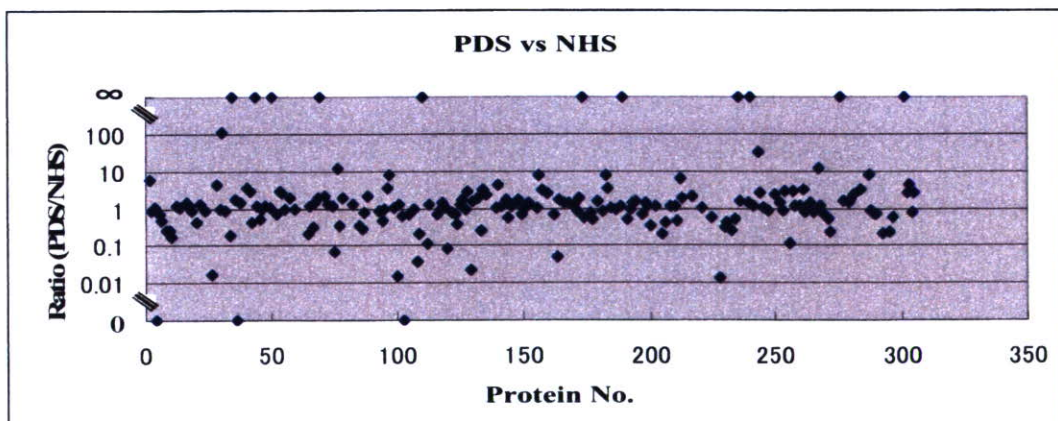


図 15. パーキンソン病患者血清 (PDS) とパーキンソン病脳脊髄液 (PD-CSF) の解析比較

パーキンソン病患者血清 (PDS) と健常人血清 (NHS) の比較



同定された306種類の内、202種類が比較定量可能。比較定量不能なたんぱく質(104種類)の比は表示せず。

図 16. パーキンソン病患者血清 (PDS) と健常人血清 (NHS) の解析比較

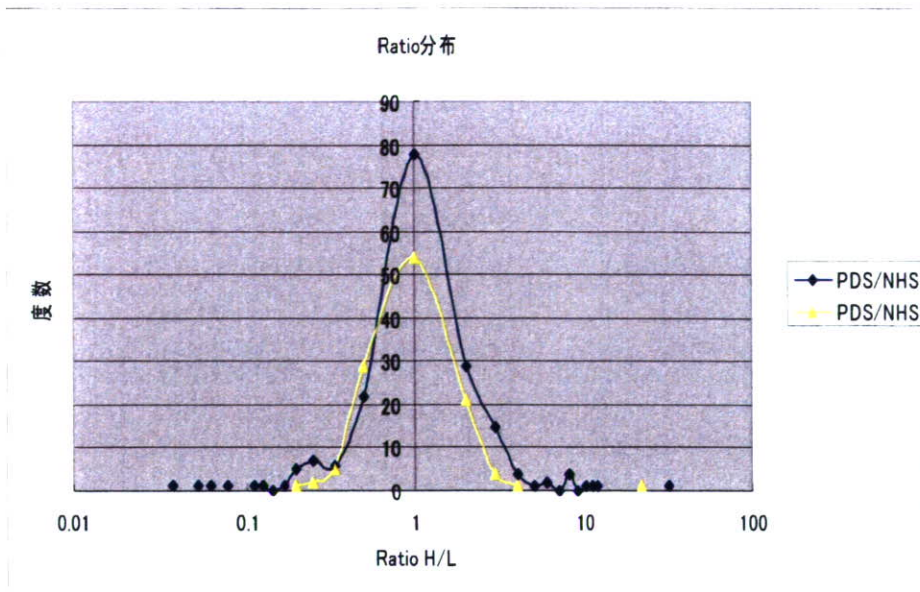


図 17. パーキンソン病患者血清 (PDS) と健常人血清 (NHS) の比較定量値 (H/L) の分布。

青線は PD-CSF を介した時の PDS/NHS を、黄色線は直接血清を比較した時の PDS/NHS を示す。

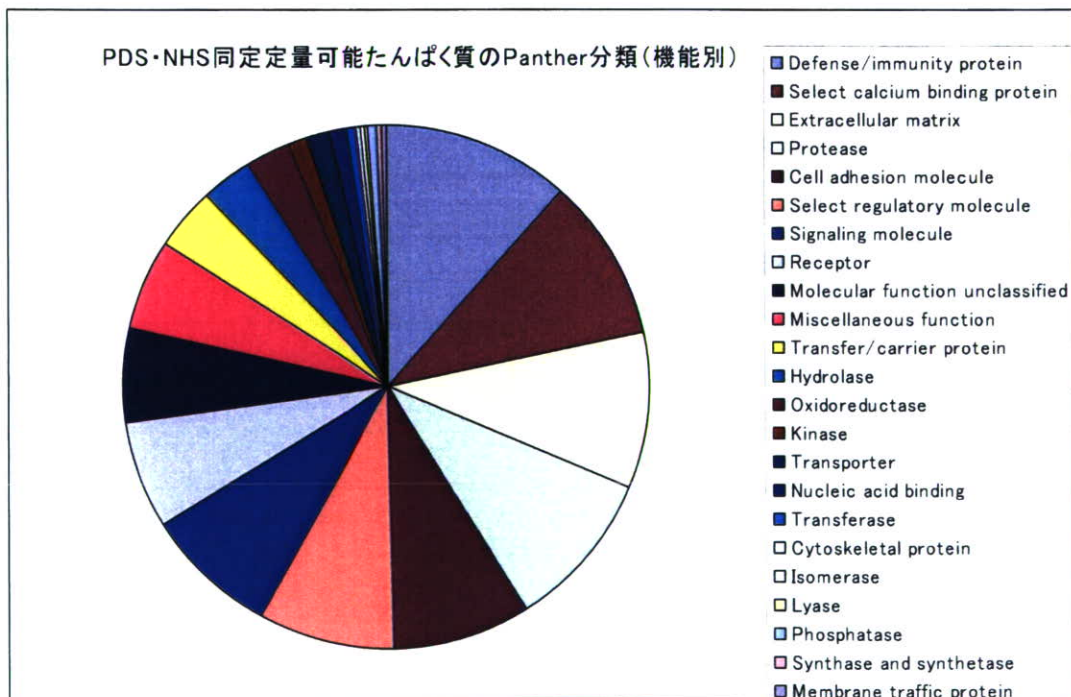


図 18. PDS・NHS 同定定量可能たんぱく質の Panther 分類 (機能別)

6) 脳脊髄液のたんぱく質の解析法の検討:

これまで、パーキンソン病及びパーキンソン症候群の患者血清と健常人血清の高発現血清たんぱく質(上位 120-140 種類)を cICAT 法で解析してきたが、疾患に特徴的なたんぱく質を見出すことは困難であった。その最大の理由の一つとして、原因と考えられる病変組織部位が脳(中枢神経系)であるため、たとえ、その変化があったとしても、血流に入るまでに希釈され、血清にまで反映されないことが考えられた。中枢神経系疾患の疾患関連たんぱく質を探索するためには、より病変部位に近い脳脊髄液(CSF)のたんぱく質解析法を確立することが重要である。今回、基礎検討用検体として、国立精神・神経センターで保存されていたパーキンソン病患者髄液(連結不可能匿名化)を用いて、cICAT 法による CSF たんぱく質解析を検討した。

CSF のたんぱく質濃度は 150-300 $\mu\text{g/ml}$ 程度であり血清の約 1/80 であるが、その 80% は血清アルブミン、補体たんぱく質等の血清主要たんぱく質が占める。残りの 20% に、脳組織選択的たんぱく質及び同組織より漏出したたんぱく質が含まれると考えられている。そこで、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)を、血清の場合と同様に、アジレント抗体カラム(Hu 14, Column 10 x 100mm)で分画し、血清主要たんぱく質(14 種類)を除去した画分(PD-CSF 素通り画分)と抗体カラムに吸着・溶出した画分(PD-CSF 吸着画分)に分けて解析を行った。

まず、PD-CSF 素通り画分の解析に関しては、同画分 100 μg protein を常法(方法に記載)に基づき、cICAT-H 鎖試薬および cICAT-L 鎖試薬で 1:1 に標識し、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、脳脊髄液(PD-CSF 素通り画分)のたんぱく質の同定と比較定量比(H/L)を計算した。なお、RefSeq の DB を用いて、cICAT ペプチドレベルで Rank 1、score 20 以上

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、294 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 6 種類、残りの 288 種類は比較定量値が可能であり、その定量比はほぼ、理論どおりに 1:1 であった。同定したたんぱく質を Mascot Score 順に並べると、上位は血清たんぱく質であったが、下位にいくにつれて神経系組織・脳脊髄液由来と考えられるたんぱく質が増加した。一方、PD-CSF 吸着画分を同様に cICAT-H 鎖試薬および cICAT-L 鎖試薬で 1:1 に標識し、解析したところ、52 種類のたんぱく質の同定が可能であり、そのうち 39 種類が血清たんぱく質であり、また、PD-CSF 素通り画分と重複するものは 33 種類であった。残りの 19 種類が PD-CSF 吸着画分のみ検出され、その中には、Hu14 で吸着される血清主要たんぱく質(14 種類)が含まれていた。

