

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590969

研究課題名(和文) 網羅的ペプチドミクスによるNASHの病態解析と分子標的の探索

研究課題名(英文) Investigation for biomarker of NASH by comprehensive analysis using peptidomics

研究代表者

山本 憲彦 (YAMAMOTO, NORIHIKO)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60501963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、メタボリック症候群の増加が本邦にとって最大の問題となってきた。その病態の解明の進歩により代謝の基本臓器である肝臓の脂肪化が疾患の誘因や進展に大変重要な役割をしていることが明らかになってきた。しかし、脂肪肝、および脂肪性肝炎(NASH)の分子生物学的な機序の解明は十分になされていない。そこで、われわれは、最新のプロテオミクス解析を用い健康人とNAFLD/NASHから肝硬変に至る時間軸にそった患者由来試料を解析し、それぞれに特異的なペプチド発現データを中心に解析し、iTRAQを用いてNASH特有のペプチドを同定した。

研究成果の概要(英文)：Recently, the increasing number of metabolic syndrome has become emerging health problem in our country.

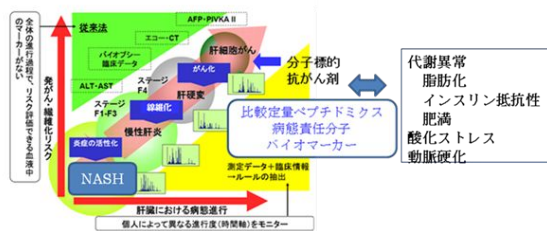
As mechanism of this disease has been evaluated, it has become obvious that hepatic steatosis plays an important role in triggering and progression of the disease. Especially, non-alcoholic steatohepatitis(NASH) is very important in the pathogenesis of the disease. But the detailed role of hepatic steatosis in metabolic syndrome remains unclear. Furthermore, it is still very difficult to distinguish simple steatosis from NASH. In this study, we analyzed the blood sample from the healthy volunteer and the NAFLD patients who developed NASH and ultimately liver cirrhosis. We detected the NASH specific molecular peptide by peptidomics using iTRAQ.

研究分野：肝臓病学

キーワード：NASH バイオマーカー プロテオミクス iTRAQ法

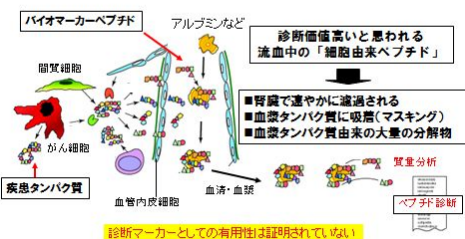
1. 研究開始当初の背景

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。病態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、糖鎖やリン酸化などのタンパク修飾なども特異的にみられる。そこで本研究では、近年増加しているメタボリック症候群の一表現型と考えられる非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD/NASH) を対象にして、血液中、組織中ペプチドミクス解析により、特に代謝関連分子に着目して、新たな NASH 進展の責任分子を探索する。最終的に病態進行の責任分子、分子標的を探索し臨床応用することを目的とする



Background

疾患ペプチドミクス



近年、メタボリック症候群の増加とそれによる成人病疾患の罹患率の増加が、本邦にとって最大の問題となってきている。その病態の解明の進歩により代謝の基本臓器である肝臓の脂肪化が疾患の誘因や進展に大変重要な役割をしていることが明らかになってきた。しかし、脂肪肝、および脂肪性肝炎 (NASH)、肝発癌の分子生物学的な機序の解明は十分になされていない。また、代謝の主臓器である肝臓における代謝関連分子の異常についてはほとんど解明されていない。一方、国内外のゲノム情報基盤の整備とトランスクリプトーム解析の確立によって、ヒントになる疾患組織・細胞内での遺伝子発現の挙動がみられるようになったこと、タンパク質の MS 技術が進んだため適切な分画を行えばタンパク質のディファレンシャル解析ができるようになりつつあること、分離ができれば MS による同定が精度よく行えることから、適切な病態モデルと発症時間にそった疾患サンプルがあれば「疾患パスウェイ」

の解析が出来る状況が可能になった。そこで、われわれは、最新のプロテオミクス解析を用いデファレンシャルプロテオーム解析システムを構築し、時間軸にける肝疾患における「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 (特許出願中)。この方法では低分子量から高分子量までのペプチド・タンパクを網羅的に解析できる。

2. 研究の目的

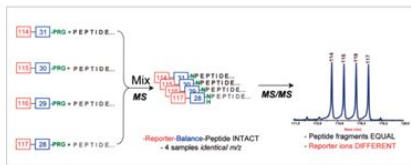
我々は、現在まで、トランスクリプトームによる網羅的解析情報と、質量分析 (以下 MS と略) による組織および血液中タンパク質発現プロファイル解析によって肝炎から肝がん にいたる疾患惹起タンパク質を同定してきた。つまり、このデファレンシャルプロテオーム解析を応用し、C 型肝炎から肝硬変および肝がん にいたるまでの血清および組織のタンパク質プロファイリングを解析し、その疾患パスウェイでの意義を研究し成果を得てきた。(Fuke H, Shiraki K, et al. Jak inhibitor induces S phase cell-cycle arrest and augments TRAIL-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. BBRC. 363, 738-44, 2007. Kaplan DE, Sugimoto K, et al. Discordant role of CD4 T-cell response relative to neutralizing antibody and CD8 T-cell responses in acute hepatitis C. Gastroenterology. 132, 654-66, 2007. Tanaka J, Shiraki K, et al. 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.) これまでの研究成果において、血中に低分子量のペプチドが多数出現することを見いだした。特に、肝疾患が進行するにつれて、特異的なペプチドが出現し、そのパターンも疾患特異性があるようである。そこで本研究では、「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、その構造決定と相互作用するタンパク質の特定と細胞内パスウェイ解析を行い、肝疾患の進展のパスウェイを時間軸にともなって動的に解析することが最初の目的である。実際にはシグナル上にマッピングし疾患の動的進行パスウェイを明らかにする。これにより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。さらに、この研究により、疾患の早期診断や薬効判定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

現在まで当科に保存されている、正常、NAFLD/NASH および NASH 発癌の患者血清および肝組織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する。病期が進展するのに伴い、特に低分子のペプチドの発現をプロファイリングする。特に代謝関連(脂肪代謝、糖代謝、動脈硬化)との関連ペプチドに注目する。同定されたペプチドをプロテオームデータから、シグナル伝達経路へのマッピング 時間軸に沿って変動する疾患タンパク質のデータベース化し、特に変動の大きいペプチドに注目し遺伝子導入や siRNA などを利用してネットワーク構造を解析する。健康人と NAFLD/NASH から肝硬変、肝がんに至る時間軸にそった患者由来試料を解析し、それぞれに特異的なペプチド発現データ(翻訳後修飾を含む)を中心に、臨床情報と遺伝子・タンパク質機能などアノテーションがついたデータベースを構築するための臨床研究プラットフォームを作成し解析する。

method

iTRAQ法の原理

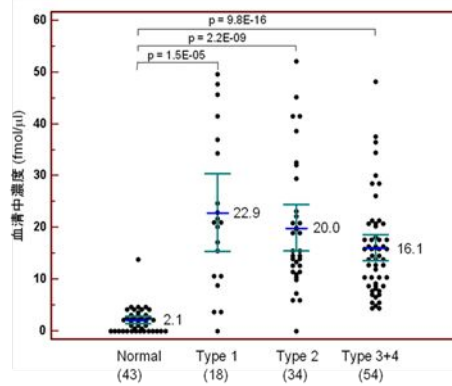


各検体に含まれるすべてのペプチドをそれぞれ異なる iTRAQ reagent でラベルする。すべての検体を等量で混合し、質量分析により各ペプチドのそれぞれの検体における発現比率を測定する。疾患において特異的に増加しているペプチドを探索する。

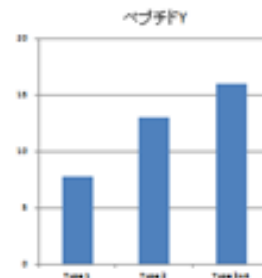
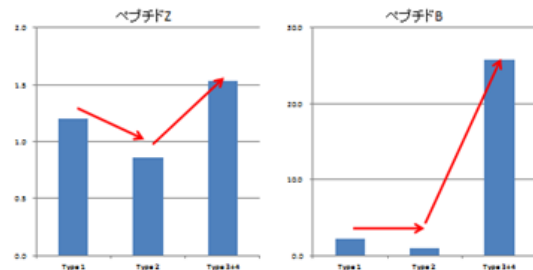
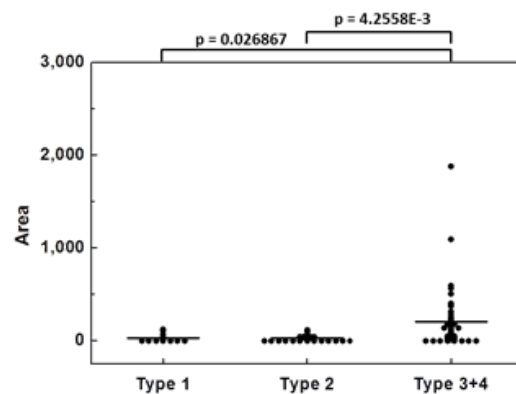
4. 研究成果

まず AST/ALT 正常慢性肝炎患者にペプチド X 濃度が上昇していることを確認した。また、このペプチド X は、Matteoni 分類における脂肪肝の組織学的分類において、正常 VS type1($P < 0.001$)、正常 VS type2($p < 0.001$)、正常 VS type3+4($P < 0.001$)と有意差を持って脂肪肝患者で上昇していたが、type 1、2 VS type 3+4 では有意差を認めなかった。ペプチド Y においては、type1 type3+4 と進行するに従って増加し、ペプチド Z は type2 で低下、ペプチド A は type2 及び type 3+4 で増加、ペプチド B は type 3+4 で増加していた。またペプチド C は、type2 と比較して有意に type3+4 で増加($p = 4.2558E-3$)しており、NASH と simple steatosis の鑑別に有用であると考えられた。今回検出されたペプチドは、NASH 特異的な有用なバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

ペプチド X



ペプチド C



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 0件)

[学会発表](計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者 山本 憲彦

(YAMAMOTO, Norihiko)

三重大学・医学部付属病院・講師

研究者番号：60501963

(2)研究分担者 白木 克哉

(SHIRAKI, Katsuya)

三重大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90263003

研究分担者 杉本 和史

(SUGIMOTO, Kazushi)

三重大学・医学部付属病院・講師

研究者番号：60378370