

200709001B

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

## 疾患関連たんぱく質解析研究

平成15年度～平成19年度 総合研究報告書

主任研究者 山西 弘一

平成20(2008)年4月

# 目 次

I. 総合研究報告書		
疾患関連たんぱく質に関する研究	.....	1
山西 弘一		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	.....	26
III. 研究成果の刊行物・別刷	.....	64

## 疾患関連たんぱく質解析に関する研究

主任研究者 山西 弘一 独立行政法人医薬基盤研究所長

### 研究要旨

本研究は、我が国における五大疾患(がん、糖尿病、高血圧、認知症、免疫疾患【自己免疫疾患、アレルギー・炎症】)について、健常人と患者との間のたんぱく質発現の変動を質的・量的に評価することで、発現変動しているたんぱく質(疾患関連たんぱく質)を探索し、この中から医薬品シーズ・創薬ターゲット・疾患マーカーとなる『疾患の発症や悪化、治療に関わるたんぱく質』を同定すること、またそのための基盤技術を開発することを目指したものであり、同時に、『疾患の発症や悪化、治療に関わるたんぱく質』を有効活用し、画期的創薬、医療技術開発に資する研究基盤を開発しようとするものである。本目的達成のため、疾患関連たんぱく質の探索・同定、データベースの構築等を実施することを通じて疾患と関連性のある因子について病態との関連性を評価するとともに、疾患関連たんぱく質の有効活用技術の確立等について検討を行った。

また、バイオインフォマテクスによる疾患関連たんぱく質解析結果および研究協力機関から提供された個人情報体系的な蓄積と特異的なたんぱく質の相互性を示す統合データベースの構築等を行い、以下の知見・情報を得た。

- ① 血清糖たんぱく質の糖鎖解析法を確立するとともに、疾患関連たんぱく質の機能解析基盤として微量の複数抗原に対しても、迅速かつ網羅的にモノクローナル抗体を創出できる基盤技術を確立した。また疾患関連たんぱく質の有効活用基盤として、たんぱく質・ペプチドを細胞内へ効率よく送達できる薬物送達キャリアの創出技術を開発した。(山西)
- ② 心不全、高血圧症、脳血管疾患、高脂血症をはじめとする9種循環器疾患について、重篤時・軽快時、処置・投薬等の前後など同一患者の異なる時期に血液を採取し、創薬プロテオームファクトリー施設にて解析した。心疾患については剖検例の組織についても採取した。約半数の試料の解析が終了し、臨床データとの比較解析を進めると共に、2次試料によってより有効なデータを得るために、対象患者や採血時期などの検討を行った。(友池)
- ③ 循環器疾患及びその原因となるメタボリックシンドロームに関連する新規生理活性ペプチドを発見するために、生体組織より抽出・精製した生理活性ペプチドを用いて、高感度生物活性検出法で解析を行い、同定した生理活性ペプチドについて、その生理的・病態生理的意義に関する検討を行った。(寒川)
- ④ 疾患関連たんぱく質やペプチドを発見するため、2次元高速液体クロマトグラフィーと質量分析計の組み合わせ、高感度のペプチド、たんぱく質消化物の解析システムを構築した。組織や細胞由来のペプチドに適用した結果、意味のある結果が集積されはじめ、同定ペプチド群より新たな生理

活性ペプチドを発見できた。また、血漿からのペプチド調製法を作成し、解析対象とできることを示した。(南野)

- ⑤ 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。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、並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、UCH-L1 の欠損マウス等を用いた研究を行った。(高坂)
- ⑥ 糖尿病関連たんぱく質データベース構築、バイオマーカー発見を目的として、糖尿病患者由来血清及び尿をプロテオーム解析した。糖尿病患者で健常者と比較して変動した血清たんぱく質で、1.5倍以上変動したのは von Willebrand factor のみであった。尿では、早期腎症合併で増加するたんぱく質 24 個、減少するたんぱく質 10 個を同定した。今後、iTRAQ 法での多数例の再解析、糖尿病患者尿たんぱく質プロファイルの追跡調査が必要だと考えた。(鍋木)
- ⑦ 小児難治性腎疾患に関連するバイオマーカーを探索・同定するために、小児ネフローゼ症候群の患者から採取した血清を用いてプロテオーム解析を行った。発症期、治療期、寛解期の病態と関連して変動する因子についてバイオインフォマティクス解析を行ったところ、Zinc-alpha2-glycoprotein (ZAG)が病態と関連して変動し、さらに患者血清を用いてウエスタンブロット法にて ZAG の発現量解析にて、血中の脂質と相関して変動していることが明らかとなった。(田上)
- ⑧ 認知症や骨粗鬆症などの加齢関連疾患のバイオマーカーの検索と新しい治療法の開発に資するべく、これらの疾患における臨床試料の提供体制を整備・確立した。また、微量タンパク質の分析体制を整備し、臨床試料、動物レベルおよび細胞レベルで、認知症に関連するタンパク質の同定とその解析、また、様々な生理活性物質の作用機序及び骨代謝調節因子や骨粗鬆症治療薬等の作用点について解析した。(太田)
- ⑨ 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。(佐古田)
- ⑩ 質量分析法を用いた生体内蛋白質・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、質量分析にかかわる分析手法やハードウェアの開発、並びに、データを確度よく解析するためのソフトウェアの試作を行い、尿たんぱく質・ペプチドのプロテオームデータベースの構築、そして、種々のがん患者尿より疾患マーカー候補の探索を行った。(高尾)
- ⑪ 糖鎖はたんぱく質や脂質に付加され(糖たんぱく質、糖脂質)、受精、発生、免疫などの様々な生命機能に関与する。また、近年、糖鎖が、細菌、ウイルスなどの感染や、筋ジストロフィーなど種々の疾患にも関与することが明らかとなってきているとともに、糖鎖を標的にした医薬品開発(タミフルなど)も盛んに行われている。癌との関わりでは、細胞は癌化の過程で糖たんぱく質や糖脂質に付加される糖鎖構造が変化し(糖鎖の癌性変化)、変化した糖鎖の一部が転移や浸潤などに関与すると考えられている。そこでまず、糖鎖の中でも癌との関わりが強く示唆されている糖脂質と、糖

たんぱく質の中のN型糖鎖に注目し、それらの微量構造解析法を確立した。それらの技術を用いて、癌細胞と正常上皮細胞の糖鎖構造を解析、比較検討し、糖鎖の癌性変化を詳細に解析し、そのメカニズムの解明を目指した。(今岡)

⑫ 未解決の疾患の病態解析、診断、治療法、予防法を解明するためには、患者と健常人試料(組織・血清等)のたんぱく質の種類・量の違いを網羅的に解明することが重要である。本研究では、最新の質量分析(MS)装置及びバイオインフォマティクスを駆使するプロテオーム解析法を用いて、疾患の特異的原因たんぱく質および疾患マーカーたんぱく質の探索・同定を行い、病態・治療に伴う変化を反映する疾患関連たんぱく質データベースを構築した。(金子)

## 分担研究者

友池仁暢	国立循環器病センター病 院長	太田壽城	国立成育医療センター研究所病 院長
寒川賢治	国立循環器病センター研究所 所長	佐古田三郎	大阪大学大学院医学研究科 教授
南野直人	国立循環器病センター研究所 薬理部 部長	高尾敏文	大阪大学蛋白質研究所 教授
高坂新一	国立精神・神経センター神経研究所 所長	今岡真義	大阪府立成人病センター 総長
鍋木康志	国立国際医療センター研究所 代謝疾患研究部病態代謝研究室 室長	金子 勲	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
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		

