

機関番号：14101
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590771
 研究課題名（和文） 比較定量ペプチドミクスによる肝疾患病態責任分子の解析と新規バイオマーカーの探索
 研究課題名（英文） Research for new marker and target molecule in liver disease by peptidomics approach.
 研究代表者
 白木 克哉 （ KATSUYA SHIRAKI ）
 三重大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号：90263003

研究成果の概要（和文）：

血清サンプルを用い解析し、肝疾患の進行を規定する有用なペプチド断片を多数同定した。その中で、特に、肝疾患進行のマーカーとし ITIH4 のペプチド断片を同定した。この分子には、糖鎖修飾もみられており、このペプチドをマーカーとして利用することで臨床的に肝硬変や肝細胞癌の診断することに有用であった。予後推定や治療法選択におも応用範囲が拡大できることが期待される。また、肝細胞癌の治療に対する分子標的になると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We have found many fragments of peptides that determine the severity of liver diseases. Among them, we identified and focused on the fragment of ITIH4. This peptide has specific sugar chains that change according to the liver disease status. This is very useful for the diagnosis of liver cirrhosis and hepatoma and the therapeutic strategy. This molecule would be the promising molecular target.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：消化器内科学・肝臓病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝疾患、バイオマーカー、ペプチド、糖鎖

1. 研究開始当初の背景

国内外のゲノム情報基盤の整備とトランスクリプトーム解析の確立によって、ヒントになる疾患組織・細胞内での遺伝子発現の挙動がみられるようになったこと、タンパク質のMS技術が進んだため適切な分画を行えばタンパク質のディファレンシャル解析が出来るようになりつつあること、分離ができればMSによる同定が精度よく行えることから、適切な病態モデルと発症時間にそった疾患サンプルがあれば「疾患パスウェ

イ」の解析が出来る状況が可能になった。

そこで、われわれは、最新のプロテオミクス解析を用いデファレンシャルプロテオーム解析システムを構築し、時間軸にける肝疾患における「疾患パスウェイ」を解析してきた。具体的には、2次元電気泳動(NEpHGE と EttanDIGE)、プロテインチップを用いた Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI or SELDI-TOF MS)、また 2次元 HPLC と Matrix Assisted Laser

Desorption/ Ionization(MALDI)を組み合わせた 2D- μ HPLC-MALDI-TOF-MS 法の 3 種類の方法を開発応用している(特許出願中)。この方法では低分子量から高分子量までのペプチド・タンパクを包括的かつ網羅的に解析できる。また、経時的、疾患的にデフレンシャルプロテオームによる解析が可能であり、差異の解析技術も確立させている。しかしながら、この方法での解析は、まだこれからというのが現状である。

2. 研究の目的

近年、病態プロテオミクスにおける血中ペプチドの重要性が明らかになってきている。特に癌の局所環境においては、数々のプロテアーゼによって特に細胞内や細胞外のタンパクを分解し、低分子量のタンパクを多数分泌や産生をしており、いわゆるペプチドームの産生源となっている。また、それぞれのペプチドは疾患特異的に切断されており、また糖鎖やリン酸化などのタンパク修飾なども特異的にみられる。これらのペプチドームの発現解析とは、これまでのバイオマーカーより、より鋭敏で特異性が高いと考えられている。一方、膵癌の病態進行による個人による異なる進行度(時間軸)をモニターできる有用な血液バイオマーカーはない。

一方、膵癌による死亡者数は年々増加しており、有用な腫瘍マーカーや画像診断もないため、早期発見が困難であり、発見時に進行していることが多い。さらに膵癌は化学療法や放射線療法の発達した現在においてもその予後は極めて悪い癌の一つであり、1年生存率は 50%を下まわっているのが現状である。このような現状の上では、膵癌の予後改善には、早期発見をする方策を開発するしかないと考えられる。そこで本研究ではこの血液中ペプチドミクス解析により新たな膵癌発症の病態を解析し病態責任分子を明らかにし、最終的に病態進行や膵癌発症の早期バイオマーカーを探索して臨床応用することを目的とする。