以上のことより、PD-CSF 素通り画分の 294 種類と PD-CSF 吸着画分 19 種類の合計 313 種類の脳脊髄液たんぱく質の同定が可能であった。この結果は、通常と同様に処理した 100 μg の血清同士(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、また、これまでに、cICAT 法で同定した血清たんぱく質リスト(222 種類)より多いことが分かった(図 17)。すなわち、脳脊髄液たんぱく質 313 種類のうち、94 種類は今までに血清解析で検出されたことがあるが、残りの 219 種類は脳脊髄液選択的な低発現たんぱく質と考えられ、血流に入るまでに希釈されたために血清では検出されなかったものと解釈できた。図 18 には、脳脊髄液たんぱく質 313 種類の Panther 分類図(機能別)を示す。一番多いカテゴリーは受容体(Receptor)であり、次いで、細胞外マトリックス(Extracellular matrix)、情報伝達物質(Signaling molecule)、細胞接着分子(Cell adhesion molecule)、選択的制御分子(Select regulatory molecule)、免疫・生体防御たんぱく質(Defense/immunity protein)、たんぱく質分解酵

素 (Protease)、選択的カルシウム結合たんぱく質 (Select calcium binding protein) の順であった。また、たんぱく質リン酸化酵素 (Kinase) やトランスポーター (Transporter) も含まれていた。この分類パターンは血清の場合と大きく異なり、むしろ細胞・組織解析の分類パターンに近い。脳組織の細胞・細胞膜及び細胞質のたんぱく質が脳脊髄液に漏出したものと考えられた。なお、脳脊髄液のたんぱく質に関しては、米国のグループが iTRAQ 法で解析を行っている (13)。それによると、パーキンソン病、アルツハイマー病およびレビー小体病 (Dementia with Lewy bodies) の脳脊髄液の解析で、合計約 746 種類のたんぱく質の同定と比較定量が可能と報告されている。そこで、今回 cICAT 法で同定したパーキンソン病の脳脊髄液たんぱく

質 313 種類と比較した結果、iTRAQ 法で同定したたんぱく質と共通なものは 102 種類であり、残りの 211 種類は cICAT 法でのみ同定可能なたんぱく質であった (図 21)。その中には、各種受容体、神経変性疾患等に関与するとされる多数の低発現たんぱく質が含まれていた。なお、iTRAQ 法で使用した ABI4700、解析ソフト、使用データベース (IPI (3.1) DB)、スコアリング方法が、cICAT 解析法の場合 (QSTAR XL、RefSeq database、Mascot) と異なる為、純粋な意味での比較はできないが、マイナーな SNP 変異をたんぱく質数に加えない RefSeq database を用いれば、iTRAQ で同定したたんぱく数 (746 種類) は大幅に減少すると予想された。

脳脊髄たんぱく質と血清たんぱく質の比較 (ベン図)

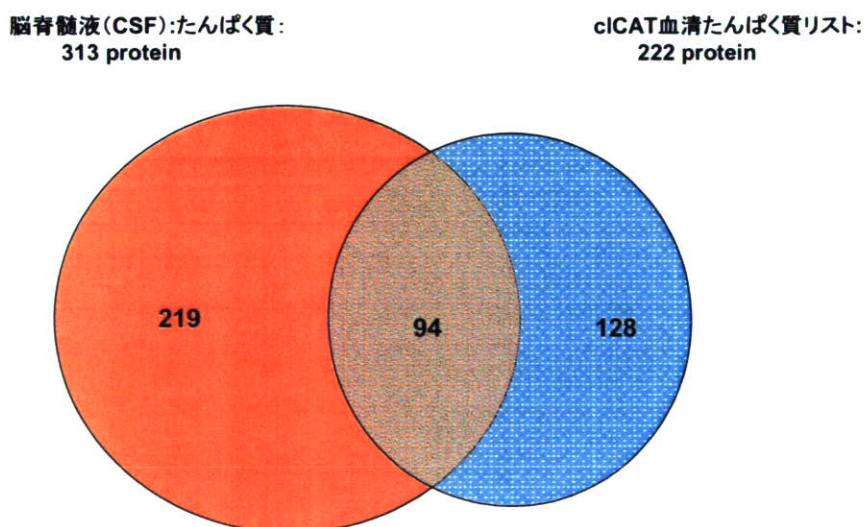


図 19. cICAT 法により同定された脳脊髄液たんぱく質と血清たんぱく質の比較 (ベン図)

脳脊髄液たんぱく質の解析 (Panther分類 機能別)

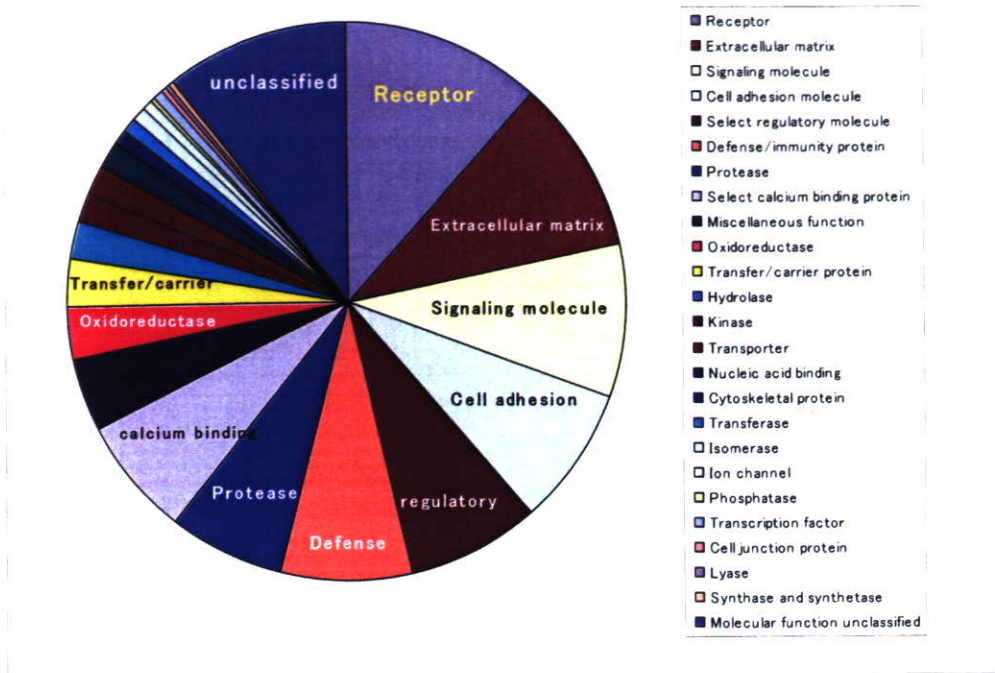


図 20. cICAT 法により同定された脳脊髄液たんぱく質の Panther 分類 (機能別)

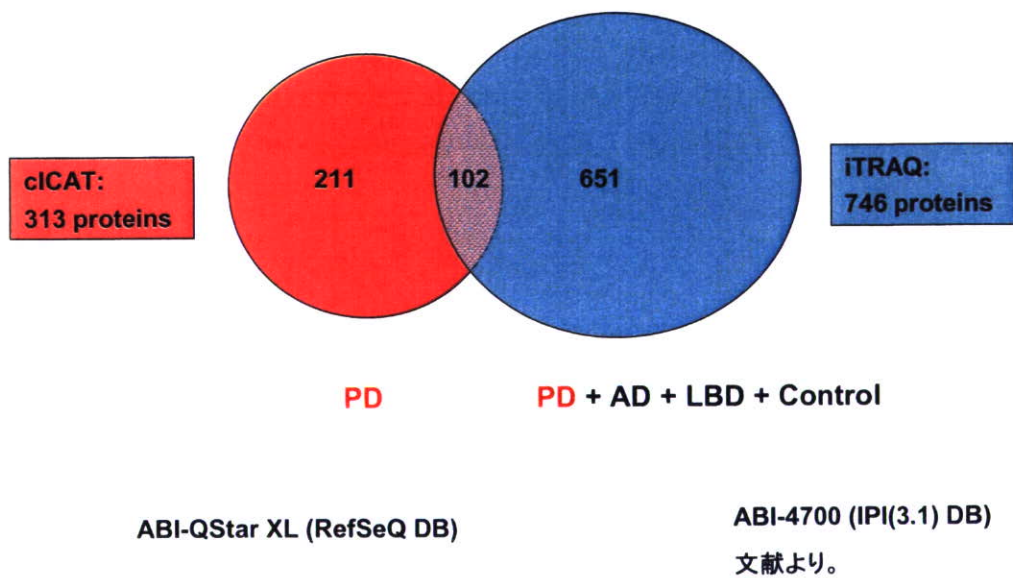


図 21. 脳脊髄液たんぱく質解析での cICAT 法と iTRAQ 法の比較

7) Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (FGF-receptor 2) の siRNA によるスキルス胃がん細胞株の増殖阻害効果：

