

## 消化器領域におけるプロテオミクスの応用

初谷守朗<sup>1</sup>、黒川真奈絵<sup>2</sup>、永井宏平<sup>2</sup>、有戸光美<sup>2</sup>、末松直也<sup>2</sup>、岡本一起<sup>2</sup>、伊東文生<sup>1</sup>、加藤智啓<sup>2</sup>

1 聖マリアンナ医科大学 消化器肝臓内科

2 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

### [目的]

潰瘍性大腸炎 (UC) 及びクローン病 (CD) は原因不明の難治性炎症性腸疾患であり、免疫系の異常が示唆されている。両疾患の何れか鑑別困難な indeterminate colitis (IC) が存在し、両者を判別できる診断マーカーの確立が急務である。UC 及び CD の疾患マーカーとして各々核周型抗好中球細胞質抗体 (p-ANCA) や酵母菌に対する抗体 (ASCA) 等が報告されているが、何れも臨床应用到十分な精度を示していない。我々は UC 及び CD 患者末梢血単核球 (PBMC) で発現している蛋白質を網羅的に検出することにより、両疾患の鑑別が可能か検討した。また鑑別に用いた蛋白質を同定し、病態との関連を考察した。

### [方法]

UC 患者 17 例、CD 患者 13 例及び患者と性・年齢を一致させた健常人 14 例より末梢血を採取し、単核球を分離後蛋白質を抽出した。全症例の蛋白質試料を等量ずつ混合して標準試料を作製し、Cy3 で標識した。各症例の蛋白質試料は Cy5 で標識した。患者または健常人の一試料と標準試料とを同一のゲル上で 2 次元電気泳動 (2D-DIGE) にて展開した。検出した蛋白質スポットの各々について、標準試料との比較から、個々の症例での強度を算出した。これを用い統計プログラム SIMCA-P+ での多変量解析により UC と CD の判別モデルを作製し、両疾患の鑑別診断及び臨床所見の結果予測が可能か検討した。蛋白質同定は MALDI-TOF/TOF 型質量分析計による質量解析と蛋白質データベース照合によった。

### [結果]

UC 患者、CD 患者及び健常人全 44 例の PBMC 蛋白質を 2D-DIGE にて展開した結果、一症例あたり 576 個の蛋白質スポットが得られた (図 1)。UC 群、CD 群、健常人群間で各蛋白質スポットの強度に対し ANOVA 検定を行い、有意差がみられた 276 個の蛋白質スポットを抽出した。直交部分最小二乗法判別分析 (OPLS-DA) により判別モデルを作製した結果、UC 例と CD 例とを完全に判別できた (説明変数  $R^2=0.994$ 、予測変数  $Q^2=0.462$ )。判別モデルの作製にて信頼性及び寄与度の高かった蛋白質スポット 58 個を用いて、再度 OPLS-DA 法により判別モデルを作製したところ予測能が向上した ( $R^2=0.948$ 、 $Q^2=0.566$ ) (図 2)。後者の判別モデル作製に用いた 58 個の蛋白質スポットを質量分析により解析し、11 個のスポットから 7 種の蛋白質を同定した。それらは炎症、酸化・還元、細胞骨格構成、細胞内輸送、転写活性に関

与するものであった。

PBMC 蛋白質プロファイルを用いて臨床所見の予測を試みたところ、UC の罹患期間 ( $R^2=0.960$ 、 $Q^2=0.660$ )、活動性 ( $R^2=0.776$ 、 $Q^2=0.760$ )、腸管病変の範囲 ( $R^2=0.961$ 、 $Q^2=0.821$ )、CRP ( $R^2=0.945$ 、 $Q^2=0.909$ )、治療反応性 ( $R^2=0.980$ 、 $Q^2=0.595$ )、及び CD の活動性 ( $R^2=0.784$ 、 $Q^2=0.522$ )、CRP ( $R^2=0.864$ 、 $Q^2=0.838$ ) を高率に予測できる可能性を示した。

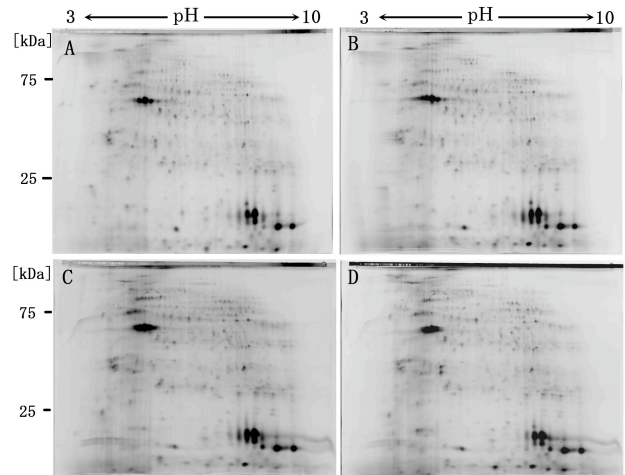


図 1. PBMC 由来蛋白質の網羅的検出  
A : UC, B : CD, C : 健常人, D : 標準試料

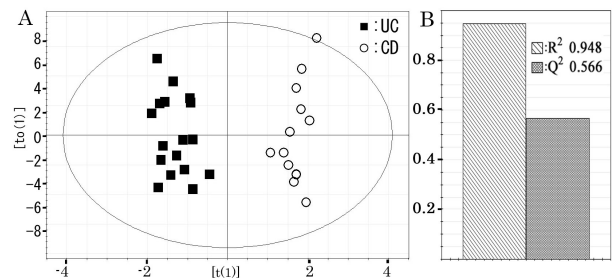


図 2. 選定された 58 スポットでの判別モデル

### [結論]

UC 及び CD の PBMC プロテオミクス解析は、両疾患の鑑別診断に有用である。また両疾患の病態把握や治療法選択に有用なマーカーを提供する可能性が示された。