

Endocrinol Metab, 293: E819-825, 2007.

⑤ Toshinai K, Mondal MS, Shimbara T, Yamaguchi H, Date Y, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin stimulates growth hormone secretion and food intake in aged rats. Mech Ageing Dev, 128: 182-186, 2007.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究協力者

宮澤 崇 (国立循環器病センター研究所)
宮里幹也 (国立循環器病センター研究所)

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

分担研究者 南野直人 国立循環器病センター研究所 部長

高血圧症や心循環器系疾患に関連した疾患マーカーや創薬標的の候補となるたんぱく質やペプチドを発見するためには、より微量の対象までを高感度かつ再現的に分離、検出し、構造解析できるシステムが必要である。昨年度までに2次元高速液体クロマトによる分離と質量分析計による検出、構造解析の方法論を確立し、得られる情報の有効性について検討を行った。本年度は、最新鋭の質量分析計の導入によりさらに高感度化を図ると共に、培養細胞の分泌するペプチド、たんぱく質についてこれらの方法論を適用して解析を行い、同定されたペプチド群より生体内に内在し機能する新たな生理活性ペプチドを見出すことができた。

A. 研究目的

ヒト、マウス、ラットをはじめとする動物でゲノム遺伝子配列が決定されたため、次の包括的データベース化は生体で実在、機能するたんぱく質、ペプチド、代謝化合物などの実験的解析によるファクトデータベース構築へとシフトした。細胞、組織、血液をはじめとする体液などのたんぱく質の発現・存在量、立体構造、相互作用、機能などの情報を包括的に収集、利用可能にできれば、生命現象の理解のみならず疾患発症や病態形成に関わるたんぱく質、医薬品や食品をはじめ産業に利用できるたんぱく質を発見する上で有用と考えられる。しかし、生命現象の場で多彩な機能を発揮するたんぱく質分子は極めて多様な性質を示すため、たんぱく質総体である「プロテオーム」を解析することは困難である。さらに、たんぱく質の比較を定量的かつ高感度を実施できる方法が未だ限定的であり、その包括的な解析は極めて難度が高い。また、たんぱく質やペプチドに多く認められる翻訳後修飾などの詳細構造解析についても、未解決な問題が山積している。本研究では循環器疾患を対象として、組織、血液、細胞などに含まれるたんぱく質を網羅的に解析し、高血圧、心疾患、動脈硬化などに関連するたんぱく質を解析す

る方法(プロファイリング法)の確立と高感度・高精度化、たんぱく質同定法や量的評価法の改善、迅速な解析システムの開発研究などを行う。

本年度の研究では、これまでに確立した2次元高速液体クロマトグラフィー(2-dimensional high performance liquid chromatography, 2D-HPLC)による分離法を基盤に、最新鋭のMaldi、Esi イオン化法の質量分析計を導入して、より高感度、高精度なシステムを構築する。また、これらのシステムをヒト培養細胞の産生、分泌するたんぱく質、ペプチドに適用して解析を実施し、それらの中より新規たんぱく質、ペプチドなどの候補を探索し、可能性のある物質が見出された場合は、その活性や機能の解析を行う。一方、継続実施している血液試料については、ペプチド画分を主たる対象に、分解や変動を極小化した再現性の高い試料調製法を確立し、実際の血液試料解析に利用できるプロトコールと分離・解析システムを組み合わせて総合的な解析法を構築する。

B. 研究方法

これまでに作成してきた分離方法に最新鋭のMaldi-Tof-Tof型のABI社4800、Esi-iontrap型に電場型FT検出装置を装備したThermoelectron

社 Orbitrap 質量分析計を組み合わせ、実際にプロテオーム解析、ペプチドーム解析を行い、感度や構造決定精度などの検討を行った。

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

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

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

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

C. 研究結果

ABI 社 4800 質量分析計においては、レーザ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で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一次元 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。

一次元の分離でも、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由来するペプチドであった。一方、たんぱく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5mL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。

D. 考察

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スト中に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る。

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装が必要である。

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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

① T. Naka, E. Katsumata, K. Sasaki, N. Minamino, M. Yoshioka, Y. Takei: Natriuretic peptides in Cetaceans: Identification, molecular characterization and changes in plasma concentration after landing. *Zool. Sci.*, 24, 577-587 (2007)

② H. Yamaguchi, K. Sasaki, Y. Satomi, T. Shimbara, H. Kageyama, M.S. Mondal, K. Toshinai, Y. Date, L.J. Gonzalez, S. Shioda, T. Takao, M. Nakazato, N. Minamino: Peptidomic identification and biological validation of neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2. *J. Biol. Chem.*, 282, 26354-26360 (2007)

2. 学会発表

① K. Sasaki, Y. Satomi, H. Yamaguchi, T. Takao, M. Nakazato, N. Minamino: Peptidomic identification of novel neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2. 4th International Peptide Symposium (平成19年10月、Cairns)

② N. Minamino, K. Sasaki, T. Osaki, Y. Satomi, T. Takao: Peptidomic analysis for identification of endogenous peptides and

precursor processing pathway. 4th
International Peptide Symposium (平成 19 年 10
月、Cairns)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他

研究協力者

佐々木一樹, 尾崎司 (国立循環器病センター
研究所薬理部)

痴呆等の精神・神経疾患に関連する微量タンパク質解析技術の確立

分担研究者 高坂 新一 国立精神・神経センター神経研究所 所長

本研究では神経変性疾患（パーキンソン病、若年性痴呆症など）の治療成績向上を行い、またその発症機序の解明や診断技術の高度化を図るため、血液、尿サンプル中の蛋白質のプロテオーム解析を実行し、当該疾患に特異的な、あるいは特徴ある蛋白質群を同定し、その臨床的利用を行うことを目標とした。国立精神・神経センター武蔵病院から提供したパーキンソン病患者血液試料の第一次解析結果を踏まえ、髄液試料を用いた絞り込みの有用性を確認し髄液使用についての IRB の承認を得た上で、髄液を用いて予備的な検討をおこなったところ、髄液特異的なタンパク質が 100 個近く同定され、髄液の研究対象としての有用性が確認できた。また、神経変性疾患研究の困難さを克服するため、細胞傷害時に神経細胞死を誘導する分子、UCH-L3 についてその阻害剤を *in silico* drug screening により 3 種同定した。

A. 研究目的

本研究では、神経変性疾患（パーキンソン病、若年性痴呆症など）の治療成績向上を図り、またその発症機序の解明や診断技術の高度化を図るため、当該疾患に特異的な、あるいは特徴ある蛋白質群の同定とその臨床的活用をめざした。神経変性疾患では蛋白質の不溶化・凝集が細胞変性の本態と考えられているが、その成立には免疫機序の関与も認められ、また自律神経症状などを認めることも多い。さらに、生活習慣がその発症に影響を与えることは近年の疫学的調査から明らかになってきており、血液、髄液、尿などの解析から予防・診断に関して新たな知見が得られるとの期待が高まっている。また、種々の薬剤が神経変性疾患の治療に用いられているが、脳内への効果的な輸送には血中動態並びにその代謝の分子の実体の解明が不可避である。したがって本研究のアプローチは薬物治療の向上にも多大に貢献する。本年度までにパーキンソン病 12 例、パーキンソン症候群 10 例の臨床検体の確保と情報のまとめを行い、プロテオームファクトリーへ提供した。さらに、パーキンソン病患者 40 名程度の連結不可能匿名化

された試料を確保した。また脳という組織の特殊性から、研究成果の獲得にはモデル動物の開発と利用、ならびに新規創薬の標的分子の開発が神経変性疾患研究には必須であることから、昨年度報告した新規パーキンソン病モデルマウスである I93M UCH-L1 発現マウスに加えて今年度は UCH-L1 の近縁分子である UCH-L3 の欠損マウスの表現型解析を行った。また家族性筋萎縮性側索硬化症の創薬標的分子の同定など周辺分野の基盤整備も行った。

B. 研究方法

1) 神経変性疾患（パーキンソン病等）の研究試料の確保

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

を受け、プロテオーム・ファクトリーへの髄液検体送付が可能となった。

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

2) モデル動物の解析、創薬標的分子開発に関する研究

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

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

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、22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漿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、50mM Tris/HCl (pH 8.5) に溶解し、cICAT 法で解析した。髄液は、313種類のタンパク質を同定でき、そのうち94種が血清タンパク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 cICAT 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タンパク質のうち、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。

検出された髄液タンパクの内容としては、神経栄養因子、神経発生に関わる転写因子、神経接着分子、アミロイド関係タンパクなど、神経特異的と考えられるタンパク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。

D. 考察

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も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

の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づ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蛋白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、神経特異的なタンパク質は少なく、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タンパク質が同定された。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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohsawa, K., Irino, Y., Nakamura, Y., Akazawa, C., Inoue, K. and Kohsaka, S.: Involvement of P2X4 and P2Y12 receptors in ATP-induced microglia chemotaxis. *Glia* 55 (2007) 604-616
2. Koizumi, S., Shigemoto-Mogami, Y., Nasu-Tada, K., Shinozaki, Y., Ohsawa, K., Tsuda, M., Joshi, BV., Jacobson, KA., Kohsaka, S. and Inoue, K.: UDP acting at P2Y(6) receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* 446 (2007) 1091-1095
3. Okamoto, N., Kubota, T., Nakamura, Y., Murakami, R., Nishikubo, T., Tanaka, I., Takahashi, Y., Hayashi, S., Imoto, I., Inazawa, J., Hosokai, N., Kohsaka, S. and Uchino, S.: 22q13 Microduplication in Two patients With Common Clinical Manifestations: A Recognizable Syndrome? *Am J Med Genet.* 143 (2007) 2804-2809
4. Irino, Y., Nakamura, Y., Inoue, K., Kohsaka, S. and Ohsawa, K.: Akt activation is involved in P2Y12 receptor-mediated chemotaxis of

- microglia. *J. Neurosci. Res.* (2008) in press
5. Setsuie, R., Wada, K. : The functions of UCH-L1 and its relation to neurodegenerative diseases. *Neurochem. Int.* 52 (2007) 105-111
6. Hirayama, K., Aoki, S., Nishikawa, K., Matsumoto, T. and Wada, K. : Identification of novel chemical inhibitors for ubiquitin C-terminal hydrolase-L3 by virtual screening. *Bioorgan. Med. Chem* 15 (2007) 6810-6818
7. Sakurai, M., Sekiguchi, M., Zushida, K., Yamada, K., Nagamine, S., Kabuta, T. and Wada, K. : Reduction of memory in passive avoidance learning, exploratory behavior and synaptic plasticity in mice with a spontaneous deletion in the ubiquitin C-terminal hydrolase L1 gene. *Eur. J. Neurosci.* (2008) in press
8. Asanuma, M., Miyazaki, I., Diaz-Corrales, F. J., Miyoshi, K., Ogawa, N. and Murata, M. : Preventing effects of a novel anti-parkinsonian agent zonisamide on dopamine quinine formation. *Neurosci Res.* 60 (2007) 106-113
9. Murata, M., Hasegawa, K., Kanazawa, I., The Japan Zonisamide on PD Study Group. : Zonisamide improves motor function in Parkinson disease. A randomized, double-blind study. *Neurology* 68 (2007) 45-50.
10. Funayama, M., Li, Y., Tomiyama, H., Yosino, H., Imamichi, Y., Yamamoto, M., Murata, M., Toda, T., Mizuno, Y. and Hattori, N. : LRRK2 G2385R variant is a risk factor for Parkinson disease in Asian population. *Neuro Report* 18-3 (2007) 273-275
11. Tagawa, K., Marubuchi, S., Qi, M.L., Enokido, Y., Tamura, T., Inagaki, R., Murata, M., Kanazawa, I., Wanker, E.E. and Okazawa, H. : The induction levels of heat shock protein 70 differentiate the vulnerabilities to mutant huntingtin among neuronal subtypes. *J. Neurosci.* 27-4 (2007) 868-880
12. Satake, W., Mizuta, I., Suzuki, S., Nakabayashi, Y., Ito, C., Watanabe, M., Takeda, A., Hasegawa, K., Sakoda, S., Yamamoto, M., Hattori, N., Murata, M. and Toda, T. : Fibroblast growth factor 20 gene and Parkinson's disease in the Japanese population. *Neuroreport* 18 (2007) 937-940
13. Amino, T., Ishikawa, K., Toru, S., Ishiguro, T., Sato, N., Tsunemi, T., Murata, M., Kobayashi, K., Inazawa, J., Toda, T. and Mizusawa, H. : Redefining the disease locus of 16q22.1-linked autosomal dominant cerebellar ataxia. *J. Hum Genet* 52 (2007) 643-649
14. 青木吉嗣, 山本敏之, 尾方克久, 大矢 寧, 小川雅文, 村田美穂 : 嚥下造影検査が重症筋無力症増悪の評価に有効であった1例. *臨床神経学* 47-10 (2007) 669-671
15. 村田美穂 : パーキンソン病の治療、薬物療法. *Clini Neurosci.* 25 (2007) 82-85
16. 青木吉嗣, 岡本智子, 大矢 寧, 小川雅文, 村田美穂, 山村 隆, 大槻泰介 : 多発性硬化症が疑われた頸髄海綿状血管腫の49歳女性例. *脊椎脊髄ジャーナル* 20-3 (2007) 273-278
17. 村田美穂, 長谷川一子 : デイベート、パーキンソン病の初期治療はレボドパカ、ドパミンアゴニストか? *Clini Neurosci.* 25 (2007) 240-241
18. 村田美穂 : パーキンソン病の診察のポイント. *MB Med Reha.* 76 (2007) 7-12.
19. 村田美穂 : Parkinson病患者における日中睡眠過多と突発的睡眠. *神経内科* 60-1 (2007) 67-71
20. 村田美穂 : パーキンソン病の治療戦略、早期患者への治療方針. *内科* 99-5 (2007) 787-791
21. 服部信孝, 村田美穂, 佐藤健一, 鈴木正彦 : 内科医のためのパーキンソン病診療、座談会、パーキンソン病治療のこれから. *内科* 99-5 (2007) 884-894
22. 村田美穂 : 薬物治療、我が国初の新規治療薬の開発に向けて - 新規抗パーキンソン病薬ゾニサミ

ドの開発 - . 最新医学 62-7 (2007) 40-45

2. 学会発表

(国際学会)

1. Murata, M., Horiuchi, E. and Kanazawa, I.: Zonisamide increases TH mRNA via T type Ca channel. Dopamine 50 years, Gothenburg, Sweden, 5.30-6.2, 2007.

2. Toda, T., Satake, W., Mizuta, I., Watananbw, M., Takeda, A., Hasegawa, K., Yamamoto, M., Hattori, N. and Murata, M.: Fibroblast growth factor 20 gene and Parkinson's disease in the Japanese population. 11th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Istanbul, Turkey, 6.3-6.7, 2007.

3. Murata, M., Hasegawa, K., Kanazawa, I., Zonisamide Study Group JAPAN.: Long-term efficacy and safety of Zonisamide in advanced Parkinson's disease. 11th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Istanbul, Turkey, 6.3-6.7, 2007.

(国内学会)

1. 内野茂夫, 福村怜子, 田畑秀典, 平澤孝枝, 服

部功太郎, 湯浅茂樹, 仲嶋一範, 高坂新一: 大脳皮質形成過程における NMDA 受容体を介した細胞移動の分子基盤. Neuro 2007, 横浜, 9.10, 2007

2. 大澤圭子, 中村泰子, 鈴木恵理, 井上和秀, 高坂新一: 細胞外 ATP 受容体 P2Y12 を介したミクログリアの突起伸展調節機構の解析. 第 12 回グリア研究会, 名古屋, 11.17, 2007

3. 大澤圭子, 中村泰子, 鈴木恵理, 井上和秀, 高坂新一: 細胞外 ATP 受容体 P2Y12 を介したミクログリアの突起伸展調節機構の解析. 第 30 回日本分子生物学会年会, 第 80 回日本生化学会大会合同大会, 横浜, 12.12, 2007

4. 村田美穂, 久野貞子: パーキンソン病に対する深部脳刺激術の効果と満足度に関するアンケート調査. 第 48 回日本神経学会総会, 名古屋, 5.16, 2007.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

プロテオームファクトリーより 1 件出願準備中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

分担研究者 鎗木 康志 [国立国際医療センター・研究所]

研究要旨

【目的】わが国の主要な疾患の一つである糖尿病について、患者及び健常者由来臨床検体でのプロテオーム解析により、糖尿病関連たんぱく質のデータベースを構築し、新規バイオマーカー、創薬ターゲットの発見に資することを目的とする。

【方法】糖尿病患者から血清及び尿を採取して、血清は cICAT 法を用いた定量解析にて、尿は 2D-DIGE 及び LC-MS にて、たんぱく質プロファイルを解析した。

【結果】本施設の内分泌代謝科の協力により、糖尿病患者血清を 124 例、健常者血清を 42 例から収集し、プロテオームファクトリー施設にて cICAT 法で定量解析した。合併症のない糖尿病患者では、健常者と比較して、28 個のたんぱく質が有意に変動していたが、1.5 倍以上の変動をしていたのは、von Willebrand factor のみであった。糖尿病性合併症を有する患者血清では、各合併症で異なる血清たんぱく質プロファイルが見られたが、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。糖尿病患者尿たんぱくの解析結果では、微量アルブミン尿を有する糖尿病患者尿にて健常者尿と比較して有意に増加する 24 個のたんぱく質、減少する 10 個のたんぱく質を同定した。

【考察】cICAT 法での少数例の解析で、糖尿病の病態によって血清たんぱく質プロファイルが異なることが示唆された。今後、cICAT データと臨床情報を組み合わせた上での多変量解析、多数のたんぱく質が定量可能な iTRAQ 法を用いた多数の血清サンプルでの再解析が必要である。また、今回の 2D-DIGE 解析で確認した早期腎症患者で有意に変動する一連の尿たんぱく質について、早期腎症マーカーとしての意義を検証するために糖尿病患者での尿たんぱく質プロファイルの追跡調査が必要である。

A. 研究目的

糖尿病は、ライフスタイルの西洋化に伴ってわが国では戦後急増し、今や国民病ともいえるが、心筋梗塞や脳卒中などの動脈硬化性疾患の基礎疾患としても重要である。また、糖尿病性細小血管症を生じて網膜症による失明や腎症による人工透析、糖尿病性壊疽による下肢切断も増加しており、国民健康上大きな問題になっている。糖尿病の複雑な病態を解明するためには、遺伝子及びたんぱ

く質の両面からのアプローチが必要であり、前者については候補遺伝子及び網羅的アプローチの両面からの網羅的解析が進んでいるが、後者については培養細胞、実験動物を用いた網羅的解析が端緒に付いたばかりである。

国立国際医療センター、東京女子医大、国立健康・栄養研究所の今年度までの共同プロジェクトとして、(1)インスリン作用特異性の原因のプロテオーム解析による網羅的検索、(2)組織細胞工学的

視点でのブタ膵内分泌細胞の分化・増殖・再生に関与する重要なたんぱく質の同定、(3)糖尿病発症に影響する環境因子の分子機構についての転写因子に焦点を当てた解析、(4)SELDI-TOF を用いた血清・尿たんぱく質プロファイリングによる新たな分子マーカの開発を研究の4つの柱として行われた。しかし、同プロジェクトでは糖尿病患者由来検体を用いた大規模な解析は行われなかった。今回、我々はプロテオームファクトリー施設でのcICAT法を用いた網羅的たんぱく質解析系を駆使して、糖尿病患者血清からの糖尿病の新規治療標的の発見、糖尿病及びその合併症の進行度、予後及び治療効果を判定する診断マーカの開発を目指した。また、本施設にて収集可能な糖尿病以外の疾患についても、臨床検体の収集及びプロテオーム解析によって、疾患固有の治療標的及び診断マーカを検索した。

B. 研究方法

1) 糖尿病患者血清でのcICAT法による解析

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

2) 糖尿病患者尿での2D-DIGE法による解析

プロテオームファクトリー施設での糖尿病関連血清たんぱく質データベースの構築とは別に、本施設での独自のプロジェクトとして早期糖尿病性腎症の診断マーカを検索するために、本施設にて健常者尿、腎症非合併糖尿病患者尿、早期腎症合併糖尿病患者尿を収集し、前処理後に蛍光ダイファレンシャル二次元電気泳動(2DE-DIGE)を用いて尿たんぱく質プロファイルを解析し、糖尿病・早期腎症に固有な新規診断マーカ及び糖尿病性腎症治療の分子標的を検索した。

本施設にて収集可能な糖尿病以外の疾患由来サ

ンプルについてもプロテオームファクトリーにて解析した。その一環として、呼吸器疾患(慢性閉塞性肺疾患)の患者血清を用いて治療の分子標的、診断マーカを検索した。

3) 血管内皮細胞におけるDHEAの抗アポトーシス作用

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

4) 分化マクロファージにて発現するたんぱく質の解析

感染防御に関与する組織マクロファージへの細胞内分化決定因子をプロテオーム解析にて同定することを目的として、ヒト末梢血単核球からCD14陽性細胞を抗体ビーズ・マグネット法にて分離し、*in vitro*でGM-CSFまたはM-CSF存在下に培養することで、成熟型マクロファージ、GM型マクロファージとM型マクロファージに各々分化させた。末梢血から分離された直後の単球、培養開始から7日間(168時間)経過した分化型マクロファージならびにBCG(Tokyo172株)を感染させたGM型とM型のマクロファージに関して網羅的たんぱく質解析を行った。

- ① 末梢血から分離直後の培養されていない単球
- ② 培養開始から7日間経過後のGM型マクロファージ
- ③ 培養開始から7日間経過後のM型マクロファージ

④ ①②③の単球ならびにマクロファージからそれぞれたんぱく質を抽出する。

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

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

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

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

5) 結核バイオマーカーの探索

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

C. 研究結果

【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平成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送付済みであり、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

5×10⁻⁶M 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。

D. 考察

【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送付した糖尿病患者血清及び健常者血清を用いて 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、低分子量たんぱく質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蛋白の解析

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 lysosomeenzyme 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質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。

E. 結論

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 1620 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。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

①論文発表

1. Yamashita R, Fujiwara Y, Ikari K, Hamada K, Otomo A, Yasuda K, Noda M, Kaburagi Y. Extracellular proteome of human hepatoma cell, HepG2 analyzed using two-dimensional liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Mol Cell Biochem.* 298, 83-92, 2007
2. Kaburagi Y, Okochi H, Satoh S, Yamashita R, Hamada K, Ikari K, Yamamoto-Honda R, Terauchi Y, Yasuda K, Noda M. Role of IRS and PHIP on Insulin-Induced Tyrosine Phosphorylation and Distribution of IRS Proteins. *Cell Struct Funct.* 32, 69-78, 2007
3. Nakahara M, Saeki K, Yogiashi Y, Kimura A, Horiuchi A, Nakamura N, Yoneda A, Saeki K, Matsuyama S, Nakamura M, Toda T, Kondo Y, Kaburagi Y, Yuo A. The protein expression profile of cynomolgus monkey embryonic stem

cells in two-dimensional gel electrophoresis: a successful identification of multiple proteins using human databases. J Electrophoresis. 51, 1-8, 2007

②学会発表:

1. 山下亮. ウシ血管内皮細胞における DHEA の抗アポトーシス作用. 第 3 回メタボリズムネットワーク研究会, ポスター発表, 大磯, 3 月, 2007.
2. 鎗木 康志、山下 亮、安田 和基、野田 光彦. 初期糖尿病性腎症患者由来尿蛋白のプロテオーム解析. 第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会, 口演, 仙台, 5 月, 2007.
3. 山下 亮、井狩高平、安田和基、関原久彦、鎗木康志. ウシ血管内皮細胞における DHEA の抗アポトーシス作用. 第 80 回の日本内分泌学会学術総会, ポスター発表, 東京, 6 月, 2007.
4. 井狩高平、山下亮、郡司眸、浜田圭子、安田和基、野田光彦、鎗木康志. 糖尿病性腎症・早期尿マーカーの 2D-DIGE による検索. 日本ヒトプロテオーム機構第 5 回大会, ポスター発表, 東京, 7 月, 2007.
5. 浜田圭子、山下亮、井狩高平、安田和基、鎗木康志. IRS 高発現 CHO 細胞の核抽出液でのプロテオーム解析. 日本ヒトプロテオーム機構第 5 回大会, ポスター発表, 東京, 7 月, 2007.
6. 鎗木康志. 糖尿病性腎症・早期尿マーカーの

2D-DIGE による検索. 第 7 回 Tokyo Diabetes Seminar, 口演, 東京, 7 月, 2007.

7. 山下亮、井狩高平、安田和基、鎗木康志. ウシ血管内皮細胞における DHEA の抗アポトーシス作用. 第 30 回日本分子生物学会・第 8 回日本生化学合同大会, 口演 & ポスター発表, 横浜, 12 月, 2007.
8. 井狩 高平、山下 亮、郡司 眸、浜田 圭子、安田 和基、鎗木 康志. プロテオーム解析を用いた早期糖尿病性腎症・尿マーカーの検索. 第 30 回日本分子生物学会・第 8 回日本生化学 合同大会, 口演 & ポスター発表, 横浜, 12 月, 2007.
9. 高橋 枝里、岡村 匡史、井狩 高平、平野 久、安田 和基、鎗木 康志. LEA/Sendai ラット血清のプロテオーム解析. 第 30 回日本分子生物学会・第 8 回日本生化学 合同大会, ポスター発表, 横浜, 12 月, 2007.

総説:

鎗木康志 脂肪細胞におけるインスリン作用 カラー版 糖尿病学 基礎と臨床 からだの科学 西村書店、145-148, 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当事項なし

小児腎疾患関連因子の探索ならびに解析

分担研究者 田上 昭人 国立成育医療センター研究所 薬剤治療研究部 部長

研究要旨

小児の免疫・アレルギー疾患の中でネフローゼ症候群について疾患特異的な指標となる体液性因子について解析を行った。その結果 Zinc-alpha2-glycoprotein (ZAG) が血中脂質と相関してネフローゼ症候群の患者で病態と共に変動していることが明らかとなった。

A. 研究目的

小児の腎疾患は近年患者の増加がみられ、その病因・病態の解明および治療方法の開発は成育医療において重要な課題の一つである。このような疾患の病態の解明・治療法の開発において、網羅的に疾患関連因子・薬物標的因子の探索が可能なプロテオーム解析は、トランスクリプトーム解析とともに有用である。つまり、これらの疾患においては、原因遺伝子だけではなくその遺伝子により作られるたんぱく質の動態や他の生体分子との相互作用、さらにはこれに関連する細胞全体の機能情報ネットワークを詳細に解析し、個体の遺伝的特徴(ゲノム情報)を付加して系統的に整理していくことにより、疾患の解明や治療法の開発が可能となるものと考えられる。

喘息やネフローゼ等の疾患は、ステロイド剤や免疫抑制剤が有効であることより、原因となる疾患関連分子が血清中あるいは尿中に存在することが示唆されてきている。本研究では、疾患関連新規病態分子を同定し病態の解明とともに、小児腎疾患の新たな治療法の開発を目指した。

B. 研究方法

原疾患を有する患者から発症時(急性期)、寛解期および正常人の血清の蛋白質の種類、質、量の相違について質量分析装置およびバイオインフォマティクス技術を用いて解析した。さらに、同

定された因子について疾患との関連性について生物学的・医学的関連性を解析するために動物や細胞を用いた検討を行った。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究成果

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。平成18年10月から平成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。

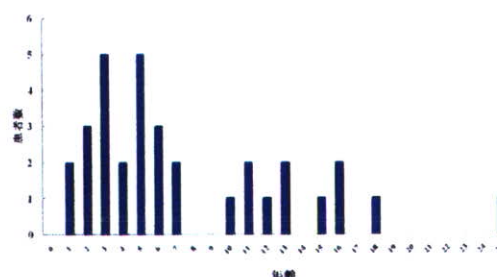


図1 患者の年齢分布

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

	患者数計	微小変化	び慢性メサン	FSGS	糸球体腎炎	慢性増殖性	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	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、尿蛋白陰性)、寛解期(ステロイド治療中止、尿蛋白陰性)の3つのステージでの採取、解析を行った(図3)。

検体提供回数	1回目	2回目	3回目
病期	発症 再発	寛解	寛解
尿蛋白	++~+++	-	-
プレドニゾン服用	15~60mg/日 投与前	休薬 or 減薬 投与中	投与後 投与中
経過時間	0週	1~3週後	8~20週後

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

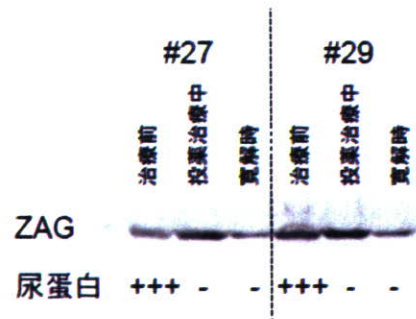
これらの検体の中で一部の検体について(図4)インフォマティクスを用いて解析したところ疾患及び病態と関連して変動するZinc-alpha2-glycoprotein (ZAG)が同定された。

1回目				2回目				3回目			
#1	EVGC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	尿蛋白	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
#2	EVGC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	尿蛋白	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
#3	EVGC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	尿蛋白	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
#4	EVGC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	尿蛋白	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
#5	EVGC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	尿蛋白	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
#6	EVGC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	尿蛋白	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
#7	EVGC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	尿蛋白	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
#8	EVGC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	尿蛋白	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
#9	EVGC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	尿蛋白	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
#10	EVGC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	尿蛋白	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
#11	EVGC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	尿蛋白	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
#12	EVGC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	尿蛋白	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
#13	EVGC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	尿蛋白	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
#14	EVGC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	尿蛋白	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
#15	EVGC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	尿蛋白	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
#16	EVGC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	尿蛋白	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
#17	EVGC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	尿蛋白	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
#18	EVGC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	尿蛋白	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
#19	EVGC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	尿蛋白	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
#20	EVGC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	尿蛋白	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
#21	EVGC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	尿蛋白	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
#22	EVGC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	尿蛋白	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
#23	EVGC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	尿蛋白	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
#24	EVGC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	尿蛋白	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
#25	EVGC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	尿蛋白	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
#26	EVGC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	尿蛋白	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

EVGC, 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)。



抗ZAG抗体を用いたウエスタンブロット
ステロイド感受性ネフローゼ症候群の初発患者12名のうち2名の検体を用いた。
血清2μL相当の血清を12.5%SDS-PAGEにより電気泳動を行い、ウエスタンブロットを行った。
Primary antibody: ZAG(1E2), 1.200 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC)
Secondary antibody: anti-mouse IgG, HRP, 1.3000

図5 抗ZAG抗体を用いたウエスタンブロット法

D. 考察

- 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。
- プレドニゾンによる投薬治療中は尿蛋白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ン休薬時には、血中ZAG濃度は発症時に比べて低下する。