(1) 胃がん細胞株を用いた解析：

昨年、各種ヒト胃がん細胞株(スキルス胃がん株 Kato-III、低分化充実型腺癌株の MKN-45 及び中分化型腺癌株の MKN-74)を用いて、その発現たんぱく質を cICAT 法で解析した結果、スキルス胃がん細胞株の Kato III は FGF-receptor 2 を選択的に強発現していることを確認した(4)。このことは、すでに報告されている Kato-III での FGF-receptor 2 mRNA の選択的強発現を、たんぱく質レベルでも確認したことを示した。

そこで、本年度は、Kato-III 以外のスキルス胃がん細胞株すなわち OCUM-1 株及び NUGC-4 株でどの程度 FGF-receptor 2 たんぱく質が発現されているのかを同様に cICAT 法で検討した。すなわち、Kato-III を L 試薬で、OCUM-1 株或いは NUGC-4 株を H 試薬で標識して比較解析を行った。その結果、ともに約 800 - 1000 種類のたんぱく質の同定と比較定量が可能であったが、FGF-receptor 2 に関してみると、OCUM-1 株では、Kato-III 株の約 5% 程度の FGF-receptor 2 の発現がみられたが、NUGC-4 株では 0.1% 以下の発現しか観察されなかった(データ省略)。一方、EGF-receptor に関しては、OCUM-1 株は Kato-III 株の 3-4 倍、NUGC-4 株では 2.5 倍多く発現していた。また、後述するように、実際のスキルス胃がん患者 2 名での LMD で部位特異的に分取したスキルスがん部位と正常組織部位の比較で約 1000 種類のたんぱく質を同定と比較定量したが、その中には FGF-receptor 2 は含まれなかった。一方、原始血球系のたんぱく質数種類がスキルスがん組織で共通に強発現して

いた。従って、FGF-receptor 2 は明らかに Kato-III 株には強発現しているが、他のスキルス株でも共通に強発現しているものとは言えず、むしろ Kato-III 株に特異的なものである可能性が高いと考えられた。しかし、FGF-receptor 2 が Kato-III 株を含めた胃がん細胞株の増殖にどの程度関与しているかは興味あることである。

(2) siRNA によるヒト胃がん培養細胞株の増殖阻害：

一般に、同位体標識法等でたんぱく質の発現差が見出されても、その差が必ずしも機能活性の差を反映するとは限らない。創薬ターゲットなどの疾患関連たんぱく質を探索するためには、たんぱく質発現差解析とともにその機能解析も必要である。上述のように、FGF-receptor 2 は Kato-III 株に選択的に強発現しているため、FGF-receptor 2 の機能解析のために、mRNA レベルでその発現を阻害する siRNA を作成し、各種胃がん細胞の増殖に及ぼす効果を調べた。即ち、FGF-receptor 2 の siRNA (DHARMACON 社製、US) を、各胃がん細胞株 (Kato-III, MKN-45, MKN-75, NUGC-4, OCUM-1) に、Transfection 試薬 (DharmaFECT 1) を用いて Transfection を行い、Transfection 後 1-7 日目の細胞増殖阻害効果 (10% 牛胎児血清存在下) を、MTS 法 (Promega) を用いて測定した。なお、FGF-receptor 2 の siRNA としては 4 種類 [Target siRNA-17, -18, -19, -20 (表 10)] を混合したもの (ON-TARGET plus SMART pool FGR2) 及びそれぞれ単独の Target siRNA を、また、negative コントロールとしては Non-Target siRNA を使用し、各細胞株への最適濃度条件下で Transfection を行った (ユニテック社依頼)。

表 10

FGF-receptor 2 の siRNA の種類と配列

Anti-sequence	Sense-sequence
Target siRNA-17: 5'P-GAUUGAUGGACCCGUAUUCUU	GAAUACGGGUCCAUCAUUCUU
Target siRNA-18: 5'P-UCAGAUGGGACCACACUUUUU	AAAGUGUGGUCCAUCUGAAU
Target siRNA-19: 5'P-UGUUGGUCCAGUAUGGUGCUU	GCACCAUACUGGACCAACAUU
Target siRNA-20: 5'P-UUUCGUACCUUGUAGCCUCUU	GAGGCUACAAGGUACGAAAUU
Non-Target siRNA #1: Negative control siRNA at least 4 mismatches to human, mouse or rat gene.	

その結果、siRNA4 種類の混合物 (ON-TARGET plus SMART pool FGFR2) を Transfection させた場合、Kato-III が最も強い阻害効果を受け、また、NUGC-4 株も弱いながら阻害効果を受けた。一方、低分化非充実型腺がん細胞株の MKN-45 及び中分化型腺がん細胞株の MKN-74 は殆ど阻害効果を受

けなかった (図 22)。また、スキルス胃がん細胞株の OCUM-1 は、FGF-receptor 2 を Kato-III 株の 5% 程度発現しているにも関わらず、殆ど阻害効果を受けなかった。なお、増殖阻害実験において、MTS 法の変わりに、BrdU 法 (Roche) でも行ってもほぼ同様な結果が得られた (データ省略)。

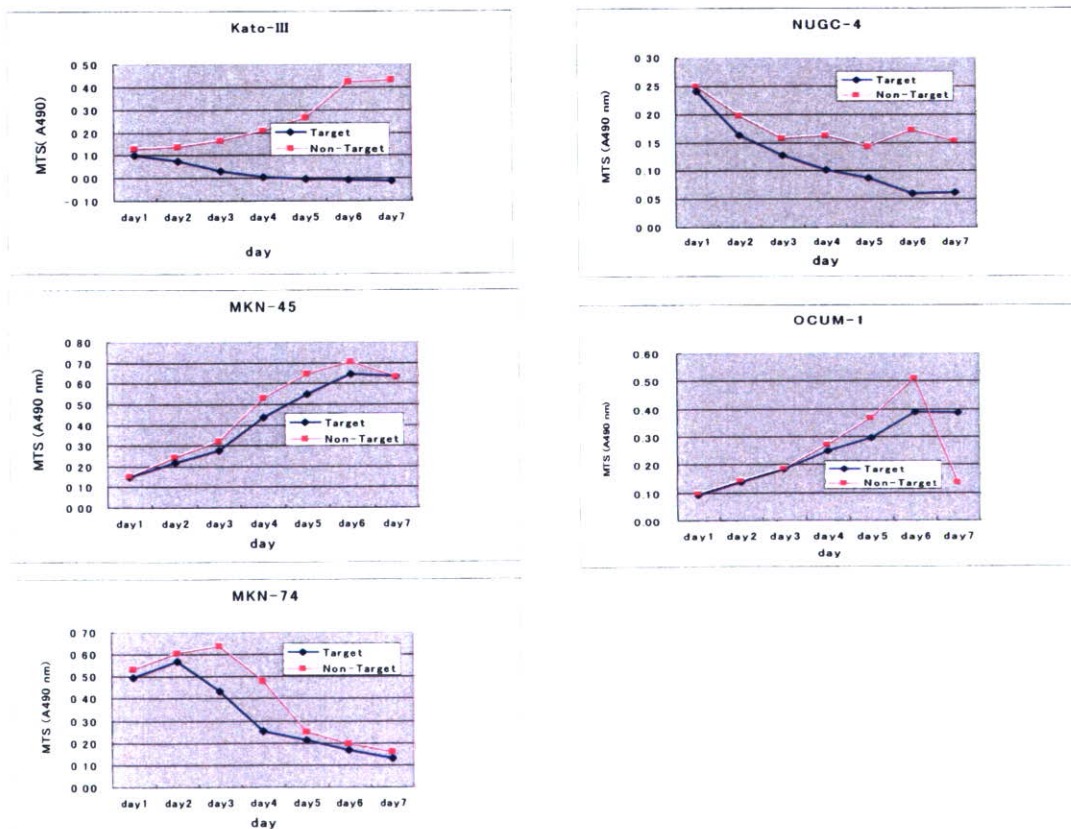


図 22. FGF-Receptor 2 の Target siRNA4 種混合物 (ON-TARGET plus SMART pool FGR2) による細胞増殖抑制試験

次に、4種のsiRNAのうち、どの配列を持つsiRNAが最も阻害効果が強いかを、Kato-III、NUGC-4株を用いて調べた(図23)。表10に各siRNAのanti-sense sequenceとsense-sequenceを示す。その結果、Kato-IIIの場合、いずれのsiRNAもnegative controlのNon-target siRNAより阻害効果は示したが、最も阻害効果が強いsiRNAは

Target siRNA19であり、ついでTarget siRNA20、Target siRNA18の順であった。また、NUGC-4の場合では、Target siRNA19のみが阻害効果を示した。従って、Target siRNA19が最も阻害効果が強いsiRNAであると考えられた。なお、Target siRNA19はMKN-45細胞には殆ど阻害効果を示さなかった(データ省略)。

