

特集：プロテオミクス

血清のペプチドミクス

永井宏平*¹ 金城永幸*^{1,2} 木村健二郎*² 加藤智啓*¹

はじめに

IgA 腎症をはじめとする慢性腎炎の確定診断には腎生検が必須である。また、経過把握のために複数回の腎生検が必要となる場合もある。しかしながら、腎生検は侵襲性が高いことや施行可能な医療機関に限られることを考えると、血液や尿など容易に採取できる検体を用いて、慢性腎炎の診断・鑑別、あるいは治療効果判定などを行うことができれば、その利用価値は大変大きい。近年、質量分析法の発展により、体液中に存在するペプチドを網羅的に検出および定量し、同定することが可能になってきた¹⁾。これらの技術は、“ペプチドミクス”と呼ばれ、癌²⁻⁵⁾や腎疾患⁶⁻⁸⁾などさまざまな臨床分野に応用されるようになって

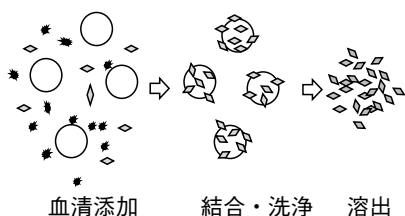
きた。われわれの研究室では、血清ペプチドミクス解析をさまざまな疾患に応用し、バイオマーカーペプチドの探索を行っている^{9,10)}。慢性腎炎に関しても、IgA 腎症患者と健常者の血清ペプチドの比較を行い、健常者と IgA 患者の判別に有効と思われる 5 つのペプチドを発見し報告している¹⁰⁾。

本稿では、IgA 腎症におけるわれわれの研究成果を中心に血清ペプチドミクス解析について解説したい。

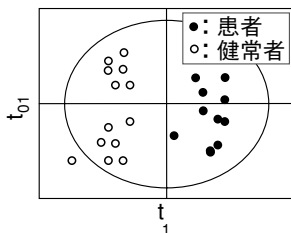
血清ペプチドミクス解析の流れ

図 1 にわれわれの研究室で行っている血清ペプチドミクス解析の概略を示す。血清ペプチドミクス解析は、①磁

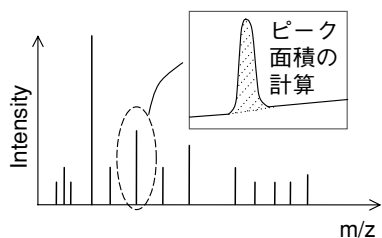
①磁性ビーズを用いた血清ペプチドの回収



③多変量解析 (OPLS-DA) を用いたマーカー候補の探索



②MALDI-TOF MS型質量分析計を用いた血清ペプチドの定量



④MS/MS測定とデータベース検索によるペプチドの同定

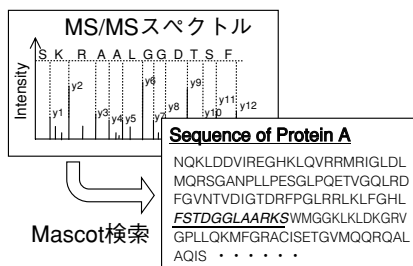


図 1 血清ペプチドミクス解析の流れ

Serum peptidomics

*¹ 聖マリアンナ医科大学大学院疾患プロテオーム・分子病態治療学

*² 同 大学腎臓・高血圧内科

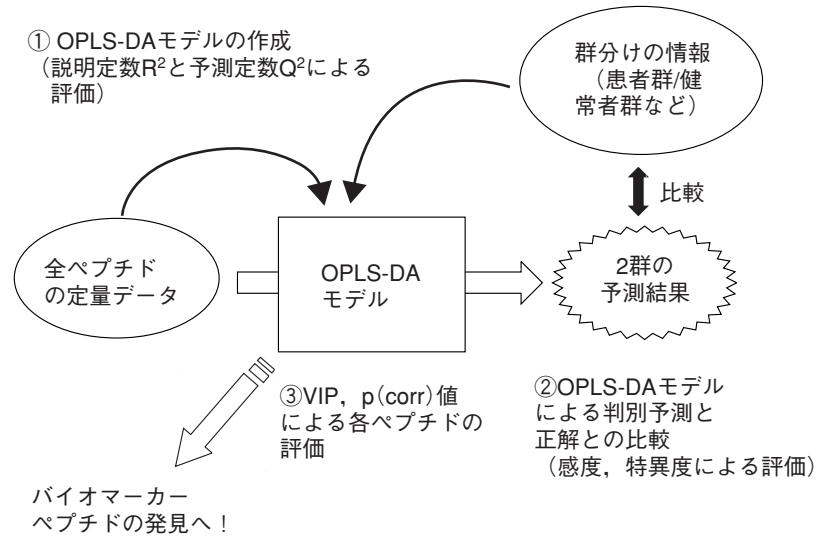


図 2 Orthogonal-Partial-Least-Squares-Discriminate-Analysis (OPLS-DA) の概念図

VIP : variable importance in the projection
 p(corr) : p scaled as correlation coefficient

