

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24007

研究課題名(和文) 便プロテオーム解析を用いた小児外科疾患の原因解明と新規治療法の探索

研究課題名(英文) Investigation of novel treatment and cause of diseases in the field of pediatric surgery by deep proteome analysis of stools

研究代表者

渡辺 栄一郎 (Watanabe, Eiichiro)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40623327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：かずさDNA研究所と共同してData-independent acquisition mass spectrometry(DIA)ベースのプロテオーム解析の構築に成功しこれを便解析に応用することでDIAベースの便プロテオーム解析の構築にも成功した。構築したDIAベースの便プロテオーム解析を用いて、BAの早期診断バイオマーカーの探索を開始し、BAの早期診断バイオマーカー候補となる便中のタンパク質を同定し、国際誌(Proteomes)に成果を発表することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、BAの患児の便中には、特徴的なタンパク・プロファイルが存在することがわかった。今後もBA症例の蓄積と解析が重要と考えるが、これらを詳細に検討することが、BAの早期診断バイオマーカーの発見につながる可能性があると考えられる。また、かずさDNA研究所と共同して開発したDIAベースの便プロテオーム解析は、小児外科領域だけでなく、あらゆる消化器系疾患の新規バイオマーカー創出、更には新規治療法の開発や病因解明に大きな役割を果たすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：We established deep proteome analysis of stools and apply it to infants with cholestasis, including both BA and non-BA cohorts. Our new method of deep proteome analysis by data-independent acquisition mass spectrometry (DIA-MS) can detect over 2,000 host-derived proteins in stools and provides a method for discovering new BA biomarkers. Further large-scale studies are needed to validate our results regarding the varying levels of host-derived stool proteins in BA as potential specific and reliable biomarkers for diagnosing this disease. Moreover, deep proteome analysis of stools has great potential to elucidate the pathophysiology of BA and other pediatric diseases, especially in the field of pediatric gastroenterology.

研究分野：便、小児外科

キーワード：便 プロテオーム 腸内細菌 胆道閉鎖症 腸瘻 短腸症候群 胎便 リンパ管腫

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

本研究は、これまでの研究アプローチとは全く異なり、網羅的タンパク解析技術（以下、プロテオーム解析）を用いて、ヒト便中に存在するタンパク質を網羅的に検索し、小児外科医が対峙する小児希少難病の病因解明と新しいバイオマーカーの探索さらには新規治療法の開発を目指す、次世代の担い手となる子供たちを救うためのトランスレーショナルリサーチである。

本国では少子高齢化が進み社会的に大きな問題となっているが、次世代を担う子供たちが心身共に健康に育つことは誰しもが願うことである。小児外科は、未熟児や壊死性腸炎そして胆道閉鎖症に代表される重症疾患の治療を行い、医学的介入がなければ死に至るこれらの子供たちを、手術などの医療行為によって救うことができ、健常児と同じように一生を送る道を切り開くことができる臨床診療部門である。しかしながら、小児領域では未だに原因不明な希少難病が多く、最新の医学知識を駆使しても命を救うことができない子供たちや、成長と発達に影響を残す子供たちが多い事も事実である。希少難病は、患者数全体からみれば極わずかではあるが、これらの子供たちを救うための研究を進めることは、我々小児外科医の責務であると考えている。

これまでの小児希少難病の研究は、遺伝子解析が中心に行われ、一定の成果は上がってはいるものの病因が不明な疾患が今尚多いことが現状である。近年、科学技術の進歩による質量分析装置の改良に伴って、網羅的タンパク解析技術が急速に進歩してきている (*Meier F, Nat Methods, 2018*)。ヒト便中に存在する特定のタンパク質と炎症性腸疾患などの消化器疾患の発症や悪化の関連を示唆する報告が幾つか存在するが、糞便を使った網羅的タンパク解析の報告は少ない。2016年に世界で初めて、マウス糞便を使ったプロテオーム解析研究が報告され (*Lichtman J S, ISME J, 2016*)、その後、便中の宿主由来タンパク質をターゲットにした大腸癌マーカーの探索などに関する臨床研究が報告され始めている (*Ang C S, Methods Enzymol, 2017*)。一方で、小児に特化した便プロテオーム解析の研究はなく、本研究が生み出す成果を世に発信することは、小児外科領域のみにとどまらず、新生児を含め、あらゆる小児系分野の臨床および基礎医学研究の発展に貢献しうる可能性を十分に秘めていると考えている。

## 2. 研究の目的

本研究の第1段階として、正期産で産まれた出生直後の新生児から自然排出される胎便に始まり、15歳に至るまでの健常小児便を、便プロテオーム解析を使い、その宿主（子供）由来タンパク質を網羅的に解析し、世界的にも類をみない本邦健常小児の各年代別の便中タンパク・プロファイルを作製する。

本研究の第2段階（第1段階と並行）として、未熟児、壊死性腸炎、胆道閉鎖症、ヒルシュスブルング病、ミルクアレルギー、様々な要因によって短腸症候群となり栄養吸収障害に陥った患児、更には、希少難病を患った小児便のプロテオーム解析を行い、研究の第1段階で独自に作製した健常小児の便中タンパク・プロファイルと比較検討し、これら疾患の病因や便を利用した全く新しい非侵襲的バイオマーカーおよび新規治療法の探索を行う。特に、壊死性腸炎、胆道閉鎖症そしてミルクアレルギーは診断が非常に難しく、診断や治療の遅れが致命的な結果につながるものが、今尚、臨床現場では問題視されている。故に、これら疾患のバイオマーカーとなり得る便中タンパク質が発見できれば、便を用いた全く新しい非侵襲的バイオマーカーの提唱に

繋がり、患児の予後の改善はもちろん、診断に苦慮する臨床現場の大きな力になることが期待できる。

### 3. 研究の方法

本研究は、非侵襲的に収集できる便を利用して小児外科医が対峙する小児希少難病の便プロテオーム解析を進め、これまで着眼されていなかった便中タンパク質を網羅的に解析する。収集した便は、グリセロールで4/5倍(V/V)に希釈し-80℃で保存した。便プロテオーム解析は、かずさDNA研究所で行なった。LCはUltiMate 3000 RSLCnano LC system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を使用し、分析カラムには内径75µm×長さ200mmの空カラムにCAPCELL CORE MP(大阪ソーダ、粒子タイプ:コアシェル粒子、官能基:C18;粒子径:2.7µm;細孔径:16nm)の粒子をパッキングして使用した。MSは、Q Exactive HF-X (Thermo Fisher Scientific)を使用した。LC-MS/MS分析で得られたデータを、Scaffold DIA (Proteome Software, Inc., Portland, OR, USA)を用いてhuman UniProt Swiss-Protのタンパク質配列データベースと照合してタンパク質を同定した。また、Encyclope DIA algorithmを用いて、同定されたタンパク質の相対定量値を算出した。

- (1) 胆道閉鎖症研究: 葛西手術前のBA患児(3症例)とnon-BA(コントロール)3症例(NICCD、腹壁破裂術後、肝外門脈閉塞症)の便をプロテオーム解析で分析し比較した。統計解析は、Mann-Whitney U testを用いて行い、 $p < 0.05$ を有意とした。
- (2) 小腸瘻排液(小腸液)のタンパク質成分に関する研究: 新生児期に小腸瘻を造設した3症例(胎便性腹膜炎、限局性腸穿孔、胎便関連性イレウス)の小腸液(小腸瘻造設時からの平均採取日数:  $85 \pm 78$ 日)および便(小腸瘻閉鎖時からの平均採取日数:  $39 \pm 19$ 日)を、ヒトタンパク質に着目してプロテオーム解析で分析した。統計解析は、student t testを用いて行い、 $p < 0.05$ を有意とした。
- (3) 短腸症候群(SBS)に関する研究: 在胎24週3日504gで出生後、5回に及ぶ開腹術を経て大腸全域と回盲弁及び回盲部から14cmの回腸を残すSBSとなった女児の空腸瘻閉鎖前(日齢82)、空腸瘻閉鎖後(日齢100)、広範腸管壊死時(日齢144)2回、SBS第1期(日齢168)、SBS第2期(日齢216)2回、SBS第3期 離乳食開始後(日齢369)2回の便をプロテオーム解析で分析した。