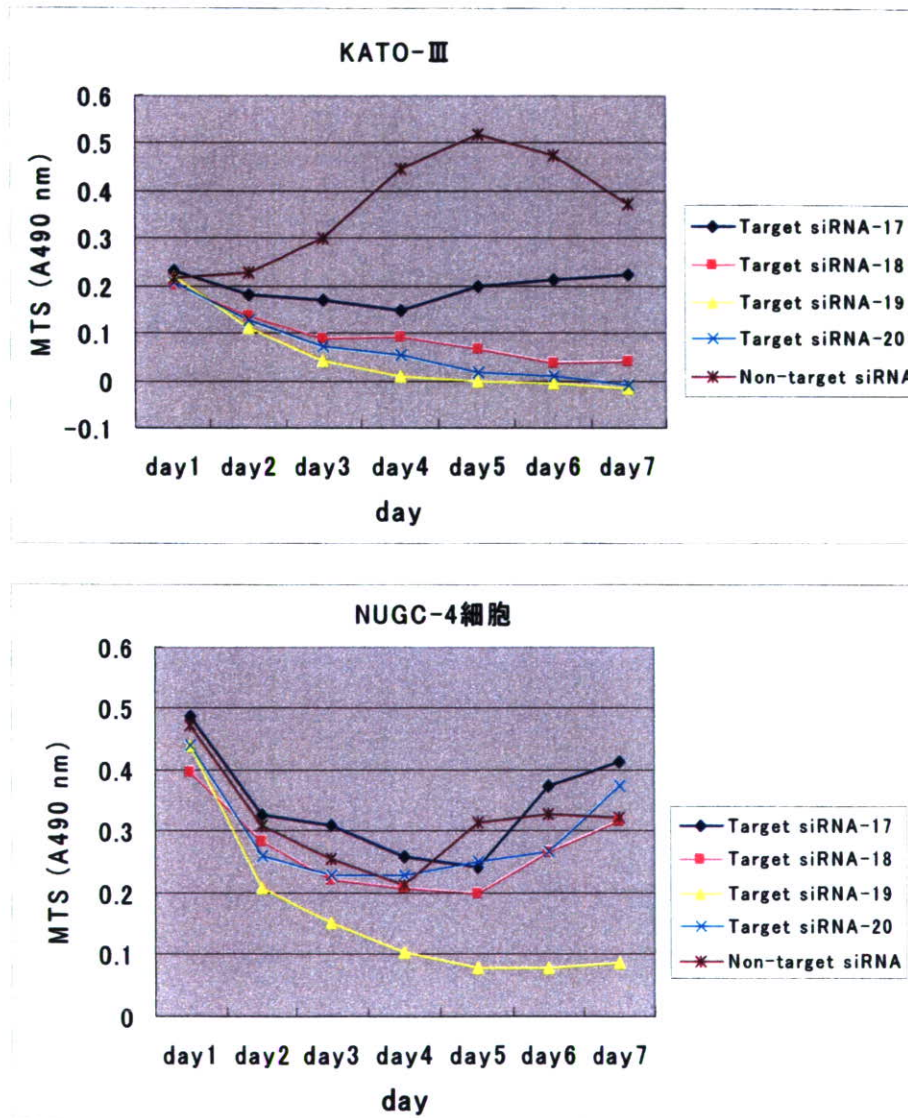


図23. 各種FGF-receptor 2 siRNA(Target siRNA-17, -18, -19, 20)による増殖阻害効果

以上のことから、FGF-receptor 2を選択的に強発現しているKato-III株は、FGF-receptor 2 siRNAにより著しい増殖阻害を受けるので、

FGF-receptor 2に極めて依存する細胞増殖を行う細胞株と考えられた。また、未分化充実型腺がん株MKN-45及び中分化腺がん株MKN-74株が

FGF-receptor 2 siRNA によって増殖阻害を受けないことは、FGF-receptor 2 が殆ど発現していないことと矛盾せず、これらの細胞株は他の受容体を介して増殖するものと考えられた。また、Kato-III 株と MKN-45 株の FGF-receptor 2 の mRNA レベルを RT-PCR 法で定量すると、Kato-III 株は MKN-45 株の約 300 倍多く発現していることが明らかになった(データ省略)。従って、この両株に関しては、FGF-receptor 2 の mRNA 発現とたんぱく質発現および機能(増殖能)とは良く一致することになる。一方、他のスキルス胃がん株の OCUM-1 株と NUGC-4 株に関して言及すると、OCUM-1 株は Kato-III 株の約 5% FGF-receptor 2 たんぱく質を発現しているが、siRNA による増殖阻害は受けなかった。また、NUGC-4 株は殆ど FGF-receptor 2 たんぱく質を発現していなかったが、Kato-III 株に比べると弱いながら増殖阻害を受けた。このうち、OCUM-1 株は Kato-III 株に比べ 3-4 倍多く EGF-receptor を発現していることから、恐らく、EGF-receptor の増殖系が主流であるので FGF-receptor 2 siRNA の阻害を受けなかったものと推定された。一方、NUGC-4 株が siRNA による阻害を受ける理由は定かではない。一つの可能性として、cICAT 法では検出できない類縁の受容体に siRNA が作用して弱い阻害を受けたことが考えられた。

8) 大規模網羅的解析を考慮したデータ品質管理:

本プロジェクトでは、MS 測定担当の研究者とインフォマティクス担当研究者が協力し、大規模網羅的解析を考慮したデータ品質管理基準を検討・策定した。MS 測定は、機器に関して別途定められた基準に従って調整する他、試料を測定する直前に 2 回、直後に 1 回、品質管理のために BSA 断片を測定し、その内容を確認している。現在、全ての血清高発現試料の MS 測定は、上記の品質管理基準に従って行っている。この管理基準によって定められたチェック項目のうち、液体クロマトグラフィーの動作品質を保証するための確認項目として、以下のデータを、測定ごとに複数の BSA ペプチド断片について確認した。:

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

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

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

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

9) 同定・定量精度向上とユーザ利便性向上へ向けた各種改良:

血清高発現たんぱく質解析データがハイスループットで質量分析部門から送られてくるようになると、バイオインフォマティクス側で行う同定結果、定量結果の検証についても、ハイスループット化を実現する必要があった。最終的な検証である「人の目による精査」を効率化するために、①システム側で実行可能な自動検証処理を可能とするための各種機能の追加と、②人的精査作業を個人差なくルーチン化するためのマニュアルの作成の 2 点を行った。以下システム側で構築した機能について概要を述べる。

- (1)自動コンバイン・コンペア・フィルター・セーブ機能
・ Search Manager の Combine Mascot Results 画面に、「Combine & Filter」機能を追加することにより、指定した結果ファイルのコンバイン、

ICAT-LとHのコンペア、これまで手作業で行っていた各種フィルター処理(後述)、スコア 20以下のタンパク質の除去、Specified Proteinの復活、データベースへのセーブを自動実行するようにした。コンバインするファイルの指定はマニュアルチェックで行うが、ファイル名絞り込みなどのフィルタリング、チェックオール機能により、簡便化した。

- ・この機能により、作業者は上記機能でセーブされたコンバインデータを出発点に、精査作業を実施すればよいことになった。

(2) ペプチド及び断片イオンの Mass 実測値と理論値とのずれを評価することによる偽陽性フィルター機能

- ・ Mascot で同定されたスコア 10 以上の全てのペプチドについて、前駆体イオンの質量実測値と理論値からのずれを線形回帰法によりフィッティングして、基準値以上外れたイオンについては、同定リストから除外した。

- ・ 同様の工程を b 系列、y 系列のフラグメントイオンについても行い、各フラグメントシリーズの信頼性指標として定義した。この指標を、Peptide Verification の自動化に利用した。

(3) Peptide Verification 自動化

- ・ コンペア時に、ペプチドのスコアと上記偽陽性フィルターの結果を踏まえた基準(詳細省略)を用いて、各ペプチドについて、基準を満たしたペプチドに Y(真)の Peptide Verification Flag を付与した。

(4) Intersection 関連機能

- ・ タンパク質 A とタンパク質 B がトリプシン断片ペプチドを共有していて、かつ各々固有のトリプシン断片ペプチドも含まれる場合 (Intersection の関係)、サンプル中にはたんぱく質 A と B が共存すると考えられ、共有されているペプチド (Intersection ペプチド) については、A、B の定量計算から外す必要がある。ところが、例えば B が偽陽性であった場合、上記共有ペプチドは A 固有のペプチドということにな

り、定量計算の扱いが変化する。このように、Intersection の関係は慎重に検討する必要がある、A 固有のペプチド、B 固有のペプチドのうち、Mascot スコアが 20 未満のものは Intersection を考慮した定量化の計算処理の対象から外すことにした。例えば、A 固有のペプチドがスコア 20 以上で存在し、B 固有のペプチドが全てスコア 20 未満だった場合は、B は A とは独立のたんぱく質とは考えず、Roll-up することにした。

- ・ 各たんぱく質に、Intersection ペプチドを共有する別のタンパク質が存在する場合、AP カラムに * をつけることにした。作業者による精査の後、Intersection タンパク質が偽陽性であることが判明し Roll-up した場合、この * が消えるようにした。

(5) Peptide Ratio, Protein Ratio 計算時のロジック変更

- ・ Peptide Details 画面に Intersection カラムを新設し、複数のタンパク質で共有されているペプチド (Intersection ペプチド) に * マークをつけ、それらは Ratio 計算には考慮しないことにした。

- ・ たんぱく質ごとに、上記 Intersection ペプチドや飽和したペプチド (Caution カラムに satu) を除いたペプチドについて、ICAT 定量比の対数平均や対数分散を求め、最終的に基準値以上外れているペプチドを外れ値 (Outlier) として除去しタンパク質の比の計算には用いないことにした。

- ・ Peptide Details 画面に OLR (OutLier Removal) カラムを追加し、ペプチドが上記の外れ値となった場合、*** を付与して注意喚起した。

- ・ OLR カラムに *** の付いているペプチドについては、その OLR ボックスをクリックすることにより、NCBI の SNP DB に登録されている SNP 情報を参照することができるようにした。

- ・ これにより、同一のたんぱく質由来であるにも関わらず他のペプチドと大きく異なる比を持つ

ペプチドについて、その変動の原因がアミノ酸置換を伴う SNP であるかどうかの検証が非常に容易の行えるようになった。

以上述べたようなシステムの機能追加と整備されたマニュアルによる作業者の精査作業のルーチン化により、たんぱく質同定・定量結果を最終的にデータベース登録するまでに PF 作業者がチェックに要する時間は1検体あたり2時間に短縮され、個人的なばらつきの少ない高精度なたんぱく質発現データベースを構築・提供することが可能になった。

D. 考 察

D-1 疾患関連たんぱく質の糖鎖修飾解析と医薬品化に向けた基盤技術の開発

本年度の結果より、糖鎖の比較定量法、並びに組織中の糖たんぱく質糖鎖を短時間で解析する方法を開発できたことから、今後、疾患関連糖鎖の探索に大きく役立つものと期待される。また、疾患関連たんぱく質に対する迅速かつ網羅的な抗体創製技術は、2D-DIGE をはじめとする疾患プロテオミクス解析により同定されてくる多数の候補たんぱく質の局在化や機能解析に極めて有用であるため、医薬品シーズたんぱく質あるいは創薬ターゲットを絞り込むツールとして極めて重要なものとなりうる。今後、組織マイクロアレイを用いた発現プロファイリングを組み合わせることにより、疾患関連たんぱく質の探索からバリデーションまでの過程を大幅に加速できるものと期待できる。

D-2 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

本年度に入り、プロテオームファクトリー施設よりたんぱく質の解析結果を報告頂くことができ、漸く本研究も稼働しだしたというのが実感である。困難を伴う定量解析であることもあり、解析対象となるたんぱく質は最大200程度であるが、従来から想定されていたプロテオーム解析データの定量値や信頼度について、実データから明確な実感

を担当医師、研究者に与えることができ、意義があった。解析結果の算出を行う基礎となる各たんぱく質の cICAT 標識トリプシンペプチド数がたんぱく質の量比や分子内システイン残基数により異なること、存在するたんぱく質濃度が大きく異なることなどより、変動値が算出されてもその信頼度は大きく異なると推察される。しかし、データが提供された際には、数値データは全て同一の重みを持つと判断されるため、信頼度を示すパラメータを導入し、解析結果の評価時に使用する必要があると考えられる。

各課題での解析結果の概要より分かるように、全体としては症例数が少ないためにこれらの結果から有意な結論を導き出すことは困難であるが、何れの課題でも数多くのたんぱく質で変動が認められたことは、その意義は今後の検討を待つとしても、担当者のプロテオーム解析への意欲を生み出すものであった。プロテオーム解析については技術的な問題が数多く残されており、特に定量解析の方法と精度については不明であった。また、血中たんぱく質量の生理的変動、個人差についても信頼できる情報はなかったが、研究計画3-3で示されたように、当該疾患に関連し臨床生化学検査で測定される既知たんぱく質群について、今回報告されたプロテオーム解析結果で同様の変動、非変動が確認された意義は大きい。今後より微量かつ多様なたんぱく質まで解析対象を拡大することにより新規の疾患関連バイオマーカー候補、疾患関連の機能性たんぱく質の同定へアプローチできる可能性を示したものと考えている。実際、研究計画4-2では、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、より重症な不全患者を含む10名の2次試料採取まで研究を進めた。また、研究計画3-1では、糖尿病患者の3ヶ月間の有酸素運動療法の前後で、変動傾向を示す可能性のある血清たんぱく質が見出された。このたんぱく質の機能は不明であるが、肥満などとも関連する可能性もあり、今後さらなる生理、病態生理的意義を検討していく予定であ

る。一方、研究計画 1-1. の脳梗塞患者の急性期と慢性期の比較では、血中たんぱく質を変動させる抗血小板薬、抗凝固薬などの治療薬が投与されるため、その投与前後での変化、生体反応をとらえている可能性が高く、治療法などの詳細も含めた症例の設定、研究計画の作成が必要である。

提供試料についてはできるだけ均一な対象を選び、作成したマニュアルに従い採取、処理、保管を実施したので、試料提供側としては十分な品質を確保できたと考えている。臨床データとの詳細な解析結果に基づき、同一課題内でも疾患原因や病態、治療内容などの均一化、採血時期の至適化などを図り、2次、3次試料を解析することにより、有用な結果が得られると期待される。

血漿試料、心組織試料の解析については、国立循環器病センター研究所で二次元電気泳動法などを用いて開始した。現状では解析可能なたんぱく数が限られているため、さらに使用血液量などを増加して意義のあるデータが得られるようにしたい。

また、新しい研究領域における異なる研究機関の共同研究には種々の問題が発生するので、それらに対して相互に積極的な情報交換、修正などを行っていく必要があると思われる。

D-3 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

本研究により、ラット小腸より脂肪細胞に作用する生理活性ペプチドとして、GIP を同定した。また、ラット脂肪組織より PACAP38 と推定されるペプチドを精製した。GIP は、グルコースや脂肪の経口摂取により小腸の K 細胞から分泌され、膵 β 細胞からのインスリン分泌を促進するインクレチンとして知られている。また、GIP の受容体が脂肪細胞に発現しており、脂肪細胞の分化に伴ってその発現が増加すること、脂肪細胞に作用して lipoprotein lipase の活性を亢進し、脂肪細胞への脂肪取り込みを促進することが報告されている。

さらに、高脂肪食負荷肥満マウスに GIP の antagonist を投与すると、肥満の改善とともに、糖・脂質代謝プロファイルの改善を認めることより、GIP の antagonist がメタボリックシンドロームの治療薬になる可能性が示唆されている。

PACAP は、中枢神経から末梢神経まで広く分布する神経伝達物質で、膵 β 細胞からのインスリン分泌を促進することが知られている。また、脂肪細胞において PACAP 受容体が発現し、PACAP が脂肪細胞への糖取り込みを促進することや、脂肪細胞の分化を促進することが報告されている。

我々はこれまで、3T3-L1 細胞を用いて、中枢性摂食促進ペプチドである neuropeptide Y (NPY) 及び中枢性摂食抑制ペプチドである α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) をブタ脳より単離・同定したことを報告した。今回、同様の手法により、膵 β 細胞からのインスリン分泌を促進し、脂肪細胞に作用する生理活性ペプチドを同定した結果から、脳、腸、膵臓及び脂肪組織を軸とした、生理活性ペプチドを介した生体のエネルギー代謝調節システムが存在する可能性が示唆され、本研究で用いた手法が、エネルギー代謝系の調節に関わる生理活性ペプチドの探索において有用であることが確認された。

今後、この手法を用いて脂肪細胞に作用する生理活性ペプチドの探索を進めることにより、メタボリックシンドロームの発症基盤としての肥満及び脂肪細胞機能に関与する新たな生理活性ペプチドの同定や、脂肪細胞の分化・増殖を制御する新たな治療薬の開発が期待できる。

D-4 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

プロテオーム、ペプチドーム解析において、解析感度は検出機器としての質量分析計に負う部分が多い。昨年度末に当センターに導入された 2 種の最新鋭機器により、同一試料についても大幅な解析領域、解析対象数や同定ペプチド数の増加を図れることが確認された。ただ、人と機器を繋

ぐ周辺環境、特にソフトウェアの開発が不十分で、これらの進歩に伴い Top-down proteomics も含めた強力な手法が実用化できると期待される。

ペプチドーム解析においては、これらの質量分析の導入により当初の解析、同定ペプチド数は大幅に上昇するものの、繰り返し測定によっても正味のペプチド同定数は微増しかしなかった。これは、内在性ペプチドの存在量の違いが非常に大きく、主要なペプチド前駆体、たんぱく質より分解などにより生成するペプチド数や量が他の微量のペプチドの解析、同定を困難にしているためであった。この克服には、ペプチド調製時のより詳細な分解防止策、分解過程を含まないペプチド調製法などの開発が必要である。この解決法の一つとして、細胞培養上清のペプチドーム解析を改善、実施したところ、既知のペプチドホルモンや前駆体由来ペプチドを主体として、多数のペプチドを分析、同定できた。この結果は、内在性ペプチドの包括的同定、前駆体たんぱく質のプロセッシング過程の同定に発展できることを示し、研究の進展が期待される。さらに、生理活性ペプチドに特徴的な C 末端アミド化構造を有する新規ペプチド候補が同定ペプチドリット中に 2 種見出され、最終的にこれらがバソプレシン分泌抑制因子であることが証明できた。上記はペプチドーム解析を有効に使用できた最初の実例であり、今後の発展性を示唆するものであった。

血液のペプチドーム解析も実施可能なレベルまでペプチド調製法などのプロトコールを作成できた。しかし、個々の研究者や補助者の手動実施では再現性、均一性などが保持できないため、簡単かつ迅速な処理装置の作成が必要である。また、現状の研究計画では採血量が不足するため、標的疾患を絞り血液を採取、解析してデータを集積し、有効性を判断する一次検索の実施が必要である。

血漿試料の二次元電気泳動法による解析は現在着実に進行しており、近日中に結論を出すことが可能と考えられる。

D-5 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

パーキンソン病など神経変性疾患については近年の分子遺伝学的解析から家族性疾患を中心にいくつかの病因遺伝子が同定された。数多くの孤発性については病因の特定はいまだなされていないが家族性の成果を発展させることで、対症療法的高度化だけでなく根本的治療法開発も展望できるとの期待が高まっている。成因に関しては国内外における研究から、たんぱく質の構造変化、凝集、蓄積と神経細胞死・神経変性との関連が示されており conformation 病の概念確立とともに、アポトーシスに加えて神経細胞機能不全も神経変性の主因として位置付けられるようになってきた。さらに、近年では免疫学的機序の関与に注目が集まっており、喫煙者にパーキンソン病発症者が少ないという疫学的調査が明らかにされるなど生活習慣との関連でも注目を集めている。

我々はこれらの近年の知見を参考に、血液、尿などの末梢サンプルにおいても新たな知見が生み出される可能性が高いと考え、神経変性疾患患者、特にパーキンソン病における血液たんぱく質の網羅的解析を行い、第一次解析結果を得る段階まで進展した。しかし、神経特異的なたんぱく質は少なく、より中枢神経の病態を反映していると考えられる髄液での検討を予備的に行った。その結果、予想を上回る神経特異的なたんぱく質が同定された。また、当該たんぱく質の髄液と血漿での濃度を測定することで、パーキンソン病で有意に変動するたんぱく質を同定することが可能になった。新たなバイオマーカーの同定、創薬にとって、髄液たんぱく質の網羅的な解析は有力な方法であるが、問題点として、解析可能な最小検体量が現在のところは、10ml であるところであった。検出感度を上げること、他の中枢神経疾患への応用を検討することが今後の重要な課題となった。

これまでに独自に作成した I93M UCH-L1 発現トランスジェニックマウスが既存のパーキンソン病モデル動物に比べ優れた点を多く有している新規

モデルであることを報告し、また UCH-L1 の近縁分子である UCH-L3 がカスパーゼ非依存的神経細胞死に関与することを昨年度報告した。今年度はさらに UCH-L3 を標的にしたコンピューター創薬、in silico drug screening を試み、5 万化合物の中から酵素活性阻害作用を有する 3 種類の薬剤の同定に成功した。今後モデルマウスにおける薬理効果を検討するとともに、より低容量で有効で、かつ毒性が少ない化合物を引き続き探索するが、本成果は in silico drug screening を利用した創薬のモデル例としてその意義は大きいと考える。

D-6 糖尿病等代謝性疾患に関連する微量タンパク質解析技術の確立に関する研究

【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

今年度は、当施設からプロテオームファクトリー施設に発送した糖尿病患者血清及び健康者血清を用いて cICAT 法による解析を行い、糖尿病及び糖尿病性合併症に関連して変動する一群のたんぱく質を同定することができた。これらのたんぱく質で 1.5 倍以上の変動をしていたのは von Willebrand factor のみであり、合併症のない糖尿病でも 1.5 倍以上の変動していたため、特定の病態の診断に有用なバイオマーカー候補は発見できなかった。今後は、cICAT 法での解析結果と臨床情報を多変量解析等の手法で検討することによって、疾患あるいは病態に固有なたんぱく質プロファイルのパターンを検索していく。また、国立がんセンター・化学療法部・山田哲司部長と共同研究として、市販の SELDI-TOF より精度、分解能及び再現性が高い SELDI-QqTOF を用いた糖尿病患者血清の解析が進行中であり、低分子量蛋白及びペプチドでの糖尿病関連分子の発見を目指している。

2) 糖尿病患者尿での 2D-DIGE 法による解析

今回の 2D-DIGE 解析から、早期腎症患者で有意に変動する多くのたんぱく質の存在を確認した。これらのたんぱく質の早期腎症診断マーカーとし

ての意義を検証するために、今後微量アルブミン尿のない糖尿病患者での追跡調査が必要である。また、微量アルブミン尿は心疾患や脳梗塞といった動脈硬化性疾患との関連性も報告されており、血管病変の進行度を評価することによって糖尿病患者での動脈硬化のマーカーとなりうるたんぱく質の発見も期待される。

【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

動脈硬化の発症の要因として、活性酸素 (ROS) や酸化 LDL などの酸化ストレスによる、血管内皮細胞の障害が考えられる。DHEA はアポトーシスに関連するたんぱく質の発現を制御することで、ROS による細胞障害を回避し、抗動脈硬化作用を持つことが推測された。

2) 分化マクロファージにて発現するたんぱく質の解析

結核菌 (BCG) 感染前後の発現たんぱく質プロファイルはまだ進んでいないが、GM 型と M 型マクロファージそれぞれの分化過程における発現たんぱく質のプロファイルに関しては一定の解析がなされた。細胞骨格たんぱく質は GM 型マクロファージにより多様なたんぱく質が発現していたが、lysosome enzyme を含む protease は M 型マクロファージに特異的に高発現しているものが認められた。そのなかでも細胞生物学的重要性が高いと考えられるものが cathepsin B と metalloprotease-9 (MMP-9) であった。どちらも、病的状況において肺組織に障害を与えうる protease であり、慢性閉塞性肺疾患を含む多様な肺疾患ならびにエンドトキシンによって惹起される急性肺損傷への関与が示唆されている。特に cathepsin B は様々な extra-cellular protein を分解するばかりでなく、IL-1 や IL-18 等の cytokine たんぱく質や metalloprotease たんぱく質の成熟、tissue inhibitors of matrix metalloprotease たんぱく質や secretory leukoprotease inhibitor たんぱく質を分解して、

組織に強い炎症をもたらす pro-inflammatory enzyme として働く。結核菌死菌により実験的にマウスに誘導される遅延型反応においても反応局所における cathepsin B の著明な増加が確認されている。従って、結核肺病巣における組織破壊・改変に炎症型マクロファージである M 型マクロファージと、この細胞が産生する cathepsin B が大きな役割を果たしていることが示唆された。

3) 結核バイオマーカーの探索

新規結核バイオマーカー探索のための予備検討用血漿サンプルの解析、及び抗原刺激解析用の血漿の調製及び解析を行った。次年度は、患者検体を用いた 2DE による比較解析を行い、疾患あるいは病態に固有なたんぱくプロファイルを抽出し診断マーカーを検索する。また、標的とする血漿タンパク質及びペプチドについては LC-MS/MS を用いて同定する予定である。

D-7 小児腎疾患関連因子の探索ならびに解析

プロテオミクス解析(再発例)において、

- ネフローゼ症候群発症時において血中 ZAG 濃度が健常人に比較して高い。
- プレドニゾロンによる投薬治療中は尿たんぱくの低下を導くと同時に、血中 ZAG 濃度が増加する。
- 寛解後のプレドニゾロン休薬時には血中 ZAG 濃度は発症時に比べて低下する。
- 血中 ZAG 濃度の変化は血中脂質濃度の変化と類似する。

初発例のサンプルおよび抗 ZAG 抗体を用いた解析において、

- プレドニゾロン服用時に血中 ZAG 濃度は増加した。
- 寛解後のプレドニゾロン休薬時には血中 ZAG 濃度は発症時に比べて低下した。
- 初発例においてもネフローゼ症候群発症時には血中 ZAG 濃度が増加していた。
- 血中 ZAG 濃度の治療前および治療後の変化は血中脂質濃度の変化と類似した。

以上の結果から、ネフローゼ症候群の血中脂質

濃度の上昇に血中 ZAG 濃度の上昇が関与している可能性が示唆された。またプレドニゾロン投薬治療における、特に血中脂質濃度に対する、血中 ZAG 濃度の治療マーカーとしての可能性が示唆された。

D-8 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についてはいずれも高齢者医療においてその対策が急務となっているものであり、疾患関連たんぱく質の解析がその診断・治療上有用な情報をもたらすことが期待される。

病理学的特徴が顕著にみられる CADASIL 脳の微小血管のプロテオーム解析によって、数種の HSPs が対照脳と比較して増加していることから、CADASIL 脳の微小血管はたんぱく質のミスフォールディングなどのストレスにさらされている可能性がある。今後さらに検体数を増やし、より特異的な変化を同定するとともに、詳細な免疫組織化学的検討が必要である。マウスに対して右総頸動脈を永久閉塞するにより、結紮側の大脳半球に慢性的な脳低灌流状態を導入する新規の慢性脳低灌流システムの確立に成功した。さらに、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新規の血管性認知症マウスモデルの開発に成功した。このシステムは多くの遺伝子改変動物への応用が可能であり、今後、血管性認知症の分子レベルでの解析が期待できる。

緑茶には抗がん作用に加え、骨量減少を予防する作用があることが報告されている。また、緑茶の主要なフラボノイドであるカテキンが、骨芽細胞の分化を促進し、アポトーシスを抑制することが知られている。EGCG は骨芽細胞において、PGF_{2α} による VEGF 産生を、SAPK/JNK のリン酸化・活性化の増強を介して促進していることが示唆された。一方で EGCG は、ET-1 による IL-6 産生を p44/p42 MAPK のリン酸化・活性化の抑制を介して減弱し、その作用点は PKC と Raf-1 の間であることが示唆された。今後、細胞レベルでのたんぱく質の翻訳後修飾による機能制御機構について解析を進める

ことにより、骨粗鬆症をはじめとする代謝性骨疾患の発症・進展等の病態制御機構の解明、ひいては有効な予防・治療法の構築に資することが期待できる。

D-9 疾患関連たんぱく質解析に関する研究

正常組織の確保が難しく、予定が遅れる結果となった。発現たんぱくデータと疾患の関連について、最新の患者の臨床情報を再入力し検討していくことも必要である。

D-10 疾患関連蛋白質解析のための質量分析法の確立

疾患マーカー候補に対しては、まず、健常者尿を用いて発現量の個人間、並びに、日間での変動を調べることが重要となる。その際、尿中への発現量(排泄量)は、尿中の溶質濃度が日内、日間、並びに、生理的状態等で変動するため、基準となる指標を設けることが必要になる。我々は、ペプチド画分に対しては総ペプチド濃度を、たんぱく質画分に対しては、一般に生化学検査で用いられているクレアチニン濃度を指標として用いているが、これらの基準が個々のペプチド・たんぱく質の発現量に相関するかどうかについては今後検証していく必要がある。本研究では、なるべくデータ間のばらつきを抑えるために早朝尿を用いて行った。昨年度見出した候補ペプチド1種類については、合成ペプチドを作成してポリクローナル抗体を調製したが、抗体価が低く、免疫沈降法(ビーズに固定化)等で利用できるものではなかった。このように、ペプチドをマーカーとして用いる場合、配列によっては抗体作成が困難となり、その際は診断への応用は難しい。

尿たんぱく質プロファイルにおいては、一回の採尿試料(10-20 mL)を用いて約300~400種のたんぱく質(その内約1/3が膜たんぱく質由来)がルーチンに同定できたが、個人差や日間変動についての詳細は明らかとなっていない。これまで蓄積した患者及び健常者尿の比較解析から、マーカー候

補たんぱく質4種類を見出しているが、現在、抗体によるウェスタンブロット解析により検証を進めている。

尿たんぱく質・ペプチドには糖鎖が付加したものが多く存在することがこれまでの解析から明らかとなっている。一方、癌マーカーとして幾つかの糖鎖は既に生化学検査でも利用されており、多くの実績がある。本研究では、それらの糖鎖が付加する糖たんぱく質を網羅的に同定し、糖鎖付加の特異性と病態との関連を明らかにすることを最終目標としている。まず、生化学検査で利用頻度の高いCA19-9抗原を有する糖たんぱく質の同定を試みたが、得られる試料が微量なため糖たんぱく質を特定するには至っていない。今後は、さらに高効率で糖たんぱく質から糖ペプチドを単離、解析できる方法を確立し、糖たんぱく質の同定のみならず糖鎖結合部位を特定できる方法としたい。また、糖ペプチド糖鎖構造解析を微量で行える質量分析法は未だ確立しているとはいえない。特に、CA19-9にも存在し、糖鎖非還元末端に特徴的に付加するシアル酸は化学的に不安定でしばしば分析途中で脱落してしまうことがあり、それを高感度かつ定量的に検出できる方法を確立する必要がある。

D-11 大腸癌の糖脂質の構造解析

今年度は、昨年度までに確立した糖脂質の微量構造解析の技術を用いて大腸癌および大腸正常粘膜の糖鎖構造解析を行った。正常大腸粘膜上皮細胞にはfucoseが付加されている糖鎖が主な構成成分で、シアル酸が付加された酸性糖鎖がほとんど存在しないことが特徴である。一方、大腸癌細胞においては、fucoseが付加されていない4糖、6糖の糖鎖が中程度存在するほか、sialic acidが付加された酸性糖鎖が、全糖脂質の約20%を占めることが特徴である。これらのことから、以下のような糖鎖の癌性変化のメカニズムが想定された。

正常粘膜上皮細胞では、4糖、6糖の糖鎖に対しては、sialic acidより先にfucoseが付加された。

一方、大腸癌では、この経路の他に、fucose が付加される前に α 2-6、 α 2-3 結合で sialic acid が付加され、その後 fucose が付加された。そのため、Sialyl Le^x、Sialyl Le^a などの癌特異的な糖鎖抗原が形成された。このことは、癌細胞では糖鎖の合成不全が起こっていることを強く示唆するものであった。

D-12 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

各研究協力機関から提供された全ての患者血清たんぱく質 (624 検体) の解析に関しては、cICAT 法による上位約 140 種類、累計約 350 種類の高発現血清たんぱく質の同定と比較定量解析を完了させた。また、日本人の健常者血清として、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) の解析も同様に行った。上述のデータは全て標準血清 (CTS02S) をベースとして連結計算してある。さて、昨年 の報告書にも記述したが、標準血清と日本人患者血清の調製法が一部異なるため、厳密な意味で健常者血清と患者血清を比較するためには、日本人健常者との比較が重要である。今回、国際医療センターより提供された上述の健常者血清 (非糖尿病罹患) 42 検体と標準血清を比較したところ、血小板由来のたんぱく質を除くと大きな差異は認められなかった。しかし、より詳細に検討すると僅かではあるが、血清主要たんぱく質の一部に差異があることが分かった。同様な傾向は赤十字社の健常者血清でも観察された。この差異が人種によるものなのか血清調製法によるものかは定かではないが、各疾患患者血清との比較解析には日本人健常者血清の解析結果を用いる方が望ましい。前述のごとく、標準血清をベースとして連結処理してあるので、日本人健常者血清と各疾患同士を比較解析することが可能である。

実際、糖尿病患者血清 73 検体と上述の健常者血清 (非糖尿病罹患) 42 検体を、標準血清を介して統計解析すると、糖尿病の合併症の有無・種類により、

有意差 ($p < 0.01$) のある十数種類のたんぱく質が見いだされてきた。これらのたんぱく質が糖尿病及び合併症の発症にどのように関係するかは今後の課題ではあるが、同様なアプローチは他の疾患でも適用可能であることを示すものと思われた。

さて、上述の cICAT 法による血清解析では上位約 140 種類の同定と比較定量が可能であるが、より低濃度の血清たんぱく質 (低発現血清たんぱく質) を解析することは未知の創薬ターゲットや診断マーカーを探索する上で極めて重要な課題である。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、患者より採取可能な血清量は限られており、また、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ていた。さて、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。今回、我々は、cICAT 法の特性を利用し病変組織たんぱく質を介在させることにより、直接患者血清と健常者血清と比較するよりも遥かに多くの病変組織由来の低発現血清たんぱく質を解析する方法を見出した (特許出願済み)。実際に、病変組織由来たんぱく質としてパーキンソン病患者脳脊髄液 (PD-CSF) を介在させ、パーキンソン病患者と健常者の血清を本法により解析すると、パーキンソン病に特徴的な血清低発現たんぱく質が見出された。本方法は、リンクさせる病変組織たんぱく質を変えることにより、他の疾患でも応用可能であると考えられた。

一方、中枢神経系疾患患者の脳脊髄液 (CSF) を直接解析することは、より病変部位に近いという点で勿論大変に重要である。すでに、二次元電気泳動法や iTRAQ 法で神経変性疾患患者の CSF の解析が試みられている (13)。今回、基礎検討用検体として、国立精神・神経センターで保存されていたパーキンソン病患者脳脊髄液 (連結不可能匿名化、

プールしたもの)を用いて、cICAT法によるCSFたんぱく質解析を検討した。血清と同様に、アジレント抗体カラムで処理した画分を解析したところ、313種類(100 μ gあたり)のたんぱく質の同定が可能であった。この同定たんぱく質を分類すると、最も多いのは受容体であり、次いで細胞外マトリックス、情報伝達物質、細胞接着分子の順であった。このことから脳脊髄液は脳組織の細胞・細胞膜及び細胞質から漏出したたんぱく質を多数含むものと考えられる。なお、脳脊髄液のたんぱく質に関しては、米国のグループがiTRAQ法で解析を行っているが、cICAT法で同定した313種類のうち、211種類はcICAT法でのみ同定可能なたんぱく質であった(図23)。その中には、各種受容体、神経変性疾患等に関与するとされる多数の低発現たんぱく質が含まれていた。iTRAQ法は簡便でスループット性も高いが、cICAT法の低発現たんぱく質の解析に有効という長所が反映されたものと思われた。以上のことから、今後、cICAT法で中枢神経系疾患患者毎の脳脊髄液を解析することは疾患関連たんぱく質を探索する上で重要であると思われた。

