては、別項で詳細に記述する。また、国立成育医療センターでは、臨床検体で得られた結果(ZAGおよびMBLP1-isoform 2の変化)が、本疾患の実験動物モデルの可能性のある、たんぱく尿、低たんぱく質血症、高脂血症を呈する ICGN マウス(9)でも確認されるか現在検討中である。

(4) 国立長寿医療センター：

同センターより提供された骨粗しょう症の患者血清 15 検体と認知症患者血清 11 検体の血清各たんぱく質の同定・比較解析を行った。そのうち、骨粗しょう症 10 検体の解析結果(同定と比較定量値)を同センターに提示した。この場合も、対照とする日本人健常人血清との比較が問題であるが、少なくとも血清高発現たんぱく質の大部分については、標準血清(外国人プール血清)と殆ど変

わらなかった。しかし、通常、標準血清及び日本人健常人血清では殆ど検出されない筋肉組織等由来のたんぱく質(profilin 1, filamin-1, peptidylprolyl isomerase A)が高値(H/Lが6~8)を示す場合が観察された(表3)。恐らく、患者血清中に漏出したこれらの組織たんぱく質が検出可能なまでにリークし増加したために測定が可能になったものと考えられる。これらの組織由来のたんぱく質が疾患特異的なのか或いは非特異的(寝たきり状態等による)なのなのかは今後の検討課題である。

(5) 国立精神・神経センター：

昨年解析したパーキンソン病患者の他に新たに2例(合計12例)及びパーキンソン病症候群(多系統萎縮症)患者5例の血清の解析を行った。解析結果を同センターに開示する予定である。パーキンソン病に関しては12例を纏めて標準血清と比較したが、高発現血清たんぱく質の中では、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、より病変部位に近い脳脊髄液の解析に向けて、その解析法等を検討する。

(6) 大阪府立成人病センター：

スキルス胃癌患者5名の手術前・後の血清高発現たんぱく質の解析を行った。また、胃癌組織に関しては、同センターの指導のもとに、組織染色、LMD技術を用いるcICAT解析法を構築し、高分化型腺がん患者1例の病変部位・正常部位の解析を終了した(後述)。また、スキルス胃癌組織の解析も開始した。これらの結果を同センターに開示し、今後の対応を討議する予定である。

7) 大阪大学医学部：

同大学より提供された運動ニューロン病(ALS)患者血清14検体のうち、10検体の解析を終了した。結果を近く同大学に開示協議する予定である。また、組織解析系が構築されてきたので、今後は乳がん組織の解析も開始する。

表3 各疾患における閾値を超えた ((H/L: <0.63, >1.60) 代表的血清たんぱく質の解析結果 (H/L 比)

	外国人(4名)	日本人(4名)	PD 病(10名)	ネフローゼ(5名)			糖尿病(20名)	骨粗鬆症(15名)
				治療前	治療中	治療後		
Factor H-related 1	0.89 (0.15)	0.94 (0.22)	1.26 (0.23)	1.24 (0.21)	1.36 (0.23)	1.30 (0.14)	1.76 (0.21)	1.60 (0.36)
Factor H-related 3	1.12 (0.33)	N/A	1.34 (0.28)	1.42 (0.20)	1.12 (0.33)	0.79 (0.20)	1.53 (0.41)	1.81 (0.17)
CD5 antigen	1.16 (0.42)	1.14 (0.11)	1.02 (0.3)	0.74 (0.42)	0.59 (0.49)	0.78 (0.55)	1.86 (0.34)	1.14 (0.46)
ZAG	1.08 (0.40)	0.99 (0.15)	1.13 (0.46)	1.18 (0.43)	3.27 (0.57)	0.82 (0.24)	1.33 (0.46)	1.37 (0.29)
Ficolin 2	1.06 (0.42)	1.99 (0.30)	2.05 (0.15)	2.96 (0.47)	3.42 (0.55)	3.00 (0.69)	4.99 (0.54)	5.91 (0.20)
Filamin-1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8.24 (1.14)**
Profilin 1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6.28 (0.10)
Pancreatic RNase	1.15*	N/A	1.03 (0.27)	0.98 (0.22)	0.94 (0.18)	0.76 (0.36)	1.67 (0.34)	2.21 (0.30)
Peptidylprolylisome A	ND	ND	2.55*	ND	ND	ND	N/A	8.27 (0.07)***
LPL(a)	0.94 (1.35)	0.47(1.25)	0.66 (0.86)	0.75 (0.89)	0.79 (0.89)	0.87 (0.82)	0.17 (0.85)	0.40 (0.6)
cf								
Vitamin D-BP	0.91 (0.11)	0.90 (0.09)	0.95 (0.11)	0.85 (0.13)	0.7 (0.20)	0.90 (0.10)	0.93 (0.12)	0.94 (0.11)
Apo B	0.87 (0.09)	0.94 (0.09)	1.03 (0.08)	1.04 (0.13)	1.06 (0.28)	0.86 (0.21)	0.78 (0.39)	1.24 (0.16)
Apo C-IV	0.87 (0.11)	1.01 (0.08)	0.90 (0.12)	1.02 (0.17)	1.24 (0.17)	0.89 (0.17)	0.73 (0.49)	1.25 (0.38)
Total proteins	0.96 (0.23)	0.95 (0.18)	1.18 (0.18)	1.00 (0.29)	0.99 (0.31)	1.20 (0.33)	1.22 (0.26)	1.41 (0.26)

標準血清を L、各血清を H とした時の H/L 比を示す。閾値を <0.63, >1.60 とした時に、各疾患で閾値を超えたたんぱく質の値を表示し、また、疾患により変動しなかった Vitamin D-BP 及び食生活により変化しやすいとされる Apo B, Apo C-IV の値を参考として表示した。Total proteins は、各疾患で定量した全たんぱく質 (約 120-150 種類) の平均値を示す。() は SD(ln) を示す。N/A は比が定量できない場合。ND は検出できず。*: 1 例、**: 2 例、***: 3 例のみ定量

3) 微小変化型ネフローゼ疾患患者血清の解析結果

多量の蛋白尿と低蛋白血症等を呈するネフローゼ症候群の一つ微小変化型ネフローゼ症候群 (minimal change nephritic syndrome: MCNS) は、小児期の腎症の大部分および成年期の腎症の約 15% を占める (10)。本疾患は、糸球体のろ過機能に異常が認められ、アルブミン等の血清たんぱく質が尿中に大量に漏出し、そのため、低たんぱく質血症およびしばしば高脂血症を示す。また、凝固系阻害因子 antithrombin III 濃度が低下するため凝固系の亢進が観察されている (10)。しかし、本疾患は他の腎症と異なり、糸球体には殆ど組織学的な変化が見られず、また、免疫グロブリンや、補体の沈着も認められない。さらに、特別な自己抗体の存在も報告されていない。多くの症例では、急性に発症し、副腎皮質ステロイドホルモンや免疫抑制剤の投与により寛解するが再発しやすいなどの特徴点を有する。また、一部は難治性ネフローゼに移行することが報告されている。ステロイドホルモンの長期投与は

発育期の小児には重大な副作用を引き起こす可能性があり、より副作用のない薬剤の開発、治療法の確立が望まれている。その発症原因仮説としては、T 細胞機能異常(11)やヘモペキシンなどの糸球体透過性亢進因子の異常等(12)スリット膜関連たんぱく質の低下等 (13) が提唱されているが、いずれも決定的ではなく、本質的な発症原因の解明が強く望まれている。我々は、同位体標識法の一つ Cleavable ICAT(cICAT)法 (4) を用いて、健常人血清と、微小変化型ネフローゼ症候群患者血清 (治療前および治療後) の血清蛋白質の網羅的発現差解析を行い、その解析結果と患者の臨床情報との相関関係を明らかにすることにより、本疾患に関与する疾患関連たんぱく質を特定することを試みた。

そこで、ステロイド治療を行った微小変化型ネフローゼ症候群患者 5 名 (A, B, C, D, E) の治療前 (発症中)、治療中 (ステロイド等投与中) 或いは治療後 (ステロイド投与終了、緩解期) の患者の血清高発現たんぱく質 (約 140 種類) に関して、標準血清との同定・比較定量解析を cICAT

法により行った。また、常法により、患者の治療前（発症中）、治療中（ステロイド投与中）および治療後（ステロイド投与終了、緩解期）のたんぱく尿検査値、血清総蛋白質量及びアルブミン/グロブリン比を測定した。

その結果、患者全例において、ステロイド投与治療により、尿中へのたんぱく質の漏洩は完全に停止（+++から-に改善）したが、それとともに、血清循環糖たんぱく質の一種である zinc α 2-glycoprotein (ZAG)の（H/L 比）は治療前では平均 1.18 ± 0.68 であったのが、治療により平均 3.27 ± 0.82 と約 3 倍に増加した(図 5)。一方、

他の血清循環糖たんぱく質の vitronectin, alpha-1B glycoprotein, hemopexin の H/L 比は治療により、殆ど変化はしなかった。また、血清総たんぱく質量およびアルブミン/グロブリン比は治療により、上昇するものの治療中の時点では緩解期のレベルまでには回復していなかった(データ省略)。従って、治療による zinc α 2-glycoprotein (ZAG)の増加は血清総たんぱく質量及びアルブミン/グロブリン比の正常値までの変化よりも先行した。また、治療後（緩解期）には、本たんぱく質の H/L 比は正常値近くに帰り、増加はステロイド投与中にのみに限られた。

