

## 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

#### 8. 非標識定量プロテオーム解析による糖尿病腎症の新規バイオマーカー探索

高倉 美智子、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

#### 研究要旨

糖尿病腎症を早期に発見することは腎不全への進展防止のために重要である。糖尿病腎症の診断マーカーの一つとして汎用されている尿中アルブミン量測定法は初期腎症の診断法として有用であるが、近年、抗体との反応性が低下した尿中アルブミンの存在など尿中アルブミンの質的な変化が問題になりつつある。今回我々は糖尿病腎症の発症・進展に関連する新規尿中因子を探索することを目的に非標識定量法を用いた尿プロテオーム解析を行った。2型糖尿病患者(T2DM)6名、顕性アルブミン尿を呈する糖尿病腎症患者(DN3)6名より随時尿を対象に非標識定量プロテオーム解析を行い、両群間で差異が大きい尿中タンパク質同定を試みた。LC-MS/MS解析の結果、両群間で3倍以上の発現変動を認めるタンパク質が Retention time (RT) 30~80分、Mascot Score 20以上、P値 0.05未満の条件下で30種類同定された。30タンパク質のうち multiple reaction monitoring (MRM) transition が設定可能であった25タンパク質の発現変動について独立した集団(T2DM群18名、DN3群15名)を用いて解析した結果、16タンパク質の発現変動が検証された。重回帰分析の結果、7タンパク質が尿中アルブミン・クレアチニン比と関連した。早期腎症以降への進展を基準評価としたROC解析では、これまで2型糖尿病や糖尿病腎症との関連が報告されていないタンパク質1種を含む6タンパク質(afamin, CD44 antigen, alpha-1-antitrypsin, Ig alpha-1 chain C region, WAP four-disulfide core domain protein 2, alpha-1-acid glycoprotein 1)が腎機能評価に用いられるeGFRよりも優れた判別能を示した。さらに臨床情報を説明変数とした多重ロジスティック回帰分析の結果、早期腎症以降への進展に及ぼす因子としてafamin (オッズ比:1.71; 95% CI:1.16-2.52;  $p=0.007$ )、ならびにCD44 (オッズ比:0.98, 95% CI:0.96-0.99,  $p=0.004$ )が選択された。AfaminとCD44のそれぞれのカットオフ値を用いることにより感度、特異度がいずれも100%を示し、本研究での検証集団をより正確に判定することが出来た。本研究にて同定された尿タンパク質の発現変動と糖尿病腎症との関連をより大規模な集団において検証する必要があるものの、これらの尿中蛋白質は糖尿病腎症の発症・進展をより早期に検出する診断・予測マーカーとなる可能性がある。

## A. 研究目的

本邦をはじめとする先進国では糖尿病患者数が年々急増しており、糖尿病に特徴的な合併症である糖尿病性細小血管症は、自覚症状がなく非可逆的に進行する。糖尿病腎症は我が国で透析導入される患者の主要原疾患の第一位を占める疾患であり、透析療法の導入は糖尿病患者のQOLを著しく低下させるばかりでなく、生命予後がきわめて不良となる。糖尿病腎症の診断には尿検査が重要であり、微量アルブミン尿は糖尿病や各種腎疾患の早期発見・治療評価などの指標として汎用されている。ところが近年、抗体非反応性アルブミン・酸化型アルブミン・質量の異なるアルブミンの存在が明らかとなり、免疫学的測定法にて把握しきれない尿中アルブミンの質的な変化が問題になりつつある。

現在、臨床の現場で糖尿病患者から収集可能な臨床検体は、収集の容易さからほぼ血液や尿に限定される。しかし血液(血清あるいは血漿)や尿タンパク質のプロテオーム解析では、タンパク質濃度のダイナミックレンジが広いことや高濃度タンパク質(アバンドントタンパク質)の存在が解析の障害となる。加えて、質量分析装置は存在量の多いタンパク質から優先的に測定するという特徴を有するため、尿プロテオーム解析ではアルブミン、IgGなどをはじめとする多量タンパク質が多く同定されてしまう傾向にある。実際、CE-MSを用いた尿中ペプチドマーカ

探索した報告では、273ものペプチドバイオマーカーのうち74%がコラーゲン断片であることが報告されている(Proteomics Clin Appl 2011, 5: 367-374)。したがって、既報のショットガンプロテオミクスによるバイオマーカー探索アプローチでは、機能性タンパク質に多く見られるng/mLオーダー以下の低濃度で存在する新規関連タンパク質を同定することは困難であることが推察される。

そこで本研究では、糖尿病腎症に関連するより低濃度なバイオマーカータンパク質を同定することを目的として、非標識定量法を用いた定量プロテオミクスにより尿中関連タンパク質の同定を試みた。非標識定量法を用いた定量プロテオミクスは、測定したサンプルのLC-MSデータをretention time, m/z, シグナル強度の3次元に集約し比較解析する方法であり、多検体の比較解析に有用な方法である。この方法では、比較サンプル群間で有意な変動を示すピークを拾い出し、拾い出したピークに標的を絞ってタンパク質同定を行うため、網羅的なショットガンプロテオミクス法では同定されにくいタンパク質を優先的に同定することが可能となる(Mol Cell Proteomics 2006, 5:573-588)。本研究ではまず2型糖尿病患者、顕性蛋白尿を呈する糖尿病腎症患者から採取した尿検体を用いて非標識定量プロテオミクス解析を行い、両群間で発現変動を示すタンパク質群を同定した。独立した集団にて発現変動が検証されたタンパク質を対象に尿中アルブミン・クレア

チニン比と関連するタンパク質を解析した結果、これまでに 2 型糖尿病や糖尿病腎症との関連が報告されていないタンパク質 1 種を含む 6 タンパク質の同定に成功した。

## B. 研究方法

### 1. 解析対象検体

独立行政法人国立国際医療研究センター病院 糖尿病・代謝・内分泌科に通院する微量アルブミン尿を呈していない 2 型糖尿病患者 (T2DM, 男性 4 名、女性 2 名)、腎症病期 3 期の糖尿病腎症患者 (DN3, 男性 4 名、女性 2 名) から採取した随時尿を探索用検体とした (表 1)。検証用検体として、T2DM (男性 8 名、女性 10 名)、DN3 (男性 10 名、女性 5 名) に加え、腎症病期 2 期の糖尿病腎症患

者 (DN2, 男性 10 名、女性 10 名) から採取した随時尿を解析対象とした。2 型糖尿病の診断は日本糖尿病学会の「糖尿病分類と診断基準に関する委員会報告」に基づいて行った。また、独立行政法人国立国際医療研究センター病院人間ドックに来院した男性 17 名、女性 10 名より随時尿を採取し、検証用検体における健常者対照群 (H) とした。これら検証用検体の臨床情報を表 2 に示す。

本研究の実施に当たり、事前に独立行政法人国立国際医療研究センター倫理委員会にて研究遂行内容の承認を受けた。被験者に対しては、研究趣旨や利益、不利益、権利などを十分に説明し、インフォームドコンセントが得られた被験者からのみ検体を採取した。

Table 1: Characteristics of individuals examined in this study

	Type 2 diabetes mellitus (T2DM) (M4, F2)		Diabetic nephropathy with macroalbuminuria (DN3) (M4, F2)		P value*
	Mean	SD	Mean	SD	
Age (year)	60.2	4.8	63.5	1.9	0.10
T2DM Duration (year)	12.3	5.8	14.5	10.8	0.63
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.7	4.5	25.6	5.7	0.87
SBP (mmHg)	121.2	14.1	137.7	13.6	0.10
DBP (mmHg)	69.6	11.5	72.2	15.8	0.86
AST (IU/l)	26.6	12.5	22.3	3.2	0.65
ALT (IU/l)	28.2	16.4	21.0	7.1	0.38
γ-GTP (IU/l)	40.0	24.5	21.5	15.4	0.10
TC (mg/dL)	160.2	21.3	182.3	29.5	0.26
HDL (mg/dL)	43.5	7.5	48.5	10.8	0.52
TG (mg/dL)	88.8	14.9	141.0	91.1	0.47
Fasting glucose (mg/dL)	131.7	28.2	126.8	36.5	0.87
HbA1c (%)	7.6	0.7	6.7	0.9	0.09
Creatinin (mg/dL)	0.6	0.1	0.9	0.3	0.05
Uric acid (mg/dL)	6.6	4.7	5.8	0.9	0.67
eGFR (mL/minute per 1.73 m <sup>2</sup> )	95.5	19.4	66.6	22.1	0.02
Albumin Creatinin ratio (mg/g Cre)	9.9	4.6	1097.5	757.2	0.004

\*Mann-Whitney U test

Table 2. Characteristics of healthy control, type 2 diabetic, and diabetic nephropathy subjects for the validation study.

