

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：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790531

研究課題名（和文） プロテオーム解析による NASH（非アルコール性脂肪性肝炎）疾患マーカー探索

研究課題名（英文） An Exploratory Approach for Non-Alcoholic SteatoHepatitis Biomarker Identification with Proteome and Transcriptome Analysis.

研究代表者 西村 基 (NISHIMURA MOTOI)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80400969

研究成果の概要（和文）：脂肪肝を高頻度で伴う肝疾患であり、NASH（非アルコール性脂肪性肝炎）との類似性について注目されているに C 型肝炎について新規マーカーの報告を査読付き英文誌に発表した（PLoS One. 2011 Feb 25;6(2):e17309.）。また、本研究より得られた NASH 血液マーカー候補については国内出願のみならず、最終年度までに国際出願まで至った。この NASH 血液マーカー候補については最終年度の早い段階で論文を作成し投稿した。

研究成果の概要（英文）：I released a paper reporting novel lipid biomarker of Hepatitis C, a disease highlighted because of its similarity with Non-Alcoholic SteatoHepatitis (NASH) from the viewpoint of fatty liver diseases（PLoS One. 2011 Feb 25;6(2):e17309.）。And I have had a patent application on a novel NASH blood biomarker not only in Japan, but also internationally. I have also submitted a paper describing this novel NASH marker.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床検査医学

1. 研究開始当初の背景

メタボリック症候群の肝臓における表現形ともいわれる非アルコール性脂肪肝(NAFLD; non-alcoholic fatty liver disease)患者数が急増している。NAFLDの中でもNASH(非アルコール性脂肪性肝炎; non-alcoholic steatohepatitis)と呼ばれる一群は放置されると肝硬変にまで進展しうる病態であり、NAFLDの中から早期にかつ正確にNASHを診断することはきわめて

重要である。しかし、現時点ではNASHの確定診断は侵襲を伴う肝生検に頼るしかなく、生化学的に診断可能なマーカーの開発が急務である。

申請者の所属する研究室は抗p53抗体を癌マーカーとして実用化したように(Cancer. 2003;97(3):682-9.医学生物学研究所より発売;医薬品承認番号:21900AMZ00069000)、疾患マーカーの探索と評価・実用化を行ってきた。特に近年においては、

SELDI-TOF/MS(プロテインチップシステム)によるアルコール性肝障害マーカーの同定(Proteomics.2004;4(4):1187-94)・新しい膵癌マーカーの発見(Oncogene.2008;27(20):2810-22.)や2D-DIGEによる食道癌と正常組織を鑑別できるタンパク質の発見の成功(Proteomics.2006;6(3):1011-8)・肝癌と正常組織を鑑別できるタンパク質の発見(Hepatology.2008;48(2):519-30)に見られるように、探索のためプロテオーム解析技術・機器の整備に努めてきており、2次元電気泳動・2D-DIGE(2-Dimensional Fluorescence Difference Gel Electrophoresis)といったゲルベースのディフュージョン解析からSELDI-TOF/MS, MALDI-TOF(ブルカー・ダルトニクス社 ClinProt システム)といった質量分析器まで利用できる環境にある。マーカー探索の対象疾患としては研究室を主宰する野村文夫が肝臓学を専門分野とし千葉大学病院消化器内科の外来担当医を兼任していることもあり、NAFLD・NASHを含む肝疾患におけるバイオマーカー探索をメイン・テーマの一つとしている。

また、申請者の所属する研究室は千葉大学病院の全ての臨床検体が集まる検査部門を担当しており関連診療科と連携して臨床情報の確かな検体を採取することができる。当病院の受診者の中には組織診断まで行われたNAFLD・NASH 症例が何症例も含まれ、NASH マーカー候補タンパク質の検証・確立を行うことができる。

