

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07187

研究課題名(和文) 妊娠高血圧症候群の新規バイオマーカーによる多元的病態評価法の確立

研究課題名(英文) Establishment of multi-dimensional analysis for monitoring pathophysiological status of pregnancy-induced hypertension

研究代表者

濱村 憲佑 (Hamamura, Kensuke)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：70783306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：先行研究で発見した妊娠高血圧症候群(HDP)に対する新規バイオマーカー候補の血中ペプチドのうち、2-HS-glycoprotein由来のPDA071に対する定量法確立とその有用性評価を検討した。特異抗体が精製困難なこのペプチドは質量分析法を用いた定量が必須だった。我々は血清から熱分離を用いたペプチド抽出法を開発、安定同位体を標準試料に用いた正確性の担保されるLC-MRM/MS測定プロトコルを確立した。これにより臨床多検体濃度測定を可能とした。PDA071単体で病態評価は困難だったが、他のペプチドとの多次元的评价では高精度に病態評価が可能となり、今後のHDP病態評価の一助になるとみられた。

研究成果の概要(英文)：We previously developed potential serum disease biomarkers (DBMs) of hypertensive disorder of pregnancy (HDP). Our methodology did not extend to PDA071 (cysteinyll 2-HS-glycoprotein341-367), due to difficulty to produce a specific antibody against the peptide. The aim of the present study was to establish an alternative PDA071 quantitation system using LC-MRM/MS, to explore the potential utility of PDA071 as a DBM for HDP. PDA071 was successfully extracted from serum using a heat denaturation method. Optimum conditions for quantitation via LC-MRM/MS were developed. Although the PDA071 alone did not significantly differ between patients and controls, 3D plotting of PDA039/044/071 peptide levels and construction of a Jackknife classification matrix were satisfactory in terms of HDP diagnostic precision. Combination analysis using both PDA071 and PDA039/044 levels allowed HDP diagnostic accuracy to be attained, and our method will be valuable in future pathophysiological studies of HDP.

研究分野：産科婦人科学

キーワード：妊娠高血圧症候群 疾患バイオマーカー 多元的病態評価 ターゲットプロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧症候群 (hypertensive disorder of pregnancy: HDP) は全妊娠の 7~10%に発症し、全世界で起こる年間 29 万人の母体死亡原因のうち 14%を占める重篤な疾患である。しかしながら、この疾患は未だに病因が不明で、様々な疾患因子が複雑に関連して発症していると考えられている。そのため、予防法や根本的な治療薬はなく、妊娠の終了が唯一の病態改善策となる。産婦人科医はひとたび発症した HDP 患者に対し、母体の安全と胎児の成熟度を考慮しながら、適切に妊娠修了時期を判断する必要がある。そこで、正確な病態評価が重要であり、そのためには疾患バイオマーカー (DBM) の発見と臨床応用が急務とされる。

近年の分析技術の向上により、HDP の DBM として様々な分子バイオマーカーが提唱され、定量されている。しかし、これらはある程度の発症予測は可能になるものの、病態把握効果としては不十分で、結局臨床では病態評価法として血圧と尿タンパク測定が用いられている。そのため、新たな分子生物学的観点による DBM 候補分子が必要となる。そこで申請者が注目したのが血中ペプチド断片である。

ヒト末梢血中にはタンパク質が分解代謝され残った「断片分子」も存在することを 1999 年 Richter ら (Richter et al, J Chromato B,1999) が示して以降、各疾患でその血中濃度が変化する可能性が示されてきた。そこで複雑な病態の HDP でも疾患特異的ペプチドの測定により病態が把握できると考え、プロテオーム解析による DBM 候補ペプチドの発見が試みられていた。しかし、従来のプロテオーム解析法を血液試料に用いる際、血中の 90%以上を占める主要タンパク質の除去が必須で、この操作のために正確な血中微量分子プロテオーム解析が困難であった。