## A. 研究目的

平成 15 年度の報告書等でも指摘しているように、医薬品開発に際して、創薬ターゲットや医薬品シーズ、疾患マーカーとなる疾患関連たんぱく質の発見とその知的財産権の確保は、今後の医薬品産業の発展に必要不可欠であり、ライフラインと位置付けられる。従って、近年ますます激化しつつある新薬開発や新規治療技術の創出において、欧米諸国等との国際競争に打ち勝つためには、疾患関連たんぱく質の発見とその知的財産権の確保に向けた作業を加速させることが重要となってきた。そのためには、タンパク 3000 プ

ロジェクトなどのように、たんぱく質全般の基本構造と機能との関連を解析する「たんぱく質からのアプローチ」に加え、患者と健常者との間のたんぱく質の質、量の違いを時空間的に評価する「疾患からのアプローチ」により、創薬ターゲットや医薬品シーズ、疾患マーカーを同定することが急務となっている。

このような疾患プロテオミクス研究に基づいた創薬(プロテオーム創薬)への期待と注目が国際的・学際的に集約されてきた背景として、ゲノムシーケンス研究から判明した約 2 万 2 千種の遺伝子に比して、膨大とも言える 10 万種以上に

ものぼるたんぱく質、特に解析困難であった巨大分子量のたんぱく質に対しても、高性能質量分析機器の開発および「cICAT法」、「ショットガン法」などの網羅性の高い新規開発などにより大規模かつ包括的なハイスループット解析が可能となり、「疾患からのアプローチ」が昨今の技術革新により現実的になったことが挙げられる。事実、スイスやドイツ、米国などの欧米諸国は、この「疾患からのアプローチ(疾患プロテオミクス)」に国家プロジェクトとして、大量の予算を投入し、今まさに着手し始めている。

以上の我が国にとって重要かつ深刻な状況を鑑み、我が国としても、高血圧、糖尿病、がん、痴呆症、炎症性・アレルギー性免疫疾患などを対象として、新規治療薬・診断薬の開発や新規医療技術・治療法の確立などに必須となる疾患関連たんぱく質の網羅的探索と同定、これらのデータベース化を行うと共に、これらたんぱく質を有効活用できる基盤技術の開発研究を産官学連携により推し進め、国際競争力に満ち溢れた画期的な医薬開発を支援し、日本における製薬企業などの振興・発展を図ることが最重要となる。

以上の背景のもと、本研究は、我が国の主要疾患などに関して、患者と健常人との間の発現たんぱく質の変動を、質的、量的、時空間的に評価することにより、疾患関連たんぱく質の探索と、得られた情報をもとに創薬基盤データベースを構築するものである。また、探索されてきた数多くの疾患関連たんぱく質群の中から医薬品シーズ・創薬ターゲット・疾患マーカーとなり得るたんぱく質を絞り込み、これらを新規医薬品の創出等に有効活用していくための基盤技術を確立し、我が国独自の知的財産を創出しようとするものである。本研究の成果は、我が国の創薬研究に係る基盤的な技術レベルを飛躍的に向上させるため、遺伝子解析では欧米に出遅れたものの、日本の医薬品産業の国際競争力を強化し、我が国はもとより、世界の患者に質の高い医療を提供するものと考えられる。

以上の観点から本研究では、疾患関連たんぱく質解析研究を総合的に推進していくため、疾患組織・細胞などの臨床検体から、疾患関連たんぱく質の探索・同定と、その中から医薬品シーズ・創薬ターゲットとなり得るたんぱく質の絞り込みを効果的かつ効率的に行うための研究基盤に加え、医薬品シーズ・創薬ターゲットとなり得るたんぱく質の有効活用法に関する研究を行い、疾患の予防・治療・診断方法の確立や画期的医薬品の開発に資することを目指し、以下の研究を行った。

## B. 研究方法

### B-1. 疾患関連たんぱく質の糖鎖修飾解析と医薬品化に向けた基盤技術の開発

#### 1) 疾患関連糖たんぱく質糖鎖解析技術

糖たんぱく質から酵素的に糖鎖を遊離させ、もしくはトリプシン等で分解して糖ペプチドを調製し、LC/MS<sup>n</sup>を行った。

#### 2) 疾患関連たんぱく質の有効活用技術

細胞内移行性ペプチドとして知られる TAT 中のアルギニン以外のアミノ酸をランダム置換したペプチドを発現するファージライブラリを構築した。セルパニングにより細胞に親和性の高いクローンを濃縮し、その後蛋白合成阻害因子とペプチドの融合体に組み替え、細胞傷害性の高いクローンをクローンをスクリーニングした。一方、非免疫マウス由来の一本鎖化 Fv(scFv)抗体を網羅的に発現するファージ抗体ライブラリを構築した。そして、2D-DIGE 解析により同定し、ゲル溶解法により回収したたんぱく質をニトロセルロース膜に固相化した。本固相化たんぱく質を抗原としてファージ抗体ライブラリのパニングを行い、特異的抗体クローンのスクリーニングを行った。

### B-2. 高血圧、心循環器系疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立

○個人差を最小化して量的比較、変動が観測されるようにするため、同一患者より時期を変えて

複数回、試料を採取した。

- 同意の取得から試料の採取、処理、保管に至るマニュアルを作成し、均一に実施した。
- 数値化困難なものを含め、対象疾患毎に臨床パラメータを均一、広範に収集した。
- 創薬プロテオームファクトリー施設(「PF」という。)への資料提供を行った。
- 2段階の研究とし、1次試料の解析結果に基づき対象等を絞り込んで2次試料を収集、解析し、有意な結果が得られるように努めた。(倫理面への配慮)

当センターの内部委員会での検討、承認後、倫理委員会に申請、承認を得て実施した。同意の取得、個人情報の管理、関連指針に十分に注意して、検体や情報の取得を行った。

### B-3. 疾患関連たんぱく質解析研究の一環としてのエネルギー代謝調節に関する生理活性ペプチドの探索

生体内に存在する極微量の生理活性ペプチドの探索として、ゲル濾過、イオン交換 HPLC、逆相 HPLC により精製し、高感度生物活性検出法を用いてスクリーニングを行い、単離・同定した。さらに、脂肪細胞培養系(3T3-L1 細胞)を用い、3T3-L1 細胞が分化誘導剤により前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞に分化する特性を利用し、より効率的かつ広範な脂肪細胞機能を制御する生理活性ペプチド探索系を確立するための検討を行った。

(倫理面への配慮)

研究計画は当センターの倫理委員会で承認を受け、血液試料は研究協力者に十分な説明を行い、同意を得て採取した。

### B-4. 高血圧、心循環器系疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立

- 開発してきたペプチドーム解析法を改良し、微量ペプチド、たんぱく質消化物を網羅的に分離、構造解析できるシステムを構築した。
- 組織、細胞、血液などの試料を対象に、方法の

妥当性を確認すると共に解析データを収集した。

- 解析に適したペプチド、たんぱく質試料の調製法を作成した。
- ペプチドの構造解析情報、臨床情報などに基づき、疾患マーカー、バイオマーカーなどの探索を行った。

(倫理面への配慮)

研究計画は当センターの倫理委員会で承認を受け、血液試料は研究協力者に十分な説明を行い、同意を得て採取した。

### B-5. 痴呆等の精神・神経疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立

#### 1) 神経変性疾患(パーキンソン病等)の研究試料の確保

研究試料については、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)患者の血漿、髄液等を確保し、創薬プロテオームファクトリー施設(「PF」という。)への試料提供を行った。

#### 2) モデル動物の解析、創薬標的分子開発に関する研究

脱ユビキチン化酵素 UCH-L1 及びその類縁分子 UCH-L3 の欠損マウスの表現型の検討、神経細胞死のメカニズムの検討、in silico drug screening を検討し、創薬標的分子の同定を試みた。

(倫理面での配慮)

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について、国立精神・神経センター倫理委員会にて承認された。

### B-6. 糖尿病等代謝性疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立に関する研究

糖尿病患者 124 名及び健康人 42 名から血清を採取して、PF への試料提供を行うとともに、cICAT 法を用いて定量解析した。糖尿病患者 55 名、健康人 15 名から尿を採取して、2D-DIGE にて尿蛋白プロファイルを解析し、LC-MS/MS にて蛋白を同定

した。ヒト型結核菌特異的ペプチド抗原にて刺激した結核患者由来血漿蛋白を 2D-DIGE、LC-MS/MSにて解析した。

(倫理面での配慮)

本計画は、国立国際医療センター倫理委員会にて承認を受けた上で実施した。

#### B-7. 小児免疫・アレルギー疾患関連たんぱく質関連因子の探索並びに微量たんぱく質解析技術の確立

ネフローゼ症候群の発症時、治療期、寛解期の患者より血清を採取し、PFへの試料提供を行うとともに、cICAT法を用いてプロテオーム解析を行い、バイオインフォマテックス解析にて病因または病態と関連する因子の探索を行った。さらに同定された因子と疾患との生物・医学的関連性を解明するため、患者血清や動物モデルを用いて解析を行い、関連性が証明された因子については測定方法(定性、定量法)の開発を行った。

(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・解析等遵守した。

#### B-8. 加齢関連疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立

PFへの加齢疾患関連試料の提供を行うとともに、微量たんぱく質解析システムを確立し、認知症の脳脊髄液及び剖検脳、シナプスタンパク質の解析を試みた。さらに、様々な生理活性物質の作用機序及び骨代謝調節因子や骨粗鬆症治療薬等の作用点について検討した。

(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、当院倫理委員会及びPF倫理委員会の承認を得た。

#### B-9. 疾患関連たんぱく質解析に関する研究

乳癌、消化器癌の組織、閉塞性肺疾患、運動ニューロン病の血清について、感染症検査を行う。組織については、切片を作成し、腫瘍組織と正常部分を分別して蛋白を抽出した。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した。

(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。

#### B-10. 疾患関連たんぱく質解析のための質量分析法の確立

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)、SpectrumCAL(図1)を、配列データベース検索による蛋白質同定は市販の検索エンジン“MASCOT”を用いた。MASCOTの検索結果は、同定確度の向上を目的に開発した経験的フラグメンテーションモデルに基づくスペクトル検証ソフトウェア“*FragPattern*”により検証した後に、データベースの構築を行った。

尿(10~20mL)から塩や色素等を除いた後、限外ろ過膜を用いてたんぱく質画分(10kDa~)とペプチド画分を単離し、ペプチド画分は、内径1mmの強陽イオン交換担体カラム(14分画)→内径75μmの逆相担体カラム(96分画)により分離後、MALDI-MS/MSによりペプチドの網羅的同定を行った。たんぱく質画分は予め酵素消化を行い、上記と同じイオン交換クロマトグラフィー(82分画)→ナノLC/ESI-MS/MSにより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。量変動解析、及び、定量解析は、安定同位体  $^{18}\text{O}$  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/ $^{18}\text{O}$  標識ペプチド)をもとに行った。同位体ピーク強度比の算出は、ピークフィッティング法により正確に求めることのできるソフトウェア“*Isotopica*”を用いて行った。

#### B-11. 大腸癌のN型糖鎖及び酸性糖脂質の構造解析

大腸癌患者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高純度に抽出した。それらの細胞からN型糖鎖と糖脂質の糖鎖部分を切り出し、糖鎖部分を2-アミノピリジンで蛍光標識し(PA化)、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、糖鎖構造を同定した。

(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おり、本倫理規定に従って、検体の採取、解析などを実施した。

#### B-12. 同位体標識法(cICAT)による各種疾患患者の試料(血清・組織)のたんぱく質発現解析研究

試料(血清・組織)より単離したたんぱく質を、主として、同位体標識法(cICAT法)および nanoLC/QSTAR XL system で解析し、患者及び健常人試料中のたんぱく質の同定とその比較定量値(患者/健常)を測定した。得られた結果及び臨床データを統合データベースに格納し、疾患関連データベースを作成した。スループット性の高い

prOTOF/SELDI-Plate system を用いて患者血清及び健常人血清のたんぱく質の相違を解析した。また、バイオインフォマティクス法を用いて、これらの結果及び臨床データを連結させた疾患関連たんぱく質データベースを構築し、さらに、近い将来必要となる一般公開に対応可能なデータベースシステムの構築を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究内容は、PF 倫理審査委員会において承認を得ており、本倫理規定に従って実施した。

### C. 研究結果

#### C-1. 疾患関連たんぱく質の糖鎖修飾解析と医薬品化に向けた基盤技術の開発

##### 1) 疾患関連糖たんぱく質糖鎖解析技術

同位体標識法と LC/MS を用いて、コントロール及び検体に由来する糖たんぱく質の糖鎖を比較定量する方法を開発した。本分析法を用いて、自己免疫性疾患モデルマウスの腎臓における糖鎖の変化を調べたところ、疾患モデルマウスでは低分子量の糖鎖の割合が増加していたことから、糖鎖生成・代謝過程に変化が生じている可能性が示唆された。また、血清に存在する主な糖たんぱく質の糖鎖のパターンを簡便に解析する方法として、血清をトリプシン処理した後、LC/MS を用いて解析する方法を新規に開発した。

##### 2) 疾患関連たんぱく質の有効活用技術

細胞内へ医薬品シーズたんぱく質・ペプチドを効率よく送達しうる技術の確立のため、ファージライブラリ技術を駆使することにより、細胞内移行性に優れた新規ペプチド性キャリアの創製を試みた。構築したファージライブラリを用いてセルパンニングを行い、ペプチド-たんぱく合成阻害因子融合体によりスクリーニングを行った結果、TAT よりも細胞内移行性に約 3 倍優れたペプチドを同定することができた。したがって、細胞内へたんぱく質・ペプチドを送達するためのペプチド性キャリア創製技術として本方法が有用であることが明らかとなった。一方、マウス由来非

非免疫ファージライブラリを構築し、本ライブラリとメンブランを抗原固相化担体として用いる独自の抗体創製法を確立した。本方法では、0.5ngという微量たんぱく質抗原があれば、約2週間という短期間でモノクローナル抗体を取得可能であることが明らかとなった。さらに、2D-DIGE解析により同定回収された疾患関連たんぱく質を抗原として用い、上記抗体創製法を適用することにより、同定されたすべての疾患関連たんぱく質候補に対するモノクローナル抗体を創製することが可能となった。

## C-2. 高血圧、心循環器系疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立

疾患関連たんぱく質解析研究の計画全体の理念と当センター実施に関する基本方針について倫理委員会の承認を受けた後、その指示に従いPFとMTAを締結した。提案課題より疾患プロテオーム解析に適すると考えられる高血圧症、心不全、心筋梗塞、脳卒中をはじめとする10種の循環器系疾患を選択、研究計画を作成し、倫理委員会の承認を得て実施した。