胃がん等の組織たんぱく質のcICAT法解析では、100 μ gから通常のルーチンアッセイ(SCX25分画)では約800-1000種類のたんぱく質の同定と比較解析ができる。また、分画数を多くすれば2300種類のたんぱく質の同定・比較定量も可能であり、この点、血清とは大きく異なる。しかし、最大の問題点はLaser Micro-Dissection(LMD)による部位特異的分取に長時間を要することである(100 μ gを分取するのに数週間を要す)。より高性能のLMDが望まれる。特に、スキルス胃がんのように原発部位のみを選択する場合は大変な技術・労力・時間を必要とする。しかし、得られた結果は、多くの興味ある知見をもたらした。

スキルス胃がんは胃がん全体の約10%を占める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、通常の胃がん検診では発見しにくく、発見された時に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、スキルス胃がん早期診断法の確立及び創薬ターゲットの探索が切望されていた。今回、スキルス胃がん患者3例及び通常の各種分化型胃がん6例及び乳がん3例につき、そのがん病変部位と正常腺組織部位をcICAT法で解析した結果、スキルス胃がんは、本来、血液系・骨髄系に発現しているたんぱく質が選択的に強発現していることが分かった。特に、細胞膜受容体のCD177はスキルス胃がん3例中2例で強発現(H/L= ∞)しており、免疫組織染色法でもスキルスがん細胞に局在することが確認された。なお、CD177は真性赤血球増加症のマーカーであるがその機能の詳細は不明である。また、Fibrinogen-like 2も3例中2例で強発現(H/L=6-10)していた。Fibrinogen-like 2はTリンパ球の一部が産生しウイルス性肝炎の劇症化に関与するとされるので、スキルス胃がんの特長点である線維増生を説明できるかもしれない。これらのたんぱく質は抗体医薬の創薬ターゲット候補及びバイオマーカー候補になる可能性が考えられた。また、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た。

国立がんセンター研究所の協力により導入した高速度SELDI-QqTOF-MSシステム(prOTOF 2000)を用いて、健常人(糖尿病非罹患)血清(40検体)及び糖尿病患者血清(124検体、合併症有無、種別で群分け)を解析した。本システムは、質量精度、分解能ともに高性能であり、かつ、高速度計測が可能であるため、上記の多数の臨床検体を短時間で解析することが可能であった。その結果、糖尿病性網膜症患者群で選択的に検出される8個のピークを迅速に見出すことができた。そのうちの一つ、m/z 1866.2を抽出精製し、ABI4700の精密質量数測定法(ミリマス)、CID-MS/MS法を用いて詳細に解析した結果、本物質は予想に反してペプチドではなく、界面活性剤のCHAPSであることが判明した。本物質が、なぜ一部に検出される

のかは定かではないが、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。今後、この点を、留意する必要があると思われた。一方、他の7つのピークはペプチドであるとおもわれる。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 で同定をすれば、糖尿病に関連する疾患関連たんぱく質を見出すことが可能であろう。

E. 結論

E-1 疾患関連たんぱく質の糖鎖修飾解析と医薬品化に向けた基盤技術の開発

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、血清をトリブシン処理した後、LC/MS を用いて解析する方法を開発した。また、微量の疾患関連たんぱく質に対する抗体を迅速に、網羅的に創製できる技術を初めて確立し、その有用性を明らかとした。

E-2 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

循環器疾患領域でプロテオーム解析に適切と考えられる 10 課題を選択し、倫理委員会の承認を受けて実施した。一次試料として予定した試料の大部分は採取を終えプロテオームファクトリー施設へ送付を完了し、解析結果が提供された 5 課題については臨床情報を含めた比較・解析を行い、1 課題については第二段階の試料収集に移行した。その結果、解析法の信頼性、精度がある程度確認されると共に、変動を示唆する結果も得られ始めている。当センター内では倫理、情報、試料採取・処理、管理などにおいて一応整ったシステムを作成できたので、今後も積極的にプロテオーム解析を推進していきたい。

E-3 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

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を培養脂肪細胞系を用いて行い、ラット小腸より GIP を単離・同定した。また、ラット脂肪組織より PACAP38 と推定されるペプチド分画の精製を行った。今後、脂肪細胞機能を制御する新しい生理活性ペプチドの同定が期待できる。

E-4 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

質量分析計の高速な進歩により、ペプチドーム、プロテオーム解析もさらに進化した状態へ移行し、疾患関連たんぱく質やペプチドの同定の効率化、高精度が可能となったため、解析対象とするたんぱく質、ペプチドの調製法、品質の向上、均一化がより重要な課題となった。

ペプチドーム解析においては、抽出時の分解がペプチド画分の品質を著しく低下させていたため、これを克服すべく細胞培養上清のペプチドを方法を改良して濃縮、解析したところ、生体内ペプチドの存在様式と生成過程を示す結果が得られた。さらにその中より新規生理活性ペプチド NERP の発見でき、方法論の有効性が確認された。

血液を対象としたペプチド解析においても、凝固系、補体系などの影響をできるだけ排除してペプチド画分を調製する方法論を策定した。今後実試料の解析、処理装置の開発などを行いつつ解析法を確立して行く予定である。

E-5 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

当センターから供給した患者検体を用いたプロテオーム解析により、パーキンソン病において変動するたんぱく質の第一次候補が得られた。さらに供給数を増加させるとともに、髄液を用いた研究アプローチが可能になった。また、UCH-L3 の in silico drug screening を行い、酵素活性阻害作用を有する 3 種の化合物を見出した。

E-6 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

ポストゲノム時代に疾患に関連した遺伝子情報が集積した上で、これらの情報を疾患の診断及び治療にいかにかかすかが今後の課題になる。特に糖尿病の特徴は、国内患者：740万人、潜在的には、推計1,620万人と患者数が多い上にさらに増加傾向にあること、患者の90%以上を占める2型糖尿病がインスリン分泌低下及びインスリン抵抗性が合併して発症する多因子性疾患であることである。このため、糖尿病患者由来検体の網羅的同定を行い、病態に関連したたんぱく質を検索することは、新しい治療法の開発、病態や病期を診断可能な新規のバイオマーカー開発のために意義のある試みと考える。今回の解析では、比較的少数の糖尿病患者由来血清及び尿の解析によって、糖尿病及び合併症によって有意に変動するたんぱく質を多数同定することができた。今後の改善点としては、解析する検体数の増加、より多数のたんぱく質の定量が可能なiTRAQ法に解析法を変更、検体収集する際に糖尿病性合併症及び大血管症について客観的情報として取得、得られたたんぱく質プロファイルと臨床情報からの多変量解析による多面的解析等が挙げられる。

E-7 小児腎疾患関連因子の探索ならびに解析

ネフローゼ症候群の血中脂質濃度の上昇に血中ZAG濃度の上昇が関与している可能性が示唆された。またプレドニゾロン投薬治療における、特に血中脂質濃度に対する、血中ZAG濃度の治療マーカーとしての可能性が示唆された。

E-8 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

加齢関連疾患(認知症・骨粗鬆症)の臨床検体のプロテオームファクトリーへの提供体制を継続した。nanoLC-MS/MSを用いた微量たんぱく質の解析システムによってCADASIL脳の微小血管中の主要なたんぱく質を同定した。CADASIL脳では数種のHSPs、ミオシン、およびコラーゲンが増加してい

ることが明らかとなった。また、マウスに対する右総頸動脈永久閉塞システムを確立し、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。培養骨芽細胞において、緑茶の主要なフラボノイドであるEGCGがPGF_{2α}によるSAPK/JNKのリン酸化を増強する一方、ET-1によるp44/p42 MAPKのリン酸化を抑制し、それぞれVEGF産生およびIL-6産生を促進あるいは減弱することが強く示唆された。

E-9 疾患関連たんぱく質解析に関する研究

全解析が、期間内には終了できなかった。終了後に、マーカー分子の候補がいくつかに示はられてくる。それらの臨床応用に向けての最終的な検定作業など、多くが今後の課題として残された。病態解析についても、同定されたたんぱく質について新たな展開が期待される

E-10 疾患関連たんぱく質解析のための質量分析法の確立

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、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)が比較的多く検出された。本ペプチドの親水性の性質を利用した分離法を確立し、健常者および各種癌について検証を行った。その結果、本ペプチドは日間での変動が2倍と大きく、個人差も見られ、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。

膵臓癌(5人)、肺癌(2人)、健常人(3人)尿由来の分子量10 kDa以上のたんぱく質画分について比較解析を行った結果、癌患者尿よりマーカー候補蛋白質を4種類見出した。その内の1つ(Leucine-rich α-2-glycoprotein precursor)は、膵癌患者血中でも優位に増加していることが最近報告されている(J. Chromato. B, 2007, 852, pp257-67.)。

尿中から、腫瘍マーカーであるCA19-9(シアリル