

[IDA(Information Data Acquisition) Mode] であり、Peak detection thresholdは25 count, MS rangeはm/z 370-1430である。測定データの信頼性を確保するために、実サンプルを8回測定する度に1回、QC用のBSA消化物(100fmol)を測定した。

12) 高速度 SELDI-QqTOF-MS 法：

prOTOF 2000 (PerkinElmer 社) と SELDI-ProteinChip (Bio-Rad) を利用する高速度 SELDI-QqTOF-MS 法を国立がんセンター研究所の協力により導入した。常法に基づき、9M 尿素 2% CHAPS で変性処理をした血清検体を群分けし、検体群毎の ID 番号を割り振り(三次匿名化)、検体 ID を triplicate でランダム化し、Profiling 時のスポット位置決定表を作成する。試料検体を小分けし、-80℃で保存し、必要に応じて解凍しマスタープレートに triplicate で分注し、Replica を数枚作成する。Biomek 2000 を用いて、分注検体を SELDI ProteinChip H50 及び IMAC30 に吸着させ、Matrix を添加後、乾固させた。各 SELDI ProteinChip を prOTOF 2000 で 1000-30000m/z の範囲で計測し、ペプチドピークを NCC-ProteoJudge で検出した。なお、糖尿病患者血清の解析での群分けは以下の通りである。

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)
=B 群：23 検体
- c) 腎症&網膜症(8 検体)+網膜症(14 検体)+網膜症&神経症(8 検体) = C 群：30 検体
- d) 網膜症&腎症&神経症(19 検体)+神経症(7 検体)=D 群：26 検体

ロ) コントロール血清(健康人、糖尿病の非罹患患者) = E 群：40 検体

ハ) スタンダード血清 = VSM(volunteer serum mixture)

C. 研究成果 1：

1) 創薬プロテオームファクトリー施設(PF)倫理審査委員会での審査結果：

本年度は、2回のPF倫理審査委員会が開催され、5 研究協力機関からのヒト試料の受け入れおよび研究計画(新規および継続)について審議し、いずれも承認された。PF 倫理審査委員会の構成メンバーおよび研究課題を下記に示す。

創薬プロテオームファクトリー施設(PF)倫理審査委員会：

同 委員長：岡田 善雄((財)千里ライフサイエンス振興財団、外部委員)

同 委員長代行：横田 正幸

((財)ヒューマンサイエンス振興財団、内部委員)

同 委員：神崎 俊彦(一般市民、外部委員)

同 委員：谷本 剛(同志社女子大学薬学部、外部委員)

同 委員：玉岡 かおる(作家、外部委員)(平成19年10月11日まで)

同 委員：平井 みどり(神戸大学医学部附属病院、外部委員)(平成19年10月12日から)

同 委員：手嶋 豊(神戸大学大学院法学研究科、外部委員)

同 委員：脇舛 光廣(医薬基盤研、外部委員)

研究課題

国立成育医療センター：

腎疾患および免疫・アレルギー疾患における原因たんぱく質の探索

国立精神・神経センター：

1) パーキンソン病およびパーキンソン症候群における原因たんぱく質の探索

2) パーキンソン病等の精神神経疾患に関連する髄液微量たんぱく質の解析

国立長寿医療センター：

痴呆、骨粗鬆症および褥瘡疾患における原因たんぱく質の探索

国立国際医療センター：

- 1) 糖尿病合併症動脈硬化性疾患における原因たんぱく質および疾患マーカーのたんぱく質の探索(1)
- 2) 糖尿病合併症動脈硬化性疾患における原因たんぱく質および疾患マーカーたんぱく質の探索(2)
- 3) 閉塞性肺疾患の原因たんぱく質の探索
国立循環器病センター：
 - 1) 脳動脈閉塞による急性期脳卒中関連たんぱく質の探索
 - 2) 腎血管性高血圧症関連たんぱく質の探索
 - 3) 糖尿病治療前後の動脈硬化関連たんぱく質の探索
 - 4) 冠動脈疾患を有する家族性高コレステロール血症の LDL-アフェレーシス治療施行前後のたんぱく質の探索
 - 5) 急性期心不全関連たんぱく質の探索
 - 6) 高コレステロール血症患者における疾患関連たんぱく質の探索
 - 7) 急性心筋梗塞および類似疾患における疾患関連たんぱく質の探索
 - 8) 心組織における心疾患関連たんぱく質の探索
 - 9) 肺高血圧症関連たんぱく質の探索
 - 10) 周産期心筋症の関連たんぱく質の探索

大阪府立成人病センター：

各種がん疾患における原因たんぱく質および疾患マーカーたんぱく質の探索

大阪大学医学部：

- 1) 運動ニューロン病患者における原因たんぱく質の探索
- 2) 乳がん疾患における原因たんぱく質および疾患マーカーたんぱく質の探索(1)
- 3) 乳がん疾患における原因たんぱく質および疾患マーカーたんぱく質の探索(2)
- 4) 慢性呼吸器疾患(COPD, 間質性肺炎)における原因たんぱく質の探索
- 5) 消化器癌(胃癌、食道癌、大腸癌、肝細胞胆道癌、膵臓癌)の原因たんぱく質および疾患マ-

カーたんぱく質の探索

- 6) びまん性大細胞型リンパ腫のたんぱく質の探索

日本赤十字社：

- 1) ヒト血液および血清成分のたんぱく質の探索(健常人血液試料)

財団法人ヒューマンサイエンス振興財団(HS 財団)ヒト組織バンク：

財団法人ヒューマンサイエンス振興財団(HS 財団)ヒト組織バンクから提供されるヒト各種組織を利用した疾患プロテオーム解析研究

2) 研究協力機関からのヒト試料の受け入れ：

前述の PF 倫理審査委員会で承認された研究課題に関して、平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金(疾患関連たんぱく質解析研究事業)の分担研究報告書および協力研究機関への配布試料(「創薬プロテオームファクトリー(PF)へのヒト試料等の提供について」に基づき(2)、協力研究機関より送付されるヒト試料(臨床情報も含む)の受け入れを開始した。表 1 に各協力機関より送付された検体数の一覧表を示す。これまでに、健常人および各種 26 疾患 532 患者から 730 検体試料(血清、組織等)を受け入れ、解析可能検体をすべて解析した。

表1. 研究協力機関からのヒト試料の受け入れ状況一覧表

(平成20年2月6日現在)

研究協力機関名称	ヒト試料種類	疾患名称	受け入れ状況	
			症例数	検体数
国立成育医療センター	血清	ネフローゼ	28	68
	血清	FSFG	2	7
	血清	IgA腎症	2	2
	血清	膜性増殖性糸球体腎炎	1	1
国立精神・神経センター	血清	パーキンソン病	12	12
	血清	パーキンソン病症候群	10	10
	髄液	パーキンソン病	10	10
国立循環器病センター	血清	脳動脈閉塞による急性期脳卒中	8	16
	血清	腎血管性高血圧	10	20
	血清	糖尿病治療前後の動脈硬化	6	12
	血清	急性期心不全症	20	40
	血清	高コレステロール血症	10	20
	血清	急性心筋梗塞及び類似疾患	11	22
	血清	肺高血圧症	12	18
	血清	周産期心筋症	6	12
国立長寿医療センター	血清	骨粗鬆症	19	19
	血清	認知症	18	18
国立国際医療センター	血清	糖尿病合併動脈硬化症	128	128
	血清	健常人(糖尿病非罹患者)	42	42
	血清	慢性閉塞性肺疾患(COPD)	10	10
大阪府立成人病センター	血清	胃がん	37	65
	組織	胃がん(正常部位、病巣部位)	24	48
大阪大学医学部	血清	筋萎縮性側索硬化症(ALS)	20	20
	組織	乳がん	16	32
	血清	COPD	21	21
	血清	間質性肺炎	5	5
	血清	間質性肺炎 LAM	6	6
	組織	大腸がん	8	16
日本赤十字	血清	健常人	30	30
合 計			532	730
内訳:				
血清			474	624
組織			48	96
髄液			10	10

D. 研究成果2(実験結果および考察).

1) cICAT 法による患者血清たんぱく質の解析研究:

(1) 概要

各研究協力機関から提供された、23 疾患及び日本人健常者の全ての血清(624 検体)について、cICAT 法による高発現血清たんぱく質(上位約 140 種類、累計約 350 種類)の同定と比較定量解析を完了した(一部溶血検体は除く)。その内訳は、糖尿病合併動脈硬化症 128 検体、ネフローゼ等 78 検体、パーキンソン病 12 検体、パーキンソン病様症候群 10 検体、脳動脈閉塞による急性期脳卒中 16 検体、腎血管性高血圧 20 検体、糖尿病治療前後の動脈硬化 12 検体、急性期心不全症 40 検体、高コレステロール血症 20 検体、急性心筋梗塞及び類似疾患 22 検体、肺高血圧症 18 検体、周産期心筋症 12 検体、骨粗鬆症 19 検体、認知症 18 検体、胃がん 65 検体、筋萎縮性側索硬化症(ALS) 20 検体、慢性閉塞性肺疾患 10 検体、COPD 21 検体、間質性肺炎等 11 検体、健常人血清として糖尿病非罹患者 42 検体(国際医療センター提供)およびボランティア健常人血清 30 検体(日本赤十字社提供)である。これらの解析結果は各研究協力機関に開示され、現在、臨床情報との詳細な相関性を検討予定である。また、解析結果と臨床情報は疾患関連たんぱく質データベースに格納した。