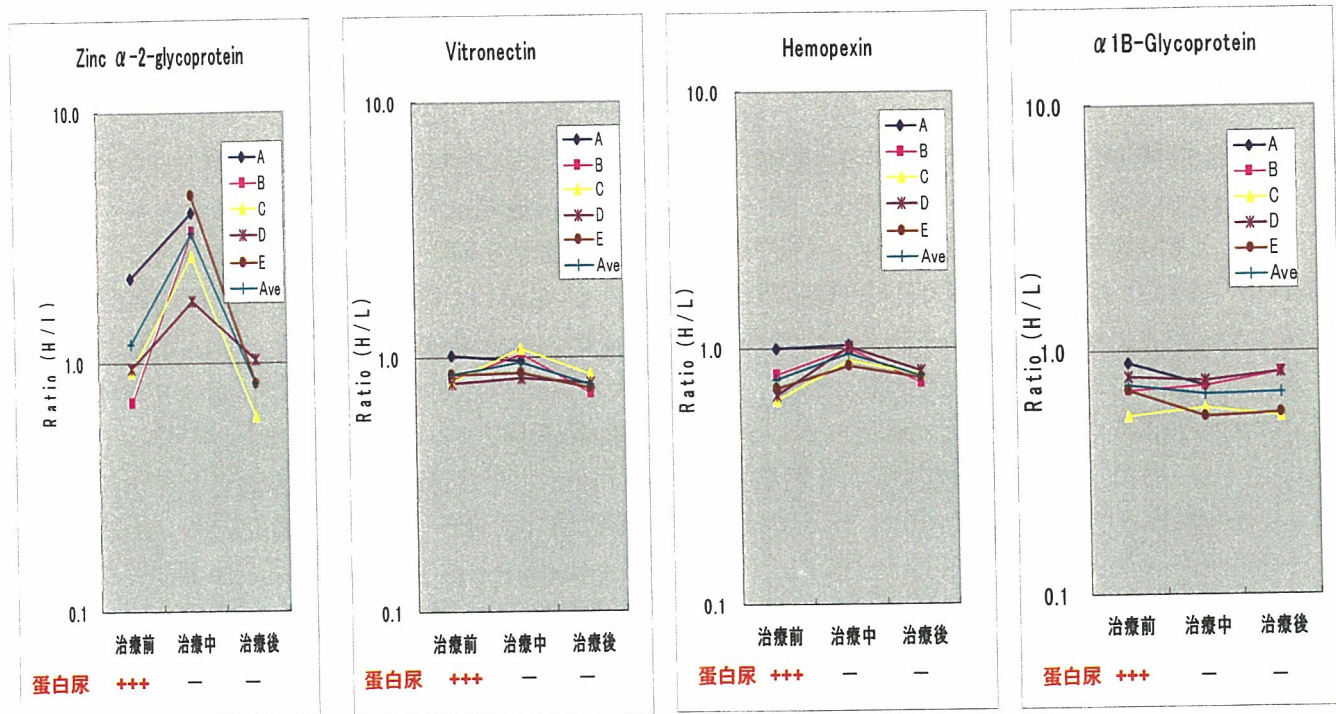


図 5. ネフローゼ（微小変化型）患者の蛋白尿および ZAG 血清たんぱく質の経時変化

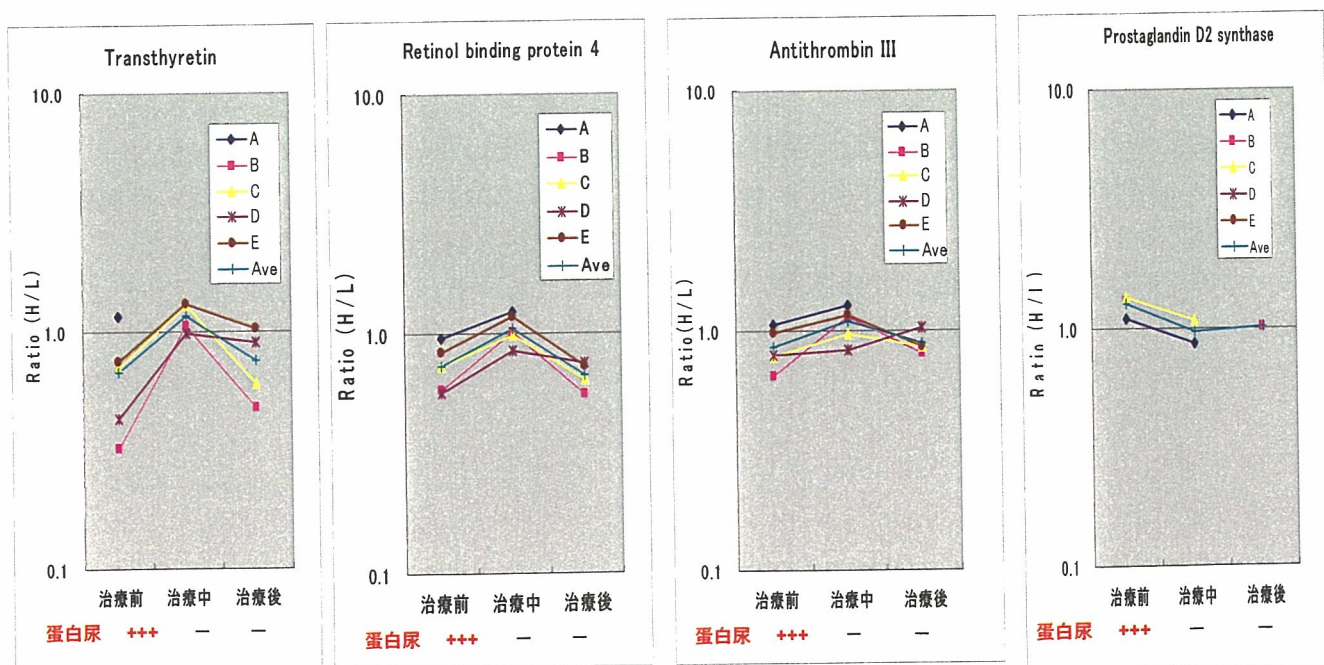


図 6. 既知マーカーたんぱく質 (transthyretin, retinol binding protein 4, antithrombin III, prostaglandin D2 synthase) の経時変化

一方、ネフローゼ症候群で、発症し腎臓の糸球体のろ過機能が低下すると、血中濃度が低下し、治療によりろ過機能が改善すると、上昇することが知られている transthyretin (14), retinol binding protein 4 (14), antithrombin III (15) は、ZAG より顕著ではないが、同様に、蛋白尿の消失とともに上昇した (図6)。また、治療後 (緩解期) には、これらのたんぱく質の H/L 比は正常値近くに帰り、増加はステロイド投与中にのみに限られた。一方、逆に、発症時には高く、治療によりろ過機能が改善すると、低下することが報告されている、炎症系の key 酵素の一つ prostaglandin D synthase (16) は、僅かではあるが蛋白尿の消失とともに低下した (図6)。

そこで、これら既知マーカー (モニター) たんぱく質と ZAG の定量比 (H/L) に関して、患者 5 名で得られた結果をまとめ、ZAG との相関性があるか調べた。その結果、本蛋白質 (ZAG) は、ろ過機能改善と相関する retinol binding protein 4, transthyretin, antithrombin III とは強い正の相関性を示し、逆に、ろ過機能の低下と相関する prostaglandin D2 synthase とは強い負の相関性を示した (図7)。以上の結果は、本たんぱく質 (ZAG) が、既知マーカー (モニター) たんぱく質と同様に、ネフローゼの病態変化を反映するモニターたんぱく質の一つであることを示す (特許出願 平成 18 年 6 月 21 日)。

ZAG には血中の脂質低下作用があると報告されており、また、ある種のがん患者ではその血

中レベルが増加することも報告されている (5, 6)。また、ステロイド投与により組織の ZAG の mRNA レベルが上昇することも報告されているが、血清レベルも上昇させるかは定かではない。しかし、ステロイドで mRNA が上昇しても、一般に高発現血清たんぱく質に属する本たんぱく質濃度が急激に上昇するとは考えにくい。それよりも、ZAG はアルブミンよりも低分子であり、糸球体のろ過機能が低下すると尿中に漏出しやすく、ステロイドの抗炎症作用により糸球体のろ過機能が回復すると漏出が止まり、リバンドで上昇するとした方が妥当と考えられる。ZAG と正に相関する retinol binding protein 4, transthyretin, antithrombin III は低分子であり、ろ過機能が低下するため尿中に漏出し、そのため血中濃度が低下するとされている。一方、生体にとって、これらのたんぱく質濃度が低下すると、本来の機能が低下するので恒常性維持のために、その生合成能力が亢進することが知られている。従って、ネフローゼ患者にしばしば観察される高脂血症は、脂質低下作用がある ZAG が低下するために引き起こされるものであり、ろ過機能が改善され、尿への漏出がストップすると、ZAG 濃度は正常レベル以上に増加し、それとともに、血中脂質レベルが低下するのかもしれない。

なお、ZAG は、表3に示すように、他疾患群 (パーキンソン病、糖尿病、骨粗鬆症) では、標準血清と比較すると、大きな変動は観察されていない。

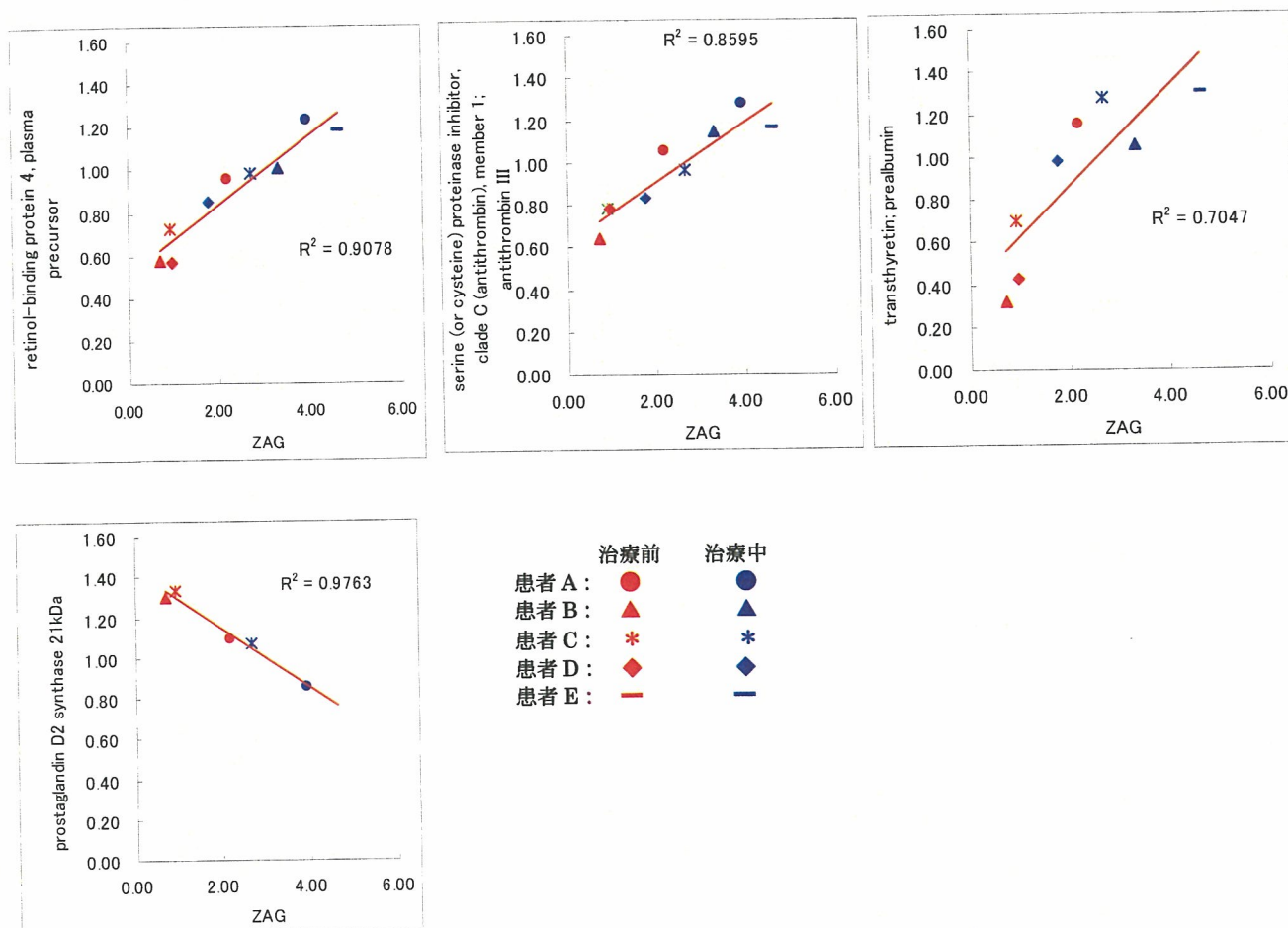


図 7. ZAGと既知マーカーたんぱく質(antithrombin III, retinol-binding protein 4, transthyretin, prostaglandin D2 synthase)の相関性

さて、ZAGが既知のマーカー(モニター)たんぱく質と同様に、治療効果を反映するたんぱく質の一つではあるが、1)完全緩解期ではそのレベルは正常に戻る、2)他の疾患でも上昇することが知られているので、特異性の高いマーカーたんぱく質とは言いがたい。また、本疾患の原因に近い上流に位置するたんぱく質ではなく、むしろ、急性期たんぱく質群のように下流に位置するたんぱく質と考えたほうが妥当である。しかし、本ネフローゼ疾患で得られたステロイドの治療効果の一部を反映していることは確実である。

そこで、ネフローゼの発症原因を探るため、ZAGをベースにして、本疾患患者の解析で得られた約140種類の血清たんぱく質全てについての相関性を検討した。その結果、今まで報告されていない疾患原因の可能性のある複数のたんぱく

質がZAGと強い負の相関することが判明した(即ち、発症時には高く、治療によって低下する)。特に、興味あるたんぱく質としては、血清に存在するレクチンで腸バクテリアの糖鎖に結合するmannose binding lectin (MBL)に特異的に結合する蛋白質分解酵素(MBLP-1)のisoform 2(7,8)が強い負の相関性を示した。一方、MBLP-1のisoform 1には相関性が認められず、また、補体の第一経路のC1s, C2にも相関性は認められなかった(図8)。MBLP-1系は比較的最近に明らかにされた補体の第3経路(レクチン経路)(17)に参与する(図10)。第1経路は抗原・抗体複合体で活性化する経路(古典的経路)であり、第2経路(Alternative pathway)は微生物表面とC3の結合により活性化される経路であり、第3経路は、腸管バクテリア

等の微生物表面糖鎖と血清に存在するレクチン (MBL)が結合することにより活性化される。MBLP-1のisoform 2, isoform 1は補体第3経路の活性化に必須なセリンプロテアーゼ系の蛋白質分解酵素である。なお、MBLP-1のisoform 2を

ベースにして他のたんぱく質の相関性を調べると、antithrombin III、transthyretin、retinol binding protein 4 とは強い負の相関性が見られた (図9)。