これらのような申請者らの所属する研究室の強みを生かし、*in vitro* のNASHモデルよりプロテオーム・トランスクリプトーム解析技術により疾患マーカーを探索・同定し、臨床検体を用いた検証・確立を行うことを着想した。

ところでNAFLD, NASHにおける *vivo* 病態モデルはマウスのようなげっ歯目を用いた実験動物モデルが主に用いられている。ヒト以外の動物種より得られる知見は疾患の理解の上で重要であり示唆に富むものではあるが、例えばげっ歯目のマウスやラットではCETP(CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN) 遺伝子(Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.2003;135:219-229.)やある種のアポたんぱく質の遺伝子をヒト・ゲノムと異なり欠損するなどヒト肝との間に遺伝子レベルからの大きな脂質代謝上の違いがあり、有意義であるとしても実験動物モデルだけに依存してNASH 疾患マーカー探索を行なうのは危険であると考えられる。

他の動物種に目を転じると獣医学の分野では、以前より知られていた脂肪性肝疾患の中

の一部にNAFLD, NASHと同様の組織学的・病理学的性質を示すものがあることが報告されている(WSAVA Standards for clinical and histological diagnosis of canine and feline liver diseases, 2006:130 など)。げっ歯目に近縁のウサギ目に高コレステロール食を負荷するモデルは既に報告されている(J Gastroenterol. 2006;41(10):971-80)が、インスリン抵抗性は伴わない。

乳牛においても脂肪肝は過肥や糖質利用不全を背景として発症し肝障害を引き起こし牛乳生産を大きく低下させるため良く研究されている。乳牛においては濃厚飼料にて肥育の後3~4日給餌を行わないことで肝臓への脂肪蓄積とインスリン抵抗性を誘導できる(J Dairy Sci. 2006;89(8):2999-3005.)ことが知られウシ脂肪肝モデルとして用いられているが、精密なヒト脂肪肝やNAFLDとの比較検討はなされていない。

ヒトにおいてはどうか。ヒトNAFLD・NASHは肝インスリン抵抗性を背景とするとされ、これはメタボリック症候群においても共有する背景である。NAFLDは代謝学的に見ると肝細胞に脂肪が蓄積し肝インスリン抵抗性を来すような糖尿病、ないしはメタボリックシンドロームの状態が母地としてあり、さらに肝にたとえば活性酸素(ROS; reactive oxygen species)による酸化ストレスが加わってNASHを発症するという二つの要素を提唱する2-hit theoryがヒトNAFLD・NASH進展の理論として最有力である。

しかしながら、著者らの知る限り培養細胞において、インスリン抵抗性を伴う脂肪肝のヒト由来の細胞モデルは存在せず、単にヒト培養細胞を用いた *in vitro* 病態モデルが存在しないと言うだけでなく、NAFLD, NASH病態解析とそのモデルにおける種差の問題も依然として未解決のままである。

申請者の所属する研究室は検査部門を担当しており、患者より研究目的使用の同意を得て採取している検体にはNAFLD/NASH症例が何症例も含まれている。この利点を生かし、バイオマーカー研究の上で大きな問題である疾患マーカー候補タンパク質の検証・確立を行うことができる。抗p53抗体の例に見るように、新規臨床検査として確立することに当研究室は実績がある。

本邦においても肥満・インスリン抵抗性を背景とするNASH罹患者は約60万人程度存在すると推定されている。NASHが不可逆的な状態である肝硬変に至る事を予防するには、早期において良性の単純な脂肪肝と鑑別し治療を開始することが重要であるが、その確定診断は現在では入院を要する侵襲的検査である肝生検を行わない限り困難である。

NASH マーカーが実用化されれば、この困難を排除し肝疾患患者の減少に寄与するものであると予想される。

2. 研究の目的

本研究ではプロテオーム・トランスクリプトーム解析技術を駆使して、モデル系（筆者らが確立したNASH培養細胞系）および実際の臨床検体を対象としてNASHの新規疾患マーカーを開発することを目的としている。

3. 研究の方法

背景で述べた *in vitro* 疾患モデルの不在・種差の問題を解決すべく、乳牛モデルにおいて過栄養状態にての肥育とその緩和が行われる事をヒントに申請者らは *in vitro* 実験系としてヒト Hepatoma 由来細胞株である HepG2 の培養条件を工夫し、インスリン抵抗性を伴った脂肪蓄積を誘導できるか検討を行い、インスリン抵抗性を伴った脂肪蓄積を誘導することができた。これは 2-hit theory のうち 1st hit の要素に該当する。本培養系が NAFLD, NASH に類似した特性を示すのか、さらに検討したところでは 2nd hit の要素である ROS・酸化ストレスも誘導されている事が判明し、NASH モデルとなり得ることも示された。本研究においては、これら新規 NASH モデル細胞培養系を用いて種差を縮めつつマーカー探索を進める手法を取った。

そして上記モデル細胞培養系よりタンパク質・RNAを抽出し、疾患モデル群とコントロール群のプロテオーム・トランスクリプトーム上の差異を検出する。プロテオーム解析について群述すると、差異があると認められたスポット（ゲルベース）、ピーク（質量分析器）に関しては一つ一つ同定する。世界的にも技術的限界によりゲルベースにせよ質量分析器を用いるにせよ、このようなプロテオーム・ディフレンシャル解析は定性的であり別法による検証は必須であるため、同定されたタンパク質については抗体によりウェスタン・ブロット解析を行い定量的な解析を行う。検証をクリアしたタンパク質はマーカー候補タンパク質として臨床検体を用いてイムノドット・ブロット法やエライザ法により評価を行い NASH 疾患マーカーたり得るか否か明らかにし、たりうるものについては臨床検査としての確立を視野に入れる。

4. 研究成果

NASH（非アルコール性脂肪性肝炎）研究において壁の一つとなっていたのは、研究対象とする試料が得難いヒト由来サンプルであったり、ヒトとは種差の存在する動物由来のサンプルであった点であった。研究代表者の

確立した *in vitro* NASH ヒト培養細胞モデルにより、この点は1. ヒト由来の細胞より試料を得ることができる。遺伝子や代謝経路の種差を乗り越えることができる。2. 培養細胞系のため、安定かつ大量の試料の調整が可能。といった意味で解決することができた。これにより、最終年度までに実施したトランスクリプトーム・プロテオーム解析を用いた疾患マーカー探索・validationのために試料をどんどん投入する事ができたと同時に、貴重なヒト由来試料を用いてピンポイント的な実証を行うことが出来た。具体例を挙げると、ある分子が疾患マーカーたりうるか validation を行う局面では本研究では western blotting など抗体を用いた validation を行っている。抗体の反応条件は抗体ごとに異なり、良い validation のためには何種類もの予備検討が必要となるが、これをヒト由来試料ではなく、*in vitro* 系由来試料で行うことが可能であった。これは患者血中の疾患マーカー探索において特に有用であった。NASH 患者血清、コントロール血清を用いたこのような validation の結果、高い疾患特異性が期待でき、また臨床的有用性についても最大の課題である単純性脂肪肝と NASH との鑑別に有望な結果が得られるような NASH 血中マーカー候補を見出した。これは最終年度までに特許の国内・国際出願を行っている。また、この NASH 血液マーカー候補については最終年度の早い段階で論文を作成して投稿を行っている。

さらに、最終年度までに脂肪肝を高頻度で伴う肝疾患であり、NASH（非アルコール性脂肪性肝炎）との類似性について注目されているに C 型肝炎について新規マーカーの報告を査読付き英文誌に発表している（PLoS One. 2011 Feb 25;6(2):e17309.）。また、本研究より得られた NASH 血液マーカー候補については国内出願のみならず、最終年度には国際出願まで至った。この NASH 血液マーカー候補については最終年度の早い段階で論文を作成した。しかしながら、本研究の新規なところとして、これまでに述べたような利点を示し、マーカー候補の探索に成功した旨臨床検体を用いて報告した内容で査読誌に投稿する物の、本論文が NASH の代謝学的な側面に力点を置き、学界で流行の免疫学的な側面にあまり触れていないため、臨床例での証明に成功しているにもかかわらず、査読者が受け入れることができず受理に至らない。

このように、本研究で探索した NASH 血液マーカー候補は国際出願にまで至っているため、知財面での問題は少ないかと考える。一方、上の段に述べた、このマーカー候補を

報告する論文が未だ受理されていない点については、学界で流行しているもののマーク探索のような臨床有用性のあるプロダクトに結びついてない免疫学的な側面に囚われている査読者にも理解できるような説得力のある文言を工夫し、本研究の革新的な部分を理解してもらうように努め、査読誌に受け入れられるような論文を **rewrite** の上、受理を目指している。

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 3 件)

- ① Nishimura M, Yamamoto H, Yoshida T, Seimiya M, Sawabe Y, et al. (2011) Decreases in the Serum VLDL-TG/Non-VLDL-TG Ratio from Early Stages of Chronic Hepatitis C: Alterations in TG-Rich Lipoprotein Levels. PLoS ONE 6(2): e17309. doi:10.1371/journal.pone.0017309 (査読有)
- ② Umemura H, Togawa A, Sogawa K, Satoh M, Mogushi K, Nishimura M, Matsushita K, Tanaka H, Takizawa H, Kodera Y, Nomura F. Identification of a high molecular weight kininogen fragment as a marker for early gastric cancer by serum proteome analysis. Journal of Gastroenterology Volume 46, Number 5 (2011), 577-585, DOI: 10.1007/s00535-010-0369-3 (査読有)
- ③ Oyama T, Harigaya K, Sasaki N, Okamura Y, Kokubo H, Saga Y, Hozumi K, Suganami A, Tamura Y, Nagase T, Koga H, Nishimura M, Sakamoto R, Sato M, Yoshida N, and Kitagawa M. Mastermind-likel (MamL1)/Mastermind-like 3 (MamL3) are essential for Notch signaling in vivo. doi: 10.1242/dev.062802 December 1, 2011 Development 138, 5235-5246. (査読有)

[学会発表] (計 16 件)

- ① 西村基, 佐藤守, 澤井撰, 小寺義男, 野村文夫 0-254 Apolipoprotein E アイソフォームの血清からのタイピング 第 58 回日本臨床検査医学会学術集会 平成 23

年 11 月 17 日～20 日 岡山コンベンションセンター

- ② 西村基, 佐藤守, 澤井撰, 小寺義男, 野村文夫 0-134 血清からの Apolipoprotein E isoform タイピング 日本臨床検査自動化学会第 43 回大会 平成 23 年 10 月 6 日～8 日 パシフィコ横浜・会議センター

- ③ 石毛崇之, 糸賀栄, 澤井撰, 佐藤謙一, 宇津野恵美, 西村基, 松下一之, 桑原聡, 野村文夫 0-136 千葉大学病院における脊髄小脳失調症 31 型 (SCA31) 遺伝学的検査の現状 日本臨床検査自動化学会第 43 回大会 平成 23 年 10 月 6 日～8 日 パシフィコ横浜・会議センター

- ④ 佐藤謙一, 糸賀栄, 宇津野恵美, 澤井撰, 石毛崇之, 西村基, 松下一之, 野村文夫 P-27 Triplet repeat primed PCR (TP-PCR) 法を用いた異常伸長 Triplet repeat の簡便・迅速な検出 日本臨床検査自動化学会第 43 回大会 平成 23 年 10 月 6 日～8 日 パシフィコ横浜・会議センター

- ⑤ 澤井撰, 宇津野恵美, 金井数明, 佐藤謙一, 石毛崇之, 糸賀栄, 西村基, 松下一之, 桑原聡, 野村文夫 千葉大学病院における脊髄小脳変性症の遺伝学的検査と遺伝カウンセリング 一家族歴を欠く 27 症例の解析 遺伝医学合同学術集会 2011 平成 23 年 6 月 16 日～19 日 京都大学百周年時計台記念館

- ⑥ 佐藤謙一, 糸賀栄, 石毛崇之, 宇津野恵美, 澤井撰, 西村基, 松下一之, 野村文夫 Triplet repeat primed PCR (TP-PCR) 法を用いた筋強直性ジストロフィー (DM1) CTG 増幅リピートの簡便な検出 遺伝医学合同学術集会 2011 平成 23 年 6 月 16 日～19 日 京都大学百周年時計台記念館

- ⑦ 野村文夫, 西村基, et al.: "Measurement of 5.9kDa Fragment of Fibrinogen Alpha Chain C-terminal (FIC5.9) by MALDI-TOF MS with Stable-Isotope Labeled Standard in Patients with Broad Spectrum Liver Diseases" MSACL 2010. (20100208). Hyatt Regency Mission Bay Spa & Marina, San Diego

- ⑧ 西村基: "網羅的プロテオミクスで得られた情報を医学生物的にはどう絞り込むのか～トランスクリプトーム解析から得られる

教訓”第6回千葉疾患プロテオミクス研究会、(20091206)、千葉大学

⑨内本高之、松下一之、西村基、他：“CYP2E1 遺伝子の転写調節(エンハンサー)領域の反復配列多型の意義について”第29回アルコール医学生物学研究会学術集会、(20091113)、三井ガーデンホテル千葉

⑩西村基、他：“低血清による肝細胞株培養はヒト NASH(非アルコール性脂肪性肝炎)の in vitro モデルとなる”第29回アルコール医学生物学研究会学術集会、(20091113)、三井ガーデンホテル千葉

⑪仙波利寿、西村基、他：“FLS(Fatty liver Shionogi)マウスを用いた NASH 関連バイオマーカーの探索”第29回アルコール医学生物学研究会学術集会、(20091113)、三井ガーデンホテル千葉

⑫野村文夫、西村基、他：“千葉大学病院における遺伝カウンセリングの現状”第33回日本遺伝カウンセリング学会学術集会、(20090724)、兵庫医科大学 平成記念会館

⑬工藤ひろみ、西村基、他：“デュアル CHO T&L「生研」と Friedewald 式併用の有用性について”日本臨床検査自動化学会第41回大会、(20091010)、パシフィコ横浜・会議センター

⑭宇津野恵美、西村基、他：“千葉大学病院における神経変性疾患の発症前診断の現状”日本臨床検査自動化学会第41回大会、(20091010)、パシフィコ横浜・会議センター

⑮澤井撰、西村基、他：“MALDI-TOF MS を用いたプロテオーム解析による多発性硬化症における疾患活動性マーカーの探索”日本臨床検査自動化学会第41回大会、(20091010)、パシフィコ横浜・会議センター

⑯西村基、他：“肝細胞培養系を用いた非アルコール性脂肪肝モデルの作成とそのメカニズム”第56回日本臨床検査医学会学術集会、(20090828)、札幌コンベンションセンター

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 非アルコール性脂肪肝炎検出および/または鑑別用マーカー、非アルコール性脂肪肝炎を検出

及び/または鑑別する方法およびそれらに用いるキット

発明者: 野村 文夫、西村 基、片山勝博、清川 巖

権利者: 千葉大学、日東紡績株式会社、ニッポーメディカル

種類: 特許権

番号: PCT/JP2011/063446

出願年月日: H22年6月17日

国内外の別: 国内・国外ともに

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0017309>

雑誌論文の全文無料ダウンロード

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・助教

研究者番号: 80400969