(2) 日本人血清と外国人血清の比較

上述の解析結果は、全て外国健常人のプール血清を標準血清(CTS02S)として患者血清と比較検討(患者血清/標準血清)したものである。昨年報告したように、標準血清と日本人健常者 4 名血清との比較では、大部分の血清たんぱく質に関しては大きな差異が認められなかったが、血清の調製法の相違により、血小板由来たんぱく質及び凝固系たんぱく質等の一部に差異が認められた。従って、

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

表 2-1 日本人健常者血清と外国人標準血清との比較

No.	GI#	Description	国際(n=42)		日赤(n=30)		日赤/国際
			Ratio(H/L)		Ratio(H/L)		
			mean	sd(ln)	mean	sd(ln)	
1	8923896	acetyl-CoA synthetase 2 isoform a	N/A	N/A			
2	4501987	afamin precursor; alpha-albumin	1.019	0.149	1.064	0.107	0.957
3	4502027	albumin precursor; PRO0883 protein			N/A	N/A	
4	21071030	alpha 1B-glycoprotein	0.759	0.167	0.875	0.147	0.867
5	4502067	alpha-1-microglobulin/bikunin precursor; Alpha	1.063	0.108	1.116	0.116	0.953
6	4502337	alpha-2-glycoprotein 1, zinc; Alpha-2-glycopro	0.533	N/A	1.000	0.439	0.533
7	4502005	alpha-2-HS-glycoprotein; Alpha-2HS-glycopro	0.955	0.164	1.023	0.178	0.934
8	66932947	alpha-2-macroglobulin precursor	1.022	0.233	1.049	0.285	0.974
9	115583663	alpha-2-plasmin inhibitor	1.204	0.113	1.345	0.117	0.895
10	4502167	amyloid beta A4 protein precursor isoform a; pe	N/A	N/A			
11	4557313	angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5 pre	0.942	0.172	0.982	0.162	0.959
12	7662474	ankyrin repeat domain 26	N/A	N/A			
13	50513243	anthrax toxin receptor 2; capillary morphogene	N/A	N/A			
14	4502149	apolipoprotein A-II precursor	0.986	0.136	0.998	0.148	0.988
15	105990535	apolipoprotein B precursor	1.215	0.272	1.257	0.247	0.967
16	4502161	apolipoprotein C-IV	1.098	0.417	1.188	0.459	0.924
17	4502163	apolipoprotein D precursor	1.052	0.180	1.493	0.198	0.704
18	4557325	apolipoprotein E precursor; apolipoprotein E3	0.928	0.310	1.082	0.193	0.858
19	4502165	apolipoprotein F precursor	0.748	N/A			
20	22091452	apolipoprotein M; NG20-like protein	1.033	0.151	1.057	0.209	0.977
21	28466979	ARHGAP15; uncharacterized bone marrow prot			N/A	N/A	
22	38569405	arylsulfatase B isoform 1 precursor; N-acetylgl	N/A	N/A			
23	93277115	ataxin 7-like 2	N/A	N/A			
24	21450863	attractin isoform 2; attractin-2; mahogany prot	0.899	0.124	0.881	0.119	1.020
25	4501885	beta actin; beta cytoskeletal actin	N/A	N/A	N/A	N/A	
26	13775595	beta tryptase 1 precursor; tryptase II; mast cel	0.904	0.110	0.840	N/A	1.076
27	4557327	beta-2-glycoprotein I precursor	0.981	0.240	1.082	0.149	0.907
28	4757826	beta-2-microglobulin precursor	1.006	N/A	1.025	N/A	0.981
29	41350333	beta-tubulin cofactor D	N/A	N/A			
30	4557373	biotinidase precursor	0.993	0.159	1.049	0.140	0.947
31	4557351	butyrylcholinesterase precursor	0.887	0.200	1.071	0.398	0.828
32	13994280	C1q and tumor necrosis factor related protein	0.708	N/A			
33	4757960	cadherin 1, type 1 preproprotein; cadherin 1, E-	0.842	0.060			
34	118766335	calcium binding protein 39-like	1.095	0.112			
35	42475534	calsyntenin 3; alcadein	0.726	N/A			
36	4503011	carboxypeptidase N, polypeptide 1, 50kD precu	1.009	0.236	1.126	0.176	0.896
37	21071039	carnosinase 1; glutamate carboxypeptidase-like	1.264	0.138			
38	47777317	cartilage acidic protein 1; chondrocyte expres	1.007	N/A	N/A	N/A	
39	40217843	cartilage oligomeric matrix protein precursor; e	1.204	0.222	N/A	N/A	
40	39753970	cathelicidin antimicrobial peptide	0.854	0.281	1.051	0.233	0.813
41	4557417	CD14 antigen precursor	0.877	0.142	0.710	0.290	1.235
42	44662834	CD163 antigen isoform a; macrophage-associat			N/A	N/A	
43	48255935	CD44 antigen isoform 1 precursor; cell surface	1.122	0.316			
44	5174411	CD5 antigen-like (scavenger receptor cysteine	0.978	0.455	0.891	0.197	1.098
45	27894376	cell adhesion molecule with homology to L1CA	0.862	0.203	0.727	0.276	1.185
46	4557485	ceruloplasmin (ferroxidase); Ceruloplasmin	0.720	0.127	0.763	0.136	0.944
47	4557443	cholesteryl ester transfer protein, plasma precu	0.746	0.458	N/A	N/A	
48	24308201	chromosome 20 open reading frame 3; adipocyt	0.801	0.302	0.817	0.223	0.981
49	4758012	clathrin heavy chain 1; clathrin, heavy polypept	N/A	N/A			
50	42716297	clusterin isoform 1; complement-associated pro	0.971	0.109	1.081	0.076	0.899
51	4503635	coagulation factor II precursor; prothrombin	0.855	0.111	0.951	0.083	0.898
52	4503649	coagulation factor IX; Coagulation factor IX (pla	0.954	0.184	0.524	0.146	1.821
53	105990535	coagulation factor V precursor	0.649	0.214	0.746	0.127	0.870
54	4503645	coagulation factor VII precursor isoform a; Coa	1.134	0.256	1.021	0.144	1.110
55	4503625	coagulation factor X precursor; prothrombinase	0.889	0.163	0.860	0.184	1.033
56	145275213	coagulation factor XII precursor	0.850	0.417	0.780	0.448	1.089
57	119395705	coagulation factor XIII A1 subunit precursor	N/A	N/A	0.940	N/A	
58	110611237	coagulation factor XIII B subunit precursor	0.696	0.139	0.726	0.155	0.958
59	42544177	complement component 1 inhibitor precursor	0.811	N/A			
60	73858568	complement component 1 inhibitor precursor	0.963	0.113	0.963	0.127	1.000
61	7705753	complement component 1, q subcomponent, alp	0.939	0.147	0.955	0.088	0.983
62	87298828	complement component 1, q subcomponent, B	0.865	0.128	0.907	0.152	0.953
63	56786155	complement component 1, q subcomponent, ga	0.873	0.129	0.894	0.112	0.977
64	66347875	complement component 1, r subcomponent	0.817	0.147	0.873	0.133	0.936
65	7706083	complement component 1, r subcomponent-like	0.860	0.122	0.922	N/A	0.932
66	4502495	complement component 1, s subcomponent	0.847	0.134	0.890	0.122	0.951
67	14550407	complement component 2 precursor; C3/C5 co	0.789	0.152	0.816	0.102	0.967
68	115298678	complement component 3 precursor	0.690	0.130	0.760	0.098	0.908
69	4502503	complement component 4 binding protein, alpha	0.770	0.139	0.787	0.127	0.979
70	4502505	complement component 4 binding protein, beta	0.837	0.174	0.815	0.140	1.027
71	67190748	complement component 4A preproprotein	0.795	0.239	0.794	0.222	1.001
72	50345296	complement component 4B preproprotein; Chid	0.623	N/A			
73	38016947	complement component 5	0.790	0.159	0.891	0.099	0.887
74	4559406	complement component 6 precursor	0.869	0.118	0.869	0.149	1.000
75	45580688	complement component 7 precursor	1.021	0.168	0.981	0.236	1.040
76	4557389	complement component 8, alpha polypeptide pr	1.188	0.160	1.012	0.189	1.174
77	4557391	complement component 8, beta polypeptide	1.014	0.127	0.902	0.109	1.125
78	4557393	complement component 8, gamma polypeptide	0.850	0.132	0.800	0.139	1.063
79	4502511	complement component 9	0.701	0.263	0.725	0.279	0.967
80	67782358	complement factor B preproprotein	0.681	0.155	0.647	0.230	1.053
81	42544239	complement factor D preproprotein; adipsin; pr	0.926	N/A			
82	62739186	complement factor H isoform a precursor	0.733	0.142	0.760	0.103	0.965
83	62739188	complement factor H isoform b precursor	0.613	N/A			
84	118442835	complement factor H-related 1	1.602	0.324	1.624	0.384	0.987
85	54792787	complement factor H-related 3	1.437	0.221	1.433	0.262	1.003
86	119392081	complement factor I	0.759	0.127	0.807	0.123	0.940
87	28373117	contactin 1 isoform 1 precursor; glycoprotein g	1.674	N/A			
88	32307161	cullin 1	0.672	0.242	0.741	N/A	0.907
89	4503107	cystatin C precursor; cystatin 3; gamma-trace	0.865	0.169	0.833	0.129	1.038
90	6912276	cysteine-rich hydrophobic domain 2; BRX-like	N/A	N/A			
91	5174675	cysteine-rich secretory protein 3; specific gran	0.944	0.260	0.958	0.259	0.985
92	4758146	defensin, alpha 1 preproprotein	1.245	0.363	3.133	0.310	0.397
93	18765694	dipeptidylpeptidase IV; dipeptidylpeptidase IV (1.276	N/A	N/A	N/A	
94	116534900	dopamine beta-hydroxylase precursor	1.256	0.412	1.667	0.309	0.754
95	9665262	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix	0.975	0.134	N/A	N/A	
96	4758232	endothelin converting enzyme-like 1; X conver	0.802	0.019			
97	5729814	Ets2 repressor factor	N/A	N/A			
98	23943902	EVIN1; expressed in activated T/LAK lymphoc			N/A	N/A	
99	4758236	extracellular matrix protein 1 isoform 1 precurs	1.627	0.295	1.713	0.064	0.950
100	13540563	factor H-related protein 5	0.540	0.252	0.608	0.230	0.889

*なお、N/Aはピーク混雑等により比較定量が不能であることを示す。

表 2-2 日本人健常者血清と外国人標準血清との比較

	GI#	Description	国際(n=42)		日赤(n=30)		日赤/国際
			Ratio(H/L)	sd(ln)	Ratio(H/L)	sd(ln)	
101	4503681	Fc fragment of IgG binding protein; IgG Fc bind	1.021	0.236	1.094	0.384	0.933
102	58331240	fetuin B	0.602	0.381	N/A	N/A	
103	70906435	fibrinogen, beta chain preproprotein	0.524	0.495	0.819	N/A	0.639
104	70906437	fibrinogen, gamma chain isoform gamma-A prec	N/A	N/A	N/A	N/A	
105	5730075	fibrinogen-like 2; fibrinogen-like protein 2; fibro	2.485	0.106	N/A	N/A	
106	4503697	fibroblast growth factor 1 (acidic) isoform 1 pre	N/A	N/A	N/A	N/A	
107	16933542	fibronectin 1 isoform 3 preproprotein; cold-insol	1.873	0.206	1.971	0.255	0.950
108	34734062	fibulin 1 isoform O precursor	1.037	0.194	1.121	0.260	0.925
109	116063573	filamin A, alpha	N/A	N/A	N/A	N/A	
110	46409278	FLJ32921 protein	0.661	0.066	N/A	N/A	
111	5031863	galactin 3 binding protein; L3 antigen; Mac-2-b	0.410	0.202	0.556	0.331	0.738
112	4504165	galactin isoform a	1.156	0.135	1.099	0.194	1.052
113	4758460	glycoprotein V (platelet)	N/A	N/A	N/A	N/A	
114	143770756	glycoprotein VI (platelet) isoform 2	N/A	N/A	N/A	N/A	
115	20304127	GS2 like	N/A	N/A	N/A	N/A	
116	5031695	H factor (complement)-like 3; factor H-related	0.469	0.474	0.559	0.633	0.838
117	45580723	haptoglobin-related protein; Haptoglobin-relate	0.362	0.346	N/A	N/A	
118	46371197	heart alpha-kinase	N/A	N/A	N/A	N/A	
119	11321561	hemopexin	0.923	0.078	0.946	0.108	0.976
120	12601257	heparan sulfate proteoglycan 2	1.428	N/A	N/A	N/A	
121	73858566	heparin cofactor II precursor	1.037	0.226	1.109	0.253	0.935
122	4504383	HGF activator preproprotein	1.084	0.151	1.062	0.194	1.021
123	4504489	histidine-rich glycoprotein precursor; histidine-	0.859	0.217	0.925	0.232	0.929
124	4758502	hyaluronan binding protein 2; hyaluronic acid bi	0.893	0.149	0.942	0.088	0.948
125	19923913	hypothetical protein BC008604	N/A	N/A	N/A	N/A	
126	19923899	hypothetical protein BC009518	0.706	0.101	N/A	N/A	
127	8922787	hypothetical protein FLJ10948	N/A	N/A	N/A	N/A	
128	22749319	hypothetical protein FLJ32800	N/A	N/A	N/A	N/A	
129	71999153	hypothetical protein LOC23334	0.795	0.234	N/A	N/A	
130	58218986	hypothetical protein LOC387357	N/A	N/A	N/A	N/A	
131	66730423	hypothetical protein LOC389384	1.063	0.029	N/A	N/A	
132	27735041	hypothetical protein MGC40179	N/A	N/A	N/A	N/A	
133	21489959	immunoglobulin J chain	1.181	0.563	N/A	N/A	
134	99028953	inscuteable isoform a	0.768	0.052	0.777	N/A	0.988
135	110227584	inscuteable isoform b	0.727	N/A	N/A	N/A	
136	11024682	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C); in	N/A	N/A	N/A	N/A	
137	4504609	insulin-like growth factor 2	1.677	N/A	N/A	N/A	
138	55925576	insulin-like growth factor binding protein 2, 36k	1.737	0.658	0.683	N/A	2.543
139	62243068	insulin-like growth factor binding protein 3 isof	1.223	0.193	1.182	0.197	1.034
140	62243290	insulin-like growth factor binding protein 4 prec	0.819	0.286	0.835	0.212	0.980
141	10834982	insulin-like growth factor binding protein 5	N/A	N/A	2.308	N/A	
142	11321593	insulin-like growth factor binding protein 6	1.127	0.245	N/A	N/A	
143	4826772	insulin-like growth factor binding protein, acid	1.066	0.188	1.219	0.167	0.875
144	4504779	integrin, beta 8	N/A	N/A	N/A	N/A	
145	4504781	inter-alpha (globulin) inhibitor H1; inter-alpha (0.957	0.111	1.062	0.115	0.901
146	31542984	inter-alpha (globulin) inhibitor H4 (plasma Kallik	0.876	0.118	0.901	0.117	0.973
147	70778918	inter-alpha globulin inhibitor H2 polypeptide	1.871	0.289	1.673	0.096	1.118
148	4504557	intercellular adhesion molecule 2 precursor	0.938	0.374	N/A	N/A	
149	48526516	ion transporter protein	N/A	N/A	N/A	N/A	
150	54792092	KIAA0431 protein	N/A	N/A	N/A	N/A	
151	4504893	kininogen 1; alpha-2-thiol proteinase inhibitor;	0.874	0.146	0.870	0.113	1.005
152	4557707	L1 cell adhesion molecule isoform 1 precursor;	0.827	0.256	N/A	N/A	
153	54607120	lactotransferrin	N/A	N/A	N/A	N/A	
154	4504951	laminin, beta 1 precursor	N/A	N/A	N/A	N/A	
155	46249412	latent transforming growth factor beta binding	N/A	N/A	N/A	N/A	
156	16418467	leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1; 2310031E	0.454	0.423	N/A	N/A	
157	62912470	leucine-rich repeat-containing G protein-coupl	1.642	0.118	N/A	N/A	
158	31543056	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfam	0.261	N/A	N/A	N/A	
159	116292750	lipoprotein Lp(a) precursor	0.366	1.012	0.774	0.857	0.472
160	132814488	low affinity immunoglobulin gamma Fc region re	0.646	0.267	0.678	0.297	0.952
161	4504965	L-plastin; Lymphocyte cytosolic protein-1 (pla	0.906	0.016	N/A	N/A	
162	4505047	lumican	N/A	N/A	N/A	N/A	
163	112380628	lysosomal-associated membrane protein 1	1.761	N/A	N/A	N/A	
164	4557894	lysozyme precursor	1.025	0.206	1.222	0.217	0.838
165	31543212	macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth f	1.282	0.140	1.337	0.209	0.959
166	21264357	mannan-binding lectin serine protease 1 isoform	1.350	0.185	1.296	0.170	1.041
167	21264359	mannan-binding lectin serine protease 1 isoform	1.243	0.012	N/A	N/A	
168	16418385	mediator of RNA polymerase II transcription su	N/A	N/A	N/A	N/A	
169	4504191	mutS homolog 6; G/T mismatch-binding protei	0.561	N/A	N/A	N/A	
170	9257232	orosomucoid 1 precursor; Orosomucoid-1 (alph	0.657	0.297	0.682	0.229	0.963
171	4505529	orosomucoid 2; alpha-1-acid glycoprotein, type	0.880	0.292	0.661	0.168	1.028
172	4506547	pancreatic ribonuclease precursor; RNase upi-	1.588	0.179	1.466	0.139	1.083
173	19923106	paraoxonase 1; Paraoxonase	1.023	0.315	1.073	0.223	0.953
174	28866955	PBX/knotted 1 homeobox 1 isoform 1; human	N/A	N/A	N/A	N/A	
175	13994151	PDZ and LIM domain 1 (elfin); carboxy termin	N/A	N/A	N/A	N/A	
176	21361845	peptidoglycan recognition protein L precursor	0.897	0.149	0.936	0.157	0.958
177	10863927	peptidylprolyl isomerase A	N/A	N/A	N/A	N/A	
178	31543410	phospholipase A2, group VII; platelet-activating	1.078	0.369	1.664	N/A	0.648
179	4505873	phospholipase D1, phosphatidylcholine-specific;	0.904	0.058	N/A	N/A	
180	126273568	plasma carboxypeptidase B2 isoform a preprop	0.958	0.202	1.046	0.229	0.916
181	4503627	plasma coagulation factor XI precursor isoform	1.015	0.182	0.933	0.225	1.087
182	78191798	plasma kallikrein B1 precursor	0.908	0.127	0.952	0.126	0.954
183	4505881	plasminogen	0.967	0.098	1.006	0.093	0.961
184	74048573	plasminogen-like B1	1.340	N/A	N/A	N/A	
185	4505883	plasminogen-like B2	0.991	0.243	N/A	N/A	
186	4505897	plastin 1; I isoform; Plastin-1	0.906	0.016	N/A	N/A	
187	4505733	platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif) ligo	8.147	N/A	N/A	N/A	
188	47419932	platelet glycoprotein Ib alpha polypeptide precu	1.405	0.103	N/A	N/A	
189	34996489	pleckstrin homology domain interacting protein	0.923	N/A	N/A	N/A	
190	21955172	pleckstrin homology-like domain, family B, mem	0.700	0.391	N/A	N/A	
191	4505937	polymerase (DNA directed), gamma	N/A	N/A	N/A	N/A	
192	4557363	PR domain containing 1, with ZNF domain isof	0.826	0.303	0.953	0.234	0.866
193	93204879	PR domain containing 15 isoform 1	N/A	N/A	N/A	N/A	
194	88985511	PREDICTED: hypothetical protein	N/A	N/A	N/A	N/A	
195	89037239	PREDICTED: hypothetical protein	0.717	N/A	N/A	N/A	
196	113424713	PREDICTED: hypothetical protein	N/A	N/A	N/A	N/A	
197	88971372	PREDICTED: similar to Carboxypeptidase N su	0.944	0.157	0.932	0.121	1.013
198	89057120	PREDICTED: similar to Complement C3 precu	0.567	N/A	N/A	N/A	
199	89068437	PREDICTED: similar to PRAME family member	0.765	0.257	N/A	N/A	
200	4506355	pregnancy-zone protein; Pregnancy zone prote	0.431	1.122	0.543	0.683	0.793

