

表 4-1 糖尿病患者血清と健常者血清と比較で有意差 (p < 0.01) の認められたたんぱく質

合併症無し42名/健常42名			
1%有意	合併症無し/健常	A/E	
G#	Description	無/健常	p value
gi 89191868	von Willebrand factor	1.624	8.6E-09
gi 16418467	leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1	1.585	7.0E-03
gi 4758146	defensin, alpha 1 preproprotein	1.394	3.9E-03
gi 47419932	platelet glycoprotein Ib alpha	1.281	1.5E-03
gi 67190748	complement component 4A	1.218	3.0E-04
gi 62739186	complement factor H isoform a	1.165	3.7E-07
gi 45580688	complement component 7	1.140	5.6E-04
gi 115298678	complement component 3	1.132	1.2E-04
gi 119392081	complement factor I	1.127	1.8E-05
gi 14550407	complement component 2	1.108	2.1E-03
gi 4557485	ceruloplasmin	1.094	3.0E-03
gi 21450863	atractin isoform 2	1.085	2.6E-03
gi 11321561	hemopexin	1.083	8.6E-04
gi 4559406	Complement component 6	1.082	8.9E-03
gi 4505881	plasminogen	0.928	1.0E-03
gi 4557373	biotinidase	0.909	9.3E-03
gi 4557389	complement component 8, alpha	0.901	6.2E-03
gi 4507557	tetranectin (plasminogen binding protein)	0.865	3.8E-06
gi 4507725	transthyretin; prealbumin	0.854	5.3E-03
gi 4502149	apolipoprotein A-II	0.825	2.6E-07
gi 115583663	alpha-2-plasmin inhibitor	0.806	3.2E-10
gi 22091452	apolipoprotein M; NG20-like protein	0.803	1.3E-06
gi 4502163	apolipoprotein D precursor	0.794	3.0E-07
gi 5174675	cysteine-rich secretory protein 3	0.764	4.5E-06
gi 4826772	insulin-like growth factor binding protein, acid lab	0.745	9.5E-04

全合併症11名、健常人42名			
1%有意	全合併症/健常	F/E	
G#	Description	全合併/健常	p value
gi 4506547	pancreatic ribonuclease ; RNase upl-1	1.768	2.1E-04
gi 5031695	H factor (complement)-like 3	1.725	1.9E-03
gi 89191868	von Willebrand factor	1.504	3.2E-04
gi 4503681	Fc fragment of IgG binding protein	1.488	9.7E-03
gi 34734062	fibulin 1 isoform C	1.351	5.8E-05
gi 45580688	complement component 7	1.286	4.9E-05
gi 105990535	coagulation factor V	1.269	3.7E-03
gi 14550407	complement component 2	1.172	2.8E-03
gi 4557485	ceruloplasmin (ferroxidase)	1.134	4.1E-03
gi 4504781	inter-alpha (globulin) inhibitor H1	0.898	8.2E-03
gi 4557391	complement component 8, beta	0.878	4.4E-03
gi 4557389	complement component 8, alpha	0.850	6.1E-03
gi 88971372	similar to Carboxypeptidase N subunit 2	0.834	1.6E-03
gi 4507557	tetranectin (plasminogen binding protein)	0.832	2.6E-04
gi 4502149	apolipoprotein A-II	0.807	6.2E-05
gi 16933542	fibronectin 1 isoform 3	0.788	1.9E-03
gi 115583663	alpha-2-plasmin inhibitor	0.774	6.4E-04
gi 5174675	cysteine-rich secretory protein 3	0.697	2.8E-04
gi 4758236	extracellular matrix protein 1 isoform 1	0.689	9.8E-03
gi 116534900	dopamine beta-hydroxylase	0.512	1.3E-03

全合併症: 腎症 + 網膜症 + 神経症

表 4-2 糖尿病患者血清と健常者血清と比較で有意差 (p < 0.01) の認められたたんぱく質

腎症単独14名/健常42名			
1%有意	腎症単独/健常	B/E	
G#	Description	腎/健常	p value
gi 89191868	von Willebrand factor	1.582	3.4E-04
gi 14550407	complement component 2	1.223	1.7E-05
gi 62739186	complement factor H isoform a	1.206	2.0E-07
gi 67782358	complement factor B	1.189	2.4E-05
gi 115298678	complement component 3	1.153	3.9E-05
gi 11321561	hemopexin	1.076	4.9E-05
gi 4507557	tetranectin (plasminogen binding protein)	0.828	7.2E-03
gi 4502163	apolipoprotein D	0.774	6.4E-04
gi 4504165	gelsolin isoform a	0.759	1.3E-03
gi 4758236	extracellular matrix protein 1 isoform 1	0.621	2.8E-03

網膜症10名/健常42名			
1%有意	網膜症単独/健常	C/E	
G#	Description	網/健常	p value
gi 89191868	von Willebrand factor	1.963	1.3E-07
gi 5031863	galectin 3 binding protein	1.544	3.9E-03
gi 9665262	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix 1	1.408	3.1E-03
gi 4506547	pancreatic ribonuclease	1.376	7.5E-03
gi 45580688	complement component 7	1.247	1.1E-03
gi 34734062	fibulin 1 isoform C	1.230	2.7E-03
gi 62739186	complement factor H isoform a	1.197	5.1E-04
gi 119392081	complement factor I	1.156	2.8E-03
gi 11321561	hemopexin	1.122	3.7E-04
gi 88971372	similar to Carboxypeptidase N subunit 2	0.858	6.9E-03
gi 4557389	complement component 8, alpha	0.856	9.7E-03
gi 4507557	tetranectin (plasminogen binding protein)	0.799	1.1E-05
gi 4502149	apolipoprotein A-II	0.774	2.6E-06
gi 115583663	alpha-2-plasmin inhibitor	0.767	4.4E-08
gi 4507725	transthyretin; prealbumin	0.765	8.8E-03
gi 4502163	apolipoprotein D	0.764	9.3E-05
gi 5174675	cysteine-rich secretory protein 3	0.743	6.6E-03
gi 22091452	apolipoprotein M; NG20-like protein	0.688	3.6E-08
gi 4758236	extracellular matrix protein 1 isoform 1	0.683	8.7E-03

神経症単独7名/健常42名			
1%有意	神経症単独/健常	D/E	
G#	Description	神/健常	p value
gi 89191868	von Willebrand factor	2.114	8.5E-07
gi 14550407	complement component 2	1.238	1.0E-03
gi 115298678	complement component 3	1.200	1.1E-03
gi 21450863	atractin isoform 2	1.195	7.0E-04
gi 62739186	complement factor H isoform a	1.193	1.1E-05
gi 4503625	coagulation factor X	0.825	3.9E-03
gi 115583663	alpha-2-plasmin inhibitor	0.777	2.9E-06
gi 39753970	cathelicidin antimicrobial peptide	0.664	7.5E-03

2) cICAT 法による患者組織たんぱく質の解析：

(1) 協力研究機関より提供された組織検体の解析状況

昨年度に確立した cICAT 組織たんぱく質解析法に基づき、各協力研究機関より提供された LMD で分取可能な各種がん患者組織(31 検体)の解析を行った。その内訳は、胃がん患者 9 症例(がん、正常、腸上皮化生部位、合計 19 検体、大阪府立成人病センター提供)、乳がん患者 4 症例(がん、正常部位、合計 8 検体、大阪大学医学部提供)、大腸がん患者 2 症例(がん、正常部位、合計 4 検体、大阪大学医学部提供)であった。各患者組織のがん部位(100 μ g)と正常部位(100 μ g)を cICAT 法で比較解析すると、いずれの場合も約 600-1000 種類のたんぱく質の同定と比較定量が可能であり、その中には、がん組織に選択的なもの及び正常組織に選択的なものが多数存在した。本報告書では、その中で、胃がん患者 9 症例(スキルスがん 3 例、中分化型腺がん 3 例、高分化型腺がん 1 例、乳頭腺がん 2 例)の胃がん組織たんぱく質の解析結果(特にスキルス胃がん)について以下に報告した。

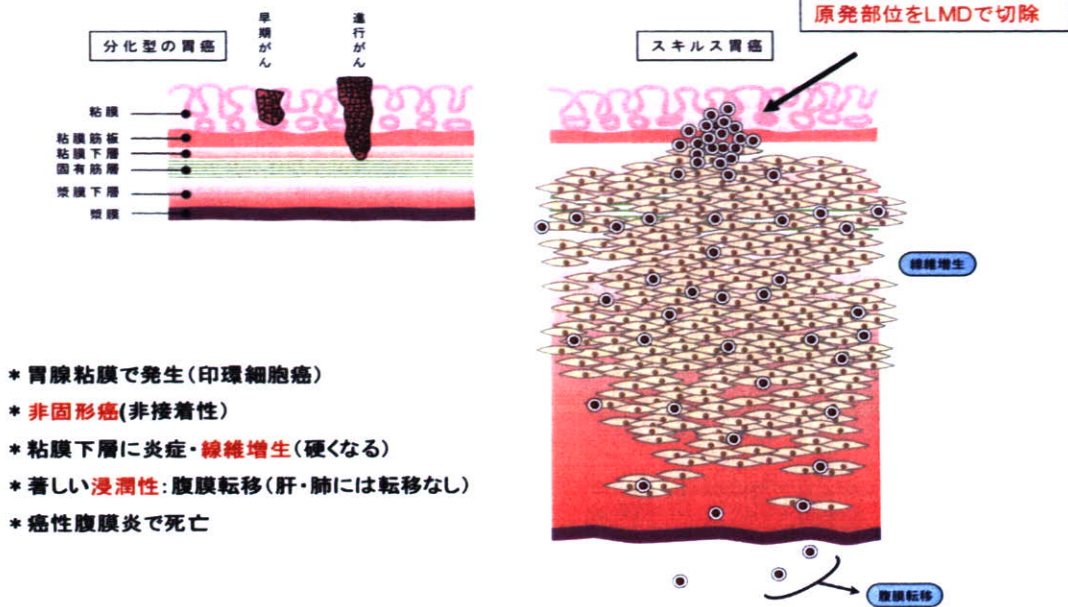
(2) cICAT 法によるスキルス胃がんたんぱく質の解析研究

日本での胃がんによる死亡者数は年間約 5 万人と依然として多いが、胃がん検診の普及及び最近の医学の進歩により、早期胃がんでは約 9 割、進行胃がん(切除可能)でも約 6 割と治療率(治療後 5 年間生存している割合)は向上している。しかし、

胃がん全体の約 10%を占めるスキルス胃がんは極めて悪性であり殆ど治療効果が認められない。その最大の理由は、普通の胃がん(分化型腺がん、未分化充実型腺がん)は、がんの病巣が隆起するため通常の検診(バリウムレントゲン、胃カメラ等)で発見できるが、スキルス胃がんは胃壁の内部全体に横に広がるため隆起部がなく発見しにくいためである。従って、スキルス胃がんをはじめとするスキルスがんは、毎年、検診していても見つからず、発見された時(スキルス型胃がんでは胃全体が硬くなる)はすでに組織全体にがん細胞が広がり、手遅れのことが多い。その意味で、一刻も早く、スキルスがん早期診断法の確立が切望されている(8)。

