

が見出された。このたんぱく質は生理的な変動で増減することが知られ、最近の報告では肥満などとも関連する可能性も示唆されているものの、運動と本たんぱく質分子の関連などを報告したものはなく、今後さらに病態生理的意義を含め検討していく必要があると考えられた。

3) 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：

遺伝的背景のない高コレステロール血症症例に対して、アトルバスタチンの服用開始前、服用開始3ヶ月後に採血を行い、臨床化学検査などとプロテオーム解析を実施した。リポたんぱく質を構成する主要なたんぱく質であるアポリポたんぱく質を例にとると、アポリポたんぱく質Bは臨床化学検査でも有意な低下を認め、プロテオーム解析においても同様の低下を観測することができた。その他のアポリポたんぱく質類については、臨床化学検査においてもプロテオーム解析においても変動を認めず、既知のたんぱく質の変動をプロテオーム解析にて正確に評価できることが検証された。今後、詳細な臨床情報との比較・解析を行うことにより、脂質代謝や動脈硬化に関わる未知のたんぱく質の探索とその病態生理的機能を検出、同定できる可能性が示唆された。

4) 研究計画 4-1. 急性期心不全関連たんぱく質の探索研究：

急性心筋梗塞の急性期と慢性期に採血を行い本疾患の病態と関連する特異的なたんぱく質の変動はないか検討した。多数のたんぱく質に本疾患の病期に応じた変動が確認されたが、確認症例数が10例と少なく心筋梗塞部位や梗塞サイズ、合併症の有無、併用薬剤の違いなど治療法にも違いがあり、今回観測されたたんぱく質の変動の意味を解析することは現状では困難と思われた。今後、疾患発症の病態と治療法なども考慮して症例を集め、たんぱく質解析を実施する必要性が認識された。

5) 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：

心不全の急性増悪のために緊急入院した患者を対象として、急性期心不全の治療前後に変化するたんぱく質について検討した。当センター受診前に何らかの治療が行われた患者や、基礎心疾患として虚血性心疾患、重篤な弁膜疾患を持つ患者を除き、治療内容については制約を設けなかった。10名の1次試料のプロテオーム解析結果を検討したところ、補体関連たんぱく質、ホルモン結合たんぱく質などが変化する可能性が示された。これらを確認し、臨床情報とたんぱく質情報をより広範に比較・検討するため、本研究計画においてのみ重症度の高い心不全患者を含む10名の2次試料採取までを行い、現在解析中である。

一方、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定した研究計画 3-2 の血漿試料、研究計画 5-1 の心組織試料については、国立循環器病センター研究所で2次元電気泳動法を主体とした方法で解析を開始した。血漿については、抗体アフィニティーカラムで主要14種の血清たんぱく質を除去した後、当センター研究でこれまで実施されてきた技術、解析機器を用いて比較、解析を実施したが、現状ではまだ十分な解析結果が得られていない。

C-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) GIPの単離・同定

各分化段階の3T3-L1細胞に対して、ラット小腸から抽出したペプチド画分をゲル濾過で分離した各分画についてアッセイを行った結果、分子量約3,000~4,000の分画に細胞内cAMP濃度上昇活性を見出した。その活性はday0、day4及びday8の脂肪細胞で検出されたが、特にday8で強く認められた。この活性分画をイオン交換HPLC及び逆相HPLCにより分離・精製し、プロテインシークエンサー及びマススペクトロメーターによる構造解析を行った結果、42残基のアミノ酸からなるGIPの

N 末端 27 残基(GIP [1-27])のペプチドが同定された。

2) PACAP38 の単離・精製

各分化段階の 3T3-L1 細胞に対して、ラット脂肪組織から抽出したペプチド画分をゲル濾過したサンプルを用いてアッセイを行った結果、分子量約 4,000-5,000 の分画に細胞内 cAMP 濃度上昇活性を見出した。その活性は day0、day4 及び day8 の脂肪細胞で検出されたが、day0 の細胞で強く認められた。この活性分画をイオン交換 HPLC 及び逆相 HPLC により分離・精製を行った結果、クロマトグラフィー上の特性及び合成品との比活性の検討より、この分画に含まれるペプチドは PACAP38 と考えられた。今後、精製したペプチドを、プロテインシーケンサー及びマススペクトロメーターにより構造決定する予定である。

C-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

ABI 社 4800 質量分析計においては、レーザーの改良などに伴いイオン化効率が上昇して感度が約 10 倍改善すると共に、構造解析対象の質量上限が約 1,000Da 上昇し、さらに質量精度も 1 桁上昇した。その結果、構造解析ペプチド数や確率が明確に上昇した。またソフトウェアの改良と同一プレートの繰り返し測定により、混合物中の順位の低い微量ペプチドまで解析可能となった。一方、Thermoelectron 社の Orbitrap 質量分析計においては、質量精度 0.01Da 以下でルーチン分析ができ、FT 検出装置による高い検出感度と低分子量領域を除く広い領域における高精度な多価イオン測定により、構造解析効率が大幅に上昇した。豊富なペプチドにおいては質量 5,000Da 以上の同定数も多く、最大では 10,000Da 近い領域までの構造解析が可能となった。これらの機器の利用により、酵素消化をせずに生体内ペプチド総体をそのまま同定するという我々の目標に近づくことが可能となり、いわゆる Top-down proteomics が現実のもの

となりつつあることが実感された。但し、解析ソフトウェア等の開発が機器の進歩に十分対応し切れていないため、構造解析結果の検証ソフトウェアなどの開発、修飾構造を含む構造解析法の改善などの総合的な対策により、さらに有用な情報の導出が可能と考えられた。

昨年度までの研究においては、脳、心房などの組織のペプチドーム解析を行ってきた。脳においてはタキキニン類やオピオイドペプチド、心房においては α -心房性ナトリウム利尿ペプチドなど豊富な生理活性ペプチドは、内在する分子型で十分に検出できた。しかし、微量の生理活性ペプチドは、たんぱく画分に検出される多量の細胞骨格、組織形成、代謝系などのたんぱく質などが抽出過程でたんぱく質分解酵素により切断され、生成する分解ペプチドに凌駕され、有意には検出できなかった。そこで、問題となる抽出を省き、かつペプチドが作動する細胞間物質の包括的解析を行うために、ペプチドを活発に産生し安定して培養できる細胞株を選択し、培養上清中に分泌されるペプチド、たんぱく質の包括的解析に着手した。ヒト内分泌組織由来細胞株の培養上清を逆相系カートリッジで濃縮し、ゲル濾過にてペプチド画分とたんぱく質画分に分離後、各画分を還元アルキル化し、ペプチド画分はそのまま次元 nano LC で分離して質量分析に付し、たんぱく画分はトリプシン消化後同様に分離、解析を行った。

次元の分離でも、重複を省き最終的に約 250 の独立したペプチドを同定できた。その主体は当該細胞が活発に産生するペプチドホルモンとその前駆体に由来するペプチドで、予想されるプロセシング経路に従いプロホルモン変換酵素で切断されたペプチドが優勢に観測された。上記以外の大部分は、分泌顆粒に豊富に含まれるグラニン類と既知の生理活性ペプチド前駆体に由来するペプチドであった。一方、たんぱく質画分には多種多様の分泌たんぱく質が観測された。それらの中にはペプチドに変換されているものも一部認められた。

繰り返し測定により同定ペプチド数は見かけ上増加したが、大部分は既に構造決定したペプチド、あるいはそのN末端やC末端アミノ酸が欠如したペプチドで、下位ペプチドを対象とした繰り返し測定のみで正味の同定ペプチド数を上昇させることは困難であることが分かった。上記で同定したペプチド群には、生理活性ペプチドに特徴的なC末端アミノ酸がアミド化された2種の新規ペプチドが見出され、NERTP-1, 2と命名した。これらの配列はラット、マウスでも高い相同性を示し、同じ前駆体たんぱく質から由来していた。各ペプチドのC末端構造認識抗体を調製し、ラット脳組織における存在を確認したところ、視床下部の室傍核、視索上核に高濃度存在し、細胞上清と同じ分子型で脳組織内にも存在していた。また、絶水負荷により視床下部での遺伝子発現は著増すると共に、バソプレッシンと同一細胞で産生され、同じ分泌顆粒に含まれることが判明した。最終的にこれらのペプチドは、生体内でバソプレッシン分泌を抑制する内在性因子であることが確認された。

血液試料中のペプチド画分は、血漿よりカートリッジを使用して抽出後、ゲル濾過にて調製し、逆相 nano HPLC で分離した後、Maldi-Tof-Tof 質量分析計で解析した。採血、冷却後、プロテアーゼインヒビターカクテルを添加し調製した血漿より、直ちに迅速処理した試料では、再現的に分子量 6K 以下のペプチド総量は極めて少なく、たんぱく質との重量比が1万分の1以下であることが確認された。凍結・融解により、線溶系、補体系はカルシウムフリー、プロテアーゼインヒビター存在下でも活性化され、その結果ペプチド量は明確に増加した。特に、エンド型プロテアーゼによる切断後、急速にエキソ型プロテアーゼによる末端アミノ酸に逐次除去が起こり、補体系活性化に由来すると考えられる当初反応が不可避であった。このため、ペプチド解析に特化した試料調製が不可欠で、採血時に抽出処理まで一貫実施し、凍結乾燥後窒素置換し、分析時まで-80℃保管すること

が望ましいと考えられた。但し、ペプチド解析には最低でも 5 mL の血漿が必要であり、実験者によらない簡単かつ迅速処理装置の作成が必要と考えられた。また、現在の研究計画では採血量が不足するため、標的疾患を絞った試料採取、一次検索を先ず計画、実施しなければならない。

血漿試料のプロテオーム解析については、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を対象に実施した。アジレント社製抗体カラムにて、血液中の上位 14 種類のたんぱく質を除去し、濃縮後 2 次元電気泳動法を用いて分離、解析した。現在個別たんぱく質の同定マップを作成中で、観測される量的変動、構造的変化とその変動原因を含めた同定作業を進めている。

C-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) 研究試料の確保に関する研究

新規試料については、すでに本センターの倫理委員会での承認を得ていた、「血液、尿、髄液を用いた脳神経疾患の病因・治療法の開発に関する研究」によって収集・保存が可能な疾患の内、パーキンソン病及びパーキンソン症候群患者の血漿、尿を本研究に利用するための倫理申請を行い、承認を得た。そして、2007年12月までに、12名のパーキンソン病患者及び10名のパーキンソン症候群患者の血清をプロテオームファクトリーに提供した。また、カルテ等から臨床情報の抽出を行い、暗号化した情報としてプロテオームファクトリーに提供した。

さらに、パーキンソン病及びパーキンソン症候群患者の連結不可能匿名化された髄液を用いて、まずは10mlを10人分プールし、予備的検討を行った。

Agilent 抗体カラム(Hu14)で分画し素通り画分と吸着溶出画分を得て、0.1% SDS、50 mM

Tris/HCl (pH 8.5)に溶解し、c ICAT 法で解析した。髄液は、313 種類のたんぱく質を同定でき、そのうち 94 種が血清たんぱく質で同定されたものであり、219 種は髄液特異的に検出された。

iTRAQ 法と今回の c ICAT 法の比較を行ったところ、全 313 種の cICAT 法で検出された髄液たんぱく質のうち、102 種が iTRAQ 法で検出された(過去の文献を参照)のみで、211 種類は cICAT 法でのみ検出できた。

検出された髄液たんぱく質の内容としては、神経栄養因子、神経発生に関わる転写因子、神経接着分子、アミロイド関係たんぱく質など、神経特異的と考えられるたんぱく質が多数同定できた。

検出感度として、最初の髄液量が 10ml 必要であるという点が明らかになった。

2) モデル動物の解析、創薬標的分子開発に関する研究

UCH-L3 については結晶体に関する 3次元構造解析が過去に報告されているので、その詳細なデータを活用し分子モデルを構築した。スクリーニング対象となる作用薬候補については血液脳関門を通過する可能性が高い約 5万種類のデジタルデータを利用した UCH-L3 と各化合物の docking simulation を市販の 3台のコンピューターで 10日間行い、スコアが高かった 10種の化合物を同定した。これらについて実際の入手し、UCH-L3 の酵素活性に及ぼす効果を酵素学的に検討したところ 3種の薬剤が阻害活性を示すことを見出した。

C-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

【臨床サンプルの収集】

1) 糖尿病

糖尿病患者由来血清の解析のために、過去に他の研究計画(ミレニアム・プロジェクト)の際に採取されていた糖尿病患者 24 人分の血清サンプルをプロテオームファクトリー施設に17年3月送付した。それに加えて、糖尿病診断マーカーの本格的

解析に使用する糖尿病患者血清サンプルを本年度までに、104 人から収集し、プロテオームファクトリー施設に送付した。検体を送付した糖尿病患者の内訳は、糖尿病性合併症なし 42 名、糖尿病性腎症のみ 13 名、網膜症のみ 7 名、神経障害のみ 9 名、腎症+網膜症 5 名、網膜症+神経障害 3 名、腎症+神経障害 4 名、腎症+網膜症+神経障害 11 名であった。また、今年度は、患者血清の対照群として使用する目的で、健常者 42 名から血清を収集し、プロテオームファクトリー施設に送付した。

早期糖尿病性腎症の尿たんぱく質プロファイルを本施設内にて解析するために、微量アルブミン尿のない糖尿病患者 28 名、微量アルブミン尿を有する糖尿病患者 27 名、また対照群として健常者 15 名から尿を収集した。

2) 糖尿病以外の疾患

慢性閉塞性肺疾患診断の血清マーカー検索の予備検討用として、前年度に慢性閉塞性肺疾患患者血清を 10 人分収集し、プロテオームファクトリー施設に送付した。

【臨床検体でのプロテオーム解析】

1) 糖尿病患者血清での cICAT 法による解析

プロテオームファクトリー施設にて、糖尿病患者血清の一部を用いて予備的解析を行った後に、糖尿病性合併症のない糖尿病患者血清 41 例、糖尿病性合併症を有する糖尿病患者血清 53 例、対照群として健常者血清 24 検体を用いて cICAT 法による高発現血清たんぱく質の定量解析を行った。血清中の高発現の 100 前後のたんぱく質について定量情報が得られ、このデータと臨床情報との関連性を解析中である。現時点で判明している結果を箇条書きにすると、

- ① 合併症のない糖尿病患者では、健常者と比較して 28 個のたんぱく質が有意に変動していたが、1.5 倍以上変動していたのは von Willebrand factor のみであった。
- ② 合併症のない糖尿病患者と、糖尿病性合併症のうち一つを有する患者の比較では、腎症のみで 6

個、網膜症のみで6個、神経障害のみで15個のたんぱく質が有意に変動しており、その一部は各合併症間で重複していた。しかし、いずれのたんぱく質も変動の幅が小さく、単独のマーカー候補になりうるたんぱく質は認められなかった。

③ 解析した糖尿病患者集団と健常者集団で平均年齢が異なるため、1) で変動していたたんぱく質が疾患ではなく加齢により変化している可能性を除外する目的で、各集団内で年齢層別に比較した。各群にて年齢によって差が認められず、同じ年齢層での糖尿病患者と健常者の比較では有意な差が認められたため、これらのたんぱく質の変動は疾患に関連したものであることが示唆された。

2) 糖尿病患者尿での 2D-DIGE 法による解析

糖尿病性腎症患者由来尿たんぱく質の解析については、前年度に確立した前処理法として尿の限外濾過にて濃縮後に Albumin and IgG Removal Kit(GE)を用いた高含有量たんぱく質の除去を行い、二次元電気泳動を用いたディファレンシャル解析(2D-DIGE)にてゲル当たり、約2000個のたんぱく質スポットを検出することが可能となった。この系を用いて、微量アルブミン尿のない糖尿病患者16名、微量アルブミン尿を有する糖尿病患者16名、コントロールとして健常者8名の尿から尿たんぱく質を精製し、2D-DIGE法にて解析した。2D-DIGEでの結果では、微量アルブミン尿を有する糖尿病患者由来尿にて健常者由来尿と比較して有意に変動するたんぱく質スポットを、増加227個、減少85個を認めた。微量アルブミン尿を有する糖尿病患者由来尿と微量アルブミン尿のない糖尿病患者由来尿の比較では、有意に増加するたんぱく質スポットは93個、減少は30個であった。また、微量アルブミン尿のない糖尿病患者由来尿と健常者由来尿の比較では、有意に増加するたんぱく質スポットは58個、減少は9個であった。これらの有意に変動したたんぱく質スポットをゲル内消化後にLC-MS/MSにて解析した結果では、微量アルブミン尿を有する糖尿病患者にて増加する

24個のたんぱく質、減少する10個のたんぱく質を同定した。これらのたんぱく質の中では、既に糖尿病性腎症にて有意に変動することが報告されている Transferrin, Ceruloplasmin(Narita(2006)Diabetes Care)が確認された。

3) 糖尿病以外の疾患の cICAT 法による解析

慢性閉塞性肺疾患患者血清10人分をプロテオームファクトリー施設に発送済みであり、現在、cICAT法による解析結果を待っている。

【2DE, LC-MSを用いたプロテオーム解析】

1) 血管内皮細胞における DHEA の抗アポトーシス作用

$5 \times 10^{-6} \text{M}$ の濃度のDHEAは過酸化水素によるアポトーシスの誘導を有意に抑制した。この時、Bcl-2の発現に変化はないものの、過酸化水素によるBcl-x1の発現低下がDHEAにより抑制されていた。この系での2D-DIGEの解析結果では、過酸化水素処理により増加する38個のたんぱく質スポット、減少する10個のたんぱく質スポットを認めた。また、増加したたんぱく質スポットの中で、14個のたんぱく質スポットがDHEA処理により発現が抑制され、これらのたんぱく質スポットをLC-MS/MSにて解析した結果、5個のたんぱく質を同定した。

2) 分化マクロファージにて発現するたんぱく質の解析

2DE, nano-HPLC ESI MS/MSを行った解析の結果、非分泌型たんぱく質のcathepsin BをM型マクロファージに特異的に高発現しているたんぱく質として同定した。さらに培養上清中からGM型、M型マクロファージ双方に共通の分泌型たんぱく質osteopontinを同定した。さらにcathepsin Bならびにosteopontinの双方についてウエスタンブロットにより検証した。

cathepsin Bについては、システインプロテアーゼとしての活性があることを、実際に基質を切断させて蛍光にて確認した。また、cathepsin Bは二次元ゲル上にて分子量と等電点の異なる3ないし4個のスポットとして認識されるため、さら

に解析を進めている。また、BCG 感染後の M 型マクロファージに関しても同様の解析を進めている。また、cathepsin B は lysosome enzyme であることが知られているため、細胞内局在の確認、とくに lysosome subpopulation との関係について共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光多重染色にて解析を進めている。

分化型マクロファージへの感染実験では、施設状況から判断してヒト型結核菌 (H37Rv) の感染実験を延期して、BCG (Tokyo172 株) の感染実験を先行して実施した。結果、GM 型に比較して M 型マクロファージでは効率的に BCG が殺菌されることが CFU アッセイによって明らかとなった。

3) 結核バイオマーカーの探索

血漿サンプル解析の予備検討のために、EDTA を加え採血した血漿について、自己血血漿から Agilent Human 14 Multiple Affinity Removal System Spin Cartridge (Agilent) を用いて高含有量たんぱく質の除去を行い、SDS-PAGE ゲル上で主要たんぱく質がほとんど消失することを確認した。

次に、自己血に結核特異抗原、PHA による刺激を加え、未刺激のものと合わせ、血漿分離後に凍結保存した。

次に上記手法で処理した血漿サンプルの二次元電気泳動の条件検討を行った。各血漿サンプルを 5kDa および 10kDa で限外ろ過を行い、低分子サンプルについて冷凍保存した。高分子サンプルを回収し、アセトン沈殿によりサンプルを濃縮し二次元電気泳動のサンプルとして用いて展開した。

C-8 小児腎疾患関連因子の探索ならびに解析

本年度は、昨年度に引き続き小児腎疾患の患者より血清を採取し血清中のプロテオーム解析を行った。18 年 10 月から 19 年 11 月まで新たに 7 名の患者から 22 検体の採取を行った。検体総数は 78 検体で患者数 33 名で検体提供時の年齢は図 1 に示した。

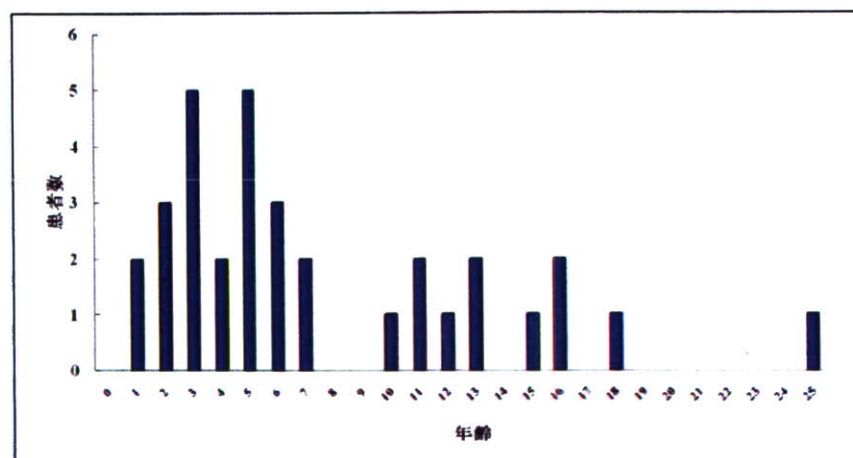


図 1 患者の年齢分布

33名の患者の内訳を図2に示した。26名中、ネ 腎症2名、その他1名であった。
 フローゼ症候群 21名、FSGS 腎移植後2名、IgA

	患者数計	微小変化	び慢性メサン ギウム増殖	FSGS	慢性増殖性 糸球体腎炎	その他	生理所見な し	不明
ネフローゼ症候群	21	6	2	2	0	3	4	4
{ ステロイド感受性 ステロイド抵抗性 不明	16	4	1			3	4	4
	4	1	1	2				
	1	1						
FSGS腎移植後	2			2				
IgA腎症	2		2					
その他	1				1			

図2 疾患の内訳

ネフローゼ症候群の患者の中でステロイド治療に感受性を示した患者群にて血清のプロテオーム解析を行った。検体の採取時期は、発症時(再発時)、

治療期(ステロイド治療、尿たんぱく質陰性)、寛解期(ステロイド治療中止、尿たんぱく質陰性)の3つのステージでの採取、解析を行った(図3)。

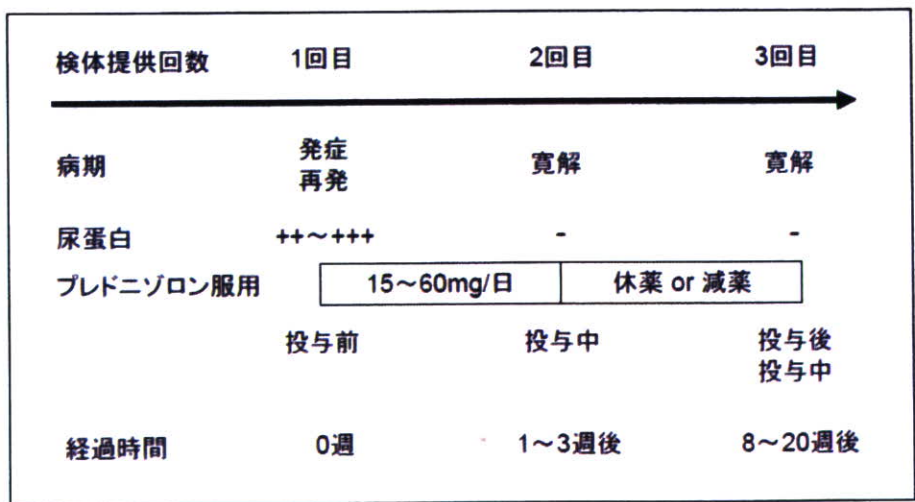


図3 ステロイド感受性ネフローゼ症候群の検体における病気及び治療推移

これらの検体の中で一部の検体について(図4)インフォマティクスを用いて解析したところ疾患及

び病態と関連して変動する Zinc- α 2-glycoprotein (ZAG) が同定された。

	1日目	2日目	3日目		1日目	2日目	3日目		1日目	2日目	3日目			
#1	EVQC	5	6	7	#15	EVQC	26	27	28	#28	EVQC	解折待ち	解折待ち	解折待ち
尿糖	PSL	-	+	-	尿糖	PSL	-	+	30mg/日	尿糖	PSL	-	+	-
尿蛋白	尿蛋白	+++	-	-	尿蛋白	尿蛋白	+++	-	-	尿蛋白	尿蛋白	++	-	-
#2	EVQC	1	2		#18	EVQC	解折待ち		解折待ち	#27	EVQC	解折待ち	解折待ち	解折待ち
尿糖	PSL	-	+		尿糖	PSL	-			尿糖	PSL	-	+	-
尿蛋白	尿蛋白	+++	-		尿蛋白	尿蛋白	+++			尿蛋白	尿蛋白	+++	-	-
#7	EVQC	29			#20	EVQC	解折待ち	解折待ち		#29	EVQC	解折待ち	解折待ち	解折待ち
尿糖	PSL	+			尿糖	PSL	-	+		尿糖	PSL	-	+	-
尿蛋白	尿蛋白	+++			尿蛋白	尿蛋白	+++	-		尿蛋白	尿蛋白	+++	-	-
#8	EVQC	20	21	22	#22	EVQC	解折待ち	解折待ち	解折待ち	#31	EVQC	解折待ち	解折待ち	解折待ち
尿糖	PSL	-	+	-	尿糖	PSL	-	+	-	尿糖	PSL	-	+	-
尿蛋白	尿蛋白	+++	-	-	尿蛋白	尿蛋白	+++	-	-	尿蛋白	尿蛋白	+++	-	-
#11	EVQC	8	9	10	#23	EVQC	解折待ち	解折待ち	解折待ち	#32	EVQC	解折待ち	解折待ち	解折待ち
尿糖	PSL	-	+	-	尿糖	PSL	-	+	-	尿糖	PSL	-	+	-
尿蛋白	尿蛋白	+++	-	-	尿蛋白	尿蛋白	+++	-	-	尿蛋白	尿蛋白	+++	-	-
#12	EVQC	21			#24	EVQC	解折待ち	解折待ち	解折待ち	#33	EVQC	解折待ち	解折待ち	解折待ち
尿糖	PSL	-			尿糖	PSL	-	+	-	尿糖	PSL	-	+	-
尿蛋白	尿蛋白	++			尿蛋白	尿蛋白	+++	-	-	尿蛋白	尿蛋白	+++	-	-
#14	EVQC	17	18	19	#25	EVQC	解折待ち	解折待ち	解折待ち					
尿糖	PSL	-	+	-	尿糖	PSL	-	+	-					
尿蛋白	尿蛋白	+++	-	-	尿蛋白	尿蛋白	++	-	-					

EVQC; プロテオームファクトリー解析番号
PSL; プレドニゾン

 プロテオーム解析済 (2006年6月時点)

図4 ステロイド感受性ネフローゼ症候群における検体状況 (20名)

ZAG についてネフローゼ症候群の患者血清についてウエスタンブロット法にて解析を行ったところ、

ステロイド治療により寛解期には ZAG の血中濃度が低下していることが明らかとなった(図 5)。



図5 抗ZAG抗体を用いたウエスタンブロット法

C-9 加齢関連疾患に関連する微量タンパク質解析技術の確立

認知症および骨粗鬆症患者の血清について検体採取・保存およびプロテオームファクトリーへの

提供体制を継続した。

CADASIL脳および対照脳から微小血管のRIPA buffer可溶性画分、Urea/Thiourea可溶性画分、およびギ酸可溶性画分中のたんぱく質のリストを作成した。その結果、CADASIL脳では対照脳と比較して、数種のHSPs、ミオシン、およびコラーゲンが増加し、 α アクチンが減少していることが明らかとなった。これらの結果は、既に報告されている免疫組織化学の結果とよく合致した。

右総頸動脈結紮により、結紮側の脳半球における脳血流の低下を認めた。結紮2時間後において、術前と比較して約65%まで脳血流の低下を示し、この変化は1ヶ月後まで有意に持続した。さらに、本システムを施して1ヶ月後のマウスでは、非空間的作業記憶の低下を認めた。さらに、脱髄・軸索損傷などの大脳白質病変を認めた。

骨芽細胞様MC3T3-E1細胞において、EGCGは10~100 mMの範囲で用量依存性にPGF_{2 α} によるVEGF産生を増強した。PGF_{2 α} は既報のp44/p42 MAPKに加えて、p38 MAPKおよびSAPK/JNKのリン酸化を促進した。PGF_{2 α} によるVEGF産生はp38 MAPKの阻害剤であるSB203580およびSAPK/JNKの阻害剤であるSP600125により抑制された。EGCGはPGF_{2 α} によるp42/p44 MAPKおよびp38 MAPKのリン酸化に何ら影響しなかったが、SAPK/JNKおよびc-Junのリン酸化を顕著に増強した。SP600125はPGF_{2 α} によるSAPK/JNKのリン酸化に対するEGCGの増強効果を減弱した。

一方、MC3T3-E1細胞および初代培養マウス骨芽細胞において、EGCGはET-1によるIL-6産生を抑制した。MC3T3-E1細胞において、SB203580はET-1によるIL-6産生を抑制したが、SP600125は何ら影響しなかった。EGCGはET-1によるp44/p42 MAPKのリン酸化を抑制したが、p38 MAPKのリン酸化に何ら影響しなかった。プロテインキナーゼC活性化物質であるTPAによるIL-6産生およびp44/p42 MAPKのリン酸化はEGCGにより抑制された。さら

にEGCGはET-1およびTPAによるMEK1/2あるいはRaf-1のリン酸化を抑制した。

C-10 疾患関連たんぱく質解析に関する研究

乳癌16例、大腸癌8例、閉塞性肺疾患32例、運動ニューロン病20例を、プロテオーム解析終了および現在解析中である。

ある1患者の乳癌と正常組織の比較においては、乳癌組織でのみ発現しているたんぱく質、乳癌で最大47倍の発現量がみられるたんぱく質から発現がみられないたんぱく質まで、約1,000種類のたんぱく質が解析された。大腸癌については、約970種類のたんぱく質が同定可能であることが明らかになった。現在データを集積中であり、臨床症状との相関について解析していく予定である。血清に関しては、プロテオーム解析は終了しており、近日各たんぱく質の比較定量値と臨床情報との相関解析の予定である。

今回、癌組織の解析については、患者の正常組織の確保に難渋した。当初予定していたリンパ腫については、患者の正常組織を採取することは問題があり、同一患者での正常組織は十分に確保できず、途中で断念せざるをえなかった。

C-11 疾患関連蛋白質解析のための質量分析法の確立

1) マーカー候補ペプチド(SRP-68由来)の検証

大腸癌患者5例、膵臓癌4例、肝臓癌5例、前立腺癌12例、腎細胞癌4例、肺癌5例(小細胞癌、肺腺癌、扁平上皮癌)、健常者尿11例の比較解析から、半定量的だが、肺癌、前立腺癌患者の7例において、同一のペプチド(SRP-68のN末端領域の26残基からなるペプチド)が多量に検出された。ペプチドのC末端領域を認識する抗体を作成したが、特異な配列のため良好な力価の抗体は得られなかった。そこで、本ペプチドの親水性の性質を利用した分離法を確立し、また安定同位体で標識したペプチドを調製、尿中にスパイクして定量する方法を確立

して、健常者および各種癌について検証を行った。健常者尿を用いて日間での変動を解析した結果、量的な変動が見られ、本ペプチドのマーカーとしての有効性は低いと結論した。

2) 尿蛋白質及び糖蛋白質糖鎖のプロファイリング法の確立とデータベース構築

尿たんぱく質・ペプチドのプロファイリングと合わせて、糖鎖修飾を検出・構造解析する方法を昨年度に引き続きオンラインnanoLC/ESI-MS/MSを用いて検討した。膵臓癌(5人)、肺癌(2人)、健常人(3人)で尿由来の分子量10 k Da以上のたんぱく質画分について、前年度に引き続き、たんぱく質プロファイルを得て、プロテオームデータベースを構築した。健常人との比較解析の結果、癌患者尿よりマーカー候補たんぱく質を4種類見出した。その内の1つ(Leucine-rich α -2-glycoprotein precursor)は膵臓癌患者血中でも優位に増加していることが報告されていた(J. Chromato. B, 2007, 852, pp257-67.)。

3) 尿糖蛋白質由来CA19-9糖鎖抗原の探索

尿中には、腫瘍マーカーである CA19-9(シアリル Le^a 抗原)を有していると推定される糖たんぱく質が多く含まれていることが質量分析の結果から予想された。尿中から、抗原を有する糖ペプチドを抗 CA19-9 モノクローナル抗体により効率よく単離する方法を確立した。膵臓癌患者尿を中心に抗原糖ペプチドを単離、網羅的に同定した結果、膵臓癌患者尿中には腫瘍マーカーである CA19-9 を有している糖たんぱく質が多く含まれていることが推定された。

C-12 大腸癌の糖脂質の構造解析

大腸癌細胞および正常粘膜上皮細胞の糖鎖の発現パターンは症例で若干異なるが、ほぼ全例で共通する特徴を有した。

1) 中性糖脂質

正常大腸粘膜上皮細胞は、中性の lactose と Le^a

が主な構成成分である。一方、大腸癌細胞では、中性糖脂質は Le^a の割合が低下し、Le^x、Le^y、Le^b の発現が著明に増加する傾向にあった。ただし、症例によっては Le^y、Le^b が正常粘膜でも発現が高い症例があった。癌細胞の特徴のひとつとして、正常粘膜ではほとんど検出されない fucose が付加されていない nLc₄、nLc₆ が、癌細胞には比較的高発現していることがあげられた。

2) 酸性糖脂質

大腸正常粘膜細胞では、癌細胞に比較して酸性糖脂質の発現は極めて低い。癌化に伴い、酸性糖脂質の全糖脂質に占める割合が約 20%に上昇する。中でも、以下に示すような α 2-6 Sialyl nLc₄、Sialyl Le^x、Sialyl Le^a、昨年我々が発見した新規の糖鎖 α 2-6 Sialyl blood group H (SBH) antigen などの発現上昇は、ほとんどすべての症例に認められた。



C-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
研究成果 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：

本年度は、2回のPF倫理審査委員会が開催され、5 研究協力機関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：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)(平成19年10月11日迄)
- ・同 委員：平井 みどり
(神戸大学医学部付属病院、外部委員)
(平成19年10月12日から)
- ・同 委員：手嶋 豊
(神戸大学大学院法学研究科、外部委員)
- ・同 委員：脇舛 光廣
((医薬基盤研)、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の解析

- ・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たんぱく質の探索(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たんぱく質の探索(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

・日本赤十字社：

ヒト血液および血清成分のたんぱく質の探索
(健常人血液試料)

・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：

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 倫理審査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」)に基づき(2)、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、健常人および各種 26 疾患 532 患者から 730 検体試料(血清、組織等)を受け入れ、解析可能検体をすべて解析した。

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20年2月6日現在)

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	検体数
国立成育医療センター	血清	ネフローゼ	28	68
	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	10	10
	髄液	パーキンソン病	10	10
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	腎血管性高血圧	10	20
	血清	糖尿病治療前後の動脈硬化	6	12
	血清	急性期心不全症	20	40
	血清	高コレステロール血症	10	20
	血清	急性心筋梗塞及び類似疾患	11	22
	血清	肺高血圧症	12	18
	血清	周産期心筋症	6	12
国立長寿医療センター	血清	骨粗鬆症	19	19
	血清	認知症	18	18
国立国際医療センター	血清	糖尿病合併動脈硬化症	128	128
	血清	健常人(糖尿病非罹患患者)	42	42
	血清	慢性閉塞性肺疾患(COPD)	10	10
大阪府立成人病センター	血清	胃がん	37	65
	組織	胃がん(正常部位、病巣部位)	24	48
大阪大学医学部	血清	筋萎縮性側索硬化症(ALS)	20	20
	組織	乳がん	16	32
	血清	COPD	21	21
	血清	間質性肺炎	5	5
	血清	間質性肺炎 LAM	6	6
	組織	大腸がん	8	16
日本赤十字	血清	健常人	30	30
合 計			532	730
内訳:				
血清			474	624
組織			48	96
髄液			10	10

研究成果2(実験結果および考察)

1) cICAT 法による患者血清たんぱく質の解析研究:

(1) 概要

各研究協力機関から提供された、23 疾患及び日本人健常者の全ての血清(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した(一部溶血検体は除く)。その内訳は、糖尿病合併動脈硬化症128検体、ネフローゼ等78検体、パーキンソン病12検体、パーキンソン病様症候群10検体、脳動脈閉塞による急性期脳卒中16検体、腎血管性高血圧20検体、糖尿病治療前後の動脈硬化12検体、急性期心不全症40検体、高コレステロール血症20検体、急性心筋梗塞及び類似疾患22検体、肺高血圧症18検体、周産期心筋症12検体、骨粗鬆症19検体、認知症18検体、胃がん65検体、筋萎縮性側索硬化症(ALS)20検体、慢性閉塞性肺疾患10検体、COPD21検体、間質性肺炎等11検体、健常人血清として糖尿病非罹患患者42検体(国際医療センター提供)およびボランティア健常人血清30検体(日本赤十字社提供)であった。これらの解析結果は各研究協力機関に開示され、今後、臨床情報との詳細な相関性を検討する予定である。また、解析結果と臨床情報は疾患関連たんぱく質データベースに格納した。

(2) 日本人血清と外国人血清の比較

上述の解析結果は、全て外国健常人のプール血清を標準血清(CTS02S)として患者血清と比較検討(患者血清/標準血清)したものである。

昨年報告したように、標準血清と日本人健常人4名血清との比較では、大部分の血清たんぱく質に関しては大きな差異が認められなかったが、血

清の調製法の相違により、血小板由来たんぱく質及び凝固系たんぱく質等の一部に差異が認められた。従って、ネフローゼ等(7)のように、同一患者で発症前後の比較する場合は臨床情報と良く相関するたんぱく質が見出されたが(4)、多数の患者背景が異なる糖尿病のような疾患をより詳細に解析するためには、日本人の多数の健常人血清と比較解析することが重要である。そこで、国際医療センターより提供された日本人健常人血清(糖尿病非罹患患者)42検体(23-61才、男性22名、女性20名)及び日本赤十字社より提供されたボランティア健常人血清30検体(18-60才、男性15名、女性15名)を標準血清(CTS02S)と比較検討した。すなわち、標準血清をL試薬で、日本人健常人血清をH鎖で標識し、各個体の同定たんぱく質と比較定量値(H/L)を算出し、その平均値(H/L, mean)と標準偏差(sd(ln))を調べた(表2-1-2-3)。その結果、国際医療センターの健常人血清で、血小板由来のPlatelet factor 4、Pro-platelet basic protein、Glycoprotein、Secreted protein(acidic)等は高値(H/L=8-20)もしくは定量不能であったが、それ以外のたんぱく質の多くは大きな差異は認められなかった(H/L≒1)。しかし、より詳細に検討すると、血清主要たんぱく質の補体たんぱく質等(H, B, C3, I, Ceruloplasmin etc)の一部のたんぱく質に関しては、10-40%の範囲ではあるが、外国人標準血清とは有意の差異があることが分かった。この傾向は日本赤十字社より提供された健常人血清でも同様に観察され、日本人と外国人(米国)の人種差に起因する可能性が考えられた。従って、より厳密に患者血清たんぱく質の値を健常人血清たんぱく質と比較する時には用いる標準血清に留意しなければならないかも知れない。

表 2-1 日本人健常者血清と外国人標準血清との比較

	GI#	Description	国際(n=42)		日赤(n=30)		日赤/国際
			Ratio(H/L)		Ratio(H/L)		
			mean	sd(ln)	mean	sd(ln)	
1	8923896	acetyl-CoA synthetase 2 isoform a	N/A	N/A			
2	4501987	afamin precursor; alpha-albumin	1.019	0.149	1.064	0.107	0.957
3	4502027	albumin precursor; PRO0883 protein			N/A	N/A	
4	21071030	alpha 1B-glycoprotein	0.759	0.167	0.875	0.147	0.867
5	4502067	alpha-1-microglobulin/bikunin precursor; Alpha	1.063	0.108	1.116	0.116	0.953
6	4502337	alpha-2-glycoprotein 1, zinc; Alpha-2-glycopro	0.533	N/A	1.000	0.439	0.533
7	4502005	alpha-2-HS-glycoprotein; Alpha-2HS-glycopro	0.955	0.164	1.023	0.178	0.934
8	66932947	alpha-2-macroglobulin precursor	1.022	0.233	1.049	0.285	0.974
9	115583663	alpha-2-plasmin inhibitor	1.204	0.113	1.345	0.117	0.895
10	4502167	amyloid beta A4 protein precursor isoform a; pr	N/A	N/A			
11	4557313	angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5 pr	0.942	0.172	0.982	0.162	0.959
12	7662474	ankyrin repeat domain 26	N/A	N/A			
13	50513243	anthrax toxin receptor 2; capillary morphogene	N/A	N/A			
14	4502149	apolipoprotein A-II precursor	0.986	0.136	0.998	0.148	0.988
15	105990532	apolipoprotein B precursor	1.215	0.272	1.257	0.247	0.967
16	4502161	apolipoprotein C-IV	1.098	0.417	1.188	0.459	0.924
17	4502163	apolipoprotein D precursor	1.052	0.180	1.493	0.198	0.704
18	4557325	apolipoprotein E precursor; apolipoprotein E3	0.928	0.310	1.082	0.193	0.858
19	4502165	apolipoprotein F precursor	0.748	N/A			
20	22091452	apolipoprotein M; NG20-like protein	1.033	0.151	1.057	0.209	0.977
21	28466979	ARHGAP15; uncharacterized bone marrow prot	N/A	N/A	N/A	N/A	
22	38569405	arylsulfatase B isoform 1 precursor; N-acetylgl	N/A	N/A			
23	93277115	ataxin 7-like 2	N/A	N/A			
24	21450863	attractin isoform 2; attractin-2; mahogany prot	0.899	0.124	0.881	0.119	1.020
25	4501885	beta actin; beta cytoskeletal actin	N/A	N/A	N/A	N/A	
26	13775595	beta tryptase 1 precursor; tryptase II; mast cel	0.904	0.110	0.840	N/A	1.076
27	4557327	beta-2-glycoprotein I precursor	0.981	0.240	1.082	0.149	0.907
28	4757826	beta-2-microglobulin precursor	1.006	N/A	1.025	N/A	0.981
29	41350333	beta-tubulin cofactor D	N/A	N/A			
30	4557373	biotinidase precursor	0.993	0.159	1.049	0.140	0.947
31	4557351	butyrylcholinesterase precursor	0.887	0.200	1.071	0.398	0.828
32	13994280	C1q and tumor necrosis factor related protein	0.708	N/A			
33	4757960	cadherin 1, type 1 preproprotein; cadherin 1, E-	0.842	0.060			
34	118766335	calcium binding protein 39-like	1.095	0.112			
35	42475534	calsynntenin 3; alcadin	0.726	N/A			
36	4503011	carboxypeptidase N, polypeptide 1, 50kD precu	1.009	0.236	1.126	0.176	0.896
37	21071039	carnosinase 1; glutamate carboxypeptidase-like	1.264	0.138			
38	47777317	cartilage acidic protein 1; chondrocyte express	1.007	N/A	N/A	N/A	
39	40217843	cartilage oligomeric matrix protein precursor; e	1.204	0.222	N/A	N/A	
40	39753970	cathelicidin antimicrobial peptide	0.854	0.281	1.051	0.233	0.813
41	4557417	CD14 antigen precursor	0.877	0.142	0.710	0.290	1.235
42	44662834	CD163 antigen isoform a; macrophage-associat			N/A	N/A	
43	48255935	CD44 antigen isoform 1 precursor; cell surface	1.122	0.316			
44	5174411	CD5 antigen-like (scavenger receptor cysteine	0.978	0.455	0.891	0.197	1.098
45	27894376	cell adhesion molecule with homology to L1CA	0.862	0.203	0.727	0.276	1.185
46	4557485	ceruloplasmin (ferroxidase); Ceruloplasmin	0.720	0.127	0.763	0.136	0.944
47	4557443	cholesteryl ester transfer protein, plasma precu	0.746	0.458	N/A	N/A	
48	24308201	chromosome 20 open reading frame 3; adipocyt	0.801	0.302	0.817	0.223	0.981
49	4758012	clathrin heavy chain 1; clathrin, heavy polypep	N/A	N/A			
50	42716297	clusterin isoform 1; complement-associated pr	0.971	0.109	1.081	0.076	0.899
51	4503635	coagulation factor II precursor; prothrombin	0.855	0.111	0.951	0.083	0.898
52	4503649	coagulation factor IX; Coagulation factor IX (pl	0.954	0.184	0.524	0.146	1.821
53	105990535	coagulation factor V precursor	0.649	0.214	0.746	0.127	0.870
54	4503645	coagulation factor VII precursor isoform a; Coa	1.134	0.256	1.021	0.144	1.110
55	4503625	coagulation factor X precursor; prothrombinase	0.889	0.163	0.860	0.184	1.033
56	145275213	coagulation factor XII precursor	0.850	0.417	0.780	0.448	1.089
57	119395709	coagulation factor XIII A1 subunit precursor	N/A	N/A	0.940	N/A	
58	110611237	coagulation factor XIII B subunit precursor	0.696	0.139	0.726	0.155	0.958
59	42544177	complement component (3d/Epstein Barr virus	0.811	N/A			
60	73858568	complement component 1 inhibitor precursor	0.963	0.113	0.963	0.127	1.000
61	7705753	complement component 1, q subcomponent, B	0.939	0.147	0.955	0.088	0.983
62	87298828	complement component 1, q subcomponent, alpha	0.865	0.128	0.907	0.152	0.953
63	56786155	complement component 1, q subcomponent, gamma	0.873	0.129	0.894	0.112	0.977
64	66347875	complement component 1, r subcomponent	0.817	0.147	0.873	0.133	0.936
65	7706083	complement component 1, r subcomponent-like	0.860	0.122	0.922	N/A	0.932
66	4502495	complement component 1, s subcomponent	0.847	0.134	0.890	0.122	0.951
67	14550407	complement component 2 precursor; C3/C5 co	0.789	0.152	0.816	0.102	0.967
68	115298678	complement component 3 precursor	0.690	0.130	0.760	0.098	0.908
69	4502503	complement component 4 binding protein, alpha	0.770	0.139	0.787	0.127	0.979
70	4502505	complement component 4 binding protein, beta	0.837	0.174	0.815	0.140	1.027
71	67190748	complement component 4A preproprotein	0.795	0.239	0.794	0.222	1.001
72	50345296	complement component 4B preproprotein; Chic	0.623	N/A			
73	38016947	complement component 5	0.790	0.159	0.891	0.099	0.887
74	4559406	complement component 6 precursor	0.869	0.118	0.869	0.149	1.000
75	45580688	complement component 7 precursor	1.021	0.168	0.981	0.236	1.040
76	4557389	complement component 8, alpha polypeptide pr	1.188	0.160	1.012	0.189	1.174
77	4557391	complement component 8, beta polypeptide	1.014	0.127	0.902	0.109	1.125
78	4557393	complement component 8, gamma polypeptide	0.850	0.132	0.800	0.139	1.063
79	4502511	complement component 9	0.701	0.263	0.725	0.279	0.967
80	67782358	complement factor B preproprotein	0.681	0.155	0.647	0.230	1.053
81	42544239	complement factor D preproprotein; adipsin; pr	0.926	N/A			
82	62739186	complement factor H isoform a precursor	0.733	0.142	0.760	0.103	0.965
83	62739188	complement factor H isoform b precursor	0.613	N/A			
84	118442839	complement factor H-related 1	1.602	0.324	1.624	0.384	0.987
85	54792787	complement factor H-related 3	1.437	0.221	1.433	0.262	1.003
86	119392081	complement factor I	0.759	0.127	0.807	0.123	0.940
87	28373117	contactin 1 isoform 1 precursor; glycoprotein g	1.674	N/A			
88	32307161	cullin 1	0.672	0.242	0.741	N/A	0.907
89	4503107	cystatin C precursor; cystatin 3; gamma-trace	0.865	0.169	0.833	0.129	1.038
90	6912276	cysteine-rich hydrophobic domain 2; BRX-like	N/A	N/A			
91	5174675	cysteine-rich secretory protein 3; specific gran	0.944	0.260	0.958	0.259	0.985
92	4758146	defensin, alpha 1 preproprotein	1.245	0.363	1.333	0.310	0.397
93	18765694	dipeptidylpeptidase IV; dipeptidylpeptidase IV (1.276	N/A	N/A	N/A	
94	116534900	dopamine beta-hydroxylase precursor	1.256	0.412	1.667	0.309	0.754
95	9665262	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix	0.975	0.134	N/A	N/A	
96	4758232	endothelin converting enzyme-like 1; X convert	0.802	0.019			
97	5729814	Ets2 repressor factor	N/A	N/A	N/A	N/A	
98	23943902	EVIN1; expressed in activated T/LAK lymphoc			N/A	N/A	
99	4758236	extracellular matrix protein 1 isoform 1 precurs	1.627	0.295	1.713	0.064	0.950
100	13540563	factor H-related protein 5	0.540	0.252	0.608	0.230	0.889

*なお、N/A はピーク混雑等により比較定量が不能であることを示す。

表 2-2 日本人健常者血清と外国人標準血清との比較

GI#	Description	国際(n=42) Ratio(H/L)		日赤(n=30) Ratio(H/L)		日赤/国際 Ratio	
		mean	sd(ln)	mean	sd(ln)		
101	4503681	Fc fragment of IgG binding protein; IgG Fc bind	1.021	0.236	1.094	0.384	0.933
102	58331240	fetuin B	0.802	0.381	N/A	N/A	
103	70906435	fibrinogen, beta chain preproprotein	0.524	0.495	0.819	N/A	0.639
104	70906437	fibrinogen, gamma chain isoform gamma-A pre	N/A	N/A			
105	5730075	fibrinogen-like 2; fibrinogen-like protein 2; fibro	2.485	0.106	N/A	N/A	
106	4503697	fibroblast growth factor 1 (acidic) isoform 1 pre	N/A	N/A			
107	16933542	fibronectin 1 isoform 3 preproprotein; cold-insol	1.873	0.206	1.971	0.255	0.950
108	34734062	fibulin 1 isoform C precursor	1.037	0.194	1.121	0.260	0.925
109	11606357	filamin A, alpha	N/A	N/A	N/A	N/A	
110	46409278	FLJ32921 protein	0.661	0.066			
111	5031863	galectin 3 binding protein; L3 antigen; Mac-2-b	0.410	0.202	0.556	0.331	0.738
112	4504165	gelsolin isoform a	1.156	0.135	1.099	0.194	1.052
113	4758460	glycoprotein V (platelet)	N/A	N/A	N/A	N/A	
114	14377075	glycoprotein VI (platelet) isoform 2	N/A	N/A	N/A	N/A	
115	20304127	GS2 like	N/A	N/A			
116	5031695	H factor (complement)-like 3; factor H-related	0.469	0.474	0.559	0.633	0.838
117	45580723	haptoglobin-related protein; Haptoglobin-relate	0.362	0.346			
118	46371197	heart alpha-kinase	N/A	N/A	N/A	N/A	
119	11321561	hemopexin	0.923	0.078	0.946	0.108	0.976
120	12601257	heparan sulfate proteoglycan 2	1.428	N/A			
121	73858566	heparin cofactor II precursor	1.037	0.226	1.109	0.253	0.935
122	4504383	HGF activator preproprotein	1.084	0.151	1.062	0.194	1.021
123	4504489	histidine-rich glycoprotein precursor; histidine-	0.859	0.217	0.925	0.232	0.929
124	4758502	hyaluronan binding protein 2; hyaluronin acid bi	0.893	0.149	0.942	0.088	0.948
125	19923913	hypothetical protein BC008604	N/A	N/A	N/A	N/A	
126	19923899	hypothetical protein BC009518	0.706	0.101			
127	8922787	hypothetical protein FLJ10948	N/A	N/A			
128	22749319	hypothetical protein FLJ32800	N/A	N/A			
129	71999153	hypothetical protein LOC23334	0.795	0.234			
130	58218986	hypothetical protein LOC387357	N/A	N/A			
131	66730423	hypothetical protein LOC389384	1.063	0.029			
132	27735041	hypothetical protein MGC40179	N/A	N/A			
133	21489959	immunoglobulin J chain	1.181	0.563	N/A	N/A	
134	99028953	inscuteable isoform a	0.768	0.052	0.777	N/A	0.988
135	11022758	inscuteable isoform b	0.727	N/A			
136	11024682	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C); in	N/A	N/A	N/A	N/A	
137	4504609	insulin-like growth factor 2	1.677	N/A			
138	55925576	insulin-like growth factor binding protein 2, 36k	1.737	0.658	0.683	N/A	2.543
139	62243068	insulin-like growth factor binding protein 3 isof	1.223	0.193	1.182	0.197	1.034
140	62243290	insulin-like growth factor binding protein 4 pre	0.819	0.286	0.835	0.212	0.980
141	10834982	insulin-like growth factor binding protein 5	N/A	N/A	2.308	N/A	
142	11321593	insulin-like growth factor binding protein 6	1.127	0.245			
143	4826772	insulin-like growth factor binding protein, acid l	1.066	0.188	1.219	0.167	0.875
144	4504779	integrin, beta 8	N/A	N/A			
145	4504781	inter-alpha (globulin) inhibitor H1; inter-alpha (0.957	0.111	1.062	0.115	0.901
146	31542984	inter-alpha (globulin) inhibitor H4 (plasma Kallik	0.876	0.118	0.901	0.117	0.973
147	70778918	inter-alpha globulin inhibitor H2 polypeptide	1.871	0.289	1.673	0.096	1.118
148	4504557	intercellular adhesion molecule 2 precursor	0.938	0.374	N/A	N/A	
149	48526516	ion transporter protein	N/A	N/A	N/A	N/A	
150	54792092	KIAA0431 protein	N/A	N/A			
151	4504893	kininogen 1; alpha-2-thiol proteinase inhibitor; f	0.874	0.146	0.870	0.113	1.005
152	4557707	L1 cell adhesion molecule isoform 1 precursor;	0.827	0.256	N/A	N/A	
153	54607120	lactotransferrin	N/A	N/A	N/A	N/A	
154	4504951	laminin, beta 1 precursor	N/A	N/A			
155	46249412	latent transforming growth factor beta binding p	N/A	N/A			
156	16418467	leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1; 2310031E	0.454	0.423			
157	62912470	leucine-rich repeat-containing G protein-coupl	1.642	0.118	N/A	N/A	
158	31543056	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfam	0.261	N/A	N/A	N/A	
159	11629275	lipoprotein Lp(a) precursor	0.366	1.012	0.774	0.857	0.472
160	13281448	low affinity immunoglobulin gamma Fc region re	0.646	0.267	0.678	0.297	0.952
161	4504965	L-plastin; Lymphocyte cytosolic protein-1 (pla	0.906	0.016			
162	4505047	lumican	N/A	N/A			
163	11238062	lysosomal-associated membrane protein 1	1.761	N/A	N/A	N/A	
164	4557894	lysozyme precursor	1.025	0.206	1.222	0.217	0.838
165	31543212	macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth f	1.282	0.140	1.337	0.209	0.959
166	21264357	mannan-binding lectin serine protease 1 isofor	1.350	0.185	1.296	0.170	1.041
167	21264359	mannan-binding lectin serine protease 1 isofor	1.243	0.012			
168	16418385	mediator of RNA polymerase II transcription su	N/A	N/A			
169	4504191	mutS homolog 6; G/T mismatch-binding protein	0.561	N/A			
170	9257232	orosomucoid 1 precursor; Orosomucoid-1 (alph	0.657	0.297	0.682	0.229	0.963
171	4505529	orosomucoid 2; alpha-1-acid glycoprotein, type	0.680	0.292	0.661	0.168	1.028
172	4506547	pancreatic ribonuclease precursor; RNase upl-	1.588	0.179	1.466	0.139	1.083
173	19923106	paraoxonase 1; Paraoxonase	1.023	0.315	1.073	0.223	0.953
174	28866955	PBX/knotted 1 homeobox 1 isoform 1; human h	N/A	N/A			
175	13994151	PDZ and LIM domain 1 (elfin); carboxy terminal	N/A	N/A	N/A	N/A	
176	21361845	peptidoglycan recognition protein L precursor	0.897	0.149	0.936	0.157	0.958
177	10863927	peptidylprolyl isomerase A	N/A	N/A	N/A	N/A	
178	31543410	phospholipase A2, group VII; platelet-activating	1.078	0.369	1.664	N/A	0.648
179	4505873	phospholipase D1, phosphatidylcholine-specific;	0.904	0.058			
180	12627356	plasma carboxypeptidase B2 isoform a preprop	0.958	0.202	1.046	0.229	0.916
181	4503627	plasma coagulation factor XI precursor isoform	1.015	0.182	0.933	0.225	1.087
182	78191798	plasma kallikrein B1 precursor	0.908	0.127	0.952	0.126	0.954
183	4505881	plasminogen	0.957	0.098	1.006	0.093	0.961
184	74048573	plasminogen-like B1	1.340	N/A			
185	4505883	plasminogen-like B2	0.991	0.243	N/A	N/A	
186	4505897	plastin 1; I isoform; Plastin-1	0.906	0.016			
187	4505733	platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif) ligo	8.147	N/A	N/A	N/A	
188	47419932	platelet glycoprotein Ib alpha polypeptide precu	1.405	0.103	N/A	N/A	
189	34996489	pleckstrin homology domain interacting protein	0.923	N/A			
190	21955172	pleckstrin homology-like domain, family B, mem	0.700	0.391	N/A	N/A	
191	4505937	polymerase (DNA directed), gamma	N/A	N/A			
192	4557363	PR domain containing 1, with ZNF domain isofor	0.826	0.303	0.953	0.234	0.866
193	93204879	PR domain containing 15 isoform 1	N/A	N/A			
194	88985511	PREDICTED: hypothetical protein	N/A	N/A	N/A	N/A	
195	89037239	PREDICTED: hypothetical protein	0.717	N/A			
196	11342471	PREDICTED: hypothetical protein	N/A	N/A			
197	88971372	PREDICTED: similar to Carboxypeptidase N su	0.944	0.157	0.932	0.121	1.013
198	89057120	PREDICTED: similar to Complement C3 precur	0.567	N/A			
199	89068437	PREDICTED: similar to PRAME family member	0.765	0.257			
200	4506355	pregnancy-zone protein; Pregnancy zone prote	0.431	1.122	0.543	0.683	0.793

*なお、N/Aはピーク混雑等により比較定量が不能であることを示す。

表 2-3 日本人健常者血清と外国人標準血清との比較

	GI#	Description	国際(n=42)		日赤(n=30)		日赤/国際
			Ratio(H/L)		Ratio(H/L)		
			mean	sd(ln)	mean	sd(ln)	
201	gi 33620751	prenylcysteine oxidase 1; prenylcysteine lyase	1.467	0.052			
202	gi 4505643	procollagen C-endopeptidase enhancer; procoll	0.879	0.198	0.881	0.232	0.998
203	gi 4826898	profilin 1; profilin-1	3.700	0.446	N/A	N/A	
204	gi 4505737	properdin P factor, complement	0.843	0.213	0.739	0.184	1.141
205	gi 4505981	pro-platelet basic protein precursor; connectiv	21.683	0.139	N/A	N/A	
206	gi 31317307	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 p	N/A	N/A	N/A	N/A	
207	gi 32171249	prostaglandin D2 synthase 21kDa; prostaglandi	0.617	0.420	N/A	N/A	
208	gi 4506115	protein C (inactivator of coagulation factors Va	1.078	0.203	1.000	0.213	1.078
209	gi 4506117	protein S (alpha); Protein S, alpha	0.925	0.156	0.917	0.124	1.010
210	gi 4506121	protein Z, vitamin K-dependent plasma glycopr	0.840	0.396	0.828	0.374	1.014
211	gi 46276889	proteoglycan 2 preproprotein; eosinophil granul	0.791	N/A			
212	gi 67190163	proteoglycan 4	0.847	0.290	0.936	0.261	0.905
213	gi 10835248	regenerating islet-derived 1 beta precursor; lith	N/A	N/A			
214	gi 82659109	retinoblastoma-associated factor 600	N/A	N/A			
215	gi 4506427	retinoic acid receptor responder (tazarotene in	1.117	N/A	N/A	N/A	
216	gi 55743122	retinol-binding protein 4, plasma precursor	1.055	0.270	1.119	0.252	0.943
217	gi 115430108	rho-related BTB domain containing 3			1.121	N/A	
218	gi 4506557	ribonuclease, RNase A family, 4 precursor			0.803	N/A	
219	gi 31543380	RNA-binding protein regulatory subunit; oncoge	2.897	N/A	N/A	N/A	
220	gi 4507171	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteone	N/A	N/A	N/A	N/A	
221	gi 4506875	selectin L; lymph node homing receptor; lympho	0.858	N/A			
222	gi 62530391	selenoprotein P isoform 1 precursor	1.305	0.191	1.305	0.008	1.000
223	gi 148277018	selenoprotein P isoform 1 precursor	1.267	N/A			
224	gi 148277022	selenoprotein P isoform 2	1.267	N/A			
225	gi 21361302	alpha-1 antiprotease, antitrypsin	1.130	0.156	1.118	0.208	1.011
226	gi 50659080	alpha-1-antichymotrypsin; antichymotrypsin	0.808	0.145	0.938	0.108	0.862
227	gi 4502261	antithrombin III	0.989	0.118	1.087	0.095	0.909
228	gi 39725934	alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derive	0.857	0.180	0.872	0.196	0.983
229	gi 7382460	sex hormone-binding globulin; Sex hormone-bin	1.220	N/A			
230	gi 117190519	sialidase 3	0.984	0.065	N/A	N/A	
231	gi 21359871	SPARC-like 1; hevin; mast9	N/A	N/A			
232	gi 67782336	tenascin XB isoform 1			0.931	N/A	
233	gi 4507557	tetranectin (plasminogen binding protein); tetra	1.106	0.132	1.123	0.162	0.985
234	gi 40317626	thrombospondin 1 precursor	1.395	0.614	N/A	N/A	
235	gi 31543806	thrombospondin 4 precursor	1.569	N/A			
236	gi 4557871	transferrin; PRO2086 protein	1.069	0.057	N/A	N/A	
237	gi 4507467	transforming growth factor, beta-induced, 68kD	0.896	0.130	1.204	N/A	0.744
238	gi 4507725	transthyretin; prealbumin	1.242	0.244	1.296	0.255	0.958
239	gi 4507651	tropomyosin 4			N/A	N/A	
240	gi 94536793	tubulin tyrosine ligase-like family, member 7	1.920	N/A			
241	gi 4507611	tyrosine kinase, non-receptor, 1; tyrosine kinas			N/A	N/A	
242	gi 28372497	ubiquitin protein ligase E3 component n-recogr	0.860	0.175	N/A	N/A	
243	gi 54607139	vacuolar protein sorting 13D isoform 1			N/A	N/A	
244	gi 32483410	vitamin D-binding protein precursor; vitamin D-	1.043	0.106	1.085	0.106	0.961
245	gi 88853069	vitronectin precursor	0.942	0.109	0.923	0.248	1.020
246	gi 4557695	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral c	1.197	N/A			
247	gi 89191868	von Willebrand factor preproprotein	0.857	0.306	0.888	0.320	0.965
248	gi 17505195	wingless-type MMTV integration site family, me	2.385	N/A			
249	gi 4557835	Xaa-Pro dipeptidase; proline dipeptidase	0.729	N/A			
250	gi 115511046	zinc finger protein 258	N/A	N/A			
251	gi 117956407	zinc finger protein 568	N/A	N/A			
252	gi 57863248	zinc finger, CCHC domain containing 11 isoform	N/A	N/A			

*なお、N/Aはピーク混雑等により比較定量が不能であることを示す。

(3) 糖尿病血清たんぱく質の解析

以上のことを考慮して、本報告書では、その一例として、国際医療センターより提供された糖尿病患者を合併症の有無及び種類により群分けした血清と日本人健常者(糖尿病非罹患)血清とを標準血清を介して比較検討した結果を報告した。糖

尿病は基準値を超える血糖値等で判定されるが、血糖値が高いが未だ合併症を有さない段階の状態(糖尿病合併症なし群)と、合併症として糖尿病性腎症を有する群(腎症群)、糖尿病性網膜症を有する群(網膜症群)および糖尿病性神経症を有する群(神経症群)に大別される。今回、解析した糖尿病

患者血清 73 検体の内訳は、合併症なし群(A)が 42 検体、腎症のみ合併した腎症単独群(B)が 14 検体、網膜症のみ合併した網膜症単独群(C)が 10 検体、神経症のみ合併した神経症単独群(D)が 7 例、すべての合併症を発症した全合併症群(F)が 11 検体であり、また、糖尿病非罹患の日本人健常者血清群(E)は 42 検体(23 - 61 才、男性 22 名、女性 20 名)であった(図 1)。これらの血清をまず標準血清(CTS02S)と比較解析を行い、得られた健常者血清群と糖尿病各群の各たんぱく質の解析データの統計解析を行った。すなわち、Shapiro-Wilk test で各群が Gauss 分布のものを選択し、次いで、F test で等分散か否かを判定し、それぞれ、t test (等分散)と t test (不等分散)で p value を計算した。

表 3 に日本人健常者と 5%以下の危険率($p < 0.05$)で有意差のある糖尿病各群のたんぱく質の一部を列挙した(赤で表示)。そのうち、健常者(糖尿病非罹患, A)血清と比較して有意差($p < 0.01$)のあるたんぱく質は、合併症なし群では 25 種類、腎症単独群では 10 種類、網膜症単独群では 19 種類、神経症単独群では 8 種類、全合併症群では 20 種類であった(表 4-1, 4-2)。また、20%以上の差異があるもの(比では >1.20 , <0.833)について注目すると、von Willebrand factor (Gi#89191868)は、健常群(1.000)にくらべると、合併症なし群で 1.624 ($p = 8.6 \times 10^{-9}$)腎症単独群(B)で 1.582 ($p = 3.4 \times 10^{-4}$)、網膜症単独群(C)で 1.963 ($p = 1.3 \times 10^{-7}$)、神経症単独群(D)で 2.114 ($p = 8.5 \times 10^{-7}$)、全合併症群(F)でも 1.504 ($p = 3.2 \times 10^{-4}$)と何れも高く、一方、日本赤十字社の健常者(18 - 60 才、男性 15 名、女性 15 名)では 0.965(表 2)あり、明らかに糖尿病であると高いことが分かった。von Willebrand factor は血流のシェアリングフォースに関与し、動脈血栓の形成に重要な役割を果たしているとされている。比較的高齢者が多い他疾患の骨粗しょう症でも高値(1.97)であることから、年齢或いは動脈硬化進展に関係している可

能性が高いが、今後、臨床情報との詳細な相関性を検討することが必要であると思われた。Apolipoprotein D (Gi#4502163), Apolipoprotein M (Gi#22091452)は、合併症なし群(A)、網膜症単独群(C)で低値を示す。また、腎症単独群(B)、神経症単独群(D)および全合併症群(F)でも、有意差検定を $p < 0.05$ の基準で比較すると、Apolipoprotein M はそれぞれ 0.809、0.751、0.801 と有意な低値を示す。従って、これらの Apolipoprotein は糖尿病を発症すると低値を示す傾向があると考えられた。

単独合併症を有する糖尿病に関しては、腎症単独群(B)では補体の C2、H、B、C3 が何れも高値を示したが、日赤の健常者ではいずれも正常値を示した(表 2)。H、B、C3 は補体の第二経路の重要構成成分であり、非特異的生体防御能、免疫複体の形成及び不活性化に関与するとされ、また、ある種の慢性糸球体腎炎にも関与するとされている。その意味で、糖尿病性腎炎との関係に興味を持たれる。一方、extracellular matrix protein 1 (Gi#4758236)は 0.621 ($p = 2.8 \times 10^{-3}$)と低値を示した。本たんぱく質は、網膜症単独群(C)および全合併症群(F)でも低値(0.683 ($p = 8.7 \times 10^{-3}$), 0.689 ($p = 9.8 \times 10^{-3}$))を示したが、合併症なし群(A)及び神経症単独群(D)では有意差が認められない。また、日赤の健常者血清では 0.95 と正常値を示した(表 2)。

網膜症群単独(C)では、Galectin 3 binding protein (Gi# 5031863)が 1.544 ($p = 3.9 \times 10^{-3}$)及び EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein (Gi#9665262)が 1.408 ($p = 3.1 \times 10^{-3}$)と高値を示した。一方、日本赤十字社の健常者では Galectin binding protein は 0.738 であり、EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein は測定不能であった(表 2)。これらのたんぱく質は、他の合併症群では有意差が認められないので、網膜症に付随した炎症に関与する可能性も考えられ

た。神経症単独群 (D) に関しては、Cathelicidin antimicrobial peptide (Gi#39753970) が低値 (0.664, $p = 7.5 \times 10^{-3}$) を示した。また、有意差検定を $p < 0.05$ の基準に緩めると、腎症単独群 (B) でも 0.697 ($p = 0.012$) と有意差ありの低値を示すが、網膜単独群 (C) では有意差は認められなかった。一方、最も糖尿病が進行したと考えられる全合併症群 (F) では、pancreatic ribonuclease (Gi# 4506547) が高値 (1.768, $p=0.00021$) を示した。本たんぱく質は網膜症単独群 (C) でも高値 (1.376, $p=0.0075$) を示したが、他の群では有意差を示さなかった。また、H factor (complement)-like 3 (Gi# 5031695) は全合併症群 (F) でのみ高値を示した。本たんぱく質は補体主要制御たんぱく質 Factor H の関連たんぱく質であり C3b との結合部位は保持

しているが、その機能は殆ど解明されていない。一方、dopamine beta-hydroxylase (Gi# 116534900) も全合併症群 (F) で低値 (0.512, $p= 0.0013$) を示した。これらのたんぱく質の変動が糖尿病進展に選択的なのか或いは全身が疲弊したためなのかは、他の疾患での挙動を調べてから判断する必要がある。

以上、糖尿病に関して合併症の有無及び種類により群分けして、cICAT 法で得られたたんぱく質のデータの解析を試みた。今後は、他疾患との比較検討と同時に、複数の合併症を含む症例も対象にし、各患者の性別、年齢、BMI、血液学検査、血清・生化学検査値、罹患年数、投薬歴及びその他の多数の臨床情報を連結してたんぱく質解析データを検討することが重要であると思われた。

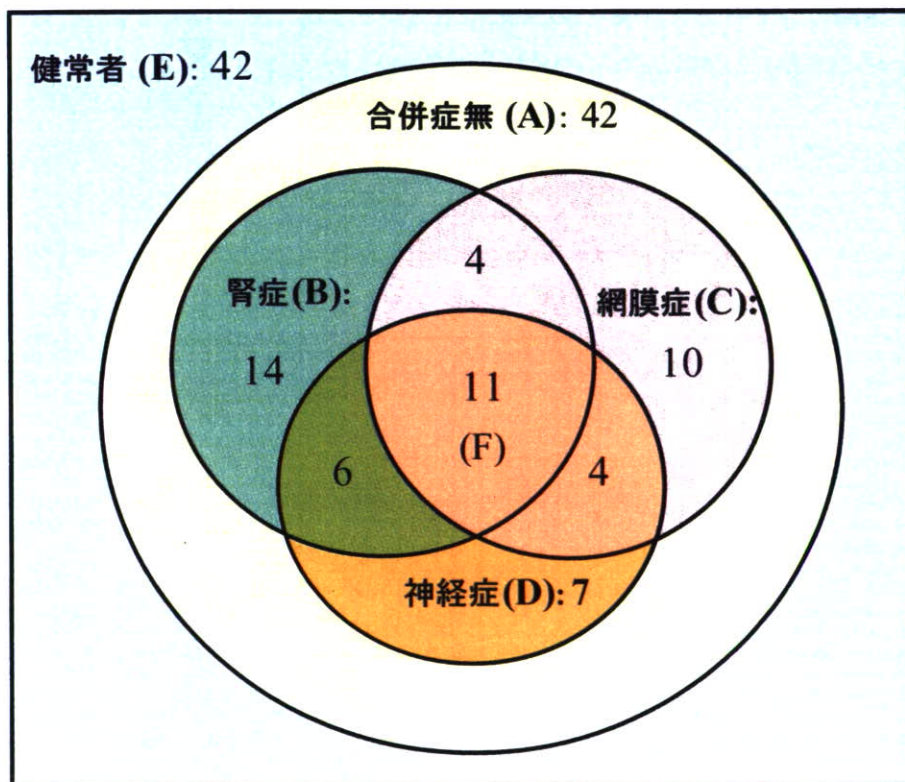


図 1. 糖尿病合併症患者の分類図 (ベン図)

表 3. 健常者と糖尿病患者の比較

Gi#	血清たんぱく質	健常者		合併症無し		腎症単独		網膜症単独		神経症単独		全合併症					
		E	A	t-test (p)	A/E	B	t-test (p)	B/E	C	t-test (p)	C/E	D	t-test (p)	D/E	F	t-test (p)	F/E
g115583663	alpha-2-plasmin inhibitor	1.204	0.970	3E-10	0.806	1.025	0.01091	0.851	0.923	4E-08	0.767	0.935	3E-06	0.777	0.932	0.0006	0.774
g38016947	complement component 5	0.790	0.979	3E-09	1.239	0.988	8.9E-06	1.250	1.031	3E-05	1.305	1.005	0.0003	1.272	0.959	0.0004	1.214
g89191868	von Willebrand factor	0.857	1.391	9E-09	1.624	1.356	1.7E-05	1.582	1.683	1E-07	1.963	1.812	9E-07	2.114	1.288	0.0003	1.504
g4502149	apolipoprotein A-II precursor	0.986	0.813	3E-07	0.825	0.829	0.00137	0.841	0.763	3E-06	0.774	0.797	0.0734	0.809	0.795	6E-05	0.807
g4502163	apolipoprotein D precursor	1.052	0.835	3E-07	0.794	0.814	0.00722	0.774	0.804	9E-05	0.764	0.908	0.0632	0.863	0.951	0.1322	0.904
g62739186	complement factor H isoform a precursor	0.733	0.854	4E-07	1.185	0.884	3.9E-05	1.206	0.878	0.0005	1.197	0.875	1E-05	1.193	0.811	0.0392	1.107
g22091452	apolipoprotein M; NG20-like protein	1.033	0.830	1E-06	0.803	0.835	4.9E-05	0.809	0.710	4E-08	0.688	0.775	0.0319	0.751	0.827	0.0155	0.801
g11321561	hemopexin	0.923	1.000	1E-06	1.083	0.993	0.00518	1.076	1.036	0.0004	1.122	0.891	0.4617	0.965	0.992	0.0123	1.075
g4507557	tetranectin	1.106	0.957	4E-06	0.865	0.916	2.4E-05	0.828	0.884	1E-05	0.799	1.039	0.2422	0.999	0.921	0.0003	0.832
g5174675	cysteine-rich secretory protein 3; specific	0.944	0.721	4E-06	0.764	0.792	0.03029	0.839	0.702	0.0068	0.743	0.826	0.2073	0.875	0.657	0.0003	0.697
g119392081	complement factor I	0.759	0.855	2E-05	1.127	0.901	1.4E-05	1.188	0.877	0.0028	1.156	0.797	0.3921	1.051	0.803	0.0175	1.059
g62243068	insulin-like growth factor binding protein 3	1.223	0.966	0.0001	0.790	0.985	0.00291	0.806	0.881	0.0002	0.721	0.668	4E-06	0.546	0.859	0.0003	0.702
g115298678	complement component 3 precursor	0.690	0.781	0.0001	1.132	0.796	0.00285	1.153	0.840	0.0001	1.217	0.829	0.0011	1.200	0.701	0.7597	1.016
g67190748	complement component 4A preproprotein	0.795	0.968	0.0003	1.218	0.852	0.39069	1.072	0.930	0.0635	1.170	0.777	0.899	0.978	0.901	0.109	1.134
g32483410	vitamin D-binding protein precursor; vitam	1.043	0.960	0.0003	0.920	0.952	0.00944	0.912	0.945	0.0173	0.906	0.809	3E-05	0.776	0.950	0.0109	0.910
g4503107	cystatin C precursor; cystatin 3; gamma-t	0.885	1.122	0.0004	1.297	0.959	0.21469	1.108	1.101	0.0241	1.273	1.024	0.078	1.183	1.388	0.0126	1.604
g45590868	complement component 7 precursor	1.021	1.163	0.0006	1.140	1.135	0.06491	1.111	1.273	0.0011	1.247	1.772	1E-05	1.735	1.312	5E-05	1.286
g62243290	insulin-like growth factor binding protein 4	0.819	1.100	0.0006	1.343	1.184	0.00407	1.447	1.045	0.04	1.276	0.904	0.4602	1.104	1.532	3E-05	1.871
g4504165	gelsolin isoform a	1.156	1.016	0.0006	0.879	0.877	0.00034	0.759	1.064	0.0907	0.920	1.078	0.2456	0.932	1.082	0.1849	0.936
g88971372	PREDICTED: similar to Carboxypeptidase I	0.944	0.837	0.0008	0.887	0.883	0.20193	0.936	0.810	0.0069	0.858	0.841	0.1107	0.891	0.787	0.0016	0.834
g4826772	insulin-like growth factor binding protein, a	1.066	0.794	0.001	0.745	1.010	0.60677	0.947	0.877	0.3657	0.822	0.513	0.0935	0.481	0.749	0.0175	0.702
g4505881	plasminogen	0.967	0.897	0.001	0.928	0.942	0.41777	0.974	0.915	0.1508	0.946	0.898	0.0764	0.928	0.886	0.0994	0.916
g9665262	EGF-containing fibulin-like extracellular m	0.975	1.440	0.0012	1.477	1.185	0.15909	1.216	1.372	0.0031	1.408	1.478	NA	4.872	1.495	0.0272	1.534
g4758236	extracellular matrix protein 1 isoform 1 pre	1.627	1.219	0.0013	0.749	1.010	0.00064	0.621	1.111	0.0087	0.683	1.310	0.548	0.805	1.121	0.0098	0.689
g47419932	platelet glycoprotein Ib alpha polypeptide p	1.405	1.799	0.0015	1.281	1.556	0.32968	1.107	0.863	NA	1.184	2.128	NA	1.515	1.974	NA	NA
g14550407	complement component 2 precursor; C3/C	0.789	0.874	0.0021	1.108	0.965	2E-07	1.223	0.874	0.0883	1.108	0.977	0.001	1.238	0.925	0.0028	1.172
g21450863	attractin isoform 2; attractin-2; mahogany	0.899	0.975	0.0026	1.085	1.000	0.01436	1.113	1.005	0.0167	1.118	1.074	0.0007	1.195	0.897	0.9658	0.998
g4557485	ceruloplasmin (ferroxidase); Ceruloplasmin	0.720	0.788	0.003	1.094	0.806	0.01589	1.120	0.800	0.0324	1.110	0.836	0.0123	1.161	1.016	0.0041	1.134
g4758146	defensin, alpha 1 preproprotein	1.245	1.736	0.0039	1.394	1.283	0.84436	1.030	1.219	0.9024	0.979	1.903	NA	1.528	1.208	0.8761	0.970
g4507725	transferrin; prealbumin	1.242	1.061	0.0053	0.854	1.117	0.22417	0.899	0.951	0.0088	0.765	0.824	0.1521	0.664	1.125	0.2812	0.905
g4557389	complement component 8, alpha polypeptide	1.188	1.071	0.0062	0.901	1.102	0.34721	0.928	1.016	0.0097	0.856	1.052	0.0742	0.886	1.009	0.0061	0.850
g16418467	leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1; 23100	0.454	0.719	0.007	1.585	0.845	0.10275	1.420	0.702	0.0436	1.546	N/A	NA	NA	1.554	NA	0.514
g4502511	complement component 9	0.701	0.826	0.0076	1.178	0.711	0.88683	1.014	0.809	0.1804	1.154	0.821	0.1813	1.171	0.872	0.0158	1.244
g4557327	beta-2-glycoprotein I precursor	0.981	1.109	0.0082	1.130	1.066	0.25725	1.086	1.142	0.0623	1.164	0.980	0.9859	0.998	1.210	0.0161	1.224
g4559406	Complement component 6 precursor	0.869	0.940	0.0089	1.082	0.864	0.8856	0.994	0.907	0.3475	1.044	0.852	0.7106	0.981	0.918	0.1728	1.056
g4557373	biotinidase precursor	0.993	0.902	0.0093	0.909	0.992	0.98604	0.999	0.856	0.0172	0.863	0.908	0.2079	0.914	0.867	0.026	0.873
g21071030	alpha 1B-glycoprotein	0.759	0.827	0.0121	1.089	0.850	0.02435	1.120	0.849	0.0618	1.119	0.837	0.1546	1.104	0.831	0.0923	1.096
g66347875	complement component 1, r subcomponent	0.817	0.878	0.0155	1.075	0.912	0.01467	1.117	0.844	0.5299	1.033	0.818	0.9717	1.002	0.875	0.1471	1.071
g145273213	coagulation factor XII precursor	0.850	0.685	0.0172	0.806	0.708	0.16037	0.833	0.685	0.1307	0.806	0.648	0.1152	0.763	0.718	0.2098	0.844
g24308201	chromosome 20 open reading frame 3; adip	0.801	0.989	0.0186	1.235	1.006	0.0589	1.256	1.026	0.0574	1.281	1.170	0.0217	1.460	1.084	0.0046	1.353
g87298828	complement component 1, q subcomponent	0.865	0.926	0.019	1.071	0.953	0.01914	1.102	0.967	0.0235	1.118	0.903	0.419	1.045	0.933	0.1003	1.079
g67782358	complement factor B preproprotein	0.681	0.742	0.0193	1.090	0.810	0.0013	1.189	0.709	0.4883	1.041	0.736	0.5081	1.081	0.625	0.1289	0.918
g116534900	dopamine beta-hydroxylase precursor	1.256	0.888	0.0207	0.707	0.932	0.17781	0.742	0.798	0.0361	0.636	1.004	0.4069	0.799	0.644	0.0013	0.512
g4502261	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, cl	0.989	0.920	0.0211	0.931	0.931	0.14646	0.942	0.904	0.0595	0.914	0.830	0.1295	0.840	0.924	0.106	0.934
g39753970	cathelicidin antimicrobial peptide	0.854	0.696	0.0214	0.814	0.595	0.012	0.896	0.859	0.9758	1.005	0.567	0.0075	0.664	0.785	0.6091	0.919
g4502495	complement component 1, s subcomponent	0.847	0.901	0.0229	1.065	0.930	0.02549	1.098	0.890	0.301	1.051	0.854	0.8817	1.008	0.894	0.2129	1.055
g70906435	fibrinogen, beta chain preproprotein	0.524	1.397	0.0232	2.669	1.214	0.17396	2.319	1.811	NA	3.459	N/A	NA	NA	NA	NA	NA
g4503635	coagulation factor II precursor; prothrombi	0.855	0.805	0.0232	0.942	0.798	0.08099	0.934	0.771	0.0133	0.903	0.703	0.0013	0.822	0.677	0.0001	0.793
g4504781	inter-alpha (globulin) inhibitor H1; inter-	0.957	0.902	0.0237	0.943	0.908	0.14176	0.949	0.844	0.1189	0.882	0.858	0.3829	0.897	0.859	0.0082	0.898
g34734062	fibulin 1 isoform C precursor	1.037	1.160	0.03	1.118	0.957	0.19458	0.922	1.276	0.0027	1.230	1.312	0.3284	1.265	1.401	6E-05	1.351
g4503681	Fc fragment of IgG binding protein; IgG Fc	1.021	1.259	0.0461	1.234	1.211	0.08343	1.187	1.258	0.1026	1.233	1.284	0.2813	1.258	1.518	0.0097	1.488
g68853069	vitronectin precursor	0.942	0.887	0.0489	0.942	1.008	0.31568	1.071	0.868	0.0635	0.922	0.886	0.5712	0.941	0.780	0.0478	0.828
g31542984	inter-alpha (globulin) inhibitor H4 (plasma	0.876	0.924	0.0509	1.055	0.865	0.73091	0.987	0.896	0.6245	1.023	0.865	0.8016	0.987	0.917	0.256	1.046
g4503649	coagulation factor IX; Coagulation factor D	0.954	1.034	0.0593	1.083	1.065	0.12789	1.116	0.982	0.7409	1.029	0.921	0.7094	0.965	0.985	0.7122	1.032
g14505643	procollagen C-endopeptidase enhancer; pr	0.879	1.088	0.0606	1.238	0.983	0.30886	1.118	1.266	0.3125	1.440	0.808	0.5156	0.919	1.129	0.0613	1.284
g19923106	paraoxonase 1; Paraoxonase	1.023	0.882	0.061	0.862	0.792	0.02936	0.775	0.806	0.0825	0.788	0.784	0.0884	0.76			