*なお、N/Aはピーク混雑等により比較定量が不能であることを示す。

表 2-3 日本人健常者血清と外国人標準血清との比較

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

*なお、N/Aはピーク混雑等により比較定量が不能であることを示す。

(3) 糖尿病血清たんぱく質の解析

以上のことを考慮して、本報告書では、その一例として、国際医療センターより提供された糖尿病患者を合併症の有無及び種類により群分けした血清と日本人健常者(糖尿病非罹患)血清とを標準血清を介して比較検討した結果を報告する。糖尿病は基準値を超える血糖値等で判定されるが、血糖値が高いが未だ合併症を有さない段階の状態(糖尿病合併症なし群)と、合併症として糖尿病性腎症を有する群(腎症群)、糖尿病性網膜症を有する群(網膜症群)および糖尿病性神経症を有する群(神経症群)に大別される。今回、解析した糖尿病患者血清73検体の内訳は、合併症なし群(A)が42検体、腎症のみ合併した腎症単独群(B)が14検体、網膜症のみ合併した網膜症単独群(C)が10検体、神経症のみ合併した神経症単独群(D)が7例、すべての合併症を発症した全合併症群(F)が11検体であり、また、糖尿病非罹患の日本人健常者血清群(E)は42検体(23 - 61才、男性22名、女性20名)であった(図1)。これらの血清をまず標準血清(CTS02S)と比較解析を行い、得られた健常者血清群と糖尿病各群の各たんぱく質の解析データの統計解析を行った。すなわち、Shapiro-Wilk testで各群が Gauss 分布のものを選択し、次いで、F testで等分散か否かを判定し、それぞれ、t test(等分散)と t test(不等分散)で p value を計算した。

表3に日本人健常者と5%以下の危険率($p < 0.05$)で有意差のある糖尿病各群のたんぱく質の一部を列挙する(赤で表示)。そのうち、健常者(糖尿病非罹患, A)血清と比較して有意差($p < 0.01$)のあるたんぱく質は、合併症なし群では25種類、腎症単独群では10種類、網膜症単独群では19種類、神経症単独群では8種類、全合併症群では20種類であった(表4-1, 4-2)。また、20%以上の差異があるもの(比では >1.20 , <0.833)について注目すると、von Willebrand factor(Gi#89191868)は、健常群(1.000)にくらべると、合併症なし群で1.624 ($p = 8.6 \times 10^{-9}$)腎症単独群(B)で1.582 (p

$= 3.4 \times 10^{-4}$)、網膜症単独群(C)で1.963 ($p = 1.3 \times 10^{-7}$)、神経症単独群(D)で2.114 ($p = 8.5 \times 10^{-7}$)、全合併症群(F)でも1.504 ($p = 3.2 \times 10^{-4}$)と何れも高く、一方、日本赤十字の健常者(18 - 60才、男性15名、女性15名)では0.965(表2)あり、明らかに糖尿病であると高いことが分かった。von Willebrand factor は血流のシェアリングフォースに関与し、動脈血栓の形成に重要な役割を果たしているとされている。比較的高齢者が多い他疾患の骨粗しょう症でも高値(1.97)であることから、年齢或いは動脈硬化進展に関係している可能性が高いが、今後、臨床情報との詳細な相関性を検討することが必要であると思われる。Apolipoprotein D (Gi#4502163), Apolipoprotein M(Gi#22091452)は、合併症なし群(A)、網膜症単独群(C)で低値を示す。また、腎症単独群(B)、神経症単独群(D)および全合併症群(F)でも、有意差検定を $p < 0.05$ の基準で比較すると、Apolipoprotein Mはそれぞれ0.809, 0.751, 0.801と有意な低値を示す。従って、これらのApolipoproteinは糖尿病を発症すると低値を示す傾向があると考えられる。

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

網膜症群単独(C)では、Galectin 3 binding

protein (Gi# 5031863)が1.544 ($p = 3.9 \times 10^{-3}$) 及び EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein (Gi#9665262) が1.408 ($p = 3.1 \times 10^{-3}$)と高値を示す。一方、日赤の健常者では Galectin binding protein は0.738 であり、EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein は測定不能であった(表 2)。これらのたんぱく質は、他の合併症群では有意差が認められないので、網膜症に付随した炎症に関与する可能性も考えられる。神経症単独群 (D) に関しては、Cathelicidin antimicrobial peptide (Gi#39753970)が低値(0.664, $p = 7.5 \times 10^{-3}$)を示す。また、有意差検定を $p < 0.05$ の基準に緩めると、腎症単独群 (B) でも0.697 ($p = 0.012$)と有意差ありの低値を示すが、網膜単独群 (C) では有意差は認められない。一方、最も糖尿病が進行したと考えられる全合併症群 (F) では、pancreatic ribonuclease (Gi# 4506547)が高値(1.768, $p = 0.00021$)を示す。本たんぱく質は網膜症単独群 (C) でも高値(1.376, $p = 0.0075$)を示すが、他の群

では有意差を示さない。また、H factor (complement)-like 3 (Gi# 5031695)は全合併症群 (F)でのみ高値を示す。本たんぱく質は補体主要制御たんぱく質 Factor H の関連たんぱく質であり C3b との結合部位は保持しているが、その機能は殆ど解明されていない。一方、dopamine beta-hydroxylase (Gi# 116534900)も全合併症群 (F)で低値(0.512, $p = 0.0013$)を示す。これらのたんぱく質の変動が糖尿病進展に選択的なのか或いは全身が疲弊したためなのかは、他の疾患での挙動を調べてから判断する必要がある。

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

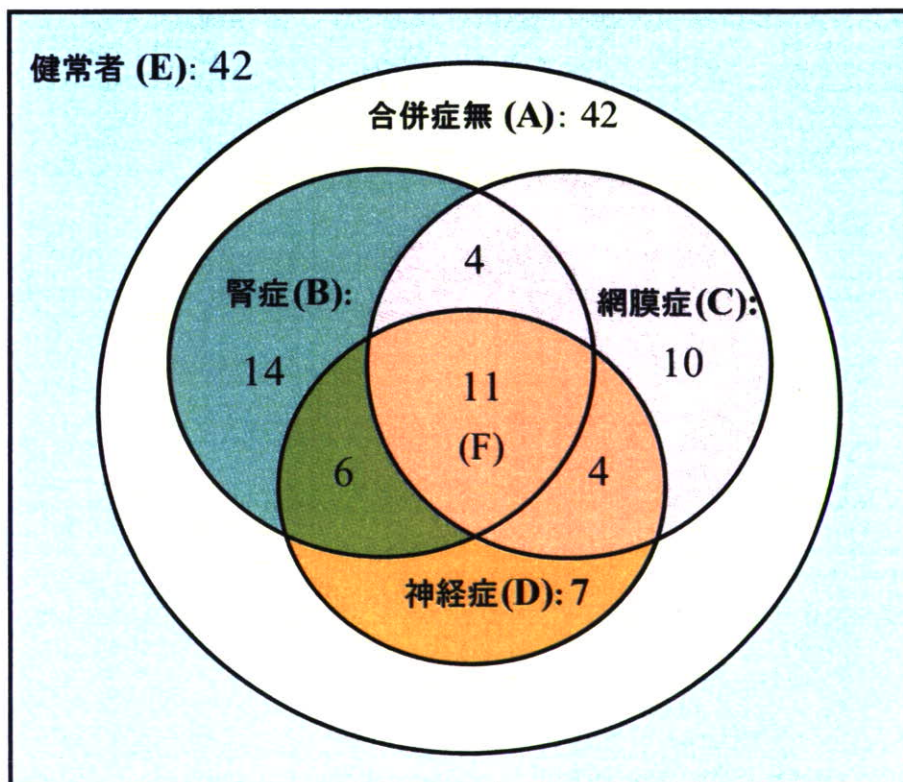


図 1. 糖尿病合併症患者の分類図 (ベン図)

表 3. 健常者と糖尿病患者の比較

Gi#	血清たんぱく質	健常者	合併症無し		腎症単独		網膜症単独		神経症単独		全合併症						
		E	A	t-test (p)	A/E	B	t-test (p)	B/E	C	t-test (p)	C/E	D	t-test (p)	D/E	F	t-test (p)	F/E
gi115583663	alpha-2-plasmin inhibitor	1.204	0.970	3E-10	0.806	1.025	0.01091	0.851	0.923	4E-08	0.767	0.935	3E-06	0.777	0.932	0.0006	0.774
gi38016947	complement component 5	0.790	0.979	3E-09	1.239	0.988	8.6E-06	1.250	1.031	3E-05	1.305	1.005	0.0003	1.272	0.959	0.0004	1.214
gi89191868	von Willebrand factor	0.857	1.391	9E-09	1.624	1.356	1.7E-05	1.582	1.683	1E-07	1.963	1.812	9E-07	2.114	1.288	0.0003	1.504
gi4502149	apolipoprotein A-II precursor	0.986	0.813	3E-07	0.825	0.829	0.00137	0.841	0.763	3E-06	0.774	0.797	0.0734	0.809	0.795	6E-05	0.807
gi4502163	apolipoprotein D precursor	1.052	0.835	3E-07	0.794	0.814	0.00722	0.774	0.804	9E-05	0.764	0.908	0.0632	0.863	0.951	0.1322	0.904
gi62739186	complement factor H isoform a precursor	0.733	0.854	4E-07	1.165	0.884	3.9E-05	1.206	0.878	0.0005	1.197	0.875	1E-05	1.193	0.811	0.0392	1.107
gi22091452	apolipoprotein M; NG20-like protein	1.033	0.830	1E-06	0.803	0.835	4.9E-05	0.809	0.710	4E-08	0.688	0.775	0.0319	0.751	0.827	0.0155	0.801
gi11321561	hemopexin	0.923	1.000	1E-06	1.083	0.993	0.00518	1.076	1.036	0.0004	1.122	0.891	0.4617	0.965	0.992	0.0123	1.075
gi4507557	tetranectin	1.106	0.957	4E-06	0.865	0.916	2.4E-05	0.828	0.884	1E-05	0.799	1.039	0.2422	0.939	0.921	0.0003	0.832
gi5174675	cysteine-rich secretory protein 3; specific	0.944	0.721	4E-06	0.764	0.792	0.03029	0.839	0.702	0.0066	0.743	0.826	0.2073	0.875	0.657	0.0003	0.697
gi119392081	complement factor I	0.759	0.855	2E-05	1.127	0.901	1.4E-05	1.188	0.877	0.0028	1.156	0.797	0.3921	1.051	0.803	0.1795	1.059
gi62243068	insulin-like growth factor binding protein 3	1.223	0.966	0.0001	0.790	0.985	0.00291	0.806	0.881	0.0002	0.721	0.668	4E-06	0.546	0.859	0.0003	0.702
gi115298678	complement component 3 precursor	0.690	0.781	0.0001	1.132	0.796	0.00285	1.153	0.840	0.0001	1.217	0.829	0.0011	1.200	0.701	0.7597	1.016
gi67190748	complement component 4A preproprotein	0.795	0.968	0.0003	1.218	0.852	0.39069	1.072	0.930	0.0635	1.170	0.777	0.899	0.978	0.901	0.109	1.134
gi324683410	vitamin D-binding protein precursor; vitamin	1.043	0.960	0.0003	0.920	0.952	0.00944	0.912	0.945	0.0173	0.906	0.809	3E-05	0.776	0.950	0.0109	0.910
gi4503107	cystatin C precursor; cystatin 3; gamma-t	0.865	1.122	0.0004	1.297	0.959	0.21469	1.108	1.101	0.0241	1.273	1.024	0.078	1.183	1.388	0.0126	1.604
gi45580688	complement component 7 precursor	1.021	1.163	0.0006	1.140	1.135	0.06491	1.111	1.273	0.0011	1.247	1.772	1E-05	1.735	1.312	5E-05	1.286
gi62243290	insulin-like growth factor binding protein 4	0.819	1.100	0.0006	1.343	1.184	0.00407	1.447	1.045	0.04	1.276	0.904	0.4602	1.104	1.532	3E-05	1.871
gi4504165	gelosin isoform a	1.156	1.016	0.0006	0.879	0.877	0.00034	0.759	1.064	0.0907	0.920	1.078	0.2456	0.932	1.082	0.1849	0.936
gi88971372	PREDICTED: similar to Carboxypeptidase	0.944	0.837	0.0008	0.887	0.883	0.20193	0.936	0.810	0.0069	0.858	0.841	0.1107	0.891	0.787	0.0016	0.834
gi4826772	insulin-like growth factor binding protein, a	1.066	0.794	0.001	0.745	1.010	0.60677	0.947	0.877	0.3657	0.822	0.513	0.0935	0.481	0.749	0.0175	0.702
gi4505881	plasminogen	0.967	0.897	0.001	0.928	0.942	0.41777	0.974	0.915	0.1508	0.946	0.898	0.0764	0.928	0.886	0.0994	0.916
gi9685262	EGF-containing fibulin-like extracellular m	0.975	1.440	0.0012	1.477	1.185	0.15909	1.216	1.372	0.0031	1.408	4.748	NA	4.872	1.495	0.0272	1.534
gi4758236	extracellular matrix protein 1 isoform 1 pre	1.627	1.219	0.0013	0.749	1.010	0.00064	0.621	1.111	0.0087	0.683	1.310	0.548	0.805	1.121	0.0098	0.689
gi47419932	platelet glycoprotein Ib alpha polypeptide p	1.405	1.799	0.0015	1.281	1.556	0.32968	1.107	1.663	NA	1.184	2.128	NA	1.515	1.974	NA	NA
gi14550407	complement component 2 precursor; C3/C	0.789	0.874	0.0021	1.108	0.965	2E-07	1.223	0.874	0.0883	1.108	0.977	0.001	1.238	0.925	0.0028	1.172
gi21450863	attractin isoform 2; attractin-2; mahogany	0.899	0.975	0.0026	1.085	1.000	0.01436	1.113	1.005	0.0167	1.118	1.074	0.0007	1.195	0.897	0.9658	0.998
gi4557485	ceruloplasmin (ferroxidase); Ceruloplasmin	0.720	0.788	0.003	1.094	0.806	0.01589	1.120	0.800	0.0324	1.110	0.836	0.0123	1.161	0.816	0.0041	1.134
gi4758146	defensin, alpha 1 preproprotein	1.245	1.736	0.0039	1.394	1.283	0.84436	1.030	1.219	0.9024	0.979	1.903	NA	1.528	1.208	0.8761	0.970
gi4507725	transferrin; prealbumin	1.242	1.061	0.0053	0.854	1.117	0.22417	0.899	0.951	0.0088	0.785	0.824	0.1521	0.664	1.125	0.2812	0.905
gi4557389	complement component 8, alpha polypeptid	1.188	1.071	0.0062	0.901	1.102	0.34721	0.928	1.016	0.0097	0.856	1.052	0.0742	0.886	1.009	0.0061	0.850
gi16418467	leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1; 23100	0.454	0.719	0.007	1.585	0.645	0.10275	1.420	0.702	0.0436	1.546	N/A	NA	NA	1.554	NA	0.514
gi4502511	complement component 9	0.701	0.826	0.0076	1.178	0.711	0.88683	1.014	0.809	0.1804	1.154	0.821	0.1813	1.171	0.872	0.0158	1.244
gi4557327	beta-2-glycoprotein I precursor	0.981	1.109	0.0082	1.130	1.066	0.25725	1.086	1.142	0.0623	1.164	0.980	0.9859	0.998	1.201	0.0161	1.224
gi4559406	Complement component 6 precursor	0.869	0.940	0.0089	1.082	0.864	0.8856	0.994	0.907	0.3475	1.044	0.852	0.7106	0.981	0.918	0.1728	1.056
gi4557373	biotinidase precursor	0.993	0.902	0.0093	0.909	0.992	0.98604	0.999	0.856	0.0172	0.863	0.908	0.2079	0.914	0.867	0.026	0.873
gi21071030	alpha 1B-glycoprotein	0.759	0.827	0.0121	1.089	0.850	0.02435	1.120	0.849	0.0618	1.119	0.837	0.1546	1.104	0.831	0.0923	1.096
gi66347875	complement component 1, r subcomponent	0.817	0.878	0.0155	1.075	0.912	0.01467	1.117	0.844	0.5299	1.033	0.818	0.9717	1.002	0.875	0.1471	1.071
gi14525213	coagulation factor XII precursor	0.850	0.685	0.0172	0.806	0.708	0.16037	0.833	0.685	0.1307	0.806	0.648	0.1152	0.763	0.718	0.2098	0.844
gi24308201	chromosome 20 open reading frame 3; adig	0.801	0.989	0.0186	1.235	1.006	0.0589	1.256	1.026	0.0574	1.281	1.170	0.0217	1.460	1.084	0.0046	1.353
gi87298828	complement component 1, q subcomponent	0.865	0.926	0.019	1.071	0.953	0.01914	1.102	0.967	0.0235	1.118	0.903	0.419	1.045	0.933	0.1003	1.079
gi67782358	complement factor B preproprotein	0.681	0.742	0.0193	1.090	0.810	0.0013	1.189	0.709	0.4883	1.041	0.736	0.5081	1.081	0.625	0.1289	0.918
gi116534900	dopamine beta-hydroxylase precursor	1.256	0.888	0.0207	0.707	0.932	0.17781	0.742	0.798	0.0361	0.636	1.004	0.4069	0.799	0.644	0.0013	0.512
gi4502261	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, cl	0.989	0.920	0.0211	0.931	0.931	0.14646	0.942	0.904	0.0595	0.914	0.830	0.1295	0.840	0.924	0.106	0.934
gi39753970	cathelicidin antimicrobial peptide	0.854	0.696	0.0214	0.814	0.595	0.012	0.696	0.859	0.9758	1.005	0.567	0.0075	0.864	0.785	0.6091	0.919
gi4502495	complement component 1, s subcomponent	0.847	0.901	0.0229	1.065	0.930	0.02549	1.098	0.890	0.301	1.051	0.854	0.8817	1.008	0.894	0.2129	1.055
gi70906435	fibrinogen, beta chain preproprotein	0.524	1.397	0.0232	2.669	1.214	0.17396	2.319	1.811	NA	3.459	N/A	NA	NA	NA	NA	NA
gi4503635	coagulation factor II precursor; prothrombi	0.855	0.805	0.0232	0.942	0.798	0.08099	0.934	0.771	0.0133	0.903	0.703	0.0013	0.822	0.677	0.0001	0.793
gi4504781	inter-alpha (globulin) inhibitor H1; inter-alf	0.957	0.902	0.0237	0.943	0.908	0.14176	0.949	0.844	0.1189	0.882	0.858	0.3829	0.897	0.859	0.0082	0.898
gi34734062	fibulin 1 isoform C precursor	1.037	1.160	0.03	1.118	0.957	0.19458	0.922	1.276	0.0027	1.230	1.312	0.3284	1.265	1.401	6E-05	1.351
gi4503681	Fc fragment of IgG binding protein; IgG Fc	1.021	1.259	0.0461	1.234	1.211	0.08343	1.187	1.258	0.1026	1.233	1.284	0.2813	1.258	1.518	0.0097	1.488
gi88853069	vitronectin precursor	0.942	0.887	0.0489	0.942	1.008	0.31568	1.071	0.868	0.0635	0.922	0.886	0.5712	0.941	0.780	0.0478	0.828
gi31542984	inter-alpha (globulin) inhibitor H4 (plasma	0.876	0.924	0.0509	1.055	0.865	0.73091	0.987	0.896	0.6245	1.023	0.865	0.8016	0.987	0.917	0.256	1.046
gi4503649	coagulation factor IX; Coagulation factor D	0.954	1.034	0.0593	1.083	1.065	0.12789	1.116	0.982	0.7409	1.029	0.921	0.7094	0.965	0.985	0.7122	1.032
gi4505643	procollagen C-endopeptidase enhancer; pr	0.879	1.088	0.0606	1.238	0.983	0.30886	1.118	1.266	0.3125	1.440	0.808	0.5156	0.919	1.129	0.0613	1.284
gi19923106	paraoxonase 1; Paraoxonase	1.023	0.882	0.061	0.862	0.792	0.02936	0.775	0.806	0.0825	0.788	0.784	0.0884	0.766			

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	attractin 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	1.408	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	attractin 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)である。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する。

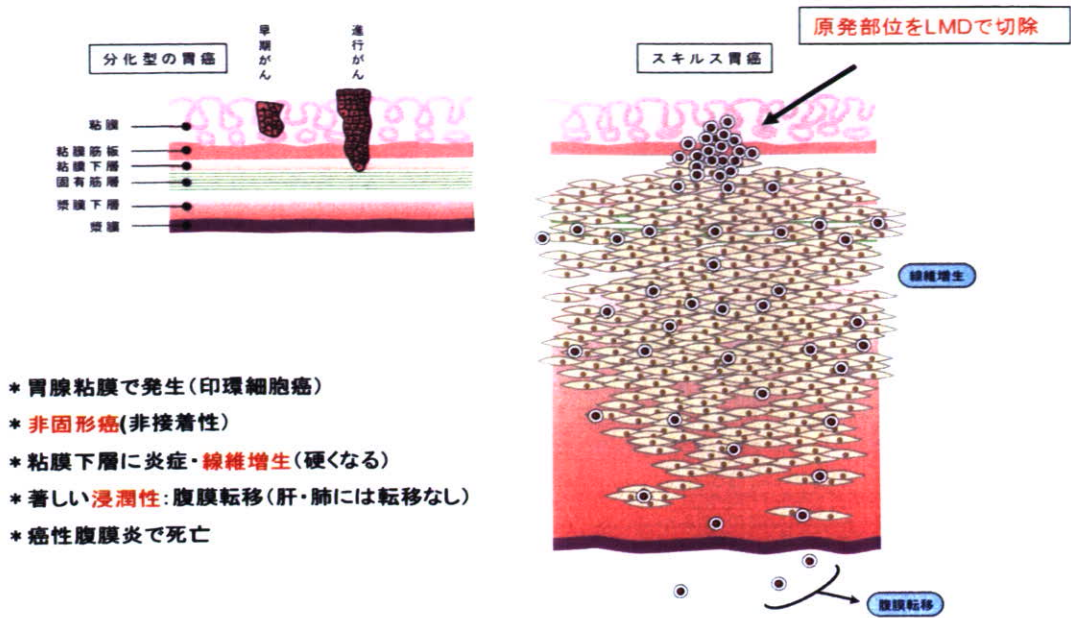
(2) cICAT 法によるスキルス胃がんたんぱく質の解析研究

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 割と治癒率(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、骨髓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、通常の分化型腺がん、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る。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る (10)。しかし、これらの培養樹立細胞株は、in vitro 培養に適應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る。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。

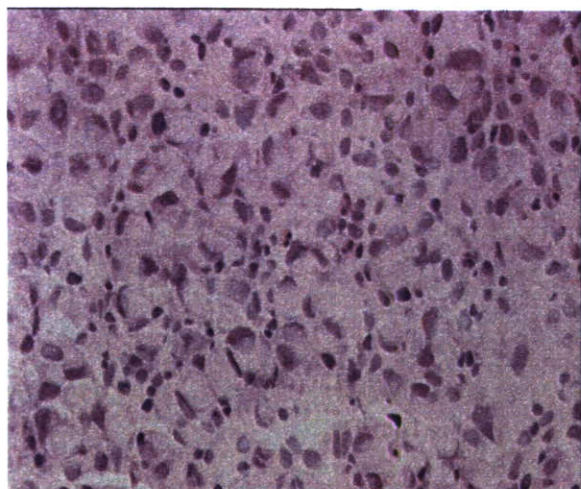
* LMD による部位特異的分取

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、スキルス胃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

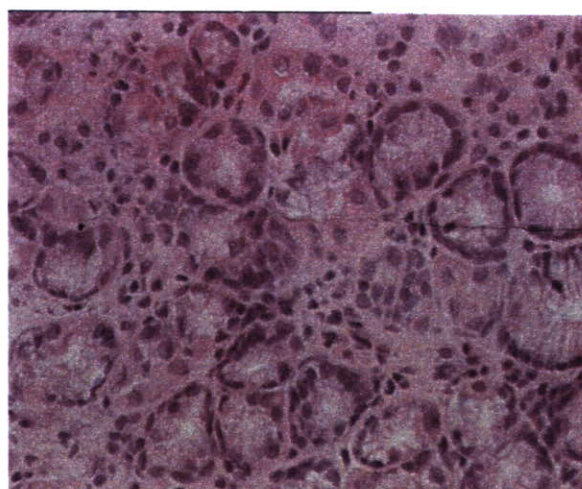
切片ともに免疫・血液系の細胞浸潤は殆ど認められない。なお、LMD で部位特異的な分取が不可能

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. スキルス胃がん患者 (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がんの解析

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、各胃がん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。得られた各種胃がん患者毎のデータを、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、スキルス胃がんの解析について報告する。図 4 には、スキルス型胃がん患者第 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。

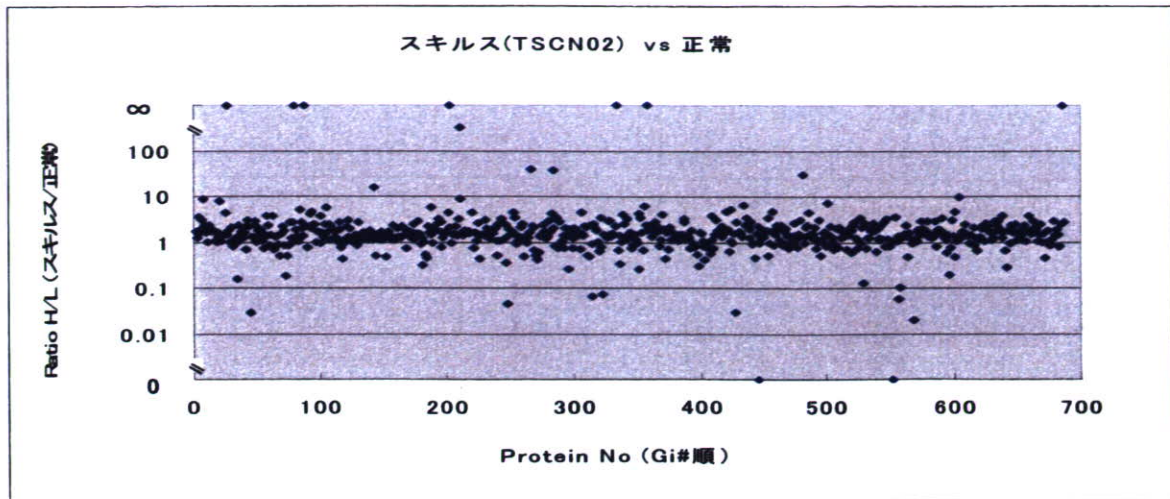


図4. スキルスがん患者第1症例(TSCN02)でのがん部位と正常部位のたんぱく質の発現比較(H/L)

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は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る。

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						スキルス#2 (実験1) 727種類							
順位	Protein ID	Score	Description	HitCys	ICAT	Ratio	順位	Protein ID	Score	Description	HitCys	ICAT	Ratio
1	gi 9966889	60	CD177, polycythemia rubra vera 1	2	HEAVY	*	1	gi 4502095	76	CD13,membrane alanine aminopeptidas	2	HEAVY	24.5
2	gi 4503549	36	elastase 2, neutrophil, medullasin	1	HEAVY	*	2	gi 40354192	75	keratin 10; cytokeratin 10	1	HEAVY	7.2
3	gi 32313593	41	olfactomedin 4 precursor; differenti	1	HEAVY	333	3	gi 21614544	58	S100 calcium-binding protein A8	1	LIGHT	6.7
4	gi 40807482	60	LPLUNC1 protein precursor; von E	1	HEAVY	39	4	gi 4504549	85	tenascin C (hexabrachion); Hexabrachio	7	HEAVY	6.5
5	gi 4758146	77	defensin, alpha 1 preproprotein, m	2	HEAVY	30	5	gi 5730075	26	fibrinogen-like 2, fibrinogen-like protein 2	1	HEAVY	6.0
6	gi 21614544	59	S100 calcium-binding protein A8, c	1	HEAVY	16	6	gi 11386171	45	carcinoembryonic antigen-related cell ad	1	LIGHT	5.7
7	gi 5730075	32	fibrinogen-like 2, fibrinogen-like pro	1	HEAVY	9.9	7	gi 4557759	64	myeloperoxidase	2	HEAVY	5.5
8	gi 10863909	51	serine protease inhibitor, Kunitz typ	2	HEAVY	9.2	8	gi 4503595	115	eosinophil peroxidase	4	HEAVY	4.6
9	gi 32454741	27	serine (or cysteine) proteinase inhit	1	HEAVY	8.9	9	gi 4502877	50	claudin 4; Clostridium perfringens entero	2	HEAVY	4.5
10	gi 11386171	49	carcinoembryonic antigen-related 4	1	HEAVY	8.2	10	gi 4505059	108	tumor-associated calcium signal transdu	3	HEAVY	4.4
11	gi 4758910	36	prostaglandin E synthase isoform 1	1	HEAVY	7.3	11	gi 4503549	43	elastase 2, neutrophil, medullasin	1	HEAVY	4.1
12	gi 4507895	73	vimentin	1	HEAVY	6.4	12	gi 4557886	113	integrin beta chain, beta 2 precursor; Inte	5	HEAVY	3.8
13	gi 4504411	45	major histocompatibility complex, c	1	HEAVY	6.3	13	gi 4502403	45	biglycan preproprotein; bone/cartilage pr	1	HEAVY	3.8
14	gi 28872753	105	dual oxidase 2 precursor; dual oxid	4	HEAVY	6.0	14	gi 4758146	71	defensin, alpha 1 preproprotein, myeloid	2	HEAVY	3.5
15	gi 19923315	50	serine hydroxymethyltransferase 2	2	HEAVY	5.9	15	gi 4502573	43	caspase 1 isoform beta precursor; interk	1	HEAVY	3.1
16	gi 4507555	29	thymopoietin	1	HEAVY	5.4	16	gi 34734062	83	fibulin 1 isoform C precursor	4	HEAVY	3.0
17	gi 17402875	84	alpha 2 type VI collagen isoform 2C	2	HEAVY	5.4	17	gi 5174485	44	mannose receptor, C type 2; endocytic re	1	HEAVY	2.9
18	gi 4557886	28	integrin beta chain, beta 2 precursc	1	HEAVY	4.8	18	gi 4758686	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

