

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 16 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590839

研究課題名（和文）肝疾患特異ペプチドの糖鎖プロファイリングによる病態標的分子の探索

研究課題名（英文） Identification of liver disease-specific peptide by sugar chain profiling.

研究代表者

杉本 和史（SUGIMOTO KAZUSHI）

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60378370

研究成果の概要（和文）：

2D- μ HPLC-MALDI-TOF-MS 法により、血清新規肝細胞癌バイオマーカーとして inter- α -trypsin inhibitor heavy chain 4 (ITIH4) のペプチド断片を同定した。また多検体を解析可能な immuno-MS を開発し、肝硬変、肝細胞がんのマーカーとしての有用性を確認した。さらにこのマーカーは非アルコール性脂肪性肝疾患の検出にも有用であった。この 35 kD の断片は糖鎖修飾により 10 の isoform に分離され、とくに isoform9, 10 は初期の肝細胞癌での発現が上昇する有用なマーカーであり、発癌との関連も示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We identified inter- α -trypsin inhibitor heavy chain 4 (ITIH4) peptide as a novel serum biomarker for liver disease using 2D- μ HPLC-MALDI-TOF-MS. Also we developed immuno-MS system to deal with many samples. Using this system, we determined the utility of this biomarker peptide for detecting liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). Moreover, this peptide was useful for detecting non-alcoholic fatty liver diseases. And 35kD protein fragment including this peptide was divided into ten isoforms by the sugar chain modification, and serum isoform 9 and 10 levels were elevated in early HCC patients. These isoforms are useful biomarker for HCC and may be related to hepatic carcinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 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：肝臓学、質量分析、糖鎖

1. 研究開始当初の背景

現在、本邦における肝細胞癌は癌死亡者数の第 3 位を占める。大部分の症例において、背景にウイルス性肝炎などの慢性肝疾患を

有し、緩如に進行し最終的に肝細胞癌が発症する。腫瘍マーカーとして AFP や PIVKAIII が使用されているが、上昇しない症例も多い。また肝疾患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。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、また糖鎖による修飾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。また、近年、糖鎖の異常が癌、糖尿病、肺気腫、ウイルス感染症、脳、筋神経疾患などの多くの病気の成因にかかわることが明らかになり、糖鎖医薬や糖鎖ワクチンなど糖鎖研究の医学への貢献が期待されている。最近の解析技術の進歩により、液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS)と生化学的方法やプロテオミクスの技術を組み合わせることによって血液や組織中の微量糖タンパク質や糖タンパク混合物からでも多くの糖鎖構造情報を入手することが可能となってきた。われわれは、最新のプロテオミクス解析を用いたデファレンシャルプロテオーム解析システムを構築し、肝疾患の時間軸における「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。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、疾患的にデファ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。この技術を用いて現在までにトランスクリプトームによる網羅的解析情報と、質量分析(以下MSと略)による組織および血液中タンパク質発現プロファイル解析によって肝炎から肝がんにいる疾患惹起タンパク質を同定してきた。つまり、このデファレンシャルプロテオーム解析を応用し、C型肝炎から肝硬変および肝がんにいるまでの血清および組織のタンパク質プロファイリングを解析し、その疾患パスウェイでの意義を研究し成果を得てきた。

2. 研究の目的

本研究では、「動的に変化する病態解析から絞り込まれたペプチド因子」を見出し、その構造決定と糖鎖構造の変異の解析を行い、肝疾患

の進展のパスウェイを時間軸にもなって動的に解析することが最初の目的である。さらにペプチドの生理活性を解析し疾患の病態解明に役立てることが可能になる。この研究により、疾患の早期診断や治療のための病態特異的ペプチドを見だし、最終的に個別化(テイラーメイド)医療の確立を目指す

3. 研究の方法

(ペプチドの同定)

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した。特に癌化との関連ペプチドに注目した。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の分画に自動装置によってわけ(AccuSpot)、それぞれの分画を質量分析計(AXIMA CFR plus:reflectron mode)にかけ、結果をデフア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行った。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した。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した。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した。これらの解析によりまず inter- α -trypsin inhibitor heavy chain 4 (ITI4)の fragment が肝疾患の進行と共に血中および肝組織中で増加していることを解明した。

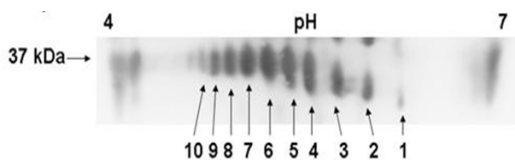
(簡易測定法としてのImmunoMSの開発)

ペプチドの簡易測定法として免疫沈降MSを確立した。同定したペプチドに対する抗体を作成し、その抗体を用いて血清を免疫沈降した。免疫沈降したものをMSにて解析し、鋭敏で特異的なペプチドピークを得た。この方法を用いることにより、血清をHPLCで分画することなく、直接MSにて解析でき、多数例の解析が短時間に施行可能となった。まず、上記のITI4のImmunoMSの開発を行い、患者血液、肝組織を利用して多検体での評価を行いその実用性を検討した。

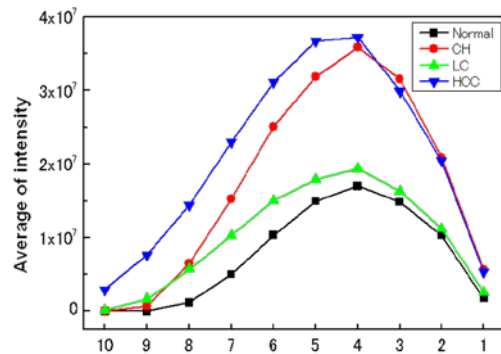
4. 研究成果

我々はこれまでの2D- μ HPLC-MALDI-TOF-MS法により、新規肝細胞癌バイオマーカーとして inter- α -trypsin inhibitor heavy chain 4 (ITI4) のペプチド断片を同定した。ITI4は血清カリクレインにより35 kDと85 kDの蛋白に分解されるが、今回同定したペプチドは35 kD蛋白のN端に存在することが判明した。また、この蛋白の断片は糖鎖修飾の差異により10のvariantに分離され(図1)、この中でもvariant9,10は発現量は低いものの肝細胞癌特異的に発現しており(図2)、特に早期の肝細胞癌の検出に有用であることを確認した。このvariant9,10の組み合わせにより stage1,2の肝癌と慢性肝炎を感度85.7%、特異度95.5% (ROC=0.903) で分離可能であり、肝硬変とstage1,2の肝癌は感度71.4%、特異度80.3% (ROC=0.77) で分離可能であった。また、この35 kDa蛋白に対する抗体を作成し、抗体との結合ビーズを作成、これを検体(血清)と反応させ、抗原-ビーズ結合体をプレート上に固相後MALD-TOF-MSにより目的ペプチド断片を検出するハイスルーputアッセイであるimmuno MSシステムを構築し、多検体がより短時間で測定可能となった。このシステムを用いてこれまでに健常人と慢性肝炎は感度85%、特異度100% (ROC=0.89) で分離可能であり、肝硬変と肝細胞癌は感度84%、特異度62% (ROC=0.70) で分離可能であった。また、このimmuno MSシステムを使用Cut off値を調節することにより、ALT正常の慢性肝炎でも感度92%、特異度73% (ROC=0.90) で健常人より分離可能であった。そのバイオマーカーとしての有用性が確認された。さらに、この35 kD蛋白は非アルコール性脂肪性肝疾患の血中でも組織学的に初期の段階から健常人に比して有意に上昇が認められ、肝細胞癌のみならず肝疾患全般での有用なマーカーとなりえることが示唆された。

(図1)



(図2)



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 Sugimoto K, Shiraki K. Different aspects of CD4 T cells that lead to viral clearance or persistence of HCV infection. *Hepatology International*. 6, 350-55, 2012. (査読あり)
- ② Sugimoto K, Takei Y. Clinicopathological features of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res*. 41, 911-20, 2011. (査読あり)
- ③ Sugimoto K, Ito T, Yamamoto N, Shiraki K. Seven cases of autoimmune hepatitis that developed after drug-induced liver injury. *Hepatology*. 54, 1892-93, 2011. (査読あり)
- ④ Nakamura H, Kawagishi H, Watanabe A, Sugimoto K, Maruyama M, Sugimoto M. Cooperative role of the RNA-binding proteins Hzf and HuR in p53 activation. *Mol Cell Biol*. 31, 1997-2009, 2011 (査読あり)
- ⑤ Nojiri K, Sugimoto K, Shiraki K. Ascites caused by arterioportal fistula 15 years after liver biopsy. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 9, e31-2, 2011. (査読あり)
- ⑥ Takaki H, Yamakado K, Sakurai H, Nakatsuka A, Shiraki K, Isaji S, Takeda K. Radiofrequency ablation combined with chemoembolization: treatment of recurrent hepatocellular carcinomas after hepatectomy. *AJR Am J Roentgenol*. 197, 488-94, 2011. (査読あり)
- ⑦ 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. (査読あり)
- 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 patients with hepatocellular carcinoma registered for

living donor liver transplantation: how long can they wait? *Transplantation*. 89, 650-54, 2010. (査読あり)

- ⑨ Nakanishi S, Shiraki K, Sugimoto K, Tameda M, Yamamoto K, Masuda C, Iwata M, Koyama M. Clinical significance of ultrasonographic imaging of the common hepatic arterial lymph node (No. 8 LN) in chronic liver diseases. *Mol Med Report*. 3, 679-83, 2010. (査読あり)
- ⑩ 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* 30, 5055-61. 2010. (査読あり)
- ⑪ 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. (査読あり)
- ⑫ 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(3):425-33, 2010. (査読あり)
- ⑬ Kawagishi H, Nakamura H, Maruyama M, Mizutani S, Sugimoto K, Takagi M, Sugimoto M. ARF suppresses tumor angiogenesis through translational control of VEGFA mRNA. *Cancer Res*. 70, 4749-58. , 2010. (査読あり)
- ⑭ 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. (査読あり)
- ⑮ 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. Takaki H, Yamakado K, Uraki J, *J Vasc Interv Radiol*. 20, 217-24, 2009. (査読あり)

[学会発表] (計 14 件)

- ① 杉本和史、白木克哉、竹井謙之、生体肝移植後 C 型肝炎に対する IFN 治療予後推測における HCV 遺伝子変異、IL28B

遺伝子多型測定の有用性の検討。第 15 回日本肝臓学会大会、平成 23 年 10 月 21 日、福岡

- ② 杉本和史、白木克哉、竹井謙之、Pooled Sample を用いた血清中の NASH バイオマーカーペプチドの iTRAQ による同定。第 47 回日本肝臓学会総会、平成 23 年 6 月 2 日、東京
- ③ 杉本和史、白木克哉、竹井謙之、白井正信、伊佐地秀司、HCV 遺伝子変異、IL28B 上流 SNP 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 47 回日本肝臓学会総会、平成 23 年 6 月 2 日、東京
- ④ Kazushi Sugimoto, Katsuya Shiraki, Yoshiyuki Takei, Glycoform variants of p35 protein as a molecular diagnostic biomarker for hepatocellular carcinoma, 2010 年 11 月 1 日 AASLD, Boston
- ⑤ 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
- ⑥ 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
- ⑦ 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
- ⑧ 杉本和史、白木克哉、竹井謙之、HCV 関連肝疾患における新規線維化マーカー YKL-40 の有用性の検討、平成 21 年 12 月 4 日、米子
- ⑨ 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
- ⑩ 白井正信、杉本和史、伊佐地秀司、肝移植直後 B 型肝炎再発予防における HB ワクチン継続接種の意義、第 13 回日本肝臓学会大会、平成 21 年 10 月 14 日、京都
- ⑪ 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
- ⑫ 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

- ⑬ 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
- ⑭ 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

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