スキルス胃がんは、病理学的には印環細胞がん(signet-ring cell carcinoma)及び非充実型低分化腺がんに分類され、がん細胞が殆ど接合性を示さない、所謂、骨髄性白血病細胞と同様の非固形がん(non-solid type)に属する(9)。また、原発部位は粘膜上皮組織であるが、すぐに粘膜下層・間質に激しい浸潤を起こし、同時に線維増生を伴い、最終的には腹膜に転移し、がん性腹膜炎を引き起こす(図 2)。一方、静脈への浸潤は認められず、肝臓への転移も発生しない等の、通常分化型腺がん、未分化充実型腺がんとは明らかに異なる特徴点を有する。さらに、胎児のある時期までは、血球系細胞は原始消化器管で産生されることを考慮すると、その血球系幹細胞とスキルス胃がん細胞との関係にも興味を持たれる。

スキルス胃がんの特徴



- * 胃腺粘膜で発生(印環細胞癌)
- * 非固形癌(非接着性)
- * 粘膜下層に炎症・線維増生(硬くなる)
- * 著しい浸潤性: 腹膜転移(肝・肺には転移なし)
- * 癌性腹膜炎で死亡

図 2. スキルス胃がんの特徴

これまで、スキルス胃がんに関しては、主として、*in vitro* 培養系で長期増殖可能な Kato-III 株等の培養樹立細胞株を用いる解析研究はなされていた。その mRNA の発現解析から、FGF-receptor 2 がスキルス胃がん株 (Kato-III) に選択的に発現していることが報告されていた (10)。しかし、これらの培養樹立細胞株は、*in vitro* 培養に適応した細胞が選択されたものであり、患者のスキルス胃がん細胞とは性質が異なる可能性が考えられた。実際、cICAT 法で培養スキルス胃がん細胞株数種について解析したところ、Kato-III 株は強発現していたが、他のスキルス胃がん株では検出限界以下、もしくは発現していても Kato-III 株の 1/20 程度であった (4)。また、後述するように、スキルス胃がん患者のがん部位を解析しても検出限界以下であり、少なくとも Kato-III のように強発現しているとは考えられなかった。

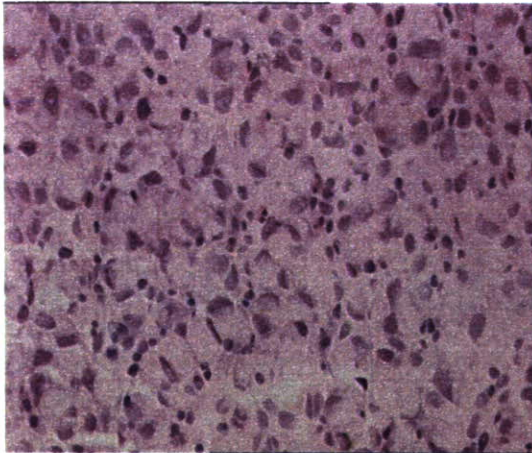
* LMD による部位特異的分取

以上のことより、スキルス胃がんの発生メカニズ

ムの解明、本疾患の早期診断マーカーの探索および治療薬開発に有効な創薬ターゲットの探索を行うためには、スキルスがん組織及びその周辺正常組織のたんぱく質を比較解析するとともに他の通常の分化型胃がんも同様に解析し、比較検討することが重要であると考えられた。そこで、大阪府立成人病センターより提供された胃がん組織検体のうち、LMD で分取可能であった 9 症例 (スキルス胃がん 3 例、中分化型腺がん 3 例、高分化型腺がん 2 例、乳頭腺がん 1 例) につき、そのがん病変部位と正常腺組織部位を、常法に従い (B. 研究方法 7)、部位特異的に分取した。なお、この場合、通常の分化型腺がんの場合は比較的的部位特異的に分取することは容易であるが、スキルス胃がんの場合は、図 2 に示すように、原発部位のみを分取しなければならず、分取には非常に長時間を要した。その典型例として、図 3 にスキルス患者第 1 例症例より、分取したスキルス胃がん部位と正常胃腺組織の組織写真を示す。この場合、スキルス胃がん部位ではスキルス印環型細胞が 90% 以上を示し、両組織

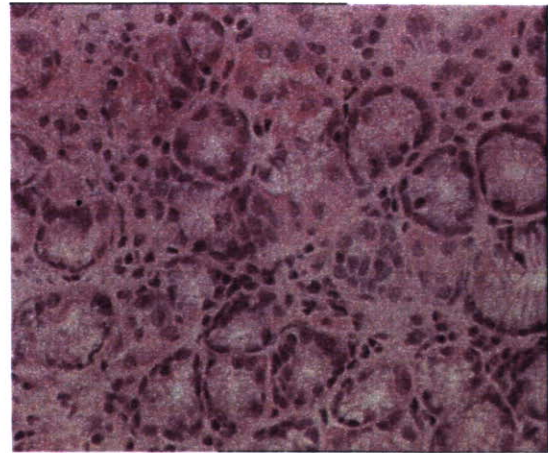
切片ともに免疫・血液系の細胞浸潤は殆ど認められない。なお、LMD で部位特異的な分取が不可能

な組織切片に関しては、その一部は免疫染色法で解析した。



がん組織部位(印環細胞型)

がん発生部位:約90%が 印環細胞がん。
免疫系細胞の浸潤は殆ど見られない。



正常胃組織部位

図 3. スキルス胃癌患者 (TSCN02) の LMD 分取がん組織部位と正常胃組織部位

*cICAT 法によるスキルス胃癌の解析

上述の LMD で部位特異的に分取した 9 症例のがん患者のがん組織部位と対応する正常部位組織を、研究方法の 8) に記載した方法で可溶化し、アセトン沈殿法により、がん組織たんぱく質と正常胃組織たんぱく質を分取した。常法に従い、得られたがん組織たんぱく質 (100 μ g) を H 鎖試薬で、正常胃組織たんぱく質 (100 μ g) を cICAT-L 鎖試薬で標識し、SCX25 分画で得られた cICAT ペプチドを、nano-LC/QSTAR XL で解析を行い、統合データベースシステム (HiSpec) を用いて、各胃癌患者組織のたんぱく質の同定と比較定量比 (H/L、がん部位/正常部位) を算出した。なお、RefSeq の DB を用いて、cICAT ペプチドレベルで Rank 1、Score 20 以上、及び Score 20-15 でペプチド精査の結果正しいと判断されたたんぱく質を同定たんぱく質とした。なお、H/L 比も生データをチェックし、H/L 比が正しいものを採用した。その結果、約 600-1000 種類のたんぱく質が同定・定量可能であった。得られた各種胃癌患者毎のデータを、同定たんぱく質 (Gi#順) と Mascot Score 値順及び

H/L 値順等でソート・マッチング及び抽出し、スキルス型、中分化型腺がん、高分化型腺がん等の間で共通点および特徴点を比較検討した。

そのうち、今回は、スキルス胃癌の解析について報告する。図 4 には、スキルス型胃癌患者第 1 症例 (TSCN02) の H/L 値とたんぱく質番号 (Gi#順) との関係を示したものである。この場合は、686 種類のたんぱく質が同定され、ピーク混雑で定量できないものは 3 種類あったが、残りの 683 種類は定量可能であった。そのうち、H/L が 10 以上、すなわち、スキルスがん部位の方が正常部位よりも 10 倍以上発現しているたんぱく質は 12 種類存在し、なかでも、スキルスがん部位に存在し、正常部位にはない (検出限界以下) もの (H/L = ∞ 、少なくとも 100 以上) は、7 種類も存在した。一方、H/L が 0.1 以下のものは 8 種類あり、正常部位にしか存在しないもの (H/L=0) は 2 種類存在した。

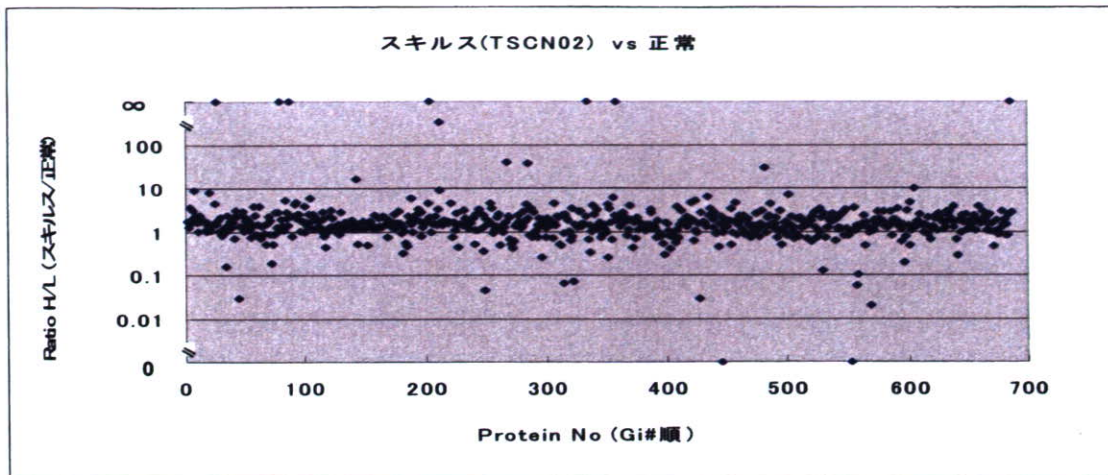


図 4. スキルスがん患者第 1 症例 (TSCN02) でのがん部位と正常部位のたんぱく質の発現比較 (H/L)

さらに、Score 25 以上を選択し、H/L 値を高い順にたんぱく質をソートして、上位 15 番目までのものを比較検討した結果、そのうちの 6 種類 (CD177、olfactomedin 4、elastase 2、defensin、S100 calcium-binding protein A8、fibrinogen-like 2) は、本来血球系細胞の一部に発現しているたんぱく質であった (表 5)。本スキルスがんで強発現 (H/L=∞、少なくとも 100 以上) している CD177 は未熟な骨髄系細胞の一部に発現する機能未知の細胞膜受容体であるとされている (10)。同様な傾向はスキルス第 2 症例にも見

られ、やはり、8 種類が血液系細胞で発現するたんぱく質であった。このうち、4 種類は両者に共通であり、そのうちの 2 種類 (fibrinogen-like 2、S100 calcium-binding protein A8) はある種のリンパ系細胞に発現し、線維増生及び炎症に関与されるものとされている。一方、CD177 は第 2 例のスキルスがんで検出されなかったが、白血球細胞でよく発現がみられる CD13 が強発現していた (H/L=24.5)。なお、CD177 は、第 3 例のスキルスがんでも強発現していた (H/L=∞) ので、2/3 の割合で強発現していることになった。

スキルス胃がんの解析結果例 (H/L ratio順)

