

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790548

研究課題名(和文)インフォマティクスを活用した血中タンパク質・ペプチドリストよりの疾患マーカー探索

研究課題名(英文)Clinical marker hunting with informatics and mass spectrometry

研究代表者

西村 基(Nishimura, Motoi)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80400969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らは、免疫沈降(IP; ImmunoPrecipitation)と質量分析(MS; Mass Spectrometry)との組み合わせ(いわゆるImmuno-MS)が従来の臨床検査にアドオンする形で手堅く構築できworkすること、そしてその実用例として、これにより血清ApoEのほぼ全長がリシーケンス可能であり、従来のジェノタイピングと同等の情報を得られるDNA freeなセロタイピングに応用できることを示した。これらにより臨床検査のImmuno-MSへの発展性とImmuno-MSの将来性を示唆することが出来た。

研究成果の概要(英文)：Motoi Nishimura and colleagues combined mass spectrometry and immunoprecipitation (so-called Immuno-MS) using widely-used clinical test immunoassay reagents. As an example, we have shown successful ApoE serotyping using Immuno-MS. ApoE serotyping is based on the correlation between ApoE genotype and isoform; it is therefore possible to determine the genotype from the blood ApoE isoform combination. Serotyping ApoE using mass spectrometry promises highly accurate results while requiring minimal amounts of blood and reagents, resulting in lower costs, which suggest that proteomic-based ApoE serotyping may eventually become a routine clinical laboratory test.

研究分野：検査病態学

キーワード：臨床検査 Immuno-MS 免疫沈降 抗体 セロタイピング

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者の所属する研究室は抗p53抗体の癌マーカーとしての実用化(Cancer. 2003;97(3):682-9. 製造販売承認番号: 21900AMZ00069000)・新規骨吸収マーカーTRAP5b (Clin Chim Acta. 2007 Feb;376(1-2):205-12. 製造販売承認番号:22000AMX00076000)実用化に見られるように、疾患マーカーの探索と評価・実用化に携わってきた。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の成功(Hepatology.2008;48(2):519-30)に見られるように、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ァレンシャル解析からSELDI-TOF/MS, MALDI-TOF, Orbitrap, TSQ Vantageといった質量分析計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当時、研究室を主宰していた野村文夫教授が肝臓学を専門分野とし千葉大学消化器内科の外來担当医を兼任していることもあり、C型肝炎・肝硬変、NAFLD(非アルコール性脂肪肝; non-alcoholic fatty liver disease)・NASH(非アルコール性脂肪肝炎; non-alcoholic steatohepatitis)を含む肝疾患、そして肝癌を含む消化器癌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きた。研究代表者(西村)は臨床検査専門医であり血中バイオマーカー探索にかねてより注力しており、2011年にC型肝炎・肝硬変における血中中性脂肪成分の構成(VLDL-TG比)変化の早期検出(PLoS One. 2011 Feb 25;6(2):e17309.)、新規血中胃癌マーカーの検索(J Gastroenterol. 2011 May;46(5):577-85)さらにMastermind-likeタンパク質の生体機能(Development 12/2011; 138(23):5235-46)といった英文論文の発表を主著者または共著者として行っている。

## 2. 研究の目的

研究代表者は前掲の「C型肝炎・肝硬変における血中中性脂肪成分の構成(VLDL-TG比)変化の早期検出」研究において、インフォマティクスの活用によって血中成分の検査値と疾患に特異的な病態との関連性をコンピューターの助けを借りつつ検出する事の重要性に改めて気付かされた。この研究では各中性脂肪成分の存在量よりも構成比の方

が疾患の早期の段階で変動を示すことを報告しているが、構成比により注目すべきということを研究代表者に最初に示唆したのはコンピューターであった。この経験を生かし、コンピューターとインフォマティクスの助けを借り、疾患マーカーたりうる蓋然性のより高いペプチド断片の選出を容易にするパイプラインを構築し、これにより特定の疾患に囚われず臨床的な有用性を持つと想定される新規疾患マーカーを探索・同定し、臨床検体を用いた検証・確立を行う事を着想した。

## 3. 研究の方法

背景に述べたように研究代表者の所属する研究室では質量分析計が整備されているため、これを用いた疾患マーカーの計測を基幹的な方法としている。いわゆるbio-fluid(血液、尿、汗)といったものは数百~数千種類に及ぶたんぱく質の複合体と云ってよく、これはペプチド断片が一つのタンパク質から多数生成されうることを考えると、その中からマーカー候補のペプチド断片を都合よく検出するには相当の工夫を要した。質量分析計による計測まで持ち込む前処理にはさまざまな方法があるが、あまりに複雑・再現性の悪い方法では当該マーカーの検証や確立まで視野に入れる事は困難である。したがって研究代表者らは、従来、臨床検査で汎用されていて性能評価が確立している抗体試薬を活用することを着想した。これらはbio-fluidに対しても選択性をもって計測対象物質を測定できることに高い再現性が保証されているためである。このような抗体試薬と質量分析の組み合わせ(いわゆるImmuno-MS)を研究の方法として採用し、その確立に取り組んだ。

## 4. 研究成果

研究代表者らは、平成24~26年度の文科省科学研究費助成により汎Apolipoprotein E(ApoE)抗体による免疫沈降(IP; ImmunoPrecipitation)と質量分析(MS; Mass Spectrometry)との組み合わせ(いわゆるImmuno-MS)で血清ApoEのほぼ全長がリシーケンス可能であり、従来のジェノタイピングと同等の情報が得られるDNA freeなセロタイピングに応用できることを示した(PLoS One. 2014 Jan 14;9(1):e85356)。

ここでやっているIPは、保険収載もされているApoE定量検査に用いられている国内企業製の臨床検査試薬を、バッファーなど関連試薬も含めそのまま転用したものである。つまり臨床検査試薬に質量分析を検出系として組み合わせ、Immuno-MSとすることで単に血中ApoE定量を行うイムノアッセイであった試薬にアイソフォーム・タイピングを行う機能を付加できた。ApoEにはE2, E3, E4の3つのアイソフォーム・タンパク質が存在するが、ApoE2はIII型家族性脂質異常症の

原因と目され、また ApoE4 はアルツハイマー型認知症の強力なリスクファクターと認識されている。よって、アイソフォーム・タイピングを行う機能を付加することは ApoE 定量イムノアッセイに、従来のジェノタイピングと同等の情報が得られる DNA free な、これら疾患の遺伝学的な診断を行う能力を付加することとなった (Expert Rev Proteomics. 2014 Aug;11(4):405-7)。「血中タンパク質・ペプチドリットよりの疾患マーカー探索」として ApoE という実例を用いて、マーカーの質量分析により得られる情報の多様な事を示すことが出来た。

#### 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 13 件)

Identification of *Nocardia* species using matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. Segawa S, Nishimura M, Sogawa K, Tsuchida S, Murata S, Watanabe M, Matsushita K, Kamei K, Nomura F. Clin Proteomics. 2015 Mar 7;12(1):6. doi: 10.1186/s12014-015-9078-5. eCollection 2015. 査読有

High-throughput screening of extended RAS mutations based on high-resolution melting analysis for prediction of anti-EGFR treatment efficacy in colorectal carcinoma.

Ishige T, Itoga S, Sato K, Kitamura K, Nishimura M, Sawai S, Matsushita K, Suzuki K, Ota S, Miyachi H, Matsubara H, Nakatani Y, Nomura F. Clin Biochem. 2014 Dec;47(18):340-3. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2014.09.013. Epub 2014 Sep 28. 査読有

Direct application of MALDI-TOF mass spectrometry to cerebrospinal fluid for rapid pathogen identification in a patient with bacterial meningitis.

Segawa S, Sawai S, Murata S, Nishimura M, Beppu M, Sogawa K, Watanabe M, Satoh M, Matsutani T, Kobayashi M, Iwadate Y, Kuwabara S, Saeki N, Nomura F. Clin Chim Acta. 2014 Aug 5;435:59-61. doi: 10.1016/j.cca.2014.04.024. Epub 2014 May 4. 査読有

How proteomic ApoE serotyping could impact Alzheimer's disease risk assessment: genetic testing by proteomics. Nishimura M, Satoh M, Matsushita K,

Nomura F. Expert Rev Proteomics. 2014 Aug;11(4):405-7. doi: 10.1586/14789450. 2014.936390. Epub 2014 Jul 4. 査読有

Second-generation antipsychotics and bone turnover in schizophrenia.

Okita K, Kanahara N, Nishimura M, Yoshida T, Yasui-Furukori N, Niitsu T, Yoshida T, Ishikawa M, Kimura H, Nomura F, Iyo M. Schizophr Res. 2014 Aug;157(1-3):137-41. doi: 10.1016/j.schres.2014.05.009. Epub 2014 Jun 2. 査読有

Human apolipoprotein e resequencing by proteomic analysis and its application to serotyping.

Nishimura M, Satoh M, Nishimura S, Kakinuma S, Sato K, Sawai S, Tsuchida S, Kazama T, Matsushita K, Kado S, Kodera Y, Nomura F. PLoS One. 2014 Jan 14;9(1):e85356. doi: 10.1371/journal.pone.0085356. eCollection 2014. 査読有

Application of quantitative proteomic analysis using tandem mass tags for discovery and identification of novel biomarkers in periodontal disease.

Tsuchida S, Satoh M, Kawashima Y, Sogawa K, Kado S, Sawai S, Nishimura M, Ogita M, Takeuchi Y, Kobayashi H, Aoki A, Kodera Y, Matsushita K, Izumi Y, Nomura F. Proteomics. 2013 Aug;13(15):2339-50. doi: 10.1002/pmic.201200510. Epub 2013 Jun 20. 査読有

The FLS (fatty liver Shionogi) mouse reveals local expressions of lipocalin-2, CXCL1 and CXCL9 in the liver with non-alcoholic steatohepatitis.

Semba T, Nishimura M, Nishimura S, Ohara O, Ishige T, Ohno S, Nonaka K, Sogawa K, Satoh M, Sawai S, Matsushita K, Imazeki F, Yokosuka O, Nomura F. BMC Gastroenterol. 2013 Jul 23;13:120. doi: 10.1186/1471-230X-13-120. 査読有

Serum fibrinogen alpha C-chain 5.9 kDa fragment as a biomarker for early detection of hepatic fibrosis related to hepatitis C virus.

Sogawa K, Noda K, Umemura H, Seimiya M, Kuga T, Tomonaga T, Nishimura M, Kanai F, Imazeki F, Takizawa H, Yoneda M, Nakajima A, Tsutsumi M, Yokosuka O, Nomura F. Proteomics Clin Appl. 2013

Jun;7(5-6):424-31. doi: 10.1002/prca.201200094. Epub 2013 May 17. 査読有

Preanalytical evaluation of serum 25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D2 measurements using LC-MS/MS.  
Mochizuki A, Kodera Y, Saito T, Satoh M, Sogawa K, Nishimura M, Seimiya M, Kubota M, Nomura F.  
Clin Chim Acta. 2013 May;420:114-20. doi: 10.1016/j.cca.2012.10.041. Epub 2012 Nov 1. 査読有

Discrimination of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from methicillin-susceptible Staphylococcus aureus or coagulase-negative staphylococci by detection of penicillin-binding protein 2 and penicillin-binding protein 2' using a bioluminescent enzyme immunoassay.  
Shiga K, Gomi K, Nishimura M, Watanabe M, Nomura F, Kajiyama N.  
J Immunol Methods. 2013 Feb 28;388(1-2):40-5. doi: 10.1016/j.jim.2012.11.012. Epub 2012 Dec 6. 査読有

Pentanucleotide repeat-primed PCR for genetic diagnosis of spinocerebellar ataxia type 31.  
Ishige T, Sawai S, Itoga S, Sato K, Utsuno E, Beppu M, Kanai K, Nishimura M, Matsushita K, Kuwabara S, Nomura F.  
J Hum Genet. 2012 Dec;57(12):807-8. doi: 10.1038/jhg.2012.112. Epub 2012 Sep 20. 査読有

Proteomic analysis of gingival crevicular fluid for discovery of novel periodontal disease markers.  
Tsuchida S, Satoh M, Umemura H, Sogawa K, Kawashima Y, Kado S, Sawai S, Nishimura M, Kodera Y, Matsushita K, Nomura F.  
Proteomics. 2012 Jul;12(13):2190-202. doi: 10.1002/pmic.201100655. 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

第 60 回日本臨床検査医学会学術集会  
2013 年 10 月 31 日 ~ 2013 年 11 月 3 日  
神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)  
「検査室におけるソフトイオン化質量分析法の役割と方向性」  
西村基、野村文夫

第 60 回日本臨床検査医学会学術集会  
2013 年 10 月 31 日 ~ 2013 年 11 月 3 日  
神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)  
「千葉大学病院におけるリンチ症候群に対

する MSI (microsatellite instability) 検査の立ち上げについて」  
松下一之、佐藤謙一、石毛崇之、北村浩一、澤井撰、西村基、糸賀栄、野村文夫

日本臨床検査自動化学会第 45 回大会  
2013 年 10 月 10 日 ~ 2013 年 10 月 12 日  
パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)  
「LC-MS/MS による 25OH-ビタミン D および 1,25 (OH) 2-ビタミン D 測定における誘導体化の有用性の検討」  
石毛崇之、佐藤守、西村基、齊藤達也、槌田祥央、澤井撰、松下一之、小寺義男、野村文夫

第 38 回日本医用マススペクトル学会年会  
2013 年 9 月 26 日 ~ 2013 年 9 月 27 日  
神戸市産業振興センター (兵庫県・神戸市)  
「細菌検査における MALDI-TOF MS を用いた Nocardia 属の同定について」  
瀬川俊介、西村基、曾川一幸、村田正太、齊藤知子、安部安規子、佐海知子、上原麻友、渡邊正治、亀井克彦、野村文夫

第 38 回日本医用マススペクトル学会年会  
2013 年 9 月 26 日 ~ 2013 年 9 月 27 日  
神戸市産業センター (兵庫県・神戸市)  
「PTAD 誘導体化を用いた LC-MS/MS による 25OH-ビタミン D および 1,25(OH)2-ビタミン D 測定」  
石毛崇之、佐藤守、西村基、齊藤達也、土田祥央、澤井撰、松下一之、小寺義男、野村文夫

第 38 回日本医用マススペクトル学会年会  
2013 年 9 月 26 日 ~ 2013 年 9 月 27 日  
神戸市産業センター (兵庫県・神戸市)  
「歯周患者マーカー探索と病態解析における質量分析技術の有用性」  
土田祥央、佐藤守、曾川一幸、川島佑介、荷堂清香、荻田真弓、竹内康雄、小林宏明、青木章、澤井撰、西村基、小寺義男、松下一之、泉雄一、野村文夫

The 12th Human Proteome Organization Congress  
パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)  
2013 年 9 月 14 日 ~ 2013 年 9 月 18 日  
「Serum Fibrinogen Alpha C-chain 5.9kD Fragment(FIC5.9) as a Biomarker for Early Detection of Hepatic Fibrosis Related to Hepatitis C Virus」  
Wataru Kikuchi, Kenta Noda, Kazuyuki Sogawa, Motoi Nishimura, Hidelo Ishihara, Fumio Nomura.

The 12th Human Proteome Organization Congress  
2013 年 9 月 14 日 ~ 2013 年 9 月 18 日  
パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

「Application of Quantitative Proteomic Analysis Using Tandem Mass Tags for Discovery and Identification of Novel Biomarkers in Periodontal Disease」  
Sachio Tuchida, Mamoru Satoh, Yusuke Kawashima, Kazuyuki Sogawa, Sayaka Kado, Setsu Sawai, Motoi Nishimura, Mayumi Ogita, Yasuo Takeuchi, Hiroaki Kobayashi, Akira Aoki, Yoshio Kodera, Kazuyuki Katsushita, Yuichi Izumi, Fumio Nomura

MSACL2013 Mass Spectrometry:  
Applications to the Clinical Laboratory  
2013年2月9日～2013年2月13日  
サンディエゴ(アメリカ)  
ApoE (Apolipoprotein E) typing from small amounts of blood samples  
Motoi Nishimura, Satomi Nishimura, Mamoru Satoh, Shoko Kakinuma, Kenichi Satoh, Setsu Sawai, Kazuyuki Matsushita, Sayaka Kado, Yoshio Kodera, Fumio Nomura.

日本人類遺伝学会第57回大会  
2012年10月26日～2012年10月26日  
京王プラザホテル(東京都・新宿区)  
血清蛋白質よりのApolipoproteinE(ApoE)タイピング  
西村基、西村里美、佐藤守、澤井摂、柿沼翔子、佐藤謙一、松下一之、小寺義男、野村文夫

第37回日本医用マススペクトル学会年会  
2012年10月25日～2012年10月25日  
ウィンクあいち(愛知県・名古屋市)  
血清よりのApolipoproteinE(ApoE)タイピング  
西村基、西村里美、佐藤守、柿沼翔子、佐藤謙一、澤井摂、松下一之、小寺義男、野村文夫

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

#### 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・講師  
研究者番号：80400969

##### (2) 研究分担者

なし( )  
研究者番号：

##### (3) 連携研究者

なし( )  
研究者番号：