

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05721

研究課題名(和文)再発性多発軟骨炎の診断を可能にする血清ペプチドの検出

研究課題名(英文)Detection of serum peptides enable the diagnosis of relapsing polychondritis

研究代表者

佐藤 利行 (Sato, Toshiyuki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：10350430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：モデル構築用のtraining setのRP群でHC、RA、HC+RA(non-RP)群に比べ1.2倍以上イオン強度が増減したペプチドを各々検出した( $p < 0.05$ )。training setで11、9、14個のペプチドイオン強度による多変量解析でRP群とHC、RA、non-RP群を完全に判別できた。RP群とnon-RP群の判別モデルを構成する14個のペプチドで10個が同定され、同定ペプチドから任意の4つを選び作成したRP/nonRP判別モデルのうち、モデル検証用のtesting set、testing setにGPAを加えたcohortで感度も特異度も70%以上を示すモデルを4つ見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義は、「血中ペプチドをバイオマーカーとして捉えた点」である。血中蛋白質は、99%を主要な蛋白質、残り1%を多様な蛋白質・小蛋白質(ペプチド)が占める。代表者のグループは顕微鏡的多発血管炎活動期にのみ検出される血清ペプチドの検出、レビー小体型認知症(DLB)で感度・特異度共に約90%を示すマーカー候補血清ペプチド及びアルツハイマー型認知症(AD)とDLBとを90%以上の確率で判別する血清ペプチドの検出など、ペプチドミクスで診断マーカー開発に応用している。社会的意義は、バイオマーカー研究を治療応用に繋げる点、である。いわば本研究は「バイオマーカー学」を樹立するものである。

研究成果の概要(英文)：In the RP group, 27, 9, and 9 peptides showed ion intensity at least 1.2-fold higher or lower in comparison to the HC, RA, and HC+RA (non-RP) groups in the training set, the cohort for the construction of RP-discriminant model, respectively ( $p < 0.05$ ). Selecting 11, 9, and 14 peptides by multivariate analysis, we completely discriminated the RP group from those groups, respectively in the training set. We tried to identify the peptides as described above. As a result, 19 peptides were identified and the most identified peptides were derived from proteins associated with coagulation. Selecting any 4 out of 10 identified peptides used in the discrimination of RP and non-RP groups, we generated 4 RP/nonRP-discriminant models with both sensitivity and specificity of 70.0% or more in testing set, the cohort for the validation of the discriminant model, and testing set with 7 granulomatosis with polyangiitis.

研究分野：ペプチドミクス

キーワード：再発性多発軟骨炎 血清 血清ペプチド 診断マーカー バイオマーカー ペプチドミクス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 再発性多発軟骨炎 (relapsing polychondritis, RP) は全身の軟骨組織が再発性かつ進行性に侵され、耳・鼻・眼・気管・関節などに炎症を来す慢性炎症性疾患である。McAdam らが提唱した方法が RP 診断に使用されている。しかし、発症初期には臨床症状が揃わず診断基準を満たさないこともあり、RP 診断に有用な検査は現時点では確立されていない。

(2) RP は自己免疫反応の関与が唱えられており、抗 II 型コラーゲン抗体が検出される (Ann Rheum Dis 1981;40:473)。それ以外にも、気管軟骨に多く見られる軟骨マトリクス蛋白質の matrilin-1 に対する自己抗体 (Arthritis Rheum 2001;44:2402) や、細胞骨格を担うチューブリン (Microbiol Immunol 2006;50:117)、解糖系酵素の  $\alpha$ -エノラーゼ (Microbiol Immunol 2006;50:117) などが RP 特異的な自己抗原として同定されているが、再現性や画像診断より劣る等の問題により、RP 診断マーカーの実用化に至っていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、RP の診断マーカー候補となる血清ペプチドを検出し、単独または複数の血清ペプチドからなる RP の診断モデルを作成し、異なる症例から成るコホートを用いて有用性を検討する。さらに、モデル作成に用いたペプチドが軟骨細胞に与える影響を検討する。

### 3. 研究の方法

RP 患者 37 例、関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) 43 例、健常者 (healthy control, HC) 37 例を、1st cohort (RP 19 例、RA 22 例、HC 19 例) および、2nd cohort (RP 18 例、RA 21 例、HC 18 例) に分けた。1st cohort から、ペプチドイオン強度の主成分分析によって外れ値を示した 3 例を除外して training set とした。2nd cohort はそのまま testing set とした。マトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF/MS) により、血清中のペプチドを網羅的に検出した。ペプチドイオン強度を用いた判別モデルは、training set を用いて直交部分最小二乗判別分析 (OPLS-DA) により構築し、testing set を用いて JMP により検証を行った。なお、一部のペプチドはタンデム質量分析により同定した。

### 4. 研究成果

(1) 160 のペプチドが 1st cohort (RP, n=19; 健常対照 [HC], n=19; 関節リウマチ [RA], n=22) で検出された。HC、RA、および HC+RA (non-RP) 群と比較して、27、9、および 9 ペプチドが、RP 群でそれぞれ少なくとも 1.2 倍高いまたは低いイオン強度を示した ( $p < 0.05$ )。ペプチドイオン強度の主成分分析によって外れ値を示した 2 つの HC および 1 つの RA 症例を 1st cohort から除外して、新しい cohort (RP, n=19; HC, n=17; RA/n=21) を設けて「training set」と名付けた。

(2) 直交部分最小二乗判別分析 (OPLS-DA) によって training set の 160 ペプチドイオン強度を分析し、RP 群を HC、RA、および non-RP 群から完全に判別する 3 つのモデルを構築した (RP/HC-160P モデル (図 1)、RP/RA-160P モデル (図 3) および RP/nonRP-160P モデル (図 5); AUROC、1.000)。判別能力の高い 11、9、14 ペプチドを選択して、RP 群を HC、RA、non-RP 群からそれぞれ完全に判別可能なモデルを構築した (RP/HC-11P モデル (図 2)、RP/RA-9P モデル (図 4)、RP/nonRP-14P モデル (図 6); AUROC、1.000)。

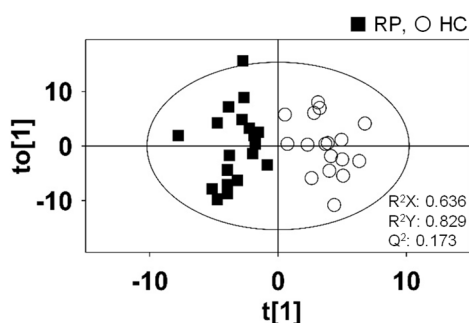


図 1. RP/HC-160P モデル

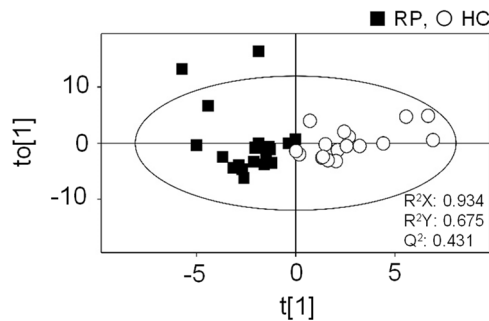


図 2. RP/HC-11P モデル

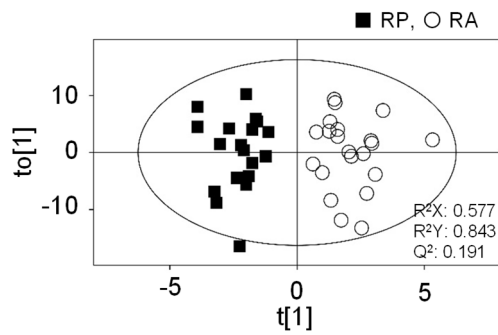


図 3. RP/RA-160P モデル

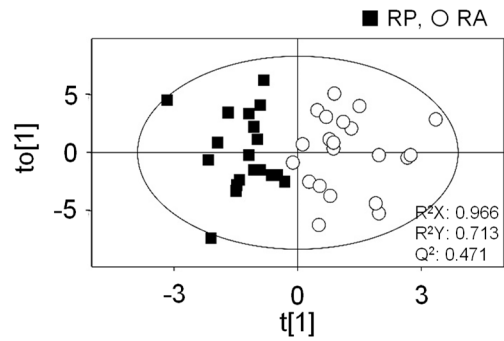


図 4. RP/RA-9P モデル

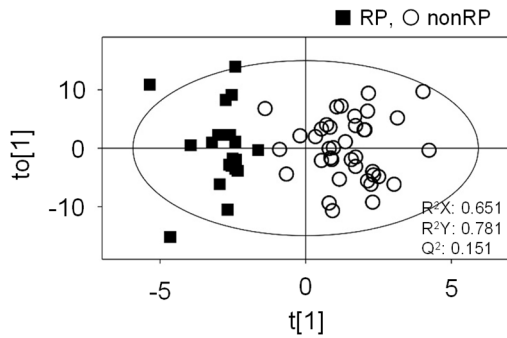


図 5. RP/nonRP-160P モデル

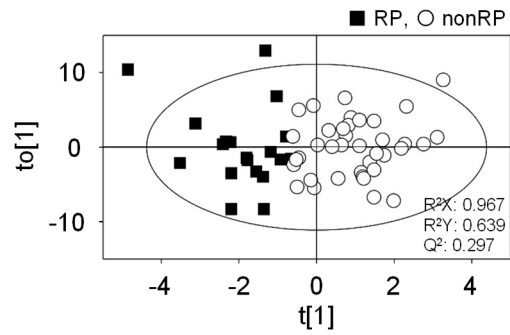


図 6. RP/nonRP-14P モデル

( 3 ) RP と他の 3 つの群の 1 つとの間に、少なくとも 1.2 倍のイオン強度の差があるペプチド、または RP/HC-11P、RP/RA-9P、RP/nonRP-14P モデルに含まれるペプチドの同定を試みた。19 のペプチドが同定され、そのほとんどは凝固に関連する蛋白質由来のペプチドであった。

( 4 ) RP/nonRP-14P モデルを構成するペプチドのうち、同定された 10 個のペプチドから任意の 4 個選び、それらを組み合わせることにより 210 個のモデルを構築した。その 210 個のモデルのうち、training set で感度および特異度が 65.0%以上 (AUROC、0.789-0.823) を示したモデルを 57 個見出した。その 57 個のモデルのうち、モデルを検証する cohort である testing set (RP, n=18; HC, n=18; RA, n=21) および testing set に多発血管炎性肉芽腫症 [GPA] (n=7) を加えた cohort で、感度および特異度が 70.0%以上を示す 4 つの RP/nonRP 判別モデル (RP/nonRP-4P-2、-10、-11、-38 モデル) を見出した (AUROC、0.779-0.815)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsutiya A., Arito M., Tagashira T., Sato M., Omoteyama K., Sato T., Suematsu N., Kurokawa MS., and Kato T.	4. 巻 549
2. 論文標題 Layilin promotes mitochondrial fission by cyclin-dependent kinase 1 and dynamin-related protein 1 activation in HEK293T cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 143-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.02.091.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Omoteyama K., Sato T., Sato M., Tsutiya A., Arito M., Suematsu N., Kurokawa M., and Kato T.	4. 巻 6
2. 論文標題 Identification of novel substrates for a disintegrin and metalloprotease 17 by specific labeling surface proteins.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e05804 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2020.e05804.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ushimaru S. Arito M., Tsutiya A., Sato T., Omoteyama K., Sato M., Suematsu N., Kurokawa MS., Kamiyo-Ikemori A., Shibagaki Y., and Kato T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Roles of Layilin in Regulation of Low-Density Lipoprotein Receptor in Malignant Glioma Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. St. Marianna Univ.	6. 最初と最後の頁 53-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kaji T., Arito M., Tsutiya A., Sase T., Onodera H., Sato T., Omoteyama K., Sato M., Suematsu N., Kurokawa MS., Tanaka Y., and Kato T.	4. 巻 1719
2. 論文標題 Layilin enhances the invasive ability of malignant glioma cells via SNAI1 signaling.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Res	6. 最初と最後の頁 140-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2019.05.034.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 黒川真奈絵、佐藤利行、佐藤政秋、土屋貴大、表山和樹、有戸光美、末松直也、加藤智啓
2. 発表標題 再発性多発軟骨炎のバイオマーカー候補となる血清ペプチドの検出
3. 学会等名 第71回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤利行、佐藤政秋、表山和樹、土屋貴大、有戸光美、末松直也、加藤智啓、黒川真奈絵
2. 発表標題 再発性多発軟骨炎における血清ペプチドプロファイルの解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤利行、佐藤政秋、高桑由希子、有戸光美、大岡正道、末松直也、川畑仁人、加藤智啓、黒川真奈絵
2. 発表標題 再発性多発軟骨炎における血清ペプチドの網羅的解析
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会総会・学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 有戸光美、佐藤利行、表山和樹、佐藤政秋、黒川真奈絵、加藤智啓
2. 発表標題 滑膜線維芽細胞におけるライリンの役割
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 表山和樹、佐藤利行、佐藤政秋、土屋貴大、有戸光美、末松直也、黒川真奈絵、加藤智啓
2. 発表標題 A Disintegrin And Metalloprotease 17 (ADAM17) の新規基質の探索
3. 学会等名 第15回日本臨床プロテオゲノミクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木琳子、永井宏平、西端智也、佐藤政秋、佐藤利行、黒川真奈絵、加藤 智啓
2. 発表標題 ANCA 関連血管炎患者における自己抗原 Myeloperoxidase の翻訳後修飾の解析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会・第70回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤政秋、佐藤利行、土屋貴大、表山和樹、有戸光美、末松直也、加藤智啓、黒川真奈絵
2. 発表標題 顕微鏡的多発血管炎の新規血清ペプチドバイオマーカー候補AC13のMALDI-TOF/MSによる定量
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawaguchi T., Arito M., Tsutiya A., Suematsu N., Sato T., Omoteyama K., Sato M., Kurokawa MS., Kato T., Kawaguchi K., Kevin C. Pringle, Kitagawa H.
2. 発表標題 IDENTIFYING OF DIAGNOSTIC BIOMARKERS BY PEPTIDOMICS USING AMNIOTIC FLUID OF FETAL LAMB DIAPHRAGMATIC HERNIA MODEL
3. 学会等名 The 32nd International Symposium on Pediatric Surgical Research (ISPSR2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------