対象試料は血液9課題、組織1課題で、採血は重篤時・軽快時2点の比較解析を基本とし、処置の前後、薬剤の長期投与の前後なども採用した。血液は血清と血漿でたんぱく質、ペプチドの分子型に大きな変動が予測されるため、6課題では血清と血漿を採取した。同意の取得から血液試料などの採取、処理、保管、提供については厳密にマニュアルを作成し、それに従い実施した。

血液試料については、9課題全ての患者1次試料をPFに送付し、1課題のみ健常者試料の送付数が予定を下回った。また、採取検体が不可避免的に血漿となる課題では、本研究期間中にはプロテオームファクトリー施設で解析できないことになったため、試料の返却を受けて当センター内で解析を開始した。残り8課題中5課題については解析結果が返却され、これらについては詳細な臨床データを提供した。心不全については検討後2次

試料を採取し、提供した。

解析データと臨床情報との比較、解析については、プロテオーム解析情報の提供形式が悪くまだ十分な解析できていない。脳梗塞患者の急性期と慢性期の比較では、多くの血中たんぱく質の変動が確認されたが、一部は特定の治療薬の投与前後での変化、生体反応(各種凝固・線溶系因子の変動など)をとらえていると推定された。症状悪化や改善などの臨床経過や病型、病態に特異な変動も含まれている可能性があるが、今回の限定された症例数と解析データだけでは、これ以上の解析は困難であった。

糖尿病患者を対象に有酸素運動を主とした運動療法を3ヶ月間行い、その前後での血清たんぱく質の比較を行った。全ての症例で共通した変動を示したたんぱく質はなかったが、ある程度の症例で1.5倍以上の上昇が認められたたんぱく質が見出された。このたんぱく質は生理的な変動で増減することが知られていたが、最近の報告では肥満などとも関連する可能性も示唆されており、運動と本たんぱく質分子の関連、さらに病態生理的意義が注目された。

遺伝的背景のない高コレステロール血症10例に対して、スタチンの服用開始前、服用開始3ヶ月後に採血を行い、臨床化学検査とプロテオーム解析を行った。リポ蛋白を構成する主要なたんぱく質であるアポリポたんぱく質を例にとると、アポリポたんぱく質Bは臨床化学検査でも、プロテオーム解析においても有意の低下を認めることができた。その他のアポリポたんぱく質は、臨床化学検査においてもプロテオーム解析においても変動を認めず、既知のたんぱく質の変動をプロテオーム解析にて正確に評価できることが検証された。今後、未知のバイオマーカーとなるたんぱく質の探索やその機能解析に向けて検討を進めたい。

急性心筋梗塞の急性期と慢性期に採血を行い、本疾患の病態と関連する特異的なたんぱく質の変動はないか検討した。多数のたんぱく質に本疾

患の病期に応じた変動が確認されたが、確認症例数が10例と少なく心筋梗塞部位や梗塞サイズ、合併症の有無、併用薬剤の違いなど治療法にも違いがあり、今回観測されたたんぱく質の変動の意味を解析することは現状では困難と思われた。今後、疾患発症の病態と治療法なども考慮して症例を集め、たんぱく質解析を実施する必要性が認識された。

心不全の急性増悪のために緊急入院した患者を対象に、治療前後に変化するたんぱく質を探索した。虚血性心疾患、重篤な弁膜疾患を持つ患者を除いた未治療の患者を対象とし、治療内容については制約を設けなかった。10名の1次試料のプロテオーム解析結果より、補体関連たんぱく質、ホルモン結合たんぱく質などが変化する可能性が示された。これらを確認し、より広範に臨床情報とたんぱく質情報を比較・検討するため、重症度の高い心不全患者を含む10名の2次試料採取までを行い、現在解析中である。

基礎的実験として、高中性脂肪血症を呈するWHHLウサギのTGHラインと対照のTGLラインの肝臓組織を採取し、二次元電気泳動、イメージスキャナー、MALDI-TOF-MS/MSを用いて解析し、TGHに多量に発現しTGLにほとんど発現を認めないたんぱく質、TGLに多量に発現しTGHに発現を認めないたんぱく質などを同定し、高中性脂肪血症の病因を知り、動脈硬化発症、進展のメカニズムを探る今後の研究基盤が形成できた。

### C-3. 疾患関連たんぱく質解析研究の一環としてのエネルギー代謝調節に関与する生理活性ペプチドの探索

#### 1) 内因性グレリン(ghrelin)の多様な分子型の解析

グレリンに特異的な2種類のラジオイムノアッセイ(RIA)法およびGHS-R発現細胞を用いた細胞内Ca<sup>2+</sup>イオン濃度測定により、胃組織および血漿中に存在する内因性グレリン分子型の検討を行った結果、胃組織および血漿中に多種類のグレリ

ン関連分子が存在した。主要分子型である28残基のオクタノイル化されたoctanoyl ghrelin(C8:0)以外に、グレリンと同等の活性を有する関連分子として脂肪酸修飾の異なるdecanoyl ghrelin(C10:0)、decanoyl ghrelin(C10:1)、C-末端のArgの欠落した27残基のoctanoyl ghrelin[1-27]、decanoyl ghrelin[1-27]を見出し、また、非活性型であるdes-acyl ghrelinおよびdes-acyl ghrelin[1-27]も同定した。これらの分子型は、グレリンの翻訳後修飾により生成したものであり、グレリンの複雑な生成機序を反映している。このような多種類のグレリン分子の存在は、グレリンのこれまで知られていない新たな生理機能や分泌調節機序に関与する可能性が示唆され、今後、様々な病態における内因性グレリンの分子型の解明が重要と考えられた。

#### 2) 新規生理活性ペプチドneuromedin S(NMS)の発見

摂食・エネルギー代謝調節において重要な役割を果たす生理活性ペプチドであるneruromedin U(NMU)の受容体として知られるFM-4/TGR-1発現細胞を用いた細胞内Ca<sup>2+</sup>イオン濃度測定によって、ラット脳抽出物よりNMUとは異なる新たな活性を見出した。この活性を精製・構造解析した結果、36アミノ酸残基からなる新規生理活性ペプチドであるneruromedin S(NMS)を発見した。NMSについての組織分布をリアルタイムPCRで解析した結果、中枢神経系、脾臓、精巣で強いmRNAの発現が認められた。特に、視床下部での発現が顕著であったことから、脳内分布を*in situ*ハイブリダイゼーション法にて解析した結果、視交叉上核で特異的な発現が認められた。また、その生理機能として、概日リズムの発振機構や摂食調節において重要な機能を担っていることを明らかにした。