スキルス胃がんでは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、スキルス胃がんでは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い(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(E+1)	スキルス#1 TSCN02(E+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	乳がん#1 TSCN03	乳がん#2 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	gi4759140 defensin, alpha 1	14	30	3.5	0.2	1.06	N/A	3.0	4.3	0.2	2.0
2	gi9964889 CD177, polycythemia rubra vera 1; cell surf	33	*	ND	ND	ND	ND	4.3	ND	ND	ND
3	gi4563595 eosinophil peroxidase	5.3	1.4	5.5	0.1	0.03	0.02	0.2	0.33	ND	ND
4	gi1460269 transmembrane protease, serine 2	5.0	N/A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	gi11296171 carcinoembryonic antigen-related cell adhe	5.6	8.2	5.7	0.5	ND	ND	1.8	ND	ND	ND
6	gi322312593 olfactomedin 4 precursor	*	333	ND	ND	0.35	ND	72	38	1.6	ND
7	gi4557739 myeloperoxidase	21	N/A	5.5	0.1	1.4	ND	0.9	ND	ND	ND
8	gi4552549 elastase 2, neutrophil	*	*	4.1	0.2	2.3	2.1	4.2	ND	ND	ND
9	gi4509059 tumor-associated calcium signal transducer	5.0	4.0	4.4	ND	4.1	4.1	4.5	2.1	3.0	0.78
10	gi3245471 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	gi24797089 MHC, class II, DQ beta 1	*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7	ND	ND
12	gi47100969 CD33 antigen-like 3	*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	gi4502295 CD13, membrane alanine aminopeptidase	ND	ND	2.4	ND	ND	ND	2.5	ND	ND	ND
14	gi40807482 LPLUNC1 protein precursor	ND	39	0.2	0.06	0.09	ND	1.0	ND	ND	ND
15	gi21914594 S100 calcium-binding protein A8	ND	16	5.7	0.2	0.94	2.5	1.9	3.7	ND	ND
16	gi2726975 fibrinogen-like 2, fibroblastin	ND	9.9	5.0	ND	1.23	ND	0.2	ND	ND	ND
17	gi4504549 annexin G (traxalaphen)	ND	*	5.5	ND	4.4	ND	ND	ND	3.8	6.4
18	gi10863909 serine protease inhibitor, Kunitz type, 2	ND	9.2	ND	ND	ND	5	2.0	ND	ND	7.8
19	gi4758910 prostaglandin E synthase isoform 1	ND	7.3	ND	ND	5.5	ND	ND	ND	0.3	ND
20	gi4507895 vimentin	ND	6.4	0.7	2.3	ND	0.48	0.4	0.61	0.9	ND
21	gi4504411 MHC, class II, DR beta 1	ND	6.3	ND	1.0	0.36	0.48	6.3	0.63	ND	1.3
22	gi28872753 dual oxidase 2 precursor	ND	6.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
23	gi19823315 serine hydroxymethyltransferase 2	ND	5.9	1.2	ND	ND	2.1	ND	1.4	ND	ND
24	gi4507505 thymopoietin	ND	5.4	ND	ND	ND	2.2	ND	2.2	ND	ND
25	gi17402875 alpha 2 type VI collagen isoform 2C2	ND	5.4	2.1	3.0	ND	ND	0.3	ND	0.3	ND
26	gi4557888 CD18, integrin beta chain	2.0	4.8	3.8	0.9	ND	ND	ND	ND	1.37	ND
27	gi4507467 transforming growth factor, 68kDa	ND	4.7	2.6	5.3	4.4	0.19	0.18	1.01	0.45	ND
28	gi11761831 fibrinogen, beta chain	1.8	4.6	1.9	0.6	ND	ND	1.23	ND	1.03	ND
29	gi4503715 fibrinogen, gamma chain	1.8	4.0	1.6	0.75	ND	ND	0.97	ND	0.72	ND
30	gi4502877 claudin 4	ND	ND	4.5	ND	3.3	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る。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・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、ピ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る。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、特異的なたんぱく質を見出すことが望まれる。

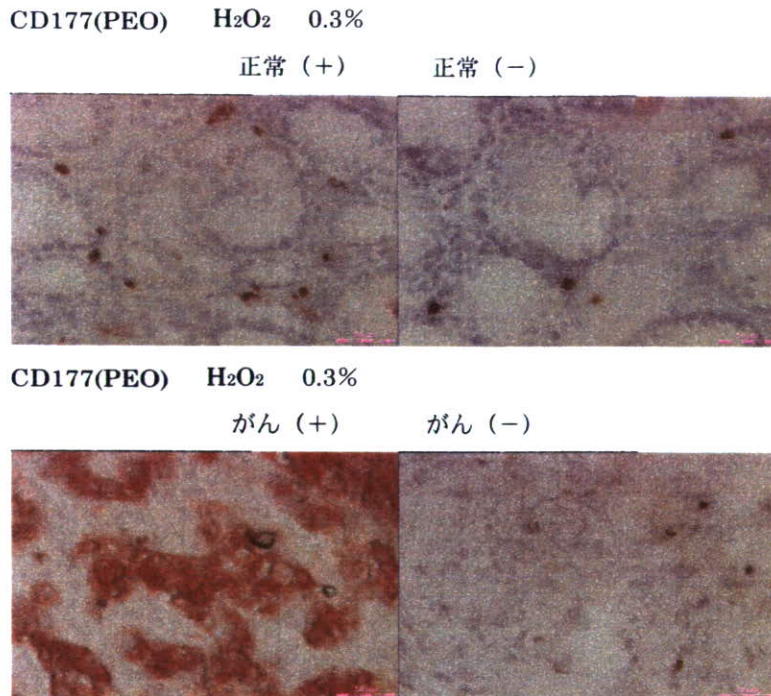


図 5. CD177 モノクロナル抗体を用いたスキルス胃がん組織及び正常組織の免疫染色法による解析

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。

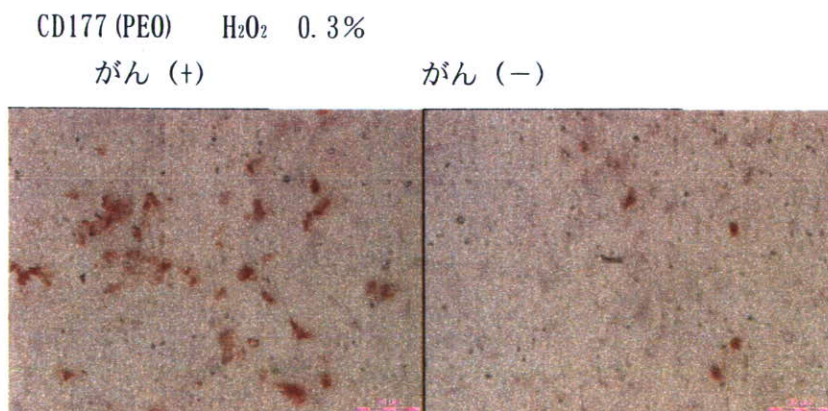


図 6. CD177 のモノクロナル抗体を用いた免疫染色法による中分化型胃がん患者の正常胃組織部位とがん部位解析結果。

(+)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) を示す。

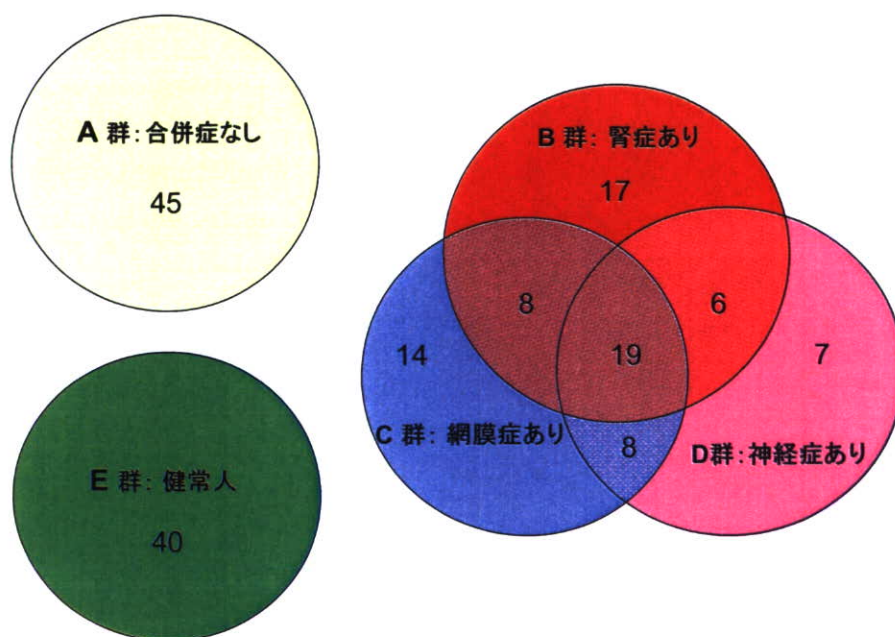


図 7 . 糖尿病患者の合併症の分類 (ベン図)

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す。

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		36.7%	30.0%
8707.2	30.0%	32.7%	25.0%
17284.6		36.7%	30.0%
17474.1	22.0%	30.6%	25.0%
17601.1		32.7%	25.0%
IMAC30	30.0%		
8898.9		40.8%	30.0%
8933.1	24.0%	40.8%	30.0%
8949.1		40.8%	30.0%
	22.0%		
	30.0%		
	30.0%		
	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に示す。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