	Healthy	T2DM	Diabetic nephropathy with microalbuminuria (DN2)	Diabetic nephropathy with macroalbuminuria (DN3)	p-values*
Age (year)	57.7 ± 7.8	62.3 ± 4.1	61.0 ± 6.5	61.1 ± 7.2	0.26
Sex (male/female)	17/10	8/10	10/10	10/5	0.51
T2DM Duration (year)	-	16.7 ± 7.8	15.4 ± 8.8	14.9 ± 9.8	0.57
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.2 ± 3.0	25.0 ± 4.1	25.9 ± 4.8	27.1 ± 8.6	0.03
SBP (mmHg)	117.1 ± 10.0	121.4 ± 13.6	128.9 ± 14.8	131.6 ± 9.4	0.002
DBP (mmHg)	74.1 ± 9.3	69.6 ± 10.4	72.4 ± 9.6	68.8 ± 12.2	0.44
AST (IU/l)	24.0 ± 6.1	22.5 ± 8.7	23.9 ± 9.1	29.6 ± 13.3	0.25
ALT (IU/l)	22.3 ± 8.6	26.6 ± 16.4	27.7 ± 19.3	30.2 ± 18.1	0.81
γ-GTP (IU/l)	30.8 ± 15.4	33.1 ± 18.5	35.7 ± 32.3	146.3 ± 365.3	0.28
TC (mg/dL)	192.9 ± 18.4	195.8 ± 33.6	180.9 ± 16.4	172.4 ± 33.4	0.048
HDL (mg/dL)	65.7 ± 17.0	57.5 ± 16.5	51.2 ± 10.2	54.7 ± 20.3	0.045
TG (mg/dL)	86.4 ± 30.6	114.1 ± 60.2	111.3 ± 43.6	167.7 ± 134.7	0.12
Fasting glucose (mg/dL)	91.8 ± 6.4	142.7 ± 50.7	147.1 ± 40.8	168.6 ± 105.3	<0.001
HbA1c (%)	5.2 ± 0.3	7.0 ± 1.0	7.6 ± 1.1	7.1 ± 1.3	<0.001
Creatinin (mg/dL)	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.3	1.2 ± 0.9	0.20
Uric acid (mg/dL)	5.3 ± 1.2	4.7 ± 1.0	5.1 ± 1.4	5.9 ± 1.5	0.09
eGFR (mL/minute per 1.73 m <sup>2</sup> )	84.9 ± 19.2	76.2 ± 18.6	70.9 ± 18.8	64.3 ± 34.3	0.05
Albumin Creatinin ratio (mg/g Cre)	6.1 ± 3.7	10.8 ± 6.4	77.9 ± 50.9	1581.7 ± 2198.9	<0.001

\*Kruskal-Wallis test

## 2. 検体の分離と精製

患者より採取した随時尿検体は 3000×g, 10 分, 4°C で遠心分離を行い、不純物を取り除いたのち速やかに凍結し解析に用いるまで -80°C にて保管した。各群の検体は、3 kDa cut off の Amicon Ultrafree の限外ろ過で脱塩と濃縮を行った後に Albin & IgG Drpletion SpinTrap (GE Healthcare) にて尿中多量タンパク質を除去した。再び、3 kDa cut off の Amicon Ultrafree の限外ろ過で脱塩と濃縮を行い乾固した後に 12 mM sodium deoxycholate (SDC)/12 mM sodium N-lauroylarcosinate (SLS) にて溶解し、95°C 5 分の変性、ならびに

37°C にて Lys-C、トリプシンによる酵素消化を行った。さらに DTT を加え 37°C、1 時間、ヨードアセトアミドで暗室 1 時間反応させ還元アルキル化を行った。界面活性剤の除去は Phase Transfer Surfactant 法 (J. Proteome Res., 2008, 7: 731–740) にて行い、Mono Spin C18 (GE Healthcare) にて精製後、得られたペプチドを LC-MS 解析用サンプルとした。

## 3. LC-MS 測定、ならびに非標識定量解析

断片化された尿ペプチドサンプルの測定は、QSTAR Elite system (Applied Biosystems) に PAL/Paradigm LC system (ARM) を接続した

装置を用いた。カラムは 0.3 × 5 mm L-trap column と 0.1 × 150 mm L-column (財団法人化学物質評価研究機構)を用いて、流速 300 nL/min、A 溶媒 (2% ACN and 0.1%FA)、B 溶媒 (90% ACN and 0.1%FA) で 175 min 間 (グラジエント 5–30% B, 20 min); 30–95% B, 1 min; 95% B, 3 min; 95–5% B, 1 min; 5% B, 10 min) 測定を行った。質量分析器のピーク検出と正規化、定量化は 2DICAL ソフトウェア (三井情報株式会社) を用いた。ピークのターゲットは、保持時間 (RT) 10-100min、ピークの最大強度 30 以上、P 値 0.05 未満のピークを選出した。選出されたピークは T2DM と DN3 で強度比に差のあるピークを目視により選別し LC-MS/MS 測定を行った。

#### 4. LC-MS/MS 測定

タンパク質同定に当たっては 2DICAL のピーク情報をもとに m/z と RT を include list に設定し LC-MS/SM 測定を行った。得られたターゲットピーク情報から SwissProt データベースと Mascot ソフトウェア (Matrix science) を用いてタンパク質同定を行い、2DICAL 上のピークに対応させた。Mascot ソフトウェアの検索パラメーターには、MS の許容誤差 0.1Da、MS/MS の許容誤差 0.1Da、固定修飾 carbamidomethyl (C)、可変修飾 acetyl (N-term)、deamidated (NQ)、oxidation (M)、価数 2+, 3+, 4+ を用いた。T2DM 群と DN3 群の発現差異を認めるピークの選定には、DN3 群のピーク定量値が T2DM 群のピーク定量値に

対して 3 倍以上、RATIO P 値 < 0.05、Mann-Whitney U 検定による P 値 < 0.05、Mascot Score  $\geq$  20 の指標を用いた。

#### 5. MRM 定量解析

H 群、T2DM 群、DN2 群、DN3 群から構成される尿検体 80 サンプルを用いて、非標識定量解析にて同定された発現変動タンパク質群の検証を行った。バイオマーカー候補タンパク質群の相対タンパク質濃度は MRM 法により算出した。MRM transition には、Mascot データからペプチドの親イオンの m/z を Q1 とし、フラグメントイオンの m/z を Q3 とし設定した。また、Enhanced Product Ion (EPI) -MS/MS にてタンパク質の同定を行い、設定した MRM transition により標的ペプチド配列が同定されることを確認した。なお、EPI-MS/MS にて同定出来ないペプチド配列に関しては、合成ペプチドを用い分析用試料と同時測定して MRM 取得ピーク、溶出時間が一致することを確認した。尿検体の酵素消化産物に内部標準ペプチドとして安定同位体元素標識ペプチド 30 fmol を加え、分析用試料として MRM 測定を行った。MRM 定量解析は、4000QTrap (AB Sciex) に LC800 HPLC system (GL) を接続したシステムを用いて行った。カラムは ACQUITY UPLC BET C18 カラム (Waters) を用いて流速 100 nL/min, 0%-30% B で 90 分直線濃度勾配にて溶出した。Multiquant Software 2.0 (AB Sciex) にて MRM 測定により

得られた各ペプチドのシグナル面積値を内部標準物質より得られたペプチドのシグナル面積値で補正し、相対タンパク質濃度を算出した。

## 6. 統計解析

各測定値は平均値±標準偏差で示した。2群間の有意差検定はMann-Whitney U testにて、多群間の有意差についてはKruskal-Wallis検定にて行い、 $p < 0.05$ を有意とした。重回帰分析、receiver-operating characteristic (ROC) 解析はIBM SPSS statistics 20ソフトウェアにて行った。

## C. 研究結果

T2DMおよびDN3の各6名ずつの検体から尿中タンパク質を精製しプロテアーゼ消

化を行った。2DICALを用いた解析により合計3,334ピークが得られ、そのうち保持時間 (RT) 10-100min、ピークの最大強度30以上、P値0.05未満のピークは234であった。図1に全てのすべてのMSピークの2次元ゲル画像を示す。m/zをX軸、RTをY軸とし、最大強度30以上あった234ピークを黄色で強調した。選出された234ピークのなかで、DN1とDN3で強度比に有意な差のある107ピークを目視により選別した(図2)。これら107ピークのLC-MS/MS測定により、T2DM群に対してDN3群で3倍以上の有意な発現変動を示すタンパク質が30種類同定された(表3)。それら30種類のタンパク質のなかで、メチオニンの酸化もしくは、miss cleavageの

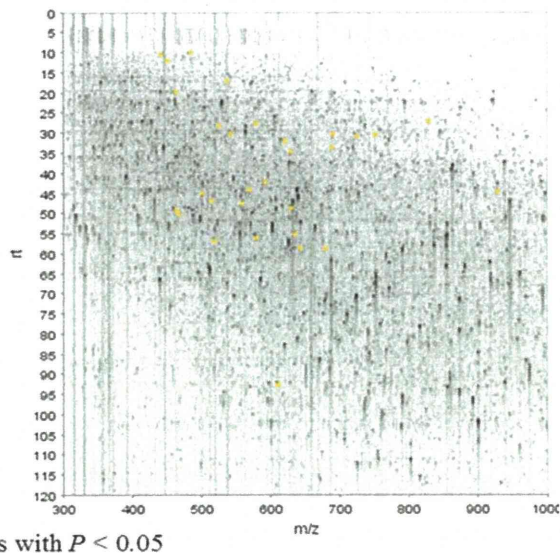


Figure 1. Two-dimensional display of all MS peaks. The 107 MS peaks whose mean intensities significantly differed between DN1 and DN3 ( $P < 0.05$ , Welch's t-test) are highlighted in red. RT: retention time.

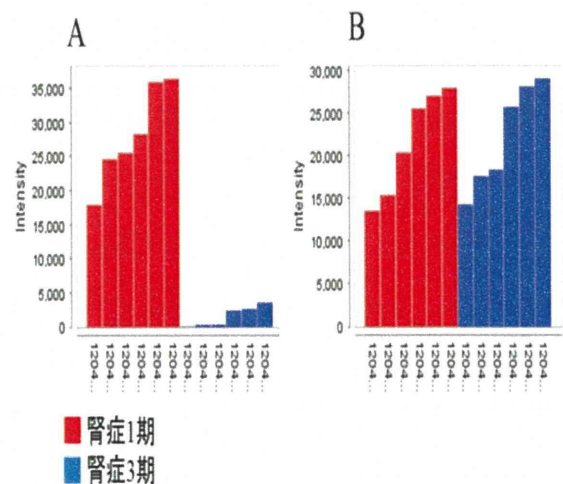


Figure 2. A, B: MS peaks of peak in duplicate LC-MS runs (6 with DN3 (left) and 6 with DN1(right)) aligned along LC RT. Columns represent the mean intensities of triplicate runs.

Table 3. Summary of protein identification by tandem mass spectrometry

ID	m/z	RT	Charge	T2DM (mean±SD)	DN3 (mean±SD)	Pvalues*	Mascot score	Peptide sequence	Protein description
50	632.9	55.2	2	51±36	4778±6415	3.2E-03	92.7	SGLSTGWTQLSK	Alpha-1B-glycoprotein
141	608.4	92.5	2	36±34	2033±3574	1.6E-03	84.7	ITLLSALVETR	Alpha-1-antichymotrypsin
1481	556.8	47.4	2	21±12	1148±1749	3.9E-04	76.9	SDVVYTDWK	Alpha-1-acid glycoprotein 1
143	676.9	58.6	2	5±3	3289±2267	3.9E-04	72.6	AREDFIMETLK	Zinc-alpha-2-glycoprotein
202	688.3	30.2	2	52±87	2442±2893	1.4E-02	67.4	TFTCTAAYPESK	Ig alpha-1 chain C region
65	567.3	44.0	2	1842±3798	38±17	8.2E-04	65.2	VFMYLSDSR	Uromodulin
514	626.8	34.5	2	13±7	822±737	2.9E-02	64.3	MFTTAPDQVDK	Ceruloplasmin
231	577.3	56.1	2	3299±2412	68±57	1.2E-03	63.8	ALSIGFETCR	CD44 antigen
3130	524.3	28.1	2	11±10	59±52	1.2E-03	62.5	CNSLSLLEK	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2
12	461.7	19.7	2	245±415	12965±9338	2.3E-03	59.3	FLENEDR	Alpha-1-antitrypsin
1	499.3	44.9	2	351±794	23692±12235	1.6E-03	55.1	ASYLDCIR	Serotransferrin
783	540.8	30.1	2	4±1	478±371	4.3E-03	54.4	TLSDYNIQK	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a
293	750.4	30.5	1	38±66	1968±1452	3.9E-04	45.4	FIEDVK	Obscurin
253	482.8	9.8	2	19±20	1482±1730	2.3E-03	44.6	HHGPTITAK	Protein AMBP
1228	723.4	30.7	1	6±3	146±214	5.7E-04	36.6	EGENFK	Tetratricopeptide repeat protein 9A
435	590.8	42.1	2	29±25	1883±1703	1.2E-03	36.3	WLDGTSPDYK	Collectin-12
209	448.8	11.9	2	5±4	84±50	3.9E-04	32.1	HLELKEK	N-alpha-acetyltransferase 10
358	561.3	38.4	2	17±13	168±330	4.3E-03	22.8	FVDPNTQEK	Epiplakin
77	512.8	46.7	2	2369±5553	75±79	1.7E-01	36.6	MALEVGDYK	Cadherin-1
410	707.4	27.1	1	33±85	1557±1751	1.6E-03	26.9	PGLYNK	Dynein heavy chain 17
97	686.5	33.7	1	53±55	1543±133	3.9E-04	53.9	AVDIVK	Poly [ADP-ribose] polymerase 14
134	474.3	33.7	1	93±105	2766±1967	3.9E-04	26.0	GGPVK	Probable E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12
59	640.4	58.5	2	33±28	8903±9672	5.7E-04	31.2	NLLEQIVLPLK	Metastasis-associated in colon cancer protein 1
825	516.8	56.7	2	9±8	605±640	8.2E-04	30.0	AIPVTQYLK	Afamin
870	577.3	27.4	1	7±5	472±882	3.9E-04	29.2	TDITK	NADPH:adrenodoxin oxidoreductase, mitochondrial
504	465.8	50.1	2	427±801	12±15	3.9E-04	28.1	FSSQFVSK	SUN domain-containing protein 1
792	462.2	49.1	2	931±818	47±45	8.2E-04	28.1	VSCVTPNF	WAP four-disulfide core domain protein 2
386	618.8	31.9	2	1019±1597	14±7	3.9E-04	26.9	VAGPWGGLVQR	Abhydrolase domain-containing protein 4
210	627.5	48.6	1	15±19	1806±2718	7.0E-04	26.2	IIILR	Dynein heavy chain 12, axonemal
437	927.5	44.5	1	11±4	961±2107	7.0E-04	22.8	SGLTEHQK	Zinc finger protein 613

RT, retention time; T2DM, type 2 diabetes mellitus without nephropathy; DN3, diabetic nephropathy with macroalbuminuria. \*: Mann-Whitney U test.

存在が推定された5種類のタンパク質を除く25種類のタンパク質(発現上昇タンパク質:20、発現減少タンパク質:5)について、一斉分析が可能な定量解析法であるMRM法を用いて尿中相対タンパク質濃度を測定した。MRM法のtransition設定は以下に従って行った。すなわち、Mascotデータからペプチドの親イオンのm/zをQ1とし、フラグメントイオンのm/zをQ3の値とした111組のtransitionで測定した。EPI-MS/MS測定により、12種類の標的ペプチド配列が同定され、残り13種類のタンパク質については合成ペプチ

ドを用いてMRM transitionの確認を行った。25種類のタンパク質を標的とするMRM transitionを用いて、T2DM群18名、DN3群15名の検体の尿中相対タンパク質濃度を測定した。25種類のタンパク質中19種類のタンパク質がH群、T2DM群、DN2群、DN3群間で有意な発現変動を示した。このうち非標識定量解析と同様の発現変動が検証されたタンパク質は16種類(発現上昇タンパク質:13、発現減少タンパク質:3)だった。