### 4. 研究成果

かずさDNA研究所と共同して、Data-independent acquisition mass spectrometry(DIA)ベースのプロテオーム解析の構築に成功し、これを便解析に応用することで、DIAベースの便プロテオーム解析の構築に成功した。

- (1) 胆道閉鎖症(BA)は、早期診断と早期治療が患児予後と直結する小児外科疾患であるが、有用な診断バイオマーカーはなく診断には難渋する。そこで、新たに構築したDIAベースの便プロテオーム解析を用いて、BAの早期診断バイオマーカーの探索に着手し、BA(3型)4症例とnon-BA(コントロール)3症例(NICCD、腹壁破裂術後、肝外門脈閉塞症)の解析を行い、BAの早期診断バイオマーカー候補となる便中のタンパク質を同定し成果を発表した(Watanabe E, proteomes, 2020)。DIAベースの便プロテオーム解析により、便中に含まれる2,110種類のヒト由来タンパク質が同定できた。

また、103 種類のタンパク質が両群で有意な差を示した。そのうち、49 種類のタンパク質が BA 群に多いタンパク質であり、胆道に発現する糖タンパクとして知られ、肝胆道系の閉塞や炎症などに関連することが報告されている CEACAM1 や CECAM5 が含まれていた（図 1）。

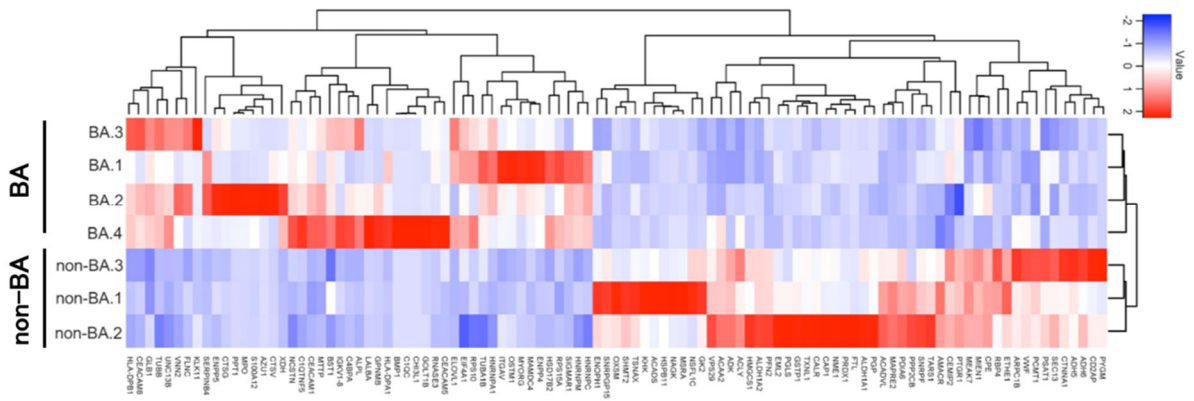


図 1 有意差を認めた 103 種類のタンパク質（胆道閉鎖症研究）

(2) 小腸瘻肛門側腸管への腸液注入は、遠位側腸管の腸管順応を促進することが知られているが未だ詳細は不明である。そこで、小腸瘻閉鎖前の小腸瘻排液(小腸液)および小腸瘻閉鎖後の便(便)をプロテオーム解析で分析し、小腸液および小腸瘻閉鎖の児に含まれるヒトタンパク質の検討を行なった。その結果、小腸液にはタンパク質分解および免疫応答に関連するタンパク質が多く存在することが判明した。小腸液の遠位側腸管への注入は、タンパク質消化に寄与するだけでなく、遠位側腸管の免疫力向上に寄与する可能性が示唆された（図 2）。

