

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10686

研究課題名(和文) 複数の疾患バイオマーカー同時測定による妊娠高血圧腎症の病態生理評価法の確立

研究課題名(英文) Development of a pathophysiological evaluation method for hypertensive disorders of pregnancy by simultaneous quantitation analysis of multiple disease biomarkers.

研究代表者

柳田 光昭 (YANAGIDA, Mitsuaki)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80365569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠高血圧症候群(HDP)は妊娠20週以降の妊婦に合併する高血圧症であり、発症前早期診断法の開発が望まれている。この目的のために我々はHDP患者血清中の生体内ペプチドに着目し、疾患と相関して変動するペプチドを探索した。探索によって得られたペプチド群が実際に多くのHDP患者において疾患と相関しているかを確認する手法として我々はマルチプルリアクションモニタリング法と呼ばれる高感度質量分析測定法を用いて各ペプチドの一斉定量系を確立した。この方法により本疾患の診断法の効率化が期待される。

研究成果の概要(英文)：Hypertensive disorders of pregnancy (HDP) is a syndrome characterized by high blood pressure that develops after 20-week in pregnancy. The pathogenesis of HDP is not fully elucidated and early diagnosis is expected to be developed. For this purpose, we have focused on the native peptides in the serum of patients with HDP and explored disease related peptides in the patients' serum. In this study, we established the quantitation method for these peptides using mass spectrometry with high sensitivity, which was multiple reaction monitoring. We measured the candidate biomarker peptides in the serum of patients with HDP using this system, and evaluated whether these peptides were validated as diagnostic markers of HDP.

研究分野：タンパク質化学

キーワード：妊娠高血圧症候群 疾患バイオマーカー ペプチド 質量分析 マルチプルリアクションモニタリング

1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧症候群 (HDP: hypertensive disorders of pregnancy) は母児双方の生命に重大な影響を及ぼす産科重要疾患の一つである。中でも腎機能障害を伴う妊娠高血圧腎症 (PE) は放置すれば子癩に発展する可能性が高い。近年、本邦でも急速に増加している「高齢出産」にも密接に関連しているが、その病態生理は不明の点が多い。現在、PE を含め HDP の発症前診断法はなく、本質的な治療薬もないため、一旦発症増悪すればその根本的な治療法は妊娠の速やかな終了以外にはない。しかし、妊娠の中断は胎児周産期障害につながるため、妊娠継続可否の判定は極めて切迫した状態下で求められることになる。

このように根本的治療薬が存在せず、発見の遅れが重篤な事態につながる HDP の病態をより正確にモニターする方法が確立できれば、現在の主な治療法である食事・運動制限療法に科学的な検証を加えることができる。したがって、HDP の早期診断法を開発することがこの疾患の発症と重篤化を防止するための極めて重要な課題であり、そのためにはこれらの疾患を特徴付ける疾患特異的バイオマーカー (DBM: disease biomarker) の測定法を確立することが期待されている。

古来より病態の把握のために、DBM 分子の探索が多くの疾患で試みられ、その結果として、さまざまな診断・治療法が発展してきた。近年では分析技術の発展に伴って DBM 分子の探索が盛んに行われており、患者から採取可能な検体を用いて、その中から疾患特異的な分子を探索・同定することが出発点となる。

HDP に関する DBM 候補はこれまでにいくつかの報告があるが、マーカーとして信頼できる感度・精度を持つものは少なく、未だ臨床応用にまで至っていない。

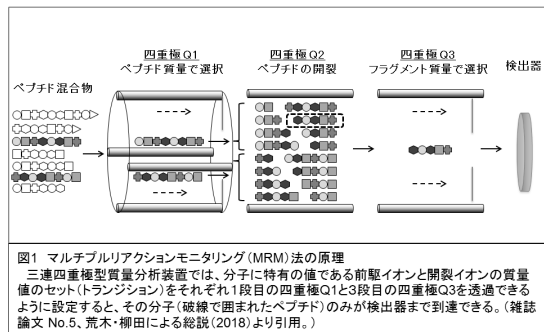
我々は HDP 患者中の循環血液中に存在する物質として生体内ペプチドに着目し、これらが HDP の病態生理に特異的な変動を示す DBM となりうる可能性について検討を行った。この目的のための方法論としては、近年大きな発展を遂げた質量分析計等を用いたオミクス大規模解析が絶大な潜在的威力・可能性を持っている。我々はこれまで質量分析法を中心としたプロテオーム解析を用いて疾患特異的タンパク質の探索を行ってきた。

我々が抹消血中に存在するペプチド断片の比較解析に用いる方法として注目したのは、血清中の主要タンパク質によりペプチド断片の測定値が左右されにくい新規分析技術 (プロットチップ法: Tanaka et al, BBRC, 2009) であった。この方法を用いて HDP 患者特異的な血清ペプチド DBM の探索を行った結果、23 種類のペプチドを検出し、そのうちの 7 種類のアミノ酸配列の同定にすでに成

功した (Araki et al, Proteomics, 2011)。

これらのペプチドの DBM としての有用性・実用性を検証するためには、同定されたペプチド断片について ELISA などの手法による簡易定量系を確立した上でその評価試験を行うことが必要である。我々も DBM 候補分子のうち 2 種類のペプチドについて ELISA 系を構築でき、HDP との相関を示すことができた。しかしながら、この方法は以下のような欠点を持っている: 1) 分子ごとの抗体作成に時間・労力がかかる; 2) 標的分子構造によっては良い抗体を作成できない場合があり、同じタンパク質由来の長さの異なるペプチド断片を交叉反応により検出する可能性がある。これらの障害が制約となり、DBM 候補を同定しても評価試験が必ずしも的確に遂行できない場合があることが大きな問題であった。

この問題点を解決するために、我々は抗体を用いずに DBM 候補の評価を効率よく行う方法として、マルチプルリアクションモニタリング法 (MRM 法・図 1) を用いた質量分析法に着目した。この方法では図 1 に示すように三連四重極型質量分析計を用い、1 段目の四重極において分子イオンの質量電荷比をもつ物質を透過するように設定し、2 段目の四重極で分子を開裂することによって生じた断片イオンの質量電荷比をもつ物質を透過するように 3 段目の四重極を設定することによって、対象物質を特異性よく検出・定量することができる。



この手法はさまざまな物質の混合物から解析の対象とする分子を検出することに特化した手法の一つであり、構造が既知の分子、特に合成品を標準物質として用意できるものに対しては以下の利点がある: 1) DBM 候補の標準品を液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (LC-MS/MS) することにより得られる MS/MS のパターンから、MRM 用の条件設定が可能である; 2) 一種類の対象分子について、複数の検出条件を設定することで特異性を上昇させることができる; 3) LC を MRM/MS 法と組み合わせて検出すると、目的とする多種類の対象分子を、一斉に定量評価することができる。

2. 研究の目的

本研究では、HDP を早期に診断できる

DBM の測定法の確立を最終目的とした。そのため以下の各項目を遂行していくこととした。

(1) 先行研究 (Araki et al, Proteomics, 2011) で発見された 23 種類の DBM 候補ペプチドのうち、DBM として評価するために必要な分子構造が決定可能なペプチドの選定。

(2) LC-MS/MS を用いた MRM 法による候補ペプチド一斉定量分析系の構築。

(3) 本定量分析系の試料として、検体からペプチド画分を再現性よく調製する方法の確立。

(4) ヒト検体への本法の応用。多数の患者検体における DBM 候補ペプチドの一斉定量評価、及びそれを基盤とした HDP、PE の予知・診断に有用な分子群の同定。

本研究で行う DBM 候補ペプチドを定量評価するための手法は、HDP 以外の疾患においても疾患関連物質の探索に続いて行う評価系の構築の際に重要な知見をもたらすものと考えられる。本法構築に際してその方法を蓄積し、他への波及効果を目指すこととした。

### 3. 研究の方法

#### (1) HDP 患者血清の採取と病態の把握

順天堂大学浦安病院産婦人科に入院・外来通院中の HDP 患者、及び対照として健常ボランティア (妊娠週数を合わせた正常妊婦) を対象に血清を採取した。対象者には研究に使用する旨のインフォームドコンセントを行った。血清採取は真空採血管を用い、-80 冷凍庫に解析まで分注保管した。妊婦の HDP に関する病態は血圧、腎機能により把握し、正常妊婦の場合でも採血後の妊娠経過中での PE 発症について特に留意して観察した。また、先行研究時に採血・凍結保管された 30 例以上の HDP 血清も使用した。

#### (2) 血清ペプチド画分の調製法の確立

血清試料から大規模解析の障害となる高含量タンパク質を除去し、低分子量のペプチド画分を調製するため、熱変性および酸変性の手法を検討した。

#### (3) DBM 候補ペプチドの MRM 測定条件の決定

我々の先行研究においてプロットチップ法で HDP 患者に特異的な変動を示した 23 種類の分子のうち、構造が明らかとなっている 7 種類のペプチドを選定し、MRM 法で定量測定系を以下のように構築した。

##### (a) ペプチド標準試料の合成

アミノ酸配列を図 2 に示した 7 種類のペプチドを標準試料として化学合成した。ペプチドの名称は分子量の小さい方から、P-2081, P-2091, P-2209, P-2171, P-2378, P-2858, P-3156 とした。合成した標品は凍結乾燥して秤量し、再溶解した際にその値をもとに濃

度を計算した。

##### (b) 安定同位体標識標準ペプチドの合成

7 種類のペプチドとアミノ酸配列が同じで一部のアミノ酸の炭素原子と窒素原子を安定同位体である  $^{13}\text{C}$  および  $^{15}\text{N}$  に置換したペプチドを合成した。安定同位体に置換したアミノ酸を図 2 に下線で示した。

記号	アミノ酸配列	由来タンパク質
P-2081	<u>HN</u> LGHG <u>H</u> K <u>H</u> EDQGHG <u>H</u> Q	[Kininogen 1 (439-456)]
P-2091	DEAG <u>S</u> ED <u>H</u> EG <u>T</u> HS <u>T</u> K <u>E</u> GHA	[Fibrinogen $\alpha$ (605-624)]
P-2127	G <u>H</u> GLGHG <u>H</u> EQ <u>H</u> GLGHG <u>H</u> K <u>F</u>	[Kininogen 1 (458-477)]
P-2209	<u>K</u> HN <u>L</u> G <u>H</u> G <u>H</u> K <u>H</u> EDQGHG <u>H</u> Q	[Kininogen 1 (438-456)]
P-2378	DD <u>P</u> DA <u>P</u> L <u>Q</u> P <u>V</u> TL <u>Q</u> LE <u>G</u> ER <u>N</u>	[C4-A/B (1429-1449)]
P-2858	<u>T</u> V <u>Q</u> PS <u>V</u> GAAAG <u>P</u> V <u>F</u> PC (C) <u>P</u> GR <u>I</u> R <u>H</u> E <u>K</u> V	[ $\alpha$ 2-HS-glycoprotein (341-367)]
P-3156	N <u>V</u> HS <u>G</u> ST <u>F</u> F <u>K</u> Y <u>L</u> Q <u>G</u> AK <u>I</u> P <u>K</u> PEAS <u>E</u> SP <u>R</u>	[Inter- $\alpha$ -THC H4 (617-644)]

図2 妊娠高血圧症候群の疾患特異バイオマーカー候補ペプチド。  
下線で示したアミノ酸は安定同位体標識ペプチドで $^{13}\text{C}$ ・ $^{15}\text{N}$ で標識されたアミノ酸。

##### (c) MS/MS による各ペプチドの MRM 設定情報の取得

合成した各ペプチドを逆相 LC-MS/MS で分析し、各ペプチドの定量用 MRM 分析条件 (MRM トランジション) を決めるために重要な次の 3 種類のパラメータを取得した: 1) 前駆イオンの質量電荷比値、2) 開裂イオンの質量電荷比値、3) カラムからの溶出時間。以上のパラメータに基づき、三連四重極型質量分析計 (QTRAP6500, SCIEX 社) を用いた各ペプチドの MRM 法による測定系を構築した。安定同位体標識合成ペプチドについても同様に MRM トランジションを決定した。

##### (4) MRM 法を用いた DBM 候補ペプチドの一斉定量解析系の構築

逆相 C18 カラム (HiQ Sil C18W-3-ESI カラム、ケイワイエーテクノロジー) の LC に試料をかけ、オンラインで接続した三連四重極型質量分析システムに、上記で決定した各ペプチドに対する MRM 分析条件をすべて設定し、一斉定量分析系を構築した。まずは合成ペプチド試料混合物を分析することにより、一斉分析条件を確認し、その後、標準血清試料から調製したペプチド画分を MRM 法による一斉分析により定量可能であるか確認した。一定量の安定同位体標識ペプチドを内部標準物質として血清に添加してからペプチド画分を調製し、血清中のペプチド量を定量した。

##### (5) MRM 法を用いた患者試料の一斉定量解析

確立した分析方法で患者および正常妊婦検体中の各マーカー候補ペプチドを測定した。MRM 法により測定した各ペプチド濃度の結果は、病態との相関を検定し、HDP の診断に有効な DBM のセットを多変量解析により選定した。

### 4. 研究成果

### (1) MRM によるペプチド定量系の構築

図2に示したHDPのDBM候補である7種類のペプチドについて、MRM測定のための標準品とするために、非標識体と安定同位体標識体の標品を合成した。凍結乾燥した合成標品はすべて0.1%ギ酸溶液に溶解可能であり、標準品として使用することが可能であった。

各ペプチドについて、MS測定およびMS/MS測定を行い、分子イオンの多価イオンのうち強度が高いピーク、および開裂により生ずる断片イオンのうち高いピークを示す質量電荷比の値をもとに、MRMトランジションを決定した。その結果、最低でも2種類以上のトランジションセットを決定することができた。

0.1%ギ酸、アセトニトリル濃度勾配による逆相C18カラムクロマトグラフィーにより合成標準ペプチドを分離し、上記で決定したMRMトランジションを設定したMSを導入してMRM分析を行った。各ペプチドのピークがMRMのピークとして得られたが、ピーク強度に差があった(図3)。特に、分子量の小さいペプチドはピーク強度が低かった。

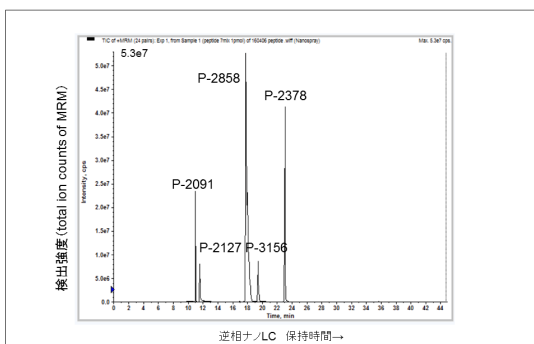


図3 7種類の合成ペプチド混合物試料のMRM測定。  
縦軸: 検出強度 (total ion counts of MRM)、横軸: カラム保持時間。

分子量の小さいペプチドが低いピークを示す理由として、Kyte & Doolittleのハイドロパシスケールをもとに各ペプチドの疎水度を計算すると、分子量の小さいペプチドには疎水性のクラスターが存在せず、逆相C18カラムへの保持が十分でない可能性が考えられた。そこで、これらのペプチドをカラムへより強く保持させるために、保持の段階のみにイオンペア試薬を共存させ、カラムへの保持を改善した。イオンペア試薬としてはトリフルオロ酢酸が有効であることがわかったが、質量分析におけるイオン化抑制の問題を避けるためにカラムスイッチングの方法で過剰のイオンペア試薬が分析カラムに入らないようにトラッピングカラムを使用した。

これらのことより、複数のペプチドを分析する場合、疎水性によってカラム保持条件を変えて分析する方法が感度良い分析に効果的であることがわかった。

### (2) 血清からのペプチド画分の調製法の確立 血清からタンパク質成分を除去し、我々が

分析対象とするペプチドを含むペプチド画分を調製するために効率良かったのは、アセトニトリル10%を添加した血清からギ酸存在下で熱変性により除タンパクする方法であった。除タンパク後の上清はC18ミニカラムにかけて溶出画分をペプチド試料とした。また、親水性ペプチドについてはC18ミニカラムに結合せず素通り画分に得られるため、この画分からさらにグラファイトカーボンチップカラムにより親水性ペプチドを精製して親水性ペプチド試料とした。

これらの調製法が有効であることは、ヒト由来成分を含まない市販の標準マウス血清を模擬血清として用い、これに7種類の標準ペプチドの非標識体・安定同位体標識体を添加したもからペプチド画分を調製する添加回収実験によって確認した。その際、既知量の安定同位体標識ペプチドを内部標準として、非標識体ペプチドを絶対定量することが可能であった。ペプチドによって感度の差があるが、定量直線性が4ケタ程度であった。図4にP-2378の添加回収実験の例を示した。

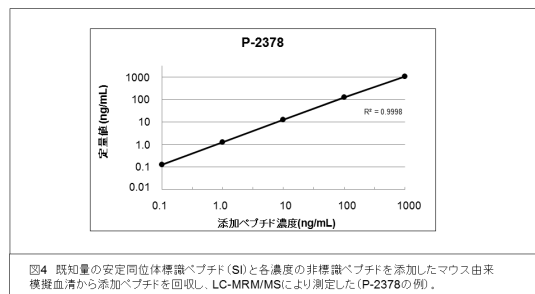


図4 既知量の安定同位体標識ペプチド(SI)と各濃度の非標識ペプチドを添加したマウス由来模擬血清から添加ペプチドを回収し、LC-MRM/MSにより測定した(P-2378の例)。

### (3) ヒト血清での測定

健常人から採取した血清を標準血清として、それに含まれる各ペプチドについて安定同位体標識ペプチドを内部標準としてLC-MRM/MS分析した。健常人血清中の生体内由来ペプチドとして定量することが可能であった(図5)。

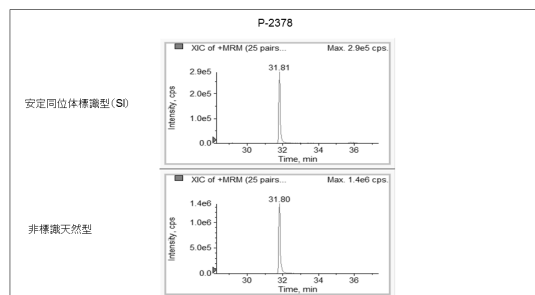


図5 安定同位体標識ペプチドを内部標準(SI)とし、液体クロマトグラフィー上で同じ位置に溶出する血清中の天然に存在するペプチドをピークエリア比から定量することができた。P-2378の例を示した。

現在、HDP患者血清と健常群の血清検体を用いて本研究で確立された手法での測定を行っている。これまでに、P-2858の測定結果と我々が以前構築したP-2081とP-2209のELISA系での測定結果とを合わせると、HDP発症との相関が高くなることを明らかにした。

#### (4) まとめ

本研究により HDP の DBM 候補ペプチドの評価を行うために、抗体作成を経ず、複数のペプチドの定量測定系を構築できた。本研究で培われた DBM 候補ペプチド評価技法の確立手法は他の疾患にも応用可能であり、さまざまな疾患の解析への波及効果が期待される。

本研究の成果の一部はすでに国際学術誌に発表した。より発展させた内容について現在追加データの集積と論文作成を行っている。

#### 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 5 件)

1. Hamamura K, Nonaka D, Ishikawa H, Banzai M, Yanagida M, Nojima M, Yoshida K, Lee LJ, Tanaka K, Takamori K, Takeda S, Araki Y: Simple quantitation for potential serum disease biomarker peptides, primarily identified by a peptidomics approach in the serum with hypertensive disorders of pregnancy. *Ann Clin Biochem.*, 53, 85-96, 2016. (査読有) doi: 10.1177/0004563215583697
2. Misaki K, Takamura-Enya T, Ogawa H, Takamori K, Yanagida M: Tumor-promoting activity of polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxygenated or nitrated derivatives. *Mutagenesis*, 31, 205-213, 2016. (査読有) doi: 10.1093/mutage/gev076
3. Yoshitake H, Oda R, Yanagida M, Kawasaki Y, Sakuraba M, Takamori K, Hasegawa A, Fujiwara H, Araki Y: Identification of an anti-sperm auto-monoclonal antibody (Ts4)-recognized molecule in the mouse sperm acrosomal region and its inhibitory effect on fertilization in vitro. *J Reprod Immunol*, 115, 6-13, 2016. (査読有) doi: 10.1016/j.jri.2016.04.001
4. Hamamura K, Yanagida M, Ishikawa H, Banzai M, Yoshitake H, Nonaka D, Tanaka K, Sakuraba M, Miyakuni Y, Takamori K, Nojima M, Yoshida K, Fujiwara H, Takeda S, Araki Y: Quantitative measurement of a candidate serum biomarker peptide derived from  $\alpha$ 2-HS-glycoprotein, and a preliminary trial of multi-dimensional peptide analysis in females with pregnancy-induced hypertension. *Ann Clin Biochem.*, 55, 287-295, 2018. (査読有) doi: 10.1177/0004563217717748
5. 荒木 慶彦, 柳田 光昭: ペプチドームを基

盤とする疾患診断法 - 現状・展望及びその検査医学的技術限界 -, 臨床化学, 2018, in press. (総説・査読無)

[学会発表](計 6 件)

1. 柳田 光昭, 池田 圭吾, 三浦 正子, 藤城 真樹, 森本 真司, 高崎 芳成, 高森 建二, 関川 巖: 関節リウマチ患者に対するアバタセプト初回投与時の血清プロテオーム変動解析, BMB2015 (日本生化学会・分子生物学会合同年会), 2015 年 12 月 1 日~4 日, 神戸
2. 本田 美樹, 福田 達也, 浅井 知浩, 柳田 光昭, 奥 直人, 海老原 伸行: Rho キナーゼ阻害剤内封リポソーム点眼による実験的脈絡膜新生血管抑制効果, 第 54 回日本網膜硝子体学会総会, 2015 年 12 月 4 日~6 日, 東京
3. 柳田 光昭, 濱村 憲佑, 三浦 正子, 野中 大輔, 田中 憲次, 高森 建二, 荒木 慶彦: 妊娠高血圧症候群で特異的に変動するペプチドの診断利用を指向した評価系の確立, 日本生化学会年会, 2016 年 9 月 25 日~27 日, 仙台
4. 本田 美樹, 福田 達也, 浅井 知浩, 柳田 光昭, 海老原 伸行, 奥 直人: ファスジル内封リポソーム点眼後の後眼部への薬剤到達経路, 第 33 回日本 DDS 学会学術集会, 2017 年 7 月 6 日~7 月 7 日, 京都
5. 柳田 光昭, 濱村 憲佑, 三浦 正子, 高森 建二, 荒木 慶彦: 妊娠高血圧症候群で特異的に変動する血中ペプチド測定系の確立, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 2017 年 12 月 6 日~2017 年 12 月 9 日, 神戸

[図書](計 1 件)

1. 柳田 光昭, 関川 巖: プロテオーム解析によるリウマチ性疾患の研究動向, in silico 創薬におけるスクリーニングの高速化・高精度化技術 第 6 章 4 節, 技術情報協会, 東京, 2018

[その他]

ホームページ等

[https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/kankyo\\_igaku/k4\\_yanagida.html](https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/kankyo_igaku/k4_yanagida.html)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

柳田 光昭 (YANAGIDA, Mitsuaki)  
順天堂大学・医学研究科・准教授  
研究者番号: 80365569

##### (2) 研究分担者

荒木 慶彦 (ARAKI, Yoshihiko)  
順天堂大学・医学研究科・先任准教授  
研究者番号: 70250933