3. 研究の方法

現在まで当科に保存されている、正常者、慢性肝炎、肝硬変、肝がんの患者血清からタンパクを抽出する。我々は、2D- μ HPLC-MALDI-TOF-MS(質量分析計)を用いたハイスループットの検出系をすでに確立しており、この系を用いて解析する。病期が進展するのに伴い、特に低分子のペプチドの発現をプロファイリングする。特に癌化との関連ペプチドに注目する。B 型肝炎および C 型肝炎別にも検討する。具体的には以下の方法を用いる。

<2D- μ HPLC-MALDI-TOF-MS>

血清サンプルを前処置後 SCX および C18 カラムを用いた 2D- μ HPLC により 6x190=1140 の分

面に自動装置によってわけける(AccuSpot)。それぞれの分画を質量分析計(AXIMA CFR plus:reflectron mode)にかけ、結果をデフレンシャル解析ツールにより解析した。その後、再調整することなく MSⁿ 測定により、タンパク・ペプチドの構造決定をした。これらの一連の過程はすべて自動化で施行している。(自動多次元タンパク質 MS プロファイリングシステムを筑波大学と共同で開発した)。本法によって、包括的かつ網羅的なプロテオーム解析が可能になるが、検体処理速度は 1 週間に 2 検体が可能である。本研究では特に質量 5000 以下のペプチドを中心に網羅的に解析する。

<ペプチドの同定>

質量分析計によるタンパクの同定は、ペプチドマスクフィンガープリント法(PMF)とアミノ酸内部配列解析を施行する。具体的には、PMF はタンパク質を特異的切断酵素で処理し、データベースから予想されるペプチドの質量と実測値を比較し、既存のデータベースより同定する。また、アミノ酸内部配列解析は、ペプチド断片をさらにペプチド結合の位置で分解し、アミノ酸内部配列解析を施行する。これにより未知のタンパク質も構造を明らかにする。

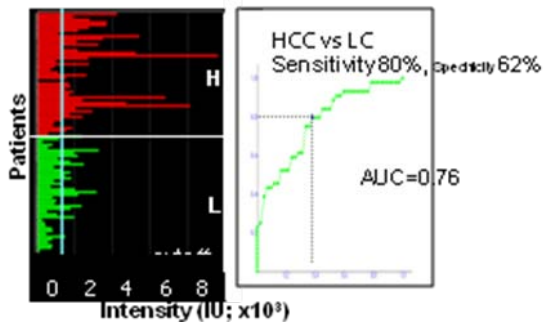
その後、翻訳後の修飾の有無について検討する。具体的には MS 法と HPLC-MS 法を用いる。これにより、リン酸化、脂肪酸付加、糖鎖付加、プロセッシングなどの一般的な翻訳修飾の検出・解析をする。また、MS/MS 法を用い修飾の種類だけでなく、その位置まで決定する。さらに、HPLC-MS 法により酵素消化ペプチドを分離して、分析することにより、修飾部位の同定や、修飾状態の詳細を明らかにする。

4. 研究成果

(1) ペプチドの同定

上記記載方法にて、肝細胞癌、肝硬変、慢性肝炎の血清サンプルを前処置後 2D- μ HPLC により 1140 に分画し、それぞれの分画を MALDI プレートにスポット後、質量分析による計測を行い、その結果をデフレンシャル解析ツールにより解析した。その後、再調整することなく MSⁿ 測定により、タンパク・ペプチドの構造決定をした。これらの一連の過程を自動化した 2D- μ HPLC-MALDI-TOF-MS 法によって行った。この方法を用いて、正常者、慢性肝炎、肝硬変と肝癌患者血清で増加し、診断に有用なペプチド断片多数同定した。一例を示すと、特に図に示すペプチド NR では肝細胞癌と慢性肝炎や肝硬変との鑑別が高い AUC にて可能であった(図 1)。

