

平成 30 年 9 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06814

研究課題名(和文)尿プロテオミクスによる新規泌尿器癌バイオマーカーの探索と二次元早期診断法の確立

研究課題名(英文) Investigation of novel bio-marker by urine proteomics and establishment for early diagnosis by two-dimensional approach for urological cancer

研究代表者

齋藤 卓 (Saito, Suguru)

新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：50776721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、泌尿器癌の早期発見に有用となる新規バイオマーカー探索、及びその検出技術の確立を達成した。バイオマーカー探索においては、独自の解析プラットフォームを確立し、尿プロテオミクス解析により、尿中に存在する新規バイオマーカー候補タンパク質の高精度の同定を可能とした。バイオマーカー検出においては、表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance; SPR)を用いることにより、尿検体中より直接的にバイオマーカーを検出することを可能とした。これらの研究成果は、泌尿器癌の早期発見において極めて重要な基盤技術であり、臨床利用を目指し、これをベースとした更なる発展が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：Throughout this project, we completed that establishment of the technology in novel bio marker investigation and detection for early diagnosis of urological cancer. In the investigation of bio-marker, we established original analysis platform based on urine proteomics, so that we were success to identify the candidate of novel bio-marker with high accuracy. In the detection of bio-marker, we adopted SPR technique for direct detection of bio-marker in the urine sample. These results are important basic skill for early diagnosis of urological cancer. Based on the skills, further development will be estimated for clinical use.

研究分野：予防医学

キーワード：尿プロテオミクス 泌尿器癌 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

腎泌尿器癌は自覚症状が乏しく、尚且つ発見が困難であり、容易に診断可能となるまで進行した状態では予後不良であるケースが多い。現在の臨床診断において、早期発見を可能とする簡便かつ高精度の検査方法は確立されていなかった。これまでの研究報告では、尿中には腎泌尿器癌のバイオマーカーとなるタンパク質が存在する可能性が示唆されてきた。しかし、これらをターゲットとした検出方法は未だに臨床利用できるレベルに達していなかった。これら尿中のタンパク質は、一般的には質量分析法により同定されるが、その精度や絶対定量は多くのパラメータにより影響を受けるため容易ではなく、また、信頼性の高い解析プラットフォームは存在していなかった。このような背景が、バイオマーカーの臨床利用の妨げとなっていた。更には、質量分析法自体が容易な解析方法ではないため、研究室レベルを出て広く浸透していないという問題もあった。より信頼性の高い、安定した尿プロテオミクス解析技術の確立、そして、高精度でバイオマーカーを検出できる新規技術の開発が必要であると考えられた。日常的に誰もが気軽に受けることのできる腎泌尿器癌を対象としたバイオマーカーを用いた検査は、予防、早期発見と治療の面において切望されるものであった。

2. 研究の目的

本研究では、尿プロテオミクスと表面プラズモン共鳴という手法を用い、尿中から直接的に腎泌尿器癌バイオマーカーを検出する技術の確立を目指した。更に、これらの手法を応用し、新規泌尿器癌バイオマーカー探索のためのプラットフォームの確立にも着手した。

3. 研究の方法

A) 尿タンパク質の精製とプロテオミクスに適したペプチドサンプル調整技術開発

安定したサンプルは高精度のプロテオミクスに必要不可欠である。特に、尿中のタンパク質精製とそのペプチド化は容易ではなく、最終的なペプチドサンプルの不均一性は解析結果の不安定性を招いていた。本研究では、既存の沈殿法を改良し、高純度かつ高回収率での尿タンパク質を精製を目指した。同時に、ペプチド化の過程でも、プロテオミクスへ直接使用できる、高純度の消化ペプチドを得るための手法の確立を目指した。

B) 尿プロテオミクスによる腎泌尿器癌バイオマーカーのための解析プラットフォームの確立。尿中のバイオマーカー同定において、極めて微量のターゲットを正確に解析する技術が必要である。また、尿中のタンパク質の存在量は振れ幅が大きいため、適正な閾値の設定が必要となる。そのため、本研究では

健常者の尿を解析することで、ベースラインとなるデータベースを確立し、それを基に腎泌尿器癌バイオマーカーの的確な検出手法の確立に着手した。

C) 表面プラズモン共鳴によるハイスループットスクリーニング技術の確立。バイオマーカーを用いる検査方法の臨床利用を念頭に置いた際、簡便かつ高精度の技術が求められる。本研究では、バイオマーカーに対する抗体を用いた表面プラズモン共鳴により、尿中に存在するバイオマーカーを短時間で数種類同時に検出することを試みた。

4. 研究成果

本研究では、Methanol/Chloroform 沈殿法を改良し、80%以上の尿タンパク質を高純度で精製することに成功した。この過程では、得られたタンパク質は分子量や電気化学的特性による差はなく、極めて均一に精製されていることを確認した (Fig 1A-C)。そして、これらタンパク質のペプチド化では、In solution digestion を改良し、高純度のトリプシン消化ペプチドを得ることに成功した。このペプチドサンプルは、従来の方で問題となっていた尿中色素の混入などは見られず、直接プロテオミクス解析に用いることが可能であった。この方法により得られたサンプルの質量分析の結果では、1000 個以上のタンパク質同定が可能であった。そして、他の方法により精製された尿タンパク質を用いた解析と比較して、同定されたタンパク質の特異性が高かった (Figure 2A, B)。

健常者 50 人以上より提供された尿を用いたプロテオミクス解析により、正常域である各尿タンパク質のデータベース化を達成した。これを用いて、各尿検体における腎泌尿器癌バイオマーカーの検出およびその絶対量評価が可能となった。僅かな存在量、または健常域からの逸脱を見極めることが可能であると考えられる。健常者データベースを基にした、腎泌尿器癌の新規バイオマーカー候補の探索にも着手したが、数種類の候補タンパク質の同定に成功した。これらは今後の更なる検証が必要である。

腎泌尿器癌バイオマーカーに対する抗体を用いた、Immuno Surface Plasmon Resonance (Immuno SPR)により、尿中に存在するターゲットを僅か数時間で pg オーダーで検出することに成功した。本研究で使用した解析装置 (Proteon XPR36, Bio Rad, USA) では、最大 6 種類のバイオマーカーに対して、100 検体以上を同時解析可能であり、臨床利用に不可欠な、ハイスループットスクリーニングが十分に達成できると考えられた (Figure 3)。

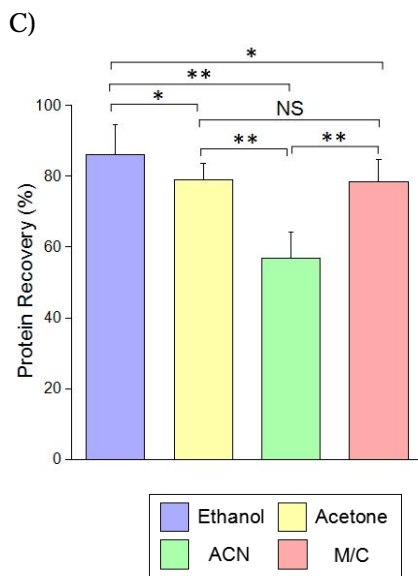
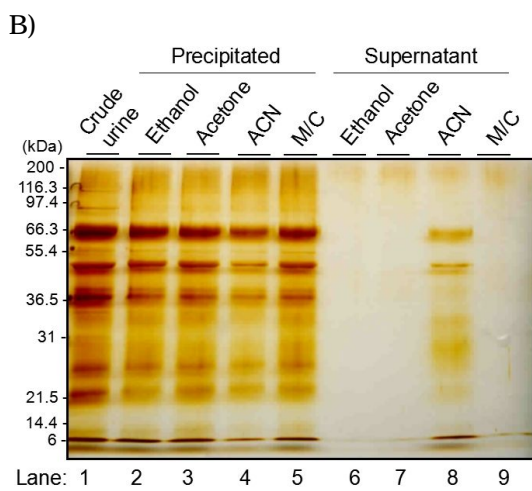
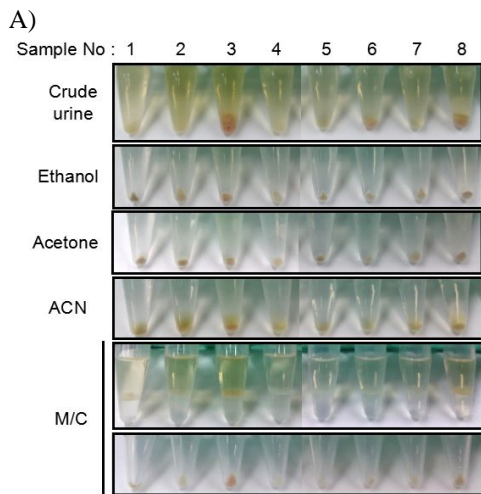


Figure 1 各種沈殿法により抽出された尿タンパク質(A)、沈殿効率(B)、回収率(C) Methanol/Chloroform (M/C) 沈殿法で得られたタンパク質は最も尿中色素の混入が少なく、純度が良好であった。また、この沈殿法で背負為政されたタンパク質の沈殿効率は良好であり、ほぼ全てのタンパク質は沈殿

画として得られていた。タンパク質回収率は平均で 80%だった。

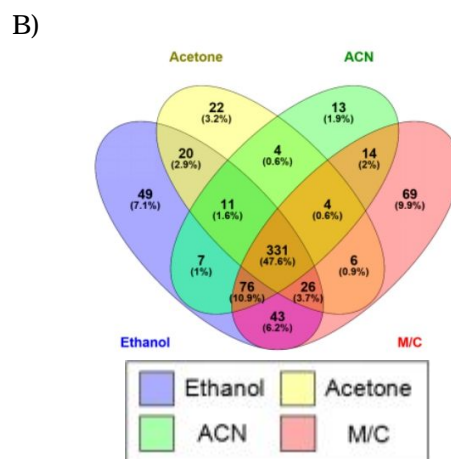
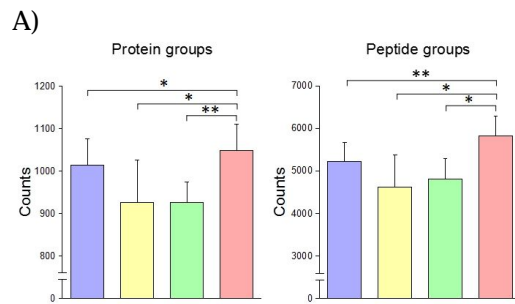


Figure 2 各種沈殿法により精製された尿タンパク質のプロテオミクス解析による同定数 M/C 沈殿法により得られた尿タンパク質を用いた解析では、最も良好な同定数が得られた(A)。また、同定されたタンパク質の特異性も高かった (B)。

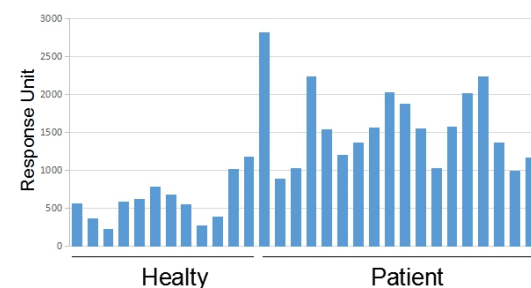


Figure 3 Immuno SPR による尿中バイオマーカーの検出 健常者尿と比較し、泌尿器癌患者尿からは多量のバイオマーカーが検出された。

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1件)

1. Proteome Profiling of Diabetic Mellitus

Patient Urine for Discovery of Biomarkers by Comprehensive MS-Based Proteomics. Hirao Y, Saito S, Fujinaka H, Miyazaki S, Xu B, Quadery AF, Elguoshy A, Yamamoto K, Yamamoto T. Proteomes. 2018 Feb 6;6(1). pii: E9. doi: 10.3390/proteomes6010009.

〔学会発表〕(計2件)

1. Saito S, Hirao Y, Xu B, Quadery AF, Elguoshy A, Yamamoto K, Yamamoto T. Urine protein preparation workflow for urine proteomics. HUPO. 2017.

2. Saito S, Hirao Y, Xu B, Quadery AF, Elguoshy A, Yamamoto K, Yamamoto T. Urine protein preparation workflow for urine proteomics. JHUPO. 2017.

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 卓 (Saito, Suguru)
新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員
研究者番号：50776721

(2) 研究協力者

山本 格 (Yamamoto, Tadashi)
新潟大学生・体液バイオマーカーセンター、
地域創成推進機構・特任教授

平尾 嘉利 (Hirao, Yoshitoshi)
新潟大学・生体液バイオマーカーセンター・
地域創成推進機構・特任准教授