

200709001A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

疾患関連たんぱく質解析研究

平成 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山西 弘一

平成 20(2008)年 4 月

目 次

I. 総括研究報告書

疾患関連たんぱく質解析研究

山西 弘	1
------	---

II. 分担研究者報告書

1. 高血圧、心循環器系疾患に関する微量たんぱく質解析技術の確立 友池 仁暢	91
2. 疾患関連たんぱく質解析研究の一環としてのエネルギー代謝調節に関与する 生理活性ペプチドの探索 寒川 賢治	96
3. 高血圧、心循環器系疾患に関する微量たんぱく質解析技術の確立 南野 直人	100
4. 痴呆等の精神・神経疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立 高坂 新一	105
5. 糖尿病等代謝性疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立 鍋木 康志	110
6. 小児免疫・アレルギー疾患関連因子の探索ならびに 微量たんぱく質解析技術の確立 田上 昭人	117
7. 加齢関連疾患に関連するたんぱく質解析技術の確立 太田 壽城	120
8. 疾患関連たんぱく質解析技術の確立 佐古田 三郎	125
9. 疾患関連たんぱく質解析のための質量分析法の確立 高尾 敏文	127
10. 大腸癌のN型糖鎖及び酸性糖脂質の構造解析 今岡 真義	131
11. 同位体標識法(cICAT法)による各種疾患関連患者試料(血液・組織)の たんぱく質発現解析研究 金子 勲	134

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	185
---------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	190
-----------------	-----

疾患関連たんぱく質解析研究

主任研究者 山西弘一 独立行政法人医薬基盤研究所 所長

研究要旨

本研究は、我が国における五大疾患(がん、糖尿病、高血圧、認知症、免疫疾患【自己免疫疾患、アレルギー・炎症】)について、健常人と患者との間のたんぱく質発現の変動を質的・量的に評価することで、発現変動しているたんぱく質(疾患関連たんぱく質)を探索し、この中から医薬品シーズ・創薬ターゲット・疾患マーカーとなる『疾患の発症や悪化、治療に関わるたんぱく質』を同定すること、またそのための基盤技術を開発することを目指している。また同時に、『疾患の発症や悪化、治療に関わるたんぱく質』を有効活用し、画期的創薬、医療技術開発に資する研究基盤を開発しようとするものである。本年度は、これまでに引き続き、国立医療機関などから提供された各種ヒト疾患サンプルを用い、疾患関連たんぱく質の探索・同定、データベースの構築等を実施することを通じて疾患と関連性のある因子について病態との関連性を評価するとともに、疾患関連たんぱく質の有効活用技術の確立等について更なる検討を行った。また、バイオインフォマティクスによる疾患関連たんぱく質解析結果および研究協力機関から提供された個人情報の体系的な蓄積と特異的なたんぱく質の相互性を示す統合データベースの構築等を行い、以下の知見・情報を得た。

- ① 血清糖たんぱく質の糖鎖解析法を確立するとともに、抗体ライブラリ技術を利用することで2D-DIGE解析で見出される微量の疾患関連たんぱく質に対するモノクローナル抗体を迅速かつ網羅的に創製できる基盤技術を新たに確立した。(山西)
- ② 高血圧症、心臓病や脳血管疾患などの循環器系疾患に関連するたんぱく質を見出し新たな医薬品開発のシーズとするため、当センターでは10種の研究課題を作成し、第一段階の血液試料全てについてプロテオームファクトリー施設へ提供した。プロテオーム解析が終了した5課題については臨床情報との比較・解析に着手し、一部では方法論の妥当性が検証されただけでなく、可能性を示唆する結果も得られた。心不全を対象とする課題においては、第二段階の試料も採取、送付した。(友池)
- ③ 近年、心筋梗塞などの循環器疾患の発症リスクとしてのメタボリックシンドロームが注目されており、その発症基盤としての肥満及び脂肪細胞の機能解明が重要な課題となっている。従来、脂肪細胞は単なるエネルギー貯蔵臓器と見なされてきたが、最近では、様々な生理活性物質(アディポサイトカイン)を分泌する内分泌臓器として生体のエネルギー代謝調節に関与していることが明らかにされつつある。一方、脂肪細胞の機能制御に関わる生理活性ペプチドが存在すると考えられるが、これまでほとんど同定されていなかった。本研究では、これまでにグレリンの新たな分子型や、新規生理活性ペプチド neuromedin S(NMS)を発見している。また、脂肪細胞の機能

解析に有用な培養細胞系であるマウス胎仔由来線維芽細胞(3T3-L1 細胞)を用いて neuropeptide Y(NPY), peptide YY(PYY)及び α -melanocyte-stimulating hormone(α -MSH)を同定している。今回、3T3-L1 細胞を用いた細胞内 cAMP 濃度変化を指標としたスクリーニングにより、ラット小腸組織より gastric inhibitory polypeptide(GIP)を単離・同定し、ラット脂肪組織より pituitary adenylate cyclase activating polypeptide38(PACAP38)と考えられるペプチド分画を精製した。(寒川)

- ④ 高血圧症や心循環器系疾患に関連した疾患マーカーや創薬標的の候補となるたんぱく質やペプチドを発見するためには、より微量の対象までを高感度かつ再現的に分離、検出し、構造解析できるシステムが必要である。昨年度までに2次元高速液体クロマトによる分離と質量分析計による検出、構造解析の方法論を確立し、得られる情報の有効性について検討を行った。本年度は、最新鋭の質量分析計の導入によりさらに高感度化を図ると共に、培養細胞の分泌するペプチド、たんぱく質についてこれらの方法論を適用して解析を行い、同定されたペプチド群より生体内に内在し機能する新たな生理活性ペプチドを見出した。(南野)
- ⑤ 本研究では神経変性疾患(パーキンソン病、若年性痴呆症など)の治療成績向上を行いましたその発症機序の解明や診断技術の高度化を図るため、血液、尿サンプル中の蛋白質のプロテオーム解析を実行し、当該疾患に特異的な、あるいは特徴ある蛋白質群を同定し、その臨床的利用を行うことを目標とする。国立精神・神経センター武蔵病院から提供したパーキンソン病患者血液試料の第一次解析結果を踏まえ、髄液試料を用いた絞り込みの有用性を確認し髄液使用についてのIRBの承認を得た上で、髄液を用いて予備的な検討をおこなったところ、髄液特異的なタンパク質が100個近く同定され、髄液の研究対象としての有用性が確認できた。また、神経変性疾患研究の困難さを克服するため、細胞傷害時に神経細胞死を誘導する分子、UCH-L3、についてその阻害剤を in silico drug screening により3種同定した。(高坂)
- ⑥ 本施設の内分泌代謝科の協力により、糖尿病患者血清を124例、健常者血清を42例から収集し、創薬プロテオームファクトリー施設にてcICAT法で定量解析した。合併症のない糖尿病患者では、健常者と比較して28個の蛋白が有意に変動していたが、1.5倍以上の変動をしていたのは von Willebrand factor のみであった。糖尿病性合併症を有する患者血清では、各合併症で異なる血清蛋白プロファイルが見られたが、いずれの蛋白も変動の幅が小さく、単独のマーカー候補になりうる蛋白は認められなかった。糖尿病患者尿蛋白の解析結果では、微量アルブミン尿を有する糖尿病患者尿にて健常者尿と比較して有意に増加する24個の蛋白、減少する10個の蛋白を同定した。(鍋木)
- ⑦ 小児の免疫・アレルギー疾患の中でネフローゼ症候群について疾患特異的な指標となる体液性因子について解析を行った。その結果 Zinc-alpha2-glycoprotein(ZAG)が血中脂質と相関してネフローゼ症候群の患者で病態と共に変動していることが明らかとなった。(田上)
- ⑧ 本年度は、引き続き認知症および骨粗鬆症患者の血清検体をプロテオームファクトリーへの提供体制を継続した。また、前年度の脳脊髄液中のタンパク質の解析に引き続き、これまでに確立した微量タンパク質の解析システムを用い、家族性脳血管性認知症である Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy(CADASIL)患者脳のプロテオーム解析を行い、CADASIL 脳の微小血管中の主なタンパク質の同定をした。CADASILの微小血管は、対照脳の微小血管と比較して、数種の heat shock proteins(HSPs)が増加していることが明らかとなった。また、マウスに対する新規の慢性脳低灌流システムとして、右総頸動

