

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 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：13101
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590881
 研究課題名（和文） 三連四重極型質量分析計による尿バイオマーカーのハイスループット多項目同時定量
 研究課題名（英文） High-throughput multiplex quantitation of urinary protein biomarkers using a triple quadrupole mass spectrometer
 研究代表者
 吉田 豊（YOSHIDA YUTAKA）
 新潟大学・医歯学系・講師
 研究者番号：40182795

研究成果の概要（和文）：尿のプロテオミクス解析と、尿に出現する糸球体局在タンパク質の探索により、尿細管傷害マーカー（NGAL、L-FABP、KIM-1、Megalin）、糸球体傷害マーカー（podocalyxin、SHPS-1、Crumbs-like protein 2）をバイオマーカーとして選択し、三連四重極型質量分析計の SRM モードで定量するための条件を決定し、同時多項目定量法の至適化を行うところまで到達した。

研究成果の概要（英文）：A Proteomic analysis of normal urine proteome and seeking of urinary proteins originated from the glomerulus, we found biomarker candidates of tubular injury (NGAL, L-FABP, KIM-1, Megalin) and glomerulus injury (Podocalyxin, SHPS-1, Crumbs-like protein 2). We now constructed SRM transition conditions for multiplexed assay of these biomarkers using TripleQ-mass spectrometer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：腎臓学・尿バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

(1) 腎機能を評価する従来の指標は、血清クレアチニン、糸球体濾過量、尿中微量アルブミン、尿蛋白などであるが、これらの指標は

残存腎機能を評価する上で重要であるが、リアルタイムで起こっている腎臓機能の変化をとらえることは難しい。これらの変化を迅速に捉え、病態を把握し、鑑別診断に役立ち、

非侵襲的に評価することが可能な尿バイオマーカーは、急性腎障害（AKI）ならびに慢性腎臓病（CKD）の早期診断と早期治療介入にきわめて有効な手段となり得る。

(2) プロテオミクス研究により、数多くの尿バイオマーカー候補が報告されたが、このうち、比較的大規模な研究により、AKI あるいは CKD のマーカーとして高く評価されるものが最近浮上してきた。これらのバイオマーカーは多くがタンパク質であり、尿中微量アルブミン上昇や血清クレアチニン濃度上昇が認められるよりかなり早期に濃度上昇が起これり、かつ疾患特異的で鑑別診断に有用なものが含まれる。しかし、この中には、尿中安定性や疾患特異性の点で問題のあるものも存在する。これらの尿バイオマーカーを AKI と CKD に分けてパネル化し、多項目同時測定を行うことは、診断精度を上げ、正確な病態把握、予後判定、治療の評価に大きな貢献ができるものと考えられる。

2. 研究の目的

- (1) 尿プロテオームは不確定な要素が多く、同じ個人でも、採取法、採取時期、サンプル処理、保存法などにより組成が変動する。尿バイオマーカーを正確に定量するためには、できるだけ不確実な要素を排除する必要があり、標準的な尿試料のハンドリング法を検討する。
- (2) これまでに AKI の尿バイオマーカーとして有望視されているタンパク質は近位尿細管、遠位尿細管に局在するものが多く、尿細管傷害のマーカーと考えることができる。一方、糸球体傷害マーカーで糸球体に特異的あるいはほぼ選択的に発現しており、糸球体傷害マーカーとなり得る尿タンパク質の報告はない。質量分析計による糸球体と尿のプロテオームの比較、大規模な免疫組織化学のデータベースで

