

○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、

○プレドニゾン服用時に血中 ZAG 濃度は増加する。

○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。

○初発例においてもネフローゼ症候群発症時には血中 ZAG 濃度が増加している。

○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する。

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. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1) 特許取得 なし

2) 実用新案登録 なし

3) その他 なし

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

分担研究者 太田壽城 国立長寿医療センター 病院長
田平 武 国立長寿医療センター 研究所長
研究協力者 徳田治彦 国立長寿医療センター 臨床検査部長
渡邊 淳 国立長寿医療センター 血管性認知症研究部
分子病態研究室長

研究要旨

本年度は、引き続き認知症および骨粗鬆症患者の血清検体をプロテオームファクトリーへの提供体制を継続した。また、前年度の脳脊髄液中のたんぱく質の解析に引き続き、これまでに確立した微量たんぱく質の解析システムを用い、家族性脳血管性認知症である Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL) 患者脳のプロテオーム解析を行い、CADASIL 脳の微小血管中の主なタンパク質の同定をした。CADASIL の微小血管は、対照脳の微小血管と比較して、数種の heat shock proteins (HSPs) が増加していることが明らかとなった。また、マウスに対する新規の慢性脳低灌流システムとして、右総頸動脈永久閉塞システムを確立し、本システムを施すことにより、認知機能の低下および大脳白質病変を示す血管性認知症マウスモデルを開発した。一方、骨代謝の制御を担当している骨芽細胞における、緑茶などに含まれる主要なフラボノイドであるカテキン (EGCG: (-)-epigallocatechin gallate) の作用について検討し、stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) のリン酸化・活性化の増強を介して、プロスタグランジン F_{2α} (PGF_{2α}) による血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 産生を促進すること、p44/p42 mitogen-activated protein kinase (MAPK) のリン酸化・活性化の抑制を介して、エンドセリン-1 (ET-1) によるインターロイキン-6 (IL-6) 産生を減弱することを明らかとした。これらの知見は、骨粗鬆症の予防・治療の観点から、臨床検体における疾患関連たんぱく質解析を進める上で重要であると考えられた。

A. 研究目的

高齢化社会の進行に伴い、加齢関連疾患の急増が知られている。これまでに私共は、認知症および骨粗鬆症患者の臨床検体について、病院から研究所へのサンプル提供体制を確立し、さらに認知症・骨粗鬆症・褥創の3疾患について、病院から創薬プロテオームファクトリー (PF) へのサンプル提供体制を整備してきた。また、疾患関連たんぱく質およびペプチドの分析体制を整備し、AD に関連するたんぱく質・ペプチドの網羅的解析技術に

ついて検討してきた。

本年度は、引き続き PF への認知症・骨粗鬆症患者の血清サンプルの提供を行いこれらの疾患関連たんぱく質の解析に資する一方、微量タンパク質の解析法を確立し、各疾患における特異的なたんぱく質の同定、早期診断のための生化学的マーカーを得ることを目的とした。即ち原因遺伝子として Notch3 が同定されている家族性脳血管性認知症の CADASIL に着目し、この病態を探るために、CADASIL 患者剖検脳および対照剖検脳から微小血

管を分離し、血管内のタンパク質に変化がないか解析を行い、発症機序の解明を試みた。また、マウスに対する新規の慢性脳低灌流システムを確立し、それらを用いて新規の血管性認知症マウスモデルの開発を試みた。さらに骨粗鬆症の予防に関する基礎的検討として、骨芽細胞培養系を用いて、EGCG のたんぱく質リン酸化に対する影響および細胞機能制御について検討した。

B. 研究方法

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

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

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

新生仔マウス頭蓋冠より分離株化された骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞およびコラゲナーゼ消化法により調製した初代培養系骨芽細胞を 10%FCS を含む α -MEM 培地にてコンフルエントに達するまで培養した。その後培地を 0.3%FCS を含む α -MEM とし、48 時間後、実験に供した。細胞を EGCG あるいは各種阻害剤にて前処置した後、PGF_{2 α} 、ET-1 あるいは TPA にて刺激し、培地中の VEGF 濃度ある

いは IL-6 濃度を ELISA にて解析した。細胞質分画中の p44/p42 MAPK、p38 MAPK、SAPK/JNK、c-Jun、MEK1/2、Raf-1 のリン酸化について Western blot 法を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

当センターにおける臨床試料の解析あるいは PF への臨床試料の提供については、既に当院倫理委員会および PF 倫理委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

認知症および骨粗鬆症患者の血清について検体採取・保存およびPFへの提供体制を継続した。CADASIL 脳および対照脳から微小血管の RIPA buffer 可溶性画分、Urea/Thiourea 可溶性画分、およびギ酸可溶性画分中のたんぱく質のリストを作成した。その結果、CADASIL 脳では対照脳と比較して、数種の HSPs、ミオシン、およびコラーゲンが増加し、 α アクチンが減少していることが明らかとなった。これらの結果は、既に報告されている免疫組織化学の結果とよく合致した。

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

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

の増強効果を減弱した。一方、MC3T3-E1 細胞および初代培養マウス骨芽細胞において、EGCG は ET-1 による IL-6 産生を抑制した。MC3T3-E1 細胞において、SB203580 は ET-1 による IL-6 産生を抑制したが、SP600125 は何ら影響しなかった。EGCG は ET-1 による p44/p42 MAPK のリン酸化を抑制したが、p38 MAPK のリン酸化に何ら影響しなかった。プロテインキナーゼ C 活性化物質である TPA による IL-6 産生および p44/p42 MAPK のリン酸化は EGCG により抑制された。さらに EGCG は ET-1 および TPA による MEK1/2 あるいは Raf-1 のリン酸化を抑制した。

D. 考察

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ことにより、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。

E. 結論

加齢関連疾患(認知症・骨粗鬆症)の臨床検体の PF 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。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshizaki K, Adachi K, Kataoka S, Watanabe A, Tabira T, Takahashi K, and Wakita H. Chronic cerebral hypoperfusion induced by right unilateral common carotid artery occlusion causes delayed white matter lesions and

- cognitive impairment in adult mice. *Exp. Neurol.* in press.
2. 渡邊 淳. 疾患プロテオミクス-質量分析計を用いた認知症の病態解析-基礎老化研究, 日本基礎老化学会, in press.
3. Tokuda H, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Akamatsu S, Hanai Y, Hosoi T, Harada A, Ohta T, Kozawa O. (-)-Epigallocatechin gallate enhances prostaglandin F₂ α -induced VEGF synthesis via up-regulating SAPK/JNK activation in osteoblasts. *J. Cell. Biochem.* 100:1146-1153, 2007
4. Tokuda H, Takai S, Hanai Y, Matsushima-Nishiwaki R, Hosoi T, Harada A, Ohta T, Kozawa O. (-)-Epigallocatechin gallate suppresses endothelin-1-induced interleukin-6 synthesis in osteoblasts: inhibition of p44/p42 MAP kinase activation. *FEBS Lett.* 581:1311-1316, 2007
5. Takai S, Tokuda H, Hanai Y, Kozawa O. Limitation by p70 S6 kinase of PDGF-BB-induced IL-6 synthesis in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Metabolism.* 56:476-483, 2007
6. Takai S, Tokuda H, Hanai Y, Kozawa O. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt limits FGF-2-induced VEGF release in osteoblasts. *Mol Cell Endocrinol.* 267:46-54, 2007
7. Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Tokuda H, Yasuda E, Toyoda H, Kaneoka Y, Yamaguchi A, Kumada T, Kozawa O. Protein kinase C δ regulates the phosphorylation of heat shock protein 27 in human hepatocellular carcinoma. *Life Sci.* 81:585-591, 2007
8. Tokuda H, Hanai Y, Matsushima-Nishiwaki R, Yamauchi J, Doi T, Harada A, Takai S, Kozawa O. Rho-kinase regulates endothelin-1-stimulated IL-6 synthesis via p38 MAPK in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 362:799-804, 2007
9. Yamauchi J, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Hanai Y, Doi T, Kato H, Ogura S, Kato K, Tokuda H, Kozawa O. (-)-Epigallocatechin gallate inhibits prostaglandin D₂-stimulated HSP27 induction via suppression of the p44/p42 MAP kinase pathway in osteoblasts. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 77:173-179, 2007
10. Tokuda H, Takai S, Hanai Y, Harada A, Matsushima-Nishiwaki R, Akamatsu S, Ohta T, Kozawa O. Platelet-derived growth factor-BB amplifies PGF_{2 α} -stimulated VEGF synthesis in osteoblasts: function of phosphatidylinositol 3-kinase. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 77:187-193, 2007
11. Takai S, Tokuda H, Hanai Y, Harada A, Yasuda E, Matsushima-Nishiwaki R, Kato H, Ogura S, Ohta T, Kozawa O. Negative regulation by p70 S6 kinase of FGF-2-stimulated VEGF release through stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase in osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* 22:337-346, 2007
12. Tokuda H, Takai S, Hanai Y, Harada A, Matsushima-Nishiwaki R, Kato H, Ogura S, Kozawa O. Potentiation by platelet-derived growth factor-BB of FGF-2-stimulated VEGF release in osteoblasts. *J. Bone Miner. Metab.* in press.
13. Tokuda H, Takai S, Hanai Y, Matsushima-Nishiwaki R, Yamauchi J, Harada A, Hosoi T, Ohta T, Kozawa O. (-)-Epigallocatechin gallate inhibits basic fibroblast growth factor-induced interleukin-6 synthesis in osteoblasts. *Horm. Metab. Res.* in press.
2. 学会発表
1. Watanabe A, Tabira T, Kalaria RN, and Takahashi K. Proteomic Analysis of

microvessels of CADASIL brain. International
Psychogeriatric Association, IPA 2007 Osaka
Silver Congress, Osaka, Japan, Oct. (2007)

2. 実用新案登録
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

3. その他
なし

疾患関連たんぱく質解析に関する研究

分担研究者 佐古田 三郎 大阪大学大学院医学系研究科教授

研究要旨

乳癌、消化器癌、閉塞性肺疾患、運動ニューロン病に関連する診断マーカー／治療評価マーカーなどを見出すこと、治療方法の開発へとつながる病態解析をするために、患者から採取した組織あるいは血清を用いて、質量分析器を用いたプロテオーム解析を施行した。

A. 研究目的

難治性疾患として、腫瘍性疾患(消化器癌、乳癌)、閉塞性肺疾患、運動ニューロン疾患の組織や血清蛋白を網羅的に解析する。病理結果を含む臨床データと、蛋白解析結果を検討することで、治療方法の開発へとつながる病態解析、診断マーカー／治療評価マーカーなどを見出すことを目標とする。

B. 研究方法

質量分析器を用いたプロテオーム解析を施行し、臨床データと比較検討する。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

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

ある 1 患者の乳癌と正常組織の比較においては、乳癌組織でのみ発現している蛋白、乳癌で最大 47 倍の発現量がみられる蛋白から発現がみられない蛋白まで、約 1000 種類の蛋白が解析されている。大腸癌については、約 970 種類の蛋白が同定可能であることが明らかになった。現在データを集積中であり、臨床症状との相関について解析してい

く予定である。

閉塞性肺疾患および運動ニューロン病の血清に関しては、プロテオーム解析は終了しており、近日各蛋白の比較定量値と臨床情報との相関解析の予定である。

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

D. 考察

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

E. 結論

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しぼられてくる。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、同定された蛋白について新たな展開が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表なし。

2. 学会発表なし。

2. 実用新案登録なし。

3. その他なし。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得なし。

疾患関連蛋白質解析のための質量分析法の確立

分担研究者 高尾敏文 大阪大学蛋白質研究所 教授

質量分析法を用いた生体内たんぱく質・ペプチドの構造解析をフェムトモルレベルの微量で精度よく行うための方法論の確立を目指し、質量分析に関連する分析的手法やハードウェアの開発、並びに、データを精度よく解析するためのソフトウェアの試作を行った。本年度は、前年度に肺癌患者尿より見出した疾患マーカー候補ペプチドの検証、たんぱく質画分のプロテオーム比較解析、並びに、糖たんぱく質糖鎖のプロファイリング法について CA19-9 抗原を例に検討した。

A. 研究目的

疾患関連の微量たんぱく質の網羅的同定および翻訳後修飾の解析には、化学・分析的手法、並びに、質量分析に関するハード・ソフトウェアの開発研究は必要不可欠である。本研究では、尿を生体試料としてマーカー探索のためのペプチド・たんぱく質、糖鎖の高効率の分離・抽出法を確立し、尿たんぱく質・ペプチドのデータベースの構築、並びに、癌患者尿よりマーカー候補の探索を行うことを目的とする。

本年度は、上記目的を達成するために、以下の3つの研究内容を実施した。

- 1) 種々の癌患者から同定したマーカー候補ペプチド (Signal Recognition Particle (SRP)-68 由来) について、尿中での存在量を種々の癌種間及び健常者で比較解析した。
- 2) 尿蛋白質及び糖蛋白質糖鎖のプロファイリング法の確立とデータベース構築。
- 3) 尿糖蛋白質から CA19-9 糖鎖抗原を網羅的に探索する方法を検討した。

B. 研究方法

既設の2つのタンデム質量分析計 (ESI-MS/MS, MALDI-MS/MS) を用いて、尿から抽出、単離したたんぱく質・ペプチドの測定を行い、ペプチド・たんぱく質の網羅的同定、並びに、糖たんぱく質糖

鎖の構造解析を行った。質量スペクトルの解析には、一次構造解析支援ソフトウェア“SEQMS” (Fernandez-de-Cossio J. et al., 1998 年) を、データベース検索によるたんぱく質同定には市販の検索エンジン“MASCOT”を用いた。MASCOT の検索結果は、さらに、同定精度の向上を目的に H17 年度試作したソフトウェア“FragPatterm” (Satomi Y. et al., 2006 年) により検証し、その後、データベースの構築を行った。

尿ペプチドの分離は、内径 1 mm の強陽イオン交換担体カラム、内径 75 μ m の逆相担体カラムを用いて行った。また、尿たんぱく質は、予め限外ろ過膜により単離しておいたたんぱく質画分 (10 k Da \sim) を酵素消化し、上記イオン交換クロマトグラフィー (82 分画) で分画後、各々の画分に対して nanoLC /ESI-MS/MS を行い、たんぱく質同定を行った。糖鎖 (CA19-9) は、上記たんぱく質酵素消化物に対して市販のモノクローナル抗体を用いて濃縮後、nanoLC /ESI-MS/MS により糖鎖構造とたんぱく質同定を行った。尿からのマーカー候補ペプチドの同定は逆相担体カラムにより簡易精製後、MALDI-MS/MS により同定と定量を行った。定量は、安定同位体 180 標識化ペプチド (酸触媒を用いて調製) を尿試料に一定量スパイクして MS 測定し、観測されるイオンピークの強度比 (ペプチド/標識ペプチド) をもとに行った。ピーク強度比の算出

は、H16年度に開発したソフトウェア“Isotopica” (Fernandez-de-Cossio J. et al.)を用いて同位体比を求めることにより行った。

C. 研究結果

1) マーカー候補ペプチド(SRP-68由来)の検証。

大腸癌患者5例、膵臓癌4例、肝臓癌5例、前立腺癌12例、腎細胞癌4例、肺癌5例(小細胞癌、肺腺癌、扁平上皮癌)、健常者尿11例の比較解析から、半定量的だが、肺癌、前立腺癌患者の7例において、同一のペプチド(SRP-68のN末端領域の26残基からなるペプチド)が多量に検出された。ペプチドのC末端領域を認識する抗体を作成したが、特異な配列のため良好な力価の抗体は得られなかった。そこで、本ペプチドの親水性の性質を利用した分離法を確立し、また安定同位体で標識したペプチドを調製、尿中にスパイクして定量する方法を確立して、健常者および各種癌について検証を行った。健常者尿を用いて日間での変動を解析した結果、量的な変動が見られ、本ペプチドのマーカーとしての有効性は低いと結論した。

2) 尿たんぱく質及び糖たんぱく質糖鎖のプロファイリング法の確立とデータベース構築。

尿たんぱく質・ペプチドのプロファイリングと合わせて、糖鎖修飾を検出・構造解析する方法を昨年度に引き続きオンライン nanoLC/ESI-MS/MSを用いて検討した。

膵臓癌(5人)、肺癌(2人)、健常人(3人)尿由来の分子量10 kDa以上のたんぱく質画分について、前年度に引き続き、たんぱく質プロファイルを得て、プロテオームデータベースを構築した。健常人との比較解析の結果、癌患者尿よりマーカー候補たんぱく質を4種類見出した。その内の1つ(Leucine-rich α -2-glycoprotein precursor)は膵臓癌患者血中でも優位に増加していることが報告されている(J. Chromato. B, 2007, 852, pp257-67.)。

3) 尿糖たんぱく質由来 CA19-9 糖鎖抗原の探索。

尿中には、腫瘍マーカーである CA19-9(シアリ

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

D. 考察

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のが重要となる。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、生理的状态等で変動するため、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。

E. 結論

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 以上の蛋白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たんぱく質を 4 種類見出した。その内の 1 つ

(Leucine-rich α -2-glycoprotein precursor)は、膵癌患者血中에서도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 Lea 抗原)を有する糖ペプチドを抗 CA19-9 モノクローナル抗体により効率よく単離する方法を確立した。膵癌患者尿中には CA19-9 抗原を有している糖たんぱく質が多く含まれていることが推定された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, Inagaki F, Ohsumi Y.: The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J Biol Chem.* 2007 Dec 28;282(52):37298-302.
2. Mikami T & Takao T.: Selective Isolation of N-Blocked Peptides by Isocyanate-Coupled Resin. *Anal Chem.* 2007: 79: 7910-7915.
3. Nishiwaki T, Satomi Y, Kitayama Y, Terauchi K, Kiyohara R, Takao T, Kondo T.: A sequential program of dual phosphorylation of KaiC as a basis for circadian rhythm in cyanobacteria. *EMBO J.* 2007 Sep 5;26(17):4029-37.
4. Yamaguchi H, Sasaki K, Satomi Y, Shimbara T, Kageyama H, Mondal MS, Toshinai K, Date Y, González LJ, Shioda S, Takao T, Nakazato M, Minamino N.: Peptidomic identification and biological validation of neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2. *J Biol Chem.* 2007 Sep 7;282(36):26354-60.
5. Sekine K, Fujiwara M, Nakayama M, Takao T, Hase T, Sato N.: DNA binding and partial

nucleoid localization of the chloroplast stromal enzyme ferredoxin:sulfite reductase. FEBS J. 2007 Apr;274(8):2054-69.

2. 学会発表

1. 田家亜由美, 高尾敏文: 内部データベース検索機能を搭載した nanoLC/ IonTrap-TOFMS によるヒト尿蛋白質のプロファイリング、第 55 回質量分析総合討論会(平成 19 年 5 月、広島)
2. 高尾敏文: 尿プロテオミクスによるバイオマーカー探索、第 25 回京阪泌尿器腫瘍セミナー(特別講演)(平成 19 年 9 月、大阪)
3. T. Mikami, A. Taya, N. Minamino, T. Takao: α -アミノ基選択的反応による蛋白質 N 末端ペプチド単離法の開発 第 80 回日本生化学会大会(平成 19 年 12 月、横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- ① 発明の名称: アミノ末端修飾ペプチドの分離方法

発明者: 高尾敏文、三上寿幸

特許出願予定(2008 年、2 月 10 日)

- ② 発明の名称: 新規ペプチド

発明者: 山崎基生、高橋憲行、南野直人、佐々木一樹、高尾敏文、里見佳典

PCT/JP2006/314969 号

日本、米国、ヨーロッパに移行予定(2008 年)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

(研究協力者)

- ✓ 須藤浩三(ヒューマンサイエンス財団流動研究員)
- ✓ 田家亜由美(文部科学省科学研究費特任研究員)
- ✓ 門田守人、山本浩文(大阪大学大学院医学系研究科 消化器外科学)
- ✓ 中森正二(国立病院機構 大阪医療センター)
- ✓ 奥山明彦、野々村祝夫、中山雅志(大阪大学大学院医学系研究科 泌尿器科学)
- ✓ 中里雅光、芦谷淳一、山口秀樹(宮崎大学医学部附属病院 第三内科)

大腸癌の糖脂質の構造解析

分担研究者 今岡真義 大阪府立成人病センター 総長

研究要旨 癌性変化した糖鎖の一部が、癌の転移や浸潤に深く関与すると考えられている。そこで、実際のヒト癌サンプルを用いて、糖鎖の癌性変化を詳細に解析し、そのメカニズムを明らかにすることを目的とした。昨年度までに、糖鎖のなかでも癌との関わりが示唆されているとともに、比較的解析の容易な糖脂質に焦点を絞り、それらの微量構造解析を行うための技術を確立した。大腸癌 14 症例の癌細胞、大腸正常粘膜上皮細胞から糖脂質を抽出し、それらの構造解析および比較検討を行った。解析方法は、糖脂質の糖鎖部分を 2-アミノピリジンで蛍光標識した後、HPLC による 2 次元糖鎖マッピング法、質量分析法、酵素消化法を組み合わせ、糖鎖構造を想定した。その結果、大腸正常粘膜上皮細胞には fucose が付加された中性糖が主な構成成分であった。一方、大腸癌細胞では fucose が付加された中性糖以外に fucose が付加されない中性糖鎖も多く存在し、さらに、正常粘膜上皮細胞では極めて発現の低かった sialic acid が付加された酸性糖が中等度発現していた。以上の結果から、大腸癌の糖鎖の癌性変化のメカニズムとして糖鎖合成不全が強く示唆された。

A. 研究目的

細胞は癌化に伴いその細胞表面の糖鎖構造を大きく変化させる(糖鎖の癌性変化、aberrant glycosylation)。また変化した糖鎖の一部が key molecule となり、転移や浸潤などに深く関与すると考えられている。一部の癌の糖鎖構造解析から sialyl-Lex、sialyl-Lea などの糖鎖構造が癌に特異的に発現することが判明し、その後の機能解析から、それらが血管内皮細胞に発現するセレクトインのリガンドとして作用し、癌の血行性転移に深く関与することが明らかとなった。そこで、癌研究分野において、癌細胞表面の糖鎖構造を総合的に解析し、その発現データをもとにした糖鎖機能解析は極めて重要な研究課題と考えられる。

しかし、現在までのところ、癌細胞表面の糖鎖構造解析は、ほとんどが癌細胞株を用いたものである。実際のヒト癌サンプルの解析は、一部の癌において糖脂質の構造解析は行われてはいるが、精度、感度の点で問題点も少なくない。またヒト癌で行われている主な解析は、レクチンプロットや

免疫組織化学などを用いた特定の糖鎖構造の発現を検討するものである。我々は、昨年度までにヒト癌組織の糖鎖構造、なかでも癌との関わりが示唆されているとともに、比較的解析が容易な N 型糖鎖と糖脂質に焦点を絞り、それらの微量構造解析を行うための技術を確立した。今年度は、レーザーマイクロダイセクション法などを用いて、大腸癌細胞、大腸正常粘膜上皮細胞を抽出し、それらの糖脂質の構造を詳細に解析、比較検討し、糖鎖の癌性変化のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

大腸癌患者 14 名の大腸癌組織及び大腸正常粘膜組織からレーザーマイクロダイセクション法などで、大腸癌細胞や大腸正常粘膜上皮細胞を抽出した。レーザーマイクロダイセクションにはライカ社製、AS LMD を用いた。手術で採取された大腸癌サンプルをクリオスタットで 10 μ m の切片を作成し、ホイルつきのスライドガラスに貼り付けた。

切片をアセトンで固定し、ヘマトキシリン染色後、レーザーマイクロダイセクション法で癌細胞を抽出した。

それらの細胞から脂質成分をクロロフォルム：メタノール溶液で抽出し、DEAEを用いたイオン交換で、中性脂質と酸性脂質を分離した。両脂質を Endoglycoceramidase II (TAKARA) で処理することにより糖脂質の糖鎖部分を切り出した。糖鎖を高感度で検出するため糖鎖部分を 2-アミノピリジンで蛍光標識し(ピリジルアミノ化、PA 化)、C18 逆相カラム及び Amide 順相カラムの 2 種類の HPLC を用いて糖鎖構造を推定する 2 次元糖鎖マッピング法、質量分析法と酵素消化法を組み合わせ、糖鎖構造を同定した。PA 化糖鎖の質量分析にはイオントラップ型質量分析計 LCQ Deca XP を用いた。酵素消化には、 β 1-4 galactosidase、 α 2-3 sialydase、 β -N-acetyl hexosaminidase、endo- β -galactosidase、 α 1-3/4 fucosidase などを用いた。

(倫理面への配慮)

本研究内容は、大阪府立成人病センターに設けられた倫理審査委員会において既に承認されている。今回使用した癌組織、正常組織は、手術前に患者さんに対して文書を用いて説明し、同意の得られた患者さんのサンプルである。

C. 研究結果

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

1) 中性糖脂質

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

していることがあげられる。

2) 酸性糖脂質

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



D. 考察

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る。

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 が付加される。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 が付加される。そのため、Sialyl、Sialyl Le^a などの癌特異的な糖鎖抗原が形成される。このことは、癌細胞では糖鎖の合成不全が起きていることを強く示唆するものである。

E. 結語

大腸癌細胞、大腸正常粘膜上皮細胞の糖脂質の構造を詳細に検討し、両者を比較することにより糖鎖の癌性変化のメカニズムを推測することができた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

学会発表

- ① 宮本泰豪、是金宏昭、大腸癌の酸性糖脂質の解析と癌の糖鎖解析における laser microdissection の有効性の評価、第 55 回日本質量分析総合討論会(2007 年 5 月、広島)
- ② 信田京子、是金宏昭、御園生良子、能浦真吾、大植雅之、今岡真義、宮本泰豪、大腸癌の糖脂質の構造解析、第 80 回日本生化学大会(2007 年 12 月、横浜)

論文発表

- ① H. Korekane, S. Tsuji, S. Noura, M. Ohue, Y. Sasaki, S. Imaoka, Y. Miyamoto, Novel fucogangliosides found in human colon adenocarcinoma tissues by means of glycomic analysis, Anal Biochem 364 (2007) 37-50.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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

分担研究者 金子 勲 (財)ヒューマンサイエンス振興財団
創薬プロテオームファクトリー
生体試料分析部門長

研究要旨

1. 各研究協力機関から提供された、日本人健常者及び糖尿病、がん、認知症、腎疾患及び免疫・アレルギー疾患等 23 疾患の全ての血清(624 検体)について、cICAT 法による高発現血清たんぱく質(上位約 140 種類、累計約 350 種類)の同定と比較定量解析を完了させ、その解析結果及び臨床情報をデータベースに格納した。また、疾患関連たんぱく質候補探索を可能にする解析付加情報を作成した。
2. Laser -Micro-Dissection により分取した各種がん患者組織試料(がん・正常組織等, 34 検体)を cICAT 法により解析し、患者毎に 600-1000 種類のたんぱく質の同定と比較定量(がん/正常)を行った。その結果、スキルス胃がんの特徴的な十数種類のたんぱく質を見出した(特許出願 2 件)。
3. 高分解能計測機能をもつ高速度 SELDI-QqTOF-MS 法を導入して、糖尿病患者(合併症有無)血清(124 検体)及び健常人血清(40 検体)を解析し、合併症で観察される複数のピークを見出し、その一つを同定した。
4. 脳脊髄液たんぱく質の cICAT 法による解析法を検討した結果、100 μ g protein を用いて約 310 種類のたんぱく質の同定と比較定量が可能であった。その中には、脳組織由来と考えられる受容体等のたんぱく質が多数含まれていた。
5. 低発現血清たんぱく質に関しては、病変組織部位より漏出する低発現血清たんぱく質の解析法を構築した(特許出願 1 件)。
6. cICAT 法と iTRAQ 法により同定された血清たんぱく質の詳細な比較解析を行った。iTRAQ Confidence 99%での同定たんぱく質(94 種類)のうち、cICAT 同定たんぱく質(116 種類)と共通のものは 65 種類、cICAT 法でのみ検出されるたんぱく質は 51 種類であった。Confidence 95%に落とすと、iTRAQ 同定たんぱく質数は 242 に増加する。両方法を相補的に使用することが望ましい。
7. FGF-receptor 2 たんぱく質を強発現していた培養スキルス胃がん細胞株の細胞増殖を FGF-receptor 2 siRNA は選択的に強く阻害することを見出した(特許出願)。

A. 研究目的:

新たな創薬ターゲットおよび疾患関連バイオマーカー探索には、多数の患者試料(血清・組織等)と健常人試料に存在するたんぱく質を同定・比較定量し、得られたたんぱく質解析結果と患者の臨

床情報を連結させた疾患関連たんぱく質のデータベースを作成することが必要である。本年度は、cICAT 法による高発現血清たんぱく質(上位約 140 種類)解析スループット性を 12 検体/週に上げ、各研究協力機関から提供された全てのヒト血清試料

の網羅的解析研究(同定・比較定量)を完了させることを最優先する。また、組織たんぱく質の解析に関しては、部位特異的分取が可能な Laser-Micro -Dissection(LMD)を用いて、主として消化器がん患者のがん部位と正常部位の比較解析を行う。一方、スループット性が高く、正確な分子量が測定可能な prOTOF2000 を SELDI-plate に使用し、バイオマーカー探索系の構築を行う。低発現血清たんぱく質の解析に関しては、病変組織より漏出した低発現血清たんぱく質が測定可能な解析法を構築する。以上、得られた各たんぱく質の比較定量値および臨床情報(年齢、性別、血液生化学検査値、病状(ステージ)、発症時期、投薬歴等)を格納した疾患関連たんぱく質データベース作成に着手する。

B. 研究方法：

1) 血清の調製法：

患者血清(研究協力機関で実施)の調製は、10 ml 真空採血管(ベノジェクト II 血清分離剤・凝固促進剤フィルム入り)を用いて採血した血液(通常は 10-20 ml 程度)を 37℃で 30 分静置(もしくは室温で 1 時間静置)したものを 4℃で、1,500 G (3,000rpm)で 10 分遠心分離を行うことにより、上清(血清)を得た。得られた血清は 0.2ml ずつ 1.5 ml チューブ(エッペンドルフ製)に分注し、冷凍保存した(-80℃)。必要に応じて融解し、実験に使用した。なお、本研究に使用するヒト標準血清(CTS02S)は、健常外国人(米国)の年齢 20~50 歳代の男性 5 名、女性 5 名より、採取した血清をプールしたものであった [Uniglobe Research Corporation(CA, USA)より購入]。また、これとは別に、健常外国人の個々の血清を調べるため、さらに、男女 5 名ずつ(年齢 21~46 歳)の血清を Uniglobe Research Coporation より購入した。日本人の健常人血清としては、1)日本赤十字センターより提供して頂いた年齢 18-60 歳の男女それぞれ 15 名(合計 30 名)の血清、及び 2)国際医療センターより提供された年齢 23-61 歳(男性 22 名、

女性 20 名、合計 42 名)のボランティア健常人(糖尿病非罹患患者)の血清を使用した。

2) 血清主要たんぱく質の除去：

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

3) cICAT 法(血清ルーチンアッセイ)：

市販の cICAT 試薬 (Applied Biosystems (AB)) のロットの一部に含量バラツキがある場合があるので、試薬(H, L 鎖)の一部を分取し、C18 逆相カラムで定量し、H 鎖試薬、L 鎖試薬のバラツキが 10%以内のロットを反応に使用した。標準血清 (CTS02) 或いは患者血清を、アジレント抗体カラム (Hu6) で分画し、高濃度たんぱく質を除いた血清たんぱく質画分 (final 1mg/ml) を得た。本画分を、常法に従い (1), 50 mM Tris-HCl, 0.1% SDS (pH8.5) で可溶化し、TCEP (final 1mM, 95℃, 10 min) で変性還元後、2.2mM の cICAT L 鎖試薬を標準血清 (CTS02S) 画分 200 μ g に、また H 鎖試薬を患者血清画分 200 μ g に、37℃、2 時間反応させた。未反応の試薬を 10mM DTT でクエンチングし、H 鎖

試料と L 鎖試料を等量混合し、トリプシン (Promega, TPCK 処理) で 37°C、16 時間消化した。得られた消化物を、SCX column (Poly LC Sulfoethyl A column(4.6 x 100mm)) にアプライし、10mM KH₂PO₄, pH2.8, 25%CH₃CN (SCX-binding buffer) で吸着・洗浄後、SCX-binding buffer + 0.5M KCl (SCX-elution buffer) で溶出させた。溶出画分をアビジンカートリッジカラム(5 個連結) にアプライし、素通り部分を洗浄後、吸着した cICAT 試薬反応ペプチドを 30% CH₃CN/0.4% TFA で溶出した (Vision Workstation System)。溶出画分を乾燥後、95%TFA (5%Scavenger 含有) で 37°C、2 時間反応させてビオチン部分を切断し、cICAT 標識ペプチド(H 鎖、L 鎖)を得た。本ペプチド画分を、減圧乾固した後、SCX column(2.1 x 35mm) にて、0.05%ギ酸/25% CH₃CN - 0.5M ギ酸アンモニウム/5.88%ギ酸/25% CH₃CN濃度勾配系で 25 分画し、C18 column(1 x 5mm) で脱塩した。得られた cICAT ペプチドは nano-LC/QSTAR XL [Applied Biosystems (AB), ESI-Q/TOF]、分析時間 90min の条件で質量測定を行い、生データをチェック後、日立統合データベースシステム (HiSpec) と RefSeq database を用いてペプチドおよびたんぱく質の同定・比較定量解析を行った(2-4)。

4) iTRAQ 法 :

ヒト標準血清(CTS02S)をアジレント抗体カラム (Hu6) で 6 種高濃度たんぱく質を除いた血清たんぱく質画分(200 μg)を、常法に従い(5)、50 mM triethylammonium bicarbonate, 0.1% SDS (pH8.5) で可溶化し、TCEP(final 1mM, 60°C, 60 min)で変性還元後、Cysteine Blocking 試薬でクエンチング(25°C, 10min)を行い、30 μg のトリプシン (Promega, TPCK 処理) を加え、37°C、16 時間消化した。得られた消化物を 4 等分に分画し(40 μg/tube), iTRAQ 試薬 (114 と 117) を添加 (duplicate) し、25°C で 60min 反応させた。その後、114 試薬及び 117 試薬で反応させたもの混合し、蒸発乾固後、SCX binding buffer (10mM KH₂PO₄/25%

CH₃CN, pH2.9) に溶解し、SCX column [Poly LC Sulfoethyl A column(4.6 x 100mm)] で吸着・洗浄後、SCX-binding buffer + 0.5M ギ酸アンモニウム (SCX-elution buffer) の濃度勾配法で 25 分画に溶出させた。溶出画分を C18 column で脱塩した iTRAQ ペプチドは nano-LC/QSTAR XL (AB, ESI-Q/TOF) で質量分析測定を行い、得られた MS データを ABI- ProQuant 解析ソフト及び Mascot を基本とする日立統合データベースシステム (HiSpec) と RefSeq database を用いて、ペプチドおよびたんぱく質の同定・比較定量解析をした。

5) 低発現血清たんぱく質の解析法 :

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

標準血清画分を cICAT の L 鎖試薬で、組織由来たんぱく質を H 鎖試薬でそれぞれ、常法 (B. 方法の 9) に記載) に基づき、37°C、2 時間標識した。アセトン沈殿法により過剰試薬等を除去、たんぱく質画分を分取後、トリプシン処理、Avidin affinity column (Vision system) 処理、Cleaving 処理(37°C, 2 h)後、SCX column で 25 分画し、脱塩後の cICAT ペプチドを、QSTAR

XL/nanoLC-system で測定し、HiSpec で解析し、同定たんぱく質と比較定量値(A:患者組織由来たんぱく質/健常人血清たんぱく質)を得た。次に、患者血清画分をL鎖試薬で、同一の組織由来たんぱく質をH鎖で標識し、同様に、同定たんぱく質と比較定量値(B:患者組織由来たんぱく質/患者血清たんぱく質)を得た。得られた結果を連結処理することにより、患者血清と正常血清で同定したたんぱく質の比較定量値を算出した。

連結処理：

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

6) 脳脊髄液(CSF)の解析法の検討：

国立精神神経センターより基礎検討用として提供されたパーキンソン病患者脳脊髄液(10 ml x 10名)を使用した。各患者検体の脳脊髄液のたんぱく質濃度をLowry法で定量後(0.16 - 0.28 mg/ml (average:0.22 mg/ml))、各検体5mlをプールし(50 ml)、EDTA 10 mMを添加後、限外ろ過膜(5K以上)で濃縮した。濃縮した脳脊髄液を、上述の14種類のたんぱく質を吸着するAgilent抗体カラム(Hu14, 10 x 100mm)で分画し、素通り画分と吸着溶出画分に分けた。素通り画分を0.1% SDS, 50mM Tris/HCl(pH8.5)に溶解し、100 μg proteinを2本用意し、それぞれH試薬、L試薬(1:1)で37℃, 2h標識した。アセトン沈殿法により過剰試薬等を除去、たんぱく質画分を分取後、常法により、トリプシン処理、Avidin affinity column (Vision system)処理、Cleaving by TFA 37℃, 2h処理後、SCX columnで25分画し、脱塩後のcICATペプチドを、QSTAR XL/nanoLC-systemで測定した。生データをチェック後、統合データベースシステム(HiSpec)を用いてペプチドおよびたんぱく質の同定・比較定量解析をした。なお、アジレント抗体カラムの吸着溶出画分も同様に解析し

た。

7) 凍結組織切片の調製およびLMDによる正常・病変部位特異的組織分取：

協力医療機関より提供された10 μmの切片(100~400枚)を切除用のスライドガラスに貼り付け、風乾後、95%エタノール液で組織を固定化し、ヘマトキシリンの3倍希釈液で軽く染色した。Laser-Micro-Dissection(LMD)(LEICA社製AS LMD)を用いて常法(6)により、病変部位あるいは正常部位を指定してレーザーを照射することにより部位特異的に切除し、試験管に集め、必要に応じて可溶化処理を行った。

8) 組織可溶化・たんぱく質抽出法：

LMDで得られた部位選択的組織の乾燥重量を測定し、予想されるたんぱく質含量に合わせて、たんぱく質濃度(約1mg/ml)になるように可溶化溶液[(8M尿素(Wako), 4% CHAPS, 1mM TCEP or 65mM DTT, 40mM Tris/HCl(pH8.3), 1/100 protease inhibitors(Sigma, P2714: 100x stock soln))に懸濁し、Vortexを行い、超音波処理し、可溶化処理を行った。たんぱく質の定量はLowry法で行った。得られた組織粗可溶画分(Total lysate)を20℃で、12,000rpm, 20分間の遠心処理を行い、上清を組織全可溶画分とした。常法に従って、上述の組織全可溶画分溶液に冷アセトン(100%, 4℃)を加えて、攪拌し、白濁した懸濁液を-80℃で一晩放置し、アセトン沈殿を完結させた。その後4℃で12,000 rpm, 20分の遠心処理を行い上清を除き沈殿画分(crude proteins)を得た。この沈殿画分に99.5%エタノールを加え、4℃で12,000rpm, 20分の遠心処理し、残存する不純物(上清)を除き、たんぱく質沈殿画分を得た(約100 μg/tube, -30℃で保存)。この操作によるたんぱく質の回収率は約80%であった。Kato-III, MKN-45, MKN-74などのヒト胃がん培養細胞株の可溶化は組織可溶化法に準じた。

9) 組織・細胞たんぱく質の cICAT 法による解析:

組織・細胞由来たんぱく質各 100 μ g/tube 2 本をそれぞれ 1 unit の H 鎖 cICAT 試薬および L 鎖 cICAT 試薬反応用に用意した(主として正常部位とがん部位の比較)。常法(2, 4)に従い、50 mM Tris-HCl, 0.1% SDS (pH8.5) で可溶化し、TCEP (final 1mM, 95°C, 10 min) で変性還元後、2.2mM の cICAT 試薬(AB) [13 C (H 鎖) あるいは 12 C (L 鎖) 標識] を 37°C、2 時間反応させた(反応液各 100 μ l)。未反応の試薬を 10mM DTT でクエンチングし、H 鎖試料と L 鎖試料を等量混合した後、アセトン沈殿法により過剰試薬等を除去し、たんぱく質画分を分取した。本画分を常法に従い、トリプシン(Promega, TPCK 処理)で 37°C、16 時間消化し、得られた消化物をアビジンカートリッジカラム(2 個連結)にかけ、吸着した cICAT 試薬反応ペプチドを 30% CH₃CN/0.4% TFA で溶出した(Vision Workstation System)。溶出画分を乾燥後、95%TFA(5%Scavenger 含有)で 37°C、1 時間反応させてビオチン部分を切断し、cICAT 標識ペプチド(H 鎖、L 鎖)を得た。本ペプチドを減圧乾固した後、0.05%ギ酸/25% CH₃CN に溶解し、SCX column(2.1 x 35mm)にて、0.05%ギ酸/25% CH₃CN - 0.5 M ギ酸アンモニウム/5.88%ギ酸/25% CH₃CN 系(ギ酸アンモニウム 0 ~ 0.5M gradient)でペプチド画分を分画(25~50 分画)し、それぞれ C18 column で脱塩し、減圧乾固した。得られた cICAT ペプチドは QSTAR で質量分析測定を行い、血清の場合と同様に統合データベースシステム(HiSpec)及び RefSeq database を用いて、ペプチドおよびたんぱく質の同定・比較定量解析を行った。細胞株については比較する細胞株由来のたんぱく質を各々 100 μ g/tube を用意し、上記と同様の処理を行い解析した。

10) 凍結組織切片の免疫組織化学法による正常・病変部位解析法:

スキルス胃がん患者の第 1 症例(#1)の胃がん組織ブロック及び周辺の正常胃組織ブロックからク

リオスタットで調製した 10 μ m の組織切片をスライドガラスに貼り付け、風乾後、95%エタノール液で組織を固定化した。免疫組織化学的解析の常法により、cICAT 法でスキルス胃がん特異的たんぱく質と判定された CD177(gi|9966889)のマウスモノクロナル抗体(MEM-166, ZYMED Laboratories)を 1 次抗体として用いて、胃がん部位切片および正常部位切片の免疫染色を行った。1 次抗体を切片に加え室温 2 時間反応させた後に洗浄し、ビオチン標識ウマ抗マウス抗体(2 次抗体)を添加し、室温 20 分反応後、未反応な 2 次抗体を洗浄除去した。その後、ABC(Peroxidase) Kit (VECTOR Laboratories)を用いて、常法により AEC Substrate(red)で発色させ、乾燥後、ヘマトキシリンの 3 倍希釈液で染色(counterstaining)し、免疫染色を行った。

11) QSTAR XL (ESI-Q/TOF) での測定:

SCX による分画・脱塩したペプチド(cICAT 標識)を 0.1%TFA-2% CH₃CN にて再溶解し、nano-LC (LC-Packing)/QSTAR XL (AB, ESI-Q/TOF) および nano-LC /Probot (LC-Packings)にて分析した。カラムは C18 PepMapTM 100, 3 μ m, 100 Å, 75 μ m x 150mm(LC-Packings)を使用し、QSTAR XL 用移動相は A: 2%CH₃CN/0.1% HCOOH, B: 95% CH₃CN/0.1% HCOOH によるリニアグラジエント(流速: 200 nl/min, 分析時間 90 分)である。ABI-4700 用移動相は、A: 5% CH₃CN/0.1% TFA, B: 95% CH₃CN/0.1% TFA によるリニアグラジエント(流速 300 nl/min, 分析時間 70 分)である。なお、QSTAR XL で分析する場合は、BSA トリプシン消化ペプチド断片(100fmol)を用いて nano-LC の調整を行い、規定のシーケンスカバレッジ(約 50%以上)が得られるのを確認した後、サンプルの測定を行った。なお、血清試料の一部高発現たんぱく質のペプチドが定量測定範囲を超えないように(飽和しないように)各画分の injection 量を調整した。測定は MS 1 秒、第一 MS/MS 3 秒、第二 MS/MS 3 秒の合計 7 秒が 1 サイクルの自動測定