

図6 高齢者で発現が増加する蛋白質の例

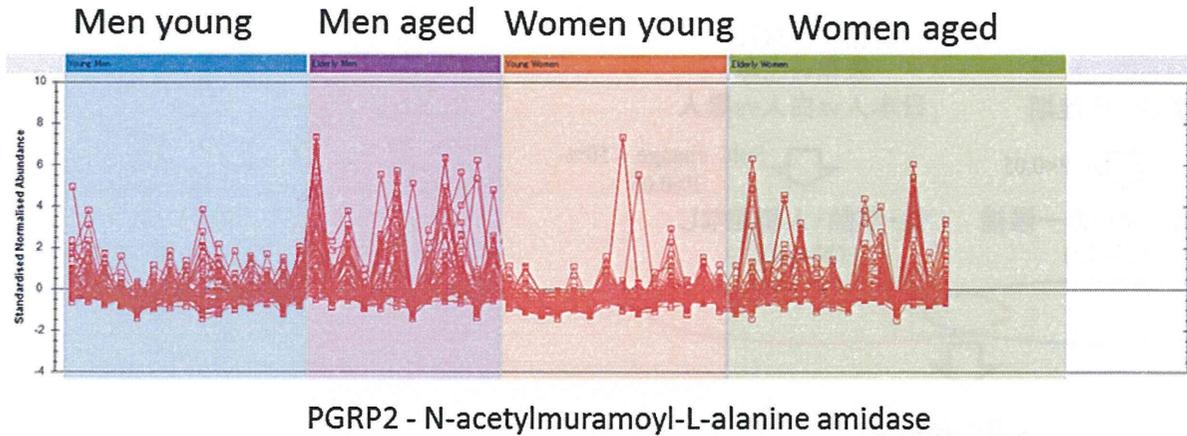


図7 イオン性代謝物に関する人種差（若年男性）の主成分分析

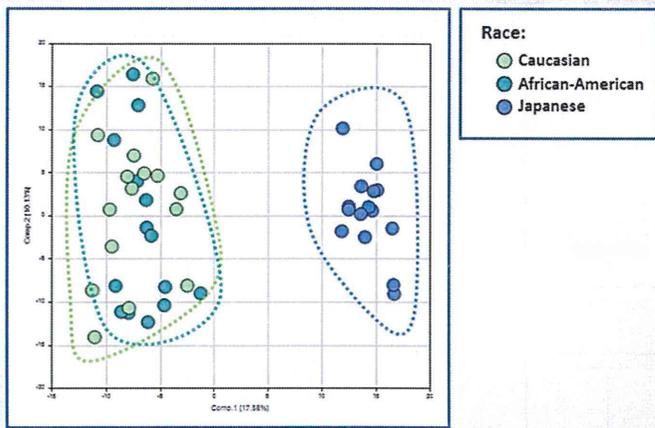


図8 脂質代謝物に関する人種差（若年男性）の PLS-DA 解析

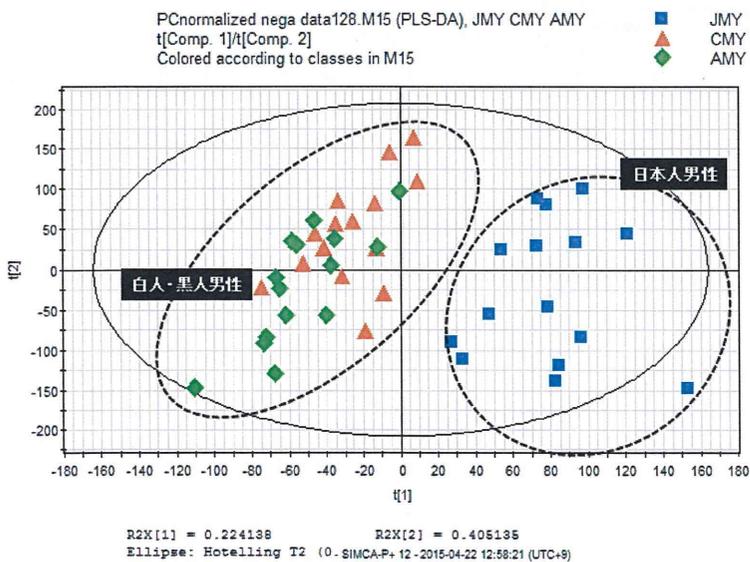


図9 イオン性代謝物に関する肝障害バイオマーカー候補の絞り込み

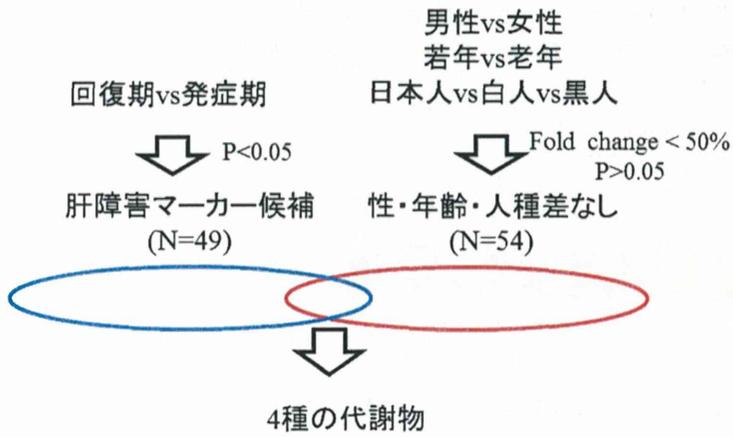


図10 イオン代謝物の薬物性肝障害バイオマーカー候補

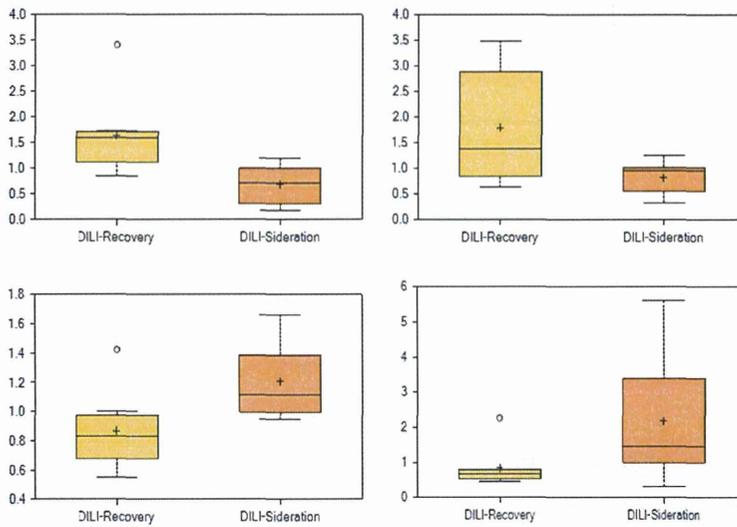


図 11 脂質代謝物の薬物性肝障害バイオマーカー候補（リン脂質、スフィンゴ脂質）

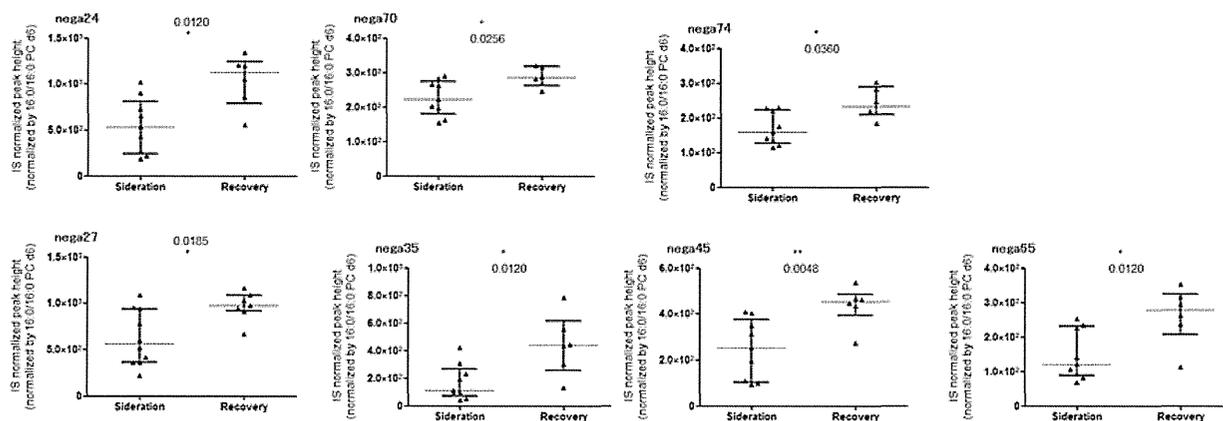
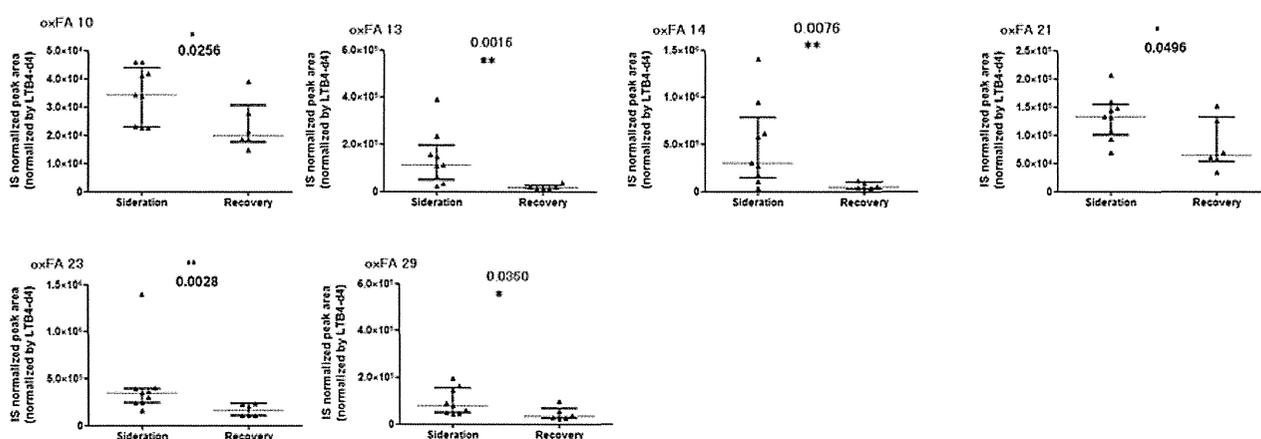


図 12 脂質代謝物の薬物性肝障害バイオマーカー候補（酸化脂肪酸）



II. 分担研究報告書

平成 26 年度 厚生労働科学研究費補助金
(医薬品等規制調和・評価研究事業)
分担研究報告書

ヒト副作用試料の収集と新規バイオマーカー探索に向けた効率的な医療情報基盤の構築

研究分担者 北里大学医学部附属臨床研究センター 教授 熊谷 雄治
研究協力者 北里大学医学部附属臨床研究センター 特任助教 田中 理英子

研究要旨：

バイオマーカーは、既存の臨床評価項目だけでは判断がつかない診断を可能とするサロゲートマーカーとして、臨床においてその重要性が増してきている。新規バイオマーカーの探索研究においては、質の高い臨床情報の収集が不可欠である。しかし、臨床研究が複数の医療機関もしくは多科に渡る場合、必ずしも臨床情報の書式が統一されているとは限らず、情報管理は煩雑なものとなっていた。そこで、本研究では、情報書式の均質化を図る事により、高品質かつ効率的な情報管理を可能とするために、収集している薬物性肝障害を対象に、IT 技術を用いた新たなデータベース構築を試みた。

平成 25 年度までに、北里大学病院消化器内科の協力の下に『薬剤性肝障害発症時における新規バイオマーカー開発に関する探索的研究』の実施体制を整え、検体の収取および臨床情報の収集を開始している。薬剤性肝障害は、死に至る可能性がある重篤な障害にも関わらず、診断基準としては既存の非特異的な評価項目に頼っている現状であり、感度・特異度の高い新規バイオマーカーの探索が急務である。そこで、我々は新たに構築したデータベースに上記臨床研究に登録された被験者 5 例の情報をテストデータとして格納した所、構築した体制は順調に機能していることが確認された。

このデータベースは薬剤性肝障害のみではなく、他の臨床情報の収集にも応用可能あり、高品質かつ効率的な臨床情報の提供により、バイオマーカー探索研究に大いに貢献することが期待される。

A. 研究目的：

近年、既存の臨床評価項目だけでは判断が困難であった、疾患の早期発見や病勢判断に関わる感度・特異度の高い新規バイオマーカーの探索に注目が集まっている。バイオマーカー探索研究においては、質の高い臨床情報が必要不可欠であるが、複数の機関から異なる書式の臨床情報を収集し、統合することは非常に煩雑な作業が必要となる。一般的には解析を行う研究者がその作業を担当しデータセットの作成と解析を行うが、そのデータセットに後から情報を追加する場合や、別の研究者が違った目的で解析する際には、その度にデータの収集、整理が必要となり、時間や労力の消費の面で多くの問題を抱えていた。そこで我々は、本学のように複数の病院をまたいだ臨床情報の一元化を目的とし、収集している薬物性肝障害を対象に、オンラインデータベースの構築を試みることにした。

即ち、平成 25 年度より北里大学病院の消化器内科を中心として行われている『薬剤性肝障害発症時における新規バイオマーカー開発に関する探索的研究』に焦点を当て、効率的な医療情報管理基盤を構築した。

B. 研究方法：

1) システム詳細

データサーバは本学医学部情報センター内に以下のラック式のサーバを設置

- ・ProLiant DL320 (HP 製)
- メモリ：8GB、ハードディスクドライブ：500GB (RAID1)、OS：Windows Server 2003 R2
- ・データ管理アプリケーション
- Promasys ver. 7.1 (OmniComm 社)

2) 入力項目

下記表 1 に記載する。

表 1 データベース入力項目

| 調査項目 | 検査・観察・評価項目 |
|--------------|---|
| 患者背景 | 性別、年齢、体温、血圧、身長、体重、飲酒歴、喫煙歴、常用薬、現病歴、既往歴、合併症、薬剤性肝障害の既往有無、アレルギー体質、海外渡航歴、薬剤性肝障害家族歴の有無 |
| 臨床症状 | 発熱、発疹、掻痒感、関節痛、全身倦怠感、黄疸、嘔気、嘔吐、腹痛、食欲不振 |
| 薬歴 | |
| 薬剤性肝障害診断関連項目 | 診断日時、原因薬物名、原因薬物投与開始日、原因薬物投与中止日、DDWJスコア、RUGAMスコア |
| 検査関連項目 | 最終食事時間、採血時間、採尿時間、血液：凍結保存開始時間、尿：凍結保存開始時間、ALT or ALP上昇確認日、症状出現日時 |
| 血液検査 | 血液一般、白血球分画、血液生化学、IgM HA抗体、HBs抗体、HCV抗原、IgM CMV抗体、IgM EB VCA抗体、IgG、IgM、ANA、AMA、DLST |
| 尿検査 | 定性(糖、蛋白、ウロビリノーゲン、ケトン体、潜血)、尿沈渣 |

3) 倫理面での配慮

個人情報保護の観点から、データベースに入力される被験者の情報は、連結可能匿名化された被験者IDを用いた。

4) アクセス権限

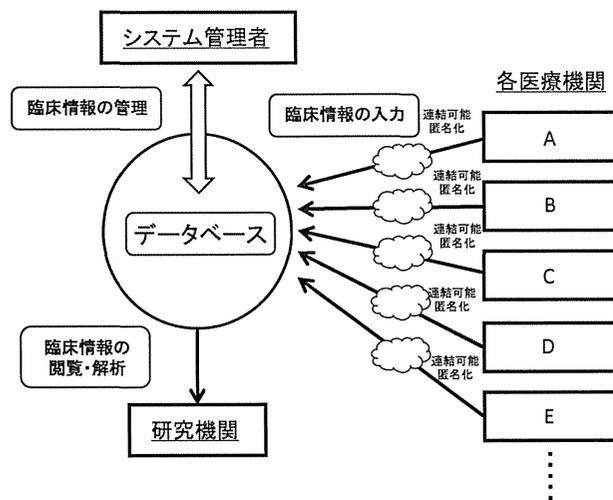
データベースへのアクセス権限は以下の通りとした。

- システム管理者：北里大学臨床研究センター
- データ入力者：北里大学病院消化器内科 医師
北里大学東病院消化器内科 医師
- 閲覧者：国立医薬品食品衛生研究所

5) データの流れ

各医療機関で連結匿名化された臨床情報がデータベース上に入力される。各研究者は、オンライン上のサーバにアクセスすることにより、入力されたデータの閲覧が可能となる。なお、データセットはタブ区切りのtxt. ファイルとしてエクスポートが可能である。概念図を図1に示す。

図 1. データベースの概念図



C. 研究結果：

データベースの実際の取り扱いの画面例を図2、図3に示す。現段階においては『薬剤性肝障害発症時における新規バイオマーカー開発に関する探索的研究』において登録された被験者5例の情報がテストデータとして格納されている。まだ、臨床研究は端緒についたばかりであり、例数は少ないものの、構築したデータベースは順調に機能していることが確認された。

図 2. 被験者登録画面

| 種別ID | Subjct ID | 検体 | 検種 | Occur | ステータス | タイムテーブル | 検出コード |
|--------|--------------|-----|----|-------|-------|-----------|---------|
| BM1001 | 1 Kitasato | SEL | | 0 | EVE | Screening | ? |
| BM1002 | 2 Kitasato | SEL | | 1 | EVE | Onset | Patient |
| BM1003 | 3 Kitasato | SEL | | 2 | EVE | Recovery | Patient |
| BM1004 | 4 Kitasato | SEL | | | | | |
| BM1005 | 5 Kitasato-E | SEL | | | | | |

図 3. 被験者の臨床情報

| Onset_D | Lab | Name | Value | Unit |
|------------|-------|-------------|-------|---------------------------|
| 2014/01/29 | 00:00 | 血液生化学 (物価集) | | |
| 2014/01/30 | | WBC | 3.8 | $\times 10^3/\mu\text{L}$ |
| | | RBC | 3.39 | $\times 10^6/\mu\text{L}$ |
| | | HGB | 11.0 | g/dL |
| | | PLT | 9.0 | $\times 10^4/\mu\text{L}$ |
| | | HCT | 30.40 | % |
| | | Neut | 74.6 | % |
| | | Eos | 0.3 | % |
| | | Lymph | 13.4 | % |
| | | MONO | 11.4 | % |
| | | Baso | 0.3 | % |
| | | V_Lymp | ? | % |
| 2014/01/30 | | 血液生化学 (臨床集) | | |
| | | AST(GPT) | 4366 | U/L |
| | | ALT(GPT) | 4093 | U/L |
| | | ALP | 405 | U/L |
| | | γ-GTP | 237 | U/L |
| | | Amylase | ? | U/L |
| | | LDL-C | ? | mg/dL |
| | | HDL | ? | mg/dL |
| | | TG | ? | mg/dL |
| | | BUN | 20.3 | mg/dL |
| | | CKTN | 0.92 | mg/dL |

D. 考察：

今回のデータベース構築により、質の高い均質なデータの蓄積、多施設共同試験の効率化、遠隔から閲覧可能、データ集計の簡便化がなされ、バイオマーカー探索研究に大いに貢献ができる可能性が示唆された。その一方、ユーザーがシステムに慣れる必要がある、データのセキュリティ保障、データベース維持のランニングコストなどの問題点も挙がってきた。今後は、利用者のトレーニングや、長期的な運用を見通した支援体制の検討が必要である。

E. 結論

複雑化している臨床情報をデータベースとしてサーバに格納することで、高品質かつ均一な情報管理と効率化を目的とした医療情報管理基盤を確立できた。この事は、今後の新規バイオマーカー探索研究の効率と発展に大きく寄与すると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 26 年度 厚生労働科学研究費補助金
(医薬品等規制調和・評価研究事業)
分担研究報告書

尿中プロテオーム解析によるバイオマーカーの検出およびその評価法の確立

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部 室長 鈴木 孝昌

研究要旨：

尿中バイオマーカーの検出のため、LC-MS を用いたショットガンプロテオミクス法による高感度分析によりラットおよびヒトの尿サンプルを解析し、性差、年齢差、種差など基本的なサンプル条件による影響を検討した。そして、ヒト（白人）においては、ラットに比べて個体差が大きいことを明らかにしてきた。今年度は、日本人由来の尿サンプルに関しても解析を行い、白人と同様個人差が大きいことを確認するとともに、個人差の原因となっていたタンパク質の検討を行った。その結果、主成分分析における第一主成分方向のばらつきに大きな影響を与えるタンパク質群を同定した。

さらに、ヒト臨床検体でのバイオマーカー検索として、薬物性肝障害を起こした患者の尿サンプルを用いて、肝障害時と回復時の比較から、肝障害に特異的なタンパク質の検索を行った。その結果、肝障害時に共通して変化した複数のバイオマーカー候補物質を同定した。このうちの一つは、炎症反応の初期段階に誘発されることが知られている Leucine-rich alpha-2-glycoprotein であり、肝障害早期の尿中バイオマーカーとして期待される。この他に、肝障害時に発現が増加するタンパク質として、Alpha-crystallin B chain、Alpha/beta hydrolase domain-containing protein 14B、Trypsin-2、Glutamyl aminopeptidase、Cathepsin Z、Copper transport protein ATOX1、UPF0556 protein C19orf10 が、発現低下すタンパク質として、Hemicentin-1、Receptor-type tyrosine-protein phosphatase eta が同定された。これら、バイオマーカー候補タンパク質の白人および日本人コントロール集団での発現量についても、あわせて検討を行った。今後得られたバイオマーカー候補物質の有用性に関して検討を進めたい。

D. 研究目的：

個別化医療の推進、コンパニオン診断薬の利用、並びに予防的治療介入による先制医療の実現に向け、各種バイオマーカーの開発と診断への利用が課題となっている。近年、制癌剤の領域を中心として、分子標的薬の開発が盛んとなり、薬剤ターゲットとして同定された分子標的自体が治療薬選択のための診断バイオマーカーとなるケースも増えてきている。また、新薬開発における患者の感受性予測のための新規バイオマーカーの同定と、コンパニオン診断薬としての同時承認に向けた開発は今後一気に加速すると見られ、オミックス的手法を用いて開発されたいわゆる次世代型のバイオマーカーが今後ますます重要となる。これら、新規バイオマーカーの有効性は、薬剤の有効性に直接結びつき、治療の可否を左右する重要な役割を担うことになる。よって、これらバイオマーカーの有効性を担保し、その品質を保証する上で、評価要件の確立が急務となっている。通常取りうるアプローチとして、動物実験等の非臨床試験で得られた知見およびヒトでの臨床試験データから個々のバイオマーカーの有用性を評価することになるが、今のところそれを目的と

した評価要件は国内外を含め確立されていない。そこで、新規バイオマーカーの評価要件の作成を目的として、非臨床および臨床検体を用いたバイオマーカーの検出に関わる基本要件の検討のため、生体試料の採取方法および性差年齢等の因子が与える影響等に関して基礎的なデータを取得するとともに、実験動物でのバイオマーカーの開発とヒトへの外挿による臨床応用にむけたスキームの妥当性に関する評価要件についても検討を行った。

我々はこれまでに、バイオマーカーの開発手法として尿中プロテオーム解析に注目し、LC-MS を用いたショットガンプロテオミクス法による網羅的定量プロテオーム解析に関する研究を行ってきた。この手法を応用し、尿中バイオマーカーに関する基礎的知見を得るために、初年度はまず実験動物としてラットを用いて、性差、年齢、絶食、サンプリングタイムなどの試料採取条件が与える影響に関して基礎的な知見を得た。昨年度は、同様の解析をヒト尿サンプルに関して行い、プロテオーム発現を規定する要因の解析を行うとともに、ラットデータとの比較による種差の検討を行い、実験動物からヒトへの外層性に関して考察

を行った。

今年度は、臨床検体として実際に薬物性肝障害を起こした患者の尿サンプルを用いて、バイオマーカー候補タンパク質の検索を行った。さらに、ヒト尿プロテオーム解析におけるばらつきの要因となるタンパク質に関しても、検討を行った。

E. 研究方法：

1) タンパク質の沈殿および消化条件

(タンパク質の沈殿)

尿を 2000xg、5 分間遠心分離を行い、不溶性物質を除去した後、Qubit™ spectrometer (Invitrogen) にてタンパク質濃度を測定した。タンパク 15 μg 相当量の尿をとり、2 倍容量のアセトンを加え、タンパク質を沈殿させた。

その後 14,000xg にて 15 分間遠心分離後、上清を除き、沈殿を 500 μl の同一溶媒で洗浄した。

(タンパク質の可溶化)

再び 14,000xg にて 15 分間遠心分離後、上清を除き、沈殿を 15 μl の 0.1% Rapigest (Waters) に溶解させた。

(還元アルキル化)

タンパク質画分の調製後、トリプシンによる消化を促進するために、以下の条件にてタンパク質 S-S 結合の還元とアルキル化の処理を行なった。タンパク溶液 30 μl に、30 μl の 10mM DDT を加え、60°C 30 分間反応させて還元後、室温に戻した後、60 μl の 30mM ヨードアセトアミド溶液を加え、遮光して室温にて 30 分間反応させた。

(トリプシン消化)

還元アルキル化したサンプル溶液にそのままトリプシン溶液 (Trypsin Gold, Promega) を 4.6 μl (0.25 μg/μl) 加え、37°C で一晩消化した。消化液を、ZipTip C18-P10 (Millipore) にて精製後、0.1% TFA にて 25 倍に希釈した後、LC-MS 解析に用いた。

2) LC-MS 測定条件

ナノ LC として、ADVANCE S Nano LC System (Michrome) を使用した。オートサンプラーにて試料を導入し、配管には内径 50 μm のヒューズドキャピラリーチューブを用い、C-18 逆相カラム (AMR, ZAPLOUS) およびトラップカラム (CERI, L-column micro) を使用した。移動相は A (水 0.1% ギ酸) , B (アセトニトリル, 0.1% ギ酸) の 2 種類の組成の溶媒を用い、B2% から B98% へのグラジエントをかけてペプチドを順次カラムより溶出させた。サンプルの必要量、最適なグラジエント組成、流速等の測定条件について検討を行なった。

質量分析装置としては、当研究所にて共同利用機器として使用可能な ESI-四重極/FT 型タンデム

質量分析装置 Q-Exactive (Thermo Fisher) を用い、前述のナノ LC とオンライン接続し、LC-MS としての測定を行った。通常の測定は、ポジティブモードを使用した。ZAPLOUS 逆相 C18 カラム (AMR 製 0.1 mm x 50 mm) にてペプチドを分離後、ナノスプレーインターフェース (Captive Spray, AMR) にて質量分析装置へと導入した。質量分析装置の設定に関しては、基本的に以下の項目に関して最適な MS 測定条件を検討した。

(MS 測定)

| | |
|-------------------------|------------------|
| ・MS 質量範囲 | 300-2000 m/z |
| ・Total Analysis Time | 110 min |
| ・Resolution | 70,000 |
| ・Accumulation time | 250 ms |
| ・Spray Voltage | 400-1800 V |
| ・Automatic Gain Control | 5xe ⁶ |

(MS/MS 測定)

| | |
|-------------------------|--------------------------|
| ・Resolution | 17,000 |
| ・Accumulation time | 50 ms |
| ・Automatic Gain Control | 5xe ⁵ |
| ・MS/MS 測定条件 | 上位 3 ペプチド (2 価以上) を自動選択。 |

(LC 測定)

| | |
|------------|---|
| ・LC 流速 | 150-300 nl/min |
| ・LC グラジエント | A 溶媒 (2% アセトニトリル, 0.1% ギ酸) と B 溶媒 (80% アセトニトリル, 0.1% ギ酸) によりグラジエント。 |

3) データ解析ソフトウェアによるノンラベル定量解析

Q-Exactive による質量分析データ (RAW 形式) は、基本的に付属のソフトウェアである Xcalibur を用いて解析し、データ依存的 MS/MS 測定を同時に行った。また、定量比較のための解析ソフトウェアとして “Progenesis LC-MS” (Nonlinear Dynamics) を採用し、比較プロテオーム解析に利用した。

本ソフトウェアは、二次元電気泳動のゲルスポットの定量比較のために開発されたソフトウェアを基本とし、LC-MS 用に開発されたものである。Q-Exactive からの生データである Raw 形式のファイルを直接読み込むことができ、3D グラフ化が可能である。この画像化されたデータを元に、異なるサンプル間のリテンションタイムの補正を行うことにより、ペプチドスポットのマッチングを行い、複数のサンプル間の定量比較および、統計解析を行うことが可能である (図 1)。また、MS/MS データを含む複数の Raw データを統合して MASCOT 検索を行う機能もあり、同定結果を取り込んで、タンパクレベルでの解析を行うこともできる。

4) データベース検索によるタンパク質の同定

MS/MS 測定から得られたフラグメントイオンパターンより、ペプチドマスフィンガープリンティング法によるタンパク質の同定を行うための解析ソフトである MASCOT(Matrix Science)を用いて、SwissProt プロテインデータベースを検索した。MASCOT の検索パラメーターとしてはデフォルト値を用い、固定修飾としてシステインのカルバミドメチル化を、可変修飾として、メチオニンの酸化、およびセリン、スレオニン、チロシンのリン酸化を設定した。同定の信頼性には、MASCOT のデフォルト値である、 $p < 0.05$ を用い、切断ミス許容数 1 にて検索を行った。

5) 日本人正常尿サンプルのプロテオーム解析

八重洲桜通クリニックより入手した日本人由来正常ヒト尿サンプルを 60 検体を使用した。いずれも健康人由来で、インフォームドコンセント取得済みのサンプルを使用した。使用したサンプルは、性別および年齢によって 4 群に分けた。

| 1群 男性 25-35歳 (MY) | | | | 2群 男性 55-65歳 (MO) | | | |
|-------------------|----|-------|------|-------------------|----|-------|------|
| sample# | 性別 | 年齢(歳) | BMI | sample# | 性別 | 年齢(歳) | BMI |
| 1 | M | 25 | 20.3 | 1 | M | 55 | 22.6 |
| 2 | M | 26 | 18.5 | 2 | M | 56 | 20.2 |
| 3 | M | 27 | 21.8 | 3 | M | 56 | 25.1 |
| 4 | M | 28 | 22.6 | 4 | M | 57 | 25.1 |
| 5 | M | 28 | 22.8 | 5 | M | 59 | 24.5 |
| 6 | M | 30 | 18.6 | 6 | M | 60 | 23.2 |
| 7 | M | 31 | 23.1 | 7 | M | 60 | 23.9 |
| 8 | M | 32 | 22.0 | 8 | M | 60 | 21.4 |
| 9 | M | 32 | 22.0 | 9 | M | 61 | 23.7 |
| 10 | M | 32 | 19.0 | 10 | M | 61 | 21.1 |
| 11 | M | 32 | 22.2 | 11 | M | 62 | 24.8 |
| 12 | M | 32 | 18.8 | 12 | M | 62 | 22.9 |
| 13 | M | 34 | 18.6 | 13 | M | 63 | 23.1 |
| 14 | M | 35 | 23.5 | 14 | M | 64 | 21.0 |
| 15 | M | 35 | 22.5 | 15 | M | 64 | 20.6 |

| 3群 女性 25-35歳 (FY) | | | | 4群 女性 55-65歳 (FO) | | | |
|-------------------|----|-------|------|-------------------|----|-------|------|
| sample# | 性別 | 年齢(歳) | BMI | sample# | 性別 | 年齢(歳) | BMI |
| 1 | F | 25 | 20.5 | 1 | F | 55 | 18.8 |
| 2 | F | 25 | 20.3 | 2 | F | 55 | 20.1 |
| 3 | F | 25 | 19.1 | 3 | F | 56 | 20.9 |
| 4 | F | 28 | 23.7 | 4 | F | 58 | 24.3 |
| 5 | F | 29 | 18.7 | 5 | F | 58 | 19.2 |
| 6 | F | 29 | 22.2 | 6 | F | 58 | 22.4 |
| 7 | F | 30 | 20.9 | 7 | F | 59 | 18.5 |
| 8 | F | 32 | 24.0 | 8 | F | 60 | 18.4 |
| 9 | F | 33 | 19.6 | 9 | F | 61 | 21.3 |
| 10 | F | 33 | 19.0 | 10 | F | 61 | 24.7 |
| 11 | F | 33 | 25.0 | 11 | F | 62 | 23.4 |
| 12 | F | 34 | 18.6 | 12 | F | 62 | 22.6 |
| 13 | F | 34 | 20.3 | 13 | F | 63 | 22.3 |
| 14 | F | 34 | 21.7 | 14 | F | 64 | 20.0 |
| 15 | F | 35 | 19.0 | 15 | F | 65 | 22.5 |

すべてのサンプルに関してデータを取得したが、表中灰色に塗った 5 つのサンプルに関しては、十分な質のデータが得られなかったため、解析からは除外した。

日本人サンプルに関しては白人ほど肥満度に大きなバラつきがなかったため、 $BMI < 20$ 、 $20 \leq BMI \leq 23$ 、 $BMI > 23$ の 3 群に分けて解析を行った。値を元に、以下のように分類した。

6) 薬物性肝障害尿サンプルのプロテオーム解析

北里大学医学部より提供を受けた、薬物性肝障害患者の尿サンプルについて、プロテオーム解析によるバイオマーカー検索を行った。臨床検体は、肝障害発症時および回復後に採取されたものをセットで用いた。入手した臨床検体の内訳を表 4 に示した。男女各 3 名、6 名の患者より得られたサンプルを使用した。このうち女性 2 検体については、回復後のサンプルが得られず、発症時のみの解析となった。原因となったと考えられる薬剤は表 4 に示すとおり様々であった。肝障害のタイプについては、情報が得られていない 1 名を除き、すべて肝細胞障害型であった。患者の年齢は 53~80 歳と比較的高齢であった。陰性対象として比較的年齢に近い日本人正常尿サンプルを用いて、肝障害発症時に特徴的に変化を示すタンパク質の検索を行った。

(倫理面での配慮)

ヒト臨床検体の使用に関しては、本研究所および関連医療機関の研究倫理委員会での承認を経た後、適切なインフォームドコンセントを取得して入手したサンプルを使用した。

F. 研究結果 :

1) 日本人由来正常尿プロテオーム解析

データが得られた 55 サンプルのデータをまとめて Progenesis-LC/MS にて解析した結果、検出された総ペプチド数(2-7 価)は、218755 個であった。そして、得られた MS/MS スペクトル情報を基に、MASCOT によるデータベース検索をした結果、1282 タンパク質が同定された。

同定されたタンパク質の情報を基に主成分分析 (PCA) を行ったところ図 2 のような結果が得られた。年齢および性別により分けられた 4 群を色分けしてプロットしたが、PCA グラフ上これら要素による明らかな傾向は得られず、ランダムなばらつきが認められた。

次に、肥満度との相関を見るために、BMI 値により全体を 3 群に分け、同様の解析をしたところ、図 3 に示すように、昨年度白人サンプルに見られたような明らかな傾向は認められなかった。

次に、性別および年齢差に特徴的な動きを示すタンパク質の抽出を行った。その結果、まず男性に特異的な発現を示すタンパクの例として、beta-microseminoprotein が同定された(図 4)。これは前立腺にて分泌され精液に含まれるタンパクのため、女性では全く発現が見られない。逆に、女性特異的に発現しているタンパクの例として、annexin A1、Protein S100-A11、Protein S100-A7、annexin A2 が同定された(図 5)。このうち、

AnnexinA1 と A2 は、昨年度の白人サンプルの解析においても、女性特異的タンパク質として見つかった。

次に、年齢の影響を受けるタンパク質として、高齢者で発現が増加するタンパクの例として、N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase のデータを図 6 に示す。

さらに、特定の群に特異的に発現するタンパクとして、男性高齢者群に高発現を示すタンパクが認められた (図 7)。

2) コントロールサンプルのばらつきの要因となっているタンパク質の検索

図 2 に示したとおり、全同定タンパク質を用いて主成分分析を行った場合には、性差や年齢差による傾向とは無関係に、特に第一主成分 (PC 1) 方向にデータがばらついていることが分かる。この PC1 スコアを正および負の方向へ導く要因となっているペプチドは、主成分分析図の背景上にプロットされており、水平方向の左右それぞれ両極端の位置に存在する。そこで、主成分分析グラフより、最も右側と左側に位置するペプチドをリストアップした (表 1)。

このリストを、先に得られている白人でのデータ (表 2) と比較することにより、共通した要因となっているペプチドをまとめた。黄色い印をつけたペプチドが両者に共通のものであり、それらを表 3 にまとめた。さらに、GO 解析においてそれぞれのタンパク質が示す分子機能 (Molecular Function) に関する情報を加えた。

3) 薬物性肝障害患者由来の尿サンプルの解析によるバイオマーカー検索

薬物性肝障害の患者より得られた、発症時、回復時の尿サンプルのリストを表 4 に示す。発症時 6 サンプル、回復時 4 サンプルが利用可能であった。尿プロテオーム解析の常法に従って検討を行ったところ、検出された総ペプチド数 (2-7 価) は、271,873 個であった。得られた MS/MS スペクトル情報を基に、MASCOT によるデータベース検索をした結果、1274 タンパク質が同定された。日本人由来正常コントロール尿を対照として使用し、肝障害発症時に特異的に発現変化するタンパク質を検索した。検索にあたっては、以下の条件を設定した。

1. 同定スコア 30 未満のタンパクは信頼性が低いため除外。
2. 複数のタンパク質に帰属されたペプチ

ドに関しては、対象から除外。

3. タンパク質レベルでの統計解析により Anova p 値が 0.05 未満であり、Fold change が 2 より大きいものを選択。

4. 選ばれた候補タンパク質に関して、ペプチドレベルでの発現パターンを確認し、一致率の悪いものを除外。

5. こうして選ばれた候補タンパク質を、Fold change, Anova p 値および Confidence score をもとにランクづけした。

これらの条件を満たすタンパク質として見つかったバイオマーカー候補タンパクを表 5 に示す。またこれらのタンパク質の発現のパターンを、コントロールデータとともに図 8 に示す。

最上位にランクされた Leucine-rich alpha-2-glycoprotein は、炎症反応に関与するタンパク質として最近注目されているが、薬物による肝障害が自己免疫反応等の炎症を伴うメカニズムで誘導されていると考えると興味深い。ただし、このタンパク質はコントロールデータの解析より、男性高齢者に特異的に高い発現が見られており、肝障害のマーカーとして使えるかどうかは、さらに検討が必要である。その他、肝障害時 (sideration) に特異的に発現が上昇するタンパク質として、Alpha-crystallin B chain、Alpha/beta hydrolase domain-containing protein 14B、Trypsin-2、Glutamyl aminopeptidase、Cathepsin Z、Copper transport protein ATOX1、UPF0556 protein C19orf10 が、発現減少するタンパク質として、Hemicentin-1、Receptor-type tyrosine-protein phosphatase eta が同定された。白人および日本人のコントロールのデータがあるものについては、同時に発現パターンを示したが、バイオマーカーとして利用する際は、コントロールでのバラつきが小さいものが望ましい。今後できればさらにサンプル数を増やして、バイオマーカー候補タンパク質の絞込みを行いたい。また、有用性が期待されるマーカーに関しては、同一患者でのより詳細な経時変化を検討することにより、早期診断のバイオマーカーとしての利用も検討してゆきたい。

D. 考察：

昨年度の白人サンプルでのヒト尿プロテオームデータの取得に続き、今年度は日本人コントロールでのデータを同様に取得したが、白人と同様に、性差、年齢差を上回る個人差によるばらつきが認められた。そこで、白人、日本人両者におい

て、主成分分析における第一主成分のばらつきへの寄与の大きいペプチドを検索した。多くのペプチドが共通するタンパク質由来であり、これらのタンパク質の変動が、プロテオームプロファイルの個人差を導く要因となっていることが示唆された。これらのタンパク質の分子機能という観点から考察を加えたところ、“binding”、“catalytic activity”、“receptor activity”の3つの機能が抽出された。SNP等の影響によりこれらのタンパク分子の発現に差ができて、個体差の原因となっている可能性が示唆された。

昨年度の検討より白人の尿プロテオームプロファイルは、肥満度による影響を受けることがわかったため、日本人サンプルについても肥満度の影響を見るためBMI値によるサブグループ分けをして、同様の傾向が見られるかを検討したが、はっきりとした傾向は認められなかった。日本人の場合には、白人のような極端に肥満度の高い個人が少なかったため、差が出にくかったとも考えられるため、今後肥満度の高い個人からのサンプルが得られれば、再検討を行いたい。

日本人のコントロールデータにおいて、性差に特徴的なタンパク質の検索を行ったところ、男性および女性特異的に発現するタンパク質が同定された。男性特異的に発現するタンパク質 beta-microseminoprotein は前立腺にて産生されるタンパク質であり、女性で発現していない点は、納得がいく。尿検体の性差を鑑定する場合には、有効なバイオマーカーとなると考えられる。女性特異的な発現を示したタンパク質は、Annexin A1, A2, S100-A7, A11 と類似した二つのタンパク質群であり、それぞれの発現に関連性が存在する可能性が考えられる。Annexin については白人サンプルでも女性特異的タンパクとしてすでに検出されており、再現性が確認できた。S100 タンパク質群はカルシウム結合タンパクであり、女性特異性の原因に関しては不明である。

次に、年齢差を示したタンパクに関しては、男女とも高齢者で上昇するものとして PGRP2 が同定された。一方、男性高齢者のみに特異的に発現するタンパク質は、多くのものが該当した。特に LRG に関しては、肝障害の検索においてバイオマーカー候補として同定されてきており、男性高齢者のサンプルを用いた影響が懸念される。バイオマーカーの検討においては、同一患者の発症中と回復後を比較しているため、個人差のバイアスによる影響は排除できるが、絶対値の値をもとに診断を下す場合には注意が必要である。Alpha/beta hydrolase domain-containing protein 14B についても、同様の結果が得られた。

薬物性肝障害患者の尿サンプルについては、発

症時と回復時のサンプルをセットで入手できたので、両者の比較から肝障害特異的なバイオマーカーの検索を試みた。この際陰性対象として、日本人由来のコントロールサンプル数検体を用い、同時に解析を行った。使用した薬物に関しては多岐にわたっているため、肝障害において共通して変化するタンパク質を標的とし、10種類のタンパク質をバイオマーカー候補タンパク質としてリストアップした。統計的有意性、変化率、同定スコアなどの観点から順位付けした結果、最も有望なタンパク質として、Leucine-rich alpha glycoprotein (LRG) が同定された。LRG は関節リウマチやクローン病、ベーチェット病などの自己免疫疾患における新規の炎症マーカーとなることが報告されており、薬物性肝障害の原因を自己免疫疾患に基づくと考えた場合には、同様のマーカーとして有効である可能性は十分にある。これまでは主に血液中での検出であったが、同様に尿中でも検出可能であれば、検査のしやすさからも有用性は高いと期待できる。すでに、LRG に関しては抗体を用いた市販の ELISA 検査キットが利用可能であり、今後さらにサンプル数を増やして、バイオマーカーとしての有用性を検証してゆきたい。その他、バイオマーカー候補物質に関しても、追加検体により絞込みができれば、個別の検討も進めたい。こうした研究が、薬物性肝障害の予測バイオマーカーの開発につながることを期待している。

G. 結論

- ▶ ヒト尿プロテオーム発現プロファイルの個人差の要因となるタンパク質（ペプチド）群を同定した。
- ▶ 薬物性肝障害発症時に特異的な発現を示すタンパク質を検索し、いくつかのバイオマーカー候補物質を得た。
- ▶ そのうち、炎症のマーカーとして知られている Leucine-rich alpha-2-glycoprotein は、初期の免疫応答に由来するバイオマーカーとして、薬物性肝障害の予測への応用が期待される。

E. 健康危険情報

F. 研究発表

1. 論文発表

G-3.その他 特記事項なし

1) Nishikawa K, Iwaya K, Kinoshita M, Fujiwara Y, Akao M, Sonoda M, Thiruppathi S, Suzuki T, Hiroi S, Seki S, Sakamoto T. Resveratrol increases CD68⁺ Kupffer cells co-localized with adipose differentiation-related protein (ADFP) and ameliorates high-fat-diet-induced fatty liver in mice. Mol Nutr Food Res. 2015

2) 鈴木孝昌 コンパニオン診断薬の現状と課題 「最先端バイオマーカーを用いた診断薬/診断装置開発と薬事対応」 p271-275 (技術情報協会) 2015

2. 学会発表

1) Suresh T., Maekawa K., Saito Y., Sato Y., Suzuki T. Individual variations in the human urinary proteome in relation to rat. The 3rd International Conference on Personalized Medicine (2014.6) (Prague)

2) スレッシュ ティルパッティ、斎藤嘉朗、本間正充、佐藤陽治、鈴木孝昌 変異原暴露モニタリング手法としてのタンパクアダクトミクス日本環境変異原学会第43回大会 (2014. 12) (東京)

3) Suzuki T., Suresh T. Protein adductome analysis for the human exposure monitoring to mutagens. The 4th Asian Conference on Environmental Mutagens (2014.12) (Kolkata)

4) 鈴木孝昌 医薬品開発においてヒト内在性物質を測定する際の定量分析法に関する留意点(案)の概要:規制の重要性と今後の課題 第6回JBFシンポジウム (2015. 2) (東京)

G. 知的財産権の出願・登録状況

G-1. 特許取得 なし

G-2. 実用新案登録 なし

図1 Progenesis-LC/MS ソフトウェアを用いた定量的プロテオーム解析



図2 同定されたタンパク質の発現情報に基づく全サンプルの主成分分析

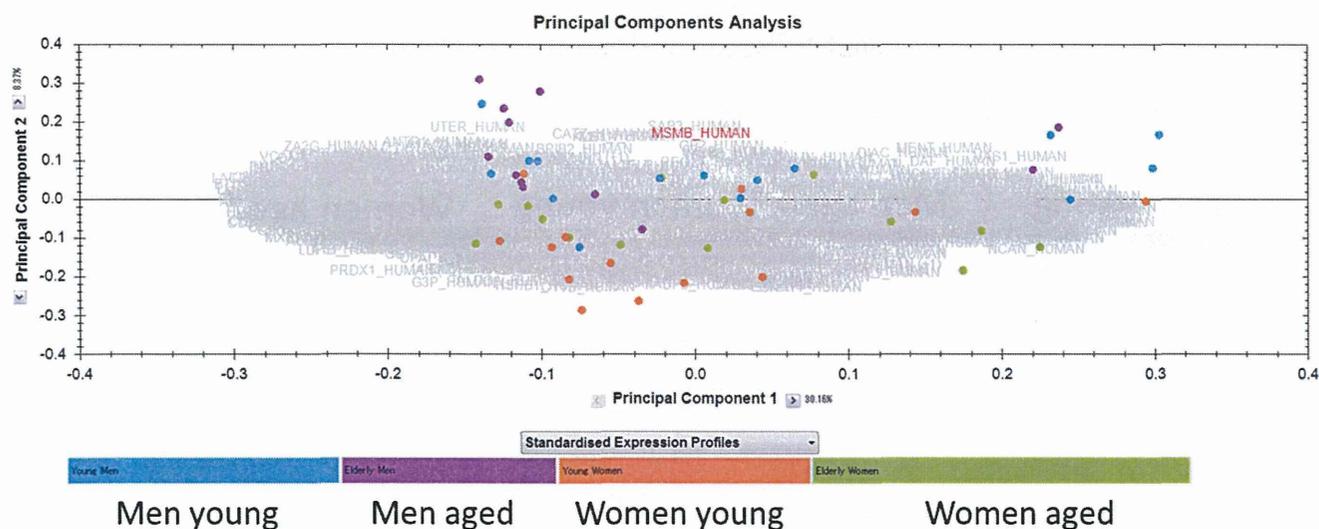


図3 主成分分析における肥満度によるクラス分けの影響

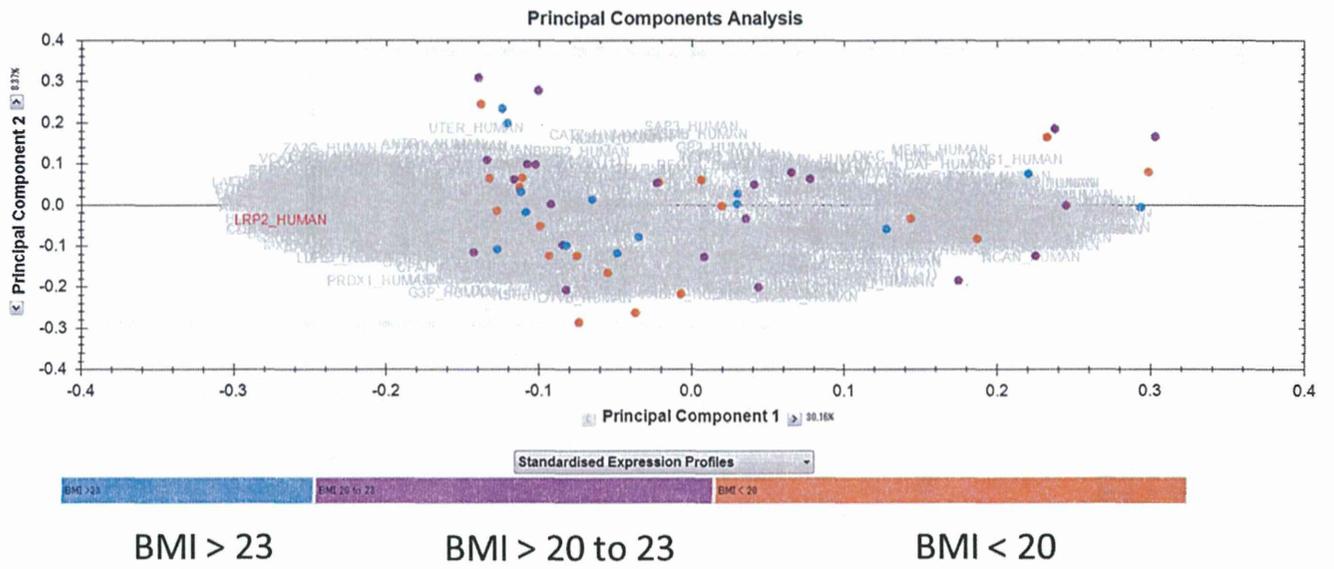


図4 男性特異的な発現を示すタンパク質の例

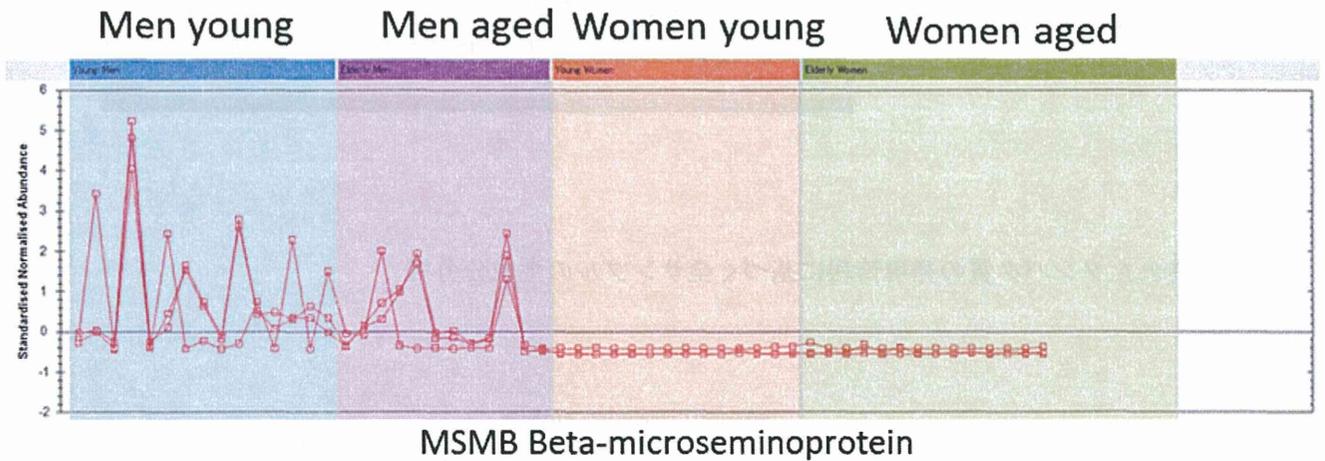
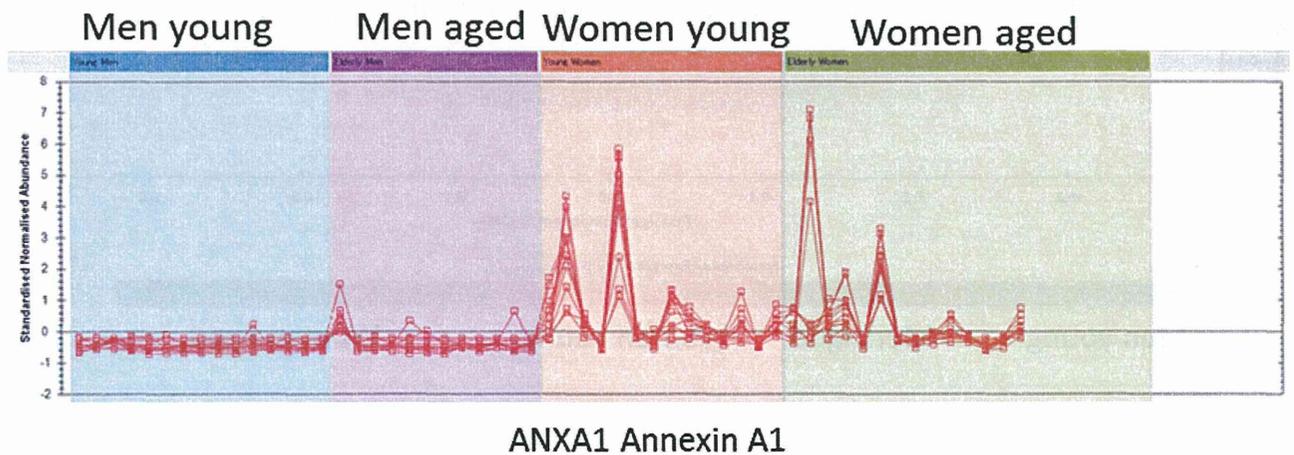


図5 女性特異的な発現を示すタンパク質の例

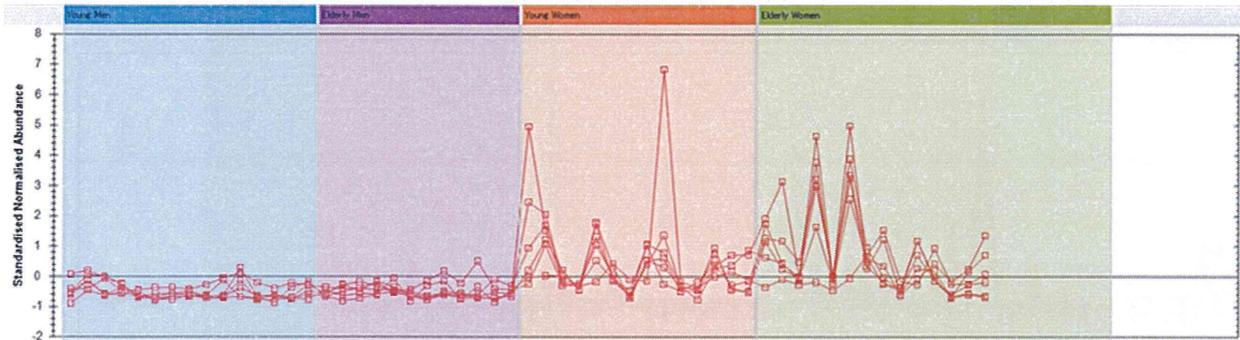


Men young

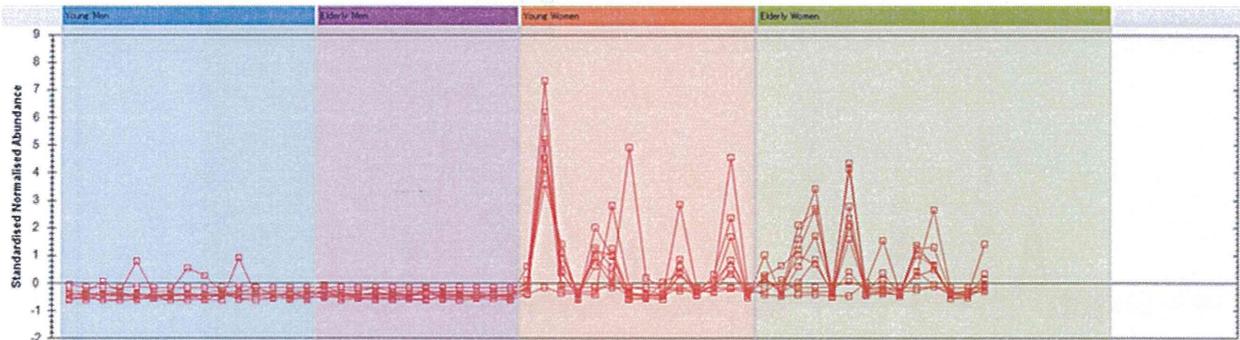
Men aged

Women young

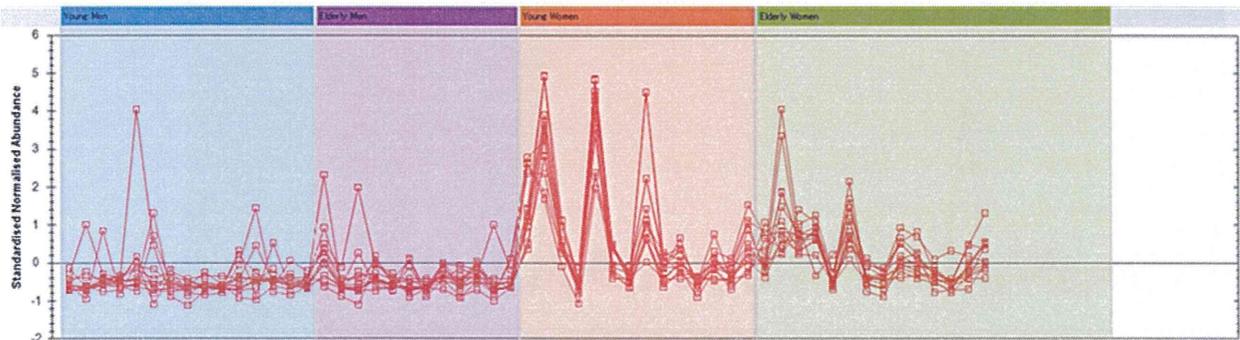
Women aged



S10A11 Protein S100-A11



S10A7-Protein S100-A7



ANXA2 Annexin A2

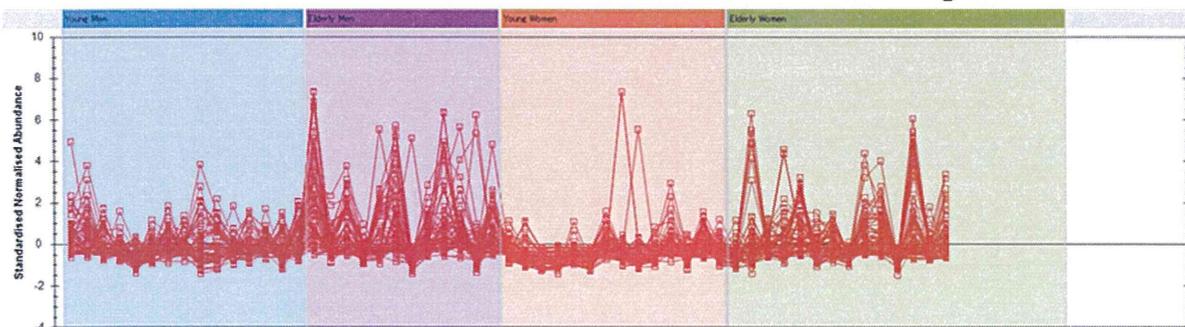
図6 高齢者で発現が増加するタンパク質の例

Men young

Men aged

Women young

Women aged



PGRP2 - N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase

図7 男性高齢者に特異的に高発現するタンパク質

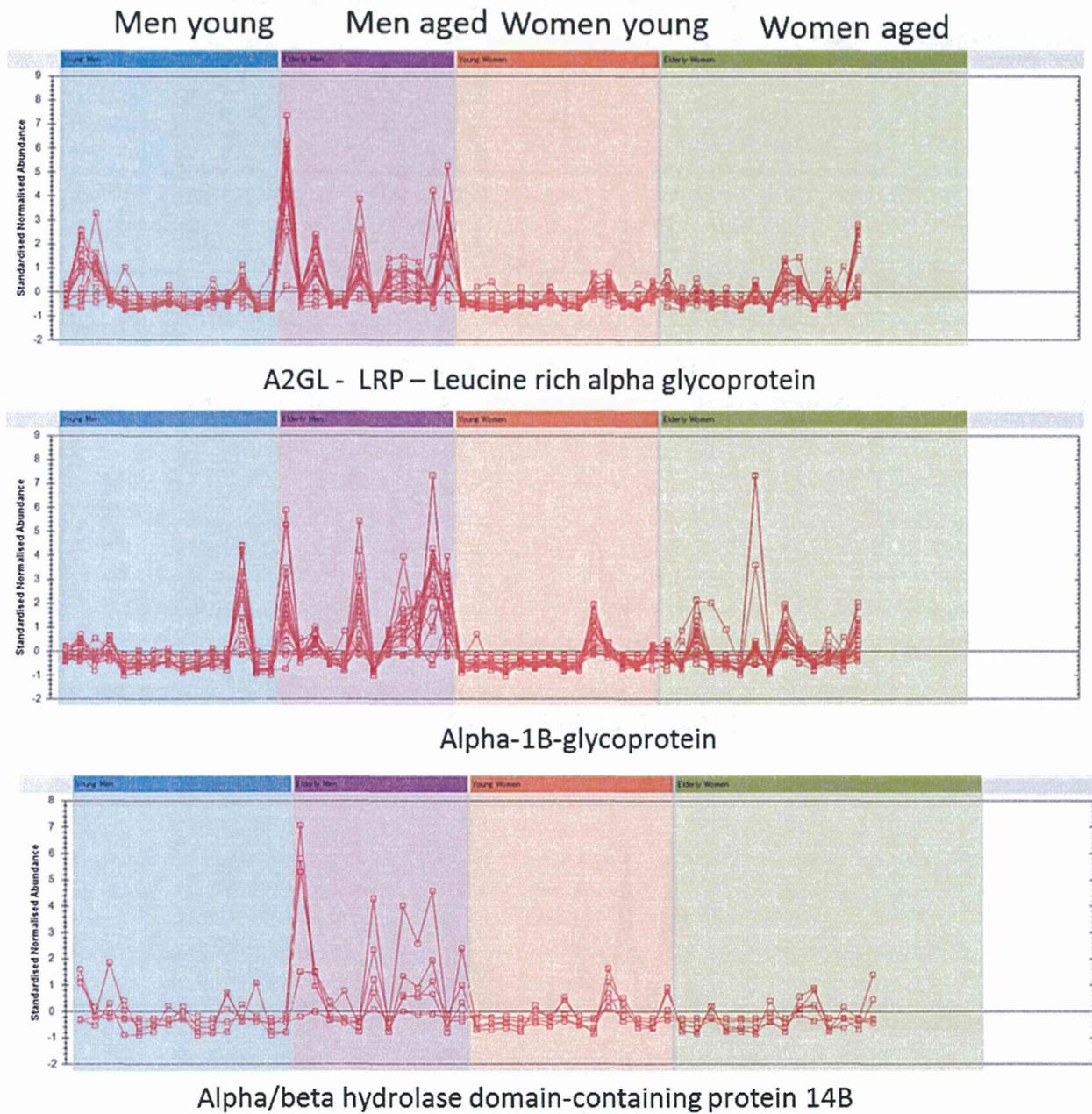
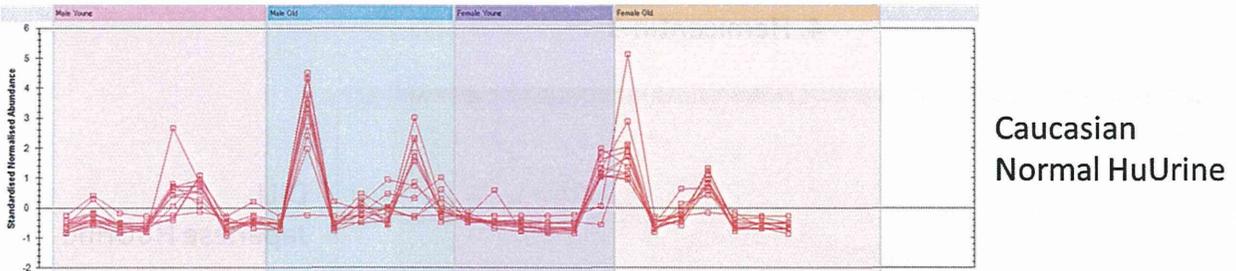
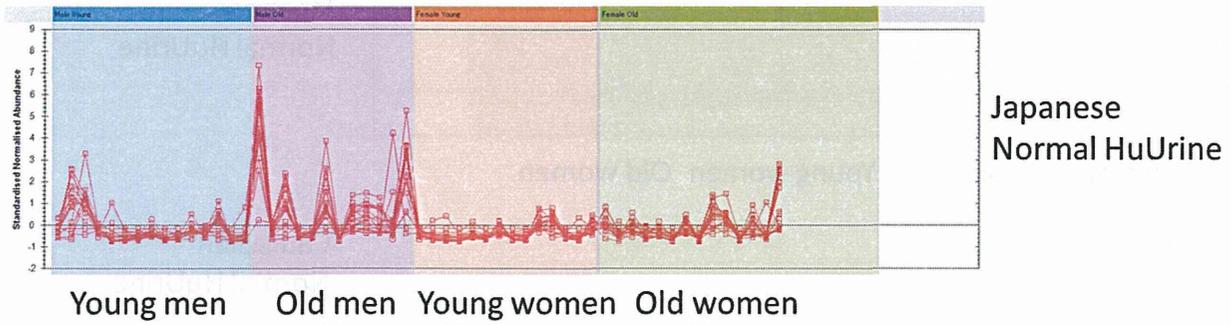
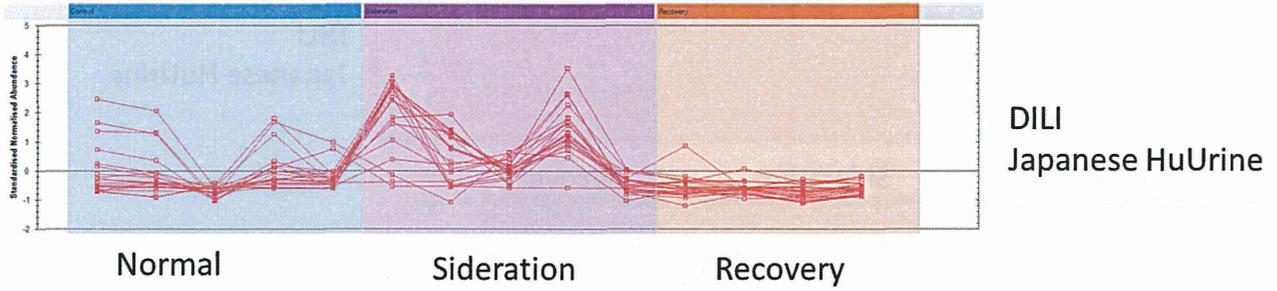
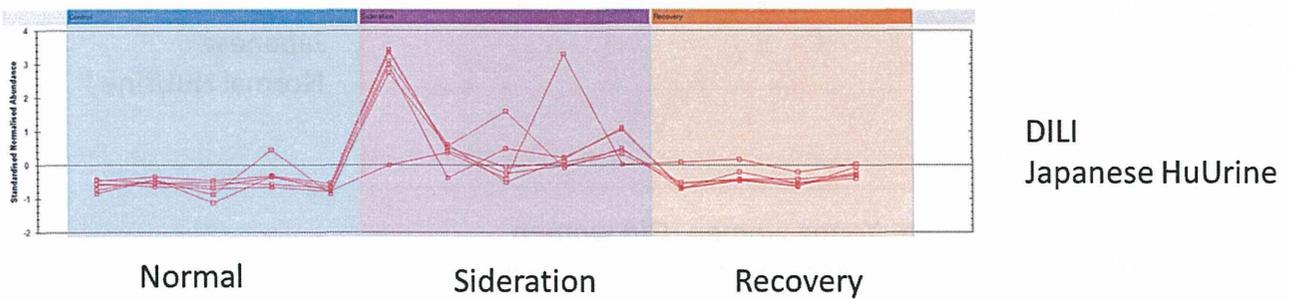


図 8 薬物性肝障害のバイオマーカー候補タンパク質の発現パターン

1. Leucine-rich alpha-2-glycoprotein



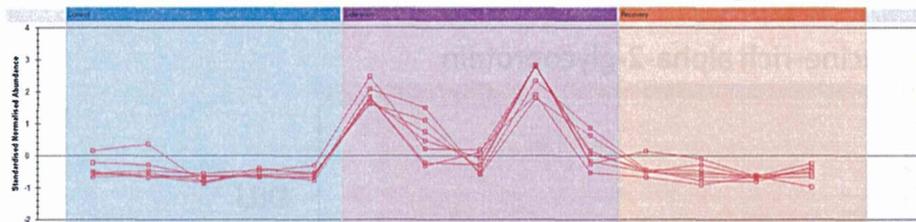
2. Alpha-crystallin B chain



Japanese
Normal HuUrine

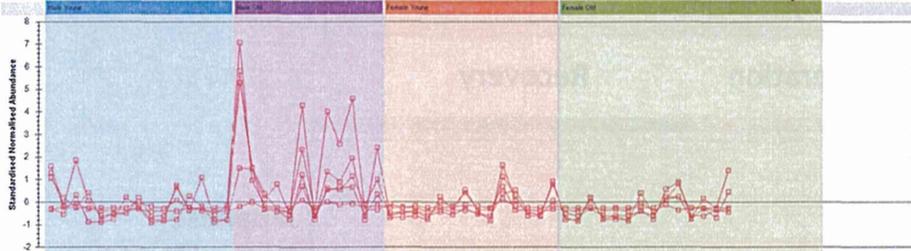
Caucasian
Normal HuUrine

3. Alpha/beta hydrolase domain-containing protein 14B



DILI
Japanese HuUrine

Normal Sideration Recovery

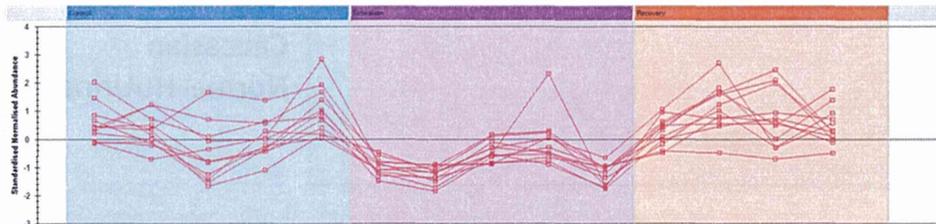


Japanese
Normal HuUrine

Young men Old men Young women Old women

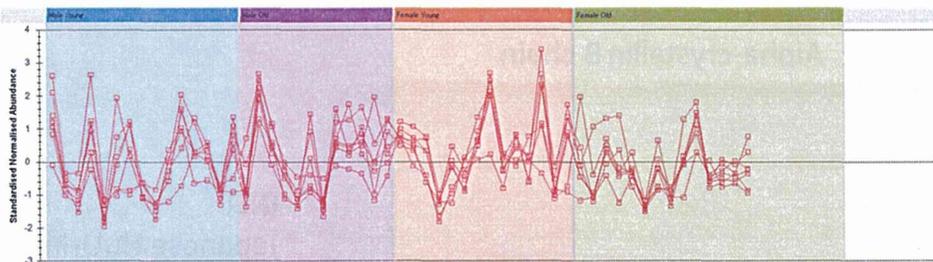
Caucasian
Normal HuUrine

4. Hemicentin-1



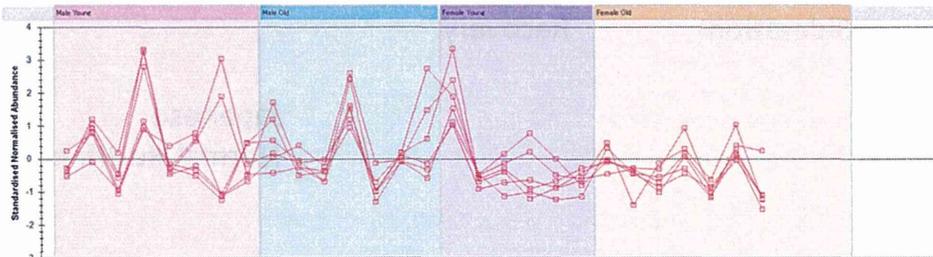
DILI
Japanese HuUrine

Normal Sideration Recovery



Japanese
Normal HuUrine

Young men Old men Young women Old women



Caucasian
Normal HuUrine