#### 3) 脂肪細胞機能を制御する新規生理活性ペプチドの探索

循環器疾患の原因となるメタボリックシンドロームの病態基盤である脂肪細胞に注目し、脂肪細胞機能を制御する新規生理活性ペプチドを発

見するため、培養脂肪細胞系を用いた探索を行った結果、ブタ脳より neuropeptide Y(NPY),  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone( $\alpha$ -MSH)を、ラット小腸より peptide YY(PYY), gastric inhibitory polypeptide(GIP)を、ラット脂肪組織より pituitary adenylate cyclase activating polypeptide38 (PACAP38)を単離・同定した。NPY, PYY 及び  $\alpha$ -MSH は中枢性の摂食調節因子として、また、GIP と PACAP は膵 $\beta$ 細胞からのインスリン分泌を促進する因子として生体のエネルギー代謝調節に関与することが報告されている。脂肪細胞を標的とする探索によりこれらの生理活性ペプチドを同定した結果から、生体内において、脳、腸、膵臓及び脂肪組織を軸とした、生理活性ペプチドを介したエネルギー代謝調節システムが存在する可能性が示唆され、本研究で用いた手法が、エネルギー代謝調節に関わる生理活性ペプチドの探索において有用であることが確認された。3T3-L1 細胞は、培養の過程において、分化誘導剤の添加により前駆脂肪細胞から脂肪脂肪滴を有する成熟脂肪細胞に分化する。今回同定した NPY や PYY は、脂肪細胞の分化過程において異なる強さの活性を示すことが明らかとなり、その活性の強さは NPY や PYY に対して異なる親和性を持つ Y 受容体の発現パターンと一致していた。また、Y 受容体が前駆脂肪細胞の時期に強い発現が認められたことより、NPY や PYY が脂肪細胞の増殖・分化に関連する生理活性ペプチドであることが示唆された。以上の結果より、様々な分化段階の 3T3-L1 細胞を標的としてアッセイすることで、効率的で広範な生理活性ペプチドの同定が可能であり、また、同定した生理活性ペプチドの脂肪細胞における機能の推定に役立つことが明らかとなった。今後、本研究にて確立した手法を用いて脂肪細胞に作用する生理活性ペプチドの探索を進めることにより、メタボリックシンドロームの発症基盤としての肥満及び脂肪細胞機能に関連する新規生理活性ペプチドの発見や、脂肪細胞の分化・増殖の制御に関連する新たな医薬品開発が

期待できる。

#### C-4. 高血圧、心循環器系疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立

これまでのペプチドーム解析研究では、脳組織のペプチドを酵素消化なしに直接解析、データベースすることを目的とし、比較的量的なペプチド混合物を解析対象としてきた。本研究では患者血液、組織などの限定的試料より多くのペプチド、たんぱく質を同定する必要があるため、それを念頭に分離システムを構築した。分離法としては陽イオン交換液体クロマトグラフィー (IEX-LC) 後に逆相 RP-LC を行う 2 次元 LC 法が最も効率的であった。1 次元目は 10% アセトニトリル存在下でのギ酸アンモニウム (pH3.8) グラジエント溶出、2 次元目はアセトニトリルグラジエントによるキャピラリー RP-LC とし、流速、濃度などの至適化を行った。分子量 6K Da 程度までを対象とするペプチドーム解析と、還元アルキル化後のトリプシン消化物を解析するプロテオーム解析では電荷数、疎水性などの物性が大きく異なるため、3K Da、3-6K Da の生体ペプチド、トリプシン消化ペプチドの 3 種に分け、分離条件を設定した。

1 次元目の IEX-LC の分画数が多い場合は、以前に作成したリニア自動化 LC システムが有利であり、試料が豊富な場合は分離能力、ペプチド同定数で優れた結果が得られた。しかし、微量化に向け 2 次元目にナノ RP-LC が採用され、試料量の減少から IEX-LC 分画数を減少させた結果、自動化 LC システムはマイナス面が増加した。最終的には 1 次元 IEX-LC で 10-20 画分に分離後、各画分を個別に 2 次元ナノ RP-LC で分離する系が汎用され、この系で分離条件を至適化した。

検出、構造解析に使用する質量分析計として、当初は ABI 4700, Micromass Q-ToF II を使用した。上記の分離系とこれらの機器でペプチド解析を行った場合、生体内ペプチドでは pmol、トリプシン消化ペプチドで sub-pmol の実行解析感度であった。18 年度に当センターに ABI 4800, FT 検

出系を装備した Orbitrap 質量分析計が導入され、解析感度や範囲、質量精度などが大きく向上した。その結果、実行解析感度が fmol レベルに向上し、さらに Esi 法では 10,000Da 近い領域まで構造解析が可能となり、ペプチド総体をそのまま同定するという目標に近づくことができ、Top-down proteomics が現実化した。周辺ソフトウェアの向上により、さらに多くの構造解析情報が入手可能である。

上記システムを検証、活用するため、脳、心房組織のペプチドーム解析を行った。脳ではタキキニン類、心房では ANP などの豊富な生理活性ペプチドは内在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、多量の細胞骨格や代謝系たんぱく質などから抽出過程で生成する分解ペプチドに凌駕され、検出できなかった。そこで、抽出を省き高品質のペプチドを解析するため、ペプチド産生細胞株の培養上清中のペプチド、たんぱく質を解析した。培養上清を濃縮後、ゲル濾過にてペプチドとたんぱく質に分離し、還元アルキル化後、ペプチド画分、たんぱく画分トリプシン消化物を一次元 nano LC で分離、解析した。重複を省き約 250 のペプチドを同定できたが、主体は当該細胞が産生するペプチドホルモンと前駆体由来ペプチドであった。他の大部分は、グラニン類や既知のペプチド前駆体由来のペプチドであった。たんぱく画分には多種多様な分泌たんぱく質が観測された。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、大部分は構造決定済みペプチドや関連ペプチドで、微量ペプチドの同定数はあまり増加しなかった。

同定ペプチド群に、同一前駆体由来する 2 種の C 末端アミド化ペプチドが見出され、その配列はラット、マウスで保存されていた。特異抗体を作製して検討した結果、これらは視床下部の室傍核、視索上核に高濃度存在し、細胞上清と同じ分子型で存在していた。また、絶水負荷により遺伝子発現は著増し、生体内でバソプレシン分泌を抑制する内在性因子であることが確認され、

NERTP-1, 2 と命名した。

血液のペプチド解析より、血液中には超微量のペプチドしか存在せず、それを同定できればバイオマーカーとして有用性が高いと考えられた。しかし、血液には凝固、線溶、補体系などのたんぱく分解酵素が存在し、ペプチド解析には不向きであり、凍結融解だけでもペプチドの様相は大きく変化する。これらの変化を抑制して試料を調製する方法を作出し、現在調製法の安定性や解析の可否を検討している。ペプチド解析には多量の血漿を必要とするため、実験者によらない簡便かつ迅速な処理装置の作成が必要と考えられた。

## C-5. 痴呆等の精神・神経疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立

### 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る「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 PF 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 PF に提供した。

血漿たんぱく質での iCAT 法による解析で、220 種類が同定されたが、神経特異的なたんぱく質は少なく、低発現たんぱく質の検出をめざすか、より神経の病態を反映すると考えられる髄液を用いるかが必要であった。そこで、パーキンソン病患者の連結不可能匿名化された髄液を用いて、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 種類のたんぱく質を同定でき、そのうち 94 種が血漿たんぱく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。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。iTRAQ 法と 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たんぱく質のうち、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。検出された髄液たんぱく質の内容としては、神経栄養因子、神経発生に関わる転写因子、神経接着分子、アミロイド関係たんぱく質など、神経特異的と考えられるたんぱく質が多数同定できた。

## 2) モデル動物の解析、創薬標的分子開発に関する研究

ヒトのパーキンソン病で見いだされている変異発現するトランスジェニックマウス (193M UCH-L1Tg マウス) は、神経病理学的に黒質 TH 陽性ニューロンの脱落と線条体ドーパミン含量の低下を示し、このマウスがよりパーキンソン病発症と密接に関連していることが明らかになった。UCH-L1 近縁分子である UCH-L3 は、UCH-L1 より凝集性に富み、網膜では視細胞に局限した発現を示すこと、また UCH-L3 欠損マウスに認められる視細胞死は、ミトコンドリアの形態変化を伴い、アポトーシス非依存的な神経細胞死であることを明らかにした。また結晶体に関する 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に入手し、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。

## C-6. 糖尿病等代謝性疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立に関する研究

### ○糖尿病患者血清での cICAT 法による解析

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蛋白の定量解析を行った。血清中の高発現の 100 前後の蛋白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以下に列挙した。

- 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 倍以上の変動をしていたのは 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。

### ○糖尿病患者尿での 2D-DIGE 法による解析

採取した尿を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、2D-DIGE にてゲル当たり約 2000 個のたんぱく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 名から尿たんぱくを精製し、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尿の比較では、有意に増加する蛋白スポットは 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。

#### ○結核バイオマーカー候補分子の探索

ヒト型結核菌特異的ペプチド抗原 (ESAT-6, CFP-10, TB7.7) にて刺激した結核患者と対照健常者から採取した血漿から主要たんぱく質 14 種を除去後、20kD 以上の蛋白を 2D-DIGE と LC-MS/MS にて解析し、結核患者における結核抗原特異的に発現するたんぱく質を検索した。主要血漿たんぱく質 14 種類について、アフィニティースピнкаラムを用いてほぼ完全に除去できることを SDS-PAGE にて確認し、5kD、10kD 以下の低分子たんぱく質を限外濾過にて分別、また高分子たんぱく質は 2D-DIGE にて解析するために電気泳動や濃縮法に関して条件検討を行った。

#### ○ヒト肝細胞由来細胞株での分泌蛋白プロファイルの解析

ヒト肝細胞由来細胞株 HepG2 の培養上清に含ま

れる分泌たんぱく質を試料として、多次元液体クロマトグラフィー及び LC-MS/MS を組み合わせた解析系を用いて、86 個のたんぱく質を同定した。そのうち 10 個は HepG2 の分泌たんぱく質としては未報告であった。また、脂質代謝を制御して高脂血症や動脈硬化症などに深く関与する LXR のアゴニスト (T0901317) を HepG2 細胞の培養液に添加し、培養上清中のたんぱく質について 2 次元電気泳動を用いたディファレンシャル解析 (2D-DIGE) を行った。その結果、T0901317 による刺激によって有意に増加した全てのスポットが apolipoprotein E (apoE) として同定された。apoE は幅広い pI レンジと分子量にわたって複数のスポットとして点在していることも併せて確認され、このうちの一部は 2 次元電気泳動ゲルの ProQ Emerald 染色によって、糖鎖の修飾を受けていることが推定された。これより、LXR は肝臓からのいくつかの分泌たんぱく質の誘導を促し、他の臓器においても遠隔的に脂質代謝の調節を行う可能性が示唆された。

#### C-7. 小児免疫・アレルギー疾患関連たんぱく質関連因子の探索並びに微量たんぱく質解析技術の確立

小児腎疾患 33 名の患者より、78 検体の採取を行った。これらの検体の中でネフローゼ症候群に関する検体について、発症期 (ステロイド治療-、たんぱく尿+)、寛解期 (ステロイド治療+、たんぱく尿-)、寛解期 (ステロイド治療-、たんぱく尿-) の血清についてプロテオーム解析を行った (図 1)。

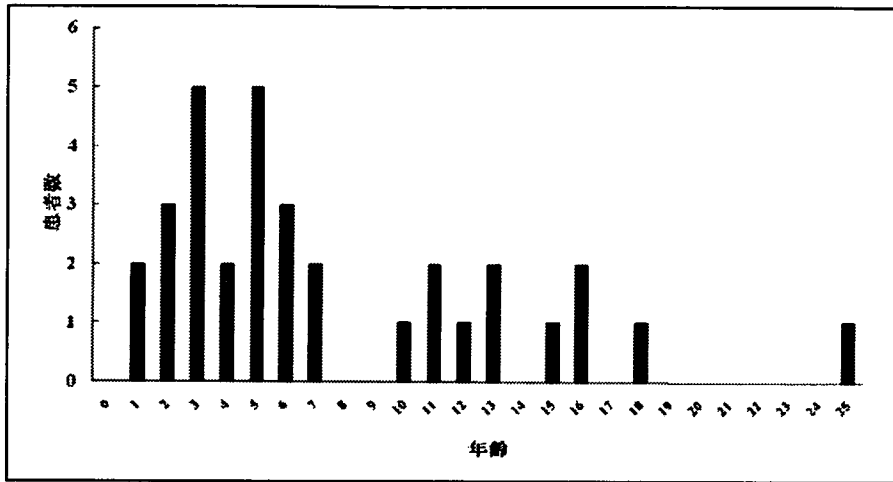


図1 患者の年齢分布

バイオインフォマティクス解析の結果 Zinc-alpha2-glycoprotein (ZAG)が病態と関連して変動している可能性が示唆された。ZAG の病態

期における変動は、血中の中性脂肪の変動と類似していた(図2)。

	患者数計	微小変化	び慢性メサン ギウム増殖	FSGS	慢性増殖性 糸球体腎炎	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 {ステロイド抵抗性 不明	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

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3)。



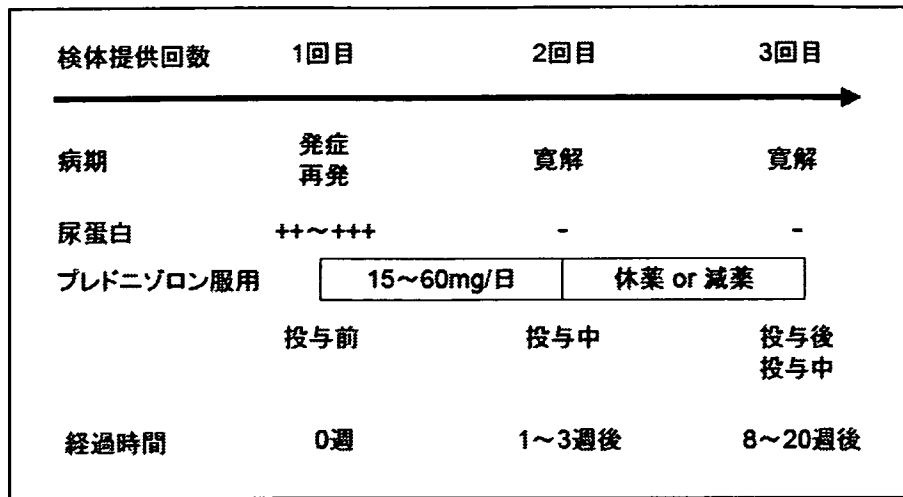


図3 ステロイド感受性ネフローゼ症候群の検体における病気及び治療推移

さらに ZAG と相関する因子を探索したところ Mannose binding lectin-associated protease 1 isoform 2 (MASP1-2) が相関していることが明らかとなった。(田上)

#### C-8. 加齢関連疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立

認知症の脳脊髄液および CADASIL 患者剖検脳の微小血管、さらにラットのシナプス画分の解析から以下のことが明らかとなった。

- 1) MALDI-TOF/MS や nano LC-MS/MS を用いた微量たんぱく質解析システムを確立し、それを用いてアルツハイマー病 (AD) を中心とした認知症の脳脊髄液から、網羅的なたんぱく質の解析を行った。そして、各疾患における脳脊髄液中のたんぱく質をリストアップした。血漿由来のたんぱく質のみならず、細胞内由来の微量なたんぱく質の同定も可能となった。
- 2) 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、Notch3 を中心に血管内のタンパク質に変化がないか解析を行った。nano LC-MS/MS を用いた網羅的な解析によって、CADASIL 脳の微小血管中のたんぱく質をリストアップした。また、CADASIL

脳の微小血管には Notch3 の細胞外領域が蓄積しており、不溶化していることが明らかとなった。

- 3) ラット脳組織のシナプス画分から代表的なシナプスタンパク質 Neuroligin, PSD-95 などを免疫沈降し、共沈降するたんぱく質を正確に同定する独自の実験系を確立した。さらに、加齢に伴うたんぱく質複合体の動態変化をみる系を確立した。また、APP 複合体をラット脳シナプス画分より精製し、いくつかの新規結合たんぱく質の候補を nano LC-MS/MS により同定した。
- 4) アシル化修飾をうけたたんぱく質に関してピオチンスイッチと呼ばれる方法で、海馬培養神経細胞からアシル化たんぱく質を精製し、神経活動依存的な変動を検討した。その結果、アシル化修飾をうけるたんぱく質のうち、シナプス足場たんぱく質 PSD-95 のアシル化レベルが神経活動を抑制した際に著しく上昇することが明らかになった。

骨代謝の制御において中心的役割を果たしている骨芽細胞培養系を用いて、様々な生理活性物質のたんぱく質リン酸化等への作用および作用機序を解析した。さらに骨代謝に影響するホルモン等骨代謝調節因子や骨粗鬆症治療薬等の作用点について検討し、以下の点を明ら

かとした。

- i) アデニル酸シクラーゼ-cAMP 経路は p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 活性化の抑制を介して、甲状腺ホルモン(T3)によるオステオカルシン産生促進作用を制御している。
- ii) 骨粗鬆症等の治療薬であるビスフォスフォネート製剤ミノドロネートは p44/p42 MAPK のリン酸化の抑制を介して骨吸収促進因子であるプロスタグランジン  $F_{2\alpha}$  (PGF $_{2\alpha}$ ) による血管内皮細胞増殖因子(VEGF)産生を抑制する。また、その作用点はプロテインキナーゼCとRaf-1の間である。
- iii) 主要な骨形成促進物質の一つである線維芽細胞増殖因子-2(FGF-2)による VEGF 産生には、p44/p42 MAPK に加えて stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) のリン酸化による活性化が関与する。また、FGF-2 が p70 S6 kinase (S6K) をリン酸化し活性化する。さらに、p70 S6K の活性化が SAPK/JNK のリン酸化を抑制し、ひいては FGF-2 による VEGF 産生を抑制的に制御する。
- iv) 緑茶などに豊富に含まれるフラボノイドであるカテキンは、PGF $_{2\alpha}$  による SAPK/JNK のリン酸化を増強させ VEGF 産生を促進する一方、エンドセリン-1(ET-1)による p44/p42 MAPK のリン酸化を抑制し、インターロイキン-6(IL-6)産生を減弱する。

### C-9. 疾患関連たんぱく質解析に関する研究

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たんぱく質、乳癌で最大 47 倍の発現量がみられるたんぱく質から発現がみられないたんぱく質まで、約 1000 種類のたんぱく質が解析されている。これらの結果は、mRNA レベルの既存の報告と比較検討するとともに、他患者の乳癌と

正常組織のプロテオーム解析結果を統合し、マーカーとしての有用性の検討および病態の解析を施行していく予定である。現在、解析の最終段階にあり、逐次データを集積中である。

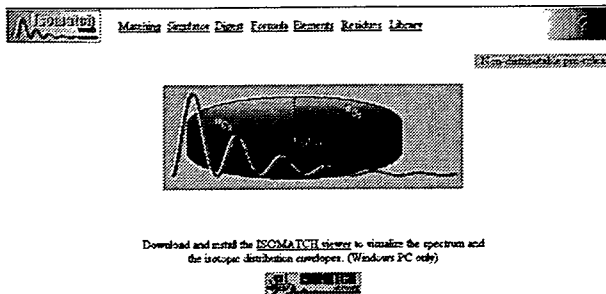
大腸癌については、約 970 種類のたんぱく質の同定と定量が可能であることが、明らかになった。現在、提供された検体すべてのデータを集積中であり、臨床症状との相関について検討過程に入る予定である。閉塞性肺疾患および運動ニューロン病の血清に関しては、プロテオーム解析は終了しており、近日各たんぱく質の比較定量値と臨床情報との相関を解析する予定である。これらの解析には、最新の臨床情報を入力し、施行していく計画である。今回、癌組織の解析については、患者の正常組織の確保に難渋した。特に当初予定していたリンパ腫については、リンパ腫組織の収集はできるものの、倫理的観点から患者の正常組織を採取することは問題があり、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。乳癌においても、年齢とともに乳腺組織が変化するため、乳癌患者の年齢における正常乳腺組織は少なく、同一患者で正常と癌組織のペアで解析できる検体がどれだけあるかは、検討中である。代用の培養細胞などの使用についても検討したが、厳密な意味におけるコントロールとはならず、また解析結果の解釈が難しくなることから、最初の方針どおり同一患者での正常・癌組織ペアでの解析を施行中である。こうした倫理的な面から、予定が大幅に遅れることとなり、現報告時点においても、解析中の検体が残っており、マーカーの同定、病態解析に至っていない。

### C-10. 疾患関連たんぱく質解析のための質量分析法の確立

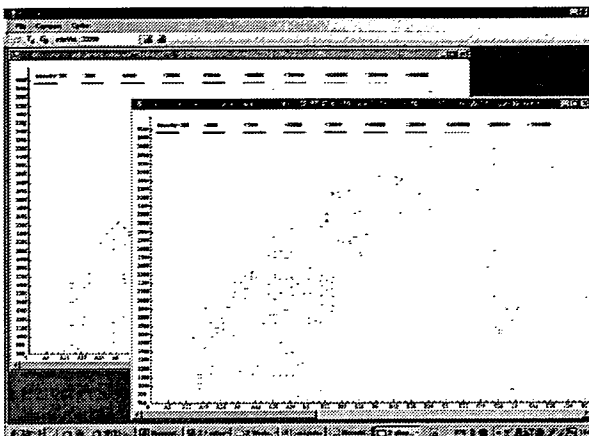
#### 1) 質量分析に関わるハードウェア、及び、データ解析ソフトウェアの開発

新規精密質量測定法の開発の他に、以下の 8 種類のソフトウェアの開発を行った(図 1)。

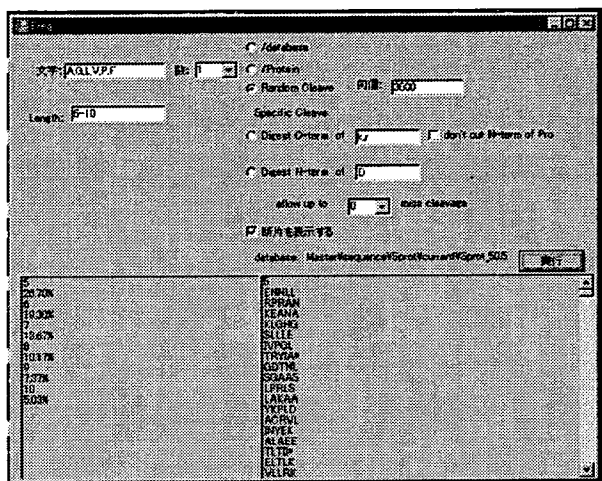
①同位体解析、定量解析支援ソフトウェア



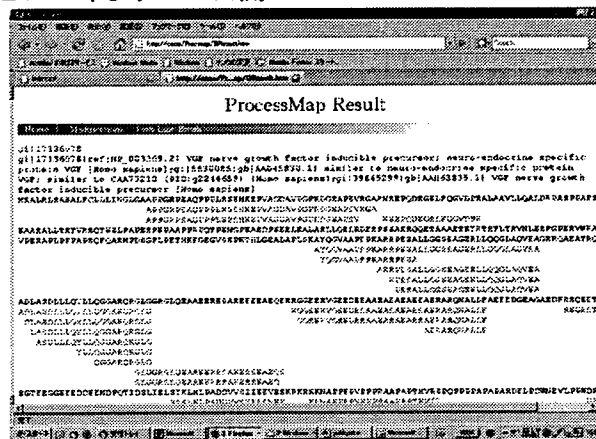
③DISCOVER: プロテオミクス変動解析ソフトウェア



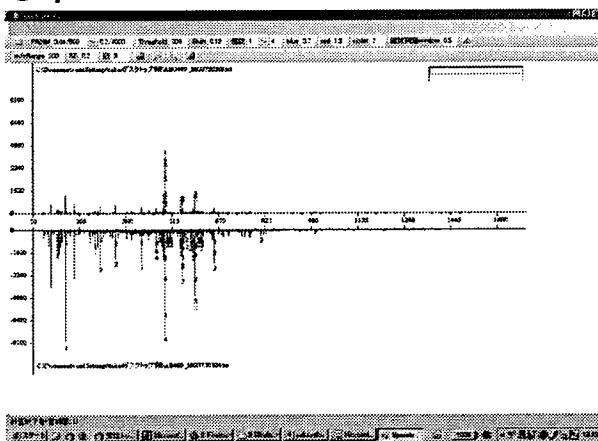
⑤FREQ: 配列データベース出現頻度算出ソフトウェア



⑥ProcessMap: プロテオミクスプロセッシングマップ 2004年よりWeb公開



⑦SpectrumCAL: MSスペクトル解析ソフトウェア



⑧ChroCAL: クロマトグラフィー解析ソフトウェア

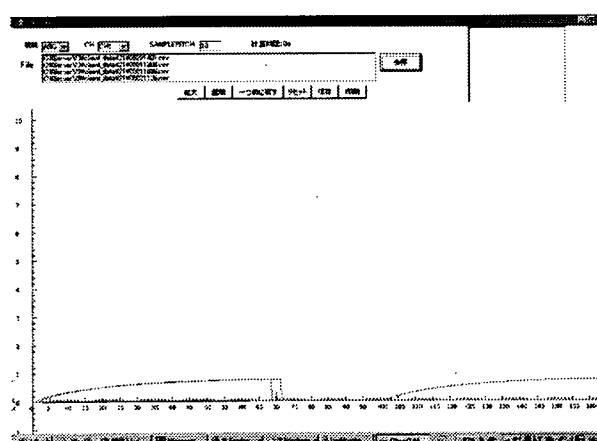


図1. 開発ソフトウェア(①、③、⑤-⑧)の出力例

Isotopica(<http://coco.protein.osaka-u.ac.jp/isotopica> から公開、利用可)：同位体解析、定量解析支援ソフトウェア利用件数実績：2,488 件(H17 年)、10,740 件(H18 年)、3,798 件(H19 年)

- ・FragPattern:ペプチド同定の検証
- ・DISCOVER:プロテオミクス変動解析ソフトウェア
- ・Score:プロテオミクス自動アノテーションソフトウェア
- ・FREQ:配列データベース出現頻度算出ソフトウェア
- ・ProcessMap:プロセッシングマップ作成ソフトウェア
- ・SpectrumCAL:MS スペクトル解析ソフトウェア
- ・ChroCAL:クロマトグラフィー解析ソフトウェア

## 2) 健康者、及び、主に癌患者尿のペプチド・蛋白質データベースの構築

尿たんぱく質・ペプチドのプロファイリング、構造解析する方法をオンライン nanoLC/ESI-MS/MSMALDI-MS/MS を用いて確立した。膵臓癌(5 人)、肺癌(2 人)、健康人(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、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。健康者および癌患者尿 10~15mL から 300~400 種のたんぱく質を同定することができ、個々人の尿たんぱく質データベースの構築が可能となった(図 2)。

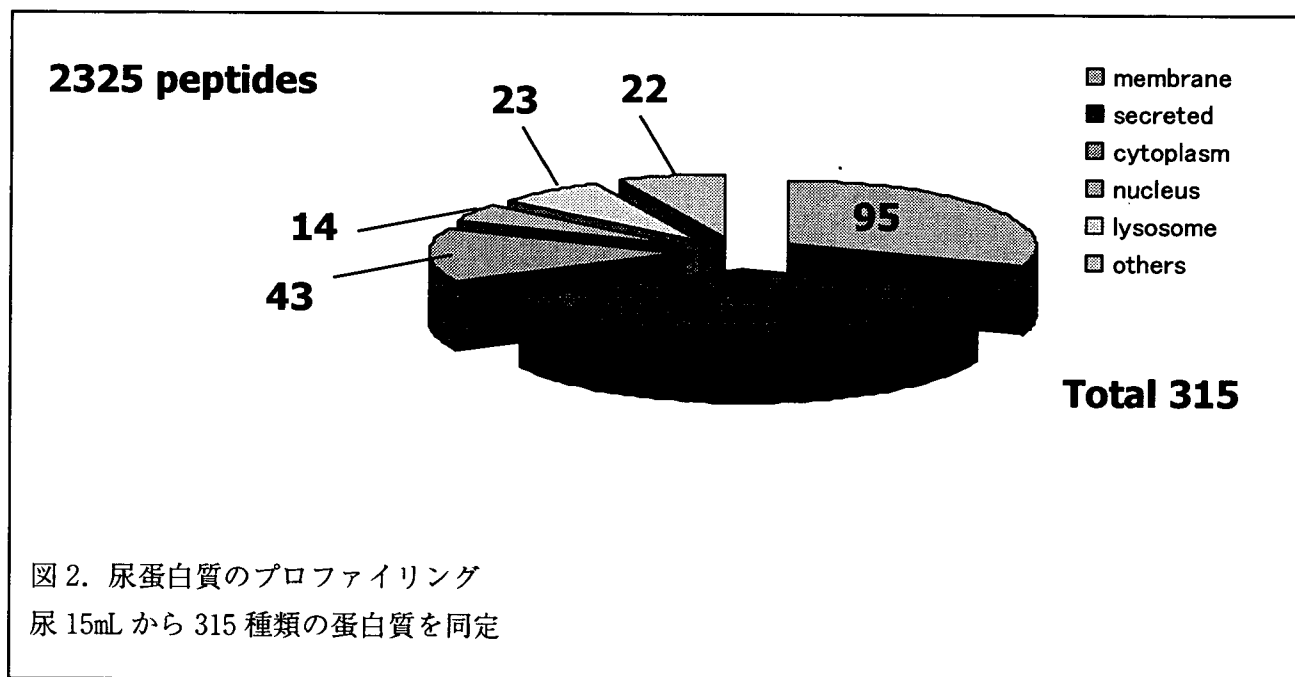


図 2. 尿蛋白質のプロファイリング  
尿 15mL から 315 種類の蛋白質を同定

さらに、健康人との比較解析により、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  $\alpha$ -2-glycoprotein precursor) は膵臓癌患者血中에서도優位に増加していることが報告されている (J. Chromato. B, 2007, 852, p257-67.)

## 3) 糖鎖修飾に注目した尿蛋白質の効率的分離法、並びに、高感度検出・構造解析法の確立 糖たんぱく質より糖ペプチドを効率よく濃縮

し、同定する方法を確立した。その結果、尿中に糖鎖修飾(N-結合型糖鎖)部位としては 122 箇所(100 種の糖たんぱく質に由来)を同定することができた。その内、未報告の新規糖鎖結合部位が 14 箇所(13 種の糖たんぱく質に由来)含まれていた。また、尿中には、腫瘍糖鎖マーカーである CA19-9(シアリル Le<sup>a</sup> 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