申請者は、近年電気泳動と質量分析を一期的に行う革新的なプロテオーム解析技術「BLOTCHIP®」法を開発し (Tanaka et al, BBRC, 2009)、プロテオーム解析を主要タンパク質除去過程なしに正確に定量することに成功した。申請者はこの方法を応用して HDP 新規血清 DBM 候補ペプチドを 7 種同定し、これらの正確な定量性を示した (Araki et al, Proteomics, 2011)。さらに、申請者は臨床多検体による有用性の検証を行うべく、この新技術を用いて同定した HDP 患者末梢血液中の DBM 候補ペプチド断片をそれらの N-/C-末端に対する特異抗体を用いた ELISA 法によって簡易測定するシステム開発してきた。

現在までに 2 種類 (PDA039/044) に関してこの簡易測定法を確立し、PDA039 においては単独で有用な HDP 診断マーカーとなりうることを示してきた (Hamamura et al, Ann Clin Biochem, 2016)が、更に重篤化の予測や細かな病態の変化を把握するためには上記 2 種

類以外の DBM 候補ペプチド (表 1) や既存のマーカー候補分子 (可溶性 Flt-1:sFlt-1、胎盤成長因子:PIGF) を組み合わせることで多角的に評価する必要があると考えられた。

| Peptide ID | Observed monoisotopic [M+H] <sup>+</sup> | Origin of the peptide | Amino acid number | Amino acid sequence               |
|------------|--|-----------------------|-------------------|-----------------------------------|
| PDA039     | 2081.00                                  | Kinogen-1             | 439-456           | HNLGHGHKHERDQGHGHQ                |
| PDA044     | 2209.12                                  | Kinogen-1             | 438-456           | KHNLGHGHKHERDQGHGHQ               |
| PDA071     | 2857.41                                  | α2-HS-glycoprotein    | 341-367           | TVVQPSVGAAGPVVPPC(+Cys) PGRIRHFKV |

表 1 HDP に対する DBM 候補ペプチド

2. 研究の目的

本研究では、HDP の DBM 候補ペプチドの一つで、ELISA 法では定量困難であった α2-HS-glycoprotein (Fetuin A)由来の PDA071 の定量法を液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (LC-MS/MS) 法により新たに確立する。また、既存の DBM や測定法の確立しているペプチドを含めることにより、病態把握精度を向上させ、「多角的バイオマーカー解析による新規病態評価法」として臨床応用を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

HDP の DBM 候補ペプチド「PDA071」に対する測定系確立を達成すべく、以下の[1]から[8]の課題順に研究を進めた。

- [1] PDA071 とその安定同位体ペプチドの人工合成ならびに妊娠高血圧患者血清採取
- [2] PDA071 に対する LC-MRM/MS 測定条件の決定
- [3] ヒト血清からの効率的な PDA071 画分抽出法の確立
- [4] 相対濃度比較法による PDA071 定量の正確性と再現性の検討
- [5] 臨床検体測定に伴う標準化測定プロトコルの確立
- [6] 臨床多検体測定と PDA071 の独立 DBM としての有用性評価
- [7] DBM 候補ペプチド 3 種による HDP の多角的病態評価
- [8] 各患者の病歴と測定結果データベースの対比による臨床応用の検討

4. 研究成果

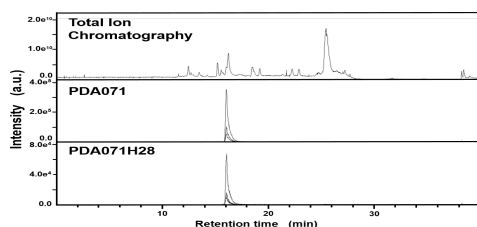
[1] PDA071 とその安定同位体ペプチドは化学合成を行い、10%アセトニトリル(ACN)+0.1%トリフルオロ酢酸溶液(TFA)にペプチドを単体保存した。

臨床血液検体は順天堂大学医学部附属浦安病院と済生会山形病院の協力のもと、外来あるいは入院患者を対象に HDP 症例では 34 例 (平均 33.7 歳)の血液を採取。正常妊婦としても 23 週と 33 週時に各 30 例 (32.8 歳)の血液を得た。分離した後、-80 冷蔵庫で保管した。特に HDP 患者の場合、基礎疾患や疾患発症時期のほか、血清採取時期の病態を細かく情報を得た。