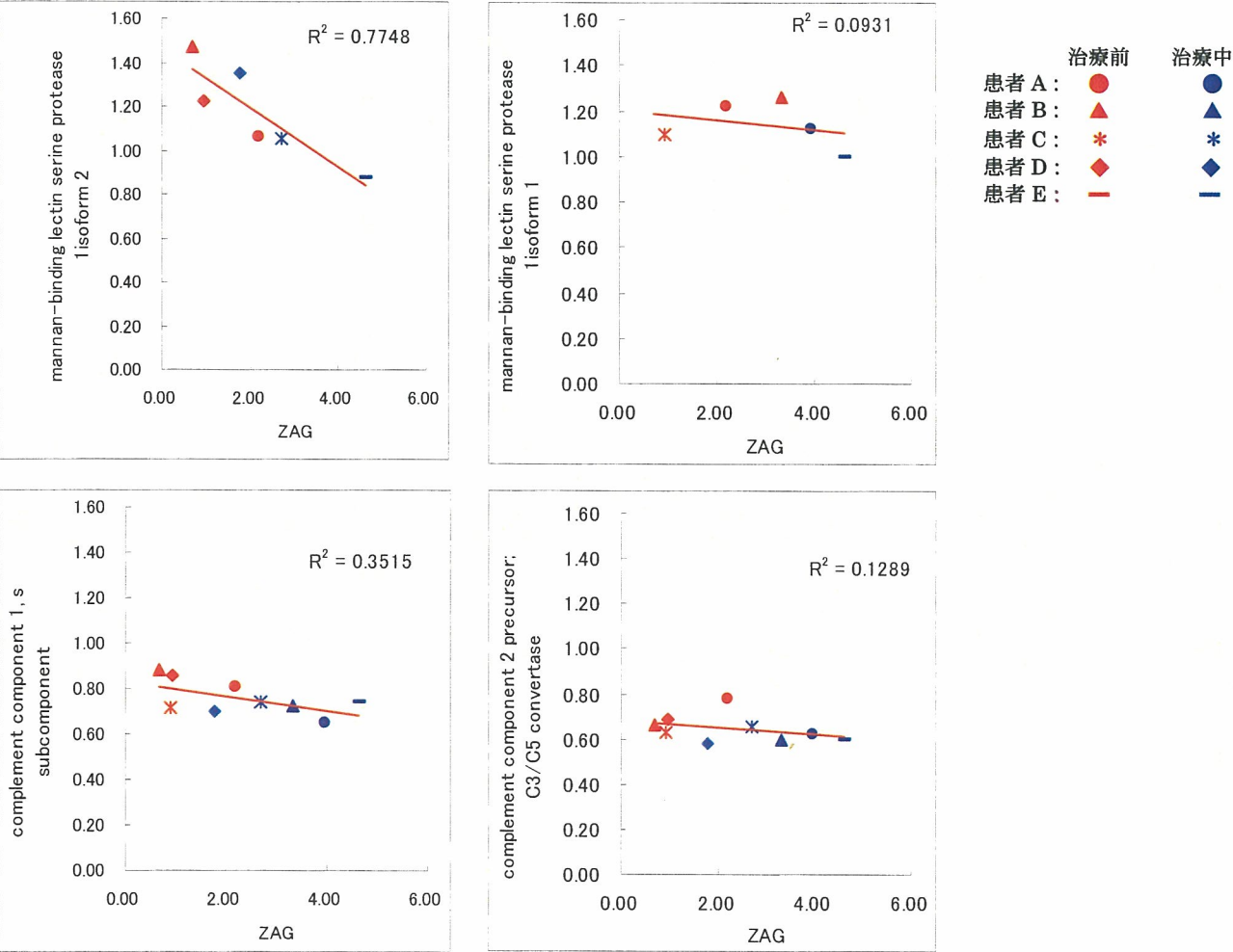


図 8. ZAG と MBL-protease 1 isoform 2 との負の相関性

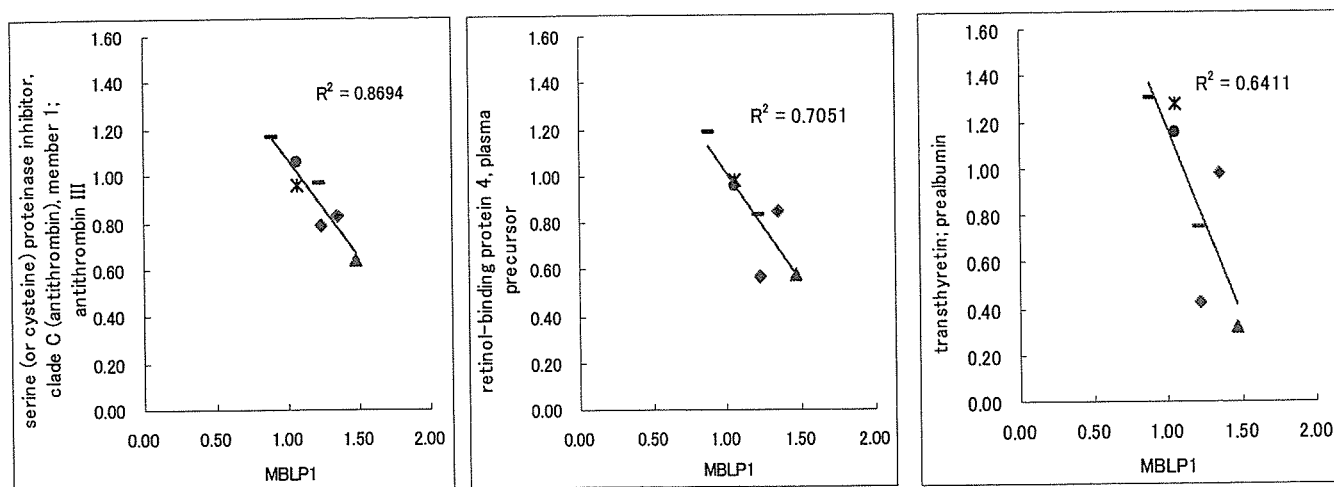


図 9. MBLP1-isoform 2と既知マーカーたんぱく質 (antithrombin III, retinol-binding protein 4, transthyretin) との負の相関性 (記号は図8と同じ)

以上のことから、本蛋白質(MBLP1)が発症時に高く、ステロイド投与治療効果とともに低下するステロイドの治療効果を反映するモニターたんぱく質の一つであると考えられる。しかし、MBLP1はZAG等の炎症系等の下流の蛋白質と異なり、炎症系の原因に近い上流たんぱく質である。MBLP1が関与する補体第3経路は腸管バクテリアのたんぱく質でなく糖鎖を認識するので非特異的である(抗体産生の履歴が起こらない)こと、また、小児ネフローゼと同様にステロイドが有効な他の小児特有の疾患(アトピー、食物アレルギー)との関連性を考慮すると、一つの可能性として、本疾患は、小児期の腸管免疫系の発育不全が

基礎にあることが考えられる。すなわち、発育不全の腸管免疫系のバリアーを突破した腸管バクテリアがMBLP補体第3経路を活性化して炎症を起こすものと考えられる。ステロイドは、MBLP補体第3経路の活性化反応を阻害できないが、その後に起こる炎症を阻害することにより、治療効果(糸球体ろ過機能改善)を発揮するものと考えられる(図10)。今後、この仮説を証明するためには多くの詳細な検討が必要であるが、本疾患のステロイドに代わる創薬ターゲットとしては、例えば、糖鎖認識部位阻害剤、MBLP1特異的阻害剤などが考えられる(特許出願済み)。

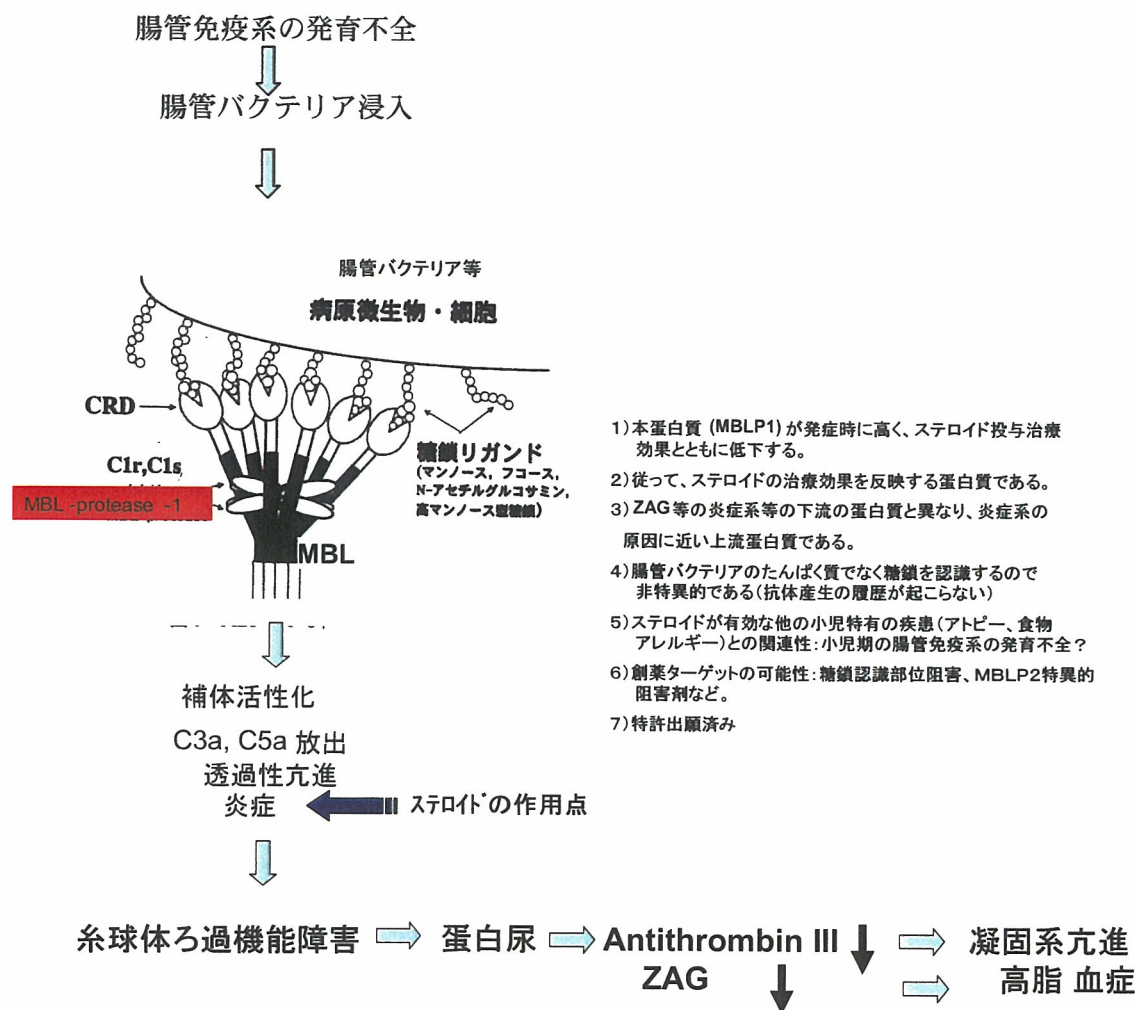


図 10. MBL複合体による補体第3経路(レクチン経路)の活性化の模式図およびネフローゼ(微小変化型)の発症原因仮説
(廣川タンパク質化学、第5巻、血漿タンパク質(II) 長澤滋治・編集 p384(図3)より一部改変)

4) cICAT 法 による細胞・組織たんぱく質解析 (1) ヒト胃がん培養細胞株の解析:

昨年に引き続き、cICAT 法を用いて、異なる性質を示す胃がん細胞株同士 (KATO-III, MKN-45, MKN-74) 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。このうち、Kato-III はスキルス胃がん細胞株、MKN-45 は充実型未分化型腺がん細胞株、MKN-74 は中分化型腺癌細胞株である。Kato-III 等の幾つかのスキルス胃がん細胞株に関しては、mRNA 発現解析の結果から、FGF-Receptor 2- mRNA が強発現していること

が知られている(18)。FGF-Receptor 2 およびその関連たんぱく質が実際のたんぱく質レベルでも強発現しているかは興味あるところである。

そこで、KATO-III(100 µg)を L 鎖試薬(1kit)で、MKN-45(100 µg) or MKN-74(100 µg)を H 鎖試薬(1kit)で標識し、常法により得られた SCX25 分画の各画分の 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) で、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、約 700 - 1000 種類の細胞たんぱく質の同定・比較定量が可能であった。そのうち、KATO-III と MKN-45 の解析で同定可能のた

んぱく質(758 種類)の機能(function)別 (図 1 1) 及び代謝経路(pathway)別 (図 1 2) のカテゴリー分類 (Panther) を示す。

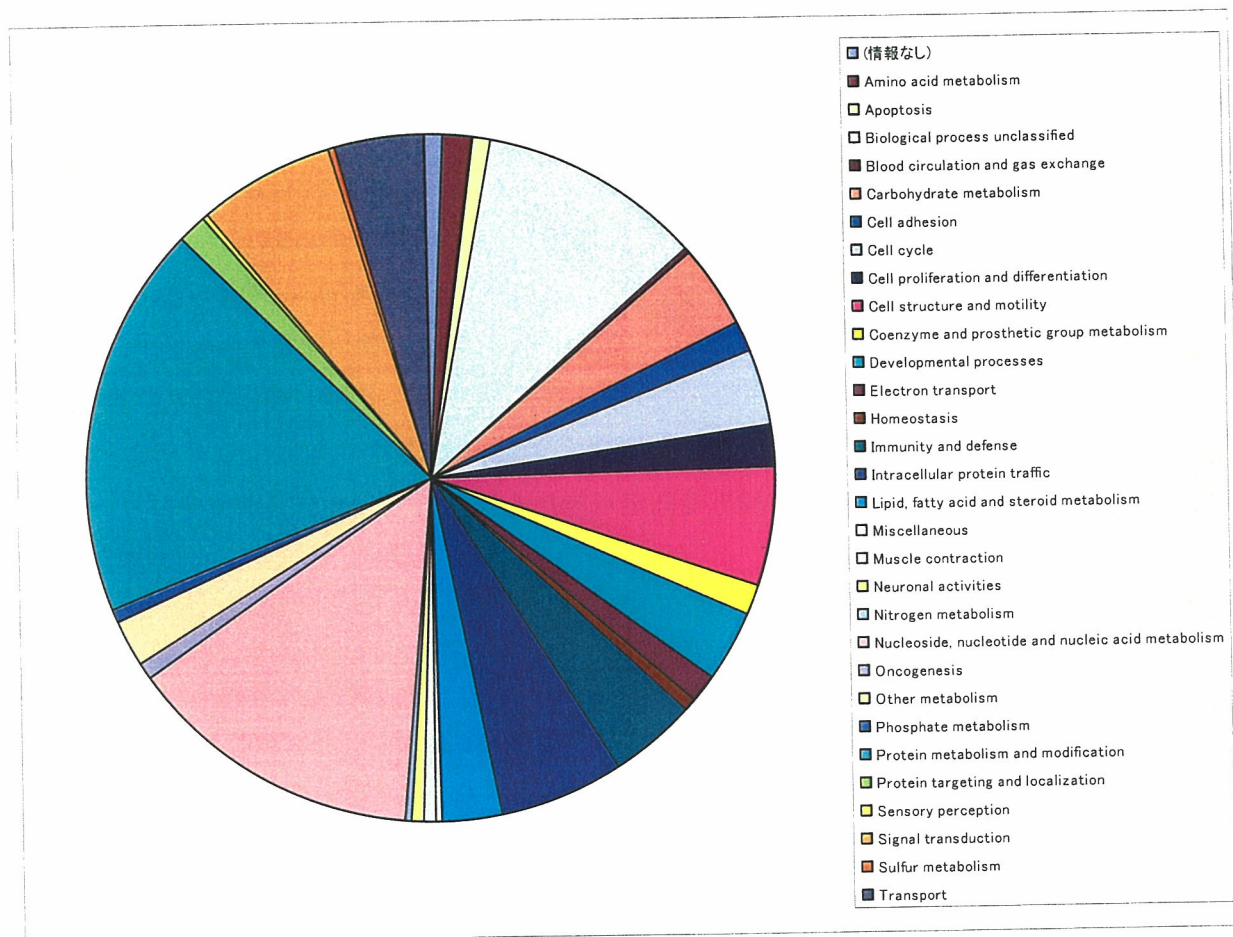


図 11. KATO-III と MKN-45 の解析で cICAT 同定可能たんぱく質の機能別カテゴリー分類

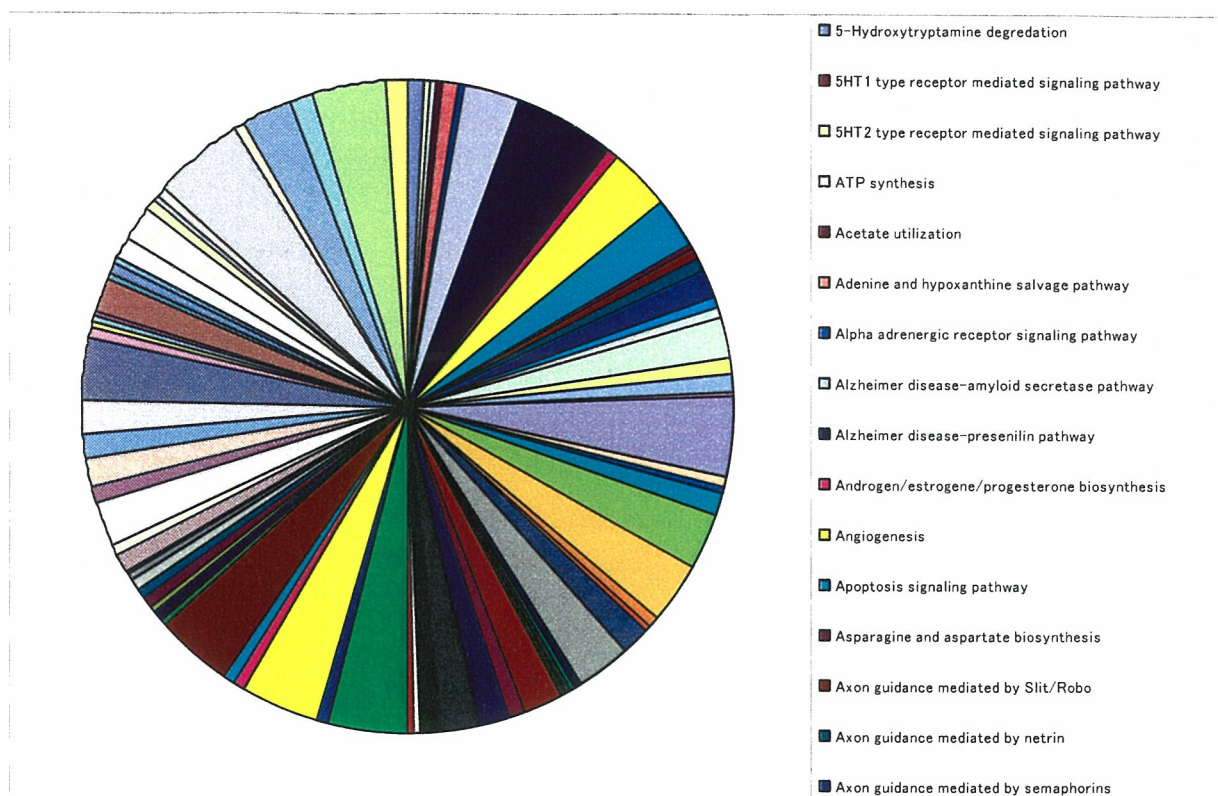


図 12. KATO-III と MKN-45 の解析で同定可能たんぱく質の代謝経路別カテゴリー分類

機能別カテゴリー分類では、たんぱく質代謝・修飾関係 (276 種)、核酸関連たんぱく質系 (209 種)、シグナル伝達系 (97 種)、細胞内たんぱく質 (89 種)、細胞骨格系 (82 種)、免疫反応系 (62 種)、トランスポート系 (63 種) などが上位を占めた。一方、代謝経路別カテゴリー分類では、presenilin pathway (21 種), ubiquitin proteasome pathway (19 種), integrin signaling pathway (17 種), inflammation pathway (17 種), cytoskeletal regulation by Rho GTPase (17 種) とともに FGF receptor pathway (12 種), EGF receptor pathway (13 種), angiogenesis (12 種), apoptosis pathway (12 種), FAS signaling pathway (6 種) 等が認められた。

図 13 は、KATO-III と MKN-45 の同定たんぱく質 (758 種類) での、各たんぱく質の発現比較定量比 (H/L: MKN-45 / KATO-III) を示す。なお、たんぱく質名は表記せず、番号で示した。その結果、KATO-III に 5 倍以上選択的なもの (Kato-III

のみで同定されたものも含む) は 10 種類であり、その中には、mRNA レベルで強発現が報告されている FGF-receptor 2 が含まれていた。

図 14 に FGF-receptor 2 の cICAT- fragment (DSGLYACTASR) の H および L の存在パターンを示す。一方、MKN-45 に 5 倍以上選択的なものは、carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5 等の 46 種類が存在した。

なお、同様な比較を Kato-III と MKN-74 (中分化型腺癌株) と比較した結果、FGF-receptor 2 は Kato-III にのみ強発現していることを確認した (データ省略)。以上の結果は、スキルス胃がん株 Kato-III での FGF-receptor 2 mRNA の選択的強発現を、たんぱく質レベルでも確認したことを示す。

今後、Kato-III 以外のスキルス細胞株及び実際のスキルス胃がん患者のスキルス癌部位ではどの程度の頻度で FGF-receptor 2 が強発現されているのかを検討したい。

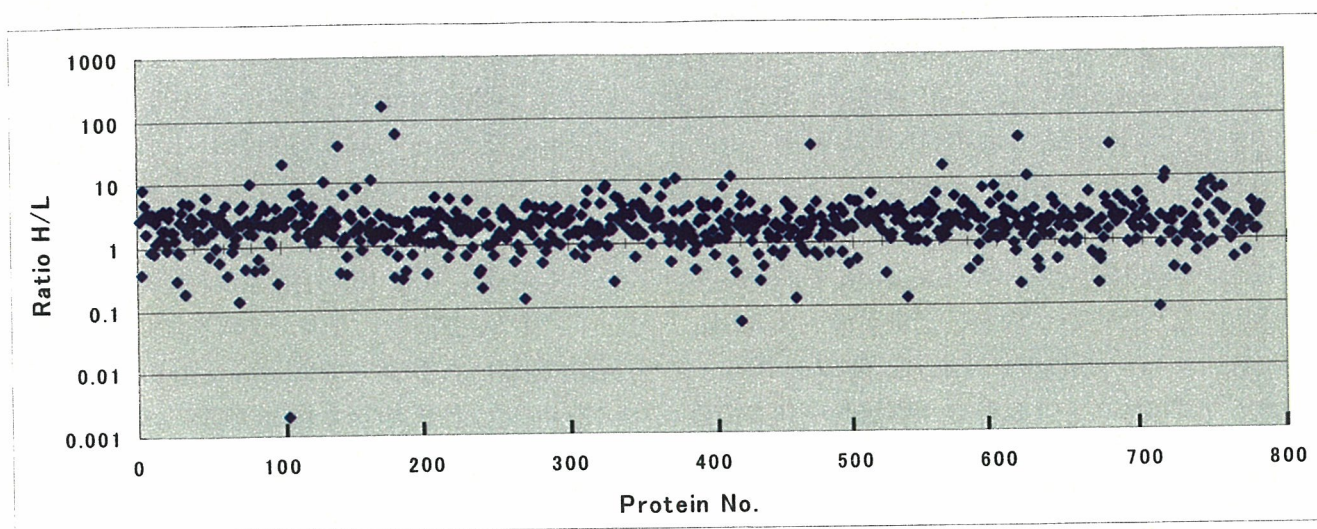


図 13 Kato-III と MKN-45 の各たんぱく質の発現比較定量比(H/L:MKN-45 / KATO-III)

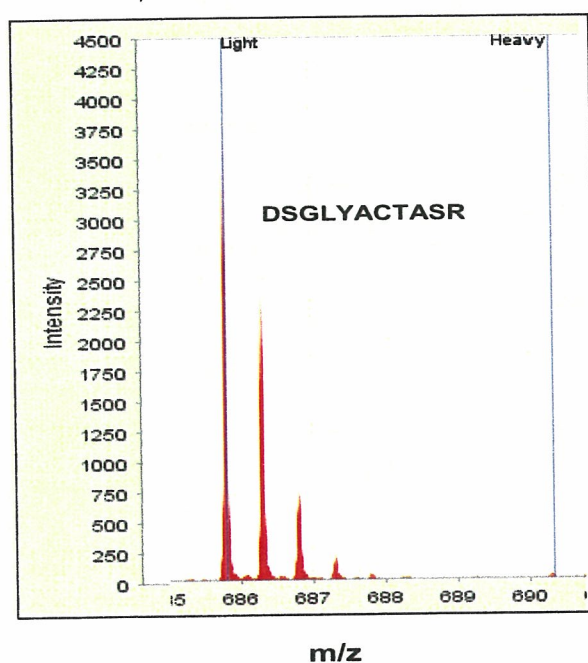


図 14. FGF-receptor 2 の cICAT fragment DSGLYACTASR の H および L の分布パターン

(2) ヒト正常胃組織の解析：

cICAT 法による培養細胞株を用いた比較検討が可能になったので、実際のヒト組織の解析をワークフロー（図 1）に従い検討した。HSSRB より購入したヒト正常胃組織を常法により切片を調製し、LMD により正常胃組織を部位特異的に分取し、研究方法の 1)に記載した方法で組織を可

溶化し、アセトン沈殿処理を行い、正常胃組織たんぱく質を得た。得られたたんぱく質を常法に基づき、cICAT- L 鎖試薬および H 鎖試薬で標識した。この場合、後述する SCX25 分画を用いて解析する時は、各 100 μ g に各 1kit の cICAT 試薬を反応させ、SCX-Amide80 で 100 分画して解析する時は各 400 μ g に各 4 kit の試薬を反応させた。

SCX25 分画は血清および細胞株と同じ方法で行い、SCX-Amide80 での 100 分画は、SCX で 10 分画し、その分画を Amide80 で 10 分画し、合計 100 分画とした。各画分を Q-Star システムで分析し、Hispec で同定・定量たんぱく質数を解析した。25 分画の場合は、Q-Star 1 run で約 670-740 種類のたんぱく質が同定・定量可能 (RefeSeq, rank 1, score 20 以上) であり、Q-Star 3 run を纏めて解析すると、合計で 993 種類 (精査済み)

のたんぱく質の同定と比較定量が可能であった。また、SCX-Amide80 を用いた 100 分画では、Q-Star で 1 run で約 1350 種類、3 run の合計で 2049 種類 (精査済み) のたんぱく質の同定・定量が可能であった。図 15 は、SCX25 分画と SCX-Amide80 の 100 分画との同定たんぱく質のベン図 (精査済み) を示す。両者に共通なものは 814 種類であるが、SCX-Amide80 の 100 分画でのみ同定されたものは 1235 種類に達する。

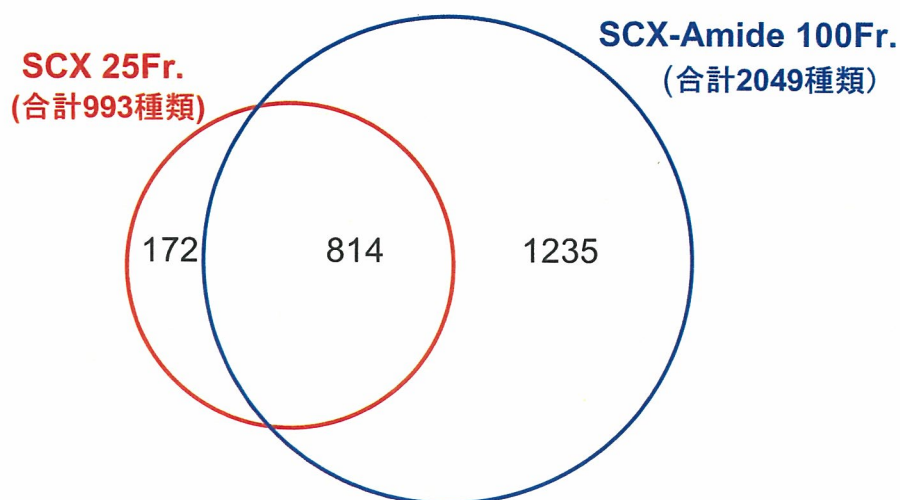


図 15. SCX25 分画と SCX-Amide80 の 100 分画との同定たんぱく質のベン図 (精査済み)

さらに、機能別のカテゴリー分類で比較すると、receptor activity(binding)では 25 分画では 25 種類であったのが、100 分画では 57 種類に、

また、transcription factor activity は 10 種類から 27 種類に増加する等、いずれも大幅に増加することが分かった (表 4)。

表 4. 胃正常組織での機能別たんぱく質分類での 25 分画と 100 分画との比較

	SCX 25Fr.		SCX-Amide 100Fr.	
nucleotide binding	148	180	294	357
DNA binding	32		63	
protein binding	36		109	
receptor activity, binding	25		57	
binding	21		45	
transcription factor activity	10		27	
RNA binding	34		49	
protein kinase, phosphatase activity	4	16	12	35
signal transducer activity	12		23	

図 16 には、100 分画で得られた同定された 2049 種類のたんぱく質の Panther による分類 (Score20 以上、unclassified を除く) を示す。これらの正常胃組織たんぱく質解析で得られたデータは、いずれ、正常胃組織たんぱく質のデータベースの一部に利用したい。

一方、実際の臨床検体のがん組織、正常組織を LMD により部位特異的に分取する時、100 分

画に解析するだけの量を確保することが難しい場合が多く、また、質量分析に膨大な時間を要する。従って、通常は 25 分画に必要な 100μg たんぱく質 (各試料につき) を用いて解析し、100 分画に必要な量が得られた場合は、可能なかぎり解析したい (血清高発現たんぱく質のルーチン解析状況を考慮する)。

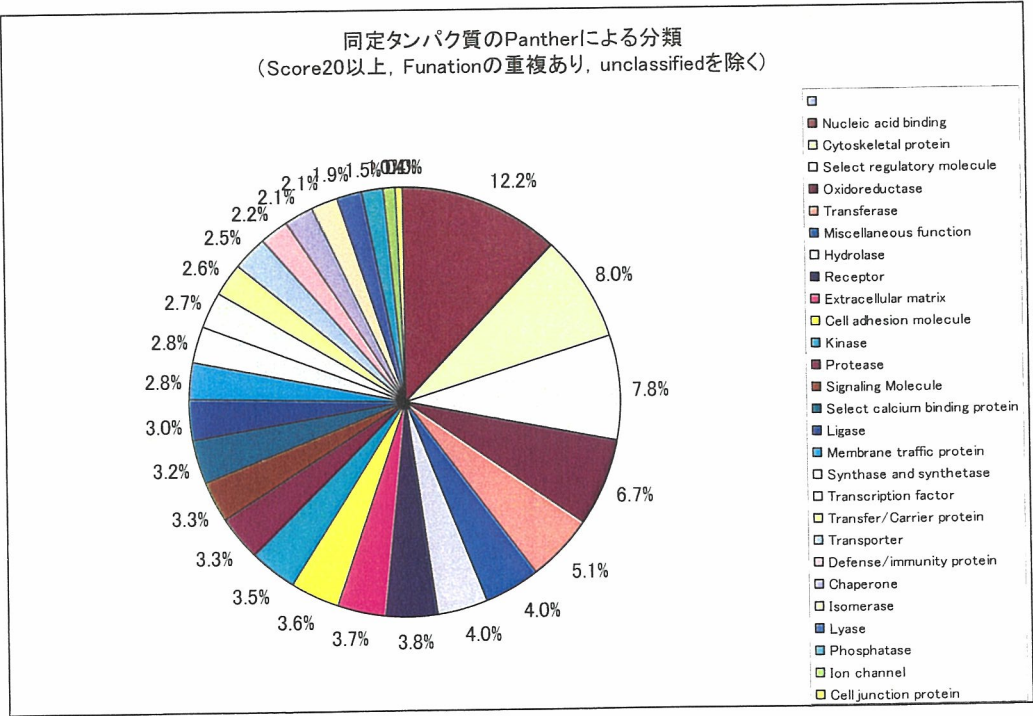


図 16. 正常胃組織たんぱく質解析で cICAT 同定可能たんぱく質の機能別カテゴリー分類

(3) ヒト胃がん患者試料（大阪成人病センター提供）のがん部位と正常胃組織の解析

大阪成人病センターより提供された胃がん患者の組織検体の解析を開始した。同センターの病理部の診断では、本胃がんは高分化型腺癌に属するとのことである。図 17 にがん病変部位および正常組織部位の組織を示す。図 1 のワークフローに従い、がん病変部位と周辺の正常胃組織を LMD で部位的に分取し、各部位のたんぱく質を得た。常法に基づき、正常胃組織たんぱく質 100 μ g を H 鎖 cICAT 試薬(H), がん組織たんぱく質 100 μ g を L 鎖 cICAT 試薬(L)で標識し、トリプシン処理、脱試薬、アビジンカラム、SCX25 分画などを行い、得られた cICAT ペプチドを 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。

その結果、がん細胞株の場合と同様に、本胃がん患者のがん部位と正常組織部位の解析から、約 700 - 1100 種類のたんぱく質が同定・定量可能で

あった。図 18 には本解析で同定された 1095 種類のたんぱく質の機能別 Panther 分類表を示す。その内訳を解析すると、やはり、cytoskeletal protein, nucleic acid binding, oxidoreductase, extracellular matrix, cell adhesion molecule, selected regulatory protein 類などが主要を占めるが、膜関連たんぱく質の Receptor 類が 26 種類、Ion channel 類が 17 種類、Transporter 類が 27 種類が存在し、その他、Kinase 類が 20 種類、Phosphatase 類が 10 種類存在した。

図 19 には、がん部位と正常組織部位の各たんぱく質の比較定量値 (H/L: 正常/がん)を示す。がん部位に 10 倍以上選択的なものが 10 種類、正常組織部位に 10 倍以上選択的なものが 6 種類存在した。さらに、正確な発現比は測定できていないが、がん部位にてのみ同定されたものが存在するので、これら閾値から大きくずれているたんぱく質に注目したい。また、今後は、可能なかぎり 100 分画を用いて、より低発現の組織たんぱく質について解析したい。

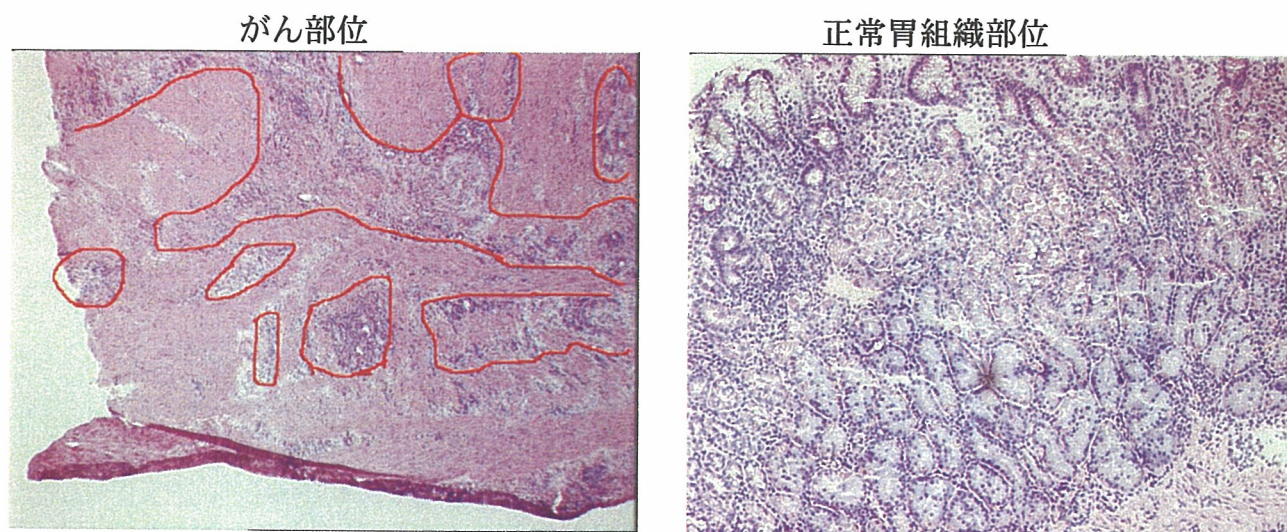


図 17. 胃がん患者（高分化型腺癌）のがん組織部位と正常胃組織部位
赤線は切除部位を示す。

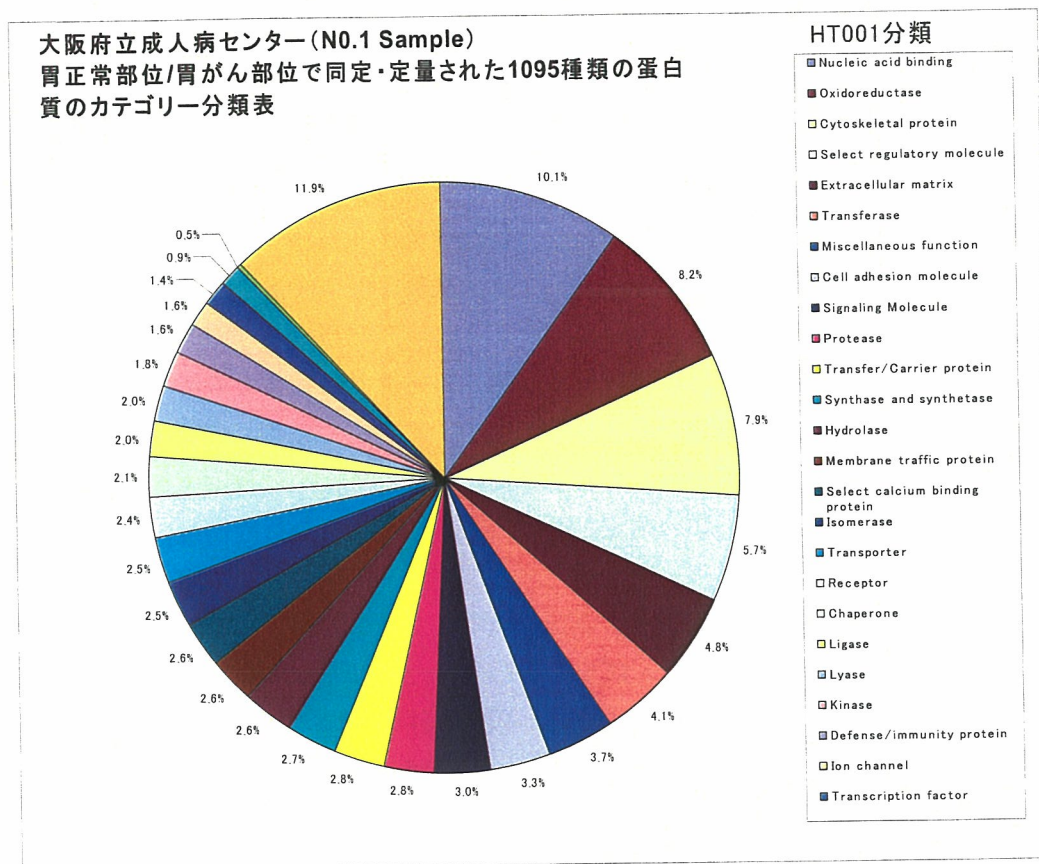


図 18. cICAT 胃がん/正常胃組織たんぱく質解析で同定された 1095 種類のたんぱく質の機能別カテゴリー分類

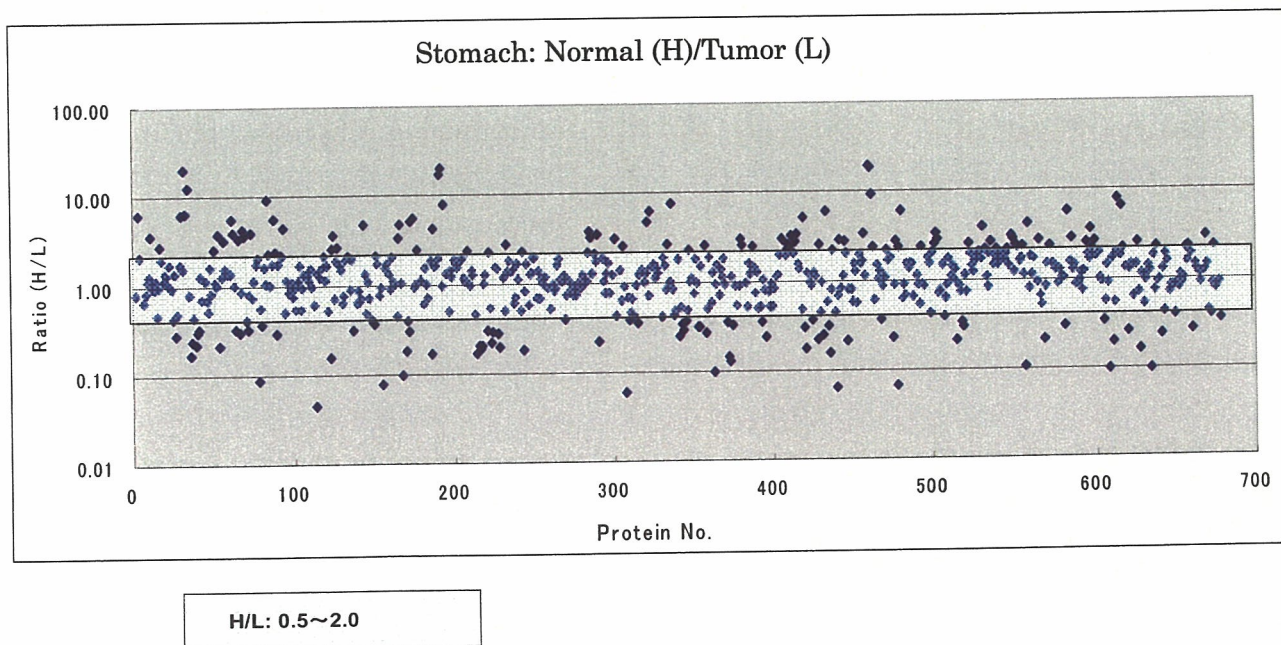


図 19. 胃がん患者のがん部位と正常組織部位の各たんぱく質の比較定量値 (H/L: 正常/がん)