図 1



(2) ペプチド ITIH4 の解析

また、その他のペプチド本ペプチドは ITIH4 の一部であり、糖鎖結合部位を持つことを解析した(図 2)。本ペプチドを定量化する系を確立し、検討したところ、正常、慢性肝炎、肝細胞癌と明らかに高濃度であった(図 3)。さらに免疫組織染色により肝細胞癌組織に ITIH4 が発現することも確認した。このペプチドをマーカーとして利用することで ALT 正常の慢性肝炎を 92% (ROC=0.9) の感度で検出することが可能であった。また、肝細胞癌と肝硬変は 84% (ROC=0.7) の感度で分離可能であった。また、上記マーカーと組み合わせると既存のマーカーである、AFP や PIVKAI I より高い感度を持って肝細胞癌の診断が可能であった。また、AFP や PIVKAI I 陰性例において高い陽性率を示した(図 4)。

図 2

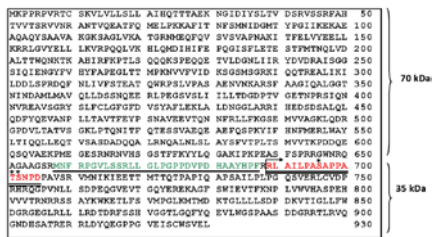


図 3

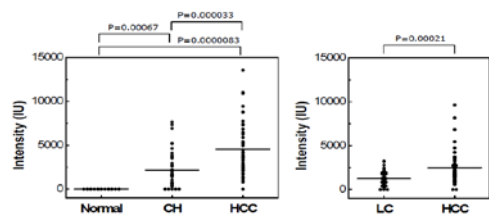
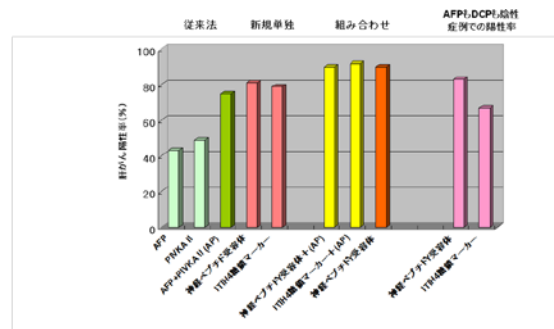


図 4



(3) ITIH4 の糖鎖の解析

さらに、このペプチド断片は二次元電気泳動のパターンから、10 の variants に分離され、多段階質量分析により、糖鎖修飾の差異に起因することが明らかとなった。HCC113 例、LC100 例、慢性肝炎 102 例における検討で、これら 10 の peptide variants はそれぞれ異なる動態を示し、中でも variant9、10 は HCC への進展とともに特異的に発現レベルが上昇していた。この 2 つの peptide variants を組み合わせることで、CH と HCC は 85% (ROC=0.89)、LC と HCC は 84% (ROC=0.77) の感度で分離可能であり、特に stage I の初期の HCC では vs. CH、vs. LC とともに 100% の感度で分離可能であった。

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 18 件)

- ① Suzuki M, Sugimoto K, Tanaka J, Tameda M, Inagaki Y, Kusagawa S, Nojiri K, Beppu T, Yoneda K, Yamamoto N, Ito M, Yoneda M, Uchida K, Takase K, Shiraki K. Up-regulation of Glypican-3 in Human Hepatocellular Carcinoma. *Anticancer Res* in press. 査読有
- ② Tanaka J, Sugimoto K, Shiraki K, Tameda M, Kusagawa S, Nojiri K, Beppu T, Yoneda K, Yamamoto N, Uchida K, Kojima T, Takei Y. Functional cell surface expression of Toll-like receptor 9 promotes cell proliferation and survival in human hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol*. 37, 805-14, 2010. 査読有
- ③ Beppu T, Gil-Bernabe P, Boveda-Ruiz D, D'Alessandro-Gabazza C, Matsuda Y, Toda M, Miyake Y, Shiraki K, Murata M, Murata T, Yano Y, Morser J, Gabazza EC, Takei Y. High incidence of tumors in diabetic

- thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and apolipoprotein E double deficient mice. *J Thromb Haemost.* in press. 査読有
- ④ Beppu T, Sugimoto K, Shiraki K, Tameda M, Kusagawa S, Nojiri K, Tanaka J, Yamamoto N, Takei Y, Takaki H, Uraki J, Nakatsuka A, Yamakado K, Takeda K. Clinical significance of tumor markers in detection of recurrent hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation. *Int J Mol Med.* 26, 425-33, 2010. 査読有
- ⑤ Ooi K, Sugimoto K, Shiraki K, Yamamoto N, Tameda M, Beppu T, Tanaka J, Nojiri K, Kusagawa S, Takei Y, Masuda C, Nobori T. Classification of hypocholesterolemia lipid patterns using Chol/Trig Combination System. *Int J Mol Med.* 25, 601-6, 2010. 査読有
- ⑥ Kusagawa S, Sugimoto K, Nojiri K, Tameda M, Shiraki K, Takei Y, Takase K. Unique endoscopic images in a patient with Henoch-Schönlein purpura. *Intern Med.* 49, 509, 2010. 査読有
- ⑦ Yamakado K, Nakatsuka A, Takaki H, Sakurai H, Isaji S, Yamamoto N, Shiraki K, Takeda K. Subphrenic versus nonsubphrenic hepatocellular carcinoma: combined therapy with chemoembolization and radiofrequency ablation. *AJR Am J Roentgenol.* 194, 530-5, 2010. 査読有
- ⑧ Mizuno S, Yokoi H, Shiraki K, Usui M, Sakurai H, Tabata M, Sugimoto K, Takei Y, Yamakado K, Takeda K, Uemoto S, Isaji S. Prospective study on the outcome of atients with hepatocellular carcinoma registered for living donor liver ransplantation: how long can they wait? *Transplantation.* 89, 650-4, 2010. 査読有
- ⑨ Wang Y, Ito S, Uchida K, et al. Laser microdissection-based analysis of cytokine balance in the kidneys of patients with lupus nephritis. *Clin Exp Immunol.*, 159, 1-10, 2010. 査読有
- ⑩ Toyoda H, Kumada T, Kamiyama N, Shiraki K, Takase K, Yamaguchi T, Hachiya H. -mode ultrasound with algorithm based on statistical analysis of signals: evaluation of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *AJR Am J Roentgenol.* 193, 1037-43, 2009. 査読有
- ⑪ Takaki H, Yamakado K, Uraki J, Nakatsuka A, Fuke H, Yamamoto N, Shiraki K, Yamada T, Takeda K. Radiofrequency ablation combined with chemoembolization for the treatment of hepatocellular carcinomas larger than 5 cm. *J Vasc Interv Radiol.* 20, 217-24, 2009. 査読有
- ⑫ Kojima T, Shimazui T, Uchida K, et al. Decreased expression of CXXC4 promotes a malignant phenotype in renal cell carcinoma by activating Wnt signaling. *Oncogene*, 28, 297-305, 2009. 査読有
- ⑬ Shimazui T, Kojima T, Uchida K, et al. Low expression of microphthalmia- associated transcription factor, a potential molecular target for interferon-alpha susceptibility, is associated with metastasis in renal cell carcinoma. *Cancer Sci.*, 100, 1714-1718, 2009. 査読有
- ⑭ Shiraki K, Sakurai H. Sclerosing peritonitis. *N Engl J Med.* 359, 293, 2008. 査読有
- ⑮ Yoneda K, Sugimoto K, Shiraki K, Tanaka J, Beppu T, Fuke H, Yamamoto N, Masuya M, Horie R, Uchida K, Takei Y. Dual topology of functional Toll-like receptor 3 expression in human hepatocellular carcinoma: differential signaling mechanisms of TLR3-induced NF-kappaB activation and apoptosis. *Int J Oncol.* 33, 929-36, 2008. 査読有
- ⑯ Yamamoto N, Murata K, Yoneda K, Fuke H, Yamaguchi Y, Ito K, Sugimoto K, Shiraki K, Yamanaka K, Mizutani H, Takei Y. Protective role of interleukin-18 against Fas-mediated liver injury. *Int J Mol Med.* 22, 43-8, 2008. 査読有
- ⑰ Yamakado K, Nakatsuka A, Takaki H, Yokoi H, Usui M, Sakurai H, Isaji S, Shiraki K, Fuke H, Uemoto S, Takeda K. Early-stage hepatocellular carcinoma: radiofrequency ablation combined with chemoembolization versus hepatectomy. *Radiology.* 247, 260-6, 2008. 査読有
- ⑱ Fuke H, Sugimoto K, Shiraki K, Tanaka J, Beppu T, Yoneda K, Yamamoto N, Ito K, Takaki H, Nakatsuka A, Yamakado K, Takeda K, Takei Y. Predictive factors for distant recurrence of HCV-related hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation combined with chemoembolization. *Aliment Pharmacol Ther.* 27, 1253-60, 2008. 査読有
- [学会発表] (計 13)
- ① 白木克哉、杉本和史、竹井謙之、肝細胞がんに対する新規バイオマーカーの網羅的探索、第 52 回日本消化器病学会大会、平成 22 年 10 月 13 日、横浜
- ② 山本憲彦、白木克哉、竹井謙之、自己免疫関連肝疾患の生体肝移植後の再発についての検討、第 52 回日本消化器病学会大会、平成 22 年 10 月 13 日、横浜
- ③ 白木克哉、杉本和史、竹井謙之、肝細胞癌に対する新規バイオマーカーの網羅

的探索、第14回日本肝臓学会大会、平成22年10月13日、横浜

- ④ 三重大学医学部附属病院消化器肝臓内科：山本憲彦、白木克哉、竹井謙之、自己免疫関連肝疾患の生体肝移植後の再発についての検討、第14回日本肝臓学会大会、平成22年10月13日、横浜
- ⑤ 杉本和史、山本憲彦、白木克哉、竹井謙之、堀江亮、内田雅子、鈴木秀昭、筑、内田和彦、高密度オリゴヌクレオチドアレイによる肝癌特異遺伝子の探索、第45回日本肝臓学会総会、平成21年6月4日、神戸
- ⑥ 白木克哉、杉本和史、竹井謙之、高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いた肝癌特異遺伝子の解析、第51回日本消化器病学会大会、平成21年10月14日、京都
- ⑦ 別府徹也、白木克哉、竹井謙之、肝癌再発の早期診断における腫瘍マーカーの意義、第51回日本消化器病学会大会、平成21年10月14日、京都
- ⑧ 杉本和史、白木克哉、竹井謙之、HCV遺伝子変異からみた生体肝移植後のC型肝炎に対するIFN治療の検討、第51回日本消化器病学会大会、平成21年10月14日、京都
- ⑨ 白木克哉、杉本和史、竹井謙之、高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いた肝癌特異遺伝子の解析、第13回日本肝臓学会大会、平成21年10月14日、京都
- ⑩ 別府徹也、白木克哉、竹井謙之、肝癌再発の早期診断における腫瘍マーカーの意義、第13回日本肝臓学会大会、平成21年10月14日、京都
- ⑪ 杉本和史、白木克哉、竹井謙之、HCV遺伝子変異からみた生体肝移植後のC型肝炎に対するIFN治療の検討、第13回日本肝臓学会大会、平成21年10月14日、京都
- ⑫ 杉本和史、山本憲彦、白木克哉、竹井謙之、目野浩二、永島廉平、内田和彦、肝疾患特異ペプチドの糖鎖プロファイリングによる新規バイオマーカーの探索、第45回日本肝臓学会総会、平成21年6月4日、神戸
- ⑬ 米田健太郎、白木克哉、竹井謙之、LAPファミリーを標的とした肝細胞癌のアポトーシス誘導、第50回日本消化器病学会大会、平成20年10月1日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白木 克哉 (KATSUYA SHIRAKI)
三重大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90263003

(2) 研究分担者

杉本 和史 (KAZUSHI SUGIMOTO)
三重大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60378370

内田 和彦 (KAZUHIKO UCHIDA)
筑波大学・人間総合科学研究科・准教授
研究者番号：90211078

(3) 連携研究者

()

研究者番号：