脈永久閉塞システムを確立し、本システムを施すことにより、認知機能の低下および大脳白質病変を示す血管性認知症マウスモデルを開発した。一方、骨代謝の制御を担当している骨芽細胞における、緑茶などに含まれる主要なフラボノイドであるカテキン(EGCG:(-)-epigallocatechin gallate)の作用について検討し、stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK)のリン酸化・活性化の増強を介して、プロスタグランジン F_{2α} (PGF_{2α})による血管内皮細胞増殖因子(VEGF)産生を促進すること、p44/p42 mitogen-activated protein kinase(MAPK)のリン酸化・活性化の抑制を介して、エンドセリン-1(ET-1)によるインターロイキン-6(IL-6)産生を減弱することを明らかとした。これらの知見は、骨粗鬆症の予防・治療の観点から、臨床検体における疾患関連たんぱく質解析を進める上で重要であると考えられる。(太田)

- ⑨ 乳癌、消化器癌、閉塞性肺疾患、運動ニューロン病に関連する診断マーカー／治療評価マーカーなどを見出すこと、治療方法の開発へとつながる病態解析をするために、患者から採取した組織あるいは血清を用いて、質量分析器を用いたプロテオーム解析を施行した。(佐古田)
- ⑩ 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、データを確度よく解析するためのソフトウェアの試作を行った。本年度は、前年度に肺癌患者尿より見出した疾患マーカー候補ペプチドの検証、蛋白質画分のプロテオーム比較解析、並びに、糖蛋白質糖鎖のプロファイリング法について CA19-9 抗原を例に検討した。(高尾)
- ⑪ 癌性変化した糖鎖の一部が、癌の転移や浸潤に深く関与すると考えられている。そこで、実際のヒト癌サンプルを用いて、糖鎖の癌性変化を詳細に解析し、そのメカニズムを明らかにすることを目的とした。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。大腸癌 14 症例の癌細胞、大腸正常粘膜上皮細胞から糖脂質を抽出し、それらの構造解析および比較検討を行った。解析方法は、糖脂質の糖鎖部分を 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、質量分析法、酵素消化法を組み合わせ、糖鎖構造を想定した。その結果、大腸正常粘膜上皮細胞には fucose が付加された中性糖が主な構成成分であった。一方、大腸癌細胞では fucose が付加された中性糖以外に fucose が付加されない中性糖鎖も多く存在し、さらに、正常粘膜上皮細胞では極めて発現の低かった sialic acid が付加された酸性糖が中等度発現していた。以上の結果から、大腸癌の糖鎖の癌性変化のメカニズムとして糖鎖合成不全が強く示唆された。(今岡)
- ⑫ 各研究協力機関から提供された、日本人健常者及び糖尿病、がん、認知症、腎疾患及び免疫・アレルギー疾患等 23 疾患の全ての血清(624 検体)について、cICAT 法による高発現血清たんぱく質(上位約 140 種類、累計約 350 種類)の同定と比較定量解析を完了させ、その解析結果及び臨床情報をデータベースに格納した。また、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を作成した。Laser -Micro-Dissection により分取した各種がん患者組織試料(がん・正常組織等、34 検体)を cICAT 法により解析し、患者毎に 600-1000 種類のたんぱく質の同定と比較定量(がん／正常)を行った。その結果、スキルス胃がんの特徴的な十数種類のたんぱく質を見出した(特許出願 2 件)。高分解能計測機能をもつ高速度 SELDI-QqTOF-MS 法を導入して、糖尿病患者(合併症

有無) 血清(124 検体)及び健常人血清(40 検体)を解析し、合併症で観察される複数のピークを見出し、その一つを同定した。脳脊髄液たんぱく質の cICAT 法による解析法を検討した結果、100 μ g protein を用いて約 310 種類のたんぱく質の同定と比較定量が可能であった。その中には、脳組織由来と考えられる受容体等のたんぱく質が多数含まれていた。低発現血清たんぱく質に関しては、病変組織部位より漏出する低発現血清たんぱく質の解析法を構築した(特許出願予定 1 件)。cICAT 法と iTRAQ 法により同定された血清たんぱく質の詳細な比較解析を行った。iTRAQ Confidence 99%での同定たんぱく質(94 種類)のうち、cICAT 同定たんぱく質(116 種類)と共通のものは 65 種類、cICAT 法でのみ検出されるたんぱく質は 51 種類であった。Confidence 95%に落とすと、iTRAQ 同定たんぱく質数は 242 に増加した。両方法を相補的に使用することが望ましい。FGF-receptor 2 たんぱく質を強発現していた培養スキルス胃癌細胞株の細胞増殖を FGF-receptor 2 siRNA は選択的に強く阻害することを見出した(特許出願)。

分担研究者

友池仁暢	国立循環器病センター 病院長	田上昭人	国立成育医療センター研究所 薬剤治療研究部 部長
寒川賢治	国立循環器病センター研究所 所長	太田壽城	国立成育医療センター研究所 病院長
南野直人	国立循環器病センター研究所 薬理部 部長	佐古田三郎	大阪大学大学院医学研究科 教授
高坂新一	国立精神・神経センター神経研究所 所長	高尾敏文	大阪大学蛋白質研究所 教授
鏑木康志	国立国際医療センター研究所 代謝疾患研究部病態代謝研究室 室長	今岡真義	大阪府立成人病センター 総長
		金子 勲	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

A. 研究目的

ポストゲノム時代の最重要課題の1つは、健康状態と比較して、疾患状態で時空間的、質的、量的に変動するたんぱく質(疾患関連たんぱく質)を探索すること、これらの機能を解析して疾患の発症や悪化、治癒などに関わるたんぱく質を絞り込むこと、そして絞り込んだたんぱく質自体を医薬品シーズとして有効活用するか、あるいはその活性を制御する分子を選択、最適化することによって新規医薬品の開発などを達成することにある。即ち、疾患の発症や悪化の鍵たんぱく質(創薬ター

ゲット)や疾患の治癒に役立つ医薬品シーズたんぱく質を、効率よく探索・同定し、我が国独自の知的財産を確保したうえで、画期的創薬に展開していくことが科学技術立国としての重要課題となっている。しかし現状では、効率のかつ効果的に疾患プロテオミクスを推進できる研究基盤や、これにより得られた情報を医薬品開発などへ有効活用していくための基盤技術が十分に整備されていない。

以上の観点から本研究では、疾患関連たんぱく質解析研究を総合的に推進していくため、疾患組

織・細胞などの臨床検体から、疾患関連たんぱく質の探索・同定と、その中から医薬品シーズ・創薬ターゲットとなり得るたんぱく質の絞り込みを効果的かつ効率的に行うための研究基盤に加え、医薬品シーズ・創薬ターゲットとなり得るたんぱく質の有効活用法に関する研究を行い、疾患の予防・治療・診断方法の確立や画期的医薬品の開発に資することを旨とし、以下の研究を行った。

B. 研究方法

B-1 疾患関連糖たんぱく質糖鎖解析

糖たんぱく質から酵素的に糖鎖を遊離させ、もしくはトリプシン等で分解して糖ペプチドを調製し、LC/MSⁿを行った。

B-2 微量疾患関連たんぱく質に対する抗体作製

1) 2D-DIGE

乳腺細胞株 184A1 と乳癌細胞株 SKBR3 をモデルとして使用し、各細胞を溶解処理後、各 50 μ g のたんぱく質をそれぞれ 400 pmol のラベル化試薬 cy2、cy3、cy5 で標識し混合した。また、たんぱく質を回収するための pick ゲル用に、標識しないサンプルも同様に混合調製した。IPG-gel (pH 5-6) スリップ と ETTAN IPGPhor を用いて、上記サンプルの等電点電気泳動を行い、泳動終了後、IPG-gel を平衡化し、Ettan Daltsix Electrophoresis System と、acrylamide と diallyltartardiamide (DATD) を混合して調製したゲルを用いて、2次元目の電気泳動を行った。pick 用ゲルは Deep purple を用いて一晩染色し、脱色液により脱色を行った。解析には、Typhoon scanner、Ettan DIGE を使用し、spot pick には Ettan Spot Picker を使用した。回収した spot ゲルに 88mM NaIO₄ を用いてゲルを溶解し、たんぱく質を抽出した。このたんぱく質を抗原として以下のパンニング操作を行った。

2) ファージ抗体ライブラリの作製

前年度までに構築したマウス由来非免疫ファ-

ージ抗体ライブラリを用いた。

3) ファージ抗体ライブラリを用いた dot blot パンニング

2D-DIGE から回収されたスポットゲル由来のたんぱく質の 1/10 量をドットプロット装置 (Bio-Dot Microfiltration Apparatus) を用い、ニトロセルロース膜上に固相化した。前年度確立した dot blot パンニング法にパンニングを行った後、output ファージ溶液に 2% Glucose 含有 2YT 培地を加え、その一部を Petrifilm に播種し、37°C で一晩培養し、得られた形質転換コロニー数を計測した。残りのファージを大腸菌 TGI 株に感染させ、増殖させた後、ファージを産出し、パンニング操作を 4 回繰り返した。

4) Dot Blot を用いたスクリーニング

2D-DIGE spot から抽出したたんぱく質を Bio-Dot Microfiltration Apparatus を用い、1ng/well になるようにニトロセルロース膜上に固相化した。Blocking buffer (10% skim milk & 25% glycerol) を添加して、室温で 2 時間静置した後、TBS で 1 回洗浄後、大腸菌を用いてモノクローン化したファージ抗体および blocking buffer を添加し、室温で 2 時間静置した。0.1% TBST で 10 回洗浄後、HRP/anti-M13 monoclonal antibody を添加し、室温で 1 時間静置した。TBST で 3 回洗浄後、ECL plus を用いて発色させ、LAS3000 イメージャーを用いて発色度合いを定量的解析した。

5) MS によるたんぱく質の同定

Spot picker によって回収したゲル断片を洗浄後、trypsin 消化を行った。その後、50% アセトニトリルと 5% TFA を用いて、消化されたたんぱく質由来ペプチドを回収した。このペプチド溶液を Speed vac で濃縮し、質量分析計 (AutoFlexII MS/MS) を用いて、たんぱく質を同定した。

6) ファージ ELISA

各種抗原たんぱく質 (TRAIL-R2, KDR, TNFR1, caspase-8, importin- α) を 1 μ g/ml に希釈し、常温で 96 穴プレート上に 8 時間固相化後、4%

BSA でブロッキングした。PBS で 1 回洗浄後、サンプルを添加し、室温で 2 時間培養した。PBST で 3 回洗浄後、HRP/anti-M13 monoclonal antibody を添加し、室温で 1 時間静置した。その後、PBST で 3 回洗浄し、基質溶液を加え発色を行い、吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

7) ファージ免疫染色

乳腺、および乳癌細胞株を 24well プレートに播種後、氷冷メタノールを用いて細胞の固定化を行った。PBS で洗浄後、Biotin Blocking System と 5% BSA を用いてブロッキングした。ブロッキング後、PBS で洗浄し、 1×10^{12} CFU に調製したファージを添加し、常温で 2h インキュベーションした。PBST で 3 回洗浄後、HRP/anti-M13 monoclonal antibody を添加し、1h 静置した。さらに PBST で 3 回洗浄後、Streptavidin/AP を加え、1h インキュベーションした。最後に PBST で 3 回洗浄後、Liquid Permanent Red により発色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。

(倫理面への配慮)

特になし

B-3 高血圧、心循環器系疾患に関連する微量

たんぱく質解析技術の確立

当センターで実施した循環器疾患関連たんぱく質解析研究の全体計画については、16 年度に倫理委員会の承認を得ていた。その指示に従い、創薬プロテオームファクトリー施設と MTA を締結し、これに基づいて試料や情報の授受を行った。18 年度末までに 10 課題が倫理委員会で承認され研究に着手したが、これらの試料収集を完了させた。

具体的には、各課題の内容は二段階の実施形式としており、第一段階として各疾患においてたんぱく質変動が予測される時期に同一患者より複数回の採血を行った。各課題の総検体数の 1/2~1/3 を第一段階の研究に当てた。創薬プロテオームファクトリー施設からたんぱく質解析結果が通知されると、臨床パラメータも含めた比較・解析を行

い、先ず既存の臨床生化学検査などにおけるたんぱく質や酵素活性などの結果との比較を行い、解析データの妥当性を検討した。次に、各課題内での症例の絞り込み、試料採取時期の再検討などを行い、本研究目的に従った結果が得られるように症例や試料採取時期を至適化すべく検討を行う。至適化した症例、時期に基づき第二段階の試料収集を行い、さらに詳細な臨床データとの比較・解析を実施した。これらの解析結果、臨床情報を総合し、創薬プロテオームファクトリー施設と共同して、各種の循環器疾患に関連するたんぱく質の発見、さらにバイオマーカーとしての有用性、たんぱく質の機能解析や病態生理的意義の解明へと展開する研究を行った。

血清と血漿でたんぱく質、ペプチドの分子型の大きな変化が予測されたため、17 年度後半より血清試料以外に血漿試料についても採取、保管、送付した。採血などの試料採取、処理、保管法でもマニュアルの精密化、均一化を進め、血漿についてはプロテアーゼインヒビターの添加、融解・再凍結の禁止などでプロテアーゼ類の活性化を抑制した。しかし、創薬プロテオームファクトリー施設では本研究期間中に血漿の解析を実施しないことが決定されたため、当センター内部で 2 次元電気泳動法をはじめとした異なるプロテオーム解析手法を用いて分析を開始した。17 年度承認を受けた心臓組織のプロテオーム解析研究についても、マニュアル化した試料収集、抽出用組織の前処理・保存、保管を実施し、上記と同様に、当センター内での解析に着手した。また、昨年度までに作成、改善した個人情報保護法、臨床研究指針などに基づく手順、実験処理マニュアルなどに従い、事故等がなく研究計画を実施できる体制を完成させた。

B-4 疾患関連たんぱく質解析研究の一環としてのエネルギー代謝調節に関与する生理活性ペプチドの探索

1) マウス胎仔由来線維芽細胞(3T3-L1 細胞)の培養、分化誘導とアッセイ:

3T3-L1 細胞を 96 穴プレートで培養し、confluent の 2 日後を 0 日 (day0) とした。また、3T3-L1 細胞の分化誘導は、day0 にデキサメタゾン、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、インスリンを含む培地で培養を行い、day2 にインスリンのみを含む培地に交換し、day4 以降は 2 日おきに 10% 牛胎仔血清を含む培地で培地交換を行った。各分化段階の 3T3-L1 細胞 (day0, day4, day8) に、ラット小腸及び脂肪組織から抽出したペプチドサンプルを添加し、細胞内 cAMP 濃度変化を指標としてアルファスクリーン法を用いて測定した。

2) 抽出および精製:

ラット小腸及び脂肪組織を既報のとおり、100℃で 5 分間熱処理後、1N 酢酸にてペプチドを抽出した。アセトン沈殿、Sep-Pak C18 カートリッジによる処理の後、陽イオン交換クロマト (SP-Sephadex) にて得られた強塩基性画分のゲル濾過を行った。さらに活性画分は、CM-イオン交換 HPLC、逆相 HPLC により分離、精製した。

3) 構造解析:

精製したペプチドの構造は、プロテインシーケンサーおよびマススペクトロメーター (Voyager-DE PRO) を用いた MALDI TOF/MS により解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては当施設のカイドラインに従い、その愛護に留意し投与実験や屠殺の際に苦痛を最小限にとどめるように十分に配慮した。

B-5 高血圧、心循環器系疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立

これまでに作成してきた分離方法に最新鋭の Maldi-Tof-Tof 型の ABI 社 4800、Esi-iontrap 型に電場型 FT 検出装置を装備した Thermoelectron 社 Orbitrap 質量分析計を組み合わせ、実際にプロテオーム解析、ペプチドーム解析を行い、感度や

構造決定精度などの検討を行った。

作成してきたペプチドーム解析の分離、解析システムを使用して、従来の組織や血液よりも内在するペプチド画分の実態を捉えやすいと期待される培養細胞のペプチド画分について調製法を確立し、分離、解析を実施してその実態を探った。併せてたんぱく質画分のトリプシン消化物についても解析を行い、その性状を検討した。

血液のペプチド解析については、昨年度に引き続き血漿ペプチドについて凝固、補体系に注意し、プロテアーゼインヒターカクテルの添加などの効果、処理法も含め検討し、生体中の血液にできるだけ近い状態でのペプチド解析を行った。

創薬プロテオームファクトリー施設においては、本研究期間内には血漿試料を分析しないことが確定したため、その返却を受けた。その上で、当センターにはショットガン法にて定量比較を実施できるシステムがないため、患者試料については抗体カラムで主要血液たんぱく質を除去後、2 次元ゲル電気泳動法を用いて、比較、解析を実施した。(倫理面への配慮)

血液試料は当センターの倫理委員会で承認を受けて本研究のために採取したものであり、研究協力者に十分な説明を行い、同意を得て採取した。

B-6 痴呆等の精神・神経疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立

1) 神経変性疾患 (パーキンソン病等) の研究試料の確保

新規試料については、パーキンソン病及びパーキンソン症候群 (多系統萎縮症など) 患者のリンパ芽球、血漿、尿、髄液等を研究に利用するための説明資料、説明文書、同意文書を作成し、国立精神・神経センター倫理委員会にて承認された。さらに、連結可能匿名化されているパーキンソン病およびパーキンソン症候群患者髄液が 40 例程度収集できており、その使用を倫理委員会での承認を受け、プロテオーム・ファクトリーへの髄液検

体送付が可能となった。その上で、10人10mlずつ髄液をプロテオーム・ファクトリーに送付し、予備的検討を行った。

2) モデル動物の解析、創薬標的分子開発に関する研究

前年度において脱ユビキチン化酵素 UCH-L3 は細胞傷害時の変性機転に深く関与することを示し、UCH-L3 が神経変性を克服する上での新たな治療標的になる可能性を提示した。今年度は *in silico* drug screening を UCH-L3 に対して試みることにした。

(倫理面への配慮)

今回の研究に用いるヒト由来試料はすべて当センター倫理委員会において承認を得た方法でインフォームドコンセントを取得したものを使用した。動物を使用する研究計画はすべて国立精神・神経センター神経研究所動物実験倫理問題検討委員会や分担研究者の所属する施設の倫理問題検討委員会で審議され承認を受けた。実際の動物使用に当たっては国の法律・指針並びに米国 NIH の基準を守り動物が受ける苦痛を最小限に留めた。

B-7 糖尿病等代謝性疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立に関する研究

1) 糖尿病患者血清での cICAT 法による解析

糖尿病関連たんぱく質のデータベース構築のために、糖尿病患者の血清を採取した。血清には臨床情報を添えて創薬プロテオームファクトリー施設に発送し、同施設の LC-MS/MS を用いて cICAT 法にて糖尿病に関連したたんぱく質の同定、定量を行った。結果について糖尿病の病態とたんぱく質プロファイルとの関係性についてデータベース化した。

2) 糖尿病患者尿での 2D-DIGE 法による解析

プロテオームファクトリー施設での糖尿病関連血清たんぱく質データベースの構築とは別に、本施設での独自のプロジェクトとして早期糖尿病性腎症の診断マーカーを検索するために、本施設に

て健常者尿、腎症非合併糖尿病患者尿、早期腎症合併糖尿病患者尿を収集し、前処理後に蛍光ダイファレンシャル二次元電気泳動 (2DE-DIGE) を用いて尿たんぱく質プロファイルを解析し、糖尿病・早期腎症に固有な新規診断マーカー及び糖尿病性腎症治療の分子標的を検索した。

本施設にて収集可能な糖尿病以外の疾患由来サンプルについても創薬プロテオームファクトリーにて解析した。その一環として、呼吸器疾患(慢性閉塞性肺疾患)の患者血清を用いて治療の分子標的、診断マーカーを検索した。

3) 血管内皮細胞における DHEA の抗アポトーシス作用

DHEA (dehydroepiandrosterone) は副腎アンドロゲンの一つであり、ガンや糖尿病、肥満、動脈硬化などの様々な疾患との関連性が報告されているが、その詳細な作用機序は不明な点が多い。我々は DHEA の作用の一つ考えられている抗動脈硬化作用に着目し、その分子メカニズムの解明を行った。具体的には、ウシ血管内皮細胞 (BAEC) を用いて培地中に DHEA を添加し、2 時間のプレインキュベーションを行った後、過酸化水素を添加し、MTT 法と TUNEL 法にて細胞死とアポトーシスを検出した。次に Western blot 法にてアポトーシス関連分子のたんぱく質発現量を調べた。さらに 2D-DIGE 法を用いて、DHEA により発現変動するたんぱく質の探索を行った。

4) 分化マクロファージにて発現するたんぱく質の解析

感染防御に関与する組織マクロファージへの細胞内分化決定因子をプロテオーム解析にて同定することを目的として、ヒト末梢血単核球から CD14 陽性細胞を抗体ビーズ・マグネット法にて分離し、*in vitro* で GM-CSF または M-CSF 存在下に培養することで、成熟型マクロファージ、GM 型マクロファージと M 型マクロファージに各々分化させた。末梢血から分離された直後の単球、培養開始から 7 日間 (168 時間) 経過した分化型マクロファージ

ならびに BCG(Tokyo172 株)を感染させた GM 型と M 型のマクロファージに関して網羅的たんぱく質解析を行った。

① 末梢血から分離直後の培養されていない単球
② 培養開始から 7 日間経過後の GM 型マクロファージ

③ 培養開始から 7 日間経過後の M 型マクロファージ
④ ①②③の単球ならびにマクロファージからそれぞれたんぱく質を抽出した。

⑤ さらに 7 日間の培養後 GM 型、M 型それぞれのマクロファージに BCG を感染させ、感染後 48 時間経過時点におけるマクロファージからのたんぱく質を抽出した。

⑥ 4 条件、5 種類の細胞から得た抽出たんぱく質を酵素処理後、二次元電気泳動 (2DE)、nano-HPLC ESI MS/MS 質量分析計にてたんぱく質同定を試みた。

⑦ ⑥と同一のサンプルを用いて、⑥で同定された分子が既知のたんぱく質である場合にその分子に対する抗体を用いたウエスタンブロットを行った。

②③と同様のサンプル調整を行い、BCG を感染させ、感染後 1 日(24 時間)から 5 日(120 時間)まで 24 時間毎にマクロファージを壊して、BCG 生菌数を数える CFU アッセイを行った。

5) 結核バイオマーカーの探索

結核バイオマーカー探索のためのサンプルとして自己末梢血と結核患者、喘息患者、健常者からの末梢血を採取した。血液に結核菌特異的ペプチド抗原 (ESAT-6、CFP-10、TB7.7)ならびに PHA を加えたものと、未刺激のサンプルから血漿を分離後凍結保存した。各血漿についてアルブミンを含む主要 14 たんぱく質を除去した後、2D-DIGE 法と LC-MS/MS によりたんぱく質解析を行った。

B-8 小児腎疾患関連因子の探索ならびに解析

原疾患を有する患者から発症時(急性期)、寛解期および正常人の血清のたんぱく質の種類、質、

量の相違について質量分析装置およびバイオインフォマティクス技術を用いて解析した。さらに、同定された因子について疾患との関連性について生物学的・医学的関連性を解析するために動物や細胞を用いた検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究においては、国立成育医療センター倫理委員会に倫理申請を行い、承認を得た(平成 16 年 8 月 17 日、倫理申請受付番号 94、追加申請;平成 18 年 12 月 27 日、倫理申請受付番号 94)。本倫理規定に従い、検体の採取・解析等を行った。

B-9 加齢関連疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立

昨年度と同様の手順により、認知症および骨粗鬆症の診療を担当する診療科医師からの試料および診療情報の受領・一時保管およびプロテオームファクトリーへの試料提供体制をしいた。

CADASIL 患者剖検脳および対照剖検脳はそれぞれプロテアーゼ阻害剤を含む PBS 中でホモジナイズし、ガラスビーズを用いたカラムで微小血管を分離した。血管は RIPA buffer、Urea/Thiourea、ギ酸等で可溶化し、各画分のたんぱく質はトリプシンで消化を行い、nanoLC/MS/MS によってショットガン分析を行い、微小血管中のたんぱく質を網羅的に解析した。

また、血管性認知症モデルマウスを作成するため、まず慢性脳低灌流システムの構築を行った。C57BL6/J(♂、12 週齢)マウスを吸入麻醉下で頸部を正中切開し、6 号絹糸を用いて右総頸動脈を 2 カ所結紮し、脳血流の変化をレーザードップラー法により測定した。さらに、本システムを施して 1 ヶ月後のマウスについて、認知機能(空間・非空間作業記憶)および大脳白質病変(脱髄・軸索損傷)を検討した。

新生仔マウス頭蓋冠より分離株化された骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞およびコラゲナーゼ消化法により調製した初代培養系骨芽細胞を 10%FCS を含む α

-MEM 培地にてコンフルエントに達するまで培養した。その後培地を 0.3%FCS を含む α -MEM として 48 時間後、実験に供した。細胞を EGCG あるいは各種阻害剤にて前処置した後、PGF_{2 α} 、ET-1 あるいは TPA にて刺激し、培地中の VEGF 濃度あるいは IL-6 濃度を ELISA にて解析した。細胞質分画中の p44/p42 MAPK、p38 MAPK、SAPK/JNK、c-Jun、MEK1/2、Raf-1 のリン酸化について Western blot 法を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

本研究においては、当センターにおける臨床試料の解析あるいはプロテオームファクトリーへの臨床試料の提供については、既に当院倫理委員会およびプロテオームファクトリー倫理委員会の承認を得て実施した。

B-10 疾患関連たんぱく質解析に関する研究

質量分析器を用いたプロテオーム解析を施行し、臨床データと比較検討した。

(倫理面への配慮)

大阪大学医学部附属病院臨床研究倫理審査委員会に申請し、承認を得るとともに、本倫理規定に従って、検体の採取・解析等を実施した。

B-11 疾患関連蛋白質解析のための質量分析法の確立

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、単離したたんぱく質・ペプチドの測定を行ない、ペプチド・たんぱく質の網羅的同定、並びに、糖たんぱく質糖鎖の構造解析を行った。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” (Fernandez-de-Cossio J. *et al.*, 1998 年) を、データベース検索によるたんぱく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、同定確度の向上を目的に 17 年度試作したソフトウェア “FragPattern” (Satomi Y. *et al.*, 2006 年) により検証し、その

後に、データベースの構築を行った。

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 μ m の逆相担体カラムを用いて行った。また、尿たんぱく質は、予め限外ろ過膜により単離しておいたたんぱく質画分 (10 k Da \sim) を酵素消化し、上記イオン交換クロマトグラフィ (82 分画) で分画後、各々の画分に対して nanoLC /ESI-MS/MS を行い、たんぱく質同定を行った。糖鎖 (CA19-9) は、上記たんぱく質酵素消化物に対して市販のモノクローナル抗体を用いて濃縮後、nanoLC /ESI-MS/MS により糖鎖構造とたんぱく質同定を行った。尿からのマーカー候補ペプチドの同定は逆相担体カラムにより簡易精製後、MALDI-MS/MS により同定と定量を行った。定量は、安定同位体 ¹⁸O 標識化ペプチド (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 (ペプチド / 標識ペプチド) をもとに行った。ピーク強度比の算出は、16 年度に開発したソフトウェア “Isotopica” (Fernandez-de-Cossio J. *et al.*) を用いて同位体比を求めることにより行った。

(倫理面への配慮)

特になし。

B-12 大腸癌の糖脂質の構造解析

大腸癌患者 14 名の大腸癌組織及び大腸正常粘膜組織からレーザーマイクロダイセクション法などで、大腸癌細胞や大腸正常粘膜上皮細胞を抽出した。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、ホイル付きのスライドガラスに貼り付けた。切片をアセトンで固定し、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。

それらの細胞から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で、中性脂質と酸性脂質を分離した。両脂質を

Endoglycoceramidase II (TAKARA) で処理することにより糖脂質の糖鎖部分を切り出した。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、質量分析法と酵素消化法を組み合わせ、糖鎖構造を同定した。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。酵素消化には、 β 1-4 galactosidase、 α 2-3 sialyase、 β -N-acetyl hexosaminidase、endo- β -galactosidase、 α 1-3/4 fucosidase などを用いた。

(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た。今回使用した癌組織、正常組織は、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のサンプルであった。

B-13 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

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)を得た。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 20~50 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った [Uniglobe Research Corporation(CA, USA)より購入]。また、これとは別に、健常外国人の個々の血清を調べるため、さ

らに、男女 5 名ずつ(年齢 21~46 歳)の血清を Uniglobe Research Coporation より購入した。日本人の健常人血清としては、1) 日本赤十字センターより提供して頂いた年齢 18-60 歳の男女それぞれ 15 名(合計 30 名)の血清、及び 2) 国際医療センターより提供された年齢 23-61 歳(男性 22 名、女性 20 名、合計 42 名)のボランティア健常人(糖尿病非罹患患者)の血清を使用した。

2) 血清主要たんぱく質の除去:

常法により、アジレント抗体カラム (Hu6 : Multiple Affinity Removal Column、10 x 100mm) を使用し、Albumin、IgG、 α 1-Antitrypsin、IgA、Transferrin、Haptoglobin を血清より除去した。すなわち、200 μ l のヒト血清を 15,000 rpm で遠心後、Agilent binding buffer A (Buffer A) で 5 倍希釈後、0.22 μ m のフィルターでろ過し、上述の抗体カラムにアプライし、素通り画分を分取した。吸着部分は Agilent Buffer B で溶出させ、その後、カラムは Buffer A で洗浄した。素通り画分を Centriprep 遠心式フィルターユニット (YM-3, Millipore) で濃縮し、50mM Tris-HCl、0.1% SDS (pH8.5) にバッファー交換後、たんぱく質濃度を Lowry 法で測定した。なお、血清低発現たんぱく質の解析の場合は、アジレント抗体カラム (Hu14) を用い、上述の 6 種に加え、IgM、 α 2-Macroglobulin、Apo A-I、Apo A-II、C3、Transthyretin、 α 1-Acid glycoprotein、 α 2-Acid glycoprotein を除去した画分を用いた。

3) cICAT 法(血清ルーチンアッセイ):

市販の cICAT 試薬 (Applied Biosystems (AB)) の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。標準血清 (CTS02) 或いは患者血清を、アジレント抗体カラム (Hu6) で分画し、高濃度たんぱく質を除いた血清たんぱく質画分 (final 1mg/ml) を得た。本画分を、常法に従い (1)、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 L 鎖試薬を標準血清 (CTS02S) 画分 200 μ g に、また H 鎖試薬を患者血清画分 200 μ g に、37°C、2 時間反応させた。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 100mm)) にアプライし、10mM KH_2PO_4 , pH2.8, 25% CH_3CN (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 (5 個連結) にアプライし、素通り部分を洗浄後、吸着した cICAT 試薬反応ペプチドを 30% CH_3CN /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、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。本ペプチド画分を、減圧乾固した後、SCX column (2.1 x 35mm) にて、0.05% ギ酸 / 25% CH_3CN - 0.5M ギ酸アンモニウム / 5.88% ギ酸 / 25% CH_3CN 濃度勾配系で 25 分画し、C18 column (1 x 5mm) で脱塩した。得られた cICAT ペプチドは nano-LC/QSTAR XL [Applied Biosystems (AB), ESI-Q/TOF]、分析時間 90min の条件で質量測定を行い、生データをチェック後、日立統合データベースシステム (HiSpec) と RefSeq database 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 (2-4)。

4) iTRAQ 法:

ヒト標準血清 (CTS02S) をアジレント抗体カラム (Hu6) で 6 種高濃度たんぱく質を除いた血清たんぱく質画分 (200 μ g) を、常法に従い (5)、50 mM triethylammonium bicarbonate、0.1% SDS (pH8.5) で可溶化し、TCEP (final 1mM, 60°C, 60 min) で変性還元後、Cysteine Blocking 試薬でクエンチング (25°C, 10min) を行い、30 μ g のトリプシン (Promega, TPCK 処理) を加え、37°C、16 時間消化

した。得られた消化物を 4 等分に分画し (40 μ g/tube)、iTRAQ 試薬 (114 と 117) を添加 (duplicate) し、25°C で 60min 反応させた。その後、114 試薬及び 117 試薬で反応させたものの混合し、蒸発乾固後、SCX binding buffer (10mM KH_2PO_4 /25% CH_3CN , pH2.9) に溶解し、SCX column [Poly LC Sulfoethyl A column (4.6 x 100mm)] で吸着・洗浄後、SCX-binding buffer + 0.5M ギ酸アンモニウム (SCX-elution buffer) の濃度勾配法で 25 分画に溶出させた。溶出画分を C18 column で脱塩した iTRAQ ペプチドは nano-LC/QSTAR XL (AB, ESI-Q/TOF) で質量分析測定を行い、得られた MS データを ABI-ProQuant 解析ソフト及び Mascot を基本とする日立統合データベースシステム (HiSpec) と RefSeq database 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。

5) 低発現血清たんぱく質の解析法:

血清低発現たんぱく質の解析の場合は、血清中のたんぱく分解酵素による低発現血清たんぱく質の分解を防止するために、血清 (標準血清及び患者血清) に 10mM EDTA を添加し、56°C、30 分間熱処理をした。また、ルーチンの高発現血清たんぱく質で用いていたアジレント抗体カラム (Hu6) の代わりに、アジレント抗体カラム (Hu14 10 x 100mm) を使用し、以下の 14 種類のたんぱく質 (Albumin, IgG, IgA, IgM, Transferrin, Fibrinogen, α 2-Macroglobulin, α 1-antitrypsin, Haptoglobin, α 1-Acid glycoprotein, Apo A-I, Apo A-II, C3, Transthyretin) を除去した画分 (標準血清及び患者血清) を用いた。一方、対象とする疾患の病変組織由来のたんぱく質を、B. 方法の 9) に記載した方法で調製した。なお、病変組織由来のたんぱく質とは、病変組織近傍より漏出した体液も含む (脳脊髄液等)。

標準血清画分を cICAT の L 鎖試薬で、組織由来たんぱく質を H 鎖試薬でそれぞれ、常法 (B. 方法の 9) に記載) に基づき、37°C、2 時間標識した。アセトン沈殿法により過剰試薬等を除去、たんぱく

質画分を分取後、トリプシン処理、Avidin affinity column(Vision system)処理、Cleaving 処理(37℃、2 h)後、SCX column で 25 分画し、脱塩後の cICAT ペプチドを、QSTAR XL/nanoLC-system で測定し、HiSpec で解析し、同定たんぱく質と比較定量値(A:患者組織由来たんぱく質/健常人血清たんぱく質)を得た。次に、患者血清画分を L 鎖試薬で、同一の組織由来たんぱく質を H 鎖で標識し、同様に、同定たんぱく質と比較定量値(B:患者組織由来たんぱく質/患者血清たんぱく質)を得た。得られた結果を連結処理することにより、患者血清と正常血清で同定したたんぱく質の比較定量値を算出した。

連結処理：

(A:患者組織由来たんぱく質/健常人血清たんぱく質)÷(B:患者組織由来たんぱく質/患者血清たんぱく質)=患者血清たんぱく質/健常人血清たんぱく質

6) 脳脊髄液(CSF)の解析法の検討：

国立精神・神経センターより基礎検討用として提供されたパーキンソン病患者脳脊髄液(10 ml x 10 名)を使用した。各患者検体の脳脊髄液のたんぱく質濃度を Lowry 法で定量後(0.16 ~0.28 mg/ml (average:0.22 mg/ml))、各検体 5ml をプールし(50 ml)、EDTA 10 mM を添加後、限外ろ過膜(5K 以上)で濃縮した。濃縮した脳脊髄液を、上述の14種類のたんぱく質を吸着する Agilent 抗体カラム(Hu14, 10 x 100mm)で分画し、素通り画分と吸着溶出画分に分けた。素通り画分を 0.1% SDS, 50mM Tris/HCl(pH8.5)に溶解し、100 μg protein を 2 本用意し、それぞれ H 試薬、L 試薬(1:1)で 37℃、2 h 標識した。アセトン沈殿法により過剰試薬等を除去、たんぱく質画分を分取後、常法により、トリプシン処理、Avidin affinity column(Vision system)処理、Cleaving by TFA 37℃、2 h 処理後、SCX column で 25 分画し、脱塩後の cICAT ペプチドを、QSTAR

XL/nanoLC-system で測定した。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。なお、アジレント抗体カラムの吸着溶出画分も同様に解析した。

7) 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：

協力医療機関より提供された 10 μm 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(6)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。

8) 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。得られた組織粗可溶画分(Total lysate)を 20℃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℃)を加えて、攪拌し、白濁した懸濁液を-80℃で一晩放置し、アセトン沈殿を完結させた。その後 4℃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℃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 100 μg/tube、-30℃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。

9) 組織・細胞たんぱく質の cICAT 法による解析：

組織・細胞由来たんぱく質各 100 μ g/tube 2 本をそれぞれ 1 unit の H 鎖 cICAT 試薬および L 鎖 cICAT 試薬反応用に用意した(主として正常部位とがん部位の比較)。常法(2,4)に従い、50mM Tris-HCl、0.1% SDS(pH8.5)で可溶化し、TCEP(final 1mM, 95 $^{\circ}$ C, 10 min)で変性還元後、2.2mM の cICAT 試薬(AB) [13 C (H 鎖)あるいは 12 C (L 鎖) 標識] を 37 $^{\circ}$ C、2 時間反応させた(反応液各 100 μ l)。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た後、アセトン沈殿法により過剰試薬等を除去し、たんぱく質画分を分取した。本画分を常法に従い、トリプシン(Promega, TPCK 処理)で 37 $^{\circ}$ C、16 時間消化し、得られた消化物をアビジンカートリッジカラム(2 個連結)にかけ、吸着した cICAT 試薬反応ペプチドを 30% $\text{CH}_3\text{CN}/0.4\%$ 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 $^{\circ}$ C、1 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% CH_3CN に溶解し、SCX column(2.1 x 35mm)にて、0.05%ギ酸/25% CH_3CN -0.5M ギ酸アンモニウム/5.88%ギ酸/25% CH_3CN 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 QSTAR XL 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)及び RefSeq database 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。細胞株については比較する細胞株由来のたんぱく質を各々 100 μ g/tube を用意し、上記と同様の処理を行い解析した。

10) 凍結組織切片の免疫組織化学法による正常・病変部位解析法：

スキルス胃がん患者の第 1 症例(#1)の胃がん組織ブロック及び周辺の正常胃組織ブロックからクリオスタットで調製した 10 μ m の組織切片を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た。免疫組織化学的解析の常法により、cICAT 法でスキルス胃がん特異的たんぱく質と判定された CD177(gi|9966889)のマウスモノクロナル抗体(MEM-166、ZYMED Laboratories)を 1 次抗体として用いて、胃がん部位切片および正常部位切片の免疫染色を行った。1 次抗体を切片に加え室温 2 時間反応させた後に洗浄し、ビオチン標識ウマ抗マウス抗体(2 次抗体)を添加し、室温 20 分反応後、未反応な 2 次抗体を洗浄除去した。その後、ABC (peroxidase) Kit (VECTOR Laboratories)を用いて、常法により AEC Substrate(red)で発色させ、乾燥後、ヘマトキシリンの 3 倍希釈液で染色(counterstaining)し、免疫染色を行った。

11) QSTAR 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% CH_3CN にて再溶解し、nano-LC(LC-Packing)/QSTAR XL (AB, ESI-Q/TOF) および nano-LC /Probot (LC-Packings)にて分析した。カラムは C18 PepMapTM 100, 3 μ m, 100 \AA 、75 μ m x 150mm(LC-Packings)を使用し、QSTAR XL 用移動相は A: 2% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ HCOOH, B: 95% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ HCOOH によるリニアグラジエント(流速: 200 nl/min, 分析時間 90 分)であった。ABI-4700 用移動相は、A: 5% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA, B: 95% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA によるリニアグラジエント(流速 300 nl/min, 分析時間 70 分)であった。なお、QSTAR 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 50%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8回測定する度に1回、QC用のBSA消化物(100fmol)を測定した。

12) 高速度 SELDI-QqTOF-MS 法:

prOTOF 2000 (PerkinElmer 社) と SELDI-ProteinChip(Bio-Rad) を利用する高速度 SELDI-QqTOF-MS 法を国立がんセンター研究所の協力により導入した。常法に基づき、9M 尿素 2% CHAPS で変性処理をした血清検体を群分けし、検体群毎の ID 番号を割り振り(三次匿名化)、検体 ID を triplicate でランダム化し、Profiling 時のスポット位置決定表を作成する。試料検体を小分けし、-80℃で保存し、必要に応じて解凍しマスタープレートに triplicate で分注し、Replica を数枚作成する。Biomek 2000 を用いて、分注検体を SELDI ProteinChip H50 及び IMAC30 に吸着させ、Matrix を添加後、乾固させた。各 SELDI ProteinChip を prOTOF 2000 で 1000-30000m/z の範囲で計測し、ペプチドピークを NCC-ProteoJudge で検出した。なお、糖尿病患者血清の解析での群分けは以下の通りである。

イ) 糖尿病患者血清(124 検体)

- a) 合併症なし=A 群: 45 検体
- b) 腎症(17 検体)+腎症&神経症(6 検体)=B 群: 23 検体
- c) 腎症&網膜症(8 検体)+網膜症(14 検体)+

網膜症&神経症(8 検体) = C 群: 30 検体

- d) 網膜症&腎症&神経症(19 検体)+神経症(7 検体)=D 群: 26 検体

ロ) コントロール血清(健常人、糖尿病の非罹患者) = E 群: 40 検体

ハ) スタンダード血清 = VSM(volunteer serum mixture)

C. 研究結果

C-1 糖たんぱく質糖鎖解析技術の開発

血清に存在する主な糖たんぱく質の糖鎖のパターンを簡便に解析する方法として、血清をトリプシン処理した後、LC/MS を用いて解析する方法を開発した。

C-2 微量疾患関連たんぱく質に対する抗体作製技術の確立

前年度までに確立したメンブランパンニング法を用い、モデル疾患サンプルとして乳癌細胞株 SKBR3 の 2D-DIGE 解析を行い、発現変動スポットを同定した。ピック用ゲルから発現変動スポットを切りだし、MS によるタンパク同定を行い、一方で、過ヨウ素酸によるゲル分解を行うことでたんぱく質を回収し、抗体パンニング、およびスクリーニング用の抗原として用いた。

2D-DIGE 解析の結果、21 個の発現変動スポットが検出され、ピックしたゲルからのたんぱく質を MS により同定した(図 1)。



spot	protein name	乳癌乳腺
#1	splicing factor YF521-B isoform 1	6 倍 ↓
#2	IkappaBR	6 倍 ↑
#3	SPTA5 protein	7 倍 ↑
#4	skin aspartic protease	11 倍 ↓
#5	beta actin variant	15 倍 ↑
#6	TRAIL-R2	18 倍 ↑
#7	cytokeratin 18	12 倍 ↑
#8	TRAIL-R2	16 倍 ↑
#9	RREB1 protein	10 倍 ↑
#10	keratin K7 type II epithelial	23 倍 ↑
#11	keratin 18	13 倍 ↑
#12	keratin K7 type II epithelial	24 倍 ↑
#13	FLJ31438 protein	35 倍 ↑
#14	keratin type II cytokeletal 7	36 倍 ↑
#15	hPAK65	8 倍 ↑
#16	Cytokeratin 8	32 倍 ↑
#17	keratin type II cytokeletal 8	72 倍 ↑
#18	XRN1 protein	8 倍 ↑
#19	Jerky protein homolog-like	22 倍 ↑
#20	EPH receptor A10 isoform 2	9 倍 ↑
#21	glutathion transferase	53 倍 ↓

図1 乳癌細胞の2D-DIGE解析と同一された発現変動タンパク質

(左) SKBR3細胞(乳癌細胞)と184A1細胞(対照)の2D-DIGE解析。赤色は癌細胞で発現増加しているタンパク質を、緑色は癌細胞で発現減少しているタンパク質を、黄色は発現変動のないタンパク質を示している。(右)MSにより同一したタンパク質および発現比を示している。

一方で可溶化したゲルからのたんぱく質を抗原としてファージ抗体ライブラリのパンニングを行った結果、21種全てのたんぱく質に対するファージ抗体の濃縮が確認され(図2)、スクリーニングの

結果、わずか2週間という短期間で、それぞれのたんぱく質についてモノクローン化ファージ抗体を得ることができた(図3)。

spot	protein name	Output/Input (x 10 ⁻⁷) / round			
		1st	2nd	3rd	4th
#1	splicing factor YF521-B isoform 1	6	7	16	480
#2	IkappaBR	6	7	15	500
#3	SPTA5 protein	5	6	32	860
#4	skin aspartic protease	5	6	5	24
#5	beta actin variant	7	11	17	480
#6	TRAIL-R2	6	7	25	420
#7	cytokeratin 18	5	11	62	260
#8	TRAIL-R2	5	27	41	1500
#9	RREB1 protein	8	9	14	370
#10	keratin K7 type II epithelial	6	7	3	2200
#11	keratin 18	6	8	15	84
#12	keratin K7 type II epithelial	10	11	13	94
#13	FLJ31438 protein	7	9	32	80
#14	keratin type II cytokeletal 7	4	7	46	280
#15	hPAK65	7	11	51	580
#16	Cytokeratin 8	8	7	16	4100
#17	keratin type II cytokeletal 8	5	12	33	240
#18	XRN1 protein	6	20	18	200
#19	Jerky protein homolog-like	7	10	49	940
#20	EPH receptor A10 isoform 2	8	6	57	3000
#21	glutathion transferase	7	8	110	1900

