様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２９　年　　５　月　２４　日現在

機関番号：　１４１０１
研究種目：　基盤研究(C)（一般）
研究期間：　2014～2016
課題番号：　２６４６１６３１

研究課題名（和文）プロテオミクスを用いたHirschsprung病の新規診断マーカーの探索

研究課題名（英文）iTRAQ proteomic analysis of aganglionic colonic mucosa to detect new diagnostic markers in Hirschsprung's disease

研究代表者

井上　幹大（INOUE, Mikihiro）

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：３０４２２８３５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,900,000円

研究成果の概要（和文）：現在、ヒルシュスプルング病(HD)の確定診断には直腸粘膜生検と生検組織のアセチルコリンエステラーゼ染色が行われているが、児への侵襲が大きく定量的な診断ができないという問題がある。そこで、非侵襲的で診断率の高い新規診断マーカーを同定するため、HD症例４例の無神経節大腸粘膜と神経節の存在する同じHD症例の正常大腸粘膜及びコントロールとして用いた鎖肛症例４例の正常大腸粘膜を用いて、タンパク質の網羅的解析を行った。その結果、計197種類のタンパク質を検出した。この中で、HD無神経節大腸粘膜において有意にup-regulateされているタンパク質は17種類だった。

研究成果の概要（英文）：Rectal mucosal biopsy is essential for the definite diagnosis of Hirschsprung’s disease (HD). However, this examination is sometimes less valuable when applied to neonates. Therefore, a less invasive and more accurate diagnostic approach is required for early screening and diagnosis of HD. In the present study, we used iTRAQ proteomic analysis to identify a novel candidate protein aimed to increase diagnostic accuracy. We prepared resected tissues from 4 patients with HD and 4 subject without HD (non-HD). The colonic mucosa of the aganglionic segment from the patient with HD, colonic mucosa of the ganglionic segment from the same HD patient and colonic mucosa from the non-HD subject were manually microdissected. The proteins were extracted, digested, labeled using iTRAQ reagents, and analyzed using mass spectrometer. We identified and quantitated 197 proteins. Among these proteins, the levels of 17 proteins were significantly up-regulated in the aganglionic HD sample.

研究分野：　小児外科

キーワード：　ヒルシュスプルング病　プロテオミクス　診断マーカー

１．研究開始当初の背景

Hirschsprung 病（以下 HD）は腸管の壁内神経節細胞の欠損により機能的腸閉塞を呈する小児外科領域の代表的疾患であるが、その診断は経肛門的に直腸粘膜の生検を行い、アセチルコリンエステラーゼ染色で無神経節腸管において増生している外来神経線維を染色することで確定されてきた。本検査はコマーシャルベースでは行われておらず、各施設で独自に検査を行っており、煩雑かつ技術的習熟を要する。また、外来神経線維が粘膜内に十分進展していない新生児期、乳児期早期には診断が確定できないこともある。さらにこの数十年間、その診断法は大きく変化していないのが現状であり、より簡便で確実な診断法が求められている。

２．研究の目的

今回の研究の目的は，プロテオミクスを用い，本症に特異的に発現しているタンパク質を同定し、この新たなタンパク質が新規の診断バイオマーカーとして臨床応用可能なものか評価することである。

３．研究の方法

(1)FFPE 標本からタンパク抽出

マクロ，ミクロのレベルで病理組織学的に FFPE 標本の状態を確認し，標本ブロックから HD 手術症例４例の無神経節大腸と神経節細胞の存在する正常大腸を 4mm コアで 3-4 か所摘出した．コントロールとしては，鎖肛症例の人工肛門閉鎖時の正常大腸 4 例を用いた（これらは神経節細胞が正常に存在することを病理学的に確認済みである。）. 60℃で 30 分インキュベーションし，パラフィンを溶かし，キシレン，濃度勾配を持たせたアルコール，蒸留水で脱パラフィン処理を行った．50mM ammonium bicarbonate 2%ASB-14 (pH 8.2)を用い，homogenisation，sonication を行った.

＜タンパク濃度測定＞

BCA assay を用い，タンパク濃度を測定した.

(2)タンパク質の沈殿

500μg のタンパク質を含むサンプル溶液に，クロロホルム，メターノールを 1:2 の割合で含んだ溶液を 1:3 の割合で混合し，-20℃のフリーザー内に一晩放置した．13,000rpm で 2 分間遠心を行い，上清を捨てる．ペレットはフリーズバキューム内で一晩乾燥を行った.

(3) ペプチドへの消化 =In solution digestion

20μl 100mM Tris (pH7.8) 2% ASB-14 6M urea でペレットを溶解した.

1.5μl dithioerythritol 溶液を加え，60 分室温で振盪した．6μｌ iodoacetamide 溶液を加え，30 分室温で振盪した. 蒸留水を 135μl 加え，1μg の endoproteinase Lys-C（Sigma-Aldrich Company Ltd）を加える．37℃の waterbath で 2 時間インキュベーションした．1μg のトリプシン（Agilent Technologies）を加え，37℃の waterbath で一晩インキュベーションし，-20℃のフリーザーで保存した.

(4)ペプチド溶液の Fractionation

C18 カラム（Agilent Technologies）を用い，high ｐH の条件でペプチド溶液を 10 個の画分に分けた．C18 カラムを 200μl 50% acetonitrile containing 0.1% ammonia と 400μl 0.1% ammonia で洗浄，準備した．100μl のペプチド溶液に 0.2% ammonia を加え，C18 カラムに通す. 200μl 0.1% ammonia で C18 カラムを洗浄し，3％から 50%の acetonitrile containing 0.1% ammonia を C18 カラムに通し，分別を行う. それぞれの画分は Freeze dry を行った.

(5)Mass spectrometry の準備

6M urea 30μl を加え，13,000rpm で 2 分間遠心を行った. 18μl の溶液に 2μl enolase 1（Sigma Chemical）を加え，十分混和した.

(6)Mass spectrometry での解析とタンパク質の解析

サンプルを mass spectrometry で解析し，得られたペプチドのデータを解析ソフトを用い, タンパク質のデータベースと照合し，タンパク質を同定した．正常大腸組織と本症の無神経節大腸組織でのタンパク質の発現の差を解析し，本症の組織において有意に発現の多いタンパク質を新規バイオマーカーの候補としてピックアップした.

４．研究成果

ヒルシュスプルング病(HD)症例４例の無神経節大腸粘膜と神経節細胞の存在する同じ HD 症例の正常大腸粘膜及びコントロールとして用いた鎖肛症例４例の正常大腸粘膜を用いて、iTRAQ 法によりタンパク質の網羅的解析を行った結果、計 197 種類のタンパク質を検出した。この中で、HD 無神経節大腸粘膜において神経節の存在する HD 正常大腸粘膜及びコントロールの大腸粘膜と比較して有意に up-regulate されているタンパク質は 17 種類だった。その内訳は Actin, cytoplasmic 2、ATP synthase subunit beta、Calcium-activated chloride channel regulator 1、Collagen alpha-1(I)、Collagen alpha-1(III) 、 Collagen alpha-2(I) 、 Desmin 、 Filamin-A 、 Hemoglobin subunit alpha 、 Histone H2A.J 、 Histone H4 、 IgGFc-binding protein、Keratin, type I cytoskeletal 19、Keratin, type II cytoskeletal 8、Myosin light polypeptide 6、Polyubiquitin-C、Serum albumin であった。

これらのタンパク質の中から、診断マーカーとして利用可能と思われる数種類について、今後、他の HD 切除標本を用いて検証を行っていく予定である。

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　0 件）

〔学会発表〕（計　1 件）

① 大竹耕平、内田恵一、井上幹大、楠正人
iTRAQ proteomic analysis of formalin-fixed and paraffin-enbedded aganglionic colonic mucosa of Hirschsprung disease: a pilot study.
The24th Congress of Asian Association of Pediatric Surgery
2016 年 5 月 24 日
ヒルトン福岡シーホーク、福岡県、福岡市

〔図書〕（計　0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計　0 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　0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
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
井上　幹大（INOUE, Mikihiro）
三重大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30422835

(2)研究分担者
内田　恵一（UCHIDA, Keiichi）
三重大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号： 30293781

大竹　耕平（OTAKE, Kohei）
三重大学・医学部・助教
研究者番号：40378344

(3)連携研究者
（　　）

研究者番号：

(4)研究協力者
（　　）