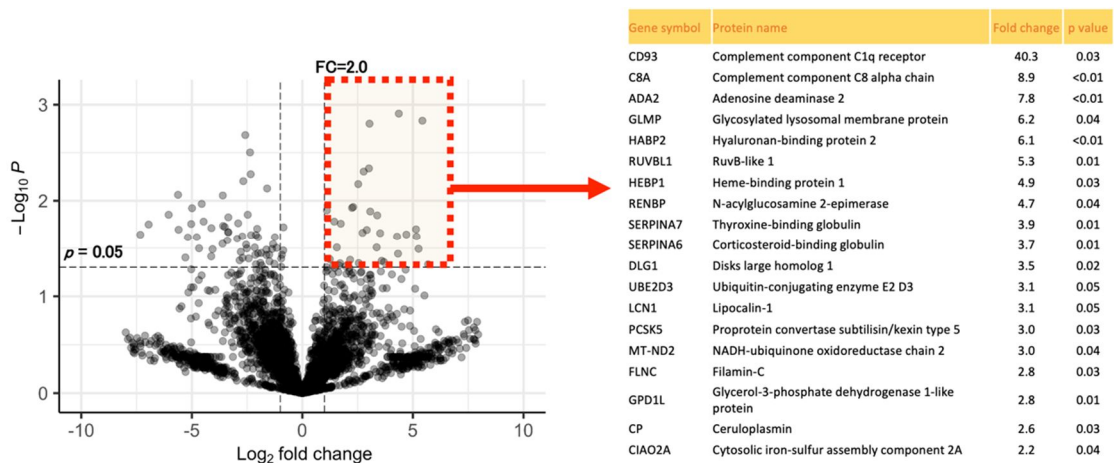


図 2 小腸瘻排液（小腸液）に多く認められたタンパク質

(3) SBS 罹患児の腸管リハビリテーションの過程をヒトタンパク質に着目して解析した。主成分分析(PCA)で、腸瘻閉鎖前後、壊死性腸炎(NEC)、SBS 第 1 期、SBS 第 2 期、SBS 第 3 期の各過程において、特有のタンパクプロファイルであることが判明した。また、SBS 第 2 期と SBS 第 3 期について比較検討では、SBS 第 2 期に比べて SBS 第 3 期には、小児の発達に重要である Insulin-like growth factor binding に関連するタンパク質が多く存在するこ