図2 疾患関連たんぱく質候補に対するファージ抗体ライブラリのメンブランパンニング

パンニングラウンドを繰り返すごとに特異的抗体ファージの濃縮効果が認められた。1st~4thパンニングでのOutput phage (titer) / Input phage (titer)の増加は、抗原に結合するクローンの濃縮が示唆される。

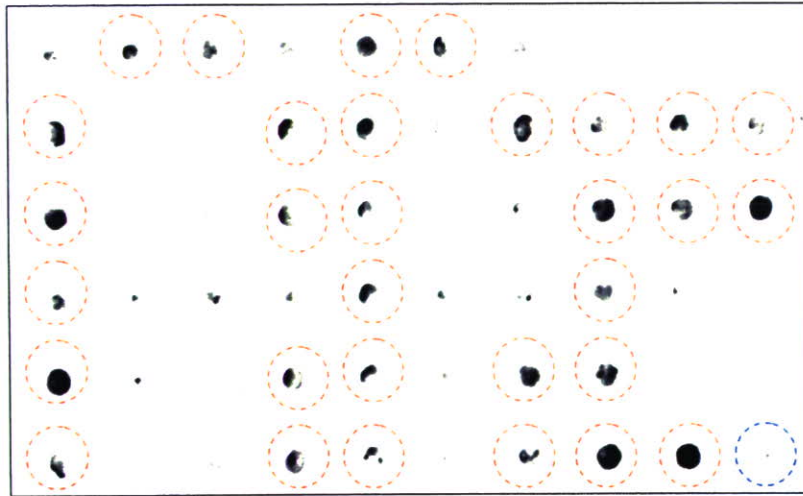


図3 抗TRAILR2ファージ抗体のスクリーニング

抗原(TRAILR2)に対して濃縮されたファージ抗体ライブラリをモノクローン化し、Dot blot western法によりスクリーニングを行った。ニトロセルロース膜上に2D-DIGEゲルから抽出したTRAILR2タンパク質を固相化した。青い丸印はネガティブコントロールファージ。

得られた抗体のひとつ、TRAILR2 抗体を用いて乳癌細胞 SKBR3 および不死化乳腺細胞株 184A1 の蛍光免疫染色を試みたところ、SKBR3 のみ選択的に

染色されたことから、得られたファージ抗体が細胞の免疫染色に利用可能であることが判明した(図4)。

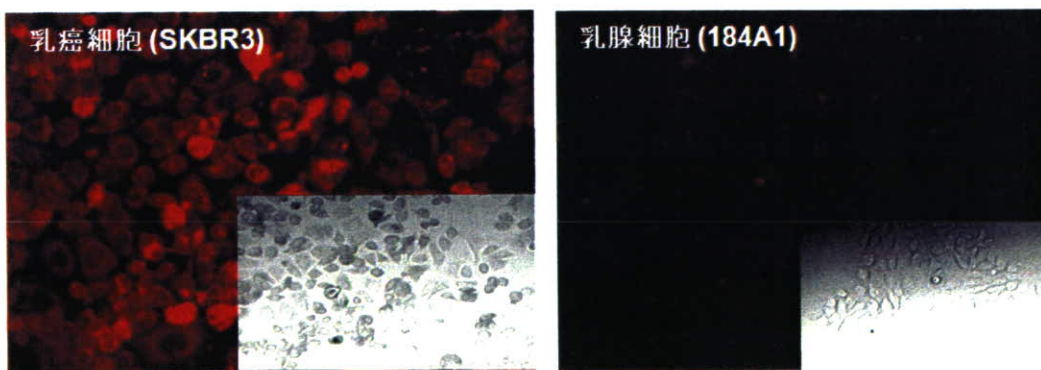


図4 取得したファージ抗体による培養細胞の蛍光免疫染色

TRAILR2に対するファージ抗体を用いて、培養SKBR3細胞、および184A1細胞の免疫染色を行い、蛍光顕微鏡により観察したところ、SKBR3細胞のみ特異的に染色された。右下のパネルは微分干渉顕微鏡像。

また、データには示さないが、組織切片の免疫染色も同様に可能であることが確認できた。

C-3 高血圧、心循環器系疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立

当センターの循環器疾患関連たんぱく質解析研究においては、以下の10課題が高度先駆的医療、研究審査委員会で医学的、科学的検討を受け、倫理委員会で倫理面での承認を得ている。各課題の目的や対象症例などの詳細、方法、試料採取時期などの詳細は、これまでの報告書に記載した。

- 研究計画 1-1. 脳動脈閉塞による急性期脳卒中関連たんぱく質の探索研究
- 研究計画 2-1. 腎血管性高血圧関連たんぱく質の探索研究
- 研究計画 3-1. 糖尿病治療前後の動脈硬化関連たんぱく質の探索研究
- 研究計画 3-2. 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研究
- 研究計画 3-3. 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研究
- 研究計画 4-1. 急性期心不全関連たんぱく質の探索研究
- 研究計画 4-2. 急性心筋梗塞症および類似疾患における疾患関連たんぱく質の探索研究
- 研究計画 4-3. 肺高血圧症関連たんぱく質の探索研究
- 研究計画 5-1. 心組織における心筋症関連たんぱく質の探索研究
- 研究計画 6-1. 周産期心筋症に関連するたんぱく質の探索研究

このうち、研究計画 5-1. 心組織、研究計画 6-1 の健常者についてのみ対象者が少なく、19年度の採取終了時期までに第一期の予定試料数を採取できなかった。研究計画 5-1 の心臓組織は、本研究

期間内では創薬プロテオームファクトリー施設で解析を行わないことが決まったため送付しなかったが、それ以外の血液試料については、血清、血漿を含め全ての送付を完了した。しかし、本年度になり、研究期間内に創薬プロテオームファクトリー施設では血漿試料の解析は困難との通知を受けたため、血漿試料の返還を求めた。特に、研究計画 3-2 においては、症例及び処置の実施上、血漿試料のみしか採取できないので、上記心組織を含めて当センター内部での解析に着手した。

一方、5課題については本年度6月から11月にプロテオーム解析結果が創薬プロテオームファクトリー施設より示され、内容に関する説明も行われた。当センターは、当該症例に対する詳細な臨床データを創薬プロテオームファクトリー施設に提供した。しかし、解析結果が紙媒体でしか提供されなかったため、現状では一部の手入力データとの解析、検討を行うに留まっている状況である。その概要と解析結果の評価などを以下に示した。

1) 研究計画 1-1. 脳動脈閉塞による急性期脳卒中関連たんぱく質の探索研究：

脳梗塞患者の急性期(入院当初)と慢性期(発症後7~14日目)の比較では、多くの血中たんぱく質の変動が確認された。一部は、特定の治療薬(抗血小板薬、抗凝固薬など)の投与前後での変化、生体反応(血小板たんぱく質、各種凝固・線溶系因子の変動など)をとらえていると推定された。症状悪化や改善などの臨床経過や病型、病態に特異な変動も含まれている可能性があったが、今回の限定された症例数と解析データだけでは、これ以上の解析は困難であった。

2) 研究計画 3-1. 糖尿病治療前後の動脈硬化関連たんぱく質の探索研究：

糖尿病患者を対象に有酸素運動を主とした運動療法を3ヶ月間行い、その前後での血清たんぱく質の比較を行った。全ての症例で共通した変動を示したたんぱく質はなかったが、ある程度の数の症例で1.5倍以上の上昇が認められたたんぱく質