

令和 6 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2019～2023

課題番号：19H05561・20K20469

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トランスレーショナルリサーチ

研究課題名（英文）Translational research through stool proteome analysis in pediatric surgery

研究代表者

藤代 準 (Fujishiro, Jun)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：60528438

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：胆道閉鎖症の早期診断バイオマーカー探索に関する論文を発表できた [Watanabe E, et al. Correspondence Fujishiro J. Proteomes, 2020]。また、259症例の初回胎便を胎便プロテオーム解析で分析し、在胎週数間での胎便タンパク質組成を明らかにしたことに加え胎便タンパク質を用いた在胎週数予測モデルを作成することに成功した。本研究成果はNature Communicationsに論文投稿し現在リバイス対応中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、科学技術イノベーションとして非侵襲的に採取可能な便検体をプロテオーム解析で分析する医療技術（便プロテオーム解析）が確立でき、胆道閉鎖症の早期診断バイオマーカー候補の同定や胎便タンパク質を用いた在胎週数予測モデルの作成に至った。便プロテオーム解析技術は、胆道閉鎖症だけではなく周産期・小児期から成人に至るまでの数多の消化器疾患への応用が十分に期待でき、非侵襲的に採取可能な便を用いた簡便なスクリーニング医療技術の開発、消化器疾患の新規治療法と予防法の構築さらには病態解明に繋がる可能性を十分に秘め、本研究の継続的な推進が将来的な社会貢献に発展する可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：We have published a scientific paper on potential stool biomarkers for biliary atresia (Watanabe E, Kawashima Y, Suda W, Kakihiro T, Takazawa S, Nakajima D, Nakamura R, Nishi A, Suzuki K, Ohara O, Fujishiro J. Discovery of Candidate Stool Biomarker Proteins for Biliary Atresia Using Proteome Analysis by Data-Independent Acquisition Mass Spectrometry. Proteomes, 8(4), 36, 2020). Additionally, we conducted meconium proteome analysis on 259 newborn babies, revealing differences in meconium protein composition across gestational ages. Furthermore, we developed a gestational age prediction model based on specific meconium proteins. These findings have been submitted to Nature Communications as an original article and are currently undergoing revision.

研究分野：小児外科

キーワード：プロテオーム解析 便 胎便 胆道閉鎖症 短腸症候群 バイオマーカー 消化器疾患 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

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(プロテオーム解析)が急速に進歩してきている[Meier F, et al. (2018) *Nat Methods*. 15: 440-448]。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、糞便を使ったプロテオーム解析の報告は少ない状況であった[Midtvedt T. et al. (2013) *PLoS One*. 8(6): e66074] [Vergnolle N. (2016) *Gut*. 65(7): 1215-1224]。2016年に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. et al. (2016) *ISME J*. 10(5): 1170-1181]、以降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研究報告が出され始めていた[Pinto E. et al. (2017) *Microbiology*. 163(2):161-174] [Ang, C. S. et al. (2017) *Methods Enzymol*. 586:247-274]。

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、一定の成果は出ているものの病因が不明な疾患が今尚多いのが現状であった。また、小児の発達に関連した腸内細菌叢の推移に関する報告はあったが[Planer, J. D. et al. (2016) *Nature*. 534(7606):263-266]、便プロテオーム解析を用いた研究報告はなく、小児の発達と便中タンパク質の関係に着目した研究は、本研究が初めてとなる。

2. 研究の目的

便研究として、これまでの腸内細菌叢に対する研究アプローチとは全く異なり、ヒト便中に存在する宿主(ヒト・患児)由来タンパク質に注目して、小児外科疾患及び小児の希少疾患と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的とする。

3. 研究の方法

本研究の第1段階として、本邦健常小児の各年代別の便中タンパク・プロファイルの作成を行う。研究代表者・藤代が、東京大学小児外科およびその関連施設の複数の小児外科 high volume center の協力のもとに、新生児の胎便に始まり思春期、成人期に至るまでの健常小児便を収集する。収集した小児便は、かずさDNA研究所にて研究分担者川島が宿主由来タンパク質をプロテオーム解析で網羅的に解析する。健常小児便サンプルは、東京大学小児外科及びその関連施設で診療する小児外科疾患のうち、鼠径ヘルニア、臍ヘルニア等の軽微な疾患に罹患したほぼ健常な小児の自然排出便を使用する。

本研究の第2段階として、研究代表者が収集する未熟児や、壊死性腸炎、胆道閉鎖症、ヒルシユスプルング病、ミルクアレルギー、短腸症候群やその他の希少疾患・難病を患った小児の便を研究分担者川島がプロテオーム解析で分析する。得られた便中タンパク解析の結果は研究代表者と研究協力者渡辺が分析し、研究の第一段階で独自に作成した健常小児の便中タンパク・プロファイルとの比較により、これらの疾患の発症原因及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、これらの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な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。

本研究の第3段階としては、研究代表者が収集した小児便サンプルを用いて、研究分担者川島が細菌由来タンパク質をプロテオーム解析で網羅的に解析し、同時に研究分担者須田が次世代シーケンサーを使ったヒト腸内細菌叢のメタゲノム解析を行い、両者の補完性を検討する。これまで、メタゲノム解析は、細菌叢の機能特性や集団・被験者間の細菌種やその遺伝子組成の相違などを定量的に解析することを可能にしてきたが、数十億塩基対におよぶ巨大情報を、特殊な方法で統合することが必要であった[須田ら (2017) *INTESTINE*. 21(4): 287-292]。一方で、細菌由来タンパク質の網羅的解析は、細菌の活動指標になりうるタンパク質自体を直接解析できるため、より精度の高い機能評価に繋がる可能性が高い。故に、既存のメタゲノム解析データとプロテオーム解析による細菌由来タンパク質の解析データを比較・検討することで、microbiotaと便中に存在する数多のタンパク質を融合させた新たな研究分野が構築でき、将来的にも、新規治療法の開発などの臨床応用が可能となる新学術分野の構築につながる事が大いに期待される。

4. 研究成果

本研究により、Data-independent acquisition massspectrometry (DIA) ベースの便プロテオーム解析を開発し、科学技術イノベーションとして非侵襲的に採取可能な便検体をプロテオーム解析で分析する医療技術(便プロテオーム解析)が確立でき、順調に臨床研究を進めることができている状況にある。

胆道閉鎖症(BA)の早期診断と早期治療を目指し非侵襲的に採取可能な便を利用してBAの早期

診断バイオマーカーの探索研究を継続している。本研究成果は2020年に国際誌に発表、2021年度は国内外の学会で多く発表し評価を得ている[Watanabe E, et al. Correspondence Fujishiro J. Proteomes, 2020]。本研究は、その後も継続して検体収集を行なっている。また、BA葛西術後の腸内環境に関する解析も進め現在論文執筆段階にある。

胎便中に含まれるヒト由来タンパク質に着目して新生児期に発症する消化管疾患のバイオマーカー探索および病因の解明を目的とした胎便研究に着手している。2019年から2021年にかけての約2年間に東京大学医学部附属病院で259症例の初回胎便を収集しプロテオーム解析を行い胎便中に存在する5,370種類のヒト由来タンパク質の検出に成功した。本研究では、詳細な臨床データとともに統計学的手法を用いて多角的に解析を行った結果、在胎週数間での胎便タンパク質組成(胎便タンパクプロファイル)を明らかにしたことに加えて、胎便タンパク質を用いた在胎週数予測モデルを作成することに成功した。本研究成果は、2022年、2023年度の学会で発表し、Nature Communicationsに論文を投稿し現在リバイス対応中の状況である。

新生児期にストーマ造設を行った児に関して遠位側腸管へのストーマ排液注入(MFR: mucosal fistula refeeding)の効果についての研究を進めている。本研究成果は2021年度、2022年度の学会で発表し、現在論文投稿中である。

筑波大学との共同研究において小児急性虫垂炎患児の唾液、便、虫垂内容液を採取し解析を行った。本研究成果は、2021年度、2022年度の学会で発表し既に国際誌へ掲載された[Aiyoshi T, Kakiyama T, et al. J Microbiol Immunol Infect, 2023]。

便プロテオーム解析技術は、胆道閉鎖症だけではなく、周産期・小児期から成人に至るまでの数多くの消化器疾患への応用が十分に期待でき、非侵襲的に採取可能な便を用いた簡便なスクリーニング医療技術の開発、新規治療法と予防法の構築、さらには病態解明に繋がる可能性を十分に秘められており、本研究の継続的な推進が、将来的な社会貢献に発展する可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 1. 渡辺栄一郎, 川島祐介, 柿原知, 設楽佳彦, 斎藤傑, 香川礼子, 紺野亮, 石川将己, 高見尚平, 清水泰岳, 松本恭明, 福家辰樹, 高澤慎也, 西明, 新井勝大, 野村伊知郎, 岡田賢, 高橋尚人, 小原收, 藤代準.	4. 巻 55
2. 論文標題 便プロテオーム解析	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 小児外科	6. 最初と最後の頁 150-157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 1. Aiyoshi T, Kakihara T, Watanabe E, Tanaka N, Ogata Y, Masuoka H, Kurokawa R, Fujishiro J, Masumoto K, Wataru S.	4. 巻 56
2. 論文標題 A Comprehensive Microbial Analysis of Pediatric Patients with Acute Appendicitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of microbiology, immunology, and infection	6. 最初と最後の頁 Open Access
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmii.2023.03.006	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 渡辺栄一郎, 川島祐介, 柿原知, 高見尚平, 高澤慎也, 小原收, 藤代準.	4. 巻 83
2. 論文標題 胆道閉鎖症の便蛋白/MS解析とバイオマーカーとしての意義	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 肝胆膵	6. 最初と最後の頁 577-586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

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 Pattarapanawan M, Uemura M, Miyazaki N, Takami S, Tomiyasu H, Tsunekawa N, Hirate Y, Fujishiro J, Kurohmaru M, Kanai-Azuma M, Higashiyama H, Kanai Y.	4. 巻 303
2. 論文標題 Anatomical and histological characteristics of the hepatobiliary system in adult Sox17 heterozygote mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anat Rec	6. 最初と最後の頁 3096-3107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ar.24466	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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20件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 設楽佳彦、渡辺栄一郎、柿原知、木本豪、向井丈雄、杉本美紀、伊藤淳、井上毅信、鹿嶋晃平、垣内五月、永松健、藤代準、高橋尚人
2. 発表標題 胎便に含まれるヒト由来タンパク質に関する網羅的タンパク質解析研究
3. 学会等名 第58回 日本周産期新生児学会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡辺栄一郎、川島祐介、紺野亮、設楽佳彦、柿原知 高橋尚人、川上英良、小原収、藤代準
2. 発表標題 胎便プロテオーム解析を用いた新生児の消化管疾患に対する新たな治療戦略創出への挑戦
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2022年大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡辺栄一郎, 柿原知, 高澤慎也, 西明, 鈴木完, 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59回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 相吉翼, 柿原知, 田中尚, 藤代準, 増本幸二, 渡辺栄一郎, 須田互
2. 発表標題 小児急性虫垂炎に対する16S rRNA遺伝子解析による腸内細菌叢解析研究
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022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, 小原収, 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、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 Eiichiro Watanabe, Yusuke Kawashima, Wataru Suda, Tomo Kakihara, Shinya Takazawa, Daisuke Nakajima, Ren Nakamura, Akira Nishi, Kan Suzuki, Osamu Ohara, Jun Fujishiro.
2. 発表標題 Discovery of candidate stool biomarker proteins for biliary atresia using deep proteome analysis by data-independent acquisition mass spectrometry (Young Scientist Award) (Agilent Technology Award)
3. 学会等名 10th AOHUPO. 2021.6.30-7.2 Pusan, Korea (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Eiichiro Watanabe, Yusuke Kawashima, Wataru Suda, Tomo Kakihara, Shinya Takazawa, Daisuke Nakajima, Ren Nakamura, Akira Nishi, Kan Suzuki, Osamu Ohara, Jun Fujishiro.
2. 発表標題 Discovery of candidate stool biomarker proteins for biliary atresia using deep proteome analysis by data-independent acquisition mass spectrometry(AOHUPO Presentation Award)
3. 学会等名 第19回大会JHUP0. 2021.7.19-21. 徳島
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Eiichiro Watanabe, Yusuke Kawashima, Wataru Suda, Tomo Kakihara, Shinya Takazawa, Daisuke Nakajima, Ren Nakamura, Akira Nishi, Kan Suzuki, Osamu Ohara, Jun Fujishiro.
2. 発表標題 Discovery of candidate stool biomarker proteins for biliary atresia using deep proteome analysis by data-independent acquisition mass spectrometry(The Best Asian Poster Award)
3. 学会等名 HUP0. 2021.11.15-19. Vancouver, Canada (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tsubasa Aiyoshi, Tomo Kakiyara, Eiichiro Watanabe.
2. 発表標題 Investigation of microbiome composition in pediatric acute appendicitis
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. 2021.12.8-10. Nara
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomo Kakiyara, Eiichiro Watanabe.
2. 発表標題 Investigation of host-derived proteins in gastrointestinal fluid of infants with DIA-MS-based proteomic analysis
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. 2021.12.8-10. Nara
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jun Fujishiro, Eiichiro Watanabe, Ryo Konno, Yusuke Kawashima, Shinya Takazawa, Mariko Yoshida, Osamu Ohara
2. 発表標題 Urinary proteome analysis for ureteropelvic junction obstruction by data-independent acquisition mass spectrometry
3. 学会等名 54th Annual Scientific Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons, PAPS2021 (国際学会)
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、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、小原収、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、設樂佳彦、紺野亮、吉原正仁、木本豪、鹿島晃平、伊藤淳、向井丈雄、柿原知、永松健、高橋尚人、藤代準、川上英良、小原収、川島祐介
2. 発表標題 網羅的タンパク質解析技術を用いた胎便タンパク質解析研究
3. 学会等名 第53回日本小児消化管機能研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 渡辺栄一郎
2. 発表標題 プロテオーム解析を応用した腸内細菌叢の新知見 便プロテオーム解析を用いた臨床への挑戦
3. 学会等名 日本患者由来がんモデル学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Watanabe E, Kakihara T, Nishi A, Fujishiro J, Shitara Y, Takahashi N, Yoshihara M, Kawakami E, Konno R, Kawashima Y, Ohara O
2. 発表標題 Exploratory research for neonatal GI diseases using meconium proteome analysis
3. 学会等名 第60回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高澤慎也、渡辺栄一郎、川島祐介、紺野亮、石川将己、柿原知、吉田真理子、森田香織、一瀬諒紀、泊卓志、松田理奈、西明、小原收、藤代準
2. 発表標題 便プロテオーム解析を用いた短腸症候群患児特異的ヒト由来タンパク質の探索
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2023年大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	須田 互 (Suda Wataru) (20590847)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・チームリーダー (82401)	
研究分担者	川島 祐介 (Kawashima Yusuke) (30588124)	公益財団法人かずさDNA研究所・ゲノム事業推進部・ユニット長 (82508)	

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
---------	---------