スキルス#1 (実験2)		629種類				
順位	Protein ID	Score	Description	HitCys	ICAT	Ratio
1	gi9968889	60	CD177, polycythemia rubra vera 1	2	HEAVY	*
2	gi4503549	36	elastase 2, neutrophil, medullasin	1	HEAVY	*
3	gi32313593	41	olfactomedin 4 precursor, differenti	1	HEAVY	333
4	gi40807482	60	LPLUNC1 protein precursor, von E	1	HEAVY	39
5	gi4758146	77	defensin, alpha 1 precursor, protein	2	HEAVY	30
6	gi21614544	59	S100 calcium-binding protein A8, c	1	HEAVY	16
7	gi5730075	32	fibrinogen-like 2, fibrinogen-like pr	1	HEAVY	9.9
8	gi10863909	51	serine protease inhibitor, Kunitz typ	2	HEAVY	9.2
9	gi32454741	27	serine (or cysteine) proteinase inhi	1	HEAVY	8.9
10	gi11386171	49	carcinoembryonic antigen-related cell	1	HEAVY	8.2
11	gi4758910	36	prostaglandin E synthase isoform 1	1	HEAVY	7.3
12	gi4507895	73	vimentin	1	HEAVY	6.4
13	gi4504411	45	major histocompatibility complex, c	1	HEAVY	6.3
14	gi28872753	105	dual oxidase 2 precursor, dual oxid	4	HEAVY	6.0
15	gi119923315	50	serine hydroxymethyltransferase 2	2	HEAVY	5.9
16	gi4507555	29	thymopoeitin	1	HEAVY	5.4
17	gi17402875	84	alpha 2 type VI collagen isoform 2C	2	HEAVY	5.4
18	gi4537686	28	integrin beta chain, beta 2 precurs	1	HEAVY	4.8

スキルス#2 (実験1)		727種類				
順位	Protein ID	Score	Description	HitCys	ICAT	Ratio
1	gi4502095	76	CD13, membrane alanine aminopeptid	2	HEAVY	24.5
2	gi40354192	75	keratin 10, cytokeratin 10	1	HEAVY	7.2
3	gi21614544	58	S100 calcium-binding protein A8	1	LIGHT	6.7
4	gi4504549	85	tenascin C (hexabrachion); Hexabrachi	7	HEAVY	6.5
5	gi5730075	26	fibrinogen-like 2, fibrinogen-like protein	2	HEAVY	6.0
6	gi11386171	45	carcinoembryonic antigen-related cell	1	LIGHT	5.7
7	gi4577759	64	myeloperoxidase	2	HEAVY	5.5
8	gi4503595	115	eosinophil peroxidase	4	HEAVY	4.6
9	gi4502877	50	claudin 4, Clostridium perfringens enter	2	HEAVY	4.5
10	gi4505059	108	tumor-associated calcium signal transdu	3	HEAVY	4.4
11	gi4503549	43	elastase 2, neutrophil, medullasin	1	HEAVY	4.1
12	gi4577886	113	integrin beta chain, beta 2 precursor, inte	5	HEAVY	3.8
13	gi4502403	45	biglycan preproprotein, bone/cartilage pr	1	HEAVY	3.8
14	gi4758146	71	defensin, alpha 1 preproprotein, myeloid	2	HEAVY	3.5
15	gi4502573	43	caspase 1 isoform beta precursor, interl	1	HEAVY	3.1
16	gi34734062	83	fibulin 1 isoform C precursor	4	HEAVY	3.0
17	gi5174485	44	mannose receptor, C type 2, endocytic re	1	HEAVY	2.9
18	gi4758686	27	low density lipoprotein-related protein 1	2	HEAVY	2.8

血球系たんぱく質

表 5. スキルス胃がん組織で強発現しているたんぱく質

スキルス胃がんで強発現している上述のたんぱく質が他のがん組織でどの程度発現しているかは興味のあるところである。そこで、前述のごとく、通常の分化型胃腺がん組織(中分化型腺がん3例、高分化型腺がん1例、乳頭腺がん2例)についても、同様に、cICAT法で解析した。その結果、何れも約800-1000種類のたんぱく質を同定と比較定量が可能であったが、CD177は中分化型腺がん3例、高分化型腺がん1例では検出されず、乳頭腺がんの1例でのみ4倍(H/L=4)程度の発現がみられたが、スキルス胃がんで観察されたような強発現

(H/L=∞)しているものはなかった。また、fibrinogen-like 2は、いずれのがん組織でも発現していないか、或いは発現比ががん部位に選択的ではなかった。一方、olfactomedin 4は、乳頭腺がんおよび高分化型腺がんの一部に強発現が見られた。以上の結果は、少なくともスキルス胃がんは、他の分化型胃腺がんと異なり、血球系のたんぱく質の一部及び線維増生・炎症に関係するたんぱく質が強発現していることを示す。なお、乳がん(2例)でも上記たんぱく質は発現していなかった(表6)。

スキルス癌の高発現たんぱく質は分化型胃癌では発現量が低い。

		胃がん								乳がん	
		スキルス#1 TSCN02(EX 1)	スキルス#1 TSCN02(EX 2)	スキルス#2 TSCN04	中分化腺癌 TSCN01	中分化型腺癌 TSCN05	中分化型腺癌 TSCN06	乳頭がん腺癌 TSCN03	高分化型腺癌 TSCN07	乳がん#1 TBCN04	乳がん#2 TBCN03
		346種類	686種類	727種類	1025種類			911種類		867種類	
#	たんぱく質名	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio
1	g4728146 defensin, alpha 1	14	30	3.5	0.2	1.06	N/A	3.0	4.3	0.2	2.0
2	g3984889 CD177, polycythemia rubra vera 1; cell surf	33	*	ND	ND	ND	ND	4.3	ND	ND	ND
3	g4302395 eosinophil peroxidase	5.3	1.4	5.5	0.1	0.03	0.02	0.2	0.33	ND	ND
4	g14602459 transmembrane protease, serine 2	5.0	N/A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	g11388171 carcinoembryonic antigen-related cell adhe	5.6	8.2	5.7	0.5	ND	ND	1.8	ND	ND	ND
6	g432313392 olfactomedin 4 precursor	*	333	ND	ND	0.35	ND	72	38	1.6	ND
7	g43527258 myeloperoxidase	*	N/A	5.5	0.1	1.4	ND	0.9	ND	ND	ND
8	g43032445 elastase 2, neutrophil	21	*	4.1	0.2	2.3	2.1	4.2	ND	ND	ND
9	g44505059 tumor-associated calcium signal transduce	5.0	4.0	4.4	ND	4.1	4.1	4.5	2.1	3.0	0.78
10	g32454741 collagen-binding protein 1	5.4	8.9	2.2	5.2	3.4	3.5	3.5	2.9	4.2	3.1
11	g24797089 MHC, class II, DQ beta 1	*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7	ND	ND
12	g47106066 CD33 antigen-like 3	*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	g43020925 CD13, membrane alanine aminopeptidase	ND	ND	24	ND	ND	ND	2.5	ND	ND	ND
14	g44807482 LPLUNC1 protein precursor	ND	39	0.2	0.06	0.09	ND	1.0	ND	ND	ND
15	g21814544 S100 calcium-binding protein A8	ND	16	6.7	0.2	0.94	2.5	1.9	3.7	ND	ND
16	g45730675 fibrinogen-like 2, fibrobleukin	ND	9.9	6.0	ND	1.23	ND	0.2	ND	ND	ND
17	g44504549 (scoposin, Q (hexabrachion)	ND	*	6.5	ND	4.4	ND	ND	ND	3.8	6.4
18	g10843909 serine protease inhibitor, Kunitz type, 2	ND	9.2	ND	ND	ND	5	2.0	ND	ND	7.8
19	g4758910 prostaglandin E synthase isoform 1	ND	7.3	ND	ND	5.5	ND	ND	ND	0.3	ND
20	g44507895 vimentin	ND	6.4	0.7	2.3	ND	0.48	0.4	0.61	0.9	ND
21	g44504411 MHC, class II, DR beta 1	ND	6.3	ND	1.0	0.36	0.48	5.3	0.63	ND	1.3
22	g28872753 dual oxidase 2 precursor	ND	6.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
23	g1992315 serine hydroxymethyltransferase 2	ND	5.9	1.2	ND	ND	2.1	ND	1.4	ND	ND
24	g4332225 thymopoietin	ND	5.4	ND	ND	ND	2.2	ND	2.2	ND	ND
25	g17402975 alpha 2 type VI collagen isoform 2C2	ND	5.4	2.1	3.0	ND	ND	0.3	ND	0.3	ND
26	g4452266 CD135, integrin beta chain	2.0	4.8	3.8	0.9	ND	ND	ND	ND	1.37	ND
27	g44507467 transforming growth factor, 68kDa	ND	4.7	2.6	5.3	4.4	0.19	0.18	1.01	0.45	ND
28	g11761631 fibrinogen, beta chain	1.8	4.6	1.9	0.6	ND	ND	1.23	ND	1.03	ND
29	g44503715 fibrinogen, gamma chain	1.8	4.0	1.6	0.75	ND	ND	0.97	ND	0.72	ND
30	g44502877 claudin 4	ND	ND	4.5	ND	33	1.91	NA	7.7	ND	ND

 : 血球系たんぱく質

H/L>4を赤で表示、*はHのみ存在、NDは検出せず、N/Aは比の計算不能。

表 6. スキルスがんでの強発現たんぱく質の分化型胃腺がん等での発現比較

*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:

上述した通り、cICAT法よりスキルスがんでは強発現しているたんぱく質を見出したが、実際に、

そのたんぱく質がスキルスがん部位に選択的に存在するかは他の手段で確認することが重要であった。そこで、CD177 を例にとり、スキルス胃がん患者の第1症例のスキルスがん部位と正常部位切片を用いて、CD177 の免疫組織染色法による解析を行った。すなわち、常法に従い、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固定化し、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、ビオチン標識ウマ抗マウス抗体を2次抗体として反応させた。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、免疫染色を完成させた。その結果、抗 CD177 抗体 (MEM-166) は正常の胃組織切片では殆ど染色されなかったが、スキルス胃が

ん部位切片のスキルスがん細胞で強く染色されることが確認された (図 5)。一方、同様に作成した中分化型胃腺がん (TSCN06) 切片に抗 CD177 抗体で免疫染色したところ、非特異的発色 (内在性 peroxidase による) を除くと殆ど染色されず (図 6)、cICAT 法で得られた結果と一致した。

以上のことは、cICAT 法で見出されたスキルス胃がんを選択的な上述のたんぱく質 (CD177) は、免疫染色法でも確認され、スキルス胃がん細胞に選択的に存在することを示す。今後、このようなスキルス胃がんを選択的なたんぱく質が、スキルス胃がん患者の血清で増加するか調べることは重要であると考えられた。なお、本報告書ではスキルス胃がんを中心に報告したが、他の分化型胃腺がん及び他臓器のがん (乳がん、大腸がん) についても同様な解析を行い、特異的たんぱく質を見出すことが望まれる。

