〔シンポジウム II : 電気泳動を基礎にした臨床プロテオミクス最近の話題〕

消化器領域におけるプロテオミクスの応用

初谷守朗¹・加藤智啓²

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臨床プロテオーム・分子病態治療学

(受付 2012 年 5 月 7 日, 受理 2012 年 7 月 12 日)

SUMMARY

Ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) are the two major inflammatory bowel disease (IBD). It is difficult to discriminate between UC and CD in 10–15% of IBD cases without typical findings for UC or CD. Such cases are diagnosed as indeterminate colitis (IC). We analyzed protein profiles of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) to discriminate between UC and CD. PBMC-derived proteins from 17 UC patients, 13 CD patients, and 17 healthy control subjects were separated by 2-dimensional differential gel electrophoresis. The intensities of individual protein spots were subjected to multivariate analysis of orthogonal partial least square-discriminant analysis (OPLS-DA) of UC and CD. As a result, a total of 547 protein spots were detected. OPLS-DA using 276 protein spots out of the 547 spots clearly discriminated the UC patients from the CD patients. A similar analysis using further selected 58 protein spots showed possible higher performance for the discrimination in unknown cases. Eleven out of the 58 protein spots were successfully identified, which included the proteins associated with inflammation and oxidation/reduction. In addition, the PBMC protein profiles were useful for prediction of clinical parameters such as disease activity. Several proteomic studies, including our study, have shown the excellent discrimination of UC from CD. Therefore, validation of such discriminant models would supply useful biomarkers for the differential diagnosis of UC and CD.

Key words: Ulcerative colitis, Crohn's disease, Inflammatory bowel diseases, Peripheral blood mononuclear cells, Two-dimensional differential gel electrophoresis

はじめに

消化器領域の疾患は非常に多岐に渡っており、標的臓器としては食道、胃・十二指腸、小腸・大腸、肝臓、胆嚢、膵臓等が含まれる。この中で、主に小腸・大腸に異常をきたす炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease, IBD) において、近年プロテオミクスによる鑑別診断が試みられているため、我々の検討を中心に紹介する。

炎症性腸疾患

IBD は小腸、大腸に炎症を生じる疾患の総称であり、下痢、血便、腹痛、発熱などの症状を認める。広義には感染性腸炎、虚血性腸炎など原因の明らかな疾患も含まれるが、

狭義には原因不明の慢性炎症を示す潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis, UC) とクローン病 (Crohn's disease, CD) を指す。

UC と CD は両者とも病因は不明であるが、免疫学的異常、遺伝子異常、感染症などの関与が考えられている (Table 1)。UC と CD は治療法が異なり、特に UC では悪性腫瘍の合併があることから、両者の鑑別診断は重要である。診断は内視鏡や X 線注腸検査などで行われ、UC の典型例では、炎症が直腸から連続性かつびまん性に口側大腸に広がり、粘膜の発赤、びらんを生じる。X 線注腸検査では、正常大腸でみられる粘膜ひだが消失し、管腔は鉛管状を呈する。CD では消化管全域に病変が生じるが、多くは大腸および小腸に非連続性の縦走潰瘍がみられ、X 線注腸検査では数石像や狭窄を認める。病理組織学的検査では UC

Proteomics in digestive diseases

Moriaki Hatsugai¹, Tomohiro Kato²

¹Division of Gastroenterology and Hepatology, Department of Internal Medicine, St. Marianna University School of Medicine; and

²Clinical Proteomics and Molecular Medicine, St. Marianna University Graduate School of Medicine

* Corresponding author: Moriaki Hatsugai; Division of Gastroenterology and Hepatology, Department of Internal Medicine, St. Marianna University School of Medicine, 2-16-1, Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki, Kanagawa 216-8511, Japan

Fax: 044-976-8505

E-mail: m.h@marianna-u.ac.jp

第 62 回日本電気泳動学会総会・シンポジウム II

では粘膜および粘膜固有層を主体とした炎症細胞浸潤を認め、陰窩膿瘍や腺管の杯細胞減少が見られる。CD では全層性の炎症像を認め、非乾酪性肉芽腫が見られる。以上のように、典型例では両者の鑑別は容易であるが、一部に上記の画像所見または病理所見が非典型的な鑑別困難例が存在する¹⁾。それらは indeterminate colitis (IC) と呼ばれ、IBD の 10–15% を占める。

これまで UC と CD を鑑別するための血清マーカーとして、微生物または自己抗原に対する抗体が提唱されてきた²⁾。代表的なマーカーとして、UC では核周囲型好中球細胞質抗体 (perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody, p-ANCA), CD では酵母菌に対する抗体 (anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies, ASCA) が測定されている。p-ANCA は UC の 50–80% で陽性となるが、CD でも 10–40% で陽性となり、また ASCA は CD で 50–70% が陽性となるが、UC でも 10% 前後で陽性となる。このように、代表的なマーカーであっても臨床応用に十分な精度を示していない。両疾患を鑑別できる血液マーカーがあれば臨床に非常に有用であり、そのマーカー分子が病態に関与していれば病態解明の一助となることが考えられる。

両疾患の免疫異常として、UC は自己抗体産生型、CD は T 細胞および炎症反応主体型と、異なるタイプの免疫異常が関与すると考えられている³⁾。そのような免疫異常の違いは、リンパ球・単球などの免疫担当細胞を主体とする末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) の蛋白質プロファイルにも反映されることが考えられる。PBMC は採血で容易に入手でき、臨床現場で利用しやすい検体である。そこで我々は、PBMC に発現している蛋白質のプロファイルを利用して、UC と CD の鑑別が可能な血液マーカーの確立を試みた⁴⁾。

方法

UC 患者 17 人、CD 患者 13 人および健常人 (healthy control subjects, HC) 17 人より文書による同意を得た後、末梢血を採取した。この末梢血検体より PBMC を分離し、蛋白質を抽出した。各症例の PBMC 由来蛋白質を Cy5 で標識した。全症例の PBMC 由来蛋白質を等量ずつ混合し、内部標準試料として Cy3 で標識した。この標準試料と、Cy5 で標識した各症例検体を同一ゲルに泳動し、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動 (Two-dimensional differential gel electrophoresis, 2D-DIGE) を行った。得られた蛋白質スポットにおいて Cy5 の値を Cy3 の値で補正し、それをスポット強度として群間の比較を行った。

結果

1. UC および CD の PBMC 由来蛋白質プロファイルの解析

PBMC 由来蛋白質を 2D-DIGE にて分離した結果、547 個の蛋白質スポットが得られた (Fig. 1)。このスポット強度により UC と CD の鑑別を行うこととした。

2. 1個または2個のスポット強度による UC, CD の鑑別

少数の蛋白質スポットの強度差により UC と CD の鑑別ができれば非常に有用と考えられる。そこで、t 検定で 2 群間に有意差の見られた 34 個の蛋白質スポットを使用し、鑑別を試みた。まず、この 34 個の蛋白質スポット 1 つ 1 つにおいて、その強度による UC と CD の鑑別を試みた。しかし最も有意差の大きいスポットを用いても、UC 群と CD 群が重複し鑑別できなかった。次に 34 個のスポットから 2 個のスポットを取り出して組み合わせ、鑑別を試みた。すべての組み合わせを試してみたが、いずれにおいても UC 群と CD 群は重複を示した。最も有意差の大きい 2 つのスポットを組み合わせても、UC と CD の鑑別はできなかった。

Table 1. Clinical manifestations in ulcerative colitis and Crohn's disease

	Ulcerative colitis	Crohn's disease
Etiology	Unknown (immunological, genetic and infectious factors)	
Symptoms	Diarrhea, Hematochezia, Abdominal pain, Fever	
Distribution of the lesions	Colon (Rectum, in particular)	Entire gastrointestinal tracts (Ileocecal region, in particular)
Radiologic findings	Lead-pipe colon, Spiculation	Fistula, Stenosis
Endoscopic findings	Diffuse erosion and edema, Rough mucosal membrane	Longitudinal ulcer, Cobble stone appearance
Pathological findings	Superficial inflammation, Crypt abscess	Transmural inflammation, Non-caseating granuloma
Compications	Malignant tumors, Arthritis, Skin disease	Arthritis, Skin disease
Treatments	5-aminosalicylic acid, PSL, LCAP, GCAP	5-aminosalicylic acid, PSL, Infliximab, Nutritional therapy

LCAP, leukocytapheresis; GCAP, granulocyte apheresis; PSL, prednisolone.

Fig. 1. Comprehensive analysis of PBMC-derived proteins from UC and CD patients.

PBMCs were collected from 17 UC patients, 13 CD patients and 17 healthy controls. Proteins were extracted from the PBMCs by using the cell lysis buffer. Equal weight of all the protein samples were mixed and labeled with Cy3 for preparation of an internal control "standard sample". Rest of all the protein samples were labeled with Cy5, and one of the Cy5-labeled protein sample and equal weight of Cy3-labeled standard sample were applied to one gel of 2DE. Representative results of Cy5-labeled protein samples from a UC patient (A), from a CD patient (B), and from a healthy control (C), and a representative result of Cy3-labeled standard sample (D) are shown. In total, 547 protein spots were commonly obtained in the UC patients, the CD patients and the healthy controls.

3. 多変量解析を用いたUCとCDの鑑別

次に多変量解析の1つである直行部分最小二乗法 - 判別分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) のプログラム (SIMCA-P+; Umetrics, Sweden) を用いて, UC と CD の鑑別を試みた. OPLS-DA は, UC と CD が2つのグループとして最大限分離される判別モデルを作製する解析法である. この判別モデルでは, R^2 , Q^2 という数値が得られる. R^2 は説明変数と呼ばれ, モデル作製に用いた元のデータをどれだけ説明できているかの指標である. Q^2 は予測変数と呼ばれ, 未知の症例での診断能を計算した数値である. Q^2 は, データ全体の 6/7 を用いてモデルを作製し, 残り 1/7 を予測することを7回繰り返すクロスバリデーションにより計算される. 生物学的研究では, Q^2 が 0.4 を超えることが, 良いモデルの目安とされている.

2D-DIGE により得られた全 547 個の蛋白質スポットのうち, UC, CD, HC 群間において ANOVA 検定を行い, 有意差を認めた 276 個の蛋白質スポットを OPLS-DA にて解析し, UC と CD の判別モデル 1 を作製した. この判別モデル 1 において, UC および CD を完全に2群に分ける事ができた (Fig. 2A). この判別モデルの R^2 は 0.994 と 1 に近く, 予測能を示す Q^2 も 0.462 と生物学的な研究の目安である 0.4 を超えていた (Fig. 2B).

この判別モデル 1 において, グループ分離への関与が高

かった蛋白質スポットを用いて, より優れた判別モデルの作製を試みた. 各蛋白質スポットにおいて, variable importance in the project (VIP) という数値は判別モデル作製への貢献度を意味し, S-plot はモデル作製に対する信頼性を縦軸, 寄与度を横軸としたものである (Fig. 2C, D). VIP 値が高いほど, また S-plot においてスポットの位置が右上もしくは左下に寄っているほど, モデル作製に有用なスポットといえる. 判別モデル 1 の 276 個より, VIP が 1 以上, 信頼性が 0.10 以上, 寄与度が 0.07 以上を基準としスポットを選定したところ, 58 個の蛋白質スポットが選定された. この 58 個のスポットを用いて, やはり UC と CD を完全に2群に分けることができた (判別モデル 2, Fig. 3). 判別モデル 2 においては, 判別モデル 1 より少ない蛋白質スポット数で, $R^2=0.948$ と高値を保ったまま, $Q^2=0.566$ と予測能を向上させることができた.

4. 蛋白質の同定

判別モデル 2 の作製に用いた 58 個の蛋白質スポットについて, matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) を用いた質量分析にて, 蛋白質の同定を試みた. 58 個のうち 11 個のスポットが同定され, 7 種類の蛋白質が判明した. UC で CD よりスポット強度の大きい蛋白質として, annexin A6, peroxiredoxin 2 (PRDX2), α/β hydrolase domain-containing protein 14B, cyclophilin A (PPIA) が同定され, 逆に CD で UC よりスポット強度の大きい蛋白質として, actin β , carbonic anhydrase 2 (CA2), protein S100-A9 (S100-A9) が同定された.

5. UCおよびCDの臨床項目とPBMC蛋白質プロファイルの相関

PBMC の蛋白質プロファイルと, UC および CD の臨床情報の相関を検討した. まず全 547 スポットを用いて各臨床項目の予測モデルを作製し, そこからスポット数を絞り込むことによって予測能を向上させた. UC の罹患期間, 活動性, 炎症反応, 病変の範囲, 治療反応性, および CD の活動性, CRP の予測モデルでは Q^2 が 0.4 を超え, PBMC 蛋白質プロファイルとの密接な関連が示唆された. またこれらのモデルで選択された蛋白質スポットの解析は, 臨床病態解明の一助となる可能性が示された.

考察

これまで UC と CD の疾患マーカーとして p-ANCA や ASCA などが提唱されてきたが, いずれも臨床応用に十分な精度とは言い難い. UC と CD は異なる免疫異常の関与が考えられており, その免疫異常の違いは, 免疫担当細胞である PBMC の蛋白質プロファイルの違いとして反映されることが考えられる.

Fig. 2. OPLS-DA using profiles of 276 protein spots to discriminate between the UC patients and the CD patients.

The 547 commonly detected protein spots were subjected to ANOVA among the UC, CD and healthy groups. As a result, 276 protein spots were found to be significantly increased or decreased ($p < 0.05$), which were used for further analysis. The intensities of the 276 protein spots in the UC patients were compensated by the mean intensities of identical protein spots from the healthy control group, UC-H, whose age- and sex- tightly matched to that of the UC patients. The intensities of the 276 protein spots in the CD patients were similarly compensated by the mean intensities of CD-H. The compensated intensities were subjected to OPLS-DA using Simca-P+.

A. Differential diagnosis of the UC patients and the CD patients. The compensated intensities of the 276 protein spots from the 17 UC patients (closed squares) and the 13 CD patients (open circles) were subjected to OPLS-DA. This analysis accurately discriminated the UC and CD groups. The x axis indicates the first principal component.

B. Validation of this model for the differential diagnosis of the UC and the CD patients. $R^2=0.994$, $Q^2=0.462$.

C. VIP scores of the 276 protein spots. The protein spots are aligned according to their VIP scores. 77 protein spots were with $VIP > 1$.

D. S-plot of the 276 protein spots. Magnitude (w , x axis) and reliability ($p(\text{corr})$, y axis) of the 276 protein spots on this model were visualized. Protein spots with $VIP > 1$, $w > |0.07|$ and $p(\text{corr}) > |0.1|$ included in the right-upper and the left-lower shaded squares were selected for generation of a new statistical model. 58 protein spots were selected by this criterion.

This figure is reprinted from J Gastroenterol 2010;45:488–500 with permission of the journal.

今回我々はPBMC由来蛋白質スポット276個の強度を用い、潰瘍性大腸炎とクローン病の判別モデル ($R^2=0.994$, $Q^2=0.462$) を作製することができ、UCとCDを完全に2群に分けることができた。この276個のうち、モデル作製に貢献度の高い58個の蛋白質スポットを選定し判別モデルを再度作製したところ、予測能が向上した ($R^2=0.948$,

$Q^2=0.566$)。この判別モデルでICの一例の鑑別を行ったところ、UCと鑑別された。実際にこの例はPBMC採取より半年後に、大腸内視鏡所見にてUCと診断された。より多くのIC例で検討する必要があるが、この一例に関しては我々の判別モデルでUCと診断可能であった。

58個の蛋白質スポットのうち11個が同定され、7種類

Table 2. Differential diagnosis of ulcerative colitis and Crohn's disease by proteomic analyses

References	Analyses	Resume
Meuwis <i>et al</i> , 2007, Biochem Pharmacol	Serum proteomics, SELDI-TOF-MS	85% sensitivity, 95% specificity, and 90% accuracy.
Nanni <i>et al</i> , 2007, Rapid Commun Mass Spectrom	Serum proteomics, MALDI-TOF-MS	100% sensitivity and specificity.
Berndt <i>et al</i> , 2007, J Immunol	T cells in colon tissue, MELC study	By co-expression of NF-kB and PARP, and number of CD4 ⁺ CD25 ⁺ cells.
Chen <i>et al</i> , 2009, Clin Exp Rheumatol	Serum antibodies to E.coli protein chips	70% sensitivity, 84% specificity, and 80% accuracy.
Marchesi <i>et al</i> , 2007, J Proteome Res	Fecal metabolomics, ¹ H NMR spectroscopy	R ² =0.93 and Q ² =0.70. 100% sensitivity and specificity.
Hatsugai <i>et al</i> , 2010, J Gastroenterol	Proteomics of PBMCs, MALDI-TOF-MS	R ² =0.948 and Q ² =0.566. 100% sensitivity and specificity.

SELDI-TOF-MS, surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry; MALDI-TOF-MS, matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry; MELC, multi-epitope ligand cartographie; NF-kB, nuclear factor-kappa B; PARP, polyadenosine diphosphate-ribose polymerase; NMR, nuclear magnetic resonance; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells.

Fig. 3. OPLS-DA of the selected 58 protein spots to discriminate between the UC patients and the CD patients.

A. The protein profiles of the 58 spots selected from the result shown in Fig.3D achieved clear discrimination between the UC patients and the CD patients. The x axis indicates the first principal component.

B. Validation of this model. R²=0.948, Q²=0.566.

This figure is reprinted from J Gastroenterol 2010;45:488–500 with permission of the journal.

の蛋白質が判明した。炎症の病態にはしばしば酸化が伴うが、同定された蛋白質のうち PPIA, S100A9, PRDX2, CA2 は炎症および酸化・還元にかかわる蛋白質であり、UC および CD の病態に関与する可能性が高いと考えた⁴⁾。また PPIA や PRDX2 の蛋白質スポットは UC と CD の間で有意差を示し、これらの発現の差が両疾患の病態の違いを反映している可能性が考えられた。

PBMC の蛋白質プロファイルは UC の罹患期間、活動性、炎症反応、病変の範囲、治療反応性、また CD の活動性、CRP と高い相関がみられた。特に UC の活動性、赤沈、CRP、CD の CRP においては、2 個または 4 個の蛋白質スポットのみで高い相関が得られている。これらの蛋白質は UC および CD の炎症に関与していることが考えられ、これらの同定は臨床病態解明の一助となる可能性が示された。

これまでに我々の研究以外でも、血清や腸粘膜組織のプ

ロテオミクスにより、UC と CD の鑑別診断を試みた研究が数例報告されている (Table 2)⁴⁻⁹⁾。ほとんどは多変量解析であり、これまでの単一バイオマーカーによる診断より高い感度、特異度等を示している。しかしこれまでの報告は全てモデル作製のみで、まだその有用性の評価がなされていない。我々の研究も含め、今後作製したモデルを異なる患者集団で評価していくことが重要である。

結語

UC および CD の血液および腸粘膜組織のプロテオミクスは、両者の鑑別に有用である。我々の研究では特に PBMC 蛋白質プロファイルに着目し、両者を鑑別し得た。鑑別に関与した蛋白質の解析は、臨床病態の解明につながる可能性が示された。

謝辞

本稿執筆にあたりご指導を頂いた聖マリアンナ医科大学大学院臨床プロテオーム・分子病態治療学 黒川真奈絵先生に、心より感謝申し上げます。

文献

- 1) Legnani PE, Kornbluth A. Difficult differential diagnoses in IBD: ileitis and indeterminate colitis. Semin Gastrointest Dis. 2001;12:211–222.
- 2) Vasiliauskas E. Recent advances in the diagnosis and classification of inflammatory bowel disease. Curr Gastroenterol Rep. 2003;5:493–500.
- 3) Kurokawa MS, Imamura Y, Noguchi Y, *et al*. Intestinal Behcet's Disease. Res Trends Immunol. 2009;10:79–91.
- 4) Hatsugai M, Kurokawa MS, Kouro T, *et al*. Protein profiles of peripheral blood mononuclear cells are useful for differential diagnosis of ulcerative colitis and Crohn's disease. J Gastroenterol. 2010;45:488–500.

- 5) Meuwis MA, Fillet M, Geurts P, *et al.* Biomarker discovery for inflammatory bowel disease, using proteomic serum profiling. *Biochem Pharmacol.* 2007;73:1422–1433.
- 6) Nanni P, Parisi D, Roda G, *et al.* Serum protein profiling in patients with inflammatory bowel diseases using selective solid-phase bulk extraction, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and chemometric data analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2007;21:4142–4148.
- 7) Berndt U, Bartsch S, Philipsen L, *et al.* Proteomic analysis of the inflamed intestinal mucosa reveals distinctive immune response profiles in Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Immunol.* 2007;179:295–304.
- 8) Chen M, Kallenberg CG. New advances in the pathogenesis of ANCA-associated vasculitides. *Clin Exp Rheumatol.* 2009;27:S108–114.
- 9) Marchesi JR, Holmes E, Khan F, *et al.* Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. *J Proteome Res.* 2007;6:546–551.