

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08611

研究課題名(和文) Immuno-MS(質量分析)の臨床検査応用に向けた免疫複合体MS前処理法の開発

研究課題名(英文) Development of immunocomplex pretreatment method for mass spectrometry (MS, Immuno-MS) which is applicable to clinical testing

研究代表者

西村 基(Nishimura, Motoi)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80400969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：免疫複合体よりLC(液体クロマトグラフィー)を用いずに抗原(ペプチド・たんぱく質)を分離し測定する質量分析前処理法を検討した。具体的には変性処理、限外ろ過を行い抗原を分離した。比較的夾雑物に強いMALDI-MS(マトリックス支援レーザー脱離イオン化法による質量分析)を用いても理想的条件を外れると検出データには十分な再現性を得る事が困難であった。

さらにより広く腫瘍分泌物、肝疾患マーカー、ビタミンD代謝物等につき質量分析研究を行い査読論文を発表した。血液培養検体の細菌同定検査におけるMALDI-MSでは特殊なポリマーを用いる事でLCによらない前処理法によって臨床検査レベルの良好な成績を得た。

研究成果の概要(英文)：Pretreatment methods for mass spectrometry to separate and measure antigen (peptide / protein) from immunocomplex without LC (liquid chromatography) was studied. Specifically, denaturation treatment and ultrafiltration were carried out to separate antigens. Even if MALDI-MS (mass spectrometry by matrix assisted laser desorption / ionization method), which is relatively resistant to contaminants in samples is used, it is difficult to obtain sufficient reproducibility for detection data when deviating from the ideal condition.

We further conducted mass spectrometry research on tumor secretion, liver disease marker, vitamin D metabolite etc. and published peer reviewed studies. In MALDI - MS in the bacterial identification test of blood culture specimens, good results of clinical examination level were obtained by pretreatment method not dependent on LC by using special polymer.

研究分野：臨床検査

キーワード：質量分析 ビタミンD 細菌同定

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、これまで汎 **Apolipoprotein E(ApoE)**抗体による免疫沈降で得られた免疫複合体から **LC (液体クロマトグラフィー)** で抗原である **ApoE** を分離する、いわゆる **Immuno-MS** で血清 **ApoE** のほぼ全長が **リシーケンス可能**であり、従来の **ジェノタイピング**と同等の情報が得られる **DNA-free** な **セロタイピング**に応用できることを示してきた。この研究成果の次のステップとして、質量分析技術を検出系とすることで **イムノアッセイ**に、それ単独では容易でない機能性 (厳密な定量性・特異性、高感度化、**アイソフォーム・タイピング**など)を加えた新たな検査法を確立することを目指した。

2. 研究の目的

克服すべきポイントは免疫複合体に、いかに適切・簡便な処理を行って抗原を分離し質量分析に持ち込むかという点である。本研究は、**Immuno-MS** の臨床検査応用に必須であり、広汎な **イムノアッセイ**の **Immuno-MS** 化を可能とする **LC**に依存しない簡便な免疫複合体の質量分析(**MS**)前処理法の確立を研究目的とした。

3. 研究の方法

既存の **イムノアッセイ**に組み合わせ **Immuno-MS** 化することを念頭に「免疫複合体の **MS** 前処理」法の開発を試みた。研究代表者らは病院検査部に所属し臨床検査、臨床研究での経験から臨床検査レベルの **イムノアッセイ** 試薬の性能の良さ (**LC**への非依存性・簡便な操作・抗体の優秀性を含む) や操作を熟知していることから、まずは臨床検査レベルの **イムノアッセイ** 試薬を用いて **LC**に依存しない「免疫複合体の **MS** 前処理」法の開発に取り組んだ。つまり、既存の **イムノアッセイ**に容易に組み合わせる事の出来る **MS** 前処理法の確立を試みた。取り組みに用いる検体には臨床検査化に直結できるよう臨床検体 (血清・血漿・全血・尿・脳脊髄液等)を用いた。さらに研究的なレベルの **イムノアッセイ**や **ポリクローナル抗体**について本法と質量分析計を組み合わせ、良好な感度・測定対象への特異性・定量性を備えた **Immuno-MS** として質の良い測定を多数の項目で可能とし、臨床研究を支える基盤技術とすることを狙った。

4. 研究成果

(1)

本研究においては、免疫複合体より測定対象系である抗原 (ペプチド・たんぱく質) を **LC**に依存せず簡便に分離する方法の確立を狙った。既存の **イムノアッセイ**は定量を目的とし

たものが多く、既存の検出系 (濁度計など) で明確に検出するため、免疫複合体中の抗原と抗体の質量比は大きく抗体側に傾いている。したがって単純に免疫複合体を質量分析の対象としても、観察されるのは抗体由来の部分が大半を占めると思われ、やはり適切・簡便な前処理を行って抗体成分を減少させることが重要と考えられた。

申請時には低濃度の **SDS** と加熱により抗体を変性させ、その後、限外ろ過で高分子量の抗体を除去できる可能性を示した。繰り返し実験を行うと、除去できることが多いものの、無視できない回数で除去に失敗し、再現性が悪いことが判明した。したがってこれも申請時に述べたとおり、抗体を固相化する方法に切り替えることで再現性および除去効率の改善に取り組んだが、改善は乏しかった。

数々の方法にチャレンジした結果、結局もっとも再現性良く除去が見込める方法は、輸血検査で用いられている方法にヒントを得た、酸で免疫複合体を処理した上で限外ろ過を行う方法であった (図1)。



(図1)

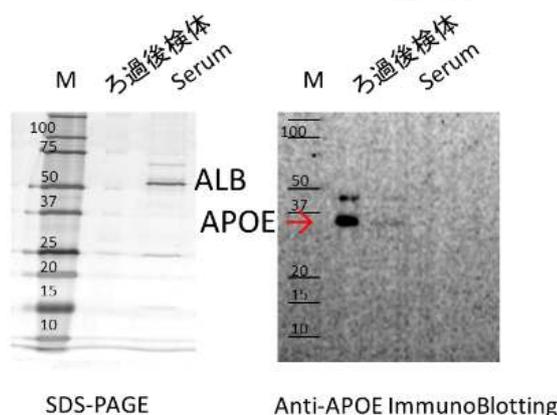
抗体成分を完璧に除去できるとまではいかないものの、処理前の免疫複合体では大きく抗体側に傾いている抗原と抗体の質量比を、この比較的簡便な処理により再現良く大幅に改善する事が可能であった (図2、図3)。



(図2)

限外ろ過によるAPOE精製

M: たんぱくマーカー
数字はkD



(図3)

100%純粋な抗原が得られなくとも、精密測定を観測するという質量分析計の特性から、この程度の粗精製物でも質量分析で解析対象にした。しかしながら、比較的夾雑物に強いといわれているMALDI-MS(マトリックス支援レーザー脱離イオン化法による質量分析)を用いても、理想的条件では測定対象の質量分析が可能なもの、条件を振るとデータが不安定で十分な再現性を得る事が困難であった。ペプチド(あるいはタンパク質)免疫複合体の質量分析前処理法としては既の実績のあるLC(液体クロマトグラフ)が、やはり手堅い手法であると結論せざるをえなかった。

一方、免疫複合体よりの精製物を質量分析の対象とするだけでは無く、より広く腫瘍分泌物、肝疾患マーカー、神経難病(平山病)、ビタミンD代謝物について質量分析研究を行った。ビタミンDについては、本邦において類例のほとんどない大規模施設共同研究で中心的な役割を果たし、日本人における血中濃度分布の報告を行った。MALDI-MSについては、細菌同定検査においては特殊なポリマーを用いる事で簡易な質量分析前処理法によって臨床検査レベルの成績が得られることを示しており、100%本申請の目的に一致するわけではないが、質量分析前処理の分野で、LCに依存せず解析精度を大きく向上させる手法の開発を行い、類似した目的の達成に貢献している。

述べた通り、血液たんぱく質の質量分析前処理法として今回、検討した抗体単独よりもLCを単独・または抗体などと併用する前処理法が最も現実的ではある。しかしながら上記の通りポリマーのような新素材によりLCを代替する簡便な前処理法開発は、アンビエントイオン化法の登場により質量分析そのものの操作の簡便化が進む現在、なお技術開発の焦点であり続けられると思われる。

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 15 件)

① Fujiki R, Yoshida A, Ohara O, Morisaki H, Nishimura M, Ichikawa T, Morisaki T, YAO Y, Tanaka T, Matsushita K. Assessing the accuracy of variant detection in cost-effective gene panel testing by next-generation sequencing. The Journal of Molecular Diagnostics. 査読有り in press

② Tsuchida S, Satoh M, Umemura H, Sogawa K, Takiwaki M, Ishige T, Miyabayashi Y, Iwasawa Y, Kobayashi S, Beppu M, Nishimura M, Kodera Y, Matsushita K, Nomura F. Assessment by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry of the Effects of Preanalytical Variables on Serum Peptidome Profiles Following Long-Term Sample Storage. Proteomics Clin Appl. 査読有り 2018;12(3):e1700047. doi: 10.1002/prca.201700047.

③ Ishige T, Itoga S, Utsuno E, Nishimura M, Yoshikawa M, Kato N, Matsushita K, Yokosuka O, Nomura F. Variant in C-terminal region of intestinal alkaline phosphatase associated with benign familial hyperphosphatasemia. J Med Genet. 査読有り 2018. pii: jmedgenet-2017-104964. doi: 10.1136/jmedgenet-2017-104964.

④ Ihara H, Kiuchi S, Ishige T, Nishimura M, Matsushita K, Satoh M, Nomura F, Yamashita M, Kitajima I, Tsugawa N, Okano T, Hirota K, Miura M, Totani M, Hashizume N; Nutrition Division, Japan Society of Clinical Chemistry. Surveillance evaluation of the standardization of assay values for serum total 25-hydroxyvitamin D concentration in Japan. Ann Clin Biochem. 査読有り 2018:4563218765570. doi: 10.1177/0004563218765570.

- ⑤ Ishige T, Satoh M, Ogawa S, Nishimura M, Matsushita K, Higashi T, Nomura F. Improved sensitivity of serum/plasma 1 α ,25-dihydroxyvitamin D quantification by DAPTAD derivatization. Clin Chim Acta. 査読有 2017;473:173-179. doi:10.1016/j.cca.2017.08.033.
- ⑥ Ashizawa K, Murata S, Terada T, Ito D, Bunya M, Watanabe K, Teruuchi Y, Tsuchida S, Satoh M, Nishimura M, Matsushita K, Sugama Y, Nomura F. Applications of copolymer for rapid identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. J Microbiol Methods. 査読有 2017;139:54-60. doi: 10.1016/j.mimet.2017.04.013.
- ⑦ Nishimura M, Ueda M, Ebata R, Utsuno E, Ishii T, Matsushita K, Ohara O, Shimojo N, Kobayashi Y, Nomura F. A novel KCNQ1 nonsense variant in the isoform-specific first exon causes both jervell and Lange-Nielsen syndrome 1 and long QT syndrome 1: a case report. BMC Med Genet. 査読有 2017 Jun 8;18(1):66. doi:10.1186/s12881-017-0430-7.
- ⑧ Ahmadloo S, Nakaoka H, Hayano T, Hosomichi K, You H, Utsuno E, Sangai T, Nishimura M, Matsushita K, Hata A, Nomura F, Inoue I. Rapid and cost-effective high-throughput sequencing for identification of germline mutations of BRCA1 and BRCA2. J Hum Genet. 査読有 2017;62(5):561-567. doi: 10.1038/jhg.2017.5.
- ⑨ Beppu M, Sawai S, Misawa S, Mori M, Ito S, Sogawa K, Nishimura M, Matsushita K, Nomura F, Kuwabara S. Serum cytokine and chemokine profiles in patients with juvenile muscular atrophy of distal upper extremity (Hirayama disease). J Neuroimmunol. 査読有 2017;302:20-22. doi: 10.1016/j.jneuroim.2016.11.011.
- ⑩ Takane K, Matsusaka K, Ota S, Fukuyo M, Yue Y, Nishimura M, Sakai E, Matsushita K, Miyauchi H, Aburatani H, Nakatani Y, Takayama T, Matsubara H, Akagi K, Kaneda A. Two subtypes of colorectal tumor with distinct molecular features in familial adenomatous polyposis. Oncotarget. 査読有 2016;7(51):84003-84016. doi:10.18632/oncotarget.11510.
- ⑪ Satoh M, Ishige T, Ogawa S, Nishimura M, Matsushita K, Higashi T, Nomura F. Development and validation of the simultaneous measurement of four vitamin D metabolites in serum by LC-MS/MS for clinical laboratory applications. Anal Bioanal Chem. 査読有 2016 Nov;408(27):7617-7627. DOI:10.1007/s00216-016-9821-4
- ⑫ Kikuchi W, Nishimura M, Kuga T, Tsuchida S, Saito T, Satoh M, Noda K, Kodera Y, Tomonaga T, Nomura F. Fibrinogen alpha C chain 5.9 kDa fragment (FIC5.9), a biomarker for various pathological conditions, is produced in post-blood collection by fibrinolysis and coagulation factors. Clin Proteomics. 査読有 2016;13:27. eCollection 2016. DOI:10.1186/s12014-016-9129-6
- ⑬ Nishi T, Takaoka H, Funabashi N, Nishimura M, Ohara O, Makiyama T, Ueda M, Kajiyama T, Kobayashi Y. Familial lamin A/C mutation cardiomyopathy with arrhythmia substrate detected by cardiac magnetic resonance imaging and electroanatomical mapping. Int J Cardiol. 査読有 2016;209:248-52. doi:10.1016/j.ijcard.2016.02.030.
- ⑭ Ishige T, Nishimura M, Satoh M, Fujimoto M, Fukuyo M, Semba T, Kado S, Tsuchida S, Sawai S, Matsushita K, Togawa A, Matsubara H, Kaneda A, Nomura F. Combined Secretomics and Transcriptomics Revealed Cancer-Derived GDF15 is Involved in Diffuse-Type Gastric Cancer Progression and Fibroblast Activation. Sci Rep. 査読有 2016 Feb 19;6:21681. doi: 10.1038/srep21681.
- ⑮ Segawa S, Nishimura M, Sogawa K, Tsuchida S, Murata S, Watanabe M, Matsushita K, Kamei K, Nomura F. Identification of Nocardia species using matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. Clin Proteomics. 査読有 2015 Mar 7;12(1):6.

doi: 10.1186/s12014-015-9078-5.

〔学会発表〕(計5件)

① 西村基

慢性肝疾患で低下する新規マーカー
FIC5.9(Fibrinogen α C chain 5.9 kD
fragment) の健常時産生メカニズム
第64回日本臨床検査医学会学術集会・第29
回世界病理臨床検査医学会連合(国際学会)
2017年11月15日
国立京都国際会館

② 西村基

新規慢性肝疾患マーカーFIC5.9(Fibrinogen
alpha C chain5.9kD fragment) は凝固線溶
の変動を反映する
第57回日本臨床化学会年次学術集会
2017年2017年10月6日
北海道大学クラーク会館

③ 西村基

質量分析技術による「ゲノム・フリー」な
Apolipoprotein E タイピング (迅速 ApoE セ
ロタイピング) を目指した試み
第63回日本臨床検査医学会学術集会
2016-09-02
神戸国際会議場

④ 西村基

大学検査部に適した「質量分析手法を用いた
次世代臨床検査」とは
日本臨床検査医学会
2015-11-19
長良川国際会議場

⑤ 西村基

自動分析法による血清 25 ヒドロキシビタミ
ンD測定値の標準化: SRM 972a を校正に用い
た測定
日本臨床化学会
2015-10-30
大阪大学コンベンションセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 基 (NISHIMURA, Motoi)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 80400969

(2) 研究分担者

佐藤 守 (Satoh, Mamoru)
千葉大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号: 20401002

(3) 連携研究者

小寺 義男 (KODERA, Yoshio)
北里大学・理学部・准教授
研究者番号: 60265733