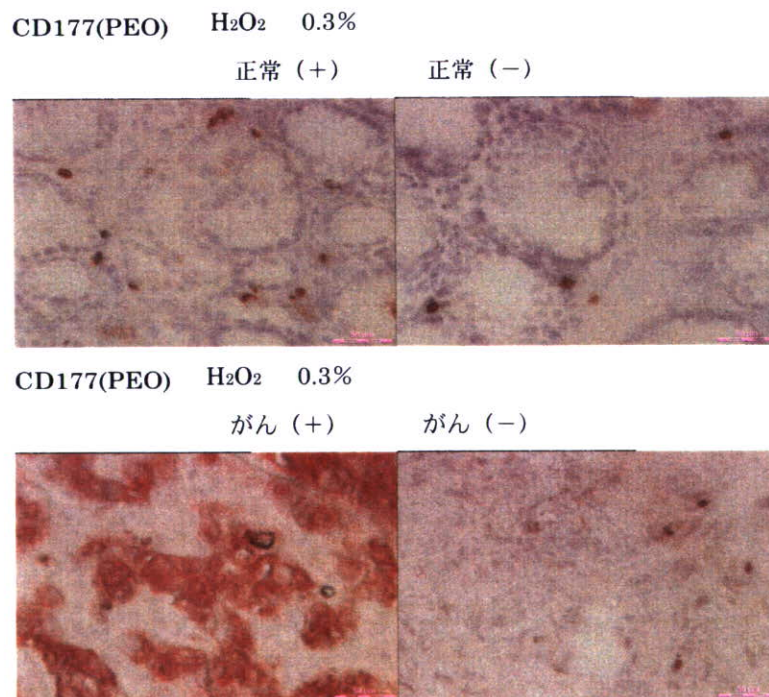


図 5. CD177 モノクロナル抗体を用いたスキルス胃がん組織及び正常組織の免疫染色法による解析

スキルス胃がん患者第1例目の正常胃組織部位とスキルスがん部位解析結果を示す。
(+)は抗体(MEM-166)あり、(-)は抗体(MEM-166)なしを示す。

CD177 (PEO) H₂O₂ 0.3%

がん (+)

がん (-)

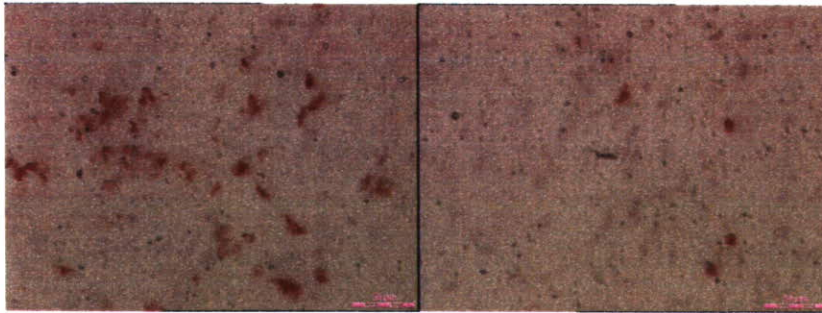


図 6. CD177 のモノクロナル抗体を用いた免疫染色法による中分化型胃癌患者の正常胃組織部位とがん部位解析結果.

(+)は抗体(MEM-166)あり、(-)は抗体(MEM-166)なしを示す。非特異的な染色(内在性のペーオキダーゼ活性による)を除くとがん組織は殆ど染色されない。

3) SELDI-QqTOF-MS 法による糖尿病患者血清の解析:

SELDI-ProteinChip を用いて患者血清を解析する場合、BioRad 社の SELDI-TOF 装置は測定の自動化と高速化には適しているが、質量精度が低いこと及び分解能が不十分でありデータの網羅性が低い欠点が指摘されていた。一方、SELDI-ProteinChip を用いて proTOF 2000 で測定する高速度 SELDI-QqTOF-MS システム(国立がんセンター研究所等が開発)は、質量精度、分解能ともに高性能であり、なお、かつ、高速度計測が可能であるため、多数の臨床検体を扱う大規模解析に有効であるとされている。

そこで、高速度 SELDI-QqTOF-MS システムを、国立がんセンター研究所(本田・山田先生)の協力を得て PF に導入し、国立国際医療センターより提供された糖尿病患者血清(124 検体)、健常人(糖尿病非罹患)血清(40 検体)を高速度 SELDI-QqTOF-MS 法で解析した。なお、糖尿病患者血清に関しては、

合併症の有無、種類を考慮して、以下の群分けし解析を行った。

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)+腎症&網膜症(8 検体)+腎症&神経症&網膜症(19 検体)=B 群(腎症あり群): 50 検体
- c) 網膜症(14 検体)+網膜症&腎症(8 検体)+網膜症&神経症(8 検体)+網膜症&神経症&腎症(19)=C 群(網膜症あり群): 49 検体
- d) 神経症(7 検体)+神経症&網膜症(8 検体)+神経症&腎症(6 検体)+神経症&腎症&網膜症(19 検体)=D 群(神経症あり群): 40 検体

ロ) 健常人コントロール血清(糖尿病に非罹患者)=E 群: 40 検体

図 7 に、糖尿病患者の合併症の分類(ベン図)を示した。

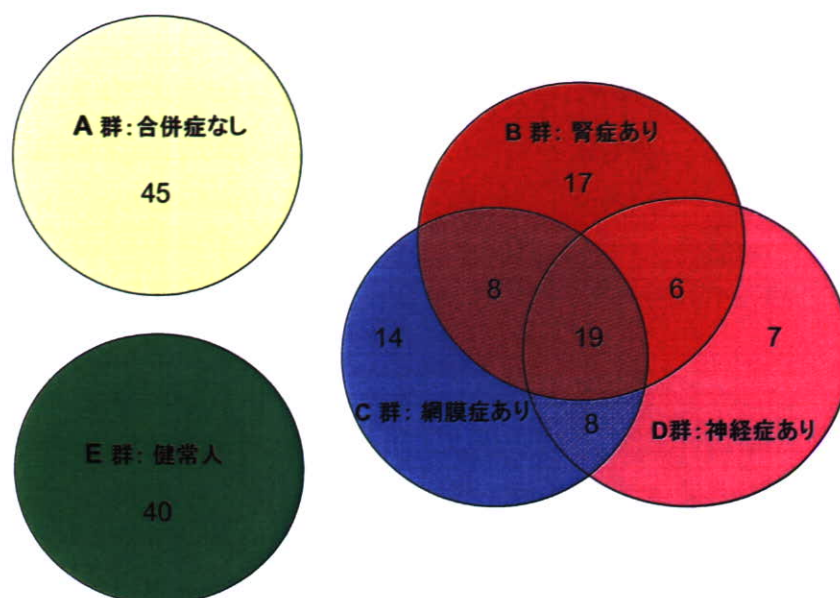


図7. 糖尿病患者の合併症の分類 (ベン図)

上記の群分けした糖尿病患者血清及び健常人血清(合計 164 検体)を、常法に従って 9M 尿素 2% CHAPS で変性し、SELDI-ProteinChip H50 (逆相条件) 及び IMAC30 (金属修飾銅) に吸着させ、マトリックス (CHCA) を添加後、SELDI-QqTOF-MS (prOTOF 2000) で m/z 700-30000 の範囲で計測 (3 回重複) し、ペプチドピークを NCC-ProteoJudge で検出した。検出ピーク数は H50 では 2243 本、IMAC30 では 2444 本であった。マーカー抽出法として、1) 合併症のない糖尿病患者 (A 群) の平均値 + 4SD を Cut off

とした場合、各種糖尿病性合併症患者の陽性率が H50 の場合 30%、IMAC30 の場合 40% を越えるもの、2) 上記 1) 条件を満たすものをさらに、目視でピークを確認した (がんセンター研究所の協力による)。その結果、H50 では 5 ピークまた IMAC30 では 3 ピークの合計 8 個のピークが上記の条件を満たすことが分かった (山田先生により解析)。表 7 に各ピークの m/z 及び各種合併症での陽性率を示した。

表 7. 合併症のない糖尿病患者の平均値 + 4SD 以上を示す症例の割合

m/z	腎症 (B 群)	網膜症 (C 群)	神経症 (D 群)
H50			
1866.2	30.0%	36.7%	30.0%
8707.2	22.0%	32.7%	25.0%
17284.6	30.0%	36.7%	30.0%
17474.1	24.0%	30.6%	25.0%
17601.1	22.0%	32.7%	25.0%
IMAC30			
8898.9	30.0%	40.8%	30.0%
8933.1	30.0%	40.8%	30.0%
8949.1	30.0%	40.8%	30.0%

このうち、H50 で得られた m/z 1866.2 と m/z 8707.2 について、健常者 (E 群)、合併症のない糖尿病 (A 群) 及び糖尿病性網膜症あり群 (C 群) での、患者毎のイオン強度 (intensity) の分布を図 8 に示した。その結果、1866.2 m/z では E 群の平均値は 103.3, A 群は 86.1 であるのに対して、C 群では 185.3 と有意に高く ($p = 0.0009$)、また陽性率は 36.7% であった (表 7)。すなわち、糖尿病性網膜症あり患者群 (C 群) の一部 (36.7%) では、健常者 (E 群) や合併症なしの糖尿病患者 (A 群) には検出されない m/z 1866.2 のピークが存在することが分かった (図 8, 9)。同様に、 m/z 8707.2 のピークも他群では検出されず、糖尿病性網膜症あり患者群 (C 群) の一部 (32.7%) に選択的に存在することが分かった (図 8, 10)。どのようなバックグラウンドを持つ糖尿病性網膜症患者がこれらのピークを持つのか興味を持たれる。

SELDI-QqTOF-MS (prOTOF 2000) はピークの正確な m/z を測定できるが、MS/MS でないのでペプチドを同定することはできない。今回、糖尿病性網膜症患者で検出される 8 個のピークを同定することが重要である。そこで、まず、H50 ProteinChip で見出された m/z 1866.2 のピークの同定を試みた。本物質 m/z 1866.2 は、H50 の SELDI plate より 70% アセトニトリル/0.1% TFA で溶出可能であり、IMAC

plate でも同ピークが検出されたので強酸性基等を含む酸性脂溶性物質であると考えられた。そこで、糖尿病性網膜症患者の血清をプールして、C18 逆相カラム (2-90% gradient CH_3CN) で分画・精製し、prOTOF 2000 で調べた結果、RT20min 付近に同ピーク (Na 付加体) 及び 1844.24 (Na 非付加体) 存在することを確認し、その精製画分を得た。しかし、ABI4700 の MS/MS では全くアミノ酸由来ピークは検出されず、本物質はペプチドとは考えられない。一方、同画分には 1866.2 の他に 614 の倍数のピークが存在するので、614 を構成成分とする高分子と考えられる。そのため、臨床検体より精製したサンプルを ABI4700 の内部標準物質を用いた精密質量数測定法 (ミリマス) で正確な質量数 (m/z 614.3996) を測定し、さらに、NCBI の PubChem Compound database と照合した上で、CID-MS/MS 法を用いて詳細に解析した結果、本物質は界面活性剤の CHAPS であることが判明した (市販試薬の CHAPS で確認済み) (図 11)。CID-MS/MS による切断部位は 4 級アミンの右側で起こると思われる (m/z 177, 447)。なお、CHAPS は、水溶液中では 10 mer (MW 6140) で存在することが知られている。

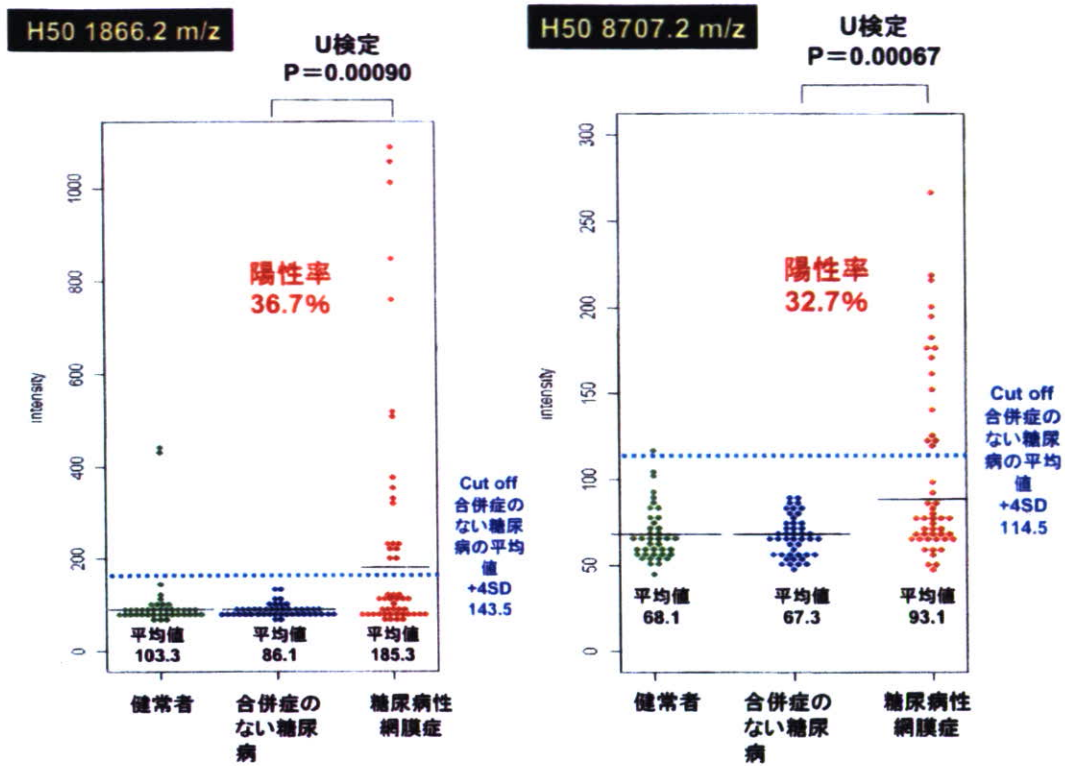


図 8. 健康者 (E 群)、合併症のない糖尿病 (A 群) 及び糖尿病性網膜症あり群 (C 群) での、 m/z 1866.2 と m/z 8707.2 の患者毎のイオン強度 (intensity) の分布

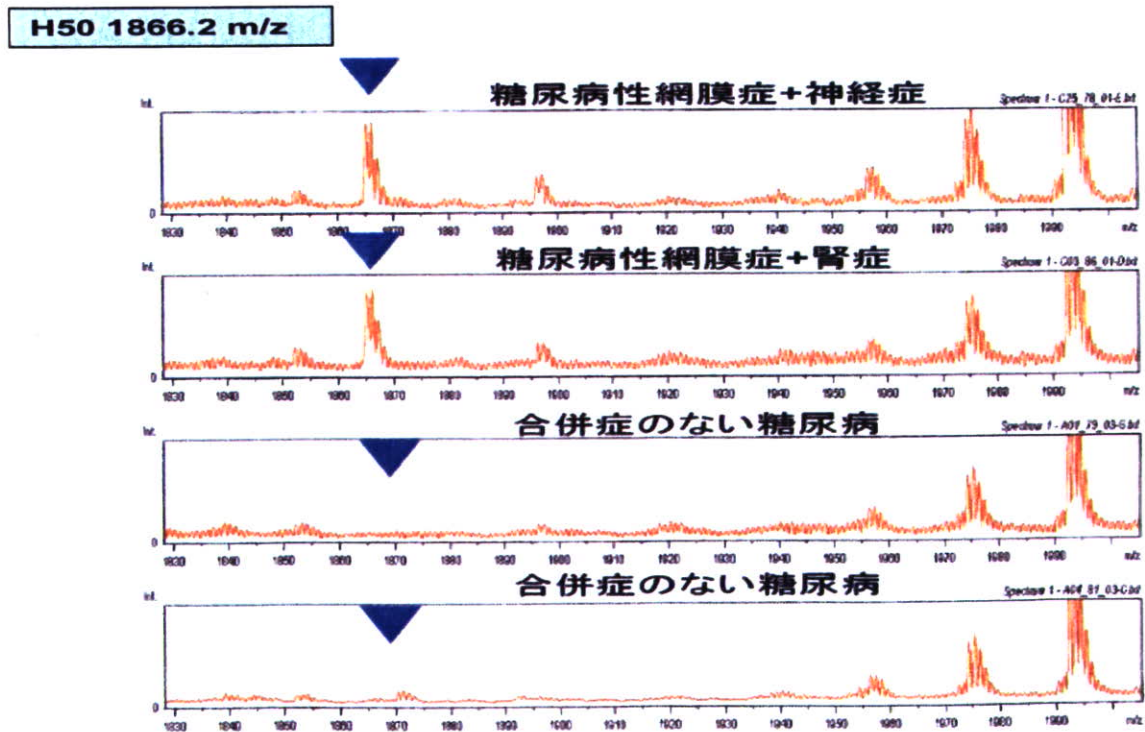


図 9. m/z 1866.2 ピーク物質の糖尿病性網膜症あり患者血清のプロファイリング

H50 8707.2 m/z

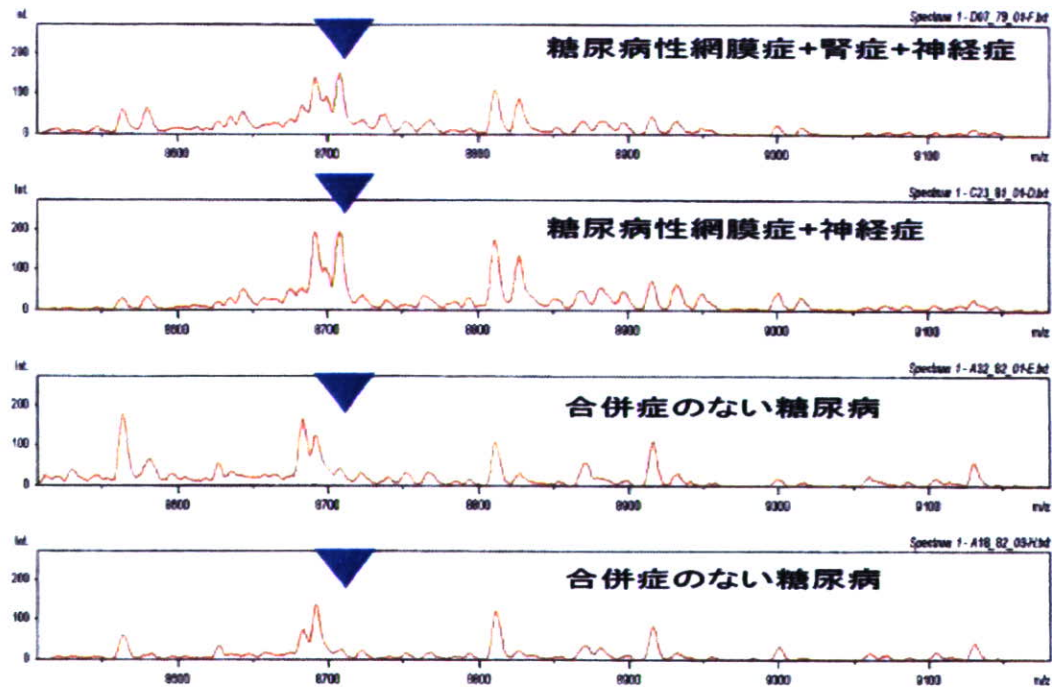
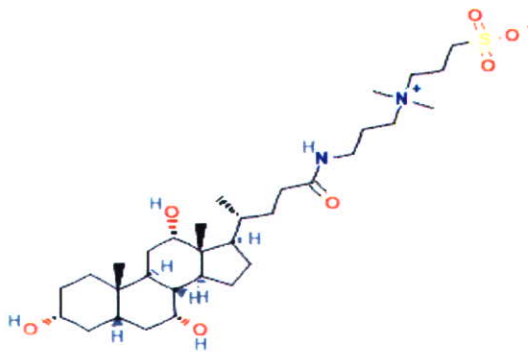


図 10. m/z 8707.2 ピーク物質の糖尿病性網膜症あり患者血清のプロファイリング



CHAPS:

Molecular Weight: 614.87712 g/mol

Molecular Formula: C32H58N2O7S

Monoisotopic Weight: 614.39647g/mol

(NCBI PubCHEM Compoundより)

図 11. m/z 1866.2 ピーク物質の同定。

今回、糖尿病性網膜症あり群 (C 群) で選択的に検出される 8 個のピークのうちの m/z 1866.2 ピーク物質は予想に反してペプチドではなく、ProteinChip 法の標準キット中に含まれる界面活性剤 (可溶化剤) の CHAPS の 3 量体であった。本物質が、なぜ糖尿病性網膜症あり群 (C 群) の一部に検出されるのかは定かではない。しかし、CHAPS が水溶液中では 10 mer (MW 6140) で存在すること

を考えると、患者血清中で何らかの病的原因でたんぱく質の一部が変性することにより、或いは血清を長期保存する間にたんぱく質変性が起こることにより、CHAPS とたんぱく質との結合様式等が変化して、上述の結果を生じたことが一つの可能性として考えられた。CHAPS は標準キット中にあるものなので、他の SELDI 血清解析の場合も同様な現象は起こる可能性がある。この点を、今後、

留意する必要があると思われた。

しかし、糖尿病性網膜症あり群(C群)では、上述のように、他に7個のピークが選択的に検出されており、これらについてはペプチドであると推定された。今後、これらのピークを同様に精製し、ABI-4700 および QSTAR XL 等の精査用 MS で同定をすることが重要であると考えた。

4) cICAT 法と iTRAQ 法により同定される血清たんぱく質の比較:

PFではこれまで主として cICAT 法を用いて患者血清たんぱく質および組織たんぱく質を解析してきたが、最近では他の同位体標識法の一つ iTRAQ 法による解析が多くなりつつある。

cICAT 法と iTRAQ 法を比較すると iTRAQ 法では次のような利点があるとされる。まず、基本的には cICAT 試薬はシステイン残基を持つたんぱく質のみ反応するが、iTRAQ 試薬は N 末アミノ酸およびリジン残基の側鎖アミノ基に結合するので全てのたんぱく質に反応できる。また、cICAT 法では H 鎖と L 鎖で各々標識するので2種類の検体の比較をするが、iTRAQ 法(4-Plex)では4種類の検体を同時に比較することが可能である。さらに、比較定量に関しては、cICAT 法では H 鎖ペプチド及び L 鎖ペプチドの MS のプレカーサーイオン強度(TOF モード)で比較定量するのに対して、iTRAQ 法は Product Ion モードで同定を行い、レポーターイオンの強度で比較定量する相違がある。また、cICAT 法はアビジンカラムによる精製、クリーピング等の多数の複雑なステップを要するが、iTRAQ 法は簡便であり、スループット性が高い利点を持つ。一方、iTRAQ 法にも短所は存在する。その一つは、ペプチドの段階で標識するため、たんぱく質の酵素消化などの前処理段階で検体間にバラツキが生じやすいことであり、また、レポーターイオンのイオン強度が弱いために、比較定量値の正確性に問題がある可能性が指摘されている。さらに、通常のショットガン法と同様に非常に多数のペプチドが生じるため、MS でのピークが煩雑

になり、測定できないペプチドが存在することが知られている。これに対して、cICAT 法では、たんぱく質レベルで反応させるため、その後の操作による誤差が小さく、また、システイン含有ペプチドのみを精製しているため、MS で煩雑になることが少ないなどの長所もある。また、cICAT 法と iTRAQ 法を比較した論文によると、iTRAQ 法は高発現たんぱく質を多数解析するのに向いているが、cICAT 法は、同定たんぱく質数は減少するもの、より低発現たんぱく質(存在量が少ない)の解析に向いていると報告されている(12)。実際、PF での臨床検体の測定においても、cICAT 法は極めて精度の高い比較定量値が得られた。

以上のことより、今後、疾患関連たんぱく質の解析研究をさらに推進する上でも、cICAT 法と iTRAQ 法を比較検討し、両法の長所短所を把握することが重要であると考えた。なお、この場合、同一検体(血清)を、同一 HPLC(SCX)の同じ分画数で、同一の質量分析装置で cICAT 法と iTRAQ 法で同定されるたんぱく質数を比較する必要がある。まず、ルーチンアッセイで使用している標準血清(CT02S)をアジレント抗体カラム(Hu6)で主要たんぱく質6種を除去した画分を、それぞれの標識法で標識し、得られた標識ペプチドを同一条件下の SCX HPLC で処理した。さらに、ペプチド分画数を25分画(SCX HPLC)に揃え、また、同一機種 nano LC(C18)/QSTAR XL で MS データを測定することにより、cICAT 法及び iTRAQ 法で同定されるたんぱく質数を比較検討した。即ち、SCX HPLC 以降は通常の血清ルーチンで用いる cICAT 法と同一である。但し、QSTAR XL の測定パラメータは iTRAQ 用に変更した。なお、標識は常法に基づいて、たんぱく質の同定・比較定量に関しては、cICAT 法は Mascot 解析ソフトを基本とする日立統合データベースシステム(HiSpec)により行い、iTRAQ 法では ABI の ProQuant 解析ソフトと HiSpec の両方を用いた。その結果、iTRAQ 法で得られたデータを ProQuant で解析すると、一番信頼性が高い Confidence 99%

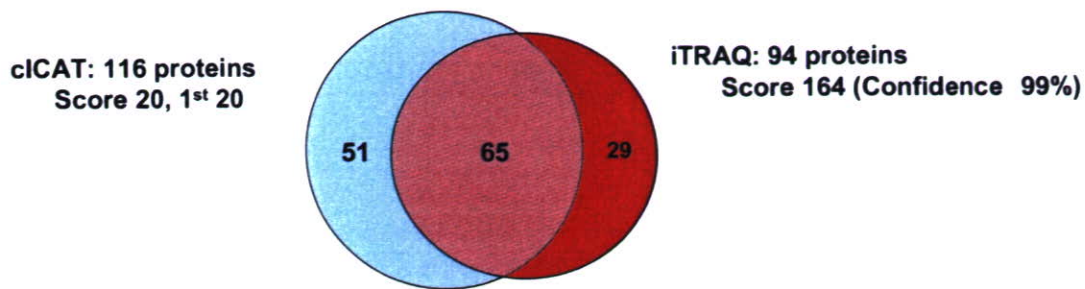
では 94 種のたんぱく質が、また次に信頼性が高い Confidence 95%では、242 種類のたんぱく質の同定が可能であった。なお、一般に、Confidence 95%以上が許容される信頼度の目安とされ、それ以下では false が多くなり信用できない。また、Confidence は ProQuant 独自のスコアリングであり、解析ソフト、使用データベース、スコアリング方法が、cICAT 解析の方法(Mascot)と異なる為、純粋な意味での比較はできない。そこで、QSTAR XL の MS データを Mascot 解析ソフトのパラメーター修飾条件に iTRAQ(N-term, K, Y)入れて解析し、また、データベースを RefSeq に統一して HiSpec で再解析した(1stRankedPepHighScore 20 以上でフィルタリング)。その結果、Confidence 99%に相当する上位 94 番目のたんぱく質の Mascot score は 164 に相当し、Confidence 95%に相当する 242 番目たんぱく質の Mascot score は 52 に相当した。通常のショットガン法で信頼できるたんぱく質の Mascot Score は 50 以上とされているので、上述の Confidence と Mascot Score との関係は妥当なものと考えられた。

一方、cICAT 法による解析では通常のルーチンアッセイの条件では、ペプチド精査済みで確定したデータを解析すると約 130-150 種類のたんぱく質が同定される。この時、1stRankedPepHighScore 20 以上でフィルタリングしたデータを解析した場合、false が認められず、信頼性は 99%以上であると考えられる。また、cICAT 法ではシステインペプチドに特化している所以で通常のペプチド断片の Mascot Score と同等に考えるのは妥当ではない。さらに、cICAT 法の Mascot Score 値は H 鎖もしくは L 鎖のみの合計を表記するので、測定した全てのペプチドの Score 値を合算する iTRAQ 法及び通常のショットガン法とでは大きく異なる(単純に考えると cICAT 法の場合、H 鎖と L 鎖の値を合算すると 2 倍になる)。以上のことを考慮して、今回得られた cICAT のデータを、

1stRankedPepHighScore 20 以上でフィルタリングして同定された 116 種類のたんぱく質について、前述の iTRAQ 法で得られた Confidence 99%(94 種類、Mascot Score 164 以上)及び Confidence 95%(242 種類、Mascot Score 52 以上)のたんぱく質について比較検討を行った。

その結果、iTRAQ Confidence 99%のたんぱく質(94 種類)では、cICAT と共通のたんぱく質は 65 種類、iTRAQ でのみ検出されるたんぱく質は 29 種類であり、cICAT 法でのみ検出されるたんぱく質は 51 種類であった(図 12A)。一方、iTRAQ Confidence 95%のたんぱく質(242 種類)では、共通たんぱく質は 85 種類、iTRAQ でのみ検出されるたんぱく質は 157 種類であり、cICAT 法でのみ検出されるたんぱく質は 31 種類であった(図 12B)。即ち、基準を緩めると、iTRAQ で同定されるたんぱく質が大幅に増えることになる。一方、iTRAQ 法の基準を大幅に緩めても(Score 20 以上、iTRAQ では 419 種類同定)、cICAT 法でのみ検出されるたんぱく質は、29 種類存在し、大幅に減少しないことが分かった(データ省略)。これらのたんぱく質は cICAT 法で選択的に同定されるが、iTRAQ 法では同定されにくいものと考えられた。表 8 に cICAT 法選択的な各たんぱく質名、Gi reference No. Score 値を示す。なお、cICAT 法でのクエンチング試薬を DTT から TCEP にすると、比較定量値正確度は低下するものの同定たんぱく質数は 162 種類に増加し、cICAT 選択的たんぱく質は 73 種類になる(データ省略)。

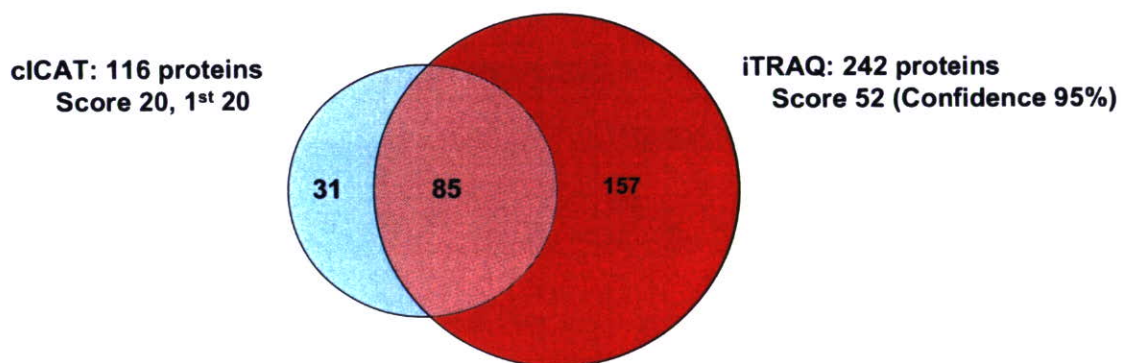
以上のことより、cICAT 法と iTRAQ 法ではそれぞれ長所・短所があり、お互いに補完し合うことが今後の疾患関連たんぱく質の解析に必要であると考えられた。



1stRankedPepHighScore 20以上のペプチドを採用

iTRAQ法はABIのProQuantで99%信頼度(Mascot Score 164以上に相当)を示すたんぱく質を示す。

図 12A. 標準血清(CT02S)を用いて cICAT 法と iTRAQ 法で同定されるたんぱく質の比較



1stRankedPepHighScore 20以上のペプチドを採用

iTRAQ法はABIのProQuantで95%信頼度(Score 52以上に相当)を示すたんぱく質を示す。

図 12B. 標準血清(CT02S)を用いて cICAT 法と iTRAQ 法で同定されるたんぱく質の比較

表 8 cICAT 法で選択的に同定される血清たんぱく質

順位	Protein ID	Score	Description
1	gij21450848	134.7	attractin isoform 3; attractin-2; mahogany protein
2	gij13540563	118.1	factor H-related protein 5
3	gij4507907	102.2	von Willebrand factor precursor; Coagulation factor VIII VWF
4	gij54792787	80.8	complement factor H-related 3
5	gij31543212	55.9	macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like)
6	gij42544239	55.9	complement factor D preproprotein; adipsin; properdin factor D
7	gij4504965	45.1	L-plastin; Lymphocyte cytosolic protein-1 (plasmin); plasmin 2
8	gij5174411	45.1	CD5 antigen-like (scavenger receptor cysteine rich family)
9	gij4758146	41.2	defensin, alpha 1 preproprotein
10	gij10835021	39.4	insulin-like growth factor binding protein 4
11	gij50355970	38.5	Fc fragment of IgG, low affinity IIIb, receptor for (CD16)
12	gij32307161	35.7	cullin 1
13	gij4758236	33.2	extracellular matrix protein 1 isoform 1 precursor;
14	gij4506547	28.7	pancreatic ribonuclease precursor; RNase upl-1
15	gij6005810	28.4	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
16	gij19923368	27.4	sialidase 3; neuraminidase 3; ganglioside sialidase
17	gij48255935	27.1	CD44 antigen isoform 1 precursor; cell surface glycoprotein CD44
18	gij4557871	27.0	transferrin; PRO2086 protein
19	gij4885457	25.4	MAD, mothers against decapentaplegic homolog 4
20	gij5454156	25.0	ubiquitin specific protease 16 isoform a
21	gij8922787	24.3	hypothetical protein FLJ10948
22	gij28372497	24.2	ubiquitin protein ligase E3 component n-recogin 1
23	gij38569405	24.0	arylsulfatase B isoform 1 precursor
24	gij4557351	23.8	butyrylcholinesterase precursor
25	gij24308201	23.6	adipocyte plasma membrane-associated protein
26	gij4557363	21.5	B-lymphocyte-induced maturation protein 1
27	gij27545323	21.4	chondroitin polymerizing factor; chondroitin sulfate synthase 2
28	gij21955172	20.8	pleckstrin homology-like domain, family B, member 2; LL5 beta
29	gij29788758	20.7	ring finger protein 130; goliath protein
30	gij44889481	20.5	myosin IB; myosin-I alpha
31	gij19923899	20.3	hypothetical protein BC009518

5) 低発現血清たんぱく質の解析法の検討：

血清たんぱく質は、非常に高濃度に存在するアルブミン等のたんぱく質からサイトカイン、ホルモン等の低発現たんぱく質等の多数のたんぱく質が存在し、また、その濃度範囲が $1 \sim 10^{12}$ に達することが特徴である。我々は、前述のごとく、患者血清 0.1 ml を抗体カラムで主要 6 たんぱく質を除去した画分を cICAT 法で解析することにより、約 120-150 種類程度の高発現たんぱく質の同定と比較定量を行ってきた。この血清 cICAT たんぱく質の上位を占めるたんぱく質は、Factor H、C3、 α 2-Mcroglobulin、C4BP、C4、Fibronectin、C7、Kininogen、Ceruloplasmin、Kallikrein であり、全体の cICAT たんぱく質の約 30% を占め、また、その殆どが 100K 以上の糖鎖含有高分子たんぱく質であった。従って、当初、これらの上位たんぱ

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を予想した。

そこで、1) 限外ろ過膜 (G100) やゲルろ過カラム (KW802.5) 等で 100K 以上のたんぱく質を除去する、2) アジレント社 (Hu14)、ベックマン社 (IgY-12)・シグマ社 (ProteoPrep 20) 等の新規イムノカラムにかけて上述たんぱく質を除く、3) 上述たんぱく質に対する自前作成の抗体カラム (anti-Factor H column 等) で除去する、4) Con A レクチンカラム等で糖たんぱく質を除去すること等により得た画分を、同様に QSTAR XL で解析した。その結果、確かに、上述の方法により、通常の高発現血清たんぱく質の他に、10-20 種類のたんぱく質の同定・定量が可能になったが、その大部分は高発現血清 cICAT たんぱく質リスト (表 9) に含

まれるものであり、予想に反して大幅に同定たんぱく質が増えることはなかった(データ省略)。

この結果は、高発現血清上位たんぱく質を除くことにより低発現たんぱく質の同定たんぱく質数を増加させる戦略がすでに限界にあることを示唆した。勿論、大量の血清を用い、膨大な処理時間をかけ分画数を大幅に増加させ、質量分析に長時間かけて解析すれば同定たんぱく質数を増加させることも可能であるが(3, 4)、多数の臨床検体を迅速に解析し結果を提供する場合には、現実的には殆ど不可能な方法である。新たな視点での低発現血清たんぱく質の解析法が望まれた。その一つとして以下に述べる方法を検討した。

患者血清たんぱく質を解析する目的の一つは、病変組織より血清に漏出した疾患関連組織たんぱく質を検出し比較することである。しかし、上述の120-150種類の血清cICATたんぱく質の中には殆ど組織由来のたんぱく質は含まれていない。その最大の理由は漏出した組織たんぱく質が血液に入るまでに大幅に希釈され、所謂低発現血清たんぱく質として存在するからである。一方、組織・

細胞のたんぱく質の解析に関しては、血清たんぱく質と同様に25分画数で解析すると、たんぱく質100 μ g程度からcICAT法では約1000種類程度のたんぱく質の同定と比較定量が可能である。この差は、組織たんぱく質の場合、血清と異なり、濃度差が小さい多種類のたんぱく質が存在するためと考えられた(図13)。図13は、血清たんぱく質と組織たんぱく質の同定たんぱく数と Mascot Score との関係を示した。血清の場合は、Factor H等が非常に高い Mascot Score を示すが、その後、たんぱく質数の増加に伴い急速に減衰するパターンを示した。また、QSTAR XLのMSデータをみる限りピーク数は込み合っており、高発現たんぱく質が低発現たんぱく質のピークを妨害しているとは思えなかった。さらに、正確なMS値が得られており9 m/z差のあるピークが多数存在するが、同定に必要なMS/MSが測定できるほどイオン強度は強くないことが分かった。一方、cICAT法は、H鎖或いはL鎖のどちらかのピークで同定できれば、9 m/z差のある相手方を見出し、比較定量値(H/L)の計算が可能になることが特徴の一つであった。

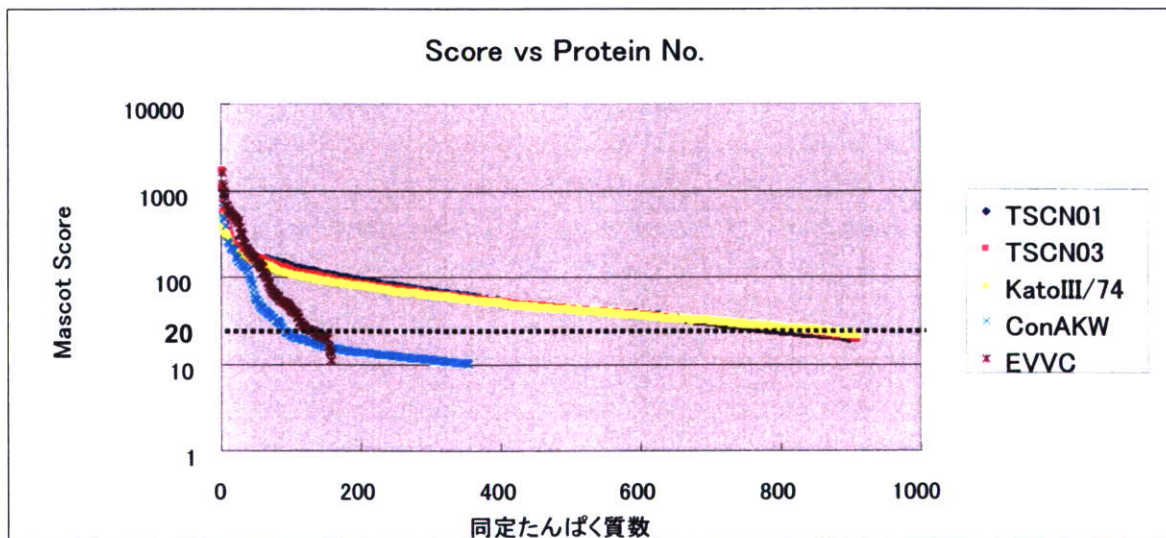


図13. 血清たんぱく質と組織たんぱく質の同定たんぱく数と Mascot Score との関係

EVVCは通常のルーチンアッセイの血清たんぱく質、ConAKWはConAカラムとKW802.5カラムで除去した血清たんぱく質、KatoIII/74はKato-III細胞株とMKN-74細胞株を比較した時のたんぱく質、TCSN01及びTCSN03は胃がん・正常胃組織を比較した時のたんぱく質の解析結果を示す。

表 9. cICAT 法で再現良く同定される血清たんぱく質リスト

補体系(30)	Blood transport and binding protein(20)	Protease inhibitor(15)	その他(82)	
complement component C1q, A chain	afamin	alpha 2 macroglobulin	aggrecan 1 isoform 1 precursor	lumican
complement component C1q, B chain	beta-2-glycoprotein I	alpha-1-antitrypsin, antitrypsin	amyloid beta A4 protein isoform a	lysosomal-associated membrane protein 1
complement component C1q, C chain	cholesterol ester transfer protein, plasma	alpha-1-antichymotrypsin	atractin isoform 2	lysosomal-associated membrane protein 2
complement component 1, r	fc fragment of IgG binding protein	alpha-2-antiplasmin	beta actin	macrophage stimulating 1
complement component 1, r	hyaluronan binding protein 2	antithrombin III	beta globin	melanoma cell adhesion molecule
complement component 1, s	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	bikunin	cadherin 1 type 1 preproprotein	neural cell adhesion molecule 1
complement component 2	insulin-like growth factor 2	complement component 1 inhibitor	carosinase glutamate carboxypeptidase like 2	PDZ and LIM domain(eflin);
complement component 3	insulin-like growth factor binding protein 2	cystatin C	cartilage acidic protein 1	peptidoglycan recognition protein 1
complement component 4A	insulin-like growth factor binding protein 3	heparin cofactor II	cartilage oligomeric matrix protein	peptidylprolyl isomerase A isoform 1
complement component 5	insulin-like growth factor binding protein 4	inter-alpha (globulin) inhibitor H1	cathelicidin antimicrobial peptide	perostin,osteoblast specific factor
complement component 6	insulin-like growth factor binding protein 5	inter-alpha (globulin) inhibitor H2	CD14 antigen	phosphatidylinositol-glycan-specific phospho
complement component 7	insulin-like growth factor binding protein 6	inter-alpha (globulin) inhibitor H3	CD163 antigen isoform a	pigment epithelium-derived factor
complement component 8, alpha	insulin-like growth factor binding protein 7	inter-alpha (globulin) inhibitor H4	CD44 antigen isoform 1 precursor	plasminogen-related protein
complement component 8, beta	insulin-like growth factor binding protein, acid labile	kallistatin precursor	CD5 antigen-like	platelet glycoprotein Ib alpha polypeptide
complement component 8, gamma	lactotransferrin	tissue factor pathway inhibitor	CD59	pregnancy zone protein
complement component 9	retinol-binding protein 4, plasma		cell adhesion molecule with homology to	procollagen C-endopeptidase enhancer
complement factor H	selenoprotein P precursor	apolipoprotein(B)	chitobiase, di-N-acetyl-	profilin 1
factor H-related protein 1	tetranectin	apolipoprotein A-II	chromosome 20 open reading frame 3	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
factor H-related protein 2	transthyretin, prealbumin	apolipoprotein B	collectin sub-family member 10	prostaglandin D2 synthase 21kDa
factor H-related protein 3	vitamin D-binding protein	apolipoprotein C-IV	cysteine-rich secretory protein 3	proteoglycan 4
factor H-related protein 4		apolipoprotein D	defensin, alpha 1 preproprotein	quiescinc Q6
factor H-related protein 5	Enzyme(24)	apolipoprotein E	delta globin	retinoic acid receptor responder 2
complement factor B	a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type)	apolipoprotein F	dermcidin precursor	SI00 calcium-binding protein A8
complement factor I	angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5	apolipoprotein Lp(a)	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix	selectin L
properdin P factor, complement	biotinidase	apolipoprotein M	extracellular link domain containing 1	sex hormone-binding globulin
complement factor D	butyrylcholinesterase		extracellular matrix protein 1 isoform 1	similar to Ig kappa chain
complement component 4 BP, alpha	carboxypeptidase N 83 kDa chain	Common circulating blood protein(14)	Fc fragment of IgG receptor for (CD16)	small inducible cytokine A16 precursor
complement component 4 BP, beta	carboxypeptidase N, polypeptide 1, 50kD	alpha 1B-glycoprotein	fetuin B; fetuin-like protein	soluble mannose binding lectin precursor
complement receptor type 2	carboxypeptidase U(carboxypeptidase B2)	alpha-1-microglobulin	fibroblast activation protein, alpha sub	SPARC-like 1; hevjin; mast9
complement component C1q receptor	dipeptidylpeptidase IV	alpha-2-glycoprotein, zinc	fibulin 1 isoform C	tarsh protein
	dopamine beta-hydroxylase	alpha-2-HS-glycoprotein	ficolin 2 isoform a	tenascin XB isoform1
血液凝固・線溶・キニン系(20)	phosphodiesterase 2	beta-2-microglobulin	ficolin 3 isoform 1	thrombospondin 4
coagulation factor II	fucosidase	ceruloplasmin	folliculin like 1 precursor	transforming growth factor, beta-induced, 66
coagulation factor V	lecithin-cholesterol acyltransferase	clusterin isoform 1	galectin 3 binding protein; L3 antigen	vascular cell adhesion molecule 1, CD106 ag
coagulation factor V II isoform a	lysozyme precursor	fibronectin 1 isoform 3	haptoglobin related protein	
coagulation factor IX	mannan-binding lectin serine protease 1	gelsolin isoform a	heparan sulfate proteoglycan 2	
coagulation factor X	mannan-binding lectin serine protease 2	hemopexin	HGF activator preproprotein	
coagulation factor XI	matrix metalloproteinase 2 preproprotein	orosomuroid 1	hypothetical protein MGC45378	
coagulation factor XII	matrix metalloproteinase 3 preproprotein	orosomuroid 2	immunoglobulin J chain	
coagulation factor XIII A chain	matrix metalloproteinase 9 preprotein	peptidoglycan recognition protein L	immunoglobulin superfamily, member 4	
coagulation factor XIII B subunit	metalloproteinase inhibitor 1 precursor	vitronectin	interleukin 1 receptor accessory prote	
protein C	pancreatic ribonuclease		intracellular adhesion molecule 2 precursor	
protein S	paraoxonase 1	血小板由来(9)	keratin 1	
protein Z	plasma glutathione peroxidase 3	glycoprotein V (platelet)	keratin 6A	
histidine-rich glycoprotein	prenylcysteine oxidase 1; prenylcysteine lyase	glycoprotein VI (platelet)	L1 cell adhesion molecule isoform 1	
plasminogen	tryptophan/serine protease	latent transforming growth factor beta BF	leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1	
plasma kallikrein B		multimerin 1	leukocyte immunoglobulin-like receptor	
kininogen(H+L)		platelet factor 4	lipopolysaccharide-binding protein	
von Willebrand factor		pro-platelet basic protein	L-plastin 1	
fibrinogen, alpha chain isoform alpha		secreted protein, acidic, (osteonectin)		
fibrinogen, beta chain preproprotein		thrombospondin 1		
fibrinogen, gamma chain gamma-A		triggering receptor expressed on myeloid		
分類参照: Molecular & Cellular Proteomics 1:947-955,2002				