とが判明した（図3）。

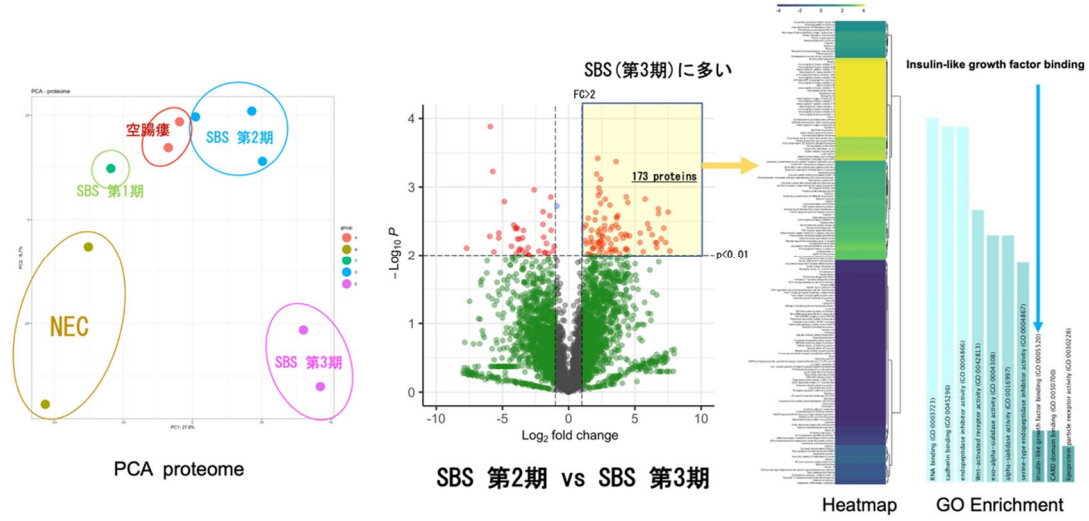


図3 短腸症候群罹患児の便解析（主成分分析及び第2期と第3期の比較検討）

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Watanabe E, Kawashima Y, Suda W, Kakihira T, Takazawa S, Nakajima D, Nakamura R, Nishi A, Suzuki K, Ohara O, Fujishiro J	4. 巻 8(4)
2. 論文標題 Discovery of Candidate Stool Biomarker Proteins for Biliary Atresia Using Proteome Analysis by Data-Independent Acquisition Mass Spectrometry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 proteomes	6. 最初と最後の頁 36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/proteomes8040036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yusuke Kawashima, Eiichiro Watanabe, Taichi Umeyama, Daisuke Nakajima, Masahira Hattori, Kenya Honda, Osamu Ohara	4. 巻 20
2. 論文標題 Optimization of data-independent acquisition mass spectrometry for deep and highly sensitive proteomic analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International journal of molecular sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20235932	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡辺栄一郎、柿原知、須田互、川島祐介、鈴木完、三宅和恵、朝長高太郎、吉田真理子、木本豪、設楽佳彦、鹿島晃平、垣内五月、高橋尚人、藤代準
2. 発表標題 短腸症候群1罹患児の腸管リハビリテーション過程における腸内細菌叢解析研究
3. 学会等名 第33回 日本腸管リハビリテーション・小腸移植研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡辺栄一郎
2. 発表標題 便を用いた網羅的タンパク解析技術・プロテオーム解析を利用した胆道閉鎖症研究（続報）
3. 学会等名 第47回 日本胆道閉鎖症研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三宅和恵、渡辺栄一郎、川島祐介、柿原知、高澤慎也、西明、鈴木完、小原収、藤代準
2. 発表標題 便プロテオーム解析を用いた葛西術後の消化管機能に関する研究
3. 学会等名 第47回 日本小児栄養消化器肝臓病学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡辺栄一郎、柿原知、藤雄木亨真、三宅和恵 朝長高太郎、吉田真理子、鈴木完、藤代準
2. 発表標題 便プロテオーム解析を用いた 小腸瘻排液のタンパク質成分に関する研究
3. 学会等名 第58回 日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 朝長高太郎、渡辺栄一郎、三宅和恵、吉田真理子 鈴木完、藤代準
2. 発表標題 プロテオーム解析を用いたリンパ管腫内用液のタンパク質解析研究
3. 学会等名 第58回 日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡辺栄一郎、渡部靖郎、則内友博、朝長高太郎、一城千都絵、鈴木完、藤代準
2. 発表標題 胎便性腹膜炎に起因したMeconium hydroceleの網羅的タンパク解析 Proteome analysis of Meconium hydrocele
3. 学会等名 第57回 日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡辺栄一郎、川島祐介、須田 互、柿原 知、朝長高太郎、星野論子、則内友博、一城千都絵、鈴木完、服部正平、小原收、藤代準
2. 発表標題 便を用いた網羅的タンパク解析技術・プロテオーム解析を利用した胆道閉鎖症研究
3. 学会等名 第46回 日本胆道閉鎖症研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺栄一郎、川島祐介、須田 互、柿原 知、高澤慎也、中島大輔、中村蓮、西明、鈴木完、小原收、藤代準
2. 発表標題 基礎研究者と共同して構築した便を対象としたData-independent acquisition mass spectrometry(DIA-MS)ベースプロテオーム解析による胆道閉鎖症の早期診断マーカー探索
3. 学会等名 第121回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 DIAGNOSIS METHOD, DIAGNOSIS KIT AND TREATMENT METHOD FOR BILIARY ATRESIA	発明者 渡辺栄一郎、藤代準、小原收、川島祐介、服部正平、須田	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、37887652	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	川島 祐介  (Kawashima Yusuke)		
研究協力者	須田 互  (Suda Wataru)		



6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	小原 収  (Ohara Osamu)		
研究協力者	藤代 準  (Fujishiro Jun)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関