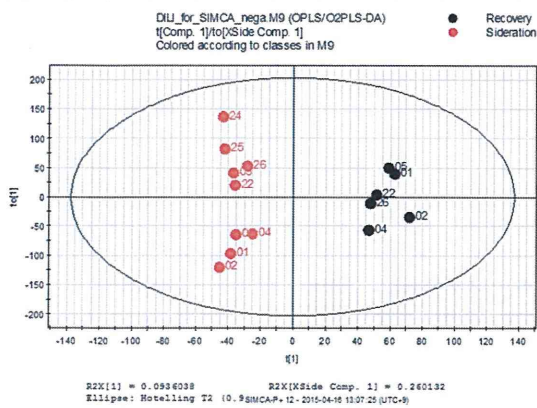


(A) 肝細胞障害型の薬物性肝障害9患者15サンプルによるスコアプロット



(B) 肝細胞障害型の薬物性肝障害9患者15サンプルによるSプロット

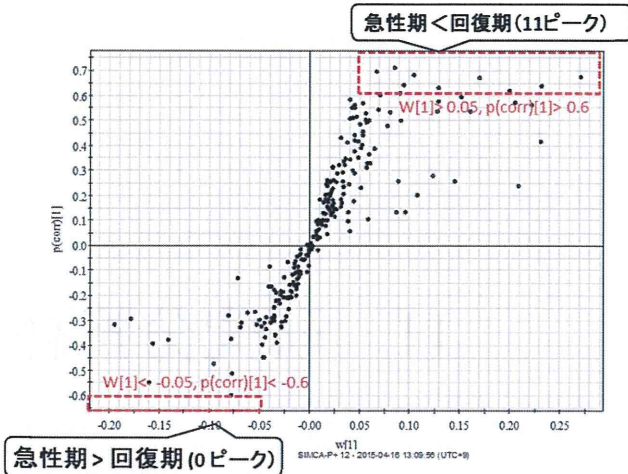


図24 薬物性肝障害患者の急性期と回復期における血漿脂質メタボロームのOPLS-DA解析による判別

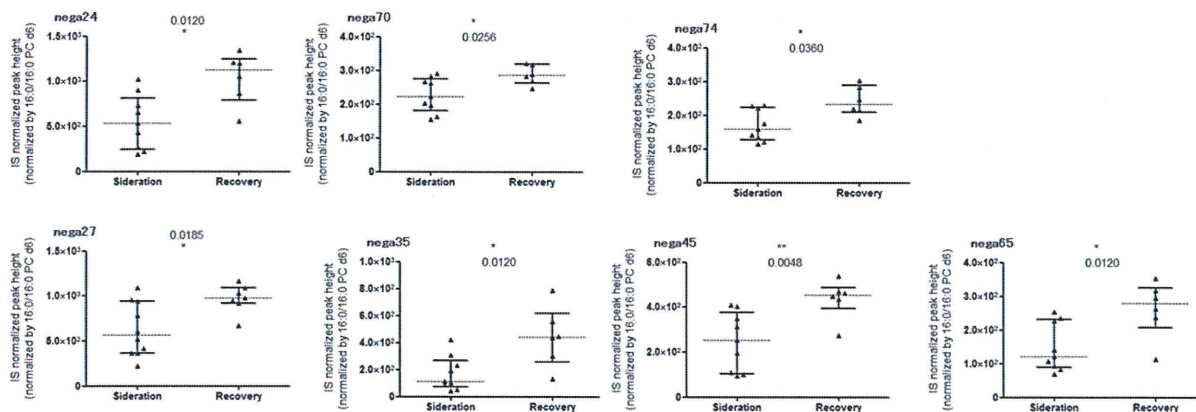


図25 OPLS-DAプロットより見出された肝細胞障害型の薬物性肝障害の急性期と回復期を判別する脂質代謝物バイオマーカー候補(リン脂質、スフィンゴ脂質)

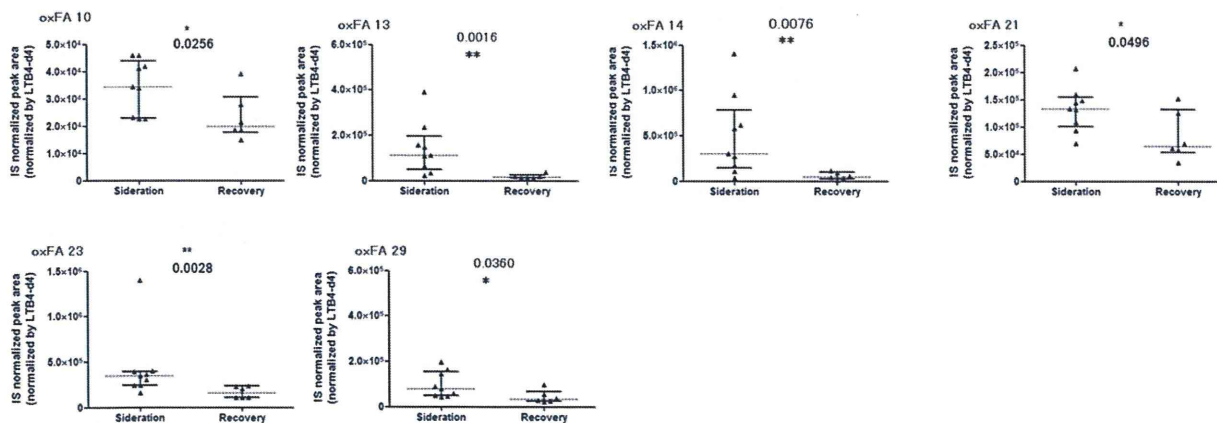


図26 肝細胞障害型の薬物性肝障害の急性期と回復期を判別する脂質代謝物バイオマーカー候補(酸化脂肪酸)

II. 研究分担総合報告書

平成 24-26 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)
研究分担総合報告書

副作用バイオマーカーの動向調査およびヒト副作用試料の収集・バンク化

研究分担者 熊谷 雄治 北里大学医学部 教授
研究協力者 田中 理英子 北里大学医学部 特任助教

研究要旨：

薬物有害反応の中で、肝、腎等への臓器障害は薬物治療の上で重要であり、早期発見・病勢判断のための感度、特異度の高いマーカーが望まれる。このことから、平成 24 年度から 25 年度にかけ、各疾患領域の専門家が参加する臨床研究事務局を設置し、新しいマーカー検索のための具体的な検体の採取・取り扱い手順を踏まえた研究体制を構築した。臨床研究事務局は消化器内科専門医と協力の下に薬剤性肝障害におけるバイオマーカー探索のための試験計画書、複数診療科にわたる試験を効率的に施行するための資料作成を行い、平成 25 年度に研究を開始した。本研究は複数の医療機関、多科にわたるものであり、臨床情報の書式が統一されておらず、情報管理が煩雑なものとなっていた。そこで、高品質かつ効率的な情報管理のための IT 技術を用いた新たなデータベース構築を試みた。この体制は薬剤性肝障害のみではなく、各診療領域におけるヒト副作用試料を患者背景情報・副作用情報とともに収集可能にするものであり、薬剤性臓器障害の早期発見・病勢判断のための感度、特異度の高いマーカー検索が可能となることが期待される。

A. 研究目的：

薬物有害反応の中で、肝障害は死に至る可能性、後遺障害を残す可能性があり、その早期発見は薬物治療の上で重要であるが、現在使用されているマーカーは特異性に関して問題があり、感度、特異度ともに高いマーカーが求められている。今回、臨床的に使用されているマーカーの調査およびそれに基づいた複数診療科にまたがる臨床研究体制を構築した。その体制のもとで薬剤性肝障害を発症した臨床検体と背景情報を収集する研究を開始した。

B. 研究方法：

1) 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計画の作成

北里大学医学部附属臨床研究センターおよび北里大学東病院消化器内科が中心となり、計画を作成した。各診療科において発生した薬剤性肝障害患者を対象とし、肝障害発生時および回復時の血液・尿検体を採取することとした。また、検体を主任研究者の所属機関である国立医薬品食品衛生研究所へ匿名化の上送付する手順を作成した。被験者の選択基準、除外基準は以下の通りである。

【患者群の選択基準】

1) 薬剤性肝障害と診断された患者
<診断基準>

ALT が正常上限の 2 倍、もしくは ALP が正常上限を超える症例で、新たに薬剤性肝障害が疑われた者

2) 本研究への参加の意思があり、文書による同意が得られた患者

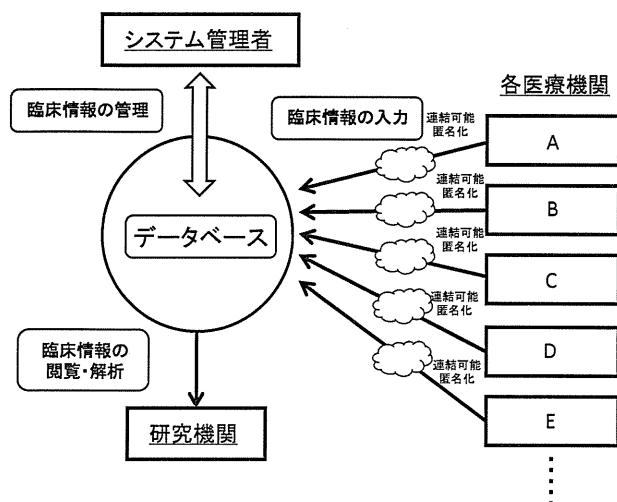
【患者群の除外基準】

1) 急性・慢性ウイルス肝炎、無症候性キャリア、アルコール性肝障害、過栄養性脂肪肝、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、胆石症、閉塞性黄疸、ショック肝などの疾患を有する者

2) DDWJ-2004 スコア 4 点以下の者

3) 医師が本臨床研究の対象として不適格と判断した者

本研究は消化器内科日高央医師を臨床研究責任者とし、北里大学・病院倫理委員会の審査を受け、施行を承認された。



(倫理面での配慮)

本研究はヘルシンキ宣言および臨床研究の一般指針を遵守して施行している。また前述のように、北里大学医学部病院倫理委員会の承認を受けて開始した。

C. 研究結果：

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。また、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。

D. 考察：

今回構築した臨床研究体制により、各診療領域におけるヒト副作用試料が患者背景情報・副作用情報とともに収集可能となった。今後は背景データおよび試料のバンク化が必要である。現時点では肝障害を対象としているが、診療領域を拡大すること、マーカーの探索範囲を広げることなども考慮に値すると思われる。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

薬剤性肝障害の早期発見・病勢判断のための感度、特異度の高いマーカー検索を行う臨床研究体制を構築し、検体採取を開始した。また、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。この基盤は今後、参加機関が増加した場合にも応用可能である。現在の症例数はまだ少数で

あるが、順調な集積が期待される。

F. 健康危険情報：

特になし。

G. 研究発表：

1. 論文発表
 - 1) 熊谷雄治：国内臨床試験における心臓安全性評価の現状と将来。谷本学校毒性質問箱、14, 20-35, 2012.
 - 2) 熊谷雄治：早期臨床試験の国際展開の中で日本の進むべき方向性：臨床評価、40, 288-295, 2013.
2. 学会発表
 - 1) 熊谷雄治：非臨床試験データからのヒト安全性の予測。日本薬物動態学会第27回年会（2012.11、東京）
 - 2) 熊谷雄治：早期臨床試験における安全性バイオマーカー。第33回日本臨床薬理学会学術総会（2012.12、沖縄）

H. 知的財産権の出願・登録状況：

1. 特許出願
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

平成 24-26 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)
研究分担総合報告書

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要件の確立

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、ラットを実験モデルとして、LC-MS を用いたショットガンプロテオミクスによる高感度分析法を確立した。ラット尿中では Major urinary protein (MUP) 等の発現量の多い一部のタンパク質の存在がより発現量の低いタンパク質の検出の障害となっていたため、尿サンプル中のタンパク質を沈殿させる際に用いる有機溶媒としてアセトンおよびエタノールの濃度を 60% 以下に抑えることにより、収率は落ちるものの比較的分子量 (21KD) の MUP を除くことができた。これにより、その後の LC-MS による解析において、検出されるピーク数が大幅に増加し、1 回の分析で 4 万を超える数のペプチドピークを検出することができた。この手法を用いて、性差、絶食時間、採血時間、週齢差など基本的な実験条件がラット尿プロテオーム発現解析に与える影響を検討した結果、雌雄間で最も大きな変化が見られ、雄、および雌特異的に発現しているタンパク質を同定した。絶食に関しては大きな変化はなかった。週齢差の影響については、高週齢の雄ラットの一部において高発現量のタンパク質が大きなバラツキの要因となることがわかり、これらを同定したところ、精子形成に関わるタンパク質であることがわかった。

次に、同様の手法を用いてヒト尿を用いた解析を行い、プロテオーム解析によるバイオマーカー探索の際に重要なファクターとなる個体差によるばらつき、およびその要因に関して検討を行った。ヒト尿は通常の解析において、検出されるペプチドピークの数に数十万ピークとなり、MS/MS スペクトル測定によるデータベース検索との組み合わせによりこれまでに 3 千近くのタンパク質を同定した。

この手法を用いて、市販の白人由来コントロールヒト尿サンプルの解析を行い、基礎的条件として、性差、年齢差による影響を検討したところ、サンプル間でのプロテオーム発現のバラツキはラットに比べて大きく、主成分分析においては、性差、年齢差ともに明らかな傾向を示さなかった。ドナー情報として利用可能であった体重および身長より Body Mass Index (BMI) を計算し、BMI による肥満度との関連を検討したところ、肥満度により主成分分析プロットが群分けされる傾向を見出した。次に日本人由来の尿サンプルについても解析を行い、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探索として、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探索を行った。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 α 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。

A. 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。そして次年度は、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うことを目的とした。

さらに、最終年度では、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探索を行った。さらに、ヒト尿プロテオーム解析におけるばらつきの変因となるタンパク質についても、検討を行った。

B. 研究方法：

ラット尿中プロテオーム解析の高感度化に向けた試料前処理方法と LC-MS/MS 測定条件の最適化および定量的解析法の確立

1) タンパク質の沈殿および消化条件

(タンパク質画分の調製)

尿からのタンパク質画分の抽出、精製の手法として、有機溶媒（アセトン、アセトニトリル、エタノール）によるタンパク質の沈殿条件について検討した。

(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、QubitTMspectrometer (Invitrogen)にてタンパク質濃度を測定した。タンパク 15 μ g 相当量の尿をとり、所定量の有機溶を加え、タンパク質を沈殿させた。この際の、温度、時間についても検討を加えた。

その後 14,000xg にて 15 分間遠心分離後、上清を除き、沈殿を 500 μ l 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 μ l 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 μ l に、30 μ l 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 μ l 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 μ l (0.25 μ g/ μ l) 加え、37°C で一晩消化した。消化液を、ZipTip C18-P10 (Millipore) にて精製後、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 μ m 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 5xe⁵
- ・MS/MS 測定件 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) ラット尿サンプルの採取

メタボローム解析用の採血のためのラットを絶食期間中代謝ゲージにて飼育し、尿サンプルを採取した。今回解析したサンプルは以下の4および5群のサンプルであり、それぞれ週齢による影響を見る目的で、1および3群のサンプルとの比較を行った。

Group No.	Sex	Age	Fasting duration	Blood collection	Animal code
1	Male	10 w	16 h	Morning	M1 to M10
2	Male	10 w	0 h	Morning	M11 to M20
3	Female	10 w	16 h	Morning	F21 to F30
4*	Male	30 w	16 h	Morning	M31 to M40
5*	Female	30 w	16 h	Morning	F41 to F50
6	Male	10 w	22 h	Morning	M51 to M60
7	Male	10 w	22 h	Afternoon	M61 to M70

6) 白人尿サンプルのプロテオーム解析

白人ヒト由来の尿サンプル 30 検体を使用した。サンプルはいずれも Caucasian 由来で、PROMEDEX 社より市販されている、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、使用したサンプルのドナー情報は以下の通りである。

	Gender	Age	Weight - kg	Height - cm	BMI	Obesity
1	F	25	128.8	170.2	44.5	Obese
2	F	25	139.7	167.6	49.7	Obese
3	F	26	147.4	182.9	44.1	Obese
4	F	27	93.4	162.6	35.4	Obese
5	F	28	59.9	154.9	24.9	Normal weight
6	F	30	139.7	172.7	46.8	Obese
7	F	33	64.0	157.5	25.8	Overweight
8	F	34	86.2	167.6	30.7	Obese
9	F	55	90.7	162.6	34.3	Obese
10	F	56	114.3	162.6	43.3	Obese
11	F	58	96.2	162.6	36.4	Obese
12	F	59	106.6	172.7	35.7	Obese
13	F	60	82.6	162.6	31.2	Obese
14	F	62	65.8	152.4	28.3	Overweight
15	F	63	74.4	157.5	30.0	Obese
16	M	25	66.2	170.2	22.9	Normal weight
17	M	26	52.2	154.9	21.7	Normal weight
18	M	27	108.9	182.9	32.5	Obese
19	M	28	59.9	167.6	21.3	Normal weight
20	M	28	78.0	172.7	26.2	Overweight
21	M	30	80.3	172.7	26.9	Overweight
22	M	32	109.3	172.7	36.6	Obese
23	M	33	72.6	157.5	29.3	Overweight
24	M	55	69.9	167.6	24.9	Normal weight
25	M	57	73.9	177.8	23.4	Normal weight
26	M	57	67.1	185.4	19.5	Normal weight
27	M	59	91.2	175.3	29.7	Overweight
28	M	60	95.3	165.1	34.9	Obese
29	M	62	80.3	188	22.7	Normal weight
30	M	64	116.1	188	32.9	Obese

肥満度に関しては、BMI の値を元に、以下のように分類した。

Obesity	BMI scale
Underweight	<18.5
Normal weight	18.5–24.9
Overweight	25–29.9
Obese	30+

7) Proteo Miner Kit を用いた高発現タンパク質除去による高感度化

これまでの検討により、ラットの尿中には比較的高発現量のタンパク質として Major Urinary Protein 群があり、低発現量のタンパク質の検出に影響を与えていることがわかったため、さらなる系の高感度化を目指して、ProteoMiner Protein Enrichment Kit (BioRad) を用いた高発現タンパク (ペプチド) の除去を行った。ProteoMiner はランダムペプチドが結合したビーズにより、一定量のターゲットタンパク質のみを吸着し高発現量のタンパク質を除去するこれまでとは逆の発想に基づく前処理法であり、低発現量のタンパク質の効率的な検出が期待される。ヒト血清およびラット尿サンプルを用いて一定量の ProteoMiner ビーズとマイクロチューブ内で反応させ、タンパクおよびペプチドを結合させた後、洗浄液にて非結合タンパク (ペプチド) を除いた後、溶出液にて結合したタンパク (ペプチド) を溶出させ、アセトン沈殿後、通常のプロトコールに従って LC-MS 解析を行った。

8) 日本人正常尿サンプルのプロテオーム解析

委託した臨床試験機関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。いずれも健常人由来で、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 ≤ BMI ≤ 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。

9) 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探索を行った。臨床検体は、肝障害発生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 1 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 1 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の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探索を行った。

(倫理面での配慮)

動物実験は、「国立医薬品食品衛生研究所 動物実験の適正な実施に関する規程」に従い、動物実験委員会の承認のもと、実験を行った。

白人・黒人の血液試料を用いた研究は、ProMedDx 社から市販されている血漿を使用した。ProMedDx 社において被験者から適切な同意を取得後、採取された試料であり、個人情報に連結不可能匿名化されていることから、機関研究倫理審査委員会への申請は非該当とすることが認められている。健常日本人の血液試料を用いた研究は、研究実施機関である国立医薬品食品衛生研究所、及び研究実施医療機関等の研究倫理審査委員会の承認のもと実施した。本研究は、「臨床研究に関する倫

理指針」(平成26年12月22日改訂)、及び臨床研究指針を遵守した。全ての健常ボランティアには、説明・同意文書にて、本研究の内容や同意撤回の権利等を十分説明した後、自由意志により文書で同意を得た。また全ての生体試料および情報は委託先の医療機関で連結不可能匿名化されてから国立衛研に提供された。

薬物性肝障害をはじめとする副作用患者試料の収集は、国立医薬品食品衛生研究所、北里大学等の各医療施設の倫理審査委員会の承認の下、「臨床研究に関する倫理指針」に準拠して行っており、被験者の同意も適正に得て行った。個人識別情報は、連結可能匿名化された資試料とは完全に切り離されているため、個人情報の漏洩の問題はない。

C. 研究結果：

1) 標準的解析法による予備試験

ラット尿プロテオームの概略をつかむ上で、まず標準的な解析法であるアセトン 80%、-20℃、1時間処理によるタンパク質の沈殿を行い、通常のトリプシン消化後、LC-MS/MS測定を行った。その結果検出されたペプチドピークの全体像を可視化するために、得られた質量分析データをProgenesis LC-MS ソフトウェア上にて、3次元グラフ化した。

その結果、図2に示すように、多数のペプチドスポットが検出されたが、幾つかのピークに関しては存在量が多いため、テーリングを起こしていた。次に、得られたMS/MSデータをもとに、MASCOTによるデータベース検索を行い、ペプチドが由来するタンパク質の同定を行った結果、多数のタンパク質が同定された。使用した尿サンプルが雄由来であったことを反映して、最も同定されたペプチド数の多かったのが、雄特異的タンパク質とされる major urinary protein (MUP)であった。この他、上位にランクされたタンパクとして urinary protein 1,2,3 (UP1, UP2, UP3)があり、これらのペプチドが3次元グラフ上の濃いスポットに相当することが確認できた。

通常LC-MS測定におけるエレクトロナノスプレーによるイオン化では、イオン化できるペプチドの量に制限があるため、こうした高発現量のタンパク質由来のペプチドと同時に溶出する他のペプチドのイオン化が抑制される。また、LC分離が難しくなるためインジェクションできるペプチドの量が制限され、その大部分を特定のペプチドが占めることになるため、微量ペプチドの検出が難しくなる。一般に、バイオマーカーとされるタンパク質は、その発現量が微量であることが多く、こうしたプロテオーム解析によるバイオマ-

ーカーの検出においては、高感度化のためのキープイントとして、高発現量のタンパク質の前処理による除去が重要な課題となっている。特に血清プロテオーム解析においては、アルブミンやイムノグロブリンなどの高発現量のタンパク質数種のみで全体の9割以上を占めるため、抗体カラム等による前処理による除去が必須となっている。我々は以前にマウスを用いた尿中プロテオーム解析の検討において、ラットと同様にMUPおよびUPが高発現しており、これらの除去のため抗体を作成して、イムノプレシピテーションによる除去を試みたが、効率的に除去できなかった経験から、別のアプローチをとることにした。より安価で簡便に特定のタンパクを除去できる手法としてタンパク質の沈殿法に着目し、高発現量のタンパク質の除去のための条件検討を行った。

2) 尿タンパク質の沈殿法に関する検討

通常のプロテオーム解析においては、なるべく多くのタンパク質を沈殿として回収したいため、比較的濃い有機溶媒濃度(アセトン終濃度80%)を用いて沈殿操作を行うが、異なる有機溶媒、および異なる終濃度を用いることにより、一部のタンパク質のみを沈殿させ、MUP等の高発現タンパクが除去できるかを検討した。また、沈殿時のインキュベーション温度、時間、振とう有無、および沈殿操作前のタンパク質の変性処理の影響について検討を行った。

図3に有機溶媒としてエタノールを用いた際の、濃度変化による沈殿タンパク質の変化をBioAnalyzer (Agilent)にて調べた結果を示したが、終濃度として70%以下になると、21KDのMUPを含めて、80%にて見られた濃いバンドが消失していくことがわかった。これは、有機溶媒濃度が低くなると、比較的分子量の小さいタンパク質が沈殿しづらくなるためであると考えられる。

アセトニトリル、アセトンに関しても同様の検討を行い、最終的なパフォーマンスの評価を、Progenesis LC-MSを用いて検出できる総ペプチド数をもとに判断した。異なる終濃度のアセトン(A)およびエタノール(E)を用いた際に、LC-MS解析で得られた総ペプチド数および同定タンパク数の結果を図4に示した。両者を総合して最も良い結果が得られたのがE50%を用いた場合であり、ペプチド数として約25,000、同定タンパク数として455が検出、同定された。

一方、この際のタンパク質の回収率に関して検討を行ったところ、図5に示すように、有機溶媒濃度が下がるにしたがって回収率は減少し、E50%においては、回収率は14.1%であった。回収率は

低いものの、高発現量のタンパクの除去効果により、検出できるペプチドの総数が増えたと考えられる。新たに検出できたペプチドに関して、Progenesis を用いてその位置を確認したところ、リテンションタイムが MUP 等由来の濃いスポットの近傍であることがわかった。この結果は、前述のイオンサプレッションの効果を反映するもので、高発現量のタンパク（ペプチド）の除去により、本来は存在していた同時に溶出する微量ペプチドのシグナルが検出できるようになったことを物語っている。以上の結果より、今後の検討には、エタノール 50%（終濃度）にて沈殿させることにより、尿タンパク（一部）を回収することとした。

沈殿生成時のインキュベーション温度（-20℃、4℃、室温）、振とうの有無、事前のタンパク質変性操作（尿素または還元アルキル化による）に関しても検討を行ったが、有機溶媒濃度ほど大きな変化は見られなかった。そこで、操作の簡便性からも、インキュベーションは、室温にて 1 時間、振とうなし、事前変性処理なしの条件を標準プロトコールとして採用することにした。

次に解析に必要な尿サンプルの必要量の検討を行った。これまでの検討により、通常の LC-MS へのインジェクションに適切なペプチドサンプル量 4 μ g を得るために、トリプシン消化時の必要タンパク量として 12 μ g を設定した。この 12 μ g のタンパク質を沈殿として得るための初期タンパク量として、オスの場合の回収から余裕を見て 300 μ g を設定した。この量のタンパク質を得るために必要な尿サンプルの容量は、平均約 250 μ l であった。一方、メスの場合にはオス特異的 MUP タンパク質の発現が低いため、オスに比べて少なめの量として 200 μ g を設定した。この際の、平均必要尿量は、430 μ l であった。

3) 各種実験条件下における尿中プロテオームの変化

30 週齢の群を除く 6 群のラットから得られた LC-MS データを Progenesis に取り込み、ペプチドピークの検出およびアラインメント、定量比較を行った。

その結果、全 47 サンプルを統合して得られたペプチドピークの総数は 347,622 であり、MS/MS データを統合して MASCOT 検索を行った結果、同定されたタンパク質の総数は、1,954 であった。類縁タンパクが重複してヒットする場合もあるので、実数はもう少し減ると考えられるが、2000 近い同定数が得られたことは、満足が行く結果であるといえる。さらに、図 6 に示すように、得られたペプチドピークのうち、タンパク質として同

定され Progenesis のフィルターをクリアした（信頼度の高いもの）総数は 2861 であり、この割合はわずか 0.8% であった。また、MS/MS データが得られたピークは全体の 13.2% であり、大部分のペプチドは MS/MS 測定がされなかった。これは、サンプルの複雑性を象徴するものであり、繰り返し測定を行うことによってさらに同定数を増やせることが期待できる。ただし、効率的なアプローチとしては、Progenesis による定量解析の結果、発現量の差が見られたバイオマーカー候補に絞って、再び MS/MS 測定を行うことにより、狙い撃ちによる同定をかけることが望ましい。

得られたデータを統合して、群ごとのばらつきおよび類似性を評価するため、主成分分析による統計解析を行った結果を図 7 に示す。主成分分析 (PCA) においては、類似した特徴をもつデータが近傍にプロットされるため、同一群内の個体からのデータは、比較的まとまりを持ってプロットされた。なかでも類似性が高く平均的な位置にプロットされたのが第 7 群の雄、22 時間絶食、午後採血のグループであった。この群だけ、午後の採血であるが、尿の採取は 22 時間行っているため、他群に比べてデータのばらつきが少なかった原因は不明である。

比較的ばらつきが大きかったのが第 2 群の非絶食群であるが、この群においてはサンプルの品質が悪かった。ばらつきの要因となっているのは 1 個体のみであるが、10 匹中 7 匹のマウスで解析可能な分析データが得られず、食餌の混入などの原因が考えられる。今後原因に関しては明らかにしていかなければならないが、現時点では絶食を行った方が良いデータが得られるという結論になる。ただし、絶食と非絶食群の間には PCA 上大きな差異は見られず、メタボローム解析のように食事の影響は受けにくいことがわかった。

雌雄間の比較においては、予想されたように比較的差が見られ、第 3 群のメスデータは他の雄データから離れた位置にプロットされたが、これは主に第 2 主成分による寄与が大きい。第 1 主成分による変化は、主に各群内での個体間のばらつきを与える要因となっていることがわかる。今後、どのようなタンパクがばらつきを与える要因になっているかについても、検討を加えたい。

雌雄差に関してももう少し詳しく検討を行った結果、図 8 に示すように、雌雄共通して発現するタンパク 909 に対し、雄のみで発現するタンパクは 544、雌のみで発現するタンパクは 533 とどちらも約 1/3 程度を占めた。これらのうちで、発現量の高いものを（表 2）にリストした。雄特異的タンパク質としては、前立腺や精巣など雄特異的臓器にて発現するタンパク質が含まれており、妥

当な結果といえる。雌特異的タンパク質には、BRCA1,2, IP₃受容体、PIP₂など機能的に注目されるタンパク質も含まれており、性特異性との関連が注目される。

当初雄特異的なタンパク質であると考えられた MUP に関しては、雌での詳細な検討により、個体によっては比較的発現の高いラットもあることが判明した (図 9)。雄も含めて、MUP の発現量には個体間差が大きく、ばらつきの原因となっていることが示唆された。

絶食時間の差に関しては、大きな影響を受けなかったが、絶食期間の延長によって発現の上昇したタンパク質を表 3 に示した。アルブミンが比較的大きな変化を示したが、尿中アルブミンは腎障害のマーカーとしても使われるため、絶食の影響を受けやすい点には注意が必要だといえる。

また採尿のタイミングに関しては多少の差が見られたが、昼夜の排尿のタイミングによる個体差をなくす意味では、今回は検討しなかったが 24 時間尿を採取することが望ましいと考えられる。

4) ラット尿プロテオーム解析における週齢差の影響

高週齢のサンプルについても解析し、全データが揃ったので、全体をまとめて主成分分析による解析を行った。その結果、図 10 に示すように、各群内で比較的まとまったパターンを示すことがわかった。群内でのばらつきは第一主成分 (PC1) 方向に観察された。雌雄各群において週齢差の影響を検討したところ、雄は比較的近いパターンを示したのに対し、雌の高齢群においては比較的他と違うパターンを示していた。30 週例の雌雄ラットのデータのみを取り出して検討したところ、図 11 に示すように、雄の群内において明らかな分離が認められた。孤立した雄サンプルにおいて特異的に発現しているタンパク質を Progenesis および Mascot 検索による同定を行ったところ、Seminal vesicle secretory protein 2、Prostatic spermine-binding protein、Aminopeptidase N という三種類のタンパク質が同定された (図 12)。これらのタンパク質は、精子および精液と関連があるため、これらの個体における精子(精液)の形成と関連があることが示唆された。

5) Proteo Miner Kit を用いた高発現タンパク質除去による高感度化の検討

これまでの検討において、ラット尿中には高発現タンパク質として MUP タンパク質群が存在し、これらが低発現量のタンパク質の検出感度を落としていることが考えられたため、昨年度はタンパク質沈殿の際に用いる有機溶媒の種類と濃度

に関する検討を行い、最終的にエタノールを 50% の濃度で用いることにより MUP 群以外のタンパク質を選択的に沈殿させ、検出されるペプチドの総数を増やすことに成功した。今後、ヒトを含めた試料として、血清タンパクの解析を行う必要性も出てくると考えられるが、血清中ではアルブミンなどの高発現量のタンパク質の占める割合が高く、よりこれらの除去が重要な課題となる。従来血清中の主要な高発現タンパクは、それらに対する抗体を結合したカラムを用いた除去法が検討されてきたが、価格と効率面において必ずしも満足するパフォーマンスは得られていなかった。しかし、最近になって新たな原理に基づく高発現タンパクの除去法として、主に 2 次元電気泳動のサンプル前処理を目的とした ProteMiner というキットが利用可能となった。これは、特定の抗体を用いるのではなく、ランダムに合成したペプチドを担体に結合させたもので、低用量のペプチドを含めて親和性のあるペプチドを普遍的かつ量的な制約を持って結合させることにより、高発現タンパク質を除き、低発現タンパクの相対的な割合を増やすことにより検出ペプチド数を増やすという従来とは逆の発想による手法を用いている。元来 2 次元電気泳動用に試薬類が設計されているため、我々は系を LC-MS サンプル用にスケールダウンすることを検討した。

まず最初に、高発現タンパクがより問題となるヒト血清を用いて、検出されるペプチド数の変化を検討した。用いる担体の量としては、規定量およびその 1/5、1/10 スケールを検討した。その結果、図 13 に示すように、未処理 (Raw) 群と比較して、処理群では 1/10 スケール群を除き、いずれも Progenesis ソフトウェアにて検出される総ペプチド数、Mascot にて同定された総タンパク数、取得 MS/MS スペクトル数ともに増加が見られた。特に 1/5 スケールでは、規定量と同等もしくはそれ以上の効果が得られており、経済的な面からも 1/5 スケールでの処理が適当であると結論づけた。

次に、同様の検討をラット尿サンプルに対しても検討した。ここでは、用いる担体量は 1/5 としたが、血清タンパクに比べて尿タンパクはタンパク含量が低く必要な液量が大きいためという問題もあり、遠心濃縮処理を行い濃度調節したサンプルも同時に検討した。その結果、図 14 に示すように、我々が開発した 50%エタノールを用いる方法と比較し、濃縮処理を行った場合に MS/MS スペクトルの取得数の若干の増加が見られたが、総ペプチド数および総タンパク数に明らかな向上は見られず、ラット尿に関しては 50%エタノールによる選択的沈殿法で十分であることがわかった。

6) 白人尿サンプルのプロテオーム解析

ヒト尿中にはこれまでの予備的な検討によりラット尿中のような高発現量のタンパクはないことがわかっていたので、通常の手法でサンプル処理を行い、解析をすることにした。

サンプルは正常白人由来の尿であり、男女各 15 サンプルに対して、25-35 歳の若年群と、55-65 歳の高齢群とを設定した。

これらの検体に関して LC-MS データを取得し、Progenesis にて解析した結果を用いて全体を主成分分析した結果を図 15 に示す。

ヒト尿サンプルの場合、主成分分析によりラットに見られたような群内でのまとまりは見られず、ランダムなばらつきの大い傾向を示し、性差や年齢差を越えて個体間のバラツキが大いことがわかった。そこでこのバラツキの要因に関して考察を加える目的で、サンプルのドナー情報として利用可能であった身長および体重のデータを元に BMI の値を算出し、これを基準に正常体重 (Normal weight)、過体重 (Overweight)、肥満 (Obese) の 3 群に分類した。この群分けによる情報を主成分分析プロットに導入すると、図 16 に示したように、肥満度によって群分けがされる傾向が認められた。即ち、肥満度によって第二主成分 (PC2) 方向に分類される傾向にあり、肥満群のサンプルは全てグラフの上半分に位置した。個体間のばらつきは、第一主成分方向に広がっており、ラットの場合と合わせ、第一主成分即ち個体差の要因となっているタンパク質の解明が今後の課題である。

肥満度による尿中タンパク発現の変化を、尿中の主要タンパクであるアルブミンを例にとり示したのが図 17 である。ラットの場合は個体間で比較的均一な発現を示すが、ヒトの場合には特に高い発現を示す個体が存在し、年齢には影響を受けない。しかし、肥満度で分類した場合にはきれいな傾向を示し、肥満度が高い個体において発現が高い個体が多くみられた。

7) 白人尿における性差、年齢差、肥満度の差により変化するタンパク質の同定

ラットの場合と同様、性特異的な発現を示すタンパクを調べた結果を図 18-19 に示す。男性特異的なタンパク質のうち半数以上がケラチン類であったが、これは尿な採取にあたって、男性の場合ケラチンの混入が多いことを示している。トップヒットした Glutamyl aminopeptidase は腎近位尿細管上皮に発現するタンパク質であり、性差を示す点は興味深い。Bromodomain testis-specific protein については、その名の示すとおり男性特

異的であることは納得がいくが、活性酸素除去酵素である Catalase が性差を示した点は注目される。尿中カタラーゼは尿路感染や炎症のマーカーとして用いられており、注意が必要である。女性特異的な発現を示すタンパク質も同様にリストアップされたが、トップヒットである $\alpha 2$ -macrogloblin-like protein は $\alpha 2$ -macrogloblin 自体が最近アルツハイマー病の進行にかかわる女性特異的なバイオマーカーとして報告されている点で注目される。

次に、年齢差を示す特徴的なタンパクを図 20 に示した。明らかな年齢差を示すタンパクは少なく、若年群で発現の高いタンパク質として CD59、Interferon induced protein with tetratricopeptid repeats 2、multimerin-1、sulphydryl oxidase-1 の 4 種類のみが同定された。CD59 は赤血球の膜抗原であり、その他のタンパク質についても、主に血液由来であると考えられる。

さらに、肥満度により発現差の見られたタンパク群は 460 と多数見られたが、その一部を図 21 に示した。これらのタンパク質は肥満度の影響を受けやすい点で注意が必要であるが、逆に肥満が誘発する疾患のバイオマーカーとなりうることも期待できるため、個々のタンパクの機能との関連性が注目される。

8) 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、218,755 個であった。そして、得られた MS/MS スペクトル情報を基に、MSCOT によるデータベース検索をした結果、1,282 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 22 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 23 に示すように、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、 β -microseminoprotein が同定された(図 24)。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 25)。このうち、Annexin A1と A2は、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 26 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 27)。

9) 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探索

図 22 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(PC1)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 4)。

このリストを、先に得られている白人でのデータ(表 5)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 6 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。

10) 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探索

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探索した。探索にあたっては、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と除外。
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 7 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 28 に示す。

最上位にランクされた Leucine-rich α 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、A-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：

プロテオーム解析によるバイオマーカー開発の成否を決める最も重要な要素としては、検出系の感度を高めることがあげられる。これまで、2次元電気泳動を中心にして多くのバイオマーカー候補が見つけれられてきたが、その大部分は高発現量のタンパク質であり、真に有用なバイオマーカー

一となるものは少なかった。各種サイトカインや腫瘍マーカー等のバイオマーカーは、その発現量が低いことが多く、これらの発現量まで解析系の検出感度を高めることが必要とされる。特に血液の場合には、アルブミン、IgG等の数種の高発現量のタンパク質が9割以上を占めており、これらの除去が必要であることから、解析が難しい。これに対して、尿中のたんぱく質に関しては、高発現量のタンパク質が血液中ほど顕著ではないため、解析がしやすいという利点がある。また、安定性、採取のしやすさという観点からも、バイオマーカー探索のための生体試料として好都合であるため、我々は以前より尿中プロテオーム解析に注目して検討を行ってきた。

その過程で、血液中ほどではないもののやはり尿中にも比較的発現量の高いタンパク質があり、さらに検出感度を高めるためには、これらを除く前処理が必要であるという結論に達した。そして、本研究においては、ラット尿中において高発現するMUPおよびUPを適当な有機溶媒による選択的沈殿という比較的簡便な方法で取り除く方法を開発した。この方法を用いて、今年度はラットの性差、絶食の影響などについて検討し、基本的なデータを得た。特に性差に関しては予想されたように変化が見られ、尿において性特異的に発現するタンパク質を同定した。一般に、バイオマーカーとしては性差の影響を受けにくいものが望まれ、これらのタンパク質は適切ではないと考えられるが、性特異的なレスポンスを反映するマーカーとしては、むしろ有望である可能性がある。いずれにしても、バイオマーカー候補を同定した場合には、性差に関する情報を得ておくことも重要であると考えられる。

こうした基本的実験条件による尿中プロテオーム発現の変化に関して検討したが、PCA解析の結果得られた情報として、同一群内の個体間のばらつきがPC1方向に認められる傾向があった。こうした分子はバイオマーカーとしては望ましくない。今回は、採血との関係で16および22時間という時間を設定したが、採尿だけを考えた場合には、24時間尿を採取するのが良いと考えられる。尿サンプルとしては、起床後最初の尿が最適であると考えられるため、この尿を確実に採取できるよう、日中の就寝時に採尿を開始、終了することが望ましいと考えられる。

高年齢の雄ラットに見られた個体差の要因になったタンパク質に関しては、精液と関連性のあるタンパク質群が同定されたことより、尿中への精液の混入が示唆された。ラットの場合その混入のコントロールは難しいと考えられるため、実験には若いラットを用いることが望ましいと考えら

れる。

白人由来尿のプロテオーム解析により得られたデータは、ヒトでの個体差の大きさを示していたが、ラットが実験動物として比較的均一な遺伝的背景を持つことを考えると妥当な結果であるといえる。ただし、性差および年齢差を超えて個体間のばらつきの方が大きかった点は意外であり、この個体差の要因をつかむことが重要な課題となった。そのための一つの手がかりとして、肥満度による相関を調べたところ、性差、年齢差には認められなかったグループ化が主成分分析の第二主成分方向に認められたことより、ヒトの尿プロテオームに関する個体差の要因の一つとして、肥満度が重要なファクターとなることが分かった。

白人サンプルに続き、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探索した。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質分子の発現に差ができ、個体差の原因となっている可能性が示唆された。

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、今後肥満度の高い日本人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探索を行ったところ、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β-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 Leucine-rich α 2- glycoprotein に関しては、肝障害の探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。 α/β 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探索を試みた。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 α 2-glycoprotein が同定された。本タンパク質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、本タンパク質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。

D. 結論

ナノ LC-MS/MS 装置を用いた尿プロテオーム解析

により、バイオマーカー探索に十分なレベルの感度を持った試験系を確立できた。

ラットにおいて最も変化を与える要因は雌雄差であり、性ホルモンなどの性特異的タンパク質の発現差の影響であると考えられる。バイオマーカーの探索においても、性差を十分考慮に入れる必要がある。

ヒト尿プロテオームデータは、ラットに比べて個体差が大きい

性差、年齢差よりも肥満度により特徴的なプロファイルが認められた。

バイオマーカーとしてのタンパクアダクトの検出法を確立した。

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探索し、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 α 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。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) Watanabe T, Suzuki T, Natsume M, Nakajima M, Narumi K, Hamada S, Sakuma T, Koeda A, Oshida K, Miyamoto Y, Maeda A, Hirayama M, Sanada H, Honda H, Ohyama W, Okada E, Fujiishi Y, Sutou S, Tadakuma A, Ishikawa Y, Kido M, Minamiguchi R, Hanahara I, Furihata C. Discrimination of genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens by statistical analysis based on gene expression profiling in the mouse liver as determined by quantitative real-time PCR. *Mutat Res.*, 747, 164-175. 2012

2) Suenaga K, Takasawa H, Watanabe T, Wako

Y, Suzuki T, Hamada S, Furihata C. Differential gene expression profiling between genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens in young rat liver determined by quantitative real-time PCR and principal component analysis *Mutat Res.*, 751, 73-83. 2013

3) 斎藤嘉朗, 前川京子, 齊藤公亮, 佐藤陽治, 鈴木孝昌 タンパク質・内在性代謝物バイオマーカーを利用した医薬品開発の活性化にむけて. 国立医薬品食品衛生研究所報告, 131, 20-24. 2013

4) 中村里香, 酒井信夫, 薮島由二, 福井千恵, 鈴木孝昌, 中村亮介, 蜂須賀暁子, 安達玲子, 手島玲子 ショットガンプロテオミクスによる加水分解小麦とその原料であるグルテンに含まれるタンパク質の網羅的解析. 国立医薬品食品衛生研究所報告, 131, 50-57. 2013

5) 鈴木孝昌 「網羅的な発現をみる マイクロアレイ解析との比較を例に」 実験医学別冊 原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド (羊土社) 111-121. 2013

6) 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

7) 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) 鈴木孝昌 : Omics approach for the biomarker of genotoxicity by aristolochic acid. 韓国毒性学会、公衆衛生学会合同国際シンポジウ

ム (2012.6) (ソウル)

2) 鈴木孝昌、田邊思帆里、山口鉄生、鈴木和博 : MYBPC2 はヒト骨格筋筋芽細胞の筋分化マーカーとなる 第 11 回日本再生医療学会総会 (2012.6) (横浜)

3) 鈴木孝昌、小原有弘、松本真理子、広瀬明彦、林 真、本間正充 : ジメチルアニリン異性体のマウスでの変異原性 日本環境変異原学会 第 41 回大会 (2012.11) (静岡)

5) Suresh T., Oshizawa T., Maekawa K., Saito Y., Sato Y., Suzuki T. Improvement of Rat Urinary Proteomics by a Differential Precipitation of Proteins. *Human Proteome Organization 12th World Congress* (2013.9) (横浜)

6) Suzuki T., Suresh T., Oshizawa T., Maekawa K., Saito Y., Sato Y. Basic factors that influence the rat urinary proteome. 第 13 回国際毒性学会 (ソウル)

7) 鈴木孝昌、Suresh Thiruppathi、本間正充、鈴木和博、佐藤陽治 次世代 DNA シークエンサーの染色体異常解析への応用 日本環境変異原学会第 42 回大会 (2013. 11) (岡山)

8) 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 ヘモグロビンアダクトーム; 環境変異原に対する暴露マーカーとしての新しいアプローチ 日本環境変異原学会第 42 回大会 (2013. 11) (岡山)

9) 降旗千恵、櫻井幹也、渡辺貴志、鈴木孝昌 Toxicogenomics/JEMS・MMS V: クリセン投与 48 時間後までのマウス肝臓における遺伝子発現変化 日本環境変異原学会第 42 回大会 (2013. 11) (岡山)

10) Suzuki T., Suresh T., Yamada M., Honma

M., Suzuki K., Sato Y. Use of the next generation sequencers for the evaluation of genomic integrity of cellular therapy products. 11th International Conference on Environmental Mutagens (2013.11) (Foz do Iguacu)

11) 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)

12) 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)

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

14) 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)

Expert Rev Proteomics. 8, 615-29 (2011)

3) High resolution proteome/peptidome analysis of body fluids by capillary electrophoresis coupled with MS. Schiffer E, Mischak H, Novak J. Proteomics. 6, 5615-27. (2006)

4) Earlier recognition of nephrotoxicity using novel biomarkers of acute kidney injury. Waring WS, Moonie A. Clin Toxicol. 49, 720-8. (2011)

5) Comprehensive human urine standards for comparability and standardization in clinical proteome analysis.

Mischak H, Kolch W, Aivaliotis M, Bouyssié D, Court M, Dihazi H, Dihazi GH, Franke J, Garin J, Gonzalez de Peredo A, Iphöfer A, Jänsch L, Lacroix C, Makridakis M, Masselon C, Metzger J, Monsarrat B, Mrug M, Norling M, Novak J, Pich A, Pitt A, Bongcam-Rudloff E, Siwy J, Suzuki H, Thongboonkerd V, Wang LS, Zoidakis J, Zürlbig P, Schanstra JP, Vlahou A. Proteomics Clin Appl. 4, 464-78. (2010)

6) 最新の疾患バイオマーカー研究
—より適切な診療を目指して—
日本臨牀 70 巻 5 号 (2012)

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1. 特許取得 なし

H-2. 実用新案登録 なし

H-3. その他 特記事項なし

(参考文献)

1) Towards the application of proteomics in renal disease diagnosis.

Vidal BC, Bonventre JV, I-Hong Hsu S. Clin Sci. 109, 421-30. (2005)

2) Clinical application of urinary proteomics/peptidomics.

Albalat A, Mischak H, Mullen W.

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

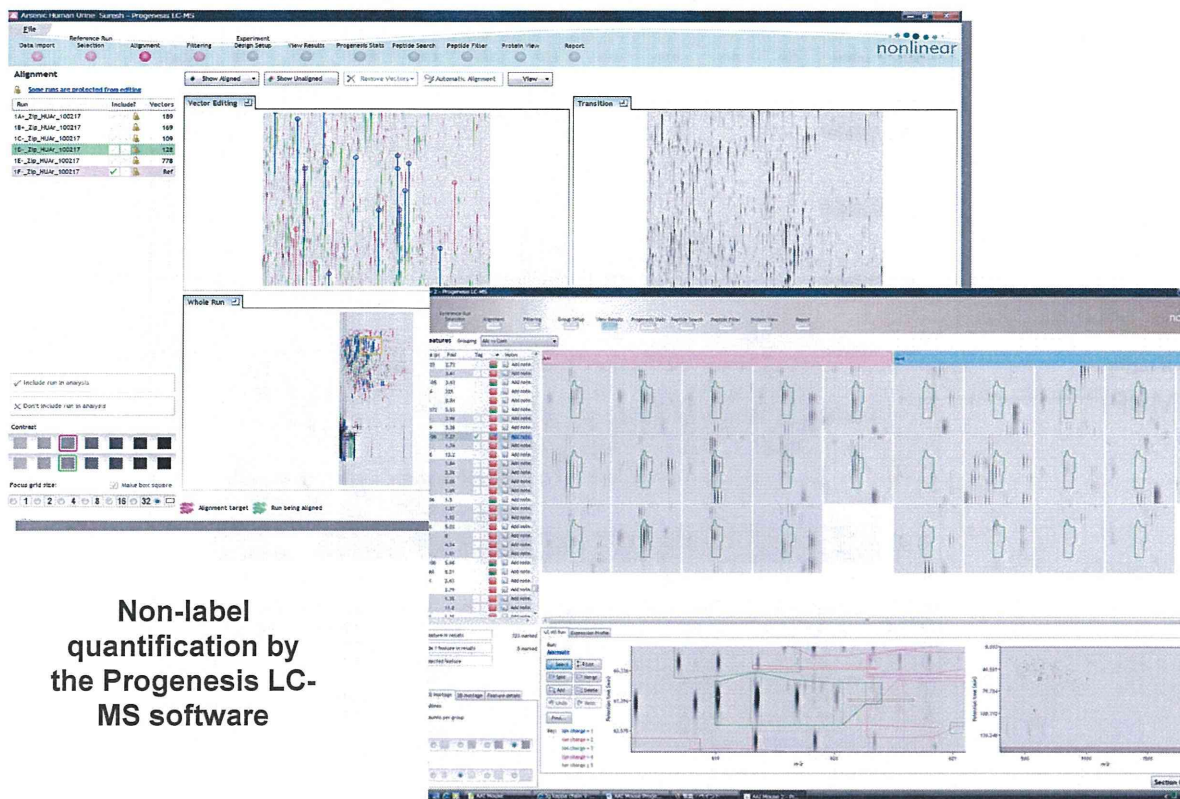


図2 ラット尿プロテオーム解析データの3次元可視化

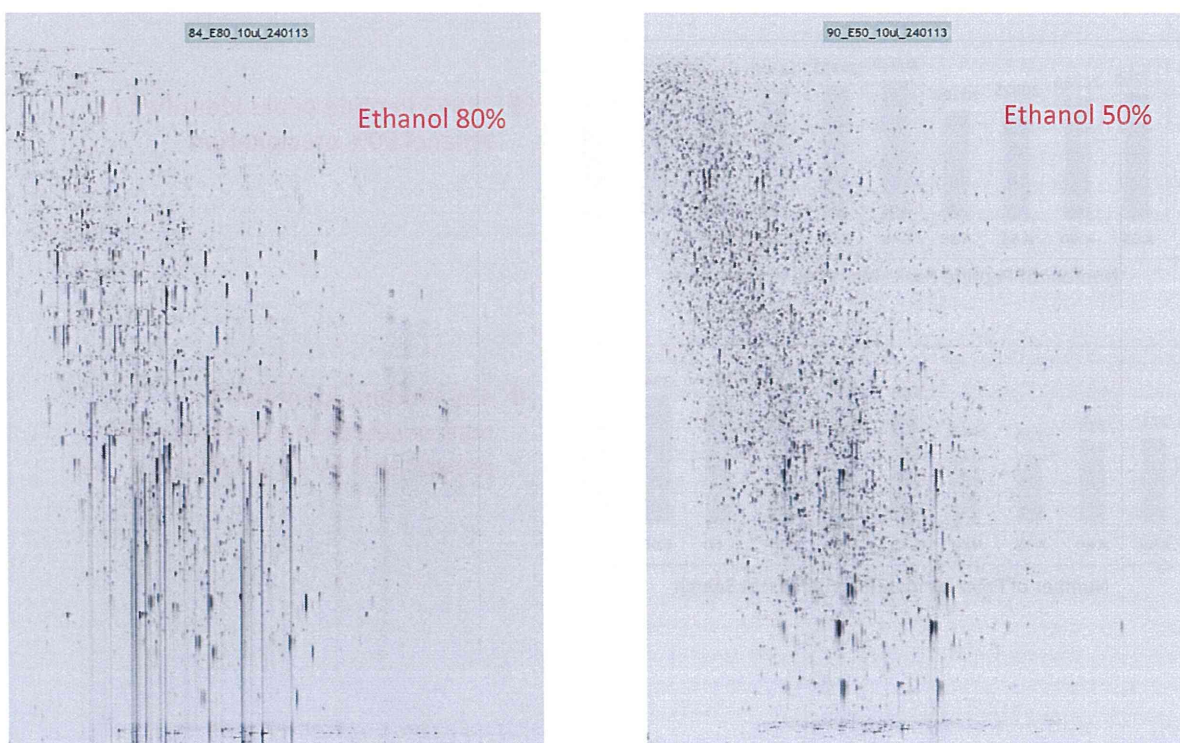
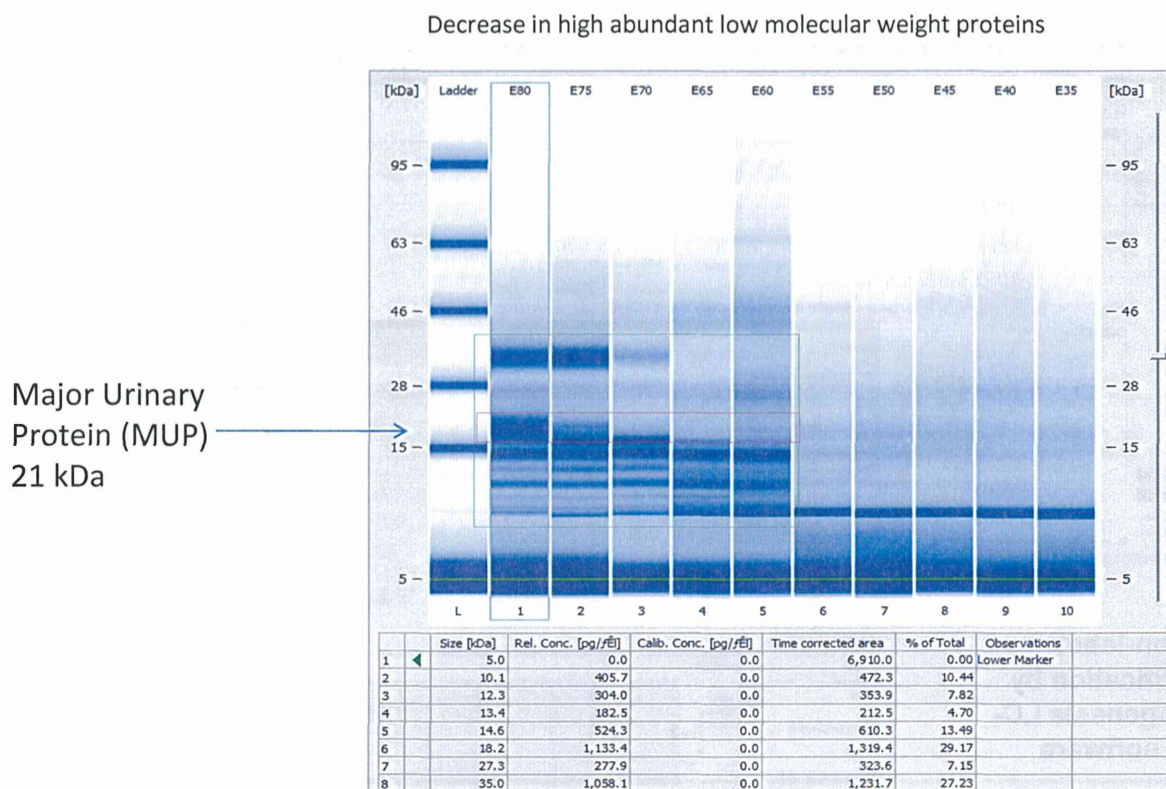
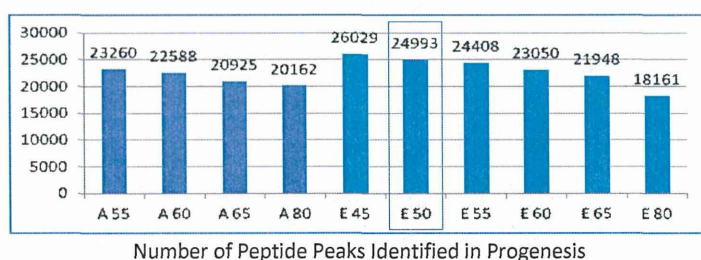


図3 エタノールの濃度変化に伴う回収タンパク質の変化

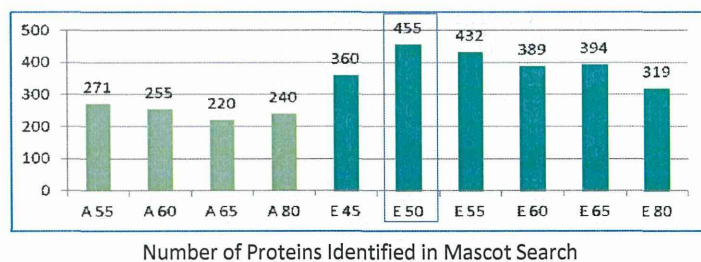


Major Urinary Protein (MUP)
21 kDa

図4 有機溶媒濃度を変化させたときの同定ペプチド数の変化



◆ 24993 Peptide peaks identified in ethanol 50% precipitation



◆ 455 Proteins identified by mascot search in a single sample precipitated by ethanol 50%