

平成22年5月12日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19390156

研究課題名(和文)：高速定量プロテオーム解析法導入による革新的病態診断法の開発

研究課題名(英文)：Diagnostic value of peptidome analyses for protease activated pathological conditions beyond cancer diagnosis

研究代表者

橋口 照人 (HASHIGUCHI TERUTO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：70250917

研究成果の概要(和文)：【目的】生体内には正常(全長)のタンパク質やペプチド以外に数多くの崩壊ペプチド断片が存在することが知られるようになった(peptidome)。生体内のプロテアーゼの作用により一つの親タンパク質から複数の断片が産生される。peptidomeは血液・体液を構成する分子グループの新規概念である。健康人の血中においてもおびただしい崩壊ペプチド断片が観察され、またその出現パターンは個人によって異なる。このpeptidomeが病態に応じて特徴的な出現パターンを示すこと(特願2006-169359、特願2008-000776)より病態の早期予知診断に役立てることとした。解析対象として、炎症あるいは播種性血管内凝固症候群、多臓器不全症の状態、悪性疾患、炎症性免疫疾患を候補として選択し、それぞれの疾患の血清を用いて包括的なペプチド断片の定量と同定を行い、本研究の成果としてこれらの重症病態の病態把握・栄養サポート戦略・薬物治療戦略に寄与する診断法を開発することを目的とした。癌、炎症性免疫疾患の各病態を網羅するペプチド断片データベースを作成することを目的としてディファレンシャル解析(分子量2-20kDa)を実施し、新規診断システムを用いた診断基準の確立を目指した。

その結果、食道癌、膵癌および慢性炎症性疾患として歯周病の解析において得られた感度・特異度の高いバイオマーカー候補ペプチドに対して診断マーカーとしての有用性と新規分子としての創薬ターゲットとしての側面から研究を遂行した。

- ① 対象疾患の病態とバイオマーカー候補ペプチドとの関連についてペプチドの生成機序を含めて、さらに検討を加えた。培養細胞を酵素処理して得られるペプチドフラグメントと生体内組織液中に存在する同一のペプチドフラグメントの有無を検討した。
- ② 慢性炎症性疾患のバイオマーカー候補ペプチドに生理活性を認める可能性のあるデータについて検討した。
- ③ 診断バイオマーカー候補ペプチドの疾患の経過における変化について検討した。
- ④ バイオマーカー候補ペプチドに対する生体内での抗体産生の可能性について検討した。

生体内に存在するペプチドフラグメント(peptidome)の新規の概念に対する論考を進めた。peptidomeは健康であればあるほど豊かで複雑さに満ちたデータの織り成しとして現れる。「病氣」の時はあるデータが強調されて「豊かな複雑さ」は影を潜めてしまう。本研究は「病態の追求」とは対極的な「健康値を追求」する検査医学に発展する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Human serum contains thousands of proteolytically derived low-molecular-weight peptide fragments (serum peptidome). The concept of utilizing the serum peptidome for cancer diagnosis has been developed. A pathological serum peptidome appears when the homeostatic balance between proteases and protease inhibitors is disrupted. We hypothesize if analyses of the serum peptidome are of diagnostic value as information on which molecules are disrupted, and the pathological course it will take in unknown pathological conditions and disseminated intravascular coagulation (DIC). We analyzed the serum peptidome in 3 stages (early stage, pre-DIC and DIC stages) in one

patient with POEMS (polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, M protein and skin changes) syndrome, an intractable disease with unknown pathology, using a 1-dimensional gel electrophoresis/ matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (1-DE/MS)-based rapid quantitative approach. A very large number of peptide fragments appeared in the DIC stage, compared to pre-DIC. In addition, we identified fragments of transthyretin (ALGISPFHEHAEVVFTANDSGPR, m/z 2,451.18) and α 1-antitrypsin (EDPQGDAQKTDTSHHDQDHPTFN, m/z 2,691.02) that significantly increased in the DIC stage, compared to those in the pre-DIC stage. Rapid analyses of the serum peptidome may lead to a diagnostic method that can predict on-going protease activated pathological conditions and help to decide on multilateral strategies including nutritional support and drug therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度			
2006年度			
2007年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2008年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2009年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：プロテオーム・ペプチドーム・ペプチド・バイオマーカー・質量分析・癌・DIC・検査

1. 研究開始当初の背景

生体内には正常（全長）のタンパク質やペプチド以外に数多くの崩壊ペプチド断片が存在することが知られるようになった（peptidome）。生体内のプロテアーゼの作用により一つの親タンパク質から複数の断片が産生される。peptidomeは血液・体液を構成する分子グループの新規概念である。健康人の血中においてもおびただしい崩壊ペプチド断片が観察され、またその出現パターンは個人によって異なる。このpeptidomeが病態に応じて特徴的な出現パターンを示すこと（特願2006-169359、特願2008-000776）より病態の早期予知診断に役立つ可能性を考えていた。

2. 研究の目的

解析対象として、炎症あるいは播種性血管内凝固症候群、多臓器不全症の状態、悪性疾患、炎症性免疫疾患を候補として選択し、それぞれの疾患の患者検体を用いて包括的なペプチド断片の定量と同定を行い、本研究の成果としてこれらの重症病態の病態把握・栄養サポート戦略・薬物治療戦略に寄与する診断法を開発することを目的とした。癌、

炎症性免疫疾患の各病態を網羅するペプチド断片データベースを作成することを目的としてディファレンシャル解析（分子量2-20kDa）を実施し、新規診断システムを用いた診断基準の確立を目指した。

3. 研究の方法

食道癌、膵癌および慢性炎症性疾患として歯周病の解析において得られた感度・特異度の高いバイオマーカー候補ペプチドに対して診断マーカーとしての有用性と新規分子としての創薬ターゲットとしての側面から研究を遂行した。

- (1) 対象疾患の病態とバイオマーカー候補ペプチドとの関連についてペプチドの生成機序を含めて、検討を加えた。培養細胞を酵素処理して得られるペプチドフラグメントと生体内組織液中に存在する同一のペプチドフラグメントの有無を検討した。
- (2) 慢性炎症性疾患のバイオマーカー候補ペプチドに生理活性を認める可能性のあるデータについて検討した。
- (3) 診断バイオマーカー候補ペプチドの疾患

- の経過における変化について検討した。
- (4) バイオマーカー候補ペプチドに対する生体内での抗体産生の可能性について検討した。

4. 研究成果

生体内に存在するペプチドフラグメント (peptidome) の新規の概念に対する論考の発展に寄与する成果を挙げることが出来た。peptidome は健康であればあるほど豊かで複雑さに満ちたデータの織り成しとして現れる。「病気」の時はあるデータが強調されて「豊かな複雑さ」は影を潜めてしまう。本研究は「病態の追求」とは対極的な「健康値を追求」する検査医学に発展する可能性を示した。

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 11 件)

1. Hashiguchi T*, Shrestha B*, Ito T*, Miura N* (*Equal contribution), Takenouchi K, Oyama Y, Kawahara K, Tancharoen S, Ki-i Y, Arimura N, Yoshinaga N, Noma S, Shrestha C, Nitanda T, Kitajima S, Arimura K, Sato M, Sakamoto T, Maruyama I: B cell-derived vascular endothelial growth factor A promotes lymphangiogenesis and high endothelial venule expansion in lymph nodes. 査読有 J Immunol 184:4819-4826, 2010.
2. Taniguchi S, Hashiguchi T, Ono T, Takenouchi K, Nakayama K, Kawano T, Kato K, Matsushita R, Nagatomo M, Nakamura S, Nakashima T, Maruyama I: Association between reduced ADAMTS13 and diabetic nephropathy. 査読有 Thromb Res (in press)
3. Oyama Y, Hashiguchi T, Taniguchi N, Tancharoen S, Uchimura T, Biswas KK, Kawahara K, Nitanda T, Umekita Y, Lotz M, Maruyama I: High-mobility group box-1 protein promotes granulomatous nephritis in adenine-induced nephropathy. 査読有 Lab Invest [Epub ahead of print] (in press)
4. Ohno Y, Hashiguchi T, Maenosono R, Yamashita H, Taira Y, Minowa K, Yamashita Y, Kato Y, Kawahara K, Maruyama I: The diagnostic value of endothelial function as a potential sensor of fatigue in health. 査読有 Vasc Health Risk Manag 6:135-144, 2010.
5. Hashiguchi T, Tanaka K, Lee LJ, Sasaki K, Natsugoe S, Kawahara K, Arimura K, Maruyama I. Diagnostic value of serum peptidome analyses for protease activated pathological conditions beyond cancer diagnosis. 査読有 Med Hypotheses 73:760-763, 2009.
6. Arimura N, Otsuka H, Yamakiri K, Sonoda Y, Nakao S, Noda Y, Hashiguchi T, Maruyama I, Sakamoto T: Vitreous mediators after intravitreal bevacizumab or triamcinolone acetonide in eyes with proliferative diabetic retinopathy. 査読有 Ophthalmology 116:921-926, 2009.
7. Arimura N, Ki-i Y, Hashiguchi T, Kawahara K, Biswas KK, Nakamura M, Sonoda Y, Yamakiri K, Okubo A, Sakamoto T, Maruyama I: Intraocular expression and release of high-mobility group box 1 protein in retinal detachment. 査読有 Lab Invest 89:278-289, 2009.
8. Deguchi T, Hashiguchi T, Horinouchi S, Uto T, Oku H, Kimura K, Makisumi K, Arimura K: Serum VEGF increases in diabetic polyneuropathy, particularly in the neurologically active symptomatic stage. 査読有 Diabet Med 26:247-252, 2009.
9. Arimura N, Ki-I Y, Hashiguchi T, Sakamoto T, Maruyama I: High-mobility group box 1 protein in endophthalmitis. 査読有 Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 24:1053-1058, 2008.
10. Ki-I Y, Arimura N, Noda Y, Yamakiri K, Doi N, Hashiguchi T, Maruyama I, Shimura M, Sakamoto T: Stromal-derived factor-1 and inflammatory cytokines in retinal vein occlusion. 査読有 Curr Eye Res 32:1065-1072, 2007.
11. Kimura K, Hashiguchi T, Deguchi T, Horinouchi S, Uto T, Oku H, Setoyama S, Maruyama I, Osame M, Arimura K: Serum VEGF-as a prognostic factor of atherosclerosis. 査読有 Atherosclerosis 194:182-188, 2007.

[学会発表] (計 9 件)

シンポジウム

1. 橋口照人: 生体蛋白質の non-homeostatic degradation 解析による病態予知診断 次世代検査医学への応用を目指して。「臨床化学の若い力で発信しつつある新たな検査、病態解析法」第 49 回日本臨床化学学会年次学術集会, 長崎, 2009.
2. 橋口照人, 川原幸一, 丸山征郎, 李 良子, 田中 憲次: Degradation of non-hemostatic molecules in the state of DIC/MOF. 第 12 回エンドトキシン血症救命治療研究会, 福岡, 2008.
3. 橋口照人, 李 良子, 田中憲次, 丸山征郎: DIC/MOF における非止血関連分子の崩壊. 日本血栓止血学会学術標準化委員

- 会 (SSC) シンポジウム, 東京, 2008.
4. 橋口照人, 川原幸一, 丸山征郎, 李 良子, 田中憲次: DIC/MOFにおける生体内蛋白分解の網羅的解析, 第13回日本エンドトキシン研究会, 鹿児島, 2007.

国際学会

1. Ohno Y, Hashiguchi T, Maenosono R, Yamashita H, Taira Y, Minowa K, Yamashita Y, Kato Y, Kawahara K, Maruyama I: Endothelial function as an objective assessment tool of fatigue in healthy individuals. ICOHN & ACOHN Joint Conference2010, Yokohama, 2010.
2. Hashiguchi T : Degradation of non-hemostatic molecules in DIC/MOF. 7th International Bio Forum, Tokyo, 2008.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計5件)

1.
名称: 新規癌マーカーおよびそれを用いた診断
発明者: 橋口照人、夏越祥次、丸山征郎、田中憲次、李 良子
権利者: 鹿児島大学
種類:
番号: 特願 PCT/JP2009/050088
出願年月日: 平成 21 年 1 月 7 日
公開年月日: 平成 21 年 7 月 16 日
国内外の別: 国外
2.
名称: 新規疾患マーカーおよびそれを用いた診断
発明者: 橋口照人、夏越祥次、丸山征郎、田中憲次、李 良子
権利者: 鹿児島大学
種類:
番号: 特願 PCT/JP2007/073974
出願年月日: 平成 19 年 12 月 12 日
公開年月日: 平成 20 年 6 月 19 日
国内外の別: 国外
3.
名称: 歯周病特異的ペプチド、並びにそれを用いた歯周病の治療および診断
発明者: 丸山征郎、橋口照人、タンジャールン サランヤー、川原幸一、田中憲次、李 良子
権利者: 鹿児島大学
種類:
番号: 特願 2010-061673
出願年月日: 平成 22 年 3 月 17 日
国内外の別: 国内
4.
名称: 新規癌マーカーおよびそれを用いた診

断

- 発明者: 橋口照人、夏越祥次、丸山征郎、田中憲次、李 良子
権利者: 鹿児島大学
種類:
番号: 特願 2008-000776
出願年月日: 平成 20 年 1 月 7 日
国内外の別: 国内
5.
名称: 新規癌マーカーおよびそれを用いた診断
発明者: 橋口照人、夏越祥次、丸山征郎、田中憲次、李 良子
権利者: 鹿児島大学
種類:
番号: 特願 2008-549347
出願年月日: 平成 19 年 12 月 12 日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋口 照人 (HASHIGUCHI TERUTO)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教授
研究者番号: 70250917

(2) 研究分担者

丸山 征郎 (MARUYAMA IKURO)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号: 20082282

川原 幸一 (KAWAHARA KOICHI)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号: 10381170

乾 明夫 (INUI AKIO)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号: 80168418

夏越 祥次 (NATSUGOE SHOJI)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号: 70237577

(3) 研究協力者

田中憲次 (Tanaka Kenji)
(株) プロトセラ・膜タンパク質&リガンド解析センター