[2] 人工合成した PDA071 ペプチドを用いて

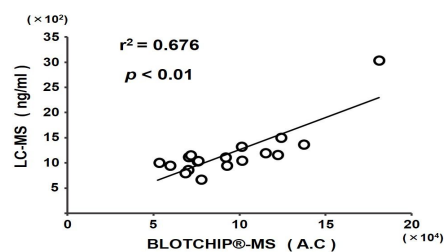
LC-MS/MS の MRM 測定条件を検討した。MS 用溶媒 (10%ACN/0.1%FA) で 1 pmol/μl に希釈した PDA071 を LC-MS/MS 法で検出したところ m/z:715.388 (4+), 572.511 (5+) のプリカーサーイオンと主に m/z:763.398 (2+), 910.992 (2+) プロダクトイオンを検出した。アミノ酸配列と質量からこれらフラグメントイオンが PDA071 由来であることを確認した。一方、安定同位体標識した PDA071 (PDA071H28) も同様に LC-MS/MS 法で検出し、安定同位体の質量増加分を加え算出した理論 m/z 値と比較した。それぞれプリカーサーイオン (722.405 (4+), 578.125 (5+))、プロダクトイオン (768.414 (2+), 919.013 (2+)) にペプチドピークを認め、各イオンの理論 m/z 値と一致した。さらに標品 PDA071/PDA071H28 の混合物を用いてそれぞれの MRM 測定条件で同時測定した。2 ペプチドのリテンションタイムは一致し、ピークの区別に十分な質量差もあることから、両者の独立した検出が可能と判断した。ペプチド検出には上記より 3 種類のプリカーサー/プロダクトイオンの組み合わせを用い、その中でも最も定量範囲の広いと推定された PDA071: 715.388 910.992、PDA071H28: 722.405 919.013 を定量時条件に用いた。

[3] 血清 PDA071 (native PDA071) は主要タンパク質との吸着が強いいため、分離カラムによる抽出量が激減すると過去の論文で推定された。そこで血清 PDA071 ペプチド抽出はタンパク質変性による分離法を選択し、中でも TFA 法と熱変性法を試みた。TFA 法などの酸変性では添加した遊離ペプチドは分離できたが、主要タンパク質と結合しているペプチドは一緒に沈殿除去されてしまった。しかし熱変性法では 20%ACN/0.1%FA 液希釈条件下で、沈殿が確実に (遠心後上清が透明で沈殿物との分離が容易) 分離でき、70、10 分条件で最も PDA071 抽出率が高かった。合成ペプチドを熱変性前に添加すると、ペプチドピーク高が TFA 法と比べ 1/10 以下に減弱した。ペプチドの熱処理だけではピークが変化せず、分子構造に影響がなかった。従って、熱変性法では元々主要タンパク質と結合の強いペプチドは分離抽出されやすいが、遊離ペプチドは逆に沈殿除去されやすくなると考えられた。以上より、最適条件による熱変性に加え、遠心分離後の上清に内部標準 PDA071H28 を添加後に抽出すれば native PDA071 定量が可能と判断した。(下図)



[4] ラット血清から TFA 法により作製した標準ペプチド抽出液 (10%ACN/0.1%FA) を用いて合成 PDA071 を各濃度に希釈した。

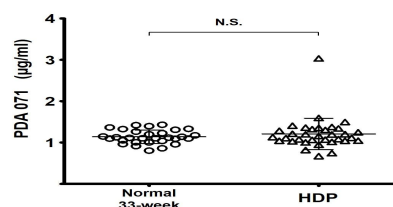
各々に 5 fmol/μl 濃度となるように内部標準 (PDA071H28) を加え、これらを前述で設定した LC-MS/MS MRM で測定し、内部標準とのピーク面積比でその濃度を算出した。実際の濃度値と相対濃度比較による定量値はほぼ一致しており、検出時 4.88 - 2500 fmol、(抽出率 100%として) 抽出前血中濃度に換算すると PDA071 ペプチドが 12.2- 6250 fmol/μl まで検出、定量可能と判断された。正常妊婦 9 例と HDP 患者 10 例の臨床血清検体を用い、先行研究の BLOTCHIP®法によるペプチド信号値と本研究法によるペプチド濃度算出値をそれぞれ 2 次元にプロットして比較した。両者の定量値に統計的に有意な相関関係を認め (slope = 0.0127, intercept = -11.109, r<sup>2</sup> = 0.676) 本定量法が BLOTCHIP®法による定量と同等に血清中のペプチド濃度を反映していることが示された (下図)



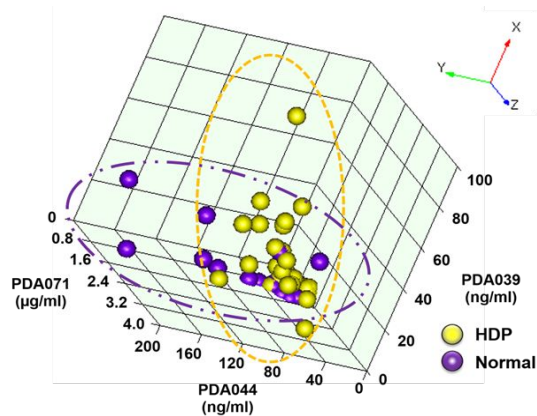
[5] 臨床多検体を LC-MS/MSMRM で測定する際に最も短時間で施行できる適切なカラム洗浄法や測定時間を検討した。カラム洗浄は ACN/イソプロパノール/メタノール混合水を使用し、40 分 3 回サイクルすることで時間短縮と多検体への影響を最低限に抑えられた。これにより抽出から測定までの標準化したプロトコルが確立された。

[6] 確立した本法を用いてヒト標準血清ペプチドを抽出し、PDA071 濃度を測定した。抽出再現性は同血清を各 7 検体に分け、同時、異時でそれぞれ抽出、MRM 定量を行って確認した。また、同時採血した血漿と血清各検体で測定を行い、両者に定量値の差がないことも確認した。その上で、正常妊婦と HDP 罹患妊婦血清を対象に質量分析による定量を行った。

HDP 罹患妊婦群は 1 例で高値を認めたほか、正常妊婦群に比べやや高値のようにみえた。しかし、濃度のばらつきが強く全体では HDP 群 (median, 1142.9; IQR, 1043.1-1317.4) と正常妊婦群 (median, 1115.9; IQR, 1042.8-1253.8) で各群の PDA071 濃度に統計的に有意差を認めなかった。さらに、ランダムに選んだ正常妊婦 23 週 15 例 (31.8 ± 4.7 歳 [SD]) との比較でも週数による測定値の変化を認めなかった。(下図)



[7] HDP は複雑な病態であることから単一物質による比較では把握しきれない場合がある。そこで、PDA071 に先行研究で用いた PDA039、PDA044 を含めた 3 種類の断片ペプチド濃度による複合的な病態診断法を検討した。PDA039/044 は ELISA による定量、PDA071 は LC-MS/MS による定量を行い、結果を組み合わせた 3 次元プロットを示した(下図)。



その結果、3 次元的に罹患群と正常群とでプロットの集積部が異なっていた。そこで、discriminant analysis (判別分析) による統計学的検証を行い、表のように正常群と罹患群で差を認めた。さらに、3 つの指標を用いたジャックナイフ分類では 79.7% の確率で正確な分類が可能になり、非的中は正常群、罹患群でそれぞれ 4 / 30 例、9 / 34 例であった。(表)

| Sample group     | Correct Classification | Normal pregnancy (n = 30) | HDP (n = 34) |
|------------------|------------------------|---------------------------|--------------|
| Normal pregnancy | 86.7%                  | 26                        | 9            |
| HDP              | 73.5%                  | 4                         | 25           |
| Total            | 79.7%                  | 30                        | 34           |

また、PDA039 単一でスクリーニングができなかった検体のうち HDP 罹患群の数例で PDA071 が高値を示す傾向があった。この結果から単独では評価困難であっても多次元解析による分類評価の可能性が示された。

[8] 臨床的なデータベースとペプチド濃度測定結果を対比したところ PDA039/044 濃度はさほど高くないものの HDP 罹患群で特に PDA071 が高濃度であった症例がみられた。この症例を後方視的にみると、採血時に AST、ALT が上昇し、HELLP 症候群を呈していたほか、インスリン療法を行うほどの妊娠糖尿病を合併していた。PDA071 の親タンパク質であるフェチュイン A は肝臓で産生され肝機能のマーカーとなるほか、耐糖能異常の原因とも報告されていることから、この症例における PDA071 高値と病態との間には関連性が推定された。今後の展望として、より様々な病態の様々な妊娠週数検体を測定することで HDP はもちろん、それ以外の病態評価にも応用ができるかもしれない。

## 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 5 件)

Hamamura K, Yanagida M, Ishikawa H, Banzai M, Yoshitake H, Nonaka D, Tanaka K, Sakuraba M, Miyakuni Y, Takamori K, Nojima M, Fujiwara H, Takeda S, Araki Y. Quantitative measurement of a candidate serum biomarker peptide derived from  $\alpha$ 2-HS-glycoprotein, and a preliminary trial of multidimensional peptide analysis in females with pregnancy-induced hypertension. *Annals of Clinical Biochemistry*, 55(2) 287-295, 2018, DOI:10.1177/004563217717748

Ura A, Ogura K, Sakaguchi A, Onagi H, Ogishima D, Sugimori Y, Hamamura K, Fukunaga M, Matsumoto T. Coexistence of cervical leiomyosarcoma and gastric-type adenocarcinoma in situ with extensive extension to the endometrium and fallopian tube. *Case Reports of Pathology*, 18;2018, DOI:10.1155/2018/5848629.

石井純麗、島貴洋太、平沼健悟、齋藤実穂、笠原真木子、山口舞子、三輪綾子、瀧村憲佑、楠木総司、杉森弥生、松岡正造、荻島大貴、産褥に Mycoplasma hominis 感染症をきたした 6 例、東京産婦人科学会誌、66(4)、624-629、2017

山口舞子、松岡正造、石井純麗、齋藤実穂、笠原真木子、三輪綾子、瀧村憲佑、島貴洋太、杉森弥生、荻島大貴、当院で経験した帝王切開創部妊娠・頸管妊娠 5 症例の検討、産婦人科の実際、66(9)、1165-1170、2017

伊藤早紀、鈴木いづみ、瀧村憲佑、青井裕美、佐野靖子、竹田純、上里忠好、平井千裕、牧野真太郎、板倉敦夫、竹田省、妊娠中に副腎腫瘍を摘出し生児を得られた Cushing 症候群の 1 例、東京産婦人科学会誌、66(3)、463-467、2017

全て査読あり

〔学会発表〕(計 6 件)

吉竹洋、有井大介、瀧村憲佑、松田浩則、櫻庭真弓、川崎優、高森建二、武田裕二、仙道富士郎、藤原浩、野島美知夫、荒木慶彦、単クローン抗体 RP-3 の反応性を指標としたラット末梢血多形核白血球の性差と多様性、日本生殖免疫学会、2016

柳田光昭、瀧村憲佑、三浦正子、野中大輔、田中憲次、高森建二、荒木慶彦、妊娠高血圧症候群で特異的に変動するペプチドの診断利用を指向した評価系の確立、日本生化学会大会、2016

Hamamura K, Quantitative analyses for the serum peptides and their clinical utility for pregnancy induced hypertension. 日本産科婦人科学会、2017

濱村憲佑、荻島大貴、青木裕志、浅見志帆、児玉寛子、坂口亜寿美、小倉加奈子、松本俊治 当科における子宮内膜細胞診異常を呈した乳がん術後患者の検討、日本臨床細胞学会、2017

濱村憲佑、杉森弥生、石井純麗、齋藤実穂、笠原真木子、山口舞子、三輪綾子、島貫洋太、松岡正造、荻島大貴 分葉状頸管腺過形成としての子宮頸部生検に対する子宮鏡手術の応用、日本婦人科腫瘍学会、2017

荻島大貴、濱村憲佑、青木裕志、浅見志帆、児玉寛子、坂口亜寿美、小倉加奈子、松本俊治、当科における子宮内膜細胞診疑陽性判定の原因と転帰について、日本臨床細胞学会、2017

〔図書〕(計 1 件)

編集：竹田省、田中温、黒田恵司、執筆：濱村憲佑他、メジカルビュー社、データから考える不妊症・不育症治療、2016、305-311

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

濱村 憲佑 (HAMAMURA, Kensuke)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：70783306

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし