

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：H21 年度～H21 年度

課題番号：21591005

研究課題名（和文）びまん性肺疾患のパラフィン包埋検体を用いたプロテオミクス解析

研究課題名（英文）A proteomic analysis of sample embedded in paraffin from patients with interstitial lung diseases

研究代表者 林 伸一（HAYASHI SHINICHI）

日本大学医学部・助教

研究者番号：20445745

## 研究成果の概要（和文）：

本研究はびまん性肺疾患組織を、マイクロダイセクションを用いて切り出し、プロテオミクス技術で網羅的に解析することにより、タンパク質のネットワーク解析から病態を明らかにしようとするものである。研究代表者は十分なサンプル量を用いてこれまでのプロテオミクス解析を行ってきた経験があるが、本研究は非常に微量のサンプルを解析する、従来報告されていない試験的な試みであった。パラフィン包埋サンプルの前処理、マススペクトロメトリーの条件変更等、様々な工夫を行ったが、ケラチンやアルブミンなどのメジャータンパク質しか同定できなかった。事件計画の見直しとさらに感度の高いタンパク質解析技術の開発が必要である。

## 研究成果の概要（英文）：

We designed this study to reveal a protein network in diffuse interstitial lung disease by a proteomic analysis of tissue sample, which was selectively collected using laser micro dissection. We modified protein-processing method of paraffin embedded sample prior to mass spectrometer; however, we could detect only major protein such as keratin and albumin so far, because amount of protein in the dissected sample was extremely small. We need to change our method and use new technology in the future to increase sensitivity, which is enough for a comprehensive analysis of very small sample.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
平成 22 年度	800,000	240,000	1,040,000
平成 23 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺線維症、プロテオミクス、マイクロダイセクション

## 1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症をはじめとするびまん性肺疾患で診断や活動性を評価する様々なバイオマーカーの検討が行われているが、臨床応用できるレベルのものは少ない。びまん性肺疾患の病態を理解する為には、様々な遺伝子、蛋白質の発現を多角的に、かつ相互関係としてとらえるのが重要である。ジーンチップなどのジェノミクスやプロテオミクスの技術は病態の網羅的な解析方法として有用である。

一般にびまん性肺疾患、特に Usual interstitial pneumonia (UIP) では正常、病的組織が混在し、しかも上皮や線維芽細胞など様々な細胞で構成されおり、組織全体の網羅的解析の結果を評価し、病態に迫るのはかなり困難であり、肺を構成する細胞単位での遺伝子、蛋白質発現を検討することが必要である。

## 2. 研究の目的

本研究は、特発性肺線維症などのびまん性肺疾患の病変部組織をレーザーマイクロダイセクション (LMD) で切り出した後にプロテオミクス解析し、蛋白質発現の網羅的解析をするだけでなく、病変部における蛋白質発現パターンと相互作用のネットワークを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

ホルマリン固定後にパラフィン包埋された UIP 検体を顕微鏡下の LMD で病変部の組織のなかで、活動性の高い部分を切り出し Antigen retrieval 技術と透析により蛋白質を抽出する。抽出された蛋白質をトリプシン処理した後に逆相クロマトグラフィーで分離し Applied Biosystem 社の QSTAR XL Hybrid LC/MS/MS システム

を用いてペプチドの同定を行う。

## 4. 研究成果

当初の予定では、パラフィン切片からの蛋白抽出を目指し、透析による脱塩の後に MS による解析を行った。解析に用いたタンパク質量は微量であるため定量は出来なかった。表 1 に実験開始当初の代表的結果を示す。

Taxonomy : Homo sapiens (human) (19372 sequences)  
Timestamp : 8 Jun 2010 at 11:06:19 GMT

ID	
K201 HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 - Homo sapiens (Human)
K1010 HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10 - Homo sapiens (Human)
K109 HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9 - Homo sapiens (Human)
K22E HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal - Homo sapiens (Human)
K206A HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 6A - Homo sapiens (Human)
K205 HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 5 - Homo sapiens (Human)
ALBU HUMAN	Serum albumin precursor - Homo sapiens (Human)
K1014 HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 14 - Homo sapiens (Human)
K201 HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 - Homo sapiens (Human)
K1010 HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10 - Homo sapiens (Human)
K109 HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9 - Homo sapiens (Human)
K22E HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal - Homo sapiens (Human)
K206A HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 6A - Homo sapiens (Human)
K205 HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 5 - Homo sapiens (Human)
ALBU HUMAN	Serum albumin precursor - Homo sapiens (Human)
K1014 HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 14 - Homo sapiens (Human)

表 1 MS 解析結果の一例

同定できたのはケラチンやアルブミンなどのメジャー蛋白質だけにとどまった。解析に用いるタンパク質の絶対量が少ないと考え、複数の切片からのサンプルをあわせて解析すると同時に、ケラチン混入の防止、脱塩の条件などを工夫して繰り返し実験を行ったが、同様の結果であった。パラフィン切片に代わり凍結切片を用いて解析を行ったが、やはりメジャー蛋白質以外は同定されなかった。

従来の研究ではマイクロダイセクションを用いたサンプルは、切り出すサンプル量が限られるため、RT-PCR や Western blot などの非常に感度の高い解析技術で RNA やタンパク発現が検討されてきた。その一方で、プロテオミクス技術は蛋白質の発現を網羅的に解析することにより、病態を多角的にとらえることができるが、感度や定量性の問題がある。研究代表者は differential gel electrophoresis やメジャー蛋白除去カラムなどを用いて感度を上げたプロテオミクス解析を行ってきており、その経験を生か

して両方の技術を統合することを試みた。もし有意義な結果が得られれば、呼吸器疾患に限らず、様々な疾患のパラフィン標本から病態解析が可能になるはずであったが、現時点で有する施設では、困難であった。もし、より好感度の MS を試す機会があれば、再度、解析を試みたいと考えている。

( )

研究者番号：

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特記なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

林 伸一 (HAYASHI SHINICHI)

日本大学医学部・助教

研究者番号：20445745

##### (2) 研究分担者

小林朋子 (KOBAYASHI TOMOKO)

日本大学医学部・臨床准教授

研究者番号：10343576

権寧博 (GON YASUHIRO)

日本大学医学部・准教授

研究者番号：80339316

##### (3) 連携研究者