糖尿病腎症の早期尿中関連因子を絞り込む目的で、H群27名、DN2群20名におけ



る25蛋白質の尿中相対タンパク質濃度を追加測定し先のデータと併せて重回帰分析を行った。解析の結果、尿中アルブミン・クレアチニン比にafamin ( $\beta$ :0.33,  $p=1.8 \times 10^{-7}$ )、CD44 antigen ( $\beta$ :-0.17,  $p=1.5 \times 10^{-3}$ )、alpha-1-antitrypsin ( $\beta$ :0.21,  $p=7.5 \times 10^{-5}$ )、epiplakin ( $\beta$ :0.21,  $p=4.9 \times 10^{-6}$ )、Ig alpha-1 chain C region ( $\beta$ :0.15,  $p=1.5 \times 10^{-3}$ )、WAP four-disulfide core domain protein 2 ( $\beta$ :-0.15,  $p=6.4 \times 10^{-3}$ )、alpha-1-acid glycoprotein 1 ( $\beta$ :0.12,  $p=0.027$ )の7タンパク質が関連することが示された。早期腎症以降への進展を基準評価としたROC解析では、epiplakinを除くafamin (AUC:93.5%)、CD44 antigen (AUC:90.7%)、alpha-1-antitrypsin (AUC:81.4%)、Ig alpha-1 chain C region (AUC:75.2%)、WAP fou

r-disulfide core domain protein 2 (AUC:77.3%)、alpha-1-acid glycoprotein 1 (AUC:87.6%)の6タンパク質が良好な診断能を示した。なお、腎機能評価に用いられるeGFRのROC曲線下面積は64.9%であり、本研究での検証集団における判定能はeGFRよりも上記6タンパク質の方が優れていた。

さらに上記6タンパク質に加えて性別、糖尿病罹病期間、BMI、収縮期血圧、トリグリセリド、空腹時血糖、HbA1c、eGFRを説明変数とした多重ロジスティック回帰分析を行った。早期腎症以降への進展に及ぼす因子として afamin (オッズ比:1.71; 95% CI:1.16-2.52;  $p=0.007$ )、ならびに CD44 (オッズ比:0.98, 95% CI:0.96-0.99,  $p=0.004$ )が選択された。Afamin と CD44 のそれぞれのカットオフ値を用いることにより感度、特異度がいずれも 100% を示し、

Table 4. Diagnostic discrimination between diabetic nephropathy patients (DN2 and DN3) and non-diabetic nephropathy subjects (H and T2DM).

Protein description	Cutoff value	Sensitivity, %	Specificity, %
Afamin	8.7	93.5	87.0
CD44 antigen	250.5	79.5	89.5
Alpha-1-antitrypsin	7.5	70.6	74.4
Epiplakin	3.3	71.4	64.3
Ig alpha-1 chain C region	16.6	67.6	75.0
WAP four-disulfide core domain protein 2	58.1	63.8	83.3
Alpha-1-acid glycoprotein 1	523.9	77.8	82.9
Afamin/CD44 antigen	8.7/250.5	100	100



本研究での検証集団をより正確に判定することが出来た(表 4)。

#### D. 考察

本研究で我々は非標識定量法を用いたプロテオーム解析により、T2DM 群、DN3 群の両群間で発現量に有意差を認める 30 種類のタンパク質を同定した。MRM 定量解析が可能であった 25 タンパク質を対象に T2DM 群、DN3 群の尿中タンパク質濃度を測定した結果、16 種類のタンパク質(発現上昇タンパク質:13、発現減少タンパク質:3)の発現変動が独立集団においても検証された。尿中アルブミン・クレアチニン比との関連が示された 7 タンパク質のうち、afamin は糖尿病、ならびに糖尿病性血管合併症に関する血清・尿プロテオーム解析にてその発現が上昇することが報告されているものの、その機能、意義についての報告はほとんど見られない。CD44 はヒアルロン酸を始めとする細胞外マトリックスと結合する接着分子であり、(1) リンパ球ホーミング、(2) リンパ球活性化、(3) 細胞-細胞間接着及び細胞-基質間接着、(4) 細胞運動、(5) 癌細胞増殖・転移などに深く関与していることが報告されている。CD44 の機能は発現量だけでなく、alternative splicing variant isoforms の発現、糖鎖付加やリン酸化等の翻訳後修飾によっても制御される。近年、CD44 は癌幹細胞マーカーとしての役割ばかりでなく、糖尿病腎症モデルである OVE26 マウス腎尿細管、ラット虚血腎モデルでの浸潤炎症細胞、腎移植後の急性拒

絶反応時の尿においても発現上昇するとの報告があり、糖尿病腎症との関連も示唆されている。一方、WAP Four-Disulfide Core Domain Protein 2 (WFDC2) は WAP (Whey Acidic Protein)ファミリーに属する分子量約 25 kDa の分泌型糖タンパク質であり、HE4 (Human Epididymal Protein 4)とも呼ばれる。WFDC2/HE4 は、正常な男女の生殖管上皮、上気道、唾液腺管、胸部で発現しているほか、遠位曲尿細管、結腸、子宮内膜でも可変的な発現が見られる。肺腺癌および肺嚢胞性線維症、子宮体癌、卵巣癌と WFDC2/HE4 発現との関連が報告されているものの、2 型糖尿病や糖尿病腎症との関連はこれまでのところ報告されていない。

本研究にて同定された尿タンパク質の発現変動と糖尿病腎症との関連をより大規模な集団において検証する必要があるものの、これらの尿中蛋白質は糖尿病腎症の発症・進展をより早期に検出する診断・予測マーカーとなる可能性がある。

#### E. 健康危険情報

該当事項なし

#### F. 研究発表

論文:

該当事項なし

学会発表:

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1.特許取得

出願準備中

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

9. 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。

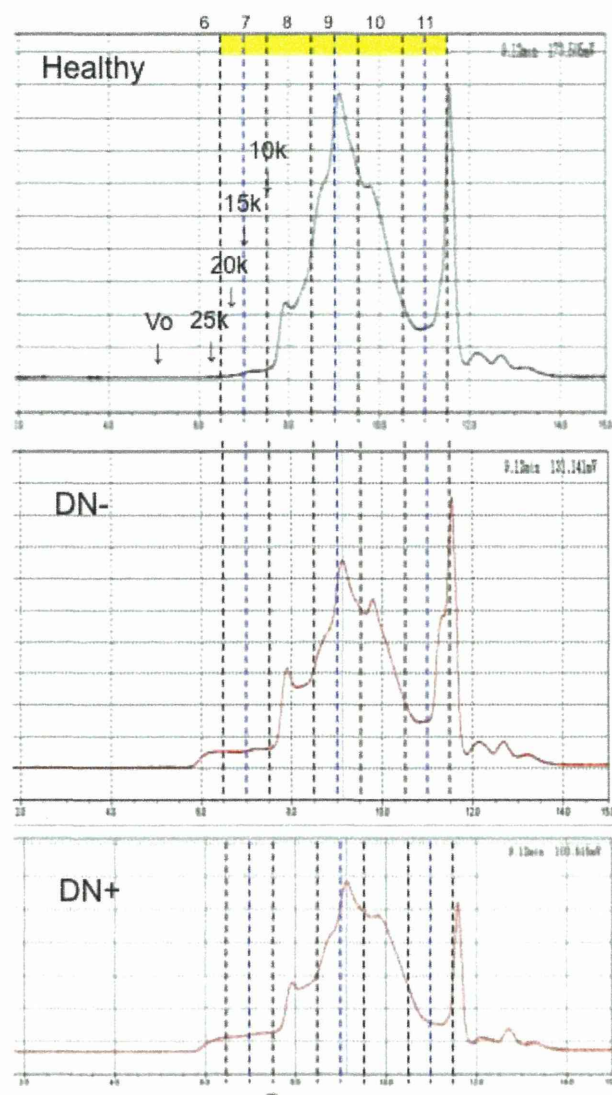


Fig. 1 前処理後の尿のゲルろ過クロマトグラム

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		
1	UROM_HUMAN	2069	69714	179 (127)	56 (37)	6.9	Uromodulin OS=Homo sapiens GN=UMOD PE=1 SV=1	
3	PCSK1_HUMAN	853	27356	34 (29)	17 (12)	3.74	ProSAAS OS=Homo sapiens GN=PCSK1N PE=1 SV=1	
4	OSTP_HUMAN	580	35401	56 (39)	27 (19)	8.15	Osteopontin OS=Homo sapiens GN=SPP1 PE=1 SV=1	
5	ALBU_HUMAN	580	69321	97 (39)	65 (30)	5.15	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2	
6	PIGR_HUMAN	499	83232	82 (29)	54 (20)	1.49	Polymeric immunoglobulin receptor OS=Homo sapiens GN=PIGR PE=1 SV=4	
7	SAP_HUMAN	477	58074	29 (17)	10 (6)	1.1	Proactivator polypeptide OS=Homo sapiens GN=PSAP PE=1 SV=2	
10	CLUS_HUMAN	403	52461	21 (16)	10 (8)	0.73	Clusterin OS=Homo sapiens GN=CLU PE=1 SV=1	
11	LTBP2_HUMAN	361	19493	6	24 (15)	23 (14)	0.3	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=LTBP2 PE=1 SV=2
12	UBIQ_HUMAN	357	8560	14 (13)	14 (13)	157.05	Ubiquitin OS=Homo sapiens GN=RPS27A PE=1 SV=1	
14	GRN_HUMAN	300	63500	26 (15)	19 (9)	0.67	Granulins OS=Homo sapiens GN=GRN PE=1 SV=2	
15	HBB_HUMAN	275	15988	32 (16)	21 (11)	12.52	Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2	
16	SLUR1_HUMAN	257	11178	19 (12)	6 (5)	7.35	Secreted Ly-6/uPAR-related protein 1 OS=Homo sapiens GN=SLURP1 PE=1 SV=2	
17	VGFB_HUMAN	256	67218	32 (17)	24 (14)	1.12	Neurosecretory protein VGF OS=Homo sapiens GN=VGFB PE=1 SV=2	
18	LMAN2_HUMAN	215	40203	15 (8)	9 (5)	0.86	Vesicular integral-membrane protein VIP36 OS=Homo sapiens GN=LMAN2 PE=1 SV=1	
19	A1AT_HUMAN	200	46707	24 (10)	19 (7)	0.85	Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 PE=1 SV=3	
21	FETUA_HUMAN	173	39300	18 (8)	17 (8)	1.07	Alpha-2-HS-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AHSG PE=1 SV=1	
22	MSMB_HUMAN	172	12856	21 (10)	11 (6)	2.79	Beta-microseminoprotein OS=Homo sapiens GN=MSMB PE=1 SV=1	
23	FIBB_HUMAN	161	55892	11 (8)	8 (5)	0.38	Fibrinogen beta chain OS=Homo sapiens GN=FGB PE=1 SV=2	
24	MASP2_HUMAN	160	75685	25 (13)	23 (12)	0.77	Mannan-binding lectin serine protease 2 OS=Homo sapiens GN=MASP2 PE=1 SV=3	
25	VEGFA_HUMAN	151	27024	8 (6)	6 (4)	0.93	Vascular endothelial growth factor A OS=Homo sapiens GN=VEGFA PE=1 SV=2	
26	ISK1_HUMAN	149	8501	9 (6)	7 (5)	6.01	Pancreatic secretory trypsin inhibitor OS=Homo sapiens GN=SPINK1 PE=1 SV=2	
27	HEPC_HUMAN	146	9402	14 (9)	11 (8)	23.56	Hepcidin OS=Homo sapiens GN=HAMP PE=1 SV=2	
28	FN1_HUMAN	141	26244	2	14 (4)	13 (4)	0.06	Fibronectin OS=Homo sapiens GN=FN1 PE=1 SV=3
29	COLL1_HUMAN	140	29405	3 (3)	2 (2)	0.27	Pro-opiomelanocortin OS=Homo sapiens GN= POMC PE=1 SV=2	
31	DEFB1_HUMAN	117	7415	7 (6)	5 (4)	4.86	Beta-defensin 1 OS=Homo sapiens GN=DEFB1 PE=1 SV=1	
32	TFF1_HUMAN	116	9143	8 (3)	5 (2)	2.01	Trefoil factor 1 OS=Homo sapiens GN=TFF1 PE=1 SV=1	
33	HBA_HUMAN	115	15248	11 (6)	10 (6)	2.92	Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2	
34	PGRC1_HUMAN	108	21658	6 (4)	5 (3)	0.63	Membrane-associated progesterone receptor component 1 OS=Homo sapiens GN=PGRC1 PE=1 SV=3	
35	CYTBB_HUMAN	107	11133	10 (8)	9 (7)	7.51	Cystatin-B OS=Homo sapiens GN=CSTB PE=1 SV=2	
36	ITIH2_HUMAN	106	10639	7	7 (2)	6 (1)	0.03	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 OS=Homo sapiens GN=ITIH2 PE=1 SV=2
37	TNFRSF12A_HUMAN	103	13902	5 (4)	4 (3)	1.7	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 12A OS=Homo sapiens GN=TNFRSF12A PE=1 SV=1	
38	EGF_HUMAN	100	13390	6	23 (5)	19 (3)	0.08	Pro-epidermal growth factor OS=Homo sapiens GN=EGF PE=1 SV=2
39	AMBP_HUMAN	99	38974	9 (6)	7 (4)	0.44	Protein AMBP OS=Homo sapiens GN=AMBP PE=1 SV=1	
40	FBN1_HUMAN	98	31208	3	31 (4)	28 (3)	0.05	Fibrillin-1 OS=Homo sapiens GN=FBN1 PE=1 SV=2
41	TFF2_HUMAN	87	14274	6 (3)	5 (2)	0.62	Trefoil factor 2 OS=Homo sapiens GN=TFF2 PE=1 SV=2	
42	LAMC1_HUMAN	86	17748	9	14 (2)	14 (2)	0.04	Laminin subunit gamma-1 OS=Homo sapiens GN=LAMC1 PE=1 SV=3
43	MAN1A1_HUMAN	84	72922	6 (1)	6 (1)	0.05	Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA OS=Homo sapiens GN=MAN1A1 PE=1 SV=3	
44	S100A8_HUMAN	84	10828	6 (3)	6 (3)	1.55	Protein S100-A8 OS=Homo sapiens GN=S100A8 PE=1 SV=1	
45	SETBP1_HUMAN	84	16951	3	8 (1)	6 (1)	0.02	SET-binding protein OS=Homo sapiens GN=SETBP1 PE=1 SV=2
46	THY1_HUMAN	83	17923	4 (3)	3 (2)	0.48	Thy-1 membrane glycoprotein OS=Homo sapiens GN=THY1 PE=1 SV=2	
47	FCN2_HUMAN	81	33980	11 (3)	9 (3)	0.37	Ficolin-2 OS=Homo sapiens GN=FCN2 PE=1 SV=2	
48	NDUFA1_HUMAN	81	8067	3 (1)	3 (1)	0.51	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 1 OS=Homo sapiens GN=NDUFA1 PE=1 SV=1	
49	IGF2_HUMAN	78	20127	7 (4)	5 (3)	0.69	Insulin-like growth factor II OS=Homo sapiens GN=IGF2 PE=1 SV=1	
50.1	PCLO_HUMAN	78	56630	9	33 (3)	29 (3)	0.02	Protein piccolo OS=Homo sapiens GN=PCLO PE=1 SV=3
50.2	RAPH1_HUMAN	78	13517	1	14 (3)	11 (3)	0.08	Ras-associated and pleckstrin homology domains-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=RAPH1 PE=1 SV=3
50.3	KDM6B_HUMAN	64	18029	9	15 (3)	12 (3)	0.04	Lysine-specific demethylase 6B OS=Homo sapiens GN=KDM6B PE=1 SV=3
50.4	YB047_HUMAN	63	12217	10 (3)	7 (3)	1.32	Putative uncharacterized protein FLJ46838 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	
50.5	WASL_HUMAN	54	54793	6 (2)	6 (2)	0.14	Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein OS=Homo sapiens GN=WASL PE=1 SV=2	
51	MGP_HUMAN	76	12345	10 (5)	7 (4)	2.03	Matrix Gla protein OS=Homo sapiens GN=MGP PE=1 SV=2	
52	DMKN_HUMAN	76	47054	4 (2)	3 (2)	0.16	Dermokine OS=Homo sapiens GN=DMKN PE=1 SV=3	
53	ATNG_HUMAN	75	7279	10 (2)	6 (2)	1.45	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit gamma OS=Homo sapiens GN=FXD2 PE=1 SV=3	
54	FIBA_HUMAN	74	94914	5 (1)	5 (1)	0.04	Fibrinogen alpha chain OS=Homo sapiens GN=FGA PE=1 SV=2	
55	IBP4_HUMAN	70	27915	6 (1)	6 (1)	0.14	Insulin-like growth factor-binding protein 4 OS=Homo sapiens GN=IGFBP4 PE=1 SV=2	
56	MT2_HUMAN	65	6037	6 (4)	4 (4)	7.52	Metallothionein-2 OS=Homo sapiens GN=MT2A PE=1 SV=1	
57	VTNC_HUMAN	68	54271	11 (3)	11 (3)	0.22	Vitronectin OS=Homo sapiens GN=VTN PE=1 SV=1	
58	CMGA_HUMAN	67	50658	1 (1)	1 (1)	0.07	Chromogranin-A OS=Homo sapiens GN=CHGA PE=1 SV=7	
59	AQP2_HUMAN	66	28819	6 (1)	5 (1)	0.13	Aquaporin-2 OS=Homo sapiens GN=AQP2 PE=1 SV=1	
60	FMN1_HUMAN	66	15744	10 (1)	8 (1)	0.02	Formin-1 OS=Homo sapiens GN=FMN1 PE=1 SV=2	

			8					
61	P3IP1_HUMAN	65	28230	5 (2)	5 (2)	0.29	Phosphoinositide-3-kinase-interacting protein 1 OS=Homo sapiens GN=PIK3IP1 PE=1 SV=2	
62	2B19_HUMAN	64	29807	4 (2)	3 (2)	0.27	HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-9 beta chain OS=Homo sapiens GN=HLA-DRB1 PE=2 SV=1	
63	AUGN_HUMAN	62	17173	3 (2)	3 (2)	0.5	Augurin OS=Homo sapiens GN=C2orf40 PE=1 SV=1	
64	PLVAP_HUMAN	61	50562	3 (2)	3 (2)	0.15	Plasmalemma vesicle-associated protein OS=Homo sapiens GN=PLVAP PE=2 SV=1	
65	SHSA5_HUMAN	61	25564	10 (2)	8 (2)	0.32	Protein shisa-5 OS=Homo sapiens GN=SHISA5 PE=2 SV=1	
66	CO1A1_HUMAN	59	17807	7	17 (3)	16 (3)	0.06	Collagen alpha-1(XVIII) chain OS=Homo sapiens GN=COL18A1 PE=1 SV=5
67	FBLN4_HUMAN	59	49372	5 (2)	5 (2)	0.16	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2 OS=Homo sapiens GN=EFEMP2 PE=1 SV=3	
68	HEPS_HUMAN	58	44982	3 (1)	3 (1)	0.08	Serine protease hepsin OS=Homo sapiens GN=HPN PE=1 SV=1	
69	SRGN_HUMAN	58	17641	1 (1)	1 (1)	0.22	Serglycin OS=Homo sapiens GN=SRGN PE=1 SV=3	
70	FBLN3_HUMAN	55	54604	9 (2)	8 (1)	0.14	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 OS=Homo sapiens GN=EFEMP1 PE=1 SV=2	
71	CTSRB_HUMAN	55	12684	3	6 (1)	6 (1)	0.03	Cation channel sperm-associated protein subunit beta OS=Homo sapiens GN=CATSPERB PE=1 SV=2
72	PRELP_HUMAN	55	43782	9 (1)	7 (1)	0.09	Prolargin OS=Homo sapiens GN=PRELP PE=1 SV=1	
73	COFA1_HUMAN	54	14163	2	14 (1)	13 (1)	0.03	Collagen alpha-1(XV) chain OS=Homo sapiens GN=COL15A1 PE=1 SV=2
74	LAMA4_HUMAN	54	20240	1	12 (1)	12 (1)	0.02	Laminin subunit alpha-4 OS=Homo sapiens GN=LAMA4 PE=1 SV=3
75	APOA1_HUMAN	52	30759	7 (2)	7 (2)	0.26	Apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=1 SV=1	
76	CO1A1_HUMAN	52	13882	7	8 (1)	8 (1)	0.03	Collagen alpha-1(I) chain OS=Homo sapiens GN=COL1A1 PE=1 SV=4
77	TKNK_HUMAN	52	13430	1 (1)	1 (1)	0.29	Tachykinin-3 OS=Homo sapiens GN=TAC3 PE=1 SV=1	
78	RGS5_HUMAN	52	20933	1 (1)	1 (1)	0.18	Regulator of G-protein signaling 5 OS=Homo sapiens GN=RGS5 PE=1 SV=1	
79	SPB4_HUMAN	51	44825	4 (2)	4 (2)	0.17	Serpin B4 OS=Homo sapiens GN=SERPINB4 PE=1 SV=2	
80	GP2_HUMAN	51	59442	6 (1)	2 (1)	0.06	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=CXCL16 PE=2 SV=4	
82	CDSN_HUMAN	49	51463	9 (4)	7 (3)	0.23	Corneodesmosin OS=Homo sapiens GN=CDSN PE=1 SV=2	
83	SULF2_HUMAN	48	10039	0	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	27237	1	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	8635	12 (3)	10 (3)	2.17	Trefoil factor 3 OS=Homo sapiens GN=TFF3 PE=1 SV=1	
88	WISP2_HUMAN	45	26807	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	CT066_HUMAN	43	39468	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	10739	0	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	31585	4	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	11385	5	13 (1)	12 (1)	0.03	Protein SMG5 OS=Homo sapiens GN=SMG5 PE=1 SV=3
99	DYH8_HUMAN	39	51433	5	14 (1)	13 (1)	0.01	Dynein heavy chain 8, axonemal OS=Homo sapiens GN=DNAH8 PE=1 SV=2
100	CO3_HUMAN	39	18703	0	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	14168	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	RENH_HUMAN	34	38993	2 (1)	2 (1)	0.1	Renin receptor OS=Homo sapiens GN=ATP6AP2 PE=1 SV=2	
113	ITIH4_HUMAN	34	10329	3	6 (1)	6 (1)	0.04	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 OS=Homo sapiens GN=ITIH4 PE=1 SV=4
114	K1875_HUMAN	33	18019	2	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	43492	2	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/alphaPAR-related protein 2 OS=Homo sapiens GN=SLURP2 PE=2 SV=1	

119	CO4B_HUMAN	31	19267 3	7 (1)	7 (1)	0.02	Complement C4-B OS=Homo sapiens GN=C4B PE=1 SV=1
120	IGHA2_HUMAN	31	36503	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	NUDT10_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	24349 6	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	22374 4	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	13628 9	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

Table 3 糖尿病で合併症のない患者の尿 (DN-)

Quantitation overview (124 proteins)							
		Score	Mass	Matches	Sequences	emPAI	
1	UROM_HUMAN	1798	69714	142 (89)	54 (29)	3.96	Uromodulin OS=Homo sapiens GN=UMOD PE=1 SV=1
2	PCSK1_HUMAN	1035	27356	37 (33)	17 (14)	5.14	ProSAAS OS=Homo sapiens GN=PCSKIN PE=1 SV=1
3	OSTP_HUMAN	752	35401	58 (40)	29 (18)	7.27	Osteopontin OS=Homo sapiens GN=SPP1 PE=1 SV=1
4	SAP_HUMAN	599	58074	43 (21)	14 (7)	1.38	Proactivator polypeptide OS=Homo sapiens GN=PSAP PE=1 SV=2
5	HBB_HUMAN	592	15988	38 (28)	25 (18)	75.69	Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2
6	ALBU_HUMAN	473	69321	92 (30)	71 (26)	3.51	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2
7	MASP2_HUMAN	455	75685	46 (27)	36 (20)	1.59	Mannan-binding lectin serine protease 2 OS=Homo sapiens GN=MASP2 PE=1 SV=3
8	FETUA_HUMAN	415	39300	36 (23)	30 (18)	5.74	Alpha-2-HS-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AHSG PE=1 SV=1
9	A1AT_HUMAN	415	46707	48 (28)	31 (17)	3.63	Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 PE=1 SV=3
10	PIGR_HUMAN	389	83232	76 (29)	53 (19)	1.28	Polymeric immunoglobulin receptor OS=Homo sapiens GN=PIGR PE=1 SV=4
11	SLUR1_HUMAN	345	11178	22 (18)	8 (6)	19.73	Secreted Ly-6/uPAR-related protein 1 OS=Homo sapiens GN=SLURP1 PE=1 SV=2
12	HBA_HUMAN	268	15248	22 (14)	17 (10)	18.25	Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2
13	LTBP2_HUMAN	257	19493	19 (9)	17 (7)	0.14	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=LTBP2 PE=1 SV=2
14	CLUS_HUMAN	224	52461	16 (11)	11 (6)	0.51	Clusterin OS=Homo sapiens GN=CLU PE=1 SV=1
15	GRN_HUMAN	219	63500	12 (8)	8 (5)	0.33	Granulins OS=Homo sapiens GN=GRN PE=1 SV=2
16	AMBP_HUMAN	204	38974	17 (10)	14 (8)	1.08	Protein AMBP OS=Homo sapiens GN=AMBP PE=1 SV=1
17	VGFR_HUMAN	183	67218	14 (9)	12 (7)	0.45	Neurosecretory protein VGF OS=Homo sapiens GN=VGFR PE=1 SV=2
18	UBIQ_HUMAN	170	8560	7 (5)	7 (5)	6.01	Ubiquitin OS=Homo sapiens GN=RPS27A PE=1 SV=1
19	LMAN2_HUMAN	152	40203	23 (13)	17 (10)	1.91	Vesicular integral-membrane protein VIP36 OS=Homo sapiens GN=LMAN2 PE=1 SV=1
20	SLUR2_HUMAN	151	10153	9 (5)	9 (5)	4.31	Secreted Ly-6/uPAR-related protein 2 OS=Homo sapiens GN=SLURP2 PE=2 SV=1
21	VEGFA_HUMAN	149	27024	5 (5)	4 (4)	0.69	Vascular endothelial growth factor A OS=Homo sapiens GN=VEGFA PE=1 SV=2
22	ISK1_HUMAN	145	8501	9 (5)	8 (5)	6.01	Pancreatic secretory trypsin inhibitor OS=Homo sapiens GN=SPINK1 PE=1 SV=2
23	FN1_HUMAN	143	26244	21 (3)	19 (2)	0.04	Fibronectin OS=Homo sapiens GN=FN1 PE=1 SV=3
24	THR2_HUMAN	137	69992	5 (3)	3 (1)	0.11	Prothrombin OS=Homo sapiens GN=F2 PE=1 SV=2
25	DEFB1_HUMAN	119	7415	8 (5)	7 (4)	4.86	Beta-defensin 1 OS=Homo sapiens GN=DEFB1 PE=1 SV=1
26	ITIH2_HUMAN	118	10639	3 (2)	2 (1)	0.03	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 OS=Homo sapiens GN=ITIH2 PE=1 SV=2
27	ACTB_HUMAN	102	41710	8 (5)	7 (4)	0.41	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1
28	MSMB_HUMAN	100	12856	8 (3)	5 (2)	0.7	Beta-microseminoprotein OS=Homo sapiens GN=MSMB PE=1 SV=1
29	HEPC_HUMAN	98	9402	10 (6)	8 (4)	4.92	Hepcidin OS=Homo sapiens GN=HAMP PE=1 SV=2
30	TFF2_HUMAN	95	14274	4 (2)	3 (2)	0.62	Trefoil factor 2 OS=Homo sapiens GN=TFF2 PE=1 SV=2
31	TFF1_HUMAN	94	9143	5 (3)	4 (2)	2.01	Trefoil factor 1 OS=Homo sapiens GN=TFF1 PE=1 SV=1
32	K10_HUMAN	88	58792	5 (2)	5 (2)	0.13	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6
33	FCN2_HUMAN	86	33980	11 (4)	9 (3)	0.37	Ficolin-2 OS=Homo sapiens GN=FCN2 PE=1 SV=2
34	PLVAP_HUMAN	85	50562	4 (2)	4 (2)	0.15	Plasmalemma vesicle-associated protein OS=Homo sapiens GN=PLVAP PE=2 SV=1
35	DMKN_HUMAN	83	47054	7 (3)	5 (2)	0.16	Dermokine OS=Homo sapiens GN=DMKN PE=1 SV=3
36	TNFRSF12A_HUMAN	81	13902	6 (3)	6 (3)	1.11	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 12A OS=Homo sapiens GN=TNFRSF12A PE=1 SV=1
37	LAMC1_HUMAN	80	17748	13 (2)	11 (2)	0.04	Laminin subunit gamma-1 OS=Homo sapiens GN=LAMC1 PE=1 SV=3
38	VTN_HUMAN	74	54271	8 (2)	8 (2)	0.14	Vitronectin OS=Homo sapiens GN=VTN PE=1 SV=1
39	NID1_HUMAN	74	13629	9 (4)	6 (2)	0.05	Nidogen-1 OS=Homo sapiens GN=NID1 PE=1 SV=3
40	MAT1A_HUMAN	72	72922	4 (1)	3 (1)	0.05	Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA OS=Homo sapiens GN=MAN1A1 PE=1 SV=3
41	FIBB_HUMAN	71	55892	6 (3)	4 (2)	0.14	Fibrinogen beta chain OS=Homo sapiens GN=FGB PE=1 SV=2
42	MGP_HUMAN	71	12345	6 (5)	4 (4)	2.03	Matrix Gla protein OS=Homo sapiens GN=MGP PE=1 SV=2
43	COL1A1_HUMAN	69	17807	19 (3)	17 (3)	0.06	Collagen alpha-1(XVIII) chain OS=Homo sapiens GN=COL1A1 PE=1 SV=5
44	APOA2_HUMAN	66	11168	9 (5)	9 (5)	3.55	Apolipoprotein A-II OS=Homo sapiens GN=APOA2 PE=1 SV=1
45	A2AP_HUMAN	65	54531	9 (1)	9 (1)	0.07	Alpha-2-antiplasmin OS=Homo sapiens GN=SERPINF2 PE=1 SV=3
46	CAD15_HUMAN	64	88861	5 (3)	5 (3)	0.13	Cadherin-15 OS=Homo sapiens GN=CDH15 PE=1 SV=1
47	IGFBP4_HUMAN	62	27915	6 (1)	6 (1)	0.14	Insulin-like growth factor-binding protein 4 OS=Homo sapiens GN=IGFBP4 PE=1 SV=2
48	FBN1_HUMAN	62	31208	28 (2)	28 (2)	0.02	Fibrillin-1 OS=Homo sapiens GN=FBN1 PE=1 SV=2
49	CAD11_HUMAN	62	87911	2 (1)	2 (1)	0.04	Cadherin-11 OS=Homo sapiens GN=CDH11 PE=1 SV=2
50	IGHG1_HUMAN	62	36083	8 (2)	7 (2)	0.22	Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1
51	VCC1_HUMAN	61	13810	2 (1)	2 (1)	0.28	VEGF co-regulated chemokine 1 OS=Homo sapiens GN=CXCL17 PE=1 SV=1
52	FBLN3_HUMAN	61	54604	5 (3)	4 (2)	0.14	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 OS=Homo sapiens GN=EFEMP1 PE=1 SV=2
53	GELS_HUMAN	61	85644	9 (2)	9 (2)	0.09	Gelsolin OS=Homo sapiens GN=GSN PE=1 SV=1
54	PIK3IP1_HUMAN	61	28230	3 (3)	2 (2)	0.29	Phosphoinositide-3-kinase-interacting protein 1 OS=Homo sapiens GN=PIK3IP1 PE=1 SV=2
55	PGRMC1_HUMAN	61	21658	5 (2)	5 (2)	0.38	Membrane-associated progesterone receptor component 1 OS=Homo sapiens GN=PGRMC1 PE=1 SV=3
56	CDSN_HUMAN	58	51463	6 (1)	5 (1)	0.07	Corneodesmosin OS=Homo sapiens GN=CDSN PE=1 SV=2
57	PCDHGC3_HUMAN	56	10101	3 (1)	3 (1)	0.04	Protocadherin gamma-C3 OS=Homo sapiens GN=PCDHGC3 PE=1 SV=1
58	MEX3C_HUMAN	56	69323	5 (1)	5 (1)	0.05	RNA-binding protein MEX3C OS=Homo sapiens GN=MEX3C PE=1 SV=3
59	FIBA_HUMAN	56	94914	6 (1)	6 (1)	0.04	Fibrinogen alpha chain OS=Homo sapiens GN=FGA PE=1 SV=2
60	EGF_HUMAN	55	13390	14 (2)	12 (1)	0.03	Pro-epidermal growth factor OS=Homo sapiens GN=EGF PE=1 SV=2

			6				
61	LAMA4_HUMAN	55	20240 1	10 (1)	9 (1)	0.02	Laminin subunit alpha-4 OS=Homo sapiens GN=LAMA4 PE=1 SV=3
62	APOA1_HUMAN	54	30759	8 (5)	6 (3)	0.41	Apolipoprotein A-1 OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=1 SV=1
63	THY1_HUMAN	54	17923	2 (2)	2 (2)	0.48	Thy-1 membrane glycoprotein OS=Homo sapiens GN=THY1 PE=1 SV=2
64	CO6A1_HUMAN	54	10846 2	6 (1)	6 (1)	0.03	Collagen alpha-1(VI) chain OS=Homo sapiens GN=COL6A1 PE=1 SV=3
65	IGF2_HUMAN	53	20127	2 (1)	2 (1)	0.19	Insulin-like growth factor II OS=Homo sapiens GN=IGF2 PE=1 SV=1
66	CD59_HUMAN	53	14168	4 (2)	4 (2)	0.62	CD59 glycoprotein OS=Homo sapiens GN=CD59 PE=1 SV=1
67	REN1_HUMAN	52	38983	2 (1)	2 (1)	0.1	Renin receptor OS=Homo sapiens GN=ATP6AP2 PE=1 SV=2
68	BIRC1_HUMAN	51	15947 9	8 (1)	7 (1)	0.02	Baculoviral IAP repeat-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=NAIP PE=1 SV=3
69	DOT1L_HUMAN	51	18474 0	9 (1)	9 (1)	0.02	Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-79 specific OS=Homo sapiens GN=DOT1L PE=1 SV=2
70	A1BG_HUMAN	50	54239	3 (1)	3 (1)	0.07	Alpha-1B-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=A1BG PE=1 SV=3
71	TPP1_HUMAN	50	61210	3 (1)	3 (1)	0.06	Tripeptidyl-peptidase 1 OS=Homo sapiens GN=TPP1 PE=1 SV=2
72	SRGN_HUMAN	49	17641	1 (1)	1 (1)	0.22	Serylglycin OS=Homo sapiens GN=SRGN PE=1 SV=3
73	AT2B3_HUMAN	48	13411 2	4 (1)	4 (1)	0.03	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 3 OS=Homo sapiens GN=ATP2B3 PE=1 SV=3
74	VTDB_HUMAN	48	52929	6 (1)	6 (1)	0.07	Vitamin D-binding protein OS=Homo sapiens GN=GC PE=1 SV=1
75	KCNK12_HUMAN	48	46858	5 (1)	5 (1)	0.08	Potassium channel subfamily K member 12 OS=Homo sapiens GN=KCNK12 PE=1 SV=1
76	PENK_HUMAN	48	30767	1 (1)	1 (1)	0.12	Proenkephalin-A OS=Homo sapiens GN=PENK PE=1 SV=1
77	NTF2_HUMAN	47	14469	4 (1)	4 (1)	0.27	Nuclear transport factor 2 OS=Homo sapiens GN=NUTF2 PE=1 SV=1
78	ACVR1B_HUMAN	46	56770	6 (3)	6 (3)	0.21	Activin receptor type-1B OS=Homo sapiens GN=ACVR1B PE=1 SV=1
79	K1C9_HUMAN	44	62027	4 (1)	4 (1)	0.06	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3
80	KV204_HUMAN	44	12308	3 (1)	3 (1)	0.32	Ig kappa chain V-II region TEW OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
81	SULF2_HUMAN	43	10039 0	5 (1)	5 (1)	0.04	Extracellular sulfatase Sulf-2 OS=Homo sapiens GN=SULF2 PE=1 SV=1
82	BLVRB_HUMAN	43	22105	2 (1)	2 (1)	0.17	Flavin reductase OS=Homo sapiens GN=BLVRB PE=1 SV=3
83	FURIN_HUMAN	43	86624	4 (1)	4 (1)	0.04	Furin OS=Homo sapiens GN=FURIN PE=1 SV=2
84	GGH_HUMAN	42	35941	1 (1)	1 (1)	0.1	Gamma-glutamyl hydrolase OS=Homo sapiens GN=GGH PE=1 SV=2
85	FBLN4_HUMAN	42	49372	4 (1)	4 (1)	0.08	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2 OS=Homo sapiens GN=EFEMP2 PE=1 SV=3
86	CADH1_HUMAN	40	97396	6 (1)	6 (1)	0.04	Cadherin-1 OS=Homo sapiens GN=CDH1 PE=1 SV=3
87	DRB4_HUMAN	39	29922	5 (1)	4 (1)	0.13	HLA class II histocompatibility antigen, DR beta 4 chain OS=Homo sapiens GN=HLA-DRB4 PE=2 SV=2
88	CSF1_HUMAN	39	60082	7 (1)	7 (1)	0.06	Macrophage colony-stimulating factor 1 OS=Homo sapiens GN=CSF1 PE=1 SV=1
89	HPT_HUMAN	37	45177	1 (1)	1 (1)	0.08	Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1
90	CO4A_HUMAN	37	19265 0	10 (1)	10 (1)	0.02	Complement C4-A OS=Homo sapiens GN=C4A PE=1 SV=1
91	DMBT1_HUMAN	36	26056 9	6 (1)	6 (1)	0.01	Deleted in malignant brain tumors 1 protein OS=Homo sapiens GN=DMBT1 PE=1 SV=2
92	CI082_HUMAN	36	38344	1 (1)	1 (1)	0.1	Uncharacterized protein C9orf82 OS=Homo sapiens GN=C9orf82 PE=1 SV=2
93	TENX_HUMAN	35	46403 4	17 (1)	17 (1)	0.01	Tenascin-X OS=Homo sapiens GN=TNXB PE=1 SV=3
94	WISP2_HUMAN	35	26807	2 (1)	2 (1)	0.14	WNT1-inducible-signaling pathway protein 2 OS=Homo sapiens GN=WISP2 PE=1 SV=1
95	APOA4_HUMAN	35	45371	2 (1)	2 (1)	0.08	Apolipoprotein A-IV OS=Homo sapiens GN=APOA4 PE=1 SV=3
96	KAIN_HUMAN	33	48511	1 (1)	1 (1)	0.08	Kallistatin OS=Homo sapiens GN=SERPINA4 PE=1 SV=3
97	LTBP4_HUMAN	33	17332 0	10 (1)	10 (1)	0.02	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 4 OS=Homo sapiens GN=LTBP4 PE=1 SV=2
98	ATS1_HUMAN	33	10529 0	5 (1)	5 (1)	0.03	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1 OS=Homo sapiens GN=ADAMTS1 PE=1 SV=4
99	SHISA5_HUMAN	33	25564	7 (2)	5 (2)	0.32	Protein shisa-5 OS=Homo sapiens GN=SHISA5 PE=2 SV=1
100	CO3_HUMAN	31	18703 0	5 (1)	5 (1)	0.02	Complement C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2
101	AUGN_HUMAN	31	17173	3 (1)	3 (1)	0.22	Augurin OS=Homo sapiens GN=C2orf40 PE=1 SV=1
102	YE026_HUMAN	31	39225	2 (1)	2 (1)	0.1	Putative uncharacterized protein LOC285679 OS=Homo sapiens PE=2 SV=2
103	FBLN5_HUMAN	30	50147	13 (1)	12 (1)	0.07	Fibulin-5 OS=Homo sapiens GN=FBLN5 PE=1 SV=1
104	HEPS_HUMAN	30	44982	1 (1)	1 (1)	0.08	Serine protease hepsin OS=Homo sapiens GN=HPN PE=1 SV=1
105	FBLN1_HUMAN	29	77162	2 (1)	2 (1)	0.05	Fibulin-1 OS=Homo sapiens GN=FBLN1 PE=1 SV=4
106	KNG1_HUMAN	29	71912	3 (1)	2 (1)	0.05	Kinogen-1 OS=Homo sapiens GN=KNG1 PE=1 SV=2
107	APOL1_HUMAN	29	43947	1 (1)	1 (1)	0.08	Apolipoprotein L1 OS=Homo sapiens GN=APOL1 PE=1 SV=5
108	B2MG_HUMAN	28	13706	6 (2)	4 (2)	0.66	Beta-2-microglobulin OS=Homo sapiens GN=B2M PE=1 SV=1
109	H2B1A_HUMAN	27	14159	2 (1)	2 (1)	0.27	Histone H2B type 1-A OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BA PE=1 SV=3
110	CATF_HUMAN	27	53332	2 (1)	2 (1)	0.07	Cathepsin F OS=Homo sapiens GN=CTSF PE=1 SV=1
111	TMSL1_HUMAN	27	5067	1 (1)	1 (1)	0.85	Thymosin beta-4-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=TMSL1 PE=2 SV=1
112	ROBO4_HUMAN	25	10739 0	11 (1)	9 (1)	0.03	Roundabout homolog 4 OS=Homo sapiens GN=ROBO4 PE=1 SV=1
113	CLM9_HUMAN	24	36120	1 (1)	1 (1)	0.1	CMRF35-like molecule 9 OS=Homo sapiens GN=CD300LG PE=1 SV=1
114	BTD_HUMAN	24	61093	6 (1)	6 (1)	0.06	Biotinidase OS=Homo sapiens GN=BTD PE=1 SV=2
115	TFF3_HUMAN	23	8635	12 (2)	9 (2)	1.16	Trefoil factor 3 OS=Homo sapiens GN=TFF3 PE=1 SV=1