ある Human Protein Atlas を参照することにより、糸球体傷害マーカーとなりうる尿タンパク質候補を選びだす。

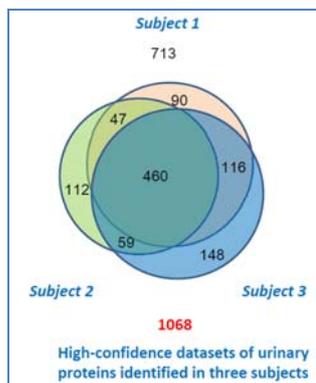
- (3) 三連四重極質量分析計（TripleQ-MS）を用いて、目的のタンパク質を、複数同時に定量するためには、標的タンパク質に帰属するペプチドとその MS/MS スペクトルの取得が必須である。また、正確な定量のためには、化学修飾、翻訳後修飾が起こる可能性のないペプチドを選ぶことが要求される。このために、尿プロテオームの大規模解析を行い、同時にこれまで蓄積してきた糸球体プロテオームの大規模解析の結果をもとに、適切なペプチドを選択し、その MS/MS スペクトルを用いて定量法を至適化する。

3. 研究の方法

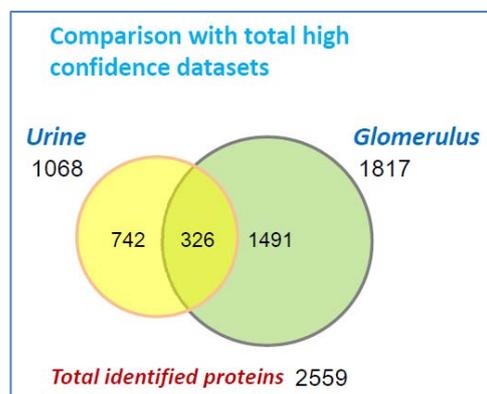
- (1) 三連四重極型質量分析計（TripleQ-MS）を用いた定量は、現在タンパク質の定量において感度、精度の面で卓越した位置にある。原理は、標的とするタンパク質の配列特異的タンパク質分解酵素（トリプシンなど）により生成したペプチドの質量数と、そのペプチドの MS/MS スペクトル（不活性ガスと衝突させることにより生じるフラグメントのスペクトルであり、アミノ酸配列情報を含む）情報から、標的タンパク質の配列特異的なペプチドを選び（第 1 フィルター）、そのペプチドから生じる特定の質量数を持つフラグメントのみを（第 2 フィルター）検出することにある（Single Reaction Mode (SRM) 解析）。安定同位体で標識した同じ配列をもつペプチドの既知量を試料に添加することにより、正確な相対定量と絶対定量が可能であり、かつ、測定時間が短いことから、同時に複数のタンパク質の定量ができることが利点である。定量の鍵は、

化学的に安定で、翻訳後修飾や化学修飾などが起こらず、標的タンパク質に特異的なペプチドの選択にあるが、このためには、実際の試料を質量分析により解析し、目的のタンパク質に帰属するペプチドとその MS/MS スペクトルを取得する必要がある。

- (2) 最初に、標的にするバイオマーカーに帰属するペプチドとその MS/MS スペクトルを取得するために、健常男子 3 名の早朝第二尿を試料として質量分析計による網羅的解析を行った。その結果、AKI の尿中バイオマーカーとして有望視されているタンパク質の多くが同定され、目的のペプチドと MS/MS スペクトルを取得した。



- (3) これらのバイオマーカーの多くは、近位尿細管あるいは遠位尿細管に局在し、尿細管傷害を直接示すマーカーとなり得ると考えられる。しかし、糸球体に局在し、糸球体の傷害マーカーとなり得る尿バイオマーカーは報告されていない。そこで、正常糸球体プロテオームと正常尿プロテ



オームを比較し、尿中に出現するタンパク質で、糸球体に特異的もしくは高度に選択的に発現しているタンパク質を Human Protein Atlas database を用いて選択し、糸球体傷害マーカーになり得るタンパク質候補の絞り込みを行った。

- (4) AKI あるいは CKD のバイオマーカーとして利用可能と考えられるタンパク質を選択し、配列特異的なペプチドの MS/MS スペクトルから、TripleQ-MS を用いた SRM モードで定量するための条件に合致したものを選び、安定同位体標識合成ペプチドを内部標準として用いて、多項目同時定量法の確立を行う。

4. 研究成果

- (1) Human Kidney and Urine Proteome Project (HKUPP) が提唱している標準法により、健常男子 3 名の早朝第二尿を採取し、低速遠心上清をゲル濾過と限外濾過によりタンパク質を脱塩濃縮したものを SDS ポリアクリルアミド電気泳動により分離し、試料毎に 18 分画をとり、トリプシン消化後、高精度・高感受性質量分析計 (LTQ-Orbitrap) により網羅的なタンパク質同定を行った。すべての結果の冗長性を排除し、2 つ以上のペプチドがマッチしたタンパク質を選択した結果、1068 種のタンパク質を同定できた。
- (2) 正常尿プロテオームで同定されたタンパク質には、NGAL、Cystatin C、NAG、beta 2-microglobulin、alpha-1-microglobulin などの尿中 AKI バイオマーカーとして有望視されているタンパク質のほとんどが含まれていることが明らかになった。このことは、三連四重極型質量分析計 (TripleQ-MS) を用いた single reaction monitoring (SRM)

法を実施するためのライブラリーとして、正常尿プロテオームを利用できることを意味するものである。

- (3) これまで報告されている AKI 新規尿バイオマーカーは、多くが分泌タンパク質、細胞タンパク質であり、近位尿細管あるいは遠位尿細管に局在していることから、尿管傷害マーカーのパネルに含めることができると考えられた。一方、糸球体に局在し、糸球体傷害バイオマーカーとして、AKI ならびに CKD の診断にも応用できるタンパク質を見出すために、我々が以前に報告した正常ヒト糸球体プロテオームと尿プロテオームを比較し、両者に共通に同定されるタンパク質で、免疫組織化学により糸球体に特異的あるいは強発現するタンパク質を探索したところ、既に報告されている Podocalyxin 以外に、SHPS-1、Crumbs-like protein 2 が見出された。
- (4) 以上の結果から、AKI あるいは CKD の尿中バイオマーカーパネルとして、尿管傷害マーカーとして NGAL、L-FABP、KIM-1、Megalin を、糸球体傷害マーカーとして、Podocalyxin、SHPS-1、Crumbs-like protein 2 を選択した。現在、TripleQ-MS による多項目同時定量法の確立のため、検討を行っている。このためには、臨床尿試料の入手、定量の対象となるタンパク質ごとに少なくとも 2 つ以上のペプチドの MS/MS スペクトル資料と、内部標準として用いる、それぞれのペプチドに対応する安定同位体標識合成ペプチドが必要であるが、ほぼ準備は整っている段階である。

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 8 件)

- ① Cui Z, Yoshida Y, Xu B, Zhang Y, Nameta M, Magdeldin S, Makiguchi T, Ikoma T, Fujinaka H, Yaoita E, Yamamoto T, Profiling and annotation of human kidney glomerulus proteome. *Proteome Sci*, 2013, 11:13. doi: 10.1186/1477-5956-11-13 (査読有)
- ② Liu Z, Xu B, Nameta M, Zhang Y, Magdeldin S, Yoshida Y, Yamamoto K, Fujinaka H, Yaoita E, Tasaki M, Nakagawa Y, Saito K, Takahashi K, Yamamoto T. Profiling of kidney vascular endothelial cell plasma membrane proteins by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Exp Nephrol*. 2012, doi: 10.1007/s10157-012-0708-1. (査読有)
- ③ Magdeldin S, Yoshida Y, Li H, Maeda Y, Yokoyama M, Enany S, Zhang Y, Xu B, Fujinaka H, Yaoita E, Sasaki S, Yamamoto T. Murine colon proteome and characterization of the protein pathways. *BioData Min*. 2012, 5:11. doi: 10.1186/1756-0381-5-11. (査読有)
- ④ Yoshida Y, Nameta M, Kuwano M, Zhang Y, Bo X, Magdeldin S, Cui Z, Fujinaka H, Yaoita E, Tomonaga T, Yamamoto T. Proteomic approach to human kidney glomerulus prepared by laser microdissection from frozen biopsy specimens: exploration of proteome after removal of blood-derived proteins. *Proteomics Clin Appl*. 2012 6:412-417. doi: 10.1002/prca.201200016. (査読有)
- ⑤ Zhang Y, Yoshida Y, Xu B, Magdeldin S, Fujinaka H, Liu Z, Miyamoto M, Yaoita E, Yamamoto T. Comparison of human glomerulus proteomic profiles obtained from low quantities of samples by different mass spectrometry with the comprehensive database. *Proteome Sci*. 2011, 9:47. doi: 10.1186/1477-5956-9-47. (査読有)
- ⑥ Xu B, Zhang Y, Zhao Z, Yoshida Y, Magdeldin S, Fujinaka H, Ismail TA, Yaoita E, Yamamoto T. Usage of electrostatic eliminator reduces human keratin contamination significantly in gel-based proteomics analysis. *J Proteomics*. 2011, 74:1022-10299. doi:

10.1016/j.jprot.2011.03.001. (査読有)

- ⑦ Koda R, Zhao L, Yaoita E, Yoshida Y, Tsukita S, Tamura A, Nameta M, Zhang Y, Fujinaka H, Magdeldin S, Xu B, Narita I, Yamamoto T. Novel expression of claudin-5 in glomerular podocytes. Cell Tissue Res. 2011, 343(3):637-48. doi: 10.1007/s00441-010-1117-y (査読有)
- ⑧ Magdeldin S, Li H, Yoshida Y, Satokata I, Maeda Y, Yokoyama M, Enany S, Zhang Y, Xu B, Fujinaka H, Yaoita E, Yamamoto T. Differential proteomic shotgun analysis elucidates involvement of water channel aquaporin 8 in presence of α -amylase in the colon. J Proteome Res. 2010, 9:6635-46. doi:10.1021/pr100789v. (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

- ① Yoshida Y et al, Increased identification of low-abundance, insoluble proteins of glomerulus laser-microdissected from frozen tissue sections exposed to repeated PBS washing. 第 11 回国際ヒトプロテオーム機構学術集会, 2012 年 9 月 9 日-13 日、ボストン (アメリカ合衆国)
- ② 吉田 豊、HKUPP: Human Kidney and Urine Proteome Project. 日本プロテオーム学会 2012 年大会 (第 10 回日本ヒトプロテオーム機構)、2012 年 7 月 26 日-27 日、東京
- ③ 吉田 豊他 凍結腎生検試料から Laser microdissection により調製した糸球体のプロテオーム解析: 血液由来タンパク質の除去。日本プロテオーム学会 2012 年大会 (第 10 回日本ヒトプロテオーム機構)、2012 年 7 月 26 日-27 日、東京
- ④ Yoshida Y et al, Extensive profiling of human urine proteome: construction of SRM transitions for quantification of urinary biomarkers for acute and chronic kidney diseases. 第 10 回国際ヒトプロテオーム機構学術集会, 2011 年 9 月 4 日-7 日、ジュネーブ (スイス連邦)
- ⑤ 吉田 豊他、正常ヒト尿プロテオームの特徴: AKI バイオマーカーの多項目同時測定の基礎的検討。日本プロテオーム学会 2011 年大会 (第 9 回日本ヒトプロテオーム機構)、2011 年 7 月 28 日-30 日、新潟
- ⑥ Yoshida Y, Verification and standardization of comparative proteome analysis of human glomeruli prepared by laser microdissection

from frozen block. 第 9 回国際ヒトプロテオーム機構学術集会, 2010 年 9 月 19 日-23 日、シドニー (オーストラリア連邦)

- ⑦ 吉田 豊他、Laser microdissection と LC-MS を用いた腎生検試料の糸球体プロテオーム解析。第 53 回日本腎臓学会学術総会、2010 年 6 月 16 日-18 日、神戸

[その他]

ホームページ等

<http://hkupp.kir.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 豊 (YOSHIDA YUTAKA)
新潟大学・医歯学系・講師
研究者番号: 40182795

(2) 研究分担者

山本 格 (YAMAMOTO TADASHI)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 30092737