そこで、患者血清と健常人血清を比較する時に、患者病変組織たんぱく質を介在させて、比較する

ことを試みた。即ち、患者(病変部位)組織等より分取したたんぱく質(病変組織由来たんぱく質)と

患者血清たんぱく質を cICAT 法で同定と比較定量を行い、次いで、同一の組織由来たんぱく質と健常者血清たんぱく質と同様に比較解析し、連結処理をすることにより、患者と健常人の血清中に存在する多数の組織由来の低発現たんぱく質の同定・比較定量が可能であるかを検討した(以下に、連結処理記載)。なお、この場合、病変組織由来たんぱく質画分とは病変組織部位より抽出したたんぱく質或いは病変組織部位近傍の体液(神経疾患等の場合は脳脊髄液(CSF))を意味する。

連結処理：

- 1) 患者(病変)組織由来のたんぱく質を cICAT 試薬(例えば H 鎖試薬)、健常者血清たんぱく質を cICAT 試薬(L 鎖試薬)で分別標識し、両者を常法により解析し、同定たんぱく質と比較定量値(組織由来たんぱく質/健常者血清たんぱく質)を測定する。
- 2) 1) と同じ患者(病変)組織由来のたんぱく質と患者血清を同様に cICAT 法で分別標識し、同定たんぱく質と比較定量値(組織由来たんぱく質/患者血清たんぱく質)を測定する
- 3) 1) と 2) で得られた同定たんぱく質とその比較定量値を連結処理することにより、患者血清たんぱく質と健常人血清たんぱく質の比較定量値を得る。

即ち：(患者組織由来たんぱく質/健常人血清たんぱく質) ÷ (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

具体的には、パーキンソン病患者血清(PDS: 10名分をプールしたもの)と健常人標準血清(NHS: CT02S)及びパーキンソン病患者脳脊髄液(PD-CSF: パーキンソン病患者10名のCSFをプールしたもの(病変組織由来たんぱく質として))のたんぱく質を、cICAT 法により、同定・比較定量解析を行った。すなわち、アジレント社製抗体カラム(Hu 14, Column 10 x 100mm)で、Albumin, IgG, IgA, IgM, α 2-Macroglobulin, α 1-Antitrypsin、

Transferrin, Haptoglobin, Apo A-I, Apo A-II, C3, Transthyretin, α 1-Acid glycoprotein, α 2-Acid glycoprotein を除去した PD-CSF(100 μ g protein)及び NHS(100 μ g)を、それぞれ cICAT-H 鎖試薬および cICAT-L 鎖試薬で標識し、常法により得られた cICAT ペプチドを、nano-LC/QSTAR XL で解析を行い、統合データベースシステム(HiSpec)を用いて、脳脊髄液(PD-CSF, H 鎖標識)と健常人標準血清(NHS, L 鎖標識)との各たんぱく質の比較定量比(H/L)を計算した。また、RefSeq の DB を用いて、cICAT ペプチドレベルで Rank 1、score 20 以上を示すたんぱく質及びペプチド精査の結果正しいと判断されたたんぱく質を同定たんぱく質とした。その結果、306 種類のたんぱく質の同定が可能であり、そのうち、ピーク混雑で比較定量不能のものは 9 種類、PD-CSF にのみ存在する(H/L = ∞)は 51 種類、血清のみに存在するもの(H/L = 0)は 6 種類であり、残りの 240 種類は 0 から無限大までの間の比較定量値が計算可能であった(図 14)。この結果は、同様に処理した血清同士(PDS と NHS)の比較解析で得られるたんぱく質数(約 120 種類)よりもはるかに多くのたんぱく質の解析が可能であることを示した。また、上記同定したたんぱく質の約 80%は PD-CSF を cICAT 法で同定したものと同一のたんぱく質であった。このことから、上記の結果は、血清では同定限界以下の病変組織由来の低発現たんぱく質が PD-CSF 中の存在するたんぱく質により同定され、比較定量が可能になったためと考えられた。さらに、この原理を利用して、cICAT 法で同様に PD-CSF を H 試薬で、パーキンソン病患者血清(PDS)を L 試薬で分別標識し、たんぱく質の同定と比較定量解析を行った。その結果、306 種類のたんぱく質の同定が可能であり、ピーク混雑で比較定量不可のものは 8 種類、PD-CSF にのみ存在する(H/L = ∞)は 29 種類、血清のみに存在するもの(H/L = 0)は 4 種類であり、残りの 265 種類は 0 から無限大までの間の比較定量値(PD-CSF/PDS)が計算可能であった(図 15)。そこで、上記の 2 つの比較定量値すなわち、

PD-CSF/NHS と PD-CSF/PDS が得られた各たんぱく質に関して、(PD-CSF/NHS) 値を (PD-CSF/PDS) 値で割る ($\text{PD-CSF/NHS} \div \text{PD-CSF/PDS} = \text{PDS/NHS}$) ことにより、PDS/NHS を計算した。その結果、比較定量不能なものは 104 種類であり、比較定量可能なものは 202 種類であった。そのうち、PDS にのみ存在するものは 11 種類、NHS にのみ存在するものは 5 種類であり、残りの 186 種類は 0 から無限大の間の比較定量値が得られた (図 16)、また、その比較定量値とたんぱく質の数 (度数) は正規分布を示した (図 17)。一方、PDS と NHS を直接解析した場合には、同定・比較定量可能なたんぱく質は 120 種類であった。

また、本法による比較定量可能なたんぱく質 202 種を Panther の分類に基づき、たんぱく質の機能別に分類すると、通常の血清同士の解析では

検出されにくい情報伝達系たんぱく質、細胞接着たんぱく質、受容体たんぱく質が多数存在することが分かった (図 18)。また、比較定量値が 5 以上、もしくは 1/5 以下を示す特異性の高いたんぱく質は合計 31 種類存在した。その中には、脳組織の神経細胞受容体などの低発現たんぱく質が多数含まれていた。これにより、血清同士の直接の比較では検出されなかった病変組織由来の多数の血清低発現たんぱく質の比較定量解析が可能になった。

以上のことより、患者血清と健常人血清を比較する場合、患者病変組織たんぱく質を介在させると、少なくとも病変部位由来の低発現血清たんぱく質の解析が可能になるものと考えられた。今後、他の疾患で同様な解析を行うことは非常に重要であった。

健常人血清(NHS)とパーキンソン病脳脊髄液(PD-CSF)の比較

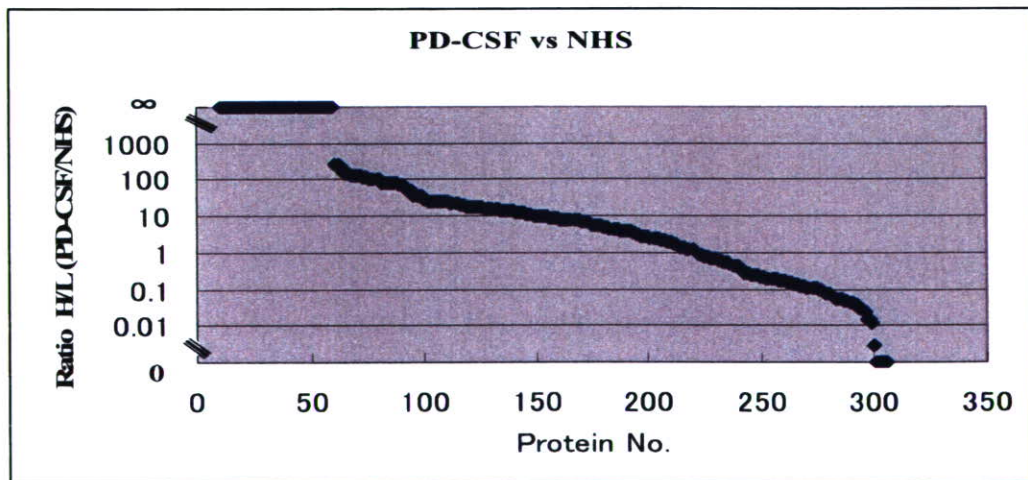


図 14. 健常人血清 (NHS) とパーキンソン病脳脊髄液 (PD-CDS) の解析比較