気ビーズを用いた血清ペプチドの回収, ②MALDI-TOF MS 型質量分析計を用いた血清ペプチドの定量, ③多変量解析を用いたマーカー候補の探索, ④MS/MS 測定とデータベース検索によるペプチドの同定, の4つの過程に大まかに分けることができる。

われわれは, ①, ②のペプチド回収と定量の工程を Bruker Daltonics (Ettlingen, Germany) 社の Clinprot システムを用いて行っている。本システムでは, 表面に特有な機能を持たせた磁性ビーズを用いて血清中のペプチドを回収し, MALDI-TOF MS 型質量分析計を用いて定量する。まず, 血清中に磁性ビーズを加え, 血清中のペプチドをビーズ表面に結合させた後, 磁石を用いてビーズを回収する。ビーズを適当なバッファーで洗浄し上清を除去した後に, 結合していたペプチドを溶出させ, MALDI-TOF MS 型質量計用のプレート上に添加する。MS 測定は, MALDI-TOF/TOF 型質量分析計である Ultraflex (Bruker Daltonics) を用いて Linear MS モードで行う。これにより得られた質量 1,000~10,000 Da 程度の MS スペクトルデータを ClinProTools ソフトウェア (Bruker Daltonics) で解析し, スペクトル間のキャリブレーション, ベースライン補正などの作業を行ったうえで, 各ペプチドピークの定量データを作成する。本システムは操作手順が少なく非常に簡便な方法である。さらに誤差を最小限に抑えるために, 1) 血清からのペプチド調製は同日に行う。2) 試料を疾患群, 健常群など群別に分けず, 順不同にしてペプチド調製と測定を行う。3) 一定

間隔でコントロール試料を配置し, 実験操作が正常に行われているかを確認する, などの工夫を行っている。また, 血液採取から血清調製までの手順, 時間を可能な限り同一にすることも大切である。

図 1③は, 得られたペプチドの定量データを多変量解析し, 疾患群と健常群のような 2 群を判別するバイオマーカー候補ペプチドを探索する工程である。多変量解析とは, ペプチドミクスデータのような複数の変数で構成される大規模データから有益な情報を取り出すための統計的手法の総称である。多変量解析にはさまざまな種類の解析法が存在するが, われわれは SIMCA-P⁺ version 12.0 (Umetrics, Umeå, Sweden) というソフトウェアに搭載されている直交部分最小二乗法-判別分析 (Orthogonal-Partial-Least-Squares-Discriminate-Analysis : OPLS-DA) という手法を用いている¹¹⁾。

図 2 に OPLS-DA の概念図を示した。本法の特徴は, 検出されたすべてのペプチドの定量情報を用いて, 患者群と健常群などの 2 群を判別する計算モデルを作成する点にある。これにより, 個々のペプチドについて有意差を確認する古典的な *t* 検定を用いた方法では発見できないようなバイオマーカーペプチド(群)を発見できる可能性が高くなる。作成された OPLS-DA モデルの判別力は, 感度(陽性数/(陽性数+偽陰性数)), 特異度(陰性数/(陰性数+偽陽性数)), 説明定数 R^2 (既知試料の群分けをどの程度説明できたかの指標), 予測定数 Q^2 (未知試料の群分けがどの程度正

確に予測できるかの指標)の4つのパラメータで評価される。ここで、 R^2 と Q^2 は、最小値が0、最大値が1の定数であり、これらが共に0.4以上の値を示すモデルが生物学的データを扱う際に有効であるといわれている。有効な OPLS-DA モデルが作成された場合、次に、このモデルを解析することで、バイオマーカー候補となるペプチドの探索を行う。その際に利用されるのが variable importance in the projection (VIP), および $p(\text{corr})$ と呼ばれる定数である。VIP は、判別モデルを形成するうえでの各ペプチドの貢献度を示す指標である。一般に、この VIP の値が 1.0 以上のペプチドがバイオマーカーとして有効であるとされる。また、 $p(\text{corr})$ は、バイオマーカーとしての信頼度を表わす指標であり、この値の絶対値が高いほど、そのペプチドがバイオマーカーとして使用できる可能性が高い。

図 1④は、③で発見されたバイオマーカー候補ペプチドを同定する工程である。バイオマーカーペプチドを同定し、そのアミノ酸配列を明らかにすれば、ELISA などの免疫学的手法を用いて、より簡便に目的ペプチドを定量することも可能となる。また、そのペプチドが由来するタンパク質の機能を知ることで病因、病態の解明に役立つ可能性もある。

ペプチドの同定は、当該ペプチドの MS/MS を測定し、タンパク質配列データベースに対して検索することで行う。われわれは MS/MS 測定は測定原理の異なる 2 種類の質量分析計を用いている。1 つはペプチドの定量に用いたのと同じ MALDI-TOF/TOF 型質量分析計である。MALDI-TOF/TOF 型質量分析計は分子量が比較的小さい (~2,000 Da) ペプチドの MS/MS 測定に向いており、感度が高く、測定誤差が小さいことから信頼性の高い同定が可能である。また、定量に用いたサンプルをそのまま MS/MS 測定に用いることができるという利点もある。比較的高分子量 (2,000~6,000 Da) のペプチドは、ETD が搭載された Ion-trap 型の MS (HCT-Ultra, Bruker Daltonics) を用いた NanoLC-MS/MS によって同定している。ETD とは、電子移動解離 (Electron transfer dissociation) と呼ばれる MS/MS の測定方法の一種で、一般的な衝突誘起解離 (Collision induced dissociation : CID) に比べて、高分子量のペプチドの MS/MS 測定に向いているという利点がある¹²⁾。また、LC によって事前にペプチドを分画するため、MALDI-TOF/TOF よりも多くのペプチドを同定することが可能である。

データベース検索は、Mascot (Matrix Science, London, UK) を用い、Swiss-prot のヒトタンパク質データベースに

対して検索を行っている。Mascot は、タンパク質をトリプシンなどの基質特異性の高いプロテアーゼで処理することで生じるペプチドを同定するために開発された検索アルゴリズムである。したがって、プロテアーゼを特定できない血清ペプチドを検索する場合には、通常検索に比べて、感度と精度が大きく減少することに注意する必要がある。血清ペプチドを Mascot で検索するためには、一般検索に比べて、より質の高い、つまり測定誤差が小さく、ピーク数の多い MS/MS スペクトルが必要になる。

血清ペプチドミクスを用いた IgA 腎症に関連するバイオマーカーの探索

図 1 で示した血清ペプチドミクス解析の 1 例として、最近われわれが行った IgA 腎症に関連するバイオマーカー探索を目的とした血清ペプチドミクス解析の例を紹介する¹⁰⁾。試料として、26 例の未治療の IgA 腎症患者と年齢と性別を合わせた 25 例の健常者の血清を用いた。26 例の患者群の平均年齢は 38.5 ± 16.3 歳であり、13 例が男性、13 例が女性であった。一方、25 例の健常者群の平均年齢は 36.4 ± 10.7 歳であり、13 例が男性、12 例が女性であった。これらの IgA 腎症患者もしくは健常者から採取された血清 5 μL を用い、表面に陰イオン交換樹脂を付与した磁性ビーズ (Clinprot MB-WCX) を用いて血清中ペプチドを回収した。得られた試料を MALDI-TOF MS 型質量分析計で測定したところ、MS スペクトル上に全部で 92 個のペプチドピークが検出された。この 92 本のペプチドの定量データを以下の解析に使用した。

われわれは、まず t 検定を用いて、両群で有意な差がみられるペプチドの探索を行った。その結果、92 個中 19 個のペプチドピークが、両群で定量値に有意な差がみられることが判明したが、残念ながら、どのペプチドピークの定量データを用いても IgA 腎症患者群と健常者群を完全に群分けすることはできなかった。そこで次に、われわれは OPLS-DA を用いて、92 個すべてのペプチドを用いて両群の判別が可能であるかどうかを試した。その結果、患者群と健常者群を完全に群分けできるモデル (感度=1.00, 特異度=1.00) を作成することができた。この OPLS-DA モデルの説明定数 R^2 は 0.919, 予測定数 Q^2 は 0.816 と非常に高い値を示した。次に、このモデルにおける各ペプチドの VIP 値、および $p(\text{corr})$ 値を基に、両群の判別に貢献しているペプチドを探索した。今回作成した IgA 腎症と健常者の判別モデルでは、92 個中 20 個のペプチドの VIP が 1.0 以上、

つまりバイオマーカーとして有効であることが示唆された。実際に、この20本のペプチドだけを用いた場合でもIgA腎症と健常者を完全に判別するOPLS-DAモデルを作成することができた(感度=1.00, 特異度=1.00, $R^2=0.877$, $Q^2=0.814$)。

さらにわれわれは、バイオマーカー候補ペプチドを絞り込むために次のような解析を行った。

1) 20個のバイオマーカー候補ペプチドをp(corr)の絶対値が高い順にリストアップする。

2) 20個のペプチドを用いてIgA腎症と健常者を判別するOPLS-DAモデルを作成し、判別力を感度, 特異度, R^2 , Q^2 の4つのパラメータで評価する。

3) p(corr)の絶対値が最も低いペプチドを除き, 1個少ないペプチド数で再度OPLS-DAモデルを作成, その判別力を評価する。

4) 3)を繰り返し, 使用するペプチド数を減らしながらモデル作成を続け, 判別力が極端に減少する個所を探す。

この解析の結果, 使用するペプチド数が19~5個の範囲では, OPLS-DAモデルの判別力は20個のときとほとんど変化しなかった。しかしながら, 4個以下に減らすと判別力は極端に減少することがわかった。以上のことから, VIPが1.0以上でp(corr)の絶対値が高い上位5本のペプチド(m/z 5907, 3240, 2659, 1778, 2070)が特にバイオマーカーとして有効であることが示唆された。この5個のペプチドのデータを用いて作成されたOPLS-DAモデルの感度は1.00, 特異度は0.96, R^2 は0.81, Q^2 は0.78であった。また, 5個ともt検定によって両群で有意な差が確認され, m/z 5907, 3240, 2659の3つのバイオマーカーはIgA腎症患者群で, m/z 1778と2070は健常者群で有意に高かった($p<0.001$)。

われわれは, さらにMS/MS測定とデータベース検索によって, 20個のバイオマーカー候補ペプチドの同定を試み, 14個の同定に成功した。それらはフィブリノーゲン, キニノーゲン, 補体C3などの分解産物であった。なかでも, p(corr)の絶対値が高かった上位5個のペプチドはすべて同定され, IgA腎症患者群で高かった3個のペプチドm/z 5907, 3240, 2659はフィブリノーゲン α 鎖の分解産物であり, 健常者群で高かった2本のペプチドm/z 1778と2070はそれぞれ, 補体C3fとキニノーゲン軽鎖の分解産物であることがわかった。IgA腎症をはじめとした糸球体腎炎では, 安定化フィブリン形成と線溶が頻繁に生じていることが知られており¹³⁾, フィブリノーゲン α 鎖分解産物の増加は, 糸球体内の炎症により血栓形成と線溶系が亢進したこ

とを反映していると考えられる。C3fは, すべての補体活性化経路の中心的存在であるC3の分解産物であり, 活性化C3(C3b)がH因子とI因子によって不活性化される際に切り出されるペプチドである。IgA腎症では第2経路の活性化がみられることが知られており¹⁴⁾, また, ZwirnerらはIgA腎症患者の30%で血中のC3b濃度が高く, また, C3bの濃度が高い患者群では, 正常値を示す患者群に比べてタンパク尿と血尿がより顕著であることを報告している¹⁵⁾。したがって, 今回発見された補体C3f分解産物の減少は, C3bの不活性化機構の不全が関与している可能性がある。キニノーゲンはカリクレインなどのプロテアーゼによって分解され, ブラジキニンなどの生理活性ペプチドを放出する。近年, プロテオミクス解析によって, 尿中タンパク質を解析したところ, IgA腎症患者の尿中のキニノーゲンが健常人に比べて著しく減少していることが報告されている¹⁶⁾。今回発見されたキニノーゲン軽鎖の分解産物の減少は, キニノーゲンの発現が減少したことを反映している可能性が考えられた。

おわりに

血清ペプチドミクス解析は, 腎疾患の診断に役立つ新規バイオマーカーの発見に有用な研究手法であると考えている。われわれは, IgA腎症患者および健常人血清のペプチドミクスデータを解析することで, IgA腎症患者と健常者を判別するうえで有効な5つのペプチドを発見し, それらがフィブリノーゲン α 鎖, 補体C3f, キニノーゲン軽鎖の分解産物であることを確認した。今後, 他の慢性腎炎との比較などを進め, IgA腎症の血清マーカーとして意義を確認する予定である。また, 同ペプチド群のIgA腎症の発症・病態への関与も考えられ, その解析も予定している。

文献

1. Xiang Y, Kurokawa MS, Kanke M, Takakuwa Y, Kato T. Peptidomics: identification of pathogenic and marker peptides. *Methods Mol Biol* 2010; 615: 259-271.
2. Fiedler GM, Leichtle AB, Kase J, Baumann S, Ceglarek U, Felix K, Conrad T, Witzigmann H, Weimann A, Schütte D, Hauss J, Büchler M, Thiery J. Serum peptidome profiling revealed platelet factor 4 as a potential discriminating peptide associated with pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 3812-3819.
3. Voortman J, Pham TV, Knol JC, Giaccone G, Jimenez CR. Prediction of outcome of non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy and bortezomib by time-course

- MALDI-TOF-MS serum peptide profiling. *Proteome Sci* 2009 ; 7 : 34.
4. Antwi K, Hostetter G, Demeure MJ, Katchman BA, Decker GA, Ruiz Y, Sielaff TD, Koep LJ, Lake DF. Analysis of the plasma peptidome from pancreas cancer patients connects a peptide in plasma to overexpression of the parent protein in tumors. *J Proteome Res* 2009 ; 8 : 4722-4731.
 5. Hashiguchi T, Tanaka K, Lee LJ, Sasaki K, Natsugoe S, Kawahara K, Arimura K, Maruyama I. Diagnostic value of serum peptidome analyses for protease activated pathological conditions beyond cancer diagnosis. *Med Hypotheses* 2009 ; 73 : 760-763.
 6. Quintana LF, Campistol JM, Alcolea MP, Banon-Maneus E, Sol-González A, Cutillas PR. Application of label-free quantitative peptidomics for the identification of urinary biomarkers of kidney chronic allograft dysfunction. *Mol Cell Proteomics* 2009 ; 8 : 1658-1673.
 7. Merchant ML, Perkins BA, Boratyn GM, Ficociello LH, Wilkey DW, Barati MT, Bertram CC, Page GP, Rovin BH, Warram JH, Krolewski AS, Klein JB. Urinary peptidome may predict renal function decline in type 1 diabetes and microalbuminuria. *J Am Soc Nephrol* 2009 ; 20 : 2065-2074.
 8. Ling XB, Sigdel TK, Lau K, Ying L, Lau I, Schilling J, Sarwal MM. Integrative urinary peptidomics in renal transplantation identifies biomarkers for acute rejection. *J Am Soc Nephrol* 2010 ; 11 (Epub ahead of print).
 9. Xiang Y, Matsui T, Matsuo K, Shimada K, Tohmas S, Nakamura H, Masuko K, Yudoh K, Nishioka K, Kato T. Comprehensive investigation of disease-specific short peptides in sera from patients with systemic sclerosis : complement C3f-desarginine, detected predominantly in systemic sclerosis sera, enhances proliferation of vascular endothelial cells. *Arthritis Rheum* 2007 ; 56 : 2018-2030.
 10. Kaneshiro N, Xiang Y, Nagai K, Kurokawa MS, Okamoto K, Arito M, Masuko K, Yudoh K, Yasuda T, Suematsu N, Kimura K, Kato T. Comprehensive analysis of short peptides in sera from patients with IgA nephropathy. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2009 ; 23 : 3720-3728.
 11. Bylesjö M, Rantalainen M, Cloarec O, Nicholson JK, Holmes E, Trygg J. OPLS discriminant analysis : combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *J Chemometrics* 2006 ; 20 : 341-351.
 12. Wiesner J, Prensler T, Sickmann A. Application of electron transfer dissociation (ETD) for the analysis of posttranslational modifications. *Proteomics* 2008 ; 8 : 4466-4483.
 13. Deguchi F, Tomura S, Yoshiyama N, Takeuchi J. Intraglomerular deposition of coagulation-fibrinolysis factors and a platelet membrane antigen in various glomerular diseases. *Nephron* 1989 ; 51 : 377-383.
 14. Hisano S, Matsushita M, Fujita T, Endo Y, Takebayashi S. Mesangial IgA2 deposits and lectin pathway-mediated complement activation in IgA glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* 2001 ; 38 : 1082-1088.
 15. Zwirner J, Burg M, Schulze M, Brunkhorst R, Götze O, Koch KM, Floege J. Activated complement C3 : a potentially novel predictor of progressive IgA nephropathy. *Kidney Int* 1997 ; 51 : 1257-1264.
 16. Rocchetti MT, Centra M, Papale M, Bortone G, Palermo C, Centonze D, Ranieri E, Di Paolo S, Gesualdo L. Urine protein profile of IgA nephropathy patients may predict the response to ACE-inhibitor therapy. *Proteomics* 2008 ; 8 : 206-216.