

特集：ペプチド科学と生化学の接点

疾患・バイオマーカー探索

高 尾 敏 文

近年目覚ましい発展を遂げた質量分析法は、生体試料中の多様な分子の網羅的解析に威力を発揮している。様々な生理的状态から得られる試料の比較解析は、それらを直接反映する分子や有用なバイオマーカーの発見につながると期待されている。特に、種々のヒト体液を用いた解析では、疾患にかかわる分子の同定により、早期診断や予後診断、さらには治療にもつながる有用なマーカーの開発が期待できる。分析対象とする分子としては、タンパク質・ペプチド、脂質や糖鎖等があげられるが、生体から得られる各種体液は各々固有の組成をもつことから、体液に応じた前処理法、そして、対象とする分子に適した分析法の確立が重要となる。ここでは、体液の中でも入手しやすく、扱いやすい尿を用いて、それに含まれるペプチドの網羅的解析とバイオマーカー探索について紹介する。

1. は じ め に

生体には未だ同定されていない極微量の生理機能を担う分子や、バイオマーカーのように生理機能には直接関係しないが、様々な生理状態を反映する分子が数多くあるものと予想される。近年、バイオマーカー（タンパク質・ペプチド、脂質、糖鎖等）探索に関する研究が著しく増え、中でも、疾患と関連して各種体液を用いたプロテオミクス等の網羅的解析研究が盛んに行われるようになった^{1)~24)} (表1)。疾患・バイオマーカーとしてタンパク質・ペプチドを解析する際に、次の三つのポイントが重要と考えられる。1) 存在（発現）量の変動、2) 様々な酵素によるプロセッシングや翻訳後修飾等の化学構造の変化、3) 立体構造の変化。これらは、様々な生理的状态に密接に関連しているものと考えられ、詳細な比較解析はバイオマーカーの同定のみならず、新たな知見をもたらすものと期待される。これらの解析は、現在の質量分析技術やプロテオミクス技法を利用することにより、生体から得られる微量試料

表1 種々の体液を用いた疾患マーカー検索に関する最近の報告

試 料	対 象 疾 患
血清	卵巣がん ¹⁾ 前立腺がん ²⁾ 乳がん ³⁾ 肝細胞がん ⁴⁾ 腎がん ⁵⁾ 膵がん ⁶⁾ 頭頸部がん ⁷⁾ 糖尿病 ⁸⁾ 心筋梗塞 ⁹⁾ アルコール症 ¹⁰⁾
尿	造影剤による腎障害 ¹¹⁾ 膀胱がん ¹²⁾ 腎がん ¹³⁾ 冠動脈硬化 ¹⁴⁾ 乳がん ¹⁵⁾ 腎移植 ¹⁶⁾
脳脊髄液	アルツハイマー病 ¹⁷⁾
唾液	膵がん ¹⁸⁾
関節液	関節リウマチ ¹⁹⁾
乳腺吸引液	乳がん ²⁰⁾
涙液	眼瞼炎 ²¹⁾
唾液	頭頸部がん ²²⁾
胆汁 ^{23, 24)}	—

大阪大学蛋白質研究所 機能・発現プロテオミクス研究系
(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-2)

Peptide profiling of human urine for biomarker discovery
Toshifumi Takao (Laboratory of Protein Profiling and Functional Proteomics, Institute for Protein Research, Osaka University, Yamadaoka 3-2, Suita, Osaka 565-0871, Japan)

に対して高感度かつ正確に行うことができる。実際に、1については安定同位体を用いたポストラベル化法が種々開発されており、2については質量分析による同定技術のみならず、修飾基に応じた様々な分析法が開発されている。3については、疾患に直接関連する特定のタンパク質の構造変化の検出法（トランスサイレチン²⁵⁾や β 2-ミクログロブリン²⁶⁾等）が報告されている。しかし、これらの解析を実際の生体試料に応用していくには、複雑な混合物からいかにターゲットとする物質を単離、濃縮するかという試料前処理に関する問題を克服しなければならない。言いかえると、生体試料は、通常、そのまま質量分析に供しても十分な測定結果は得られない。対象とする物質を網羅的に解析するためには、濃縮や分離技術を駆使し、夾雑物を除去することが極めて重要となる。

2. 尿ペプチドの検出

図1は、尿ペプチドを一旦逆相担体（C18）に吸着し、水でよく洗浄した後に10%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸（TFA）水溶液で溶出させた画分を直接マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析（MALDI-MS）で測定したスペクトルである。尿中に含まれる多くのペプチ

ドが1枚のスペクトル中に観測されているように見えるが、ここで検出されているペプチドは、各種コラーゲン由来の断片ペプチドであることがタンデム質量分析（MS/MS）により判明した。この例のように、一般に、生体試料のような混合物の測定では、含まれるペプチドの量や性質の差により、構成成分を網羅的に検出することは難しく、微量成分は検出されない。すなわち、なるべく多くの構成成分を検出、同定するためにはMS測定前に何らかの分画を行う必要がある。図2は現在筆者らが行っている尿ペプチド・タンパク質の分画の流れを示している。尿をそのままゲルろ過クロマトグラフィーにかけてみると、UV吸収上ではかなりの量の低分子が含まれていることがわかる。高分子量側には、タンパク質画分がみられ、それらの間にペプチド画分（10 kDa 以下）が現れる。筆者らは、分子量約 10 kDa 以下のペプチドに対しては強陽イオン交換クロマトグラフィー→逆相クロマトグラフィーの2段階の分画を行った後（図5）、MS/MS測定によりペプチドの同定を行っている。同定されるペプチドの数は、分析に供する尿の量、分析法、MS装置の性能等により異なってくる。図3は尿 10 mL から同定されたペプチド（内在性）の数を前駆タンパク質ごとにまとめたものであるが、各種コ

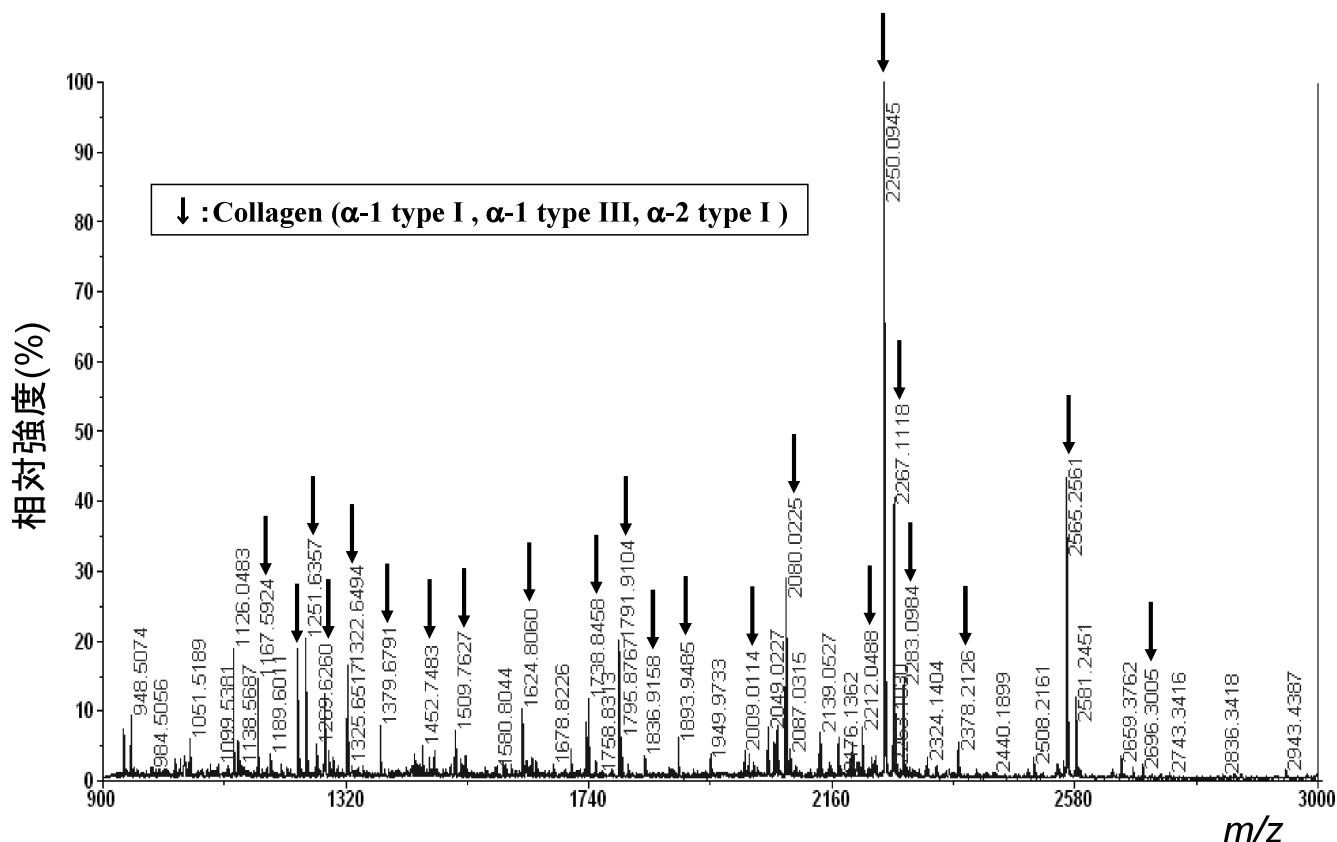


図1 ヒト尿ペプチドのMALDI-MSスペクトル

5 mLの尿を逆相担体に吸着後、10%アセトニトリル/0.1%TFA水溶液にて溶出後、測定した。↓は各種コラーゲン由来断片ペプチドとして同定されたピークを示す。

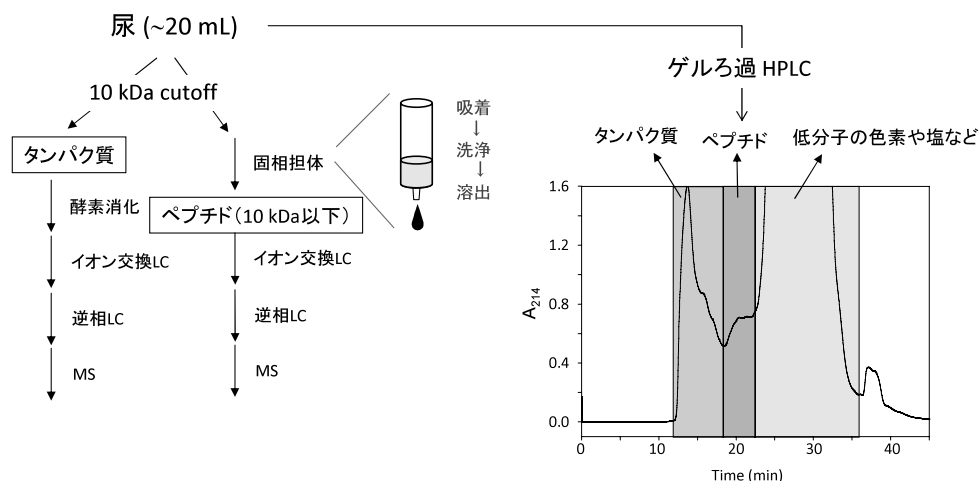


図2 尿ペプチド・タンパク質の単離

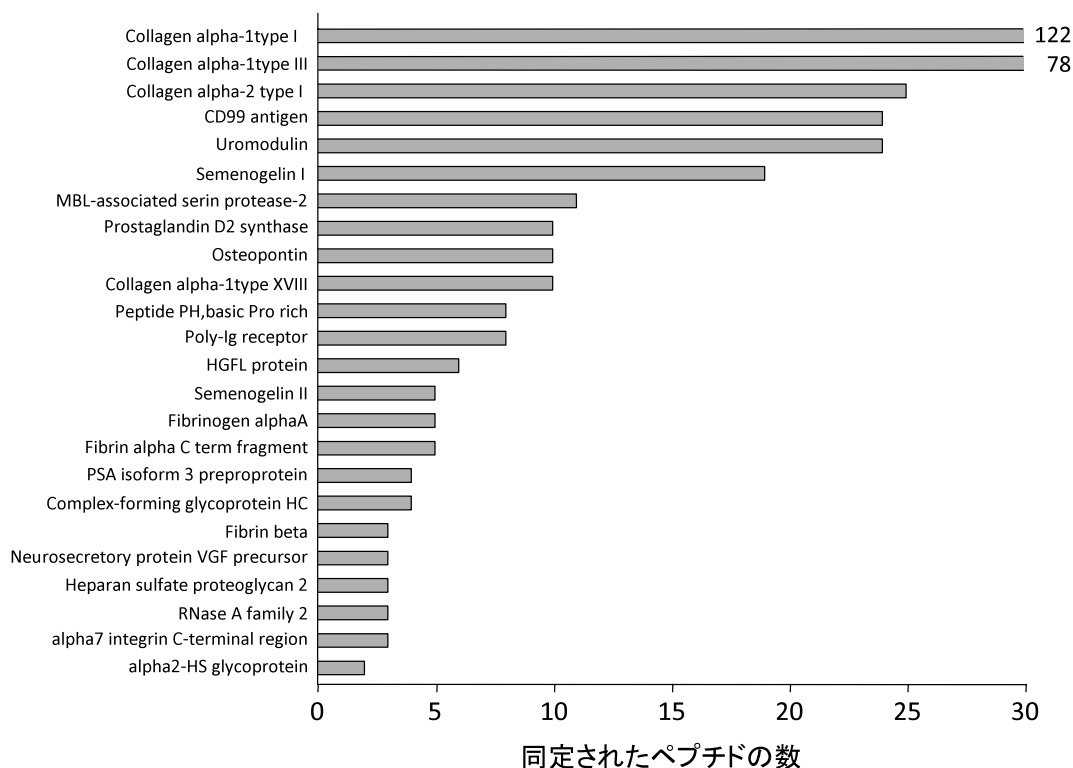


図3 同定された主な尿ペプチド（内在性）の数と種類

ラーゲン由来ペプチドの他に、図1ではみられなかった数多くのタンパク質由来のペプチドが同定されている。さらに興味あることに、これらのペプチドは、もとのタンパク質の特定の部位に由来しており、何らかの代謝過程で特異的切断を受けて生じたものと推測される。

3. バイオマーカーの探索

生体試料からバイオマーカーを探索する場合、定性・定量的な比較解析を行うことにより有意差（バイオマーカー候補）を見出していくが、それらの多くは試料間での調製

時、あるいは、個体差による“ばらつき”や分析計の誤差等に起因する。そのため、見出されたバイオマーカー候補に対しては、比較の対象を広げたり、数を増やしたりして検証することが不可欠であるが、この際には定量的解析が重要になってくる。

図4は、実際にバイオマーカーとしても利用されている尿中のC-ペプチドを液体クロマトグラフィー／エレクトロスプレーイオン化（LC/ESI）-MS/MSで分析した例である。C-ペプチドはインスリンが生合成、分泌される過程で生じるペプチドで、インスリンと等モル血中に分泌され

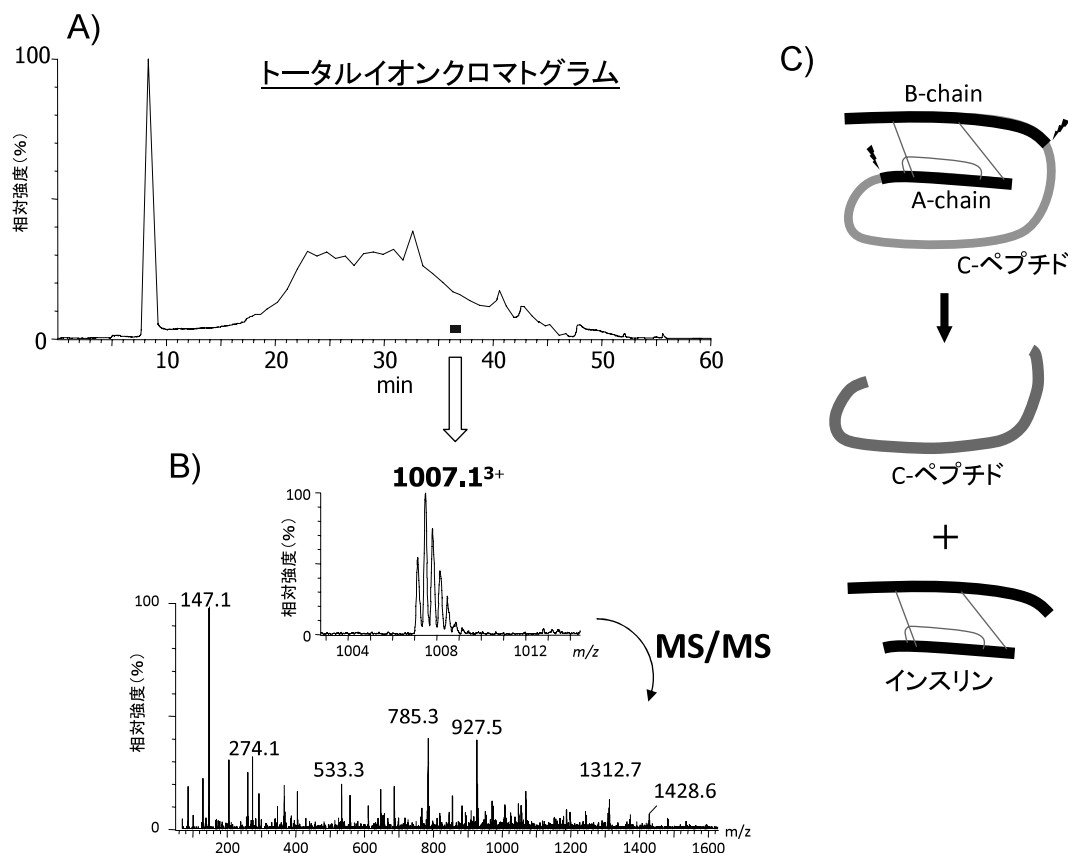


図4 ヒト尿 (25 μ L) ペプチド画分 (10 kDa 以下) のナノ LC/ESI-MS/MS

(A) トータルイオンクロマトグラフィー, (B) バーで示した領域の MS, および, MS/MS スペクトル, (C) インスリン前駆体と C-ペプチド.

る。C-ペプチド自体は生物活性をもたず、安定でほとんど分解されずに尿中に排泄される。従って、血中や尿中の C-ペプチドを定量すれば、インスリンの膵臓からの分泌量を見積もることができる。健常者での血中濃度は 1.2~2.0 ng/mL, 1 日当たりの尿中への排泄量は 24~97 μ g とされている。図 4 は、1 回の排泄で得られた尿 20 mL を用いて、濃縮・脱塩の後、1/800 量を LC/ESI-MS/MS で測定した結果を示している。バーで示した画分に C-ペプチドに相当するペプチドの分子イオンが観測され、MS/MS の結果、31 残基からなる C-ペプチドが明確に同定されている。この例の他にも、尿中には有用なマーカーが多数存在しているものと予想され、バイオマーカー探索のソースとして期待できる。

4. 疾患マーカーの探索

病気の早期診断や予後診断を的確かつ簡単に行うことができる疾患マーカーの開発は重要であり、患者のみならず医療現場においても有益である。しかしながら、現在実際に利用されている疾患マーカーの種類は限られており、また、各々のマーカーにおいては、疾患特異性や早期診断の際重要である感度の面で必ずしも十分とは言えない。対象

となる一般的な生体試料としては、血液や尿等であるが、その中に含まれる成分は一定ではなく、加齢や性別、病態等の様々な生理的要因で変化しているものと思われる。ペプチドやタンパク質の解析においては種類のみならず各構成成分の量的なダイナミックレンジはしばしば解析を困難にする。尿ペプチドでいえば、図 1 で示したように、各種コラーゲン由来のペプチドが成分の大半を占め、逆相 HPLC による 1 回の分画だけではマイナーな成分の検出は困難である。一方、仮に最大限の分画を行い、極めて微量成分まで検出したとしても、それら微量成分が有用なマーカーとして使えるかどうかは別問題となる。疾患マーカーの探索は、ある疾患と健常者間での単純な比較解析により行うことはできるが、用いる試料量、あるいは、分析プロトコルにより、検出、同定されるペプチドの数や種類は大きく異なってくる。従って、初期の探索段階での条件設定、すなわち試料量や前処理を含む分析プロトコルについては有意差や目標がみえてくるようになるまで試行錯誤を繰り返すことになる。

様々な比較解析から何らかの有意差が見つかった場合は、その分子に対して定性のみならず定量的解析を行って検証しなければならないが、この際、個体差や個人内での

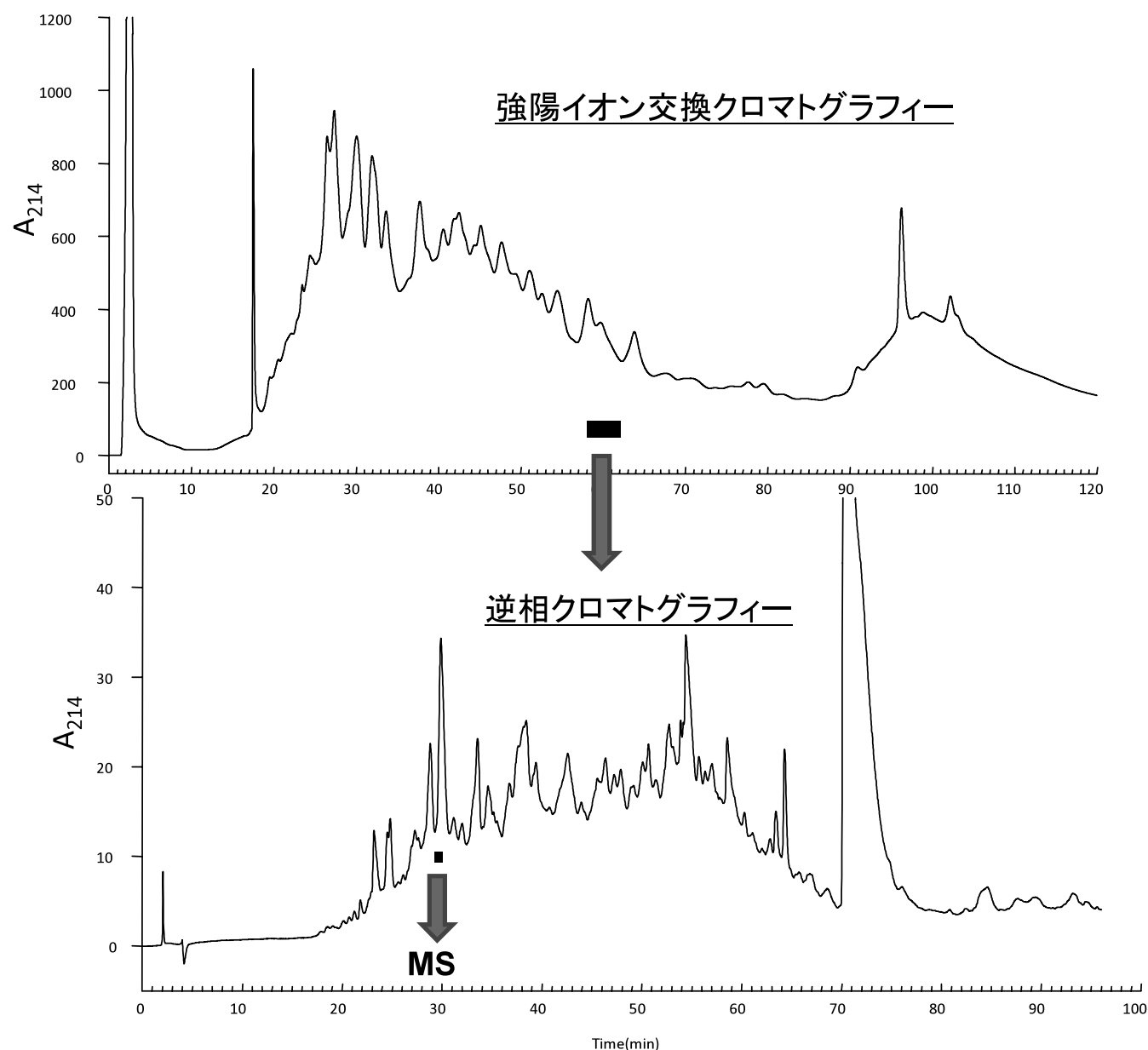


図5 尿ペプチド（10 kDa 以下）画分（図2）の強陽イオン交換クロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィー

変動（日内および日間変動）も調べる必要がある。図5では、ある疾患患者尿から得られたペプチド画分（10 kDa 以下）を強陽イオン交換クロマトグラフィー（14 画分）→逆相クロマトグラフィー（96 画分）の2段階で分画を行ったときの結果を示している。この分離を健常者尿に対しても同様に行い、一例として、それぞれで得られた計1,344 画分の中で図5下のバーで示した1画分のMALDI-MSによる比較を図6に示す。患者尿においては、健常者から得られた同一画分のスペクトルとは明らかに異なる2種のペプチド（Peptide 1, Peptide 2）が検出されている。これらのペプチドは、引き続き行ったMS/MS解析より、どちらも転移性膵臓がん腫瘍からクローニングされたC4.4タン

パク質²⁷⁾由来の断片ペプチドであることがわかった。このタンパク質はC末端にGPIアンカーをもつ膜タンパク質であることがアミノ酸配列から推定されており、体内で何らかの代謝、分解を受けて尿中に排泄されたものと予想された。また、このペプチドは尿中の微量成分（数10 fmol/mL）であるものの、一連の疾患の患者尿に比較的多く検出された。

5. 安定同位体標識による定量解析

疾患・バイオマーカー候補の検証には定量的データの取得が必要不可欠である。質量分析による定量解析では通常内部標準法が用いられる。内部標準試料として用いるペプ

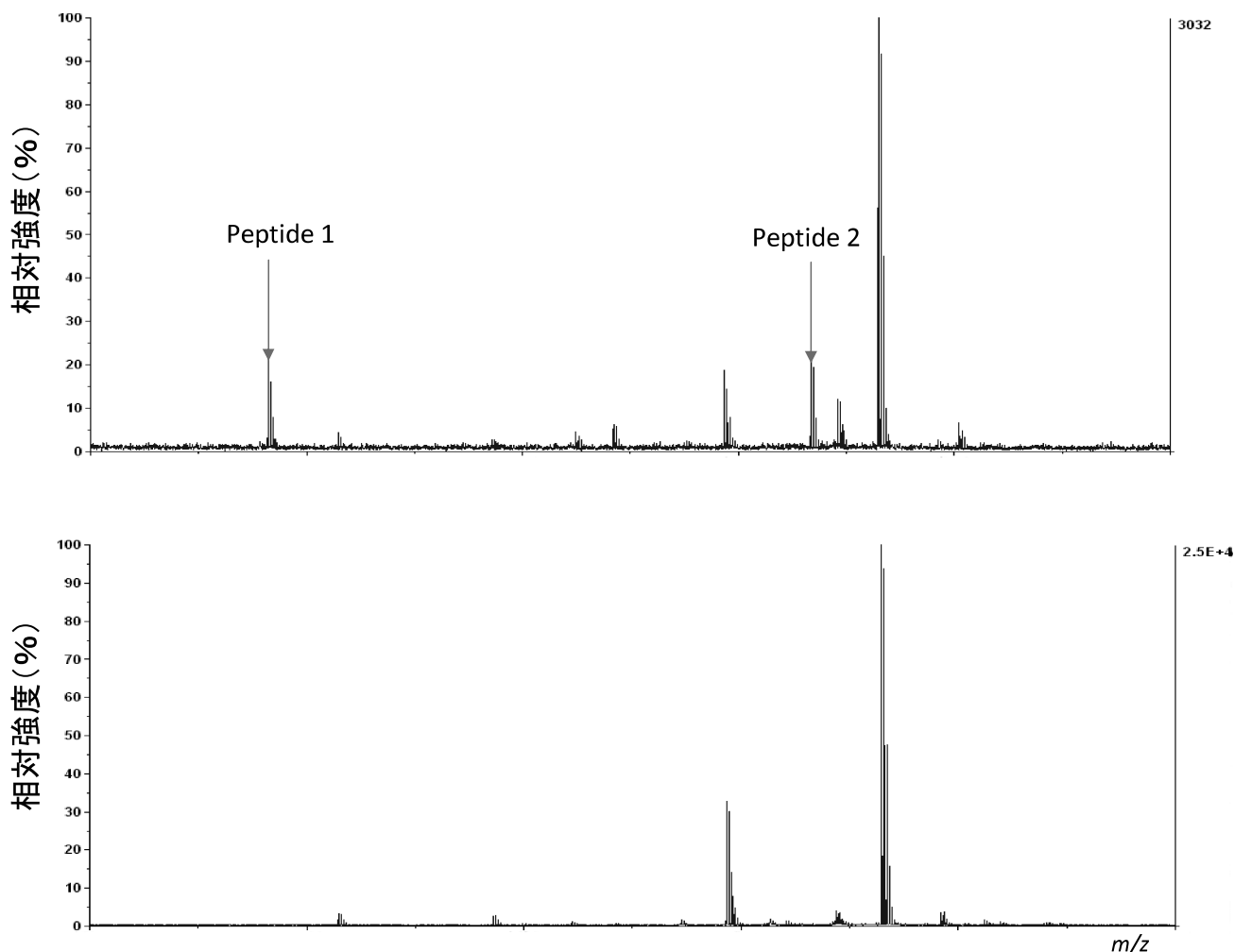


図6 患者（上），および，健常者（下）の尿から単離した画分（図5下のバーで示した領域に相当）のMALDI-MSによる比較

チドは，ターゲットペプチドと同じ配列とし，また，質量分析において試料と分離して検出する必要があるため，安定同位体で標識化しておく^{脚注1)}．筆者らは，非標識ペプチドからでも簡便に調製することが可能な安定同位体 ^{18}O ^{脚注2)}で標識化したペプチド（図7）を用いて定量解析を行っている．また，合成ペプチドを利用して抗ペプチド抗体を調製すれば，免疫沈降法等により短時間で効率よく目的ペプチドを単離，検出することも可能になる．以下に，Peptide 1（図6上）に対して安定同位体標識による定量解析を行っ

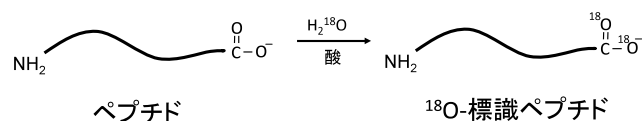


図7 ペプチドの安定同位体 ^{18}O による標識

ペプチドを H_2^{18}O に溶解し，酸性下，室温でインキュベーションして調製．

た例について紹介する．

別途調製した ^{18}O 標識合成ペプチド（200 fmol）を尿（10 mL）に添加した後，限外ろ過（10 kDa MWCO）によりペプチド画分（10 kDa 以下）を得て，総ペプチド量をUV吸収から見積もった後，抗ペプチド抗体を固定化した担体にて目的ペプチドを濃縮，溶出し，MALDI-MSにより測定した．この操作を治療前後の同一患者尿に対して行い，尿中に排泄された当該ペプチドの量を比較した（図8）．ペプチド（非標識）量は，内部標準として用いた ^{18}O 標識ペプチドの観測ピーク面積をもとに見積もることができる．その結果，治療後（28 fmol）では尿中に排泄されるPeptide 1の量は減少しており，マーカー候補となり得る

脚注1) 安定同位体で標識化したペプチドは，非標識ペプチドと同じ化学的性質を有するが，質量分析においては分子質量の差により分離して観測される．従って，非標識，標識ペプチドの分子イオンピークの面積比をとることにより定量を行うことができる．

脚注2) 安定同位体としては，他に ^{13}C や ^{15}N で標識化したペプチドも同様に利用できるが高価である．また， ^2H も利用可能であるが，交換可能な部位での標識化物は使えない点と，同位体効果による化学的性質のわずかな変化が無視できない場合もあるので注意を要する．

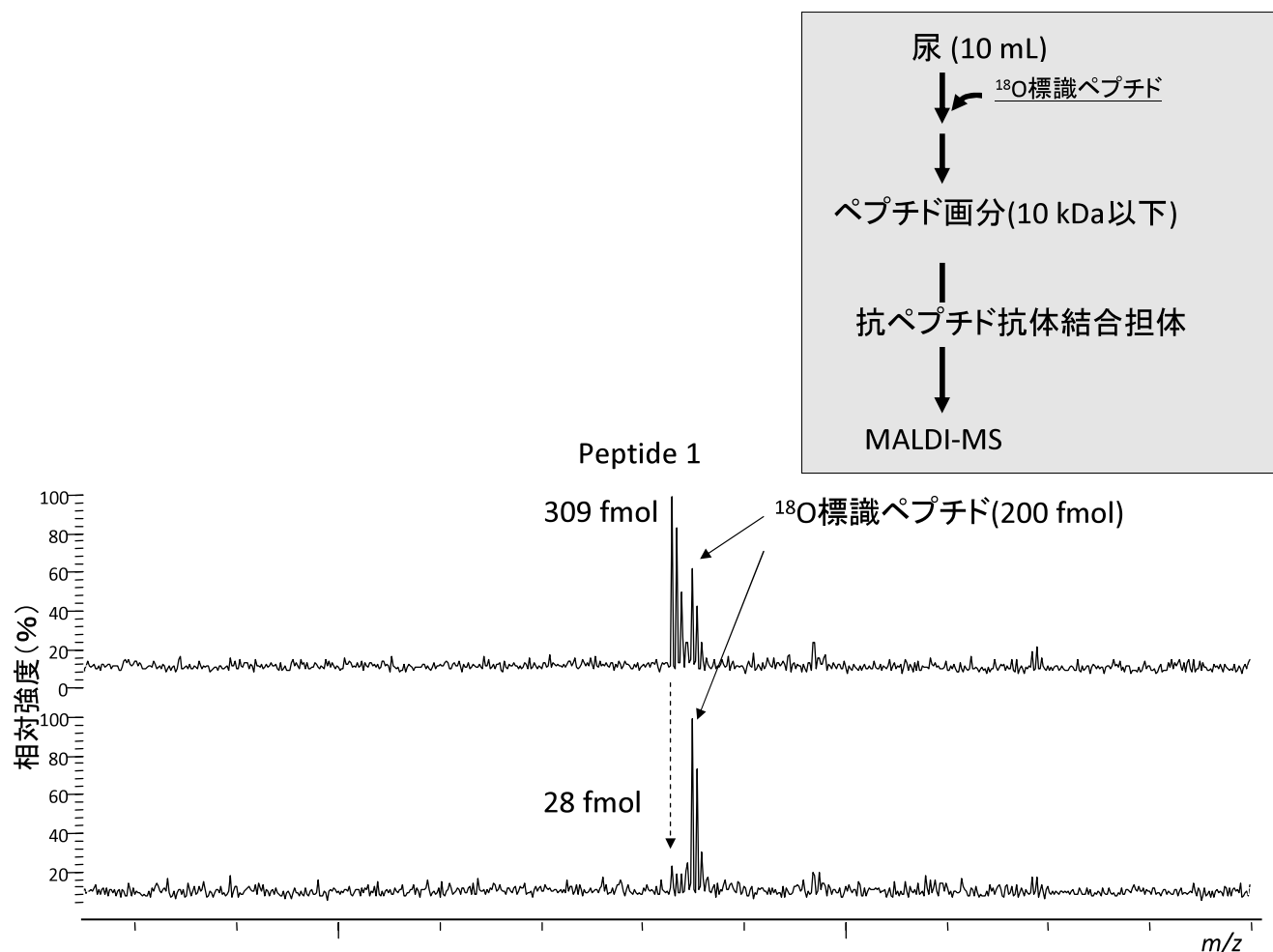


図8 尿に含まれる Peptide 1 (図6上) の定量解析

尿は同一患者から治療前(上), 治療後(下)に採取したものを用いた。 ^{18}O 標識体(内部標準物質)は非標識体(内在ペプチド)の質量値よりも+4 Da 高質量側に観測される。ピークは非標識体の天然同位体ピークと一部重なって観測されるが, 同位体分布解析ソフトウェア “*Isotopica*”^{(28), (29)} (<http://coco.protein.osaka-u.ac.jp/Isotopica>) を用いることにより, 各々の成分の比率は正確に見積もることができる。

ことが示唆された。前述のように, このようなマーカー候補に対して疾患マーカーとしての有用性を示すためには, 疾患特異的であるかどうかや個体差等を調べる必要があり, 検体数を増やして検証していかなければならない。

6. お わ り に

尿等の体液には様々な性質の物質が含まれており, ここで紹介したように, 分子量 10 kDa 以下のペプチドに絞ってみても膨大な数のペプチドが含まれている。それらを質量分析により網羅的に解析していく上で, 分析試料をどのように調製するか, すなわち, 目的とする物質の抽出や精製法, さらに, 出発試料の量や安定性などによって得られる結果は大きく左右される。筆者らの解析によれば, 尿中のペプチド・タンパク質は他の体液に比べて極めて安定で, また, 簡単な前処理により夾雑物を効率よく取り除くことができる。一方, 血液には様々なタンパク質分解酵素

が含まれており, 前処理や保存中に少なからず分解を受ける。従って, 血液中のペプチドやタンパク質の分析までの前処理には厳密なプロトコルが必須である。また, 個体差や性差, 年齢などによる生理的変化も少なからず影響を及ぼすため, 疾患・バイオマーカー候補を探索するには, それらの変動を考慮しつつ, 病態と連動して質的あるいは量的に変化するものを見つけ出さなければならない。本稿で紹介したデータの一部は未発表であるが, マーカーとしての有用性を証明するためには, 数多くの検体について疾患特異性や感度を中心に検証していく必要があり, この段階は多くの労力と時間を要することになる。

謝辞

ここで紹介した内容は, 里見佳典博士(現, 武田薬品工業(株)), 須藤浩三博士(現, シスメックス(株))との共同研究で得られた研究成果の一部である。

文 献

- 1) Petricoin, E.F., Ardekani, A.M., Hitt, B.A., Levine, P.J., Fusaro, V.A., Steinberg, S.M., Mill, G.B., Simone, C., Fishman, D.A., Kohn, E.C., & Liotta, L.A. (2002) *Lancet*, **359**, 572–577.
- 2) Adam, B.L., Qu, Y., Davis, J.W., Ward, M.D., Clements, M. A., Cazares, L.H., Semmes, O.J., Schellhammer, P.F., Yasui, Y., Feng, Z., & Wright, G.L. Jr. (2002) *Cancer Res.*, **62**, 3609–3614.
- 3) Li, J., Zhang, Z., Rosenzweig, J., Wang, Y.Y., & Chan, D.W. (2002) *Clin. Chem.*, **48**, 1296–1304.
- 4) Poon, T.C., Yip, T.T., Chan, A.T., Yip, C., Yip, V., Mok, T.S., Lee, C.C., Leung, T.W., Ho, S.K., & Johnson, P.J. (2003) *Clin. Chem.*, **49**, 752–760.
- 5) Won, Y., Song, H.J., Kang, T.W., Kim, J.J., Han, B.D., & Lee, S.W. (2003) *Proteomics*, **3**, 2310–2316.
- 6) Koopmann, J., Zhang, Z., White, N., Rosenzweig, J., Fedarko, N., Jagannath, S., Canto, M.I., Yeo, C.J., Chan, D.W., & Goggins, M. (2004) *Clin. Cancer Res.*, **10**, 860–868.
- 7) Wadsworth, J.T., Somers, K.D., Cazares, L.H., Malik, G., Adam, B.L., Stack, B.C. Jr., Wright, G.L. Jr., & Semmes, O.J. (2004) *Clin. Cancer Res.*, **10**, 1625–1632.
- 8) Dayal, B. & Ertel, N.H. (2002) *J. Proteome Res.*, **1**, 375–380.
- 9) Marshall, J., Kupchak, P., Zhu, W., Yantha, J., Vrees, T., Furesz, S., Jacks, K., Smith, C., Kireeva, I., Zhang, R., Takahashi, M., Stanton, E., & Jackowski, G. (2003) *J. Proteome Res.*, **2**, 361–372.
- 10) Nomura, F., Tomonaga, T., Sogawa, K., Ohashi, T., Nezu, M., Sunaga, M., Kondo, N., Iyo, M., Shimada, H., & Ochiai, T. (2004) *Proteomics*, **4**, 1187–1194.
- 11) Hampel, D.J., Sansome, C., Sha, M., Brodsky, S., Lawson, W.E., & Goligorsky, M.S. (2001) *J. Am. Soc. Nephrol.*, **12**, 1026–1035.
- 12) Vlahou, A., Schellhammer, P.F., Mendrinis, S., Patel, K., Kondylis, F.I., Gong, L., Nasim, S., & Wright, G.L. Jr. (2001) *Am. J. Pathol.*, **158**, 1491–1502.
- 13) Rogers, M.A., Clarke, P., Noble, J., Munro, N.P., Paul, A., Selby, P.J., & Banks, R.E. (2003) *Cancer Res.*, **63**, 6971–6983.
- 14) von Zur Muhlen, C., Schiffer, E., Zuerbig, P., Kellmann, M., Brasse, M., Meert, N., Vanholder, R.C., Dominiczak, A.F., Chen, Y.C., Mischak, H., Bode, C., & Peter, K. (2009) *J. Proteome Res.*, **8**, 335–345.
- 15) Yang, J., Bielenberg, D.R., Rodig, S.J., Doiron, R., Clifton, M. C., Kung, A.L., Strong, R.K., Zurakowski, D., & Moses, M.A. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 3913–3918.
- 16) Clarke, W., Silverman, B.C., Zhang, Z., Chan, D.W., Klein, A. S., & Molmenti, E.P. (2003) *Ann. Surg.*, **237**, 660–664, discussion 664–665.
- 17) Carrette, O., Demalte, I., Scherl, A., Yalkinoglu, O., Corthals, G., Burkhard, P., Hochstrasser, D.F., & Sanchez, J.C. (2003) *Proteomics*, **3**, 1486–1494.
- 18) Rosty, C., Christa, L., Kuzdzal, S., Baldwin, W.M., Zahurak, M.L., Carnot, F., Chan, D.W., Canto, M., Lillemoe, K.D., Cameron, J.L., Yeo, C.J., Hruban, R.H., & Goggins, M. (2002) *Cancer Res.*, **62**, 1868–1875.
- 19) Uchida, T., Fukawa, A., Uchida, M., Fujita, K., & Saito, K. (2002) *J. Proteome Res.*, **1**, 495–499.
- 20) Sauter, E.R., Zhu, W., Fan, X.J., Wassell, R.P., Chervoneva, I., & Du Bois, G.C. (2002) *Br. J. Cancer*, **86**, 1440–1443.
- 21) Koo, B.S., Lee, D.Y., Ha, H.S., Kim, J.C., & Kim, C.W. (2005) *J. Proteome Res.*, **4**, 719–724.
- 22) Drake, R.R., Cazare, L.H., Semmes, O.J., & Wadsworth, J.T. (2005) *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **5**, 93–100.
- 23) Kristiansen, T.Z., Bunkenborg, J., Gronborg, M., Molina, H., Thuluvath, P.J., Argani, P., Goggins, M.G., Maitra, A., & Pandey, A. (2004) *Mol. Cell. Proteomics*, **3**, 715–728.
- 24) Zhou, H., Chen, B., Li, R.X., Sheng, Q.H., Li, S.J., Zhan, L., Li, L., Xia, Q.C., Wang, H.Y., & Zeng, R. (2005) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**, 3569–3578.
- 25) Keetch, C.A., Bromley, E.H., McCammon, M.G., Wang, N., Christodoulou, J., & Robinson, C.V. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 41667–41674.
- 26) Smith, A.M., Jahn, T.R., Ashcroft, A.E., & Radford, S.E. (2006) *J. Mol. Biol.*, **364**, 9–19.
- 27) Rösler, M., Claas, C., Seiter, S., Herlevsen, M., & Zöller, M. (1998) *Oncogene*, **17**, 1989–2002.
- 28) Fernandez-de-Cossio, J., Gonzalez, L.J., Satomi, Y., Betancourt, L., Ramos, Y., Huerta, V., Amaro, A., Besada, V., Padron, G., Minamino, N., & Takao, T. (2004) *Nucleic Acids Res.*, **32**, W674–678.
- 29) Fernández-de-Cossio, J., Gonzalez, L.J., Satomi, Y., Betancourt, L., Ramos, Y., Huerta, V., Besada, V., Padron, G., Minamino, N., & Takao, T. (2004) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18**, 2465–2472.