5) 低発現血清たんぱく質の解析検討：

血清高発現たんぱく質の解析の場合と同様に、アジレントイムノカラムで6種類の主要たんぱく質を除いた血清画分を大量に用いて、cICAT法で、最終的に分画数を100-200にして、Qstar-XLおよびABI-4700で解析すると、約300-500種類のたんぱく質の同定と定量が可能であった(1)。しかし、膨大な処理時間と質量分析時間を要し、多数の臨床検体を迅速に解析し、結果を提供することは現実的には殆ど不可能である。一方、組織・細胞を血清高発現たんぱく質解析と同様に25分画数で解析すると、100 μ gのたんぱく質量で約1000種類の同定と定量が可能である。この差は、組織たんぱく質の場合、血清と異なり、各たんぱく質の濃度差が小さいためと考えられる。血清高発現cICATたんぱく質の上位たんぱく質は、factor H、C3、 α 2-McG、C4BP、C4、fibronectin、C7、kininogen、ceruloplasmin、karikureinであり、全体の約30%を占める。

そのため、上述の上位たんぱく質を除く手段を立てることにより、その分が低発現たんぱく質の方に振り分けられ、同定たんぱく数が増加することが予想された。そのため、アジレントイムノカラムで除いた素通り画分を、1)ベックマン社・シグマ社市販の新規イムノカラムにかけて上述たんぱく質を除く、2)上述たんぱく質は分子量が100K以上であるので、限外ろ過膜等で100K以下のたんぱく質を解析する、3)上述たんぱく質に対する自前の抗体カラムを作成し、除去する、4)抗体カラムの代わりにレクチンカラム等を利用すること等を検討した。このうち、3)の限外ろ過膜の使用により、通常の高発現血清たんぱく質(約140種類)の他に、新たなたんぱく質の同定・定量が可能になった。他の方法は、現在、検討中である。臨床検体ですでに高発現たんぱく質の解析結果が出ているので、上述の高発現たんぱく質を除いた検体を解析し、リンクすることにより、ネフローゼ血清解析で有効であった各たんぱく質・臨床情報の相関性解析が可能にな

り、所謂、網羅的な研究の特徴点を引き出せると考える。

E. 考察：

これまでに、各研究協力機関より提供された各種疾患試料(合計465検体)のうちの、血清試料(307検体)に関しては、cICAT法による血清高発現たんぱく質の解析を終了した。残りの血清試料検体も本年度の5月末までには完了する予定である。今後は、各血清たんぱく質の発現解析結果と数値化した臨床情報との網羅的な相関解析を行うことにより、疾患関連たんぱく質を探索が可能なデータベース作成を作成することになる。この場合、疾患により変動した各たんぱく質の発現比が正確であることが必須条件の一つである。

今回、これを検証する意味で、小児ネフローゼ症候群(微小変化型)の患者5名のステロイド治療前後の血清たんぱく質の解析研究を行った。その結果、治療により、蛋白尿が消失(+++から-)するのと連動して、血清循環糖たんぱく質の一種、zinc α 2-glycoprotein (ZAG)が、平均、約3倍に増加し、この増加と本疾患の既知たんぱく質マーカーであるantithrombin III, retinol-binding protein 4, transthyretin等とは強い正の相関性を、prostaglandin D2 synthaseとは強い負の相関性を示した。このことは、ZAGが本疾患における、ステロイドの治療効果を反映するたんぱく質の一つであること示す。さらに、ZAGを軸にして、本疾患患者の解析で得られた約140種類の血清たんぱく質全てについて網羅的な相関解析を行ったところ、腸管細菌に反応する補体第3経路(レクチン経路)の第一ステップの律速酵素、MBL-associated serine protease (MBLP-1) isoform 2が強い負の相関性を示した(即ち、発症時に高く治療により低下する)。一方、類縁酵素には相関性は見られ

なかった。MBLP-1 が炎症系の最上流部に位置するたんぱく質の一つであることを考慮すると、ネフローゼ（微小変化型）の発症機構は、図 10 に示したように、腸管細菌と補体第 3 経路活性化が関与している可能性を示唆する。仮説が正しければ、副作用の多いステロイドに代わる創薬ターゲットも考えられる（図 10）。

一方、観点を変えると、本解析結果で得られた cICAT 法による各たんぱく質の発現比が正確であり、臨床情報を反映していることを示唆する。従って、糖尿病等の複雑な素因を持つ慢性疾患の場合でも、臨床情報を数値化して、層別解析を行うことにより、疾患関連たんぱく質を見出せる可能性を示すものとする。なお、最近、開発された同位体標識法の iTRAQ 法を用いて標準血清（外国人プール血清）を解析すると、confidence 95% で約 250 種類の血清たんぱく質の同定と定量が可能であったが、

F. 結論：

これまでに、疾患関連血清たんぱく質解析フロー（cICAT 法）に基づき、各研究協力機関から提供された各種疾患試料（合計 465 検体（主として血清試料））の約 66% の解析を完了し、疾患関連たんぱく質データベースに入力した。PF で得られたたんぱく質発現解析結果を各研究協力機関に開示し、臨床情報および変動するたんぱく質との相関性解析を行うことにより、疾患関連たんぱく質の探索を行った。その結果、小児ネフローゼ症候群（微小変化型）において、発症に関与する可能性のある複数の疾患関連血清たんぱく質を見出した（特許 2 件出願）。

G. 健康危険情報：

特になし。創薬プロテオームファクトリー施設では万全なバイオハザード対策を施工している。

H. 研究発表：

なし。

MBLP-1 や prostaglandin D2 synthase 等は含まれていなかった。cICAT 法はスループット性では劣るものの、システイン残基に特化するため、より低濃度のたんぱく質も解析できる利点を発揮したものとする。

さて、創薬ターゲットを念頭に考えると、組織・細胞のたんぱく質の解析が重要である。今回、組織・細胞の cICAT 法によるワークフローを構築し、実際の臨床検体（胃がん患者組織）の解析を開始した。血清の場合と異なり、組織の解析では、100 μ g を用いて cICAT 法で解析すると、25 分画で約 700-1000 種類、100 分画では 2000 種類以上の組織たんぱく質の同定と定量が可能であった。この中には、受容体等も多数含まれる。今後、ルーチンの解析体制をさらに充実して臨床検体の解析を促進したい。

他疾患でも同様な解析が可能であることを示すものとする。創薬ターゲットの可能性を多く含む組織蛋白質の解析については、部位特異的組織のたんぱく質解析 cICAT ワークフロー法（約 700 – 1000 種類を同定・定量）を構築し、研究協力機関より提供された組織試料（胃がん・正常組織等）のルーチン解析を開始した。以上、得られた各たんぱく質発現比および臨床情報の数値化を行い、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した。

I. 知的財産権の出願・登録状況：

1. 特許出願：2 件

1) ネフローゼ症候群の疾患関連たんぱく質およびその使用

出願日：平成 18 年 6 月 21 日

出願番号：特願 2006-171584

1) ネフローゼ症候群の疾患関連たんぱく質およびその使用

出願日：平成 18 年 9 月 8 日

出願番号：特願 2006-244433

2. 実用新案登録：

なし。

3. その他

K. 参考文献：

- 1) 金子 勲：疾患関連たんぱく質解析研究 平成 16 年度 総括・分担研究報告書(長尾 拓編) p254-286.
- 2) 金子 勲：疾患関連たんぱく質解析研究 平成 17 年度 総括・分担研究報告書(山西弘一編) p.104-144.
- 3) Kondo, T., Seike M. et al. Proteomics. **3**, 1758-1766 (2003)
- 4) Kirk, C. et al. Molecular & Cellular Proteomics. **2**, 299-314(2003)
- 5) Bing, C et al: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **101**, 2500-2505 (2004)
- 6) Irmak, S et al: Proteomics. **5**, 4296-4304 (2005)
- 7) Ikeda, K. et al J. Biol. Chem. **262**, 7451-7454 (1987)
- 8) Matsushita, M. and Fujita. T. J. Exp. Med. **176**, 1497-1502 (1992)
- 9) Cho A-R, Uchio-Yamada K et al Mammalian Genome, **17**, 407-416 (2006)
- 10) Falk R.J., et al : Primary glomerular disease. In; Brenner and Rector's The Kidney(ed by Brenner B.M.) p1293-1380, Sannders, Philadelphia, 2004
- 11) Boulton-Jones J.M. et al. Clinical Nephrol, **20**, 72-76 (1983)
- 12) Winston, W. et al. Kidney International, **68**, 603-610 (2005).
- 13) Koop K, et al: J. Am. Soc. Nephrol, **14**, 2063-2071(2003)
- 14) Fex. G. and Hasson, B.: Eur. J. Biochem. **94**, 307-313 (1979)
- 15) Malyszko J, et al: Blood Coagul Fibrinolysis **13**, 615-621 (2002)
- 16) Donadio C, et al: J. Phar. Biome. Anal. **32**, 1099-1104 (2003)
- 17) Janeway, C.A. et al (2001) in Immunobiology, 5th edition, p.44. GARLAND
- 18) Matunobu T., Ishiwata T. et al: Int. J. Onco, **2**, 307-314 (2006)