

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 9 日現在

機関番号：87204

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590909

研究課題名(和文) プロテオミクスによる大脳白質病変の新たな危険因子の探求

研究課題名(英文) Validation of new risk factors for cerebral white matter lesions by proteomics

研究代表者

高島 由紀 (TAKASHIMA, YUKI)

独立行政法人国立病院機構肥前精神医療センター(臨床研究部)・その他部局等・研究員

研究者番号：70576404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：健常者に見られる大脳白質病変の病的意義を見出すため、我々は、大脳白質病変群およびコントロール群の血清を使用し、SELDI-TOF-MSを使用して新たなバイオマーカーの探索を行った。大脳白質病変群の血清に特異的な、かつコントロール群との間に有意な差のあるピークが得られれば、内部標準となる蛋白質を使用し、より正確な分子量をもとめることとした。結果：実験を5回行ったが、2群間で有意差($p < 0.05$)のあるピークはみられなかった。結論：大脳白質病変群に特異的な血中タンパク質を見出すことはできなかった。

研究成果の概要(英文)：We applied Surface-enhanced laser desorption / ionization - time-of flight mass spectrometry (SELDI -TOF-MS) technology to study proteomic profiles at serum of with white matter lesions in healthy adults. Preliminarily, we did proteo miner protocol and obtained 4 fraction of serum. Then we obtained expression of protein profiles by using strong anion-exchange (Q10) and weak cation-exchange (CM10) and Protein Chip Arrays. With the TOF-MS, mass-to-charge (m/z) or molecular weight (M.W.) of the peptide was determined. The protein expression patterns were analyzed using Biomarker Wizard software, which generates consistent peak intensities were shown as the ratio of intensity values. Result: We went five times of experiments. However, we were not able to find the significantly different peak intensity between two groups. Conclusion: There were no specific protein profiles difference in human serum with or without cerebral white matter lesions.

研究分野：神経内科

キーワード：大脳白質病変 プロテオミクス mass spectrometry プロテインチップ

1. 研究開始当初の背景

大脳白質病変は高齢者において高頻度に存在し、認知機能低下を引き起こす。これまで多くの研究にもかかわらずその成因や危険因子に関しては不明な点が多く、一次予防を困難にしている。

2. 研究の目的 本研究は、白質の主要構成要素であるオリゴデンドログリアの脆弱性に注目し、質量分析計を用いたプロテオミクスにより網羅的に白質障害に関連する血中タンパクを検索し、その中から未知のバイオマーカーや危険因子の候補を同定し、予防戦略の確立に貢献しようとするものである。

3. 研究の方法

1) 1997年より当院臨床研究部と佐賀県脊振町保健福祉課とで行っている健診事業の一環として行う。対象は佐賀県脊振村在住の健常高齢者である。受診者には口頭と文書により説明を行い、書面による承諾を得る。また当院倫理委員会による承認を受ける。受診者に対し一般血液検査およびプロテインチップ解析のための採血を行い、心電図、高次脳機能と脳MRI (T1, T2 強調画像、FLAIR, T2* 画像) を施行する。現時点で200例ほどの地域在住の健常者の脳MRI 健診を行い、サンプルを保存している。このサンプルを用いて、上記方法 (SELDI TOF-MS) による網羅的解析を行う。症例・対象研究のデザインで、年齢・性別、高血圧の頻度を一致させて両群を比較し、白質病変群に特有のタンパクピークを見出す。現時点で200例のサンプルをタンパク解析用として保存している。平均年齢は70歳であるので、中等度以上の白質病変 (Fazekas 分類 grade2-3) は200例中約15例に存在していると予想している。こ

の明らかな白質病変を有する群 12 例に対し、全く白質病変の無い 12 例を選択し、症例・対象研究を行う。比較する 2 群は年齢、性別、高血圧の有無を一致させて検討する。

2) 方法: (1) プロテインチップによる解析 (SELDI-TOF-MS)

血清サンプルは、陽イオンチップ、陰イオン交換チップにのせた後、エネルギー吸収剤

(energy absorbing molecule) のシナピン酸 (アセトニトリルと

トリフルオロ酢酸と混合) を添加しマトリックスを形成させる。調整したチップは SELDI 本体に挿入し、マトリックス支

援レーザー脱離イオン化法により飛行時間測定により質量分析を行う。外部標準としては bovine insulin (5733.6Da), bovine cytochrome c (12230.9bDa), bovine lactoglobulin A (18363.3 Da), horseradish peroxidase (43240.0 Da) を用い、必要に応じて内部標準の追加添加を用いて、2つの

内部標準により目的とするピークを挟み込み、より正確な分子量をもとめる。変化があったピークを内部標準で絞り込む。

(2) 血中タンパクの濃度差軽減法 (ProteoMiner)

血中タンパクは、アルブミンが約半数を占め、ダイナミックレンジは 10 の 10 乗といわれており、タンパク解析装置のダイナミックレンジをはるかに超えている。本研究では、大量に存在するタンパク質を除去するのではなく、濃度差を軽減する平衡化ビーズである Proteo Miner を用いる。

あらかじめ調整した Proteo Minor ビーズに血清を加え、ビーズに結合してい

ないタンパクを除去するためリン酸バッファーで4回洗浄し、ビーズに結合したタンパクは8M尿素、界面活性剤(2% CHAPS)、5%酢酸を用いて溶出させ、SELDI-TOF-MSなどにより測定する。溶出条件を変えることによってサンプルから4種類のサンプルを採取した。(F1, F2, F3, F4)

平成25年度は、新しい技法であるProteoMiner法の有効性をみるため1回目の実験(W1)では、従来通りに血清サンプルを直接プロテインチップによる解析(SELDI-TOF-MS)にかける群と、ProteoMiner法を使用したあとにSELDI-TOF-MSを行う群に分けて実験を行った。結果、ProteoMiner法を使用した群のほうが有意なピークを認めるとわかった。2回目(W2)、3回目(W3)の実験は、同じサンプルを用いてProteoMiner法の再現性をみた。W3までは複数の血清を混合してProteoMinerにかけていたが4回目の実験(W4)では、血清を個別にProteoMiner法にかけて結果を比較した。プロテインチップによる解析(SELDI-TOF-MS)の条件(pH)を変えて実験を進めた。

4. 研究成果

コントロール(C群), 白質病変例(W群)。それぞれ40UIずつ保管。これらの血清サンプルを用いて、ProteoMiner技法で溶出条件を変え1サンプルから4種ずつのサンプルを得た。これらをCM10 pH4の条件でSELDI-TOF-MS測定を行った。結果は、専用ソフトで解析し縦軸を信号強度、横軸をタンパク分子量として作図した。

実験経過:

W1 H24年10月 W群 8例, C群 8例。
コントロール群は平均年齢 70.3±7.0

歳、男性:女性2:6、高血圧5例であった。白質病変群は、Fazekas分類grade2-3、平均年齢70.4±7.1歳、男性:女性2:6、高血圧6例だった。8例ずつプールしたものをSELDIへ、および8例ずつプールしたものをProteoMinerからSELDIへかけた。プロテインチップの条件は、CM10, pH4とした。

結果: 直接SELDIへかけた群では特異的なピークは無く、またW群C群の差がみられなかった。ProteoMinerにかけてものはバラつきが多くピークが見られなかった。

W2 H25年1月 W群 12例, C群 12例。コントロール群は平均年齢69.0±6.8歳、男性:女性2:10、高血圧9例であった。白質病変群は、Fazekas分類grade2-3、平均年齢69.3±6.4歳、男性:女性2:10、高血圧9例だった。

12例プールしたものをProteoMinerからSELDIへかけた。プロテインチップの条件は、CM10, pH4とした。:結果1(R1)
もう一群は12例プールしたものをSELDIへと2通りの実験を行った。

結果(R1)ではW群C群間で差が見られた。ProteoMinerにかけない群では特異的なピークは無く、またW群C群の差がみられなかった。

W3 同じ実験によりProteoMinerの再現性をみる目的で行った。H25年3月 W群 12例, C群 12例(W2と同じサンプル条件:CM10, pH4)

12例プールしたものをProteoMinerからSELDIへかけた。:結果2(R2)

結果: R1とR2で再現性が見られた。

(F3,6437, 6634, F1, 4186)

W4 H25年7月 W群 10例, C群 10例 (W3から男性を除く。条件:CM10, pH4)

10例をプールせず、個別にProteoMiner

から SELDI へ : 結果 3(R3)
結果: R2 で認められた W 群, C 群に差のあるピーク (F3, 6437, 6634, F1, 4186)

は今回得られた差のあるピーク
($p < 0.05$) (分子量 3888.6Da, 37957.4Da, 40079.7da) とは一致しなかった。

平成 26 年度の実験結果 ;
平成 26 年度は、引き続き SELDI-TOF-MS の条件 (陰イオン陽イオン、pH など) を変えて実験を進めた。

W 群 10 例, C 群 10 例 条件: Q10, pH 5) を使用した。

10 例をプールせず、個別に Proteo Miner から SELDI へかけた。

再現性があり、かつ W 群, C 群に有意な差のあるピークが得られれば、2 つの内部標準値により目的とするピークを挟み込み、より正確な分子量をもとめることとした。結果: W 群, C 群の 2 群間での特異的なピークはなく、有意差 ($p < 0.05$) のあるピークもみられなかった。これまでの Proteo Miner 実験での結果のばらつきを考えると今後の実験で有意な結果を出すのは難しいと思われた。コントロール群と白質病変群では有意な変化はないと判断し、実験は終了とした。

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)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :

出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織
(1) 研究代表者
高島 由紀 (TAKASHIMA, Yuki)
独立行政法人国立病院機構肥前精神医療センター・臨床研究部・生化学研究室員
研究者番号 : 70576404

(2) 研究分担者
八尾 博史 (YAO, Hiroshi)
独立行政法人国立病院機構肥前精神医療センター・臨床研究部・生化学研究室室長
研究者番号 : 20265010

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :