

II. 厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)  
分担研究報告書

2. MRM 法による糖尿病性細小血管症診断マーカー候補蛋白の定量解析

加納 圭子、鏑木 康志

独立行政法人国立国際医療研究センター

研究所 糖尿病研究センター

臓器障害研究部

糖尿病性細小血管症新規バイオマーカー発見は早期発見による合併症の進行防止のみならず、合併症発症の機序解明、合併症予防薬開発にとっても必要である。バイオマーカー探索の手法としては、質量分析計の急速な進歩に伴い、タンパク質の異常を網羅的に解析するプロテオームの手法を用いた研究が世界中で急速に広まっている。しかしながら、プロテオームによる糖尿病バイオマーカー解析には、臨床の現場で採取される検体が、ダイナミックレンジの広さ故にプロテオームが苦手とする血液であること、単一のバイオマーカーによる病態把握には限界があること、網羅的なアプローチでは同定された蛋白のバイオマーカーとしての意義を検証するのは困難であることなどの問題があげられる。

そうした中、定量解析の新しい手法として注目されていった Multiple reaction monitoring (MRM)法は、あらかじめ判明しているバイオマーカー候補蛋白について、高感度で特異的に蛋白を一斉分析できるという利点がある。そこで、我々は、MRM 法が糖尿病研究におけるプロテオーム解析のブレイクスルーとなり得るか検証を行った。

まずは、MRM 測定の実績があるタンパク質と前項のマイクロアレイ解析で選出されたタンパク質の計 43 個のタンパク質の血中濃度を一斉分析できるか試み、更に、健常者と糖尿病患者血清での比較解析を行った。

その結果、我々は血清濃度が比較的高いタンパク質の MRM 測定での検出に成功した。検出感度についてサンプルの前処理などを行い改良する必要があるが、本手法は、効率よく糖尿病性細小血管症のバイオマーカーを探索するために優れた測定系であることが立証できた。

## A. 研究目的

糖尿病患者は 2007 年国民健康・栄養調査では約 890 万人といわれ、戦後一貫して増加している。糖尿病の特徴は慢性的な経過で糖尿病性細小血管症を引き起こすことであり、網膜症では失明、腎症では腎不全による人工透析、糖尿病性神経障害では糖尿病性壊疽による下肢切断に帰結し、国民健康上大きな問題になっている。これらの合併症は自覚症状を伴わないで進行するため、病期や予後・進行性などを的確かつ簡便に診断するバイオマーカーの開発が急務である。また、新規バイオマーカー発見は糖尿病合併症の早期発見のみならず、合併症発症の機序解明、合併症予防薬開発にとっても必要である。

バイオマーカー探索の手法としては、近年、質量分析計の急速な進歩に伴い、生体試料からタンパク質を網羅的に解析するプロテオームの手法を用いた研究が世界中で急速に

広まっている。その際に臨床検体として広く使用されている血液については、個々の蛋白の血中濃度のダイナミックレンジが著しく広いことから網羅的な解析が困難であり、疾患の主座となる臓器、組織からの検体での解析が主体となることが多い。しかしながら、糖尿病の場合は診療の現場で臓器、組織から検体を採取することはきわめて困難であり、日常的に採取されるのは血液あるいは尿のみである。

また、糖尿病は全身疾患であるため、血液から同定されたバイオマーカー候補タンパク質がどの臓器あるいは組織に由来しているのか、そのタンパク質の量的変動が本当に糖尿病合併症の出現あるいは進行を反映しているのかを検証するのは困難であるという問題もある。

このように、まず臨床検体を試料として網羅的にバイオマーカー候補タンパク質を探索するアプローチには限界がある。ところが近年、あらかじめ判明しているバイオマーカー候補タ

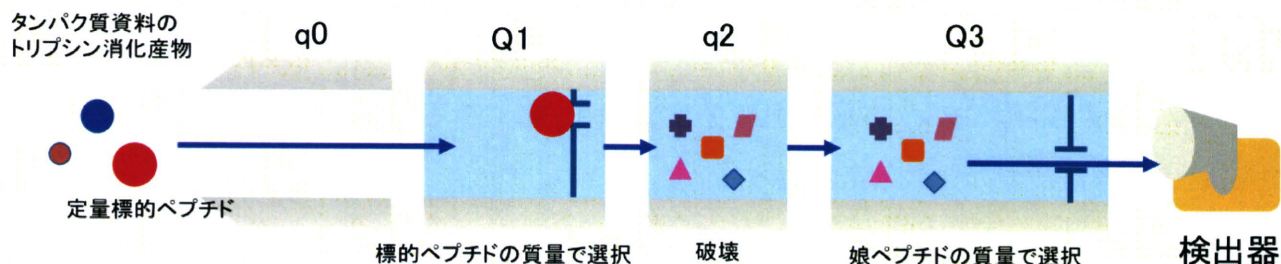


図1 .MRM 測定原理

まず、測定対象のタンパク質試料をトリプシン消化し、HPLCを使用したアセトニトリルの勾配でゆっくりと溶出する。オンラインで接続した質量分析器で、ペプチドを順次イオン化し、 $m/z$ （分子量/価数）を Q1 で測定、q2 でそのペプチドを He ガスと衝突させ断片化して、Q3 で断片化されたイオンの  $m/z$  を測定する。MRM 測定の際は、定量しようとするタンパク質の Q1 と Q3 での  $m/z$  を設定し、決定した  $m/z$  のイオンしか Q1 と Q3 を通過できないようにする。このダブルフィルターによって、選択性高く測定できる。また一度にいくつものダブルフィルター（MRM トランジション）を組むことができるので、血清のような複雑なサンプルであっても、一度に測定が可能である。

ンパク質について、高感度で特異的にタンパク質を定量できる Multiple reaction monitoring (MRM)法による解析が使われるようになってきた (Anderson et al. Mol Cell Proteomics 5:573-588, 2006) (図1)。本法を用いたアプローチでは、例えば糖尿病性細小血管症の診断マーカーを探索する際には、先に糖尿病性細小血管症の場となる組織由来の培養細胞あるいは疾患モデル動物を用いた実験にてバイオマーカー候補タンパク質を絞り込んだ後に、これらのバイオマーカー候補を糖尿病患者由来検体にて定量評価することが可能であり、先に臨床検体を網羅的に解析する場合と比較して、バイオマーカー候補タンパク質の意義付けが容易となる。また、近年、種々の疾患において単一のバイオマーカーによる病態把握には限界があるため、いくつものバイオマーカーを組み合わせたマルチマーカーの使用が提唱されている (Morrow DA et al. Circulation, 108:250-252, 2003)。一斉分析が可能な MRM 法はこの点でも大きく力を発揮する可能性がある。以上のことから、我々は MRM 法が糖尿病研究におけるプロテオーム解析のブレークスルーとなり得るか検証を行った。

## B. 研究方法

### 1. 研究の流れ

まず、血液を用いて MRM 法での測定例が報告されている 29 個のタンパク質の測定を行った (Michael A et al. Mol Cell Proteomics 8:1860-1877, 2009) (表1)。現在まで MRM 測

定を使った報告の中で Michael らの報告は比較的血清濃度の高いタンパク質が測定されていることが特徴で、これら29個のタンパク質は主に凝固線溶系、炎症系の因子である。

近年糖尿病研究においては、血小板機能のみならず凝固系や線溶能を表すマーカーも種々開発され、測定されるようになってきている。この凝固線溶系の異常は糖尿病の中でも細小血管合併症の進行した例に多いとされているが、多検体を用いての一斉分析はまだ例がない。これに加えて、他にも糖尿病性網膜症患者由来硝子体で MRM 法測定によるタンパク質濃度の変動が報告されている 4 つのタンパク質 (Kim et al. J Proteome Res 9:689-699, 2010)、MRM 法での測定法は確立されていないが糖尿病の新規バイオマーカーとして注目されている Adiponectin (ADIPOQ) の計 34 個のタンパク質を MRM 法による定量解析の予備実験として測定した (表1)。

