

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670266

研究課題名(和文)多戦略的翻訳後修飾モディフィコミクスによる肝胆膵早期がんの血中自己抗体の探索

研究課題名(英文)Multidisciplinary modificomics to search for novel and early markers to detect hepatobiliary cancers

研究代表者

野村 文夫(NOMURA, Fumio)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80164739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：モディフィコミクス解析の1つのアプローチとして糖鎖修飾を包括的に解析することにより、新しい習慣飲酒マーカーを検出、同定することに成功した。本蛋白質は肝障害の結果でなく、過度の飲酒により変化を受け、従来の飲酒マーカーが陰性のケースでも陽性を示す傾向にあった。今後は対象を消化器がんに絞り、リン酸化、ユビキチン化など他の翻訳後修飾の網羅的解析も加えて、広範囲のモディフィコミクス解析を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：By comprehensive glycoproteomics, we successfully detected and identified novel protein biomarker for excessive drinking. Alterations of this protein were not as a result of liver injury, but by excessive drinking per se. Interestingly, the changes were seen in non-responders to the conventional markers for drinking. We are planning to conduct more comprehensive analyses to detect cancer specific post-translational protein modifications including phosphorylation and ubiquitination.

研究分野：医歯薬学

キーワード：蛋白質 プロテオーム 癌 臨床 検査医学

1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム時代のキーワードの1つとプロテオームが注目され、gel-based および gel-free のプロテオーム解析技術を駆使した疾患マーカー探索が広く行われている。しかし、多くの蛋白質は何らかの翻訳後修飾を受けて初めてその本来の機能を発揮することを考慮すると、蛋白質の発現量だけでなく、その翻訳後修飾に注目する必要がある。近年の技術革新により、蛋白質の翻訳後修飾を網羅的に探索すること(モディフィコミクス)も可能になりつつあるが、ヒト癌組織に適用するための方法論は確立されていない申請者は包括的プロテオーム解析技術を用いた消化器癌のバイオマーカー探索に取り組んできた(平成19~21年度基盤研究B「多戦略的プロテオーム・ペプチドーム解析による消化器癌の早期診断法の開発と実用化」および平成22~24年度基盤研究B「多戦略的グライコプロテオミクスによる消化器癌のバイオマーカー開発と臨床応用」)しかし、蛋白質の発現量のみから得られる情報には限りがあり、翻訳後修飾に注目することにより、さらに超早期の診断が可能になると考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究では発想を転換し、固型癌を含む各種病態の初期段階に起こりうる翻訳後修飾を特異的に検出する技術(モディフィコミクス)の開発およびその修飾の結果もたらされる抗原性の変化により引き起こされる自己抗体の検出を試みることにより、各種疾患の早期診断に役立てることを目的とする。

3. 研究の方法

初年度は翻訳後修飾の代表格である糖修飾を取り上げ、方法論のチェックを兼ねて当研究グループが従来から取り組んでいる習慣飲酒マーカーをターゲットとした。新規飲酒マーカーの探索として、独立行政法人国立病院機構久里浜アルコール症センターに断酒目的で入院したアルコール性肝硬変男性患者6名の入院時、断酒8週間後の血清検体を用いた。新規飲酒マーカーの評価として、独立行政法人国立病院機構久里浜アルコール症センターに目的断酒で入院したアルコール依存症患者男性48名(内訳 非肝硬変32名、肝硬変16名) 財団法人柏戸記念財団ポートスクエア柏戸クリニックの常習飲酒者は、エタノール換算80g/日以上であった。すべての患者から同意を得た上で行った。GeLC-MS プロテオーム解析(図1)は、Glycoprotein Isolation Kit, WGA (Thermo Scientific 社)を用い、患者血清からWGA (Wheat Germ Agglutinin) がコート

されたマグネットビーズでN型糖鎖付加タンパク質を抽出した後、各サンプルを安定同位体標識試薬 TMT (Tandem Mass Tag; Thermo Scientific 社)で標識した。標識したサン

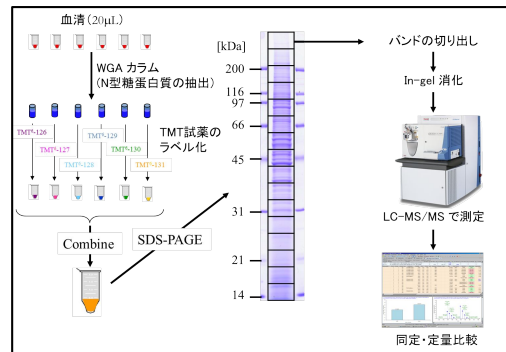


図1 解析の流れ

ルを混合し SDS-PAGE (DRC Co, Tokyo, Japan) を行い、CBB 染色後のゲルから分子量ごとにトリプシン (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) によるゲル内消化を行い、酵素消化したサンプルは LC-MS/MS 測定後、Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Scientific 社)を用いてデータベース(Uni-Prot 2012, Human) 検索を行い、タンパク質同定及び比較定量を同時に行った。アルコール性肝硬変患者6症例すべてで変化がみられた Methionine adenosyl transferase 2 subunit beta (MAT2B) の検証として、独立行政法人国立病院機構久里浜アルコール症センターに目的断酒で入院したアルコール依存症患者男性48名、財団法人柏戸記念財団ポートスクエア柏戸クリニックの人間ドック受診者男性26名の血清検体を用い、Human MAT2B ELISA Kit (Cusabio Biotech 社)で測定した。

4. 研究成果

アルコール性肝硬変患者血清6組(入院時、断酒8週間後)を用い、N型糖タンパク質を抽出した後、SDS-PAGEにより分子量ごとに分け、LC-MS/MS解析を行った結果、アルコール性肝硬変患者6症例で206タンパク質を同定した。そのうち1症例以上で入院時と断酒8週間後の比率(入院時 / 断酒8週間後)が1.5以上又は0.5未満のものは17タンパク質が同定され(表1) 3症例以上で入院時と断酒8週間後の比率(入院時 / 断酒8週間後)が1.5以上のものは alpha-2 macroglobulin, galectin-3 binding protein であり、0.5未満のものは complement C3, complement C4-A,

表1 アルコール性肝硬変患者血清検体において断酒前後で増減が認められた糖タンパク質の同定結果

No.	ID	M.W. (kDa)	アルコール性肝硬変患者 (入院時/断酒後)					
			1	2	3	4	5	6
1	Alpha-2-antiplasmin	163.2	0.98	0.48	0.61	-	-	-
2	Alpha-2-HS-glycoprotein	39.4	0.62	0.40	0.99	-	-	-
3	Alpha-2-macroglobulin	163.2	1.75	1.51	1.58	1.36	0.90	1.25
4	Attractin	158.4	0.88	0.57	1.20	1.02	0.86	1.15
5	Baculoviral IAP repeat-containing protein 6	529.9	0.72	0.88	1.18	-	-	-
6	Clusterin	52.5	1.01	0.87	0.43	-	-	-
7	Coagulation factor V	251.5	-	-	-	0.55	1.16	0.74
8	Complement C3	187.0	0.49	0.29	0.48	-	-	-
9	Complement C4-A	192.7	0.89	0.82	1.10	0.36	0.47	0.39
10	Fibulin1	71.2	0.43	0.62	0.88	0.91	0.89	0.57
11	Galectin-3-binding protein	65.3	1.57	1.51	2.20	-	-	-
12	Hemopexin	51.6	1.22	1.69	1.20	-	-	-
13	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	103.3	2.21	19.23	1.40	-	-	-
14	Methionine adenosyltransferase 2 subunit beta	37.5	0.49	0.50	0.49	0.49	0.38	0.42
15	Nck-associated protein 5	208.4	0.61	0.21	0.98	-	-	-
16	Plasma protease C1 inhibitor	55.1	0.81	0.27	0.45	1.06	0.39	0.88
17	Prothrombin	70.0	1.82	0.91	1.20	-	-	-

表1 アルコール性肝硬変患者血清検体において断酒前後で増減が認められた糖タンパク質の同定結果

methionine adenosyltransferase 2 subunit beta, plasma protease C1 inhibitorであった。特に Methionine adenosyltransferase 2 subunit beta (MAT2B) は 6 症例すべてで 0.5 未満であった。Alpha-2 macroglobulin と galectin-3 binding protein は、アルコールとの関連性は報告されていないが、慢性 C 型肝炎の線維化進行に伴って増加することが報告されている。Complement C3 と complement C4 は、アルコール性肝硬変において、健常者や慢性 B 型肝炎に比べて有意に低下すること ( $p < 0.05$ ) が報告されている。N 型糖タンパク質抽出をせずに血清を complement C3, complement C4 を測定すると、入院時、断酒 8 週間後はそれぞれ  $67.7 \pm 9.2$  mg/dL vs  $89.3 \pm 9.5$  mg/dL、 $18.2 \pm 5.9$  mg/dL vs  $26.7 \pm 4.6$  mg/dL で有意な違いがみられ ( $p < 0.01$ )、我々の結果と矛盾は無かった。MAT2B は、methionine と ATP から、S-adenosyl-L-methionine (SAM) を合成する酵素である。慢性エタノール摂取は実験動物 (ラットやヒビ) やヒトの研究で、肝組織における SAM の低下が報告されている。SAM を合成する酵素である MAT2B はアルコール性肝硬変 6 症例において、入院時と断酒 8 週間後の比率 (入院時 / 断酒 8 週間後) が 0.5 未満であることから、MAT2B の発現低下により SAM 合成が低下することが考えられる。入院時の -GTP 及び糖鎖欠損トランスフェリン (CDT) は 3 症例で正常域にとどまり、いわゆる non-responder と考えられたが、これら 3 症例においても変化が認められた。MAT2B が飲酒を反映するか評価することを目的に、非飲酒者 16 名、常習飲酒者 10 名、アルコール依存症患者 (入院時) 48 名の血清検体を用い Human MAT2B ELISA Kit で測定した。非飲酒者は  $3222.6 \pm 878.3$  pg/mL、常習飲酒者は  $2240.4 \pm 542.2$  pg/mL、アルコール依存症患者は  $1522.8 \pm 764.8$  pg/mL であった。非飲酒者と常習飲酒者及びアルコール依存症患者の間で、それぞれ  $p < 0.01$ 、 $p < 0.001$  と有意な違いが認められた (図 2)。アルコール依

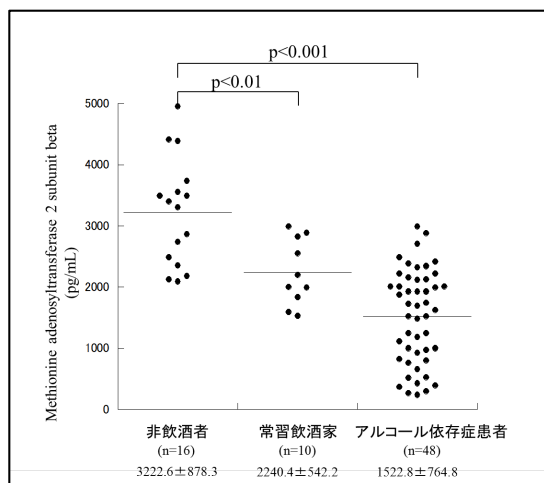


図 2 アルコール依存症患者における血清 Methionine adenosyltransferase 2 subunit beta

存症患者において、非肝硬変では  $1706.9 \pm 747.8$  pg/mL、肝硬変では  $1379.9 \pm 802.7$  pg/mL であり、 $p = 0.425$  と有意な違いが認め

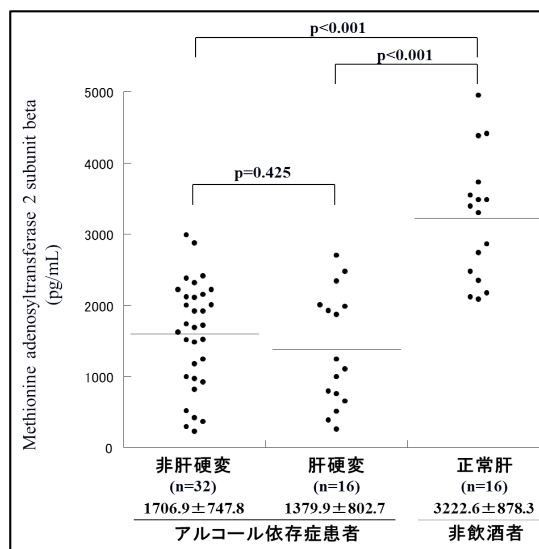


図 3 アルコール性肝硬変および非硬変症例における Methionine adenosyltransferase 2 subunit beta の血清レベル

られなかった (図 3)。アルコール依存症患者では肝障害の程度により MAT2B の変化はみられなかった。わが国で最も広く利用されている -GTP、近年欧米で多用されている CDT のいずれも、いわゆるノンリスポンダーが存在することに加え、非アルコール性疾患でも異常値を示す場合がある。すなわち、常習飲酒家のスクリーニングにおいて感度・特異度ともに満足すべきマーカーはなく、他施設共同研究においても -GTP 及び CDT の限界が示されている (15, 16)。MAT2B の発現量変化が -GTP 及び CDT のノンリスポンダーにおいてもみられることから、従来のマーカーと組み合わせることにより常習飲酒者の検出効率が上がると期待される。

当初の計画では翻訳後修飾反応としてリン酸化、ユビキチン化の検討まで予定であったが、先ず翻訳後修飾の代表格である糖鎖修飾に関してアルコール性肝障害を対象として方法論の確立、確認を行うことができたので、今後、消化器がんのマーカー探索への応用を進めていきたいと考えている。

## 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 7 件) すべて査読あり

Nomura F. Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): A revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1854(6):528-37

doi:10.1016/j.bbapap.2014.10.022  
Sawai S, Satoh M, Mori M, Misawa S,  
Sogawa K, Kazami T, Ishibashi M, Beppu  
M, Shibuya K, Ishige T, Sekiguchi Y,  
Noda K, Sato K, Matsushita K, Koder  
Y, Nomura F, Kuwabara S. Moesin is a  
possible target molecule for  
cytomegalovirus-related  
Guillain-Barré syndrome. Neurology.  
2014 ;83(2):113-7. doi:  
10.1212/WNL.0000000000000566.

Nishimura M, Satoh M, Nishimura S,  
Kakinuma S, Sato K, Sawai S, Tsuchida  
S, Kazama T, Matsushita K, Kado S,  
Koder Y, Nomura F. Human  
apolipoprotein e resequencing by  
proteomic analysis and its  
application to serotyping. PLoS One.  
2014 ;9(1):e85356 doi:  
10.1371/journal.pone.0085356

曾川一幸、飯田史枝、野村文夫: GeLC-MS  
プロテオーム解析による新規飲酒マー  
カーの探索と検証. アルコールと医学  
生物学 2014;33:50-5.

Liu Y1, Sogawa K, Sunaga M, Umemura H,  
Satoh M, Kazami T, Yoshikawa M,  
Tomonaga T, Yokosuka O, Nomura F.  
Increased concentrations of apo A-I  
and apo A-II fragments in the serum of  
patients with hepatocellular  
carcinoma by magnetic beads-assisted  
MALDI-TOF mass spectrometry. Am J Clin  
Pathol. 2014 ;141(1):52-61.  
doi:10.1309/AJCPBLFBNAP6N2UN.

Tsuchida S, Satoh M, Kawashima Y,  
Sogawa K, Kado S, Sawai S, Nishimura M,  
Ogita M, Takeuchi Y, Kobayashi H, Aoki  
A, Koder Y, Matsushita K, Izumi Y,  
Nomura F. Application of quantitative  
proteomic analysis using tandem mass  
tags for discovery and identification  
of novel biomarkers in periodontal  
disease.

Proteomics. 2013;13(15):2339-50 doi:  
10.1002/pmic.201200510

Sogawa K1, Noda K, Umemura H, Seimiya  
M, Kuga T, Tomonaga T, Nishimura M,  
Kanai F, Imazeki F, Takizawa H, Yoneda  
M, Nakajima A, Tsutsumi M, Yokosuka O,  
Nomura F. Serum fibrinogen alpha  
C-chain 5.9 kDa fragment as a  
biomarker for early detection of  
hepatic fibrosis related to hepatitis  
C virus. Proteomics Clin Appl.  
2013;7(5-6):424-3  
doi: 10.1002/prca.201200094

[学会発表](計 1 件)

曾川一幸、野村文夫ほか: GeLC-MS プロ  
テオーム解析による新規飲酒マー  
カーの探索と検証. 第 33 回アルコール医学

生物学会研究会学術集会 2014.1.24  
高知県立牧野植物園(高知県高知市)  
[図書](計 件)

[産業財産権]  
出願状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野村 文夫(NOMURA, Fumio)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号: 8 0 1 6 4 7 3 9

### (2) 研究分担者

澤井 撰(SAWAI, Setsu)  
千葉大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号: 1 0 4 0 0 9 6 2

佐藤 守(SATOH, Mamoru)  
千葉大学・医学部附属病院・寄附研究部門  
教員  
研究者番号: 2 0 4 0 1 0 0 2

小寺 義男(KODERA, Yoshio)  
北里大学・理学部・准教授  
研究者番号: 6 0 2 6 5 7 3 3

西村 基(NISHIMURA, Motoi)  
千葉大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 8 0 4 0 0 9 6 9

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: