

18. Ono M, Kamita M, Yamada T: A new diagnostic biomarker for prostate cancer patients revealed by 2DICAL. 9th AACR-JCA Joint Conferences.  
平成 25 年 2 月 22 日 (Hyatt Regency Maui, Maui, USA) 床研究分野)

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

- 1) 発明の名称 : Tumor marker for pancreatic cancer  
発明者 : 尾野雅哉、山田哲司、廣橋説雄  
特許日 : 2011 年 9 月 13 日  
特許番号 : US8017732B2 (米国特許)
- 2) 発明の名称 : Novel tumor marker for pancreatic cancer  
発明者 : 尾野雅哉、山田哲司、廣橋説雄  
特許日 : 2012 年 10 月 12 日  
特許番号 : EP2182061 号 (欧州特許)
- 3) 発明の名称 : 酸化修飾タンパク質またはポリペプチドに対する高特異性モノクローナル抗体  
発明者 : 能勢博、橋口朋代、尾野雅哉、山田哲司、廣橋説雄  
特許日 : 2009 年 6 月 5 日  
特許番号 : 第 4319700 号
- 4) 発明の名称 : 液体クロマトグラフィーのデータ補正方法  
発明者 : 尾野雅哉、山田哲司、廣橋説雄  
特許日 : 2012 年 11 月 2 日  
特許番号 : 第 5119405 号
- 5) 発明の名称 : 修飾  $\alpha$  フィブリノゲンタンパク質またはその免疫原性断片  
発明者 : 尾野雅哉、山田哲司、廣橋説雄  
特許日 : 2012 年 11 月 30 日  
特許番号 : 第 5140809 号

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

#### I. 研究協力者

増田万里 (国立がん研究センター 創薬臨

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
総合研究報告書

循環器疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の研究

研究分担者 寒川賢治 国立循環器病研究センター研究所 所長  
南野直人 国立循環器病研究センター研究所 部長

研究要旨

循環器系疾患の病態、治療、予後等を評価可能なバイオマーカーとなるたんぱく質やペプチドを発見するには、微量の対象物を高感度に構造解析できる解析系と、対象試料からの標的物質群を生体内に存在する状態で、再現的に濃縮する前処理法の確立が必須である。質量分析計の進歩により前者の技術的基盤はかなり前進したが更なる改良が必要であり、後者を可能とする有効な前処理法は依然として確立されていない。本研究では、①血漿試料を主たる対象に、微量タンパク質の回収法、消化・分解を抑制したペプチド回収法の開発、②心血管系培養細胞上清のタンパク質やペプチドの回収法、解析法、③心不全モデル動物のプロテオーム解析に基づくバイオマーカーの探索、④バイオマーカーとして有望な分子量の大きいペプチドの回収法と構造解析法の開発、などを実施した。

A. 研究目的

ゲノム遺伝子配列の決定に続き、生体で実在、機能するたんぱく質、ペプチド、代謝物などの実験的解析（プロテオーム、ペプチドーム、メタボローム解析）に基づくファクトデータベース構築が大きな目標となっている。細胞や組織が産生し、血液、尿などに多量で存在するたんぱく質、ペプチド、代謝物などを包括的に解析、利用できれば、医薬品や診断法の開発などの各種目的に利用可能な物質を探索、発見する上で極めて有用な情報源となるからである。また、正確な臨床情報を伴った血液、尿などの体液、組織や細胞試料のプロテオーム、ペプチドーム解析を疾患発症から追跡、実施できれば、有用なバイオマーカーを発見でき、病因、病態、治療、予後などの診断、医薬品の開発、評価が可能と期待される。しかし、生体内に存在するたんぱく質、ペプチドは極めて多様な性質を示す物質の混合物であると共に、濃度差が極めて大きいことが解析上の障害となり、ゲノムやトランスクリプトーム解析のような全ゲノムに亘る均一な解析が実施できていない。

特に微量たんぱく質やペプチドを生体内の状態で取り出すことや、翻訳後修飾を受けた微量たんぱく質の正確な構造情報を得ることは、依然として極めて困難である。本研究では、これまで培ってきた前処理法、解析技術を改良し、循環器疾患患者の細胞、組織、血液などに含まれる微量たんぱく質やペプチドをそのままの分子状態で定量的に回収し、定量比較や構造変化の解析可能とする研究技術を開発し、循環器疾患におけるプロテオーム、ペプチドーム解析法を作成する。これを心不全などの心疾患などに適用し、それらの診断、病態評価、さらに治療や医薬品の効果判定にも使用可能なバイオマーカーの発見を目指す。

B. 研究方法

1. 血漿試料の微量タンパク質、ペプチドの前処理法：微量タンパク質を再現的かつ簡便に濃縮・調製するため、抗体（主要タンパク質除去用）や各種アフィニティクロマト（heparin, chelate, 色素等）による試料の前処理・濃縮法と定量解析、消化・切断などに

よる構造変化について検討した。希釈血漿を各カラムに流し、素通り、吸着画分を限外濾過ユニットで脱塩、濃縮し、濃縮・調製法を検討した。2次元電気泳動法と Maldi-Tof 質量分析計 (Proteomics 4800) を組み合わせて測定を行った。限外濾過法の非保持画分 (濾液) にはペプチドが含まれ分解程度を明瞭に示すため、逆相 C18 カラムで回収し nano LC-Maldi 法で分析した。このペプチド画分の解析結果より、濃縮・調製法の比較を行った。

2. 心血管系培養細胞上清中のタンパク質、ペプチド解析：バイオマーカーの解析対象は、血液、尿、髄液等の体液がほとんどである。心血管系細胞由来の低濃度タンパク質やペプチドを血液試料から分離、同定することは困難であるので、細胞上清中に放出されるタンパク質やペプチドを分解なく回収し、解析することにした。先ず、分泌顆粒を有する内分泌系細胞 (甲状腺髄様癌由来 TT 細胞) を対象に処理方法を確立し、この方法をラット新生仔の心筋細胞、非心筋細胞 (主に線維芽細胞) に適用したが、かなりのタンパク質分解物が観測された。さまざまな改良を行った後、一定時間に無血清培地に分泌されたペプチド、タンパク質を逆相系カートリッジで回収し、ゲルろ過 HPLC 分離後のペプチド画分を LTQ Orbitrap XL 質量分析計にて分析した。質量分析では新しい開裂法を導入し、ペプチド構造解析効率の上昇に努めた。

3. 大分子量ペプチドの構造解析：血漿や培養細胞上清の何れにおいても、低分子量 (<5KDa) ペプチド量は少なく、高分子量 (>5KDa) 側へ移行するほどペプチド量は増加し、低分子量タンパク質はさらに多いことが確認された。高分子量ペプチドは一次切断部位を記録することが多いことが判明しているため、高分子量ペプチドの配列や構造が決定できれば、バイオマーカーへの展開が大きく進むと考えられる。そこで汎用されている Collision-Induced Dissociation (CID) 法に加えて新しい Electron Transfer

Dissociation (ETD) 法を開裂法として用い、高分子量ペプチド構造解析の可能性を検討した。培養細胞上清の高分子量ペプチドを対象とし、nano LC で分離後、Orbitrap XL-ETD 質量分析計で測定し、データ解析は Mascot 検索ソフトウェアを用いた。全てのデータについて実験者が実スペクトルの確認を行った。

4. 心不全モデル動物のプロテオーム解析：イヌはゲノム遺伝子配列が決定され、心機能データを正確に収集でき、ペーシングにより純粋な頻脈性心不全を作成できるため、心不全の大型実験モデル動物として適切である。右室ペーシング 230 回/分で 4 週間 (2 例) と 6 週間 (5 例) ペーシング、対照群 (1 例)、偽手術群 (2 例) を作成し、0、4、6 週で心行動態を測定し、左室心筋、血清を採取した。iTRAQ 法による解析を医薬基盤研究所、2DICAL 法による解析を国立循環器病研究センターで実施した。

4C30 マウスは医薬基盤研究所より供与され、当センター分子生理部と共同飼育した。オスの 12、16、24 週令の 4C30 マウス、同週令の野生型マウス各 4 匹から組織を採取した。心臓は秤量後、左心室組織を収集した。心エコー検査 (24 週令、EF=13% (4C30) vs. 59%(wt)) と心重量により心不全の発症、進行を確認した。組織を凍結状態で粉碎化し、加熱変性後、酵素消化等の処理を行った。ナノ LC で分離後、Triple TOF5600 で測定を行い、2DICAL ソフトウェアにより定量比較を実施した。

(倫理面への配慮)

血液試料は第 1 期プロテオーム研究時に当センター倫理委員会で承認を受けて採取したもので、本研究での使用承認を受けると共に、20 年度に研究協力者の意思確認を行い、同意が得られた試料を使用した。動物実験については、当センター動物実験委員会の承認を受けて実施した。

## C. 研究結果

1. 血漿試料の微量タンパク質、ペプチドの前処理法：主要タンパク質除去用抗体カラムと各種アフィニティーカラム、限外濾過を組み合わせ、微量タンパク質画分の再現的かつ簡便な濃縮・調製法を検討した。各カラム操作通常の洗浄を行っても、高濃度タンパク質の非特異的吸着による持ち越しが～数%の範囲で認められ、低濃度タンパク質の解析が妨害された。血漿試料では血清に比して同一タンパク質由来のスポット数が多く、各カラム処理で同定タンパク質は増加するが、大幅な増加は困難であった。

限外濾過ユニットは分子量 10,000 カット膜を使用したため、非保持画分中のペプチドの大部分は、分子量 2,500 以下であった。血清、血漿試料の抗体カラムの非吸着画分を限外濾過ユニットで濃縮した非保持画分では、血漿の総ペプチド量は血清の 1/3-1/5 で、検出ペプチド数も 1/4 程度であった。大部分は凝固系タンパク質、補体、リポタンパク質と、アノテーションの無いタンパク質 2 種の断片であった。血清試料では血漿試料由来のほぼ全てのペプチドを含んでいた。

ペプチド量は、希釈血漿を直接、迅速に限外濾過で分離した場合に最少となった。各種カラム操作で減少するペプチドは少なく、補体由来ペプチド、フィブリン断片が処理により急激に増加した。基本的に接触時間、担体量が増加すると、ペプチド量も増加した。プロテアーゼインヒビターカクテルの添加により消化制効果は認められるが完全な抑制は困難であり、特にエキソペプチダーゼの抑制は困難であった。凍結融解においてもペプチド画量が増加し、低分子量ペプチドの増加がより顕著で、プロテアーゼインヒビターカクテルによりかなりの抑制効果が認められた。

2. 心血管系培養細胞上清中のタンパク質、ペプチド解析：神経内分泌細胞株について検討を行った結果、分泌刺激により効率的なペプチドの回収、分析が可能であった。特に

TT 細胞では、カルシトニン、グレリン等のホルモン前駆体由来ペプチド、グラニン類やプロセシング酵素由来のペプチドが観測され、細胞内タンパク質由来ペプチドはごく少数であった。質量分析の反復により、最終的には 600 以上の重複の無いペプチドを同定できた。一例として、615 残基の VGF タンパク質が 15 箇所ですべて一次切断を受け、16 種のペプチドが生成すると推定できた。VGF タンパク質の C 末端部と中央の切断部位を認識する抗体を調製し Western blot 解析を行った結果、VGF タンパク質はラット脳、消化管では、TT 細胞と同じ一次切断を受けることが示され、開発したペプチドの回収、解析法の有用性が示された。

ラット心筋細胞、心臓非心筋細胞では適切な分泌刺激はなく、時間を延長して回収を行った。心筋細胞の壊死により構造タンパク質断片ペプチドが多数に観測されたが、細胞の維持・管理やペプチド回収法の改良により、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)が主要ペプチドとして観測できた。心筋細胞で ANP 前駆体由来ペプチドを集中解析した結果、活性型ペプチドである  $\alpha$ -ANP が最も多く観測され、次に前駆体 N 末端ペプチドが観測され、前駆体からのプロセシング機序が確認された。 $\alpha$ -ANP 内で切断されたペプチド群からは、既報の  $\alpha$ -ANP 分解経路と一致する切断部位が明確に示された。心臓非心筋細胞の大部分は線維芽細胞で、細胞外マトリックス由来ペプチドが主体であったが、アドレノメデュリンや分泌タンパク質由来ペプチドも多数同定された。また、リン酸化やヒドロキシル化(Pro)を受けたペプチドを多数同定することができた。

3. 大分子量ペプチドの構造解析：検討した全ての対象で、低分子量から高分子量、さらにタンパク質へ移行するに従い量的増加が認められた。プロテオーム解析では、酵素消化により 2000Da 以下の消化ペプチドとして解析するため同定効率が高い。しかし、分子

量の大きい生体内ペプチドでは、イオン化効率の低下や類似候補の増加により同定効率が著しく低下する。問題克服のためには、高精度で高分解能の質量分析スペクトル、情報量の多いタンデム質量分析 (MS/MS) スペクトルの入手が必須で、ETD 法では情報量の豊富な MS/MS スペクトルが得られる場合が多いことが特長であった。培養細胞上清のゲルろ過物について両開裂法を比較した結果、価数で 14 価まで解析可能で、最大で分子量 15000 Da のタンパク質まで同定できた。CID 法、ETD 法の同定ペプチド数は、約 800 と約 550 (重複なし) であり、同定数では CID 法が勝ったが、分子量 3000 Da 以上のペプチドの割合はほぼ同程度であった。両開裂法の併用により、従来よりも 3-10 倍、構造決定率を増加できた。また、ETD 法はリン酸化などの修飾構造と残基の同定にも有効であった。

4. 心不全モデル動物のプロテオーム解析：イヌペーシングモデルでは、4 週後、6 週後に左室駆出率が著減し、典型的な頻脈性心不全の形成を確認した。2DICAL 法では、4 週、6 週群でそれぞれ約 40000 のトリプシン消化ペプチドピークを検出し、約 1 割において有意な変動 (T-Test,  $P < 0.05$ ) が認められたが、データベースの不整備で同定ペプチド数は通常の 1/3 に止まり、有意な変動を示したタンパク質数は 4 週、6 週群で各 30 程度に止まった。医薬基盤研究所内の PRC グループは、iTRAQ 法を用いて網羅性の高い定量解析を実施し、4 週、6 週群で 800 タンパク質が同定、定量解析され、1.5 倍以上の増加や 2/3 以下の減少を示したタンパク質が約 200 種が検出された。2DICAL 法で変動の認められたほとんどのタンパク質が iTRAQ 法により検出され、同様の変動を示した。増加タンパク質は、細胞骨格・構造系、血液由来、リボゾーム系タンパク質であった。一方、減少タンパク質は、エネルギー代謝系、筋収縮系、情報伝達系の順で、エネルギー代謝酵素やカルシウム制御タンパク質などの変動は、疾患

との関連が示唆された。また、複数の酵素や情報伝達系タンパク質でアイソタイプスイッチングが示唆された。

心筋症モデルマウス 4C30 でも重度な心不全状態を確認し、有意な上昇及び減少を示したタンパク質はそれぞれ 186、145 であった。線維化の亢進を示すペリオスチンをはじめとする細胞外マトリックス、細胞膜裏打ち構造や中間系フィラメント、ER ストレス関連タンパク質で上昇が認められた。減少タンパク質の変動は大きく、特に解糖系、TCA 回路、 $\beta$  酸化において主要酵素群の減少は顕著であった。筋収縮関連タンパク質にも減少が認められたが、イヌ心不全モデルと共通した変動タンパク質はそれぞれ 60 余りと限定的であった。

#### D. 考察

1. 血漿試料の微量タンパク質、ペプチドの前処理法：血液については、第 1 期より血清、血漿のいずれが対象として適切かという懸案があった。血液中のタンパク質を反映するのは血漿であるが、各種カラム処理、濃縮操作で補体系、凝固系プロテアーゼなどが必ず活性化され、ペプチド断片がかなり多量に発生した。2 次元電気移動上のスポットも、同一タンパク質由来する部分切断タンパク質などが血漿で多く観測された。また、インヒビターカクテルの添加により部分的に切断は阻害されるが、完全な阻害には程遠く、血清試料以上に厳密な前処理条件の設定が必要であった。一方、カラム担体へのタンパク質の非特異的吸着も想像以上に多く、洗浄などの強化が必要であるが、官能基やリガンドへの親和性に依存するため、限定された強親和性タンパク質であれば低濃度タンパク質の濃縮効果は大きい。これらの結果より微量タンパク質回収の一般的手法の確立は、困難と考えられた。

血清は凝固系関連タンパク質に由来するペプチドが非常に多いため、血液のペプチドーム解析には血漿試料の使用が必須であるが、

プロテアーゼ活性化抑制の困難さから、タンパク質とペプチドを一元化して解析することは困難と判断した。そこで、新鮮血漿試料の逆相系担体による抽出法、限外濾過によるタンパク質画分（(プロテアーゼ含有)とペプチド画分の分離法を検討したが、後者でも消化抑制は困難で、逆相系担体による血漿試料の直接吸着、抽出法が比較的良い結果が得られた。プロテアーゼによる分解反応が顕著に現れるペプチド画分では、ペプチドの量や形は刻々と変わるため、疾患と対照の差分解析からバイオマーカーを探索することは極めて困難と考えられた。

2. 心血管系培養細胞上清中のタンパク質、ペプチド解析：内分泌系培養細胞より分泌されるペプチド、タンパク質の解析においては、同定ペプチドにより前駆体タンパク質のほぼ全領域をカバーする例が得られ、このタンパク質のプロセッシング経路の全貌を示すという優れた成果が得られた。他のペプチドでも、一次切断の「痕跡」を残している例が60-70%の割合で観測された。TT細胞での切断部位とラット脳、消化管での切断部位が一致したことは、培養細胞の結果が生体での存在様式の推測、バイオマーカー探索へと発展できる根拠を示すものといえる。甲状腺髄様癌において VGF タンパク質が豊富であれば、由来ペプチドの血中濃度がバイオマーカーとして測定意義がある可能性もある。

ラット心筋細胞では、心筋細胞の脆弱性のために細胞構成タンパク質の断片ペプチドが多数に観測された。培養法やペプチド回収法の改良に努めた結果、比較的豊富な ANP 前駆体由来ペプチドでは、前駆体から活性型  $\alpha$ -ANP が生成するプロセッシング機序を明示できた。 $\alpha$ -ANP 関連ペプチドの解析では、報告されている Endopeptidase 24.11 による  $\alpha$ -ANP の主要分解経路や、その後の3箇所の分解的切断が確認できた。前駆体タンパク質から活性型ペプチド、 $\alpha$ -ANP のプロセッシング、さらに主要分解ペプチドの生成が同定された事実は、培養細胞を基盤とするバイ

オマーカー探索法の有用性を明らかにするものである。非心筋細胞においても、細胞内タンパク質由来ペプチドの割合は低く、回収されたペプチドにはアドレノメデュリン、サイトカイン、成長因子等に由来するペプチド、プロホルモン変換酵素による切断を受けたと推定されるペプチドが同定された。これらのペプチドが血中で存在することが確認ができれば、バイオマーカー探索法としての有用性を確立できると期待される。

### 3. 高分子量ペプチドの構造解析：

高分子量ペプチドはプロセッシング部位などの一次切断構造を保持する割合が高く、バイオマーカーとなる可能性が高い、しかし、技術的な問題のため、一部の豊富な存在するものを除き同定されていなかった。高精度で高分解能の質量分析計と CID と ETD の開裂法の併用により、同定総ペプチド同定数が1,000 を超え、世界的にも最も網羅性の高いデータとできた。これらの約半数は分子量3,000Da 以上で、一次切断構造を保持する可能性が大幅に増加した。また、分子量15,000Da という低分子量タンパク質まで同定可能となったことは、バイオマーカー探索のみならず、トップダウンプロテオミクスへの道を大きく拓くものである。ETD 法はリン酸化をはじめとする修飾構造、修飾残基の決定にも有用であり、修飾構造を含んだバイオマーカー探索にも貢献でき、さらなる同定効率の向上を目指したい。

4. 心不全モデル動物のプロテオーム解析：イヌ心不全モデルのプロテオーム解析では、情報量が多いため、4週、6週ペーシング群で共通して変動しているタンパク質について検討を進めている。しかし、心臓構成細胞に由来する分泌タンパク質で顕著な変動を示すものは見出せていない。一方、心筋細胞の収縮機能関連のタンパク質、エネルギー産生系のタンパク質には大きく減少する例が多く、心筋収縮機能の低下に繋がると推定される。細胞内カルシウム濃度制御系にも異常が発生している可能性が高く、他の変動と相関

について解析を行っている。代謝系酵素や情報伝達系タンパク質のアイソタイプスイッチングについては、抗体などによる定量システムを作り検証していきたい。

心筋症モデルマウスのプロテオーム解析でも、エネルギー産生系が非常に機能低下した状態にあり、別途行ったハムスター心筋症モデルの代謝変化と非常に類似しており、代謝系酵素群の発現低下が極めて顕著で、この減少が病態の発症や基礎代謝変化を誘導する可能性も示唆された。また、ミトコンドリア酵素系の変化より、酸化ストレスの増大も推定される。線維化に関わる細胞外マトリックス、筋収縮関連のタンパク質の変化も認められるが、代謝系タンパク質の変化より軽度であった。代謝系酵素群の変化を血中で測定することは難しいが、産生される代謝物濃度がバイオマーカーとなる可能性についても検討の必要がある。

## E. 結論

・血液試料の微量タンパク質、ペプチドの解析するために種々の検討を行ったが、カラム担体などとの接触により補体系や凝固系が活性化され、血液中の状態を正確に反映する微量タンパク質やペプチドの安定した調製法の確立は困難であった。現状では血漿よりも血清で安定した試料調製が可能であるが、真の血液プロテオーム、ペプチドーム解析には、異なる方法論の導入が必要と考えられる。

・血液からのバイオマーカー探索が困難である現状を考えると、心血管系培養細胞を起点とするバイオマーカー探索も有効と考えられる。内分泌系細胞では、プロセッシング経路も予測可能な良好なペプチド試料調製法を確立できた。この方法を心血管系細胞に適用した結果、非心筋細胞培養では細胞外マトリックスに加え、生理活性ペプチド前駆体、サイトカイン等の断片ペプチドが多数観測された。心筋細胞では細胞脆弱性のために解析が十分ではないが、主要な分泌因子であるANPやBNP前駆体には生理的に意義のあ

る成果が得られた。微量ペプチドまで同定できれば、バイオマーカー候補の探索法として有望と期待される。

・高分子量ペプチドがペプチドームの主体であり、一次切断部位などを保持する割合が高くバイオマーカーとなる可能性も高いが、従来の解析技術では研究対象外であった。ETD開裂法の導入などにより、高分子量ペプチドの同定効率を大きく上昇でき、最大で分子量15,000Daの低分子量タンパク質までが同定可能となり、修飾構造と修飾残基を高い確率で決定可能となった。この技術開発により、疾患によるタンパク質の特異的な切断や酵素の活性化などが同定される見込みである。これにより、ペプチドや切断部位を標的とするバイオマーカー探索の技術基盤を構築できると考えられる。

・循環器疾患におけるバイオマーカー探索対象として心不全を選定し、イヌ心不全モデル、マウス心筋症モデルについて定量プロテオーム解析を実施した。収縮機能関連タンパク質、細胞内カルシウム制御系タンパク質については多くの報告があるが、2つのモデルで共通して観測されたエネルギー代謝系酵素群の顕著な減少は単なる結果とは考え難く、今後、疾患の成因や増悪機構を探る上で重要と考えられた。一方、分泌タンパク質で有意な変動を示すものはほとんどなかったが、エネルギー代謝系酵素群は細胞内濃度も高いため、部分的な細胞障害があれば漏出し、バイオマーカーとして利用できる可能性もある。また、産生される代謝物濃度（メタボローム）をバイオマーカーとする可能性も検討の価値があると考えられた。

## F. 研究発表

### F-1. 論文発表

1. Sasaki, K., Satomi, Y., Takao, T. and Minamino, N. Snapshot peptidomics of the regulated secretory pathway. *Mol. Cell. Proteomics* **8**, 1638-1647 (2009).
2. Sasaki, K., Takahashi, N., Satoh, M.,

- Yamasaki, M. and Minamino, N. A peptidomics strategy for discovering endogenous bioactive peptides. *J. Proteome Res.* **9**, 5047-5052 (2010).
3. Osaki, T., Sasaki, K. and Minamino, N. Peptidomics-based discovery of an antimicrobial peptide derived from insulin-like growth factor-binding protein 5. *J. Proteome Res.* **10**, 1870-1880 (2011).
  4. K. Sasaki, K., Osaki, T. and Minamino, N. Large-scale identification of endogenous secretory peptides using electron transfer dissociation mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 700-709 (2013).
  5. Nishikimi, T., Okamoto, H., Nakamura, M., Ogawa, N., Horii, K., Nagata, K., Nakagawa, Y., Kinoshita, H., Yamada, C., Nakao, K., Minami, T. Kuwabara, Y., Kuwahara, K., Kangawa, K. Minamino, N. and Nakao, K. Direct immunochimiluminescent assay for proBNP and total BNP in human plasma: proBNP and total BNP levels in healthy individuals and heart failure patients. *Plos One*, **8**, e53233 (2013).
- F-2. 学会発表
1. 佐々木一樹、里見佳典、高尾敏文、南野直人：調節性分泌経路のペプチドミクス。日本ヒトプロテオーム機構第7回大会（平成21年7月、東京）
  2. 佐々木一樹、南野直人：分泌顆粒内ペプチドの解析から明らかになる世界。第82回日本生化学会大会シンポジウム「ペプチドの多様性と機能」(平成21年10月、神戸)
  3. 尾崎 司、佐々木一樹、南野直人：分泌ペプチドーム解析による新規活性ペプチドの探索。第62回ペプチド討論会（平成21年11月、小倉）
  4. Minamino, N.: How to apply mass spectrometry to heart research., 20th World Congress of the International Society for Heart Research, Kyoto (Japan), May, 2010.
  5. 佐々木一樹、南野直人：ペプチドミクスで明らかにされる生理活性ペプチド分解のプロセス、日本ヒト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、千葉、2010年7月。
  6. Sasaki, K., Takahashi, N., Satoh, M., M. Yamasaki, M. & Minamino, N.: An approach to identifying endogenous functional peptides in a set of sequence information provided by mass spectrometry., The Fifth International Peptide Symposium, Kyoto (Japan), Dec., 2010.
  7. 佐々木一樹、高橋憲行、佐藤光男、山崎基生、南野直人：セクレトペプチドーム解析に基づく新規生理活性ペプチド探索 第84回日本内分泌学会学術総会（平成23年4月、神戸）
  8. 尾崎 司、佐々木一樹、南野直人：ペプチドーム解析で見出されたインスリン様成長因子結合タンパク質-5由来の新規抗菌ペプチドAMP-IBP5。第84回日本生化学会（平成23年9月、京都）
  9. N. Minamino: Discovery and function of secreted peptides. Neuroscience 2011, Society for Neuroscience Meeting, Symposium: Neuropeptides: From Discovery to Function（平成23年11月、Washington DC）
  10. 佐々木一樹、尾崎 司、南野直人：ラット心筋初代培養系の分泌ペプチド解析による心房性ナトリウム利尿ペプチドのプロセッシング・切断部位の同定。第15回日本心血管内分泌代謝学会学術総会（平成23年11月、大阪）
  11. 南野直人：ペプチドーム探索、第9回GPCR研究会（平成24年5月、東京）



12. K. Sasaki, Y. Ueta, N. Minamino:  
VGF-derived peptides identified by  
mass spectrometry and their functions.  
International Symposium: Frontiers  
in Biologically Active Peptides, the 3rd  
Meeting of the Japan Branch of the  
International Neuropeptide Society (平  
成 24 年 9 月, 小倉)

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他

#### H. 研究協力者

朝長 毅 (医薬基盤研究所プロテオーム研  
究センター)

佐々木一樹, 尾崎 司, 錦織充広, 八木寛陽  
(国立循環器病研究センター研究所分子  
薬理部)

若林繁夫, 岩田裕子 (同研究所分子生理部)

北風政史, 朝倉正紀 (同研究開発基盤セン  
ター臨床研究部)

## 精神・神経疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の研究

研究分担者 高坂新一 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 所長

### 研究要旨

本研究では精神疾患（統合失調症、気分障害など）、神経変性疾患（認知症、パーキンソン病など）の治療成績向上やその発症機序の解明及び診断技術の高度化を図るため、患者由来サンプル特に髄液中の蛋白質のプロテオーム解析を実行し、当該疾患に特異的な、あるいは特徴ある蛋白質群を同定し、その臨床的応用を図ることを目的とする。個々の患者でのプロテオーム解析を髄液 2mL から可能にするための微量測定法を開発し、さらに前処理を工夫して、さらに少ない量からの測定法を可能にした。また、国立精神・神経医療研究センターにおける髄液採取システムを確立し、精神疾患を中心に 700 検体以上の髄液を収集した。また、髄液採取後の温度管理、髄液と食事の関係などについても、診断及び研究に髄液を用いる際に有用な条件検討を行った。これらの方法論は、今後の髄液を用いた研究に有用であると考えられる。

### A. 研究目的

本研究では、神経変性疾患（認知症、パーキンソン病など）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す。

神経変性疾患では蛋白質の不溶化・凝集が細胞変性の本態と考えられているが、その成立には免疫機序の関与も認められ、また自律神経症状などを認めることも多い。さらに、生活習慣がその発症に影響を与えることは近年の疫学的調査から明らかになってきており、血液、髄液、尿などの解析から予防・診断に関して新たな知見が得られるとの期待が高まっている。

本プロジェクトの前身であるプロテオームファクトリーにおいて検討された髄液を用いた cICAT 法でのパイロット研究で中枢神経特異的な蛋白質が多数同定されており、その有用性が明らかになっていた。本プロジェクトでは、さらにその方法に改良を加えることで、微量でしかも効率的に中枢神経特異的タンパク質の同定を行う方法を検討した。プロテオームファクトリーでの解析方法はプールされた髄液 10 ml を初期量としていたが、個々の患者の髄液

を解析するまでの微量化はできていない。そこで本研究では臨床的に利用可能な髄液 2ml からのプロテオーム解析技術の開発を行うことを目標とする。さらに、より微量化ができないかどうかを検討することをめざした。

cICAT 法は対照と検体を同時に測定し比較することから、絶対値を測定する iTRAC 法に比較して少ない検体数でも有意なタンパク質を同定しやすい。一方で、対照をいかに確保するかという問題が残る。

また、プロテオームに最適な髄液検体をどのように確保するか、というシステム構築を行うことも目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. 髄液前処理の検討

##### (1) プロテアーゼ不活化

これまでは EDTA 添加、熱処理を行っていたが、その処理によってタンパク収量の著しい低下があった。そこで市販されているプロテアーゼ阻害剤を用いての検討を行い、同定タンパク数の変化を検討する。

##### (2) 抗体カラム

血清中に多量に存在する 14 種類のタンパク

質を除去する目的で、市販の抗体カラム (Agilent Hu14) を用いていたが、他社の同様なカラム (IgY14LC2) 及び 66 種類の血清タンパクを除去する抗体カラム (SuperMix) を検討した。

### (3) 初期髄液量の適正化

髄液中のたんぱく質濃度とこれまで行ってきた QSTAR による cICAT 法タンパク同定法による同定たんぱく質数の関係を調べた。また、QSTAR 質量分析において、アルブミンの総ペプチドカウントとタンパク同定数を比較した。

初期量 2ml として、30mg/dl (タンパク量 0.6 g) の 10 例と 60mg/dl 以上 (タンパク量 1.2~2 g) の 10 例での同定タンパク数を比較した。

### (4) 抗体カラム処理後のタンパク成分の検討と新たな処理法の導入

初期髄液タンパク量を 0.6 g にすることで同定タンパク数が増加したが、その際の同定タンパク質の検討により抗体カラムで除去されるべきタンパク質が大量に残っているかどうかをみるために、トランスフェリンの濃度を ELISA 法で測定した。

さらに、トランスフェリンとアルブミンの除去を目的にして、GBC カラムを単独で、または抗体カラム IgY と組み合わせる前処理をおこなって、トランスフェリンの濃度を測定した。また、抗体カラム IgY のみと IgY+GBC カラム処理でのタンパク同定数を比較した。

## 2. 髄液収集に関する検討

### (1) 髄液採取体制の整備

国立精神・神経医療研究センター内にトランスレーショナル・メディカルセンター (TMC) が設立され、その一部門にバイオリソース管理室が設置された。病院での髄液採取と検査体制を見直し、研究利用を踏まえた TMC を中核にした髄液保存プロトコルを構築する。

### (2) 標準髄液の検討

当初は購入髄液を、その後は神経内科や脳神経外科から提供される正常圧水頭症患者髄液をプールして対照として cICAT ラベルを行い、

プロテオーム測定とその解析を行った。標準髄液間の相違に関しては、最低でも 2 つの標準髄液間で 5 回の測定を行い、ペプチド毎の換算ができるようにする。

### (3) 髄液採取時の室温保存の影響

正常人の髄液を用い、①採取後直ちに氷冷して遠心後に -80°C 保存、②採取後 3 時間室温に放置した後に遠心して -80°C 保存、③採取後 24 時間室温に放置した後に遠心して -80°C 保存の 3 つの処理方法を試し、それぞれ手順通り前処理をした上で購入したプール髄液を対照にして cICAT ラベルを行い、質量分析を行った。また、代表的な神経特異的なタンパク質の量をウェスタンブロットで確認した。

### (4) 髄液採取時の食事の影響

髄液タンパク質組成における食事の影響を調べるために、同一患者で前日 22 時以降絶食 (朝食抜き、午前中の髄液採取) と昼食後 (午後 2 時の髄液採取) で比較検討した。

### (倫理面への配慮)

今回の研究に用いるヒト由来試料はすべて当センター倫理委員会において承認を得た方法でインフォームドコンセントを取得したものを使用する。髄液の一部は、植林博太郎博士 (順天堂大学名誉教授-故人) から譲り受けたパーキンソン病患者の髄液であり、連結不可能匿名化して研究利用することが当センター倫理委員会で承認されている。

## C. 研究結果

### 1. 髄液前処理の検討

プロテオームファクトリーでの検討では、最初の髄液量が 10ml 必要であるという制約はあるものの、Agilent 抗体カラム (Hu14) で分離し、素通り画分と吸着溶出画分を得て、0.1% SDS、50mM Tris/HCl (pH 8.5) に溶解することで、cICAT 法解析で 311 種類のタンパク質を同定でき、そのうち 294 種は髄液特異的蛋白として同定できていた。

髄液 2ml からの cICAT 法測定を可能にするために、以下の点を検討し、概ねその方法論が

確立できた。

#### (1) プロテアーゼ不活化

プロテアーゼ阻害剤の使用時の同定タンパク数 271、使用しない時は 269 であり、プロテアーゼ阻害剤の使用は不要と判断した。

#### (2) 抗体カラム

患者髄液プール検体を用いて、抗体カラムの種類を検討した。Agilent の Hu14 では、235 タンパク数、セプロ社 IgY14LC2 では 281 タンパク数でほぼ同等であったが、血清に多量に存在するタンパク質 66 種類を除去するセプロ社 SuperMix を用いた場合は、総計 21 種類と極端に同定数が減少した。したがって、SuperMix は髄液解析には不適と判断した。

#### (3) 初期髄液量の適正化

当初は、初期髄液量は 2ml と固定していたが、そのタンパク濃度は 28mg/dl ~108mg/dl と大きな変動があった。約 60 回の質量分析計での測定の結果を見ると明らかな逆相関 ( $R=-0.51$ ) を認めた。すなわち、初期のタンパク量が多いほど同定タンパク質数が少ないという結果であった (図 1)。

さらに、質量分析の結果で、アルブミンの total peptide count と同定数を比較すると、アルブミン残量が多いほど同定タンパク数が少ない傾向を認めた ( $R=-0.21$ )。すなわち、抗体カラムで除去できていないアルブミンなどの血漿に大量に存在しているタンパクが同定タンパク数の低下に寄与していると考えられた。

これら 2 つの結果から、初期量のタンパク量はできるだけ少なくした方がよく、またアルブミン等のタンパク質の除去をさらに徹底させるべきであるということを示唆している (図 2)。

そこで、初期髄液量を 2ml という容量ではなく、0.6mg という重量で統一することに意味があるかないかを調べるために、30mg/dl の 2ml (0.6mg と表示) と 60mg/dl 以上 2ml (2ml と表示) のそれぞれ 10 例で同定タンパク質数を比較したところ、明らかに初期タンパク質量が少ない方 (0.6mg) が優位に同定タンパク質数が多かった ( $p<0.0001$ ) (図 3)。

#### (4) 抗体カラム処理後のタンパク成分の検討と新たな処理法の導入

初期髄液量を 0.6mg にすることで一定の効果は得られたが、1 で明らかになった血漿大量タンパクの除去不全に対処するために、トランスフェリン、アルブミン、IgG を除去できるスピнкаラム (GBC カラム、コスモバイオ) をこれまでの抗体カラム IgY に加えてみたところ、質量分析結果におけるトランスフェリンとアルブミンの total peptide count が著しく低下し、これらのタンパク質が十分除かれていることが判明した ( $n=3$ ) (図 4)。

また、処理前の髄液、抗体カラム IgY のみ、GBC カラムのみ、抗体カラム IgY と GBC スピнкаラムの組み合わせ、さらに IgY と GBC スピнкаラム 2 回処理をしたもので、トランスフェリンの濃度を ELISA 法にて測定した。結果は、抗体カラム IgY+GBC スピнкаラムにて、十分血漿タンパク質の除去ができることが判明した。

この結果を踏まえて、抗体カラム IgY+GBC スピнкаラム 1 回の処理法を採用したところ、同定タンパク数の明らかな増加をみた (図 5)。

## 2. 髄液収集に関する検討

### (1) 髄液採取体制の整備

担当医が診療上必要な検査として髄液検査を行う場合、主治医の要請に応じ常にコーディネータが髄液検査に立ち会う体制を整備した。コーディネータは研究の説明と同意を得る時点から関与し、採取後はただちに氷冷して臨床検査部へ運搬する。運搬された髄液の一部で細胞数、タンパク量などの一般的な検査を臨床検査部で行い、残りを遠心・分注して、匿名化を行ってのち、TMC バイオリソース管理室の超低温フリーザーに保存する。

実際の髄液検体の利用に関しては、プロテオーム研究 (当研究テーマ) に加えて、神経研究所やそれ以外の研究者へ提供される。2011 年 12 月までの集計では、症例数 275 例 (検体数 312 例) となっている (表 1)。

## (2) 標準髄液の検討

標準として用いる髄液は一定である必要がある。そのため、当初は米国より髄液を購入しプールして用い、その後は神経内科もしくは脳神経外科から大量に提供される正常圧水頭症患者の髄液をプールして用いた。標準髄液間の相違については、最低5回の測定を行いペプチド毎の換算表を用いて補正した。

## (3) 髄液採取後の室温保存の影響

髄液採取後の室温放置時間によって、量が上昇したタンパク群、量が減少したタンパク群があり、24時間放置で検出ができなくなったタンパク群も存在した。さらに、神経特異的なタンパク質である TUJI, pY100 やシグナル伝達物質である AKT, Fyn についてウェスタンブロットを行い、3時間、24時間と室温放置する時間に依りタンパク量が減少することを確認した (図 6, 7)

## (4) 髄液採取時の食事の影響

同一患者の前日 22 時以降絶食 (朝食抜き、午前 10 時採取) と昼食後 (午後 2 時採取) の髄液タンパク質を比較したところ、同定できた約 550 種のタンパク質のうち、2 倍以上の変動を示したものは 75 種 (13.6%) で、そのうち 64 種 (変動したタンパク質の 85%) が絶食時に低下していた。1.7 倍以上の変動にすると 142 種 (25.8%) にもなり、そのうち 128 種 (変動したタンパク質の 90%) が低下していた。絶食により全体の 25% ものタンパク質が 6 割以下の量に減少していたことになる。

## D. 考察

すでにプロテオームファクトリーでの研究で髄液を用いることで、直接的に中枢神経の病態を反映している蛋白群をとらえることが判明しており、この技術を生かす為には、元々蛋白量が少ない髄液で、しかも臨床的に許容できる 2ml 以下の初期量での測定法を確立する必要がある。

そこで最初に、初期量 10ml で解析可能であ

った測定系を、初期量 2 ml の微量から解析できる前処理の確立し、結果として、コンスタントに 300 種類のタンパクを同定できる方法を確立できた (図 8)。

これまで 60 回にも及ぶ前処理及び質量分析の結果を得ていたが、そのデータを踏まえて、さらに同定数を増加させる目的で検討を行った。初期量 2ml をタンパク濃度測定の上で、0.6mg (30mg/dl) の重量に合うように変更することで、同定タンパク数を平均 260 個から平均 340 個への大幅な増加をもたらすことを見いだした。さらに、タンパク量の過剰は血漿タンパク質が十分に除去されていない可能性を考えて、質量分析結果を見直したところ、アルブミンとトランスフェリンのペプチドカウントが抗体カラム IgY 単独では比較的高く、それらを除く新たな GBC スピнкаラムを加えることで著しくカウントが低下することを見いだした。

具体的にはトランスフェリンを対象に抗体カラム IgY と GBC スピнкаラムの処理を変えた実験を行い、これらを組み合わせた方式が十分な除去率を示した。これらの結果を踏まえて、抗体カラム IgY に加えて、GBC スピнкаラム処理を行うことをルーチンとすることとした。その結果、常に 330 強の微量タンパク質が同定できる系を確立した。

髄液は中枢神経の様子を鋭敏に反映していると想定され、実際これまでの本研究で脳特異的な数多くのタンパク質が同定されてきている。本研究の目的は血液に比較して少ないタンパク量しかない髄液を対象にするために微量測定系を確立することにあるが、微量であるが故に、その測定結果に影響する種々の要因を調べ、最適な検体採取条件を決めることは結果の解釈を行う際に重要になる。一方で、髄液採取は、中枢神経疾患の診断や病態把握のための必須の検査法でないため、その採取は容易ではない。しかし今後の疾患研究において髄液は貴重で有望なバイオリソースになることは明らかであり、国立精神・神経医療研究センターでは

病院各診療科、臨床検査部と連携して、その採取手順を確立した。特に、研究利用に関する検体の取扱に関しては、トランスレーショナル・メディカルセンター臨床開発部にバイオリソース管理室を設置し、コーディネータの配置、IC 取得、匿名化作業の実施などを一括して行うシステムを構築した。このシステムで採取された研究用髄液はプロテオーム研究ばかりでなく、small RNA 解析やメタボローム研究にも十分利用可能であり、その付加価値は高い。

正常対照の髄液を常に保有し、各測定の際に標準として用いる事は不可能である。そのために、米国 Vital 社から検査後残余髄液を購入してプールし、約 100 回分の測定に供する量を確保した。これをプール患者髄液や個々の患者髄液の測定の際に標準として用いたところ、250~340 のタンパクを同定できたものばらつきが大きかった。その後、神経内科および脳神経外科から供給される正常圧水頭症患者の大量の髄液をプールして標準とすることにし、標準髄液間のペプチドのばらつきは両群での測定を最低 5 回は行い換算表を作成し、補正をかけることで解析に用いる事ができるようになった。

採取後の処理は、タンパク組成に大きな影響を与える可能性がある。採取直後に氷冷して運搬し、遠心後直ちに-80℃に保存した場合に比べて、3 時間の室温放置、24 時間の室温放置で増加したり、減少したり、さらには 24 時間放置後には検出ができなくなるタンパク質群を知ることができた。これらの情報は今後各疾患患者髄液を用いた解析結果の解釈に重要な情報となる。

また、絶食にして採取した髄液を用いている論文を目にしたことから、食事の影響に関して調べてみた。一例の結果であっても、同定できた約 550 種のタンパク質の約 25%が食事で増加する(絶食で低下する)ということを見出した。この事実は、被験者数を増加させて検討を行うことでさらにその意味が確実になるとともに、髄液タンパク質の日内変動を調べる研究へと発展できる可能性がある。

## E. 結論

精神・神経疾患のプロテオーム解析を行うにあたって、髄液の有用性を最大限活用できるように、微量タンパク測定系、特に前処理法を確立した。これによって、質量分析計 QSTAR による解析で常に 300 種近くの蛋白質が同定できる系を確立できた。分析装置の発展があれば、さらに多くのタンパク質の同定が可能になるであろう。

また、髄液種集の体制整備、採取後の処理法、食事の影響など、今後髄液を用いた診断や研究を行う際に不可欠な条件検討を行えたことは、今後の研究に大いに資するものと考えられる。

## F. 研究発表

### F-1. 論文発表

1. Hashimoto, M., Ishii, K., Nakamura, Y., Watabe, K., Kohsaka, S. & Akazawa, C. Neuroprotective effect of sonic hedgehog up-regulated in Schwann cells following sciatic nerve injury. *J. Neurochem.* **107**, 918-927. (2008).
2. Namba, T., Maekawa, M., Yuasa, S., Kohsaka, S. & Uchino, S. The Alzheimer's disease drug memantine increases the number of radial glia-like progenitor cells in adult hippocampus. *Glia* **57**, 1082-90 (2009).
3. Ohsaw, K., Irino, Y., Sanagi, T., Nakamura, Y., Suzuki, E., Inoue, K. & Kohsaka S. P2Y12 receptor-mediated integrin-β1 activation regulates microglial process extension induced by ATP. *Glia* **58**, 790-801 (2010).
4. Namba, T., Yabe, T., Gonda, Y., Ichikawa, N., Sanagi, T., Arikawa- Hirasawa, E., Mochizuki, H., Kohsaka, S. & Uchino, S. Pigment epithelium- derived factor up-regulation induced by memantine, an N-methyl- d- aspartate receptor antagonist, is involved in increased

- proliferation of hippocampal progenitor cells. *Neuroscience* **167**, 372-83 (2010).
5. Uchino, S., Hirasawa, T., Tabata, H., Gonda, Y., Waga, C., Ond, Y., Nakajima, K. & Kohsaka, S. Inhibition of N-methyl-D-aspartate receptor activity resulted in aberrant neuronal migration caused by delayed morphological development in the mouse neocortex. *Neurosci.* **169**, 609-18 (2010).
  6. Sanagi, T., Yuasa, S., Nakamura, Y., Suzuki, E., Aoki, M., Warita, H., Itoyama, Y., Uchino, S., Kohsaka, S. & Ohsawa, K. Appearance of phagocytic microglia adjacent to motoneurons in spinal cord tissue from a presymptomatic transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res.* **88** 2736-46, (2010).
  7. Namba, T., Ming, G.L., Song, H., Waga, C., Enomoto, A., Kaibuchi, K., Kohsaka, S. & Uchino, S. NMDA receptor regulates migration of newly generated neurons in the adult hippocampus via Disrupted-In-Schizophrenia 1(DISC1). *J. Neurochem.* **118**, 34-44 (2011).
  8. Kondo, S., Kohsaka, S. & Okabe, S. Long-term changes of spine dynamics and microglia after transient peripheral immune response triggered by LPS in vivo. *Mol. Brain* **17**, 4-27 (2011)
  9. Katayama, T., Kobayashi, H., Okamura, T., Yamasaki-Katayama, Y., Kibayashi, T., Kimura, H., Ohsawa, K., Kohsaka, S. & Minami, M Accumulating microglia phagocytose injured neurons in hippocampal slice cultures: involvement of p38 MAP kinase. *PLoS One.* **7**, 1-11 (2012).
  10. Gonda, Y., Andrews, W.D., Tabata, H., Namba, T., Parnavelas, J.G., Nakajima, K., Kohsaka, S., Hanashima, C. & Uchino, S. Robo1 regulates the migration and laminar distribution of upper-layer pyramidal neurons of the cerebral cortex. *Cerebral Cortex* **23**, 1495-508 (2013).
- F-2. 学会発表  
(国際学会)
1. Ohsawa K, Nakamura Y, Irino, Y, Sanagi T, Suzuki E, Inoue K, Kohsaka S.: Involvement of  $\beta 1$  integrin Activation by P2Y12 receptor in microglial Process Extension. The 22th Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry / Asian-Pacific Society for Neurochemistry, Busan, Korea, 8.25, 2009
  2. Ohsawa K, Sanagi T, Irino Y, Nakamura Y, Suzuki E, Inoue K, Kohsaka S.: P2Y12 receptor-mediated integrin- $\beta 1$  activation regulates microglial process extension induced by ATP. The 29th Naito Conference, Glia World-Dynamic Function of Glial Cells in the Brain-, Kanagawa, 10.6, 2010
  3. Uchino S, Waga C, Asano H, Kohsaka S.: Kinetic study on DNA methylation of autism susceptibility gene, SHANK3, in the developing brain. The 23rd Biennial Meeting of ISN/ESN Joint Meeting. Athens, Greece, 8.28-9.1, 2011
  4. Kotajima H, Nakamura Y, Tsuchiya A, Suzuki E, Uchino S, Kohsaka S.: Ethopharmacological and gene expression analyses in the mouse in response to prenatal exposure to valproic acid. The 11th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry / 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry. Kobe, Japan, 9.29-10.2, 2012
- (国内学会)
1. 難波隆志, 前川素子, 鈴木恵里, 湯浅茂樹, 内野茂夫, 高坂新一: NMDA受容体阻害剤

- の成体海馬神経細胞新生に対する影響. 第 31 回日本神経科学大会, 東京, 7.10, 2008
2. 大澤圭子, 佐柳友規, 中村泰子, 鈴木恵里, 井上和秀, 高坂新一: ミクログリアの形態変化と遊走 –細胞外ATPによる遊走と突起伸長の調節分子機構. 第 52 回日本神経化学大会, 群馬, 6.24, 2009
  3. 佐柳友規, 大澤圭子, 中村泰子, 鈴木恵里, 青木正志, 割田仁, 糸山泰人, 内野茂夫, 高坂新一: 顔面神経軸索損傷負荷後のALSモデルラットにおける運動ニューロン脆弱性に関与するミクログリアの機能の解析. 第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会, 神戸, 9.4, 2010
  4. 大澤圭子, 佐柳友規, 中村泰子, 鈴木恵里, 井上和秀, 高坂新一: アデノシンシグナルによるミクログリアの遊走と突起伸長調節. 第 33 回日本分子生物学会年会, 第 83 回日本生化学大会, 合同年会, 神戸, 12.8, 2010
  5. 松下雄一, 高坂新一, 中嶋一行: ミクログリアによるGDNFの産生/分泌の調節. 第 35 回日本神経科学大会, 名古屋, 9.18, 2012

#### G. 知的所有権の取得状況

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



図1 初期髄液タンパク質濃度と  
質量分析結果のタンパク同定数の関係

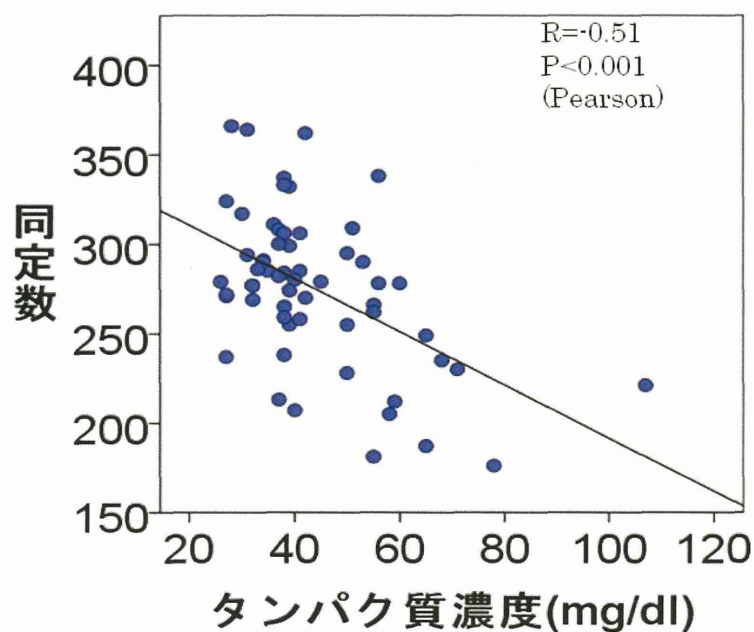


図2 質量分析結果におけるアルブミンの同定数と  
同定タンパク数の関係 (逆相関)

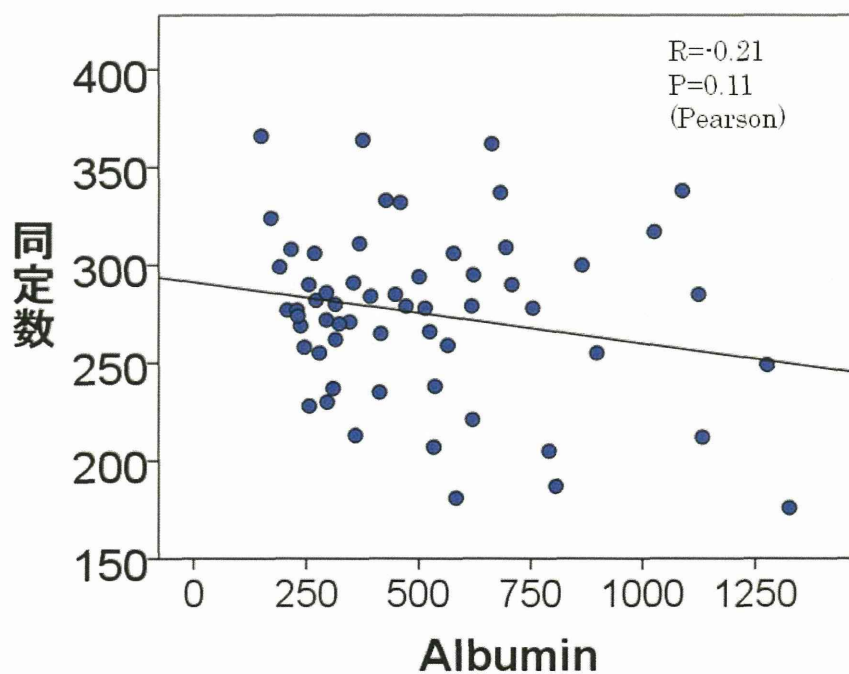


図3 初期髄液容量2mLと初期髄液量0.6mgの比較

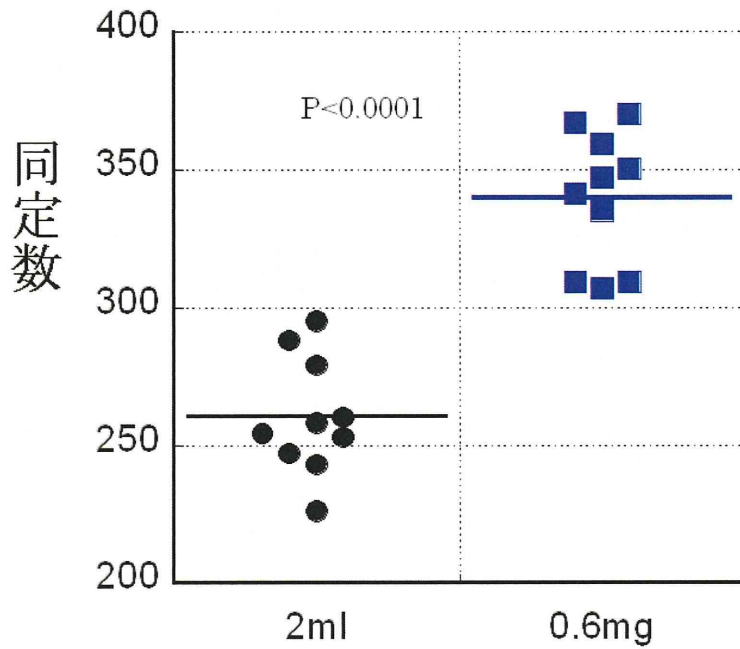


図4 GBCカラムを用いたアルブミンとトランスフェリンの除去

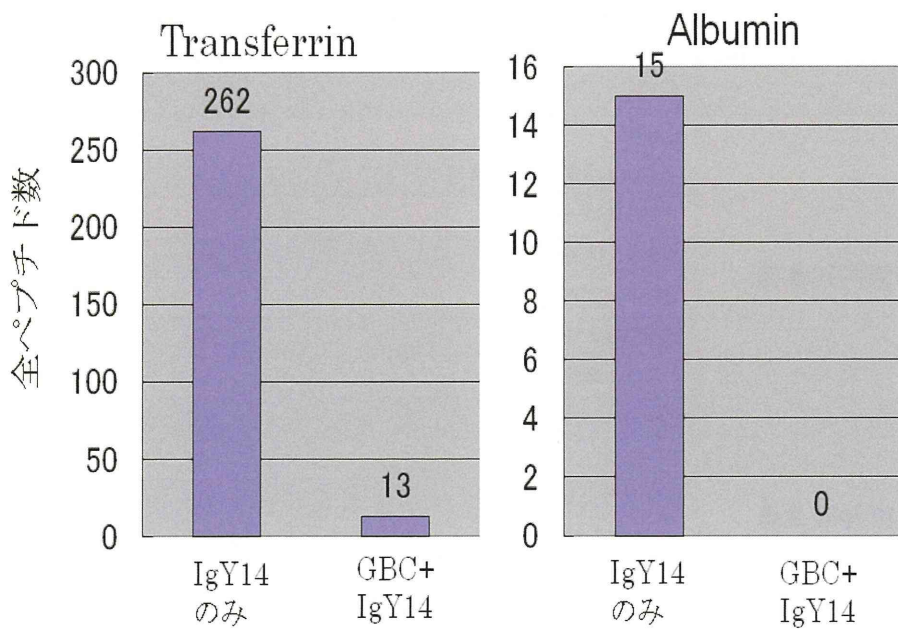


図5 GBCカラムを加えた前処理のタンパク同定数への効果

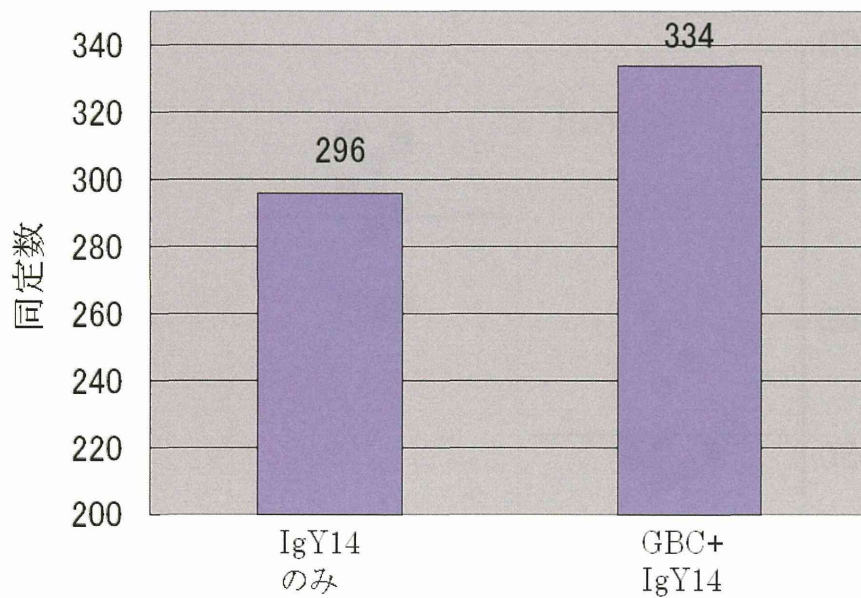
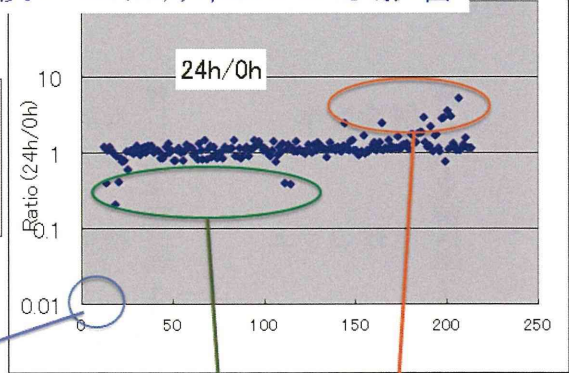


表 1 髄液検体内訳 H25.3.21現在

| 分類     | 内訳         | 検体数 |
|--------|------------|-----|
| 精神疾患   | 統合失調症      | 166 |
|        | 大うつ病性障害    | 101 |
|        | 双極性障害      | 55  |
|        | 健常対照       | 93  |
|        | その他        | 6   |
| 神経内科疾患 | 認知症        | 52  |
|        | 内、アルツハイマー病 | 20  |
|        | 内、ルビー小体病   | 7   |
|        | パーキンソン病    | 75  |
|        | 脊髄小脳変性症    | 7   |
|        | 進行性核上性麻痺   | 24  |
|        | 正常圧水頭症     | 31  |
|        | その他        | 105 |
| 小児神経疾患 | てんかん       | 4   |
|        | 精神遅滞       | 12  |
|        | 内、てんかん合併   | 6   |
|        | その他        | 4   |
| 合計     |            | 735 |

図6 CSF検体採取後の室温放置による影響

方法：正常コントロールから髄液を採取し、  
 1) 氷冷して運搬し、直ちに遠心して、  
 -80°Cに保存  
 2) 室温に24時間放置して、遠心の後、  
 -80°Cに保存



24時間では検出できなかったタンパク質

myeloperoxidase  
 S100 calcium-binding protein A8  
 azurocidin 1 preproprotein  
 fibrinogen, gamma chain isoform gamma-A precursor  
 myeloid cell nuclear differentiation antigen  
 PREDICTED: similar to hCG2042717  
 matrix metalloproteinase 9 preproprotein  
 fibrinogen, beta chain preproprotein  
 coagulation factor XI precursor  
 AFG3 ATPase family gene 3-like 2

変動したタンパク質

| タンパク質名                                                               | ratio(24h/0h) |
|----------------------------------------------------------------------|---------------|
| hypothetical protein LOC196500                                       | 5.335         |
| Ly-6 neurotoxin-like protein 1 isoform c                             | 3.681         |
| serpin peptidase inhibitor, clade A, member 3 precursor              | 3.054         |
| low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III-B precursor | 3.002         |
| insulin-like growth factor binding protein 4 precursor               | 2.922         |
| complement component 4A preproprotein                                | 2.882         |
| apolipoprotein E precursor                                           | 2.472         |
| alpha 1 type XVIII collagen isoform 2 precursor                      | 2.470         |
| insulin-like growth factor binding protein 6                         | 2.241         |
| cathepsin D preproprotein                                            | 0.413         |
| ribonuclease T2 precursor                                            | 0.405         |
| dickkopf homolog 3 precursor                                         | 0.399         |
| cadherin 13 preproprotein                                            | 0.388         |
| cartilage acidic protein 1                                           | 0.208         |

図7 室温放置による影響