次に、昨年度の研究報告で述べた High glucose 処理した内皮細胞にて有意に RNA レベルで発現が上昇していたタンパク質について MRM 解析を行った。細小血管障害が起こる腎糸球体内皮細胞や網膜血管内皮細胞において、高ブドウ糖負荷で発現上昇する分泌タンパク質中からまず 9 個の分泌タンパク質について MRM 測定を試みた。本研究では糖尿病性細小血管症に固有のバイオマーカー探索を目的としており、大血管症マーカー候補タンパク質を除外するために、これらの 9 個のタンパク質は大動脈内皮及び皮膚微小血管内費

にて変動していないものを選択した(図2)。IIIRAP と ANG については ELISA での測定を行い、MRM 法の定量性を検討した。また、MRM 測定にて血清で検出できなかったタンパク質については ELISA 法にて測定を行った(表2)。

## 2. 被験者

今回の予備検討に用いた血清は、「創薬基盤

推進研究事業」の前に行われた「疾患関連たんぱく質解析研究事業」において国立国際医療センター(当時)にて収集した健常者血清(10名)と2型糖尿病患者血清(29名)である。まず、健常者と2型糖尿病患者で血清タンパク質濃度に差があるか解析し、次に細小血管症進行度の評価として、糖尿病性腎症病期で被験者を分類して比較を行った。

Gene name	文献	Gene name	文献
AFN	1	HPX	1
SERPINA8	1	ITIH1	1
APCS	1	KNG1	1
APOC1	1	ORM1	1
APOC3	1	PLG	1
APOE	1	RBP4	1
APOH	1	SELL	1
AZGP1	1	SERPINC1	1
C4A( $\gamma$ chain)	1	SERPIND1	1
C4B( $\beta$ chain)	1	SERPINF2	1
CLU	1	TF	1
CP	1	TTR	1
F12(XIIaHC)	1	KAL	2
F2	1	PEDF	2
GC	1	SERPINA7	2
VTN	1	VWF	2
GSN isoform1	1	ADIPOQ	-

表1. 一斉分析の予備検討として測定したタンパク質群測定の際のMRM設定値(Q1,Q3,CE)記載の論文を文献の欄に示した。ADIPOQはMRM測定例がなく当研究室で設定した値を用いた。

文献1: Michael A et al. Mol Cell Proteomics 8:1860-1877, 2009

文献2: Kim et al. J Proteome Res 9:689-699, 2010

腎系球体内皮細胞

網膜血管内皮細胞

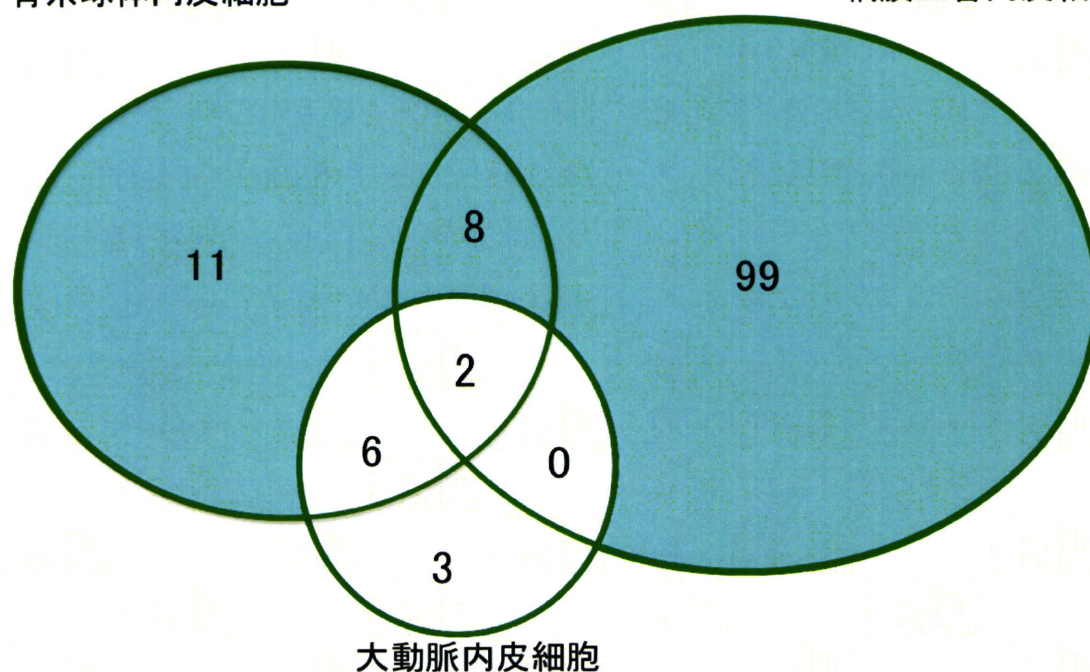


図2. DNA マイクロアレイ解析にて発現上昇した分泌蛋白コード遺伝子  
このうち9個のタンパク質についてMRM測定を試みた。

遺伝子名	発現比 (30mM/5mM)	P-value	有意差が 見られた 細胞腫	解析手法
IL1RAP	5.4	<0.001	網膜血管内皮	MRM, Elisa
ANG	3.0	<0.001	網膜血管内皮	MRM, Elisa
TIMP2	3.0	<0.001	網膜血管内皮	Elisa
TFPI	2.8	0.0018	網膜血管内皮	Elisa
IL6ST	2.4	0.0073	網膜血管内皮	MRM
PRSSI	2.3	0.0032	腎系球体血管内皮	MRM
OPN	2.2	0.0010	網膜血管内皮	Elisa
SPARC	2.1	0.0037	網膜血管内皮	Elisa
GDF15	2.0	0.0048	網膜血管内皮	Elisa
	2.0	<0.001	腎系球体血管内皮	

表2. MRM 測定を試みたタンパク質群のマイクロアレイデータ

### 3. MRM 測定用機器

LC は Paradigm MS4 (AMR)、質量分析計は予備検討には Qstar Elite (ABSciex), MRM 測定には 4000QTrap (ABSciex)を使用した。

### 4. MRM 測定のためのトランジションの設定

比較的血中濃度が高いタンパク質の MRM 測定では、それぞれ引用論文で最適化されている Q1, Q3, CE の値を使用した(表1)。MRM 測定の報告がない ADIPOQ は血清を抗 ADIPOQ 抗体で免疫沈降し内在性の ADIPOQ を濃縮した上で、還元アルキル化、トリプシン消化し、MS/MS 解析を行った。Protein Pilot Software 2.0 で得られたタンパク質同定情報をもとに、イオン化効率の最もよいペプチドを Q1、イオン強度の強いプロダクトイオンを Q3 に選別して測定に用いた。

マイクロアレイから選出されたタンパク質の MRM トランジション決定には、購入したリコンビナントタンパク質を MS/MS 解析して得た。具体的には、リコンビナントタンパク質の同定結果を MRM Pilot software で読み込み、Confidence と Ion Intensity が高く、修飾のなるべくないペプチドを選択し Q1 とした。それらのペプチドから生じるプロダクトイオンのうち、Ion Intensity が高く、ブリーカーイオンより  $m/z$  の大きい b または y イオンを選択して Q3 とした。1 ペプチドあたり 2 つの MRM トランジションを選択した。

### 5. 血清の処理と MRM 測定の流れ

血清から多量タンパク質 (Highly abundant proteins: HAP) を除去するために Seppro IgY 14 Spin Column (Sigma)にて処理し、3 kDa Amicon Ultrafree で限外ろ過後、乾燥させて 50%Ambic に溶解、還元アルキル化後、トリプシン消化した。血清 135nl から得られた消化物(約 500ng 分)を、ナノ LC を用いて C18 カラムで分離した。血清の測定では移動層の勾配を緩やかにし、イオンサプレッションを少しでも抑える必要があり、流速 300nl/min のナノフローで、5%から 40%アセトニトリルの 90 分直線濃度勾配での実施とした。1 サンプル測定するごとにアセトニトリル濃度を複数回上下させる 90 分間の洗浄を行い、サンプルが残存して次のサンプルの測定に影響しないようにした。また、リテンションタイムのずれを最小限にするために 90 分の洗浄後には分離カラムの平衡化を 30 分行った。LC から 4000 QTRAP への接続はオンラインで行った。MRM 測定 Method は MRM モード単体で行い、Protein Quant Software 2.0 でピーク面積を解析した。

### 6.MRM の定量性

ANG 測定における MRM の定量性を調べるために、血清での測定において一番 Ion Intensity が高かったペプチド (DINTFIHGDK)の C 末を安定同位体ラベルした Arginine に導入した Aquapeptide(Sigma)を購入した。1atmol から 100fmol まで6段階の量の Aquapeptide を、500ng の血清にスパイクして MRM 測定した。

## C. 研究結果

### 1. MRM 測定による内在性ピークの検出

血漿での MRM トランジションが既知の 30 個のタンパク質はすべてについて、nanoLC/4000QTRAP システムで測定することができた。硝子体で報告されていた 4 個のタンパク質では 2 個で血清での内在性ピークが確認できた。同定情報をもとに MRM 測定を試み

た ADIPOQ でも十分な高さの内在性ピークを確認することができた(図3、図4)。

内皮細胞でのマイクロアレイ解析からの 9 個のタンパク質すべてについて、MRM トランジションを設定することはできたが、血清で内在性のピークを確認できたのは ANG、IL1RAP、PRSS1、IL6ST、TFPI の5つであった。

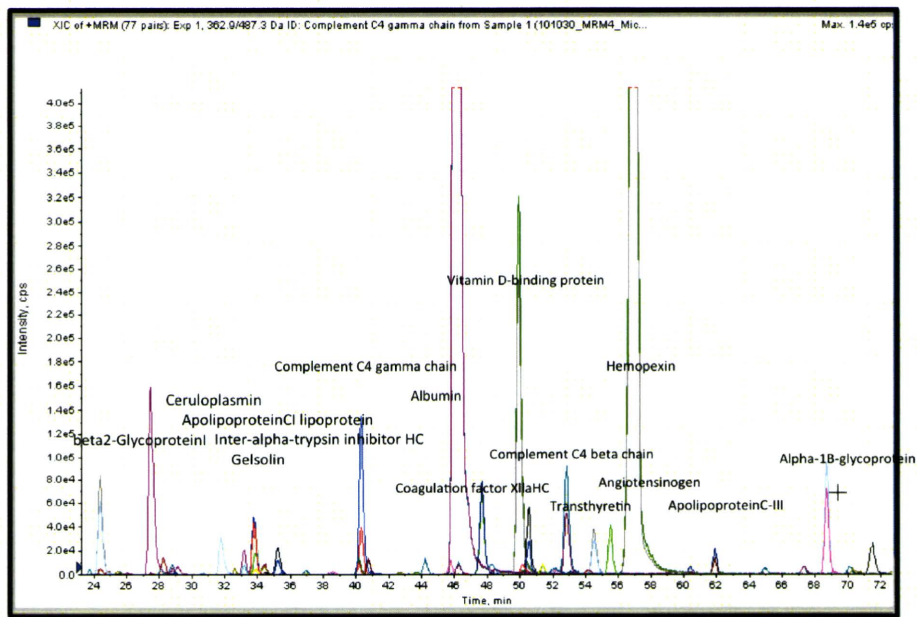


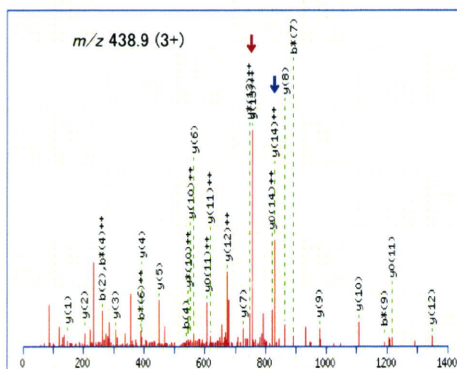
図3. MRM による一斉分析

### Adiponectin

MLLLGAVLLLLALPGHDQETTTQGGVLLPLPKGACTG  
 WM AGIPGHPGHNGAPGRDGRDGTPEKGEKGDPL  
 IGPKGDIGETVPGAEGPRGFGIQQRTYVTIPNPIRF  
 TKIFYNQQNHYDGSTGKFHCNIPGLYYFAYHITVYMKDV  
 KVSFLFKDKAMLFTYDQYQENNVDQASGSVLLHLEVGD  
 QVWLQVYGEGERNGLYADNDNDSTFTGFLLYHDTN



Q1: Product ions selection



Q3: Product ions monitoring

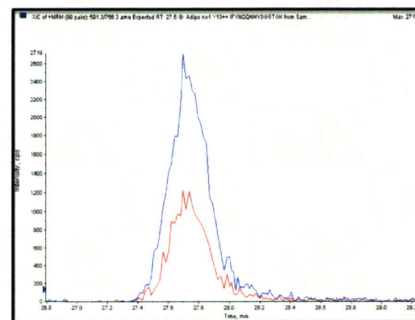


図4. ADIPOQ の MRM Transition 設定と血中内在性ピークの検出

## 2.MRM 測定の定量性

ANG では、購入したリコンビナントタンパク質を LC/MS/MS し ProteinPilot software により 6 カ所のペプチドが同定できた。各ペプチドについて 2Transition を設定した。500ng の血清を使用し、2 ペプチドを検出することができた。ANG 測定における MRM の定量性を調べた結果、Q1

442.0、Q3 548.8 のトランジションでは、10atol から 100fmol までの範囲で濃度依存的に MRM のピーク面積の直線性が保たれていることが確認できた(図5)。内在性の ANG のピーク面積は  $1.00E+03 \sim 3.00E+04$  の範囲にあり、検出感度、定量性共に問題ないことを確認できた。

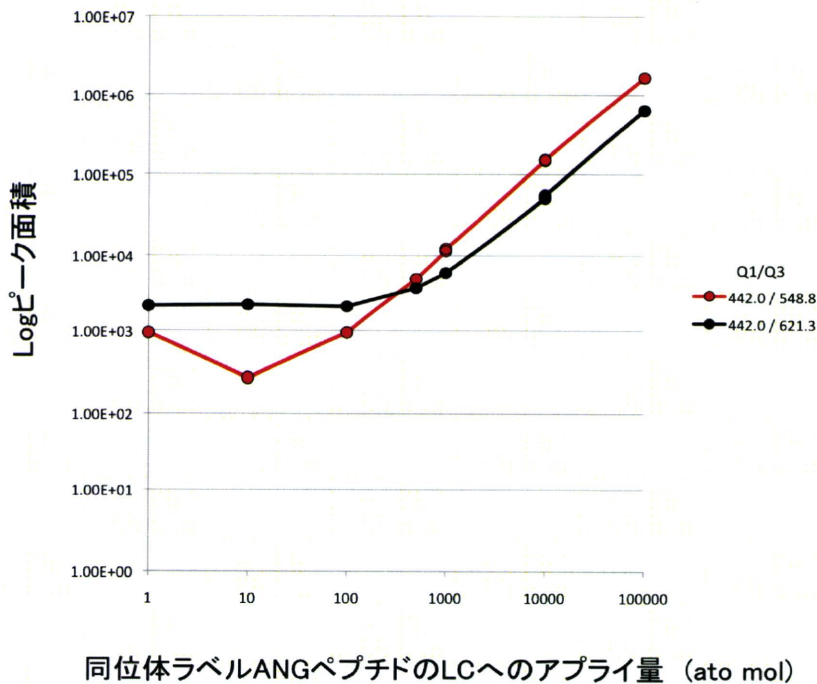


図5. ANG の定量性

TFPI では、検体によりピークが検出できたものとノイズのピークと重なってはっきりとしたピーク形状が得られないものがあった。

ANG,IL1LAP については ELISA と MRM 両方で測定を行い、有意な相関を確認した。

## 3.検体での解析結果

被験者の試験の開始前の年齢、性別、血圧、

HbA1C,BMI を T-test や ANOVA を使用して分析したところ、健常者と対照群の間で年齢、HbA1c で有意な差が見られた(表3、4)。

単変量解析の結果、健常者と 2 型糖尿病患者の血中濃度で、予備検討として測定した 34 個のタンパク質中 10 個のタンパク質について有意な増減が見られた(表5)。



	健常者	2型糖尿病患者	P-value
検体数	10	29	
男性／女性	5/5	10/19	0.308
年齢	55.6±4.0	66.1±6.7	<0.001
HbA1c	5.1± 0.3	7.0±0.6	<0.001
最高血圧	120.2±11.2	127.3±14.4	0.1681
最低血圧	78.2±8.6	76.1±9.5	0.5355
BMI	21.9±2.3	23.6±3.7	0.1667

表3. 被験者の特性(2型糖尿病発症有無での分類)

	健常者	腎症 I期	腎症 II期	腎症 III期以降	P-value
検体数	10	10	5	9	-
男性／女性	5/5	6/4	3/2	7/2	0.713
年齢	55.6±4.0	66.3±7.7 <sup>1)</sup>	65.4±6.5 <sup>2)</sup>	65.3±7.1 <sup>3)</sup>	0.009 <sup>1)</sup> 0.072 <sup>2)</sup> 0.024 <sup>3)</sup>
HbA1c	5.1± 0.3	6.9± 0.6 <sup>1)</sup>	7.2± 0.7	6.8± 0.8	<0.001 <sup>1)</sup>
最高血圧	120.2±11.2	123.1±12.2	130.0±15.5	131.1±19.0	0.3177
最低血圧	78.2±8.6	78.7±8.6	81.8±9.1	73.1±10.1	0.2660
BMI	21.9±2.3	23.3±3.5	26.0±5.1	22.4±3.3	0.3744
糖尿病罹患歴	-	16.7±7.1	16.4±3.2	19.0±5.2	0.6291

表4. 被験者の特性(腎症病期分類)

	選出方法	実験手法	糖尿病患者／ 健常者	P-value	検定方法
GDF15	マイクロアレイ	ELISA	2.2±1.4	P<0.001	U
SPP1	マイクロアレイ	ELISA	1.8±1.1	P<0.05	U
ANG	マイクロアレイ	ELISA	1.4±0.4	P<0.001	U
SERPINA7	MRM測定報告有	MRM	0.7±0.9	P<0.05	U
GSN 1	MRM測定報告有	MRM	0.7±0.5	P<0.05	U
SERPINC1	MRM測定報告有	MRM	0.7±0.4	P<0.05	U
IL1RAP	マイクロアレイ	MRM	0.7±0.4	P<0.05	U
CP	MRM測定報告有	MRM	0.7±0.3	P<0.01	U
SELL	MRM測定報告有	MRM	0.7±0.3	P<0.05	T
AZGP1	MRM測定報告有	MRM	0.6±0.5	P<0.05	U
TIMP2	マイクロアレイ	ELISA	0.6±0.3	P<0.05	U
ADIPOQ	糖尿病関連蛋白	MRM	0.6±0.3	P<0.001	U
IL6ST	マイクロアレイ	MRM	0.5±0.6	P<0.01	U
APOC1	MRM測定報告有	MRM	0.5±0.4	P<0.01	T
APOE	MRM測定報告有	MRM	0.5±0.3	P<0.05	U
VWF	MRM測定報告有	MRM	0.3±0.2	P<0.001	U

表5. 血清濃度平均値に有意差があったタンパク質(2型糖尿病での分類) 健常者平均との比率を増加した場合ピンクで、減少した場合水色で示した。

T: T-test W: Welch U: Mann-Whitney

マイクロアレイ解析にて選択されたタンパク質からは、解析したうち6個のタンパク質で有意な増減が見られた(表5)。さらに、腎症病期に分けて単変量解析をおこなったところ、予備検

討として測定したタンパク質のうち6個、マイクロアレイ選出タンパク質から3個で健常者と腎症III期以降の患者の血清濃度に有意な増加が認められた(表6)。

	選出方法	実験手法	合併症無し 糖尿病患者 ／ 健常者	腎症Ⅱ期／健常者	腎症Ⅲ期以降／健常者	P-value	検定 方法
ADIPOQ	MRM測定報告有	MRM	0.5±0.2 <sup>1)</sup>	0.5±0.3	0.6±0.4	P<0.05 <sup>1)</sup>	K,B
APOC1	MRM測定報告有	MRM	0.4±0.2 <sup>1)</sup>	0.5±0.5	0.5±0.5	P<0.05 <sup>1)</sup>	K,B
APOE	MRM測定報告有	MRM	0.4±0.1 <sup>1)</sup>	0.4±0.2	0.5±0.4	P<0.05 <sup>1)</sup>	K,B
ADIPOQ	MRM測定報告有	MRM	0.5±0.2 <sup>1)</sup>	0.5±0.3	0.6±0.4	P<0.05 <sup>1)</sup>	K,B
SELL	MRM測定報告有	MRM	0.6±0.2 <sup>1)</sup>	0.6±0.3	0.8±0.4	P<0.05 <sup>1)</sup>	K,B
CP	MRM測定報告有	MRM	0.6±0.1 <sup>1)</sup>	0.6±0.3 <sup>2)</sup>	0.8±0.4	P<0.01 <sup>1)</sup> P<0.01 <sup>2)</sup>	K,B
VWF	MRM測定報告有	MRM	0.4±0.3 <sup>1)</sup>	0.2±0.1 <sup>2)</sup>	0.3±0.2 <sup>3)</sup>	P<0.01 <sup>1)</sup> P<0.01 <sup>2)</sup> P<0.01 <sup>3)</sup>	K,B
ANG	マイクロアレイ	ELISA	1.3±0.4	1.2±0.2	1.5±0.4 <sup>1)</sup>	0.007 <sup>1)</sup>	S
GDF15	マイクロアレイ	ELISA	1.3±0.4	1.2±0.2	1.5±0.4 <sup>1)</sup>	0.005 <sup>1)</sup>	K,B
SPP1	マイクロアレイ	ELISA	1.3±0.8	1.5±0.6	2.5±1.3 <sup>1)</sup>	0.011 <sup>1)</sup>	K,B

表6. 血清濃度平均値に有意差があったタンパク質(腎症病期での分類)健常者平均との比率を増加した場合ピンクで、減少した場合水色で示した。

K: Kruskal-Wallis B: Bonferroni S: Scheffe

## D. 考察

### 1. MRM 測定による内在性ピークの検出

凝固線溶系の因子および ADIPOQ など、血中濃度の高いタンパク質については、MRM 測定用のトランジションさえ設定できれば、簡便に一斉分析が可能であり、MRM 法が優れた測定系であることが立証できた。

一方、マイクロアレイ解析にて選択されたタンパク質はいずれも血中濃度が 1 μg/ml を下回る比較的 low 濃度のタンパク質である。高感度測定が可能とされた MRM 測定を持ってしても、特にダイナミックレンジの広い血清サンプルでは低濃度タンパク質の内在性ピー

クを検出ことは困難であることが判明した。こうした中で、血中濃度 390ng/ml (ELISA 測定平均値) の ANG、62ng/ml (ELISA 測定平均値) の TFPI の内在性ピークが検出できたことは意義深い。TFPI の内在性ピークが検体によってはうまく検出できなかったことから、ペプチドによりイオン効率が大きく異なるので一概にはいえないが、4000Qtrap を用いた MRM 測定では HAP 除去をしても、数 10ng/ml で検出限界に達しているのではないかと考えられる。

### 2. MRM 測定の定量性

ANG について安定同位体ラベルペプチドを

用いて定量性を確認した結果からは、使用するトランジションを厳選する必要が判明した。アプライしたラベルペプチドの量が少なくなるにつれて直線性がなくなるのは、配列は異なるが、偶然 Q1, Q3 の値が近いペプチドが存在することによるものと考えられる。これは、分画などの前処理により血清の複雑性を下げることで、より広いダイナミックレンジでの測定が可能となることを示唆している。

MRM 測定と ELISA 測定との相関を調査したところ、有意な相関は見られたが、相関係数は低かった。原因の1つとして ELISA ではポリクローナル抗体を使用しており、ANG では 1 ペプチドの測定という点で厳密には異なる測定系であることが考えられる。ANG の測定に用いたペプチドは基質結合部位であり、I から V へのアミノ酸置換がリボヌクレアーゼ活性を減少させることが報告されている。患者検体のピークを詳細に検証したところ、こうしたアミノ酸置換が原因で ELISA との相関が見られなかった可能性も考えられた。ELISA 法では不可能であったアミノ酸置換を伴う多型の測定も MRM では可能であり、今後の進展が期待できる。

### 3. 検体の解析結果

総 ADIPOQ の血中濃度は、健常者に比較して糖尿病患者で減少するが、腎症もしくは網膜症進行に伴って増加することが報告されている (Kenichi Kato et al, Clinical Endocrinology (2008) 68, 442-449)。今回の結果では、腎症病期分類での同様の増減が認められた。

von Willebrand factor (VWF) は、は主に血管内皮や血小板において産生され、その多量体は強い血栓生成作用をもつ。本研究での MRM 測定では、腎症進行に伴って数値の減少が認められ、糖尿病性腎症患者における腎の微小血管にできた血栓による腎障害の進展度を反映しているものと考えられる。VWF は VWF 制限酵素により活性が制御されており、切断箇所も考慮したペプチドの MRM 測定を増やすことで、VWF の挙動をより詳細にモニターすることも可能であろう。

腎症進行に伴って増加傾向の見られた GDF15 は腎疾患関連蛋白として知られる蛋白と同じファミリーに属しており、詳細な機能解析を進めている。

同じく腎症進行に伴って増加傾向の見られた ANG はリボヌクレアーゼ活性を持つ血管新生蛋白である。血管内皮細胞にエンドサイトーシスにより取り込まれ、核へ移行し、種々のタンパク質の転写、翻訳に関わる多くの機能を持つタンパク質であり、高血糖による ANG の挙動説明が大変興味深いところである。

2型糖尿病患者での有意な現象が認められた TIMP2 は血管を裏打ちしている基底膜を構成している IV 型コラーゲンを切断して血管新生を促進する MMP-2 の過剰な働きを抑制的に制御する因子である。

これらのことから、本研究が高血糖により引き起こされる生体内のドラスティックな変化を正確に捉えていることが伺える。

## E. 結論

MRM 測定は、検出限界については血中濃度が低いタンパク質では残念ながら ELISA での測定に及ぶことができなかつたが、血中濃度が高いタンパク質については一斉分析が容易にできることが判明した。

MRM 測定によるバイオマーカー探索では、今後、等電点電気泳動や SCX 分画、2D-LC などの技術を駆使して、サンプルの複雑性を減少させる工夫により、検出限界を克服する試みが不可欠であり、現在着手しているところである。

腎症病期分類で健常者血清濃度との有意差が検出された ANG、GDF15、OPN は、これまでに血管新生における関与が報告されている。測定手法が既に確立されている ELISA であったものの、これらのタンパク質が、細胞の HG 処理により発現変動し、合併症の進行に伴って血清中の濃度も発現変動することを検証できたことは意義深い。今後さらに、症例数を増やし、年齢などの交絡因子を考慮した重回帰分析による検証を行うことがのぞまれる。マイクロアレイを用いて選出された候補タンパク質の中から今後、測定タンパク質を増やすことで新たなバイオマーカーが発見されることの可能性は高いと期待される。

## F. 健康危険情報

該当事項なし

## G. 研究発表

なし

学会発表:

田中崇裕, 櫻田紳策, 高橋枝里, 鏑木康志, 平野久, 小林信之, 原田登之, 慶長直人 活動性結核患者血漿タンパク質の 2D-DIGE と LC-MS/MS による解析 日本プロテオーム機構第8回大会 第 6 回日本臨床プロテオーム研究会 連合大会 浦安 7月 26~27 日 ポスター発表

加納圭子, 佐伯久美子, 本間綾香, 佐藤恵美, 高橋枝里, 奥村彰規, 湯尾明, 久保田浩之, 鏑木康志 An approach to find plasma biomarker for Diabetic microangiopathy using MRM method. 日本分子生物学会第 33 回年会 神戸 12月 10 日 ポスター発表

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## II. 厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)

### 分担研究報告書

#### 3. 尿ペプチドーム解析による糖尿病性細小血管症診断マーカー候補の探索

佐藤 恵美、鏑木 康志

独立行政法人国立国際医療研究センター

研究所 糖尿病研究センター

臓器障害研究部

#### 研究要旨

糖尿病にて慢性的に進行し重篤な合併症を引き起こすに至る糖尿病性細小血管症を簡便に診断可能とするバイオマーカーの開発は重要である。本研究では、特に糖尿病性腎症のバイオマーカーを探索するために、尿ペプチドーム解析をすることにした。

健常者、糖尿病で合併症のない患者、糖尿病で微量アルブミン尿のある患者の3グループの尿をペプチドーム解析し、ペプチドのリスト化を行った。その結果、本研究室でもバイオマーカー候補にあがったタンパク質由来のペプチドや、既報の尿ペプチドーム解析でもバイオマーカーとされるペプチドを検出することができた。今回のデータで、MS/MSのスペクトルデータが得られているので、今後の多検体の臨床サンプルでMRM法による定量解析をすることが容易となり、バイオマーカー候補ペプチドを選出することができると考えられる。

## A. 研究目的

糖尿病患者は 2007 年国民健康・栄養調査では約 890 万人といわれ、戦後一貫して増加している。糖尿病の特徴は慢性的な経過で糖尿病性細小血管症を引き起こすことであり、網膜症では失明、腎症では腎不全による人工透析、糖尿病性神経障害では糖尿病性壊疽による下肢切断に帰結し、国民健康上大きな問題になっている。これらの合併症は自覚症状を伴わないで進行するため、病期や予後・進行性などを的確かつ簡便に診断するバイオマーカーの開発が急務である。国立国際医療センター（当時）は平成 19 年度までの「疾患関連たんぱく質解析研究事業」に参加しており、その解析センター（プロテオームファクトリー）を利用した網羅的タンパク質解析を駆使して、糖尿病患者血清 124 例、健常者血清 42 例から cICAT 法での定量解析を行い、各糖尿病性合併症で異なる血清蛋白プロファイルを認めた。

糖尿病患者の臨床検体を用いてプロテオーム解析を行う際は、多くの場合に糖尿病診療の現場で日常的に採取される血清や血漿、尿が研究対象となる。ところが、血清や血漿サンプルの特徴として、アルブミンや IgG などが多量に存在し、バイオマーカー候補になるようなタンパク質は非常に微量で埋もれてしまうという、タンパク質濃度の幅が非常に大きく、また、血液凝固因子も多いためプロテアーゼ活性も高いこと

が問題となる。その点、尿サンプルは、容易に集めることができる上、腎臓でろ過されているため、血液ほど多量タンパク質に邪魔されることがなく解析が可能であり、特に糖尿病性腎症のバイオマーカー探索には腎臓の状態を反映しやすい尿を使うことは有効であると考えられる。

さらに、本研究では、プロテオーム解析の手法では見いだすことのできないペプチド画分について、ペプチドームの手法で解析することを目的とする。ペプチドを解析することの利点としては、生理活性ペプチドのように、それ自体で活性を持つものが見いだされることもあるが、バイオマーカーとしては、腎症のステージごとに腎糸球体などの構造が維持できなくなる過程でタンパク質が分解されることによって起こる特異的なペプチドや微量アルブミン尿を示す前の段階で腎機能の異常を見いだすことができるかもしれない。

## B. 研究方法

### 1. 臨床検体

今回の予備検討に用いたサンプルは、「創薬基盤推進研究事業」の前に行われた「疾患関連たんぱく質解析研究事業」において国立国際医療センター（当時）にて収集した尿である。

患者情報としては、糖尿病で合併症のない患者の尿（5名分）、糖尿病で微量アルブミン尿（アルブミン/クレアチニン:30-300 mg/g）の患者の尿（5名分）、健常者の尿（5名分）を用いた（Table 1）。

	Healthy	DN-	DN+
Number	5	5	5
Age	57.2 ± 4.8	58.4 ± 5.0	57.4 ± 8.9
Male : Female	3 : 2	4 : 1	4 : 1
BMI	20.73 ± 0.9	23.76 ± 2.2	27.45 ± 3.0
Duration	-	10.8 ± 7.6	11.0 ± 9.0
BP (max)	121.6 ± 12.1	125.2 ± 9.0	137.8 ± 16.2
BP (min)	79.2 ± 7.7	74.4 ± 13.5	81.8 ± 12.0
HbA1c	5 ± 0.3	8.14 ± 1.8	7.04 ± 1.0

Table 1 解析に用いた糖尿病患者、健常者対照群の臨床像

### 2. 尿サンプルの処理

各患者から得られた尿サンプル 10 ml（2 ml で 5 名分）を C18 カラム (3M) で脱塩・濃縮後、SCX カートリッジ (GL サイエンス) で脱色素したサンプルを還元アルキル

化し、ゲルろ過 (HPLC: GILSON, column: TSKgel G2000SWXL) により分画した。

### 3. ペプチドーム解析

当研究室には質量分析装置につながるペプチドの分離装置が 2 台あり、キャピラリー電気泳動 (CE: (Beckman Coulter 社製)) と nanoLC (AMR 社製) での分離を比較検討した。

サンプルを nanoLC (Paradigm : C18 カラム) -MS/MS (QSTAR-Elite) にアプライしてペプチドを測定し、スペクトルデータを Mascot によりデータベース検索し、ペプチド配列の解析を行った。ここでは、尿中から検出されるペプチドのリスト化をすることを目的としており、ここで検出されたペプチドは、MS/MS のデータも得られるため、MRM 測定による定量解析にスムーズに進むことができる。

### 4. MRM 法による定量解析

ペプチドーム解析により得られた MS/MS スペクトルデータをもとに、各ペプチドの Transition を設定し、臨床検体の数を増やして各個人の尿サンプルからターゲットペプチドを定量する。



### C. 研究結果

当研究室にはペプチドを分離するために CE と nanoLC が設置されている。今回のペプチドーム解析にどちらがよいか比較検討して使用することにした。

CE/MS (QSTAR Elite) の組み合わせの場合、アミノ酸 mix やトリプシン消化済み BSA をスタンダードとして測定するが、アミノ酸は分析できたが、トリプシン消化済み BSA の測定結果は電圧やアプライ量などを変更したが、coverage が 35% までしか上がらず、尿サンプルを測定しても、Uromodulin の 1 ペプチドしか検出できなかった。

nanoLC を使用した場合、トリプシン消化済み BSA の coverage は 60% になり、同じ尿サンプルを測定すると、数十ペプチドが同定されたため、nanoLC の C18 カラムで分離し、MS/MS (QSTAR Elite) 解析を行うことにした。

また、尿サンプルの前処理は、C18 カラムによる脱塩・濃縮だけよりも、SCX カートリッジによる脱色素を行った方が、同定されるペプチドの数が増え、さらに分子量で分画することにより同定ペプチドが増えたため、この方法を採用した。

健常者 (H)、糖尿病で合併症のない患者の尿 (DN-)、糖尿病で微量アルブミン尿 (アルブミン/クレアチニン: 30-300 mg/g) の患者の尿 (DN+) のサンプルを脱塩・濃縮・

脱色素して還元アルキル化処理したサンプルをゲルろ過にかけたところ、210 nm のスペクトルは Fig. 1 のようになった。

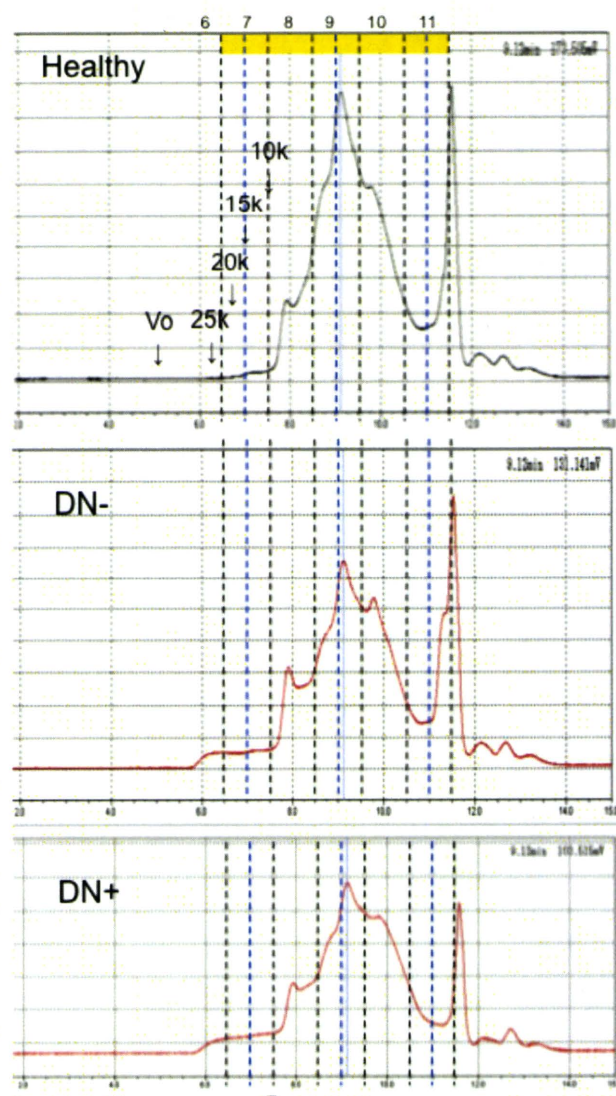


Fig. 1 前処理後の尿のゲルろ過クロマトグラム

Retention time 6.5 min から 10 min のサンプル 0.5 min 毎に回収し、分子量の大きい 6.5 min から 8 min のフラクションは Trypsin 消化し、それ以降の低分子量のサンプルに関してはそのまま nanoLC/ MS にアプライし、測定を行っ

た。

測定結果のうち、グループごとに検出されたペプチドのタンパク質名を Table 2-4 に示した。

最も多く検出されたペプチドは、Uromodulin の C 末端側のペプチドであり、これまでに報告されている尿ペプチド解析の結果とも一致し、他のペプチドーム解析でもよく検出される生理活性ペプチド前駆体である POMC や Kininogen-1、生理活性ペプチド生成酵素である ProSAAS も検出することができたため方法の検証ができた。

健常者 (H)、糖尿病で合併症のない患者の尿 (DN-)、糖尿病で微量アルブミン尿の患者の尿 (DN+) のデータを比較すると、健常者のみで検出されているペプチドなど、

ステージの違いで検出されるペプチドの違いがあることがわかった。

また、当研究室で尿プロテオーム解析やマイクロアレイから血清タンパク質の MRM 解析を行ってきたが、これまでの研究でバイオマーカー候補になった、Osteopontin や Kininogen-1 などのタンパク質由来のペプチドも検出されており、さらに検証をすすめることが重要であると考えられる。

Table 2 健常者 (H)

Quantitation overview (140 proteins)						
		Score	Mass	Matches	Sequences	emPAI
				179 (127)		
1	UROM_HUMAN	2069	69714	56 (37)	56 (37)	6.9
3	PCSK1_HUMAN	853	27358	34 (28)	17 (12)	3.74
4	OSTP_HUMAN	580	35401	56 (39)	27 (19)	8.15
5	ALBU_HUMAN	580	69321	97 (39)	65 (30)	5.15
6	PIGR_HUMAN	499	83232	82 (29)	54 (20)	1.49
7	SAP_HUMAN	477	58074	29 (17)	10 (6)	1.1
10	CLUS_HUMAN	403	52461	21 (16)	10 (8)	0.73
11	LTBP2_HUMAN	361	194936	24 (15)	23 (14)	0.3
12	UBIQ_HUMAN	357	8580	14 (13)	14 (13)	157.05
14	GRN_HUMAN	300	83500	26 (15)	19 (9)	0.87
15	HBB_HUMAN	275	15988	32 (16)	21 (11)	12.52
16	SLUR1_HUMAN	257	11178	19 (12)	6 (5)	7.35
17	VEGF_HUMAN	256	67218	32 (17)	24 (14)	1.12
18	LMAN2_HUMAN	215	40203	15 (8)	9 (5)	0.86
19	A1AT_HUMAN	200	46707	24 (10)	19 (7)	0.85
21	FETUA_HUMAN	173	39300	18 (8)	17 (8)	1.07
22	MSMB_HUMAN	172	12856	21 (10)	11 (6)	2.79
23	FIBB_HUMAN	161	55892	11 (8)	8 (5)	0.38
24	MASP2_HUMAN	180	75685	25 (13)	23 (12)	0.77
25	VEGFA_HUMAN	151	27024	8 (6)	6 (4)	0.93
26	ISK1_HUMAN	149	8501	9 (6)	7 (5)	6.01
27	HEPC_HUMAN	146	9402	14 (9)	11 (8)	23.56
28	FN1_HUMAN	141	282442	14 (4)	13 (4)	0.06
29	COLL_HUMAN	140	29405	3 (3)	2 (2)	0.27
31	DEFB1_HUMAN	117	7415	7 (6)	5 (4)	4.86
32	TFF1_HUMAN	116	9143	8 (3)	5 (2)	2.01
33	HBA_HUMAN	115	15248	11 (6)	10 (6)	2.92
34	PGRC1_HUMAN	108	21858	6 (4)	5 (3)	0.63
35	CYTB_HUMAN	107	11133	10 (8)	9 (7)	7.51
36	ITIH2_HUMAN	106	106397	7 (2)	6 (1)	0.03
37	TNR12_HUMAN	103	13902	5 (4)	4 (3)	1.7
38	EGF_HUMAN	100	133906	23 (5)	19 (3)	0.08
39	AMBP_HUMAN	99	38974	9 (6)	7 (4)	0.44
40	FBN1_HUMAN	98	312083	31 (4)	28 (3)	0.05
41	TFF2_HUMAN	87	14274	6 (3)	5 (2)	0.82
42	LAMC1_HUMAN	86	177489	14 (2)	14 (2)	0.04
43	MA1A1_HUMAN	84	72922	6 (1)	6 (1)	0.05
44	S10A8_HUMAN	84	10828	6 (3)	6 (3)	1.55
45	SETBP_HUMAN	84	169513	8 (1)	6 (1)	0.02
46	THY1_HUMAN	83	17923	4 (3)	3 (2)	0.48
47	FCN2_HUMAN	81	33980	11 (3)	9 (3)	0.37
48	NDUA1_HUMAN	81	8067	3 (1)	3 (1)	0.51
49	IGF2_HUMAN	78	20127	7 (4)	5 (3)	0.89
50.1	PCLO_HUMAN	78	568309	33 (3)	29 (3)	0.02
50.2	RAPH1_HUMAN	78	135171	14 (3)	11 (3)	0.08
50.3	KDM6B_HUMAN	64	180299	15 (3)	12 (3)	0.04
50.4	YB047_HUMAN	63	12217	10 (3)	7 (3)	1.32
50.5	WASL_HUMAN	54	54793	6 (2)	6 (2)	0.14
51	MGP_HUMAN	76	12345	10 (5)	7 (4)	2.03
52	DMKN_HUMAN	76	47054	4 (2)	3 (2)	0.18
53	ATNG_HUMAN	75	7279	10 (2)	6 (2)	1.45
54	FIBA_HUMAN	74	94914	5 (1)	5 (1)	0.04
55	IBP4_HUMAN	70	27915	6 (1)	6 (1)	0.14
56	MT2_HUMAN	65	6037	6 (4)	4 (4)	7.52
57	VTNC_HUMAN	68	54271	11 (3)	11 (3)	0.22
58	CMGA_HUMAN	67	50658	1 (1)	1 (1)	0.07
59	AQP2_HUMAN	66	28819	6 (1)	5 (1)	0.13
60	FMN1_HUMAN	66	157448	10 (1)	8 (1)	0.02
61	P3IP1_HUMAN	65	28230	5 (2)	5 (2)	0.29
62	2B19_HUMAN	64	29807	4 (2)	3 (2)	0.27
63	AUGN_HUMAN	62	17173	3 (2)	3 (2)	0.5
64	PLVAP_HUMAN	61	50562	3 (2)	3 (2)	0.15
65	SHSA5_HUMAN	61	25564	10 (2)	8 (2)	0.32
66	CO1A1_HUMAN	59	178077	17 (3)	18 (3)	0.06
67	FBLN4_HUMAN	59	49372	5 (2)	5 (2)	0.16
68	HEPS_HUMAN	58	44982	3 (1)	3 (1)	0.08
69	SRGN_HUMAN	58	17641	1 (1)	1 (1)	0.22
70	FBLN3_HUMAN	55	54804	9 (2)	8 (1)	0.14
71	CTSRB_HUMAN	55	126843	6 (1)	6 (1)	0.03
72	PRELP_HUMAN	55	43782	9 (1)	7 (1)	0.09
73	COFA1_HUMAN	54	141632	14 (1)	13 (1)	0.03
74	LAMA4_HUMAN	54	202401	12 (1)	12 (1)	0.02
75	APOA1_HUMAN	52	30759	7 (2)	7 (2)	0.28
76	COT1A1_HUMAN	52	138827	8 (1)	8 (1)	0.03
77	TKNK_HUMAN	52	13430	1 (1)	1 (1)	0.29
78	RGS5_HUMAN	52	20933	1 (1)	1 (1)	0.18
79	SPB4_HUMAN	51	44825	4 (2)	4 (2)	0.17

80	GP2_HUMAN	51	59442	6 (1)	2 (1)	0.08	Pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein GP2 OS=Homo sapiens GN=GP2 PE=2 SV=3
81	CXL16_HUMAN	49	27561	3 (1)	3 (1)	0.14	C-X-C motif chemokine 16 OS=Homo sapiens GN=CXL16 PE=2 SV=4
82	CDSN_HUMAN	49	51483	9 (4)	7 (3)	0.23	Corneodesmosin OS=Homo sapiens GN=CDSN PE=1 SV=2
83	SULF2_HUMAN	48	100390	6 (1)	6 (1)	0.04	Extracellular sulfatase Sulf-2 OS=Homo sapiens GN=SULF2 PE=1 SV=1
84	MEX3C_HUMAN	48	69323	7 (1)	6 (1)	0.05	RNA-binding protein MEX3C OS=Homo sapiens GN=MEX3C PE=1 SV=3
85	CATF_HUMAN	48	53332	5 (2)	4 (1)	0.14	Cathepsin F OS=Homo sapiens GN=CTSF PE=1 SV=1
86	PK1L2_HUMAN	46	272371	18 (1)	12 (1)	0.01	Polycystic kidney disease protein 1-like 2 OS=Homo sapiens GN=PKD1L2 PE=1 SV=3
87	TFF3_HUMAN	45	8835	12 (3)	10 (3)	2.17	Trefoil factor 3 OS=Homo sapiens GN=TFF3 PE=1 SV=1
88	WISP2_HUMAN	45	28807	3 (1)	3 (1)	0.14	WNT1-inducible-signaling pathway protein 2 OS=Homo sapiens GN=WISP2 PE=1 SV=1
89	FBLN5_HUMAN	44	50147	11 (1)	11 (1)	0.07	Fibulin-5 OS=Homo sapiens GN=FBLN5 PE=1 SV=1
90	VCC1_HUMAN	44	13810	2 (1)	2 (1)	0.28	VEGF co-regulated chemokine 1 OS=Homo sapiens GN=CXCL17 PE=1 SV=1
91	VTCN1_HUMAN	43	30859	3 (1)	3 (1)	0.12	V-set domain-containing T-cell activation inhibitor 1 OS=Homo sapiens GN=VTCN1 PE=1 SV=1
92	CT068_HUMAN	43	39488	3 (1)	2 (1)	0.09	Putative uncharacterized protein C20orf66 OS=Homo sapiens GN=C20orf66 PE=5 SV=1
93	ACVR1B_HUMAN	42	56770	5 (1)	5 (1)	0.07	Activin receptor type-1B OS=Homo sapiens GN=ACVR1B PE=1 SV=1
94	ROBO4_HUMAN	42	107390	11 (1)	11 (1)	0.03	Roundabout homolog 4 OS=Homo sapiens GN=ROBO4 PE=1 SV=1
95	RNF26_HUMAN	41	47707	5 (1)	4 (1)	0.08	RING finger protein 26 OS=Homo sapiens GN=RNF26 PE=2 SV=1
96	NIPBL_HUMAN	41	315854	17 (1)	17 (1)	0.01	Nipped-B-like protein OS=Homo sapiens GN=NIPBL PE=1 SV=2
97	2B1C_HUMAN	41	29859	1 (1)	1 (1)	0.13	HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-12 beta chain OS=Homo sapiens GN=HLA-DRB1 PE=2 SV=1
98	SMG5_HUMAN	40	113855	13 (1)	12 (1)	0.03	Protein SMG5 OS=Homo sapiens GN=SMG5 PE=1 SV=3
99	DYH8_HUMAN	39	514335	14 (1)	13 (1)	0.01	Dynein heavy chain 8, axonemal OS=Homo sapiens GN=DNAH8 PE=1 SV=2
100	CO3_HUMAN	39	187030	5 (1)	4 (1)	0.02	Complement C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2
101	2B14_HUMAN	39	30093	2 (1)	1 (1)	0.13	HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-4 beta chain OS=Homo sapiens GN=HLA-DRB1 PE=1 SV=1
102	CD59_HUMAN	38	14188	4 (3)	4 (3)	1.07	CD59 glycoprotein OS=Homo sapiens GN=CD59 PE=1 SV=1
103	NOV_HUMAN	38	39135	3 (1)	3 (1)	0.1	Protein NOV homolog OS=Homo sapiens GN=NOV PE=1 SV=1
104	CD99_HUMAN	37	18836	20 (2)	20 (2)	0.45	CD99 antigen OS=Homo sapiens GN=CD99 PE=1 SV=1
105	VTDB_HUMAN	36	52929	7 (1)	6 (1)	0.07	Vitamin D-binding protein OS=Homo sapiens GN=GC PE=1 SV=1
106	H2B1B_HUMAN	35	13942	2 (1)	2 (1)	0.28	Histone H2B type 1-B OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BB PE=1 SV=2
107	ACTG_HUMAN	35	41766	5 (1)	5 (1)	0.09	Actin, cytoplasmic 2 OS=Homo sapiens GN=ACTG1 PE=1 SV=1
108	B2MG_HUMAN	35	13706	4 (1)	3 (1)	0.29	Beta-2-microglobulin OS=Homo sapiens GN=B2M PE=1 SV=1
109	DSC1_HUMAN	34	99924	3 (1)	2 (1)	0.04	Desmocollin-1 OS=Homo sapiens GN=DSC1 PE=1 SV=2
110	APLP2_HUMAN	34	86900	9 (2)	7 (2)	0.09	Amyloid-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=APLP2 PE=1 SV=2
111	TICN1_HUMAN	34	49092	3 (1)	3 (1)	0.08	Testican-1 OS=Homo sapiens GN=SPOCK1 PE=1 SV=1
112	REN1_HUMAN	34	38993	2 (1)	2 (1)	0.1	Renin receptor OS=Homo sapiens GN=ATP8A2 PE=1 SV=2
113	TIH4_HUMAN	34	103293	6 (1)	6 (1)	0.04	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 OS=Homo sapiens GN=TIH4 PE=1 SV=4
114	K1875_HUMAN	33	180192	14 (1)	11 (1)	0.02	WD repeat-containing protein KIAA1875 OS=Homo sapiens GN=KIAA1875 PE=2 SV=2
115	ADML_HUMAN	33	20408	2 (1)	2 (1)	0.19	ADM OS=Homo sapiens GN=ADM PE=1 SV=1
116	FUT5_HUMAN	33	42980	2 (1)	2 (1)	0.09	Alpha-(1,3)-fucosyltransferase OS=Homo sapiens GN=FUT5 PE=2 SV=1
117	FILA_HUMAN	33	434922	4 (1)	4 (1)	0.01	Filaggrin OS=Homo sapiens GN=FLG PE=1 SV=3
118	SLUR2_HUMAN	32	10153	4 (2)	4 (2)	0.95	Secreted Ly-6/uPAR-related protein 2 OS=Homo sapiens GN=SLURP2 PE=2 SV=1
119	CO4B_HUMAN	31	192673	7 (1)	7 (1)	0.02	Complement C4-B OS=Homo sapiens GN=C4B PE=1 SV=1
120	IGHA2_HUMAN	31	38503	4 (1)	4 (1)	0.1	Ig alpha-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA2 PE=1 SV=3
121	O51T1_HUMAN	31	36974	2 (1)	2 (1)	0.1	Olfactory receptor 51T1 OS=Homo sapiens GN=OR51T1 PE=2 SV=1
122	PRDX6_HUMAN	30	25019	3 (1)	3 (1)	0.15	Peroxiredoxin-6 OS=Homo sapiens GN=PRDX6 PE=1 SV=3
123	IGHG2_HUMAN	30	35878	9 (1)	8 (1)	0.1	Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG2 PE=1 SV=2
124	S10A9_HUMAN	30	13234	3 (3)	3 (3)	1.18	Protein S100-A9 OS=Homo sapiens GN=S100A9 PE=1 SV=1
125	NUD10_HUMAN	29	18488	1 (1)	1 (1)	0.21	Diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase 3-alpha OS=Homo sapiens GN=NUDT10 PE=1 SV=1
126	NOTC3_HUMAN	28	243496	21 (1)	20 (1)	0.02	Neurogenic locus notch homolog protein 3 OS=Homo sapiens GN=NOTCH3 PE=1 SV=1
127	MEP1A_HUMAN	27	84365	4 (1)	4 (1)	0.04	Meprin A subunit alpha OS=Homo sapiens GN=MEP1A PE=2 SV=2
128	PLMN_HUMAN	27	90510	1 (1)	1 (1)	0.04	Plasminogen OS=Homo sapiens GN=PLG PE=1 SV=2
129	KIF26B_HUMAN	26	223744	9 (1)	9 (1)	0.02	Kinesin-like protein KIF26B OS=Homo sapiens GN=KIF26B PE=1 SV=1
130	TMSL1_HUMAN	26	5067	3 (1)	3 (1)	0.85	Thymosin beta-4-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=TMSL1 PE=2 SV=1
131	CAND1_HUMAN	24	136289	9 (1)	7 (1)	0.03	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 OS=Homo sapiens GN=CAND1 PE=1 SV=2
132	NTF2_HUMAN	22	14469	1 (1)	1 (1)	0.27	Nuclear transport factor 2 OS=Homo sapiens GN=NUTF2 PE=1 SV=1
133	BAT1_HUMAN	18	53446	4 (1)	4 (1)	0.07	B(0,+)-type amino acid transporter 1 OS=Homo sapiens GN=SLC7A9 PE=1 SV=1
134	LMBR1_HUMAN	16	55062	2 (1)	2 (1)	0.07	Limb region 1 protein homolog OS=Homo sapiens GN=LMBR1 PE=2 SV=1