

平成 27 年度オーダーメイド医療の実現プログラム 成果報告書（公開）

研究開発代表者 (所属機関・氏名)	慶應義塾大学医学部・専任講師・加部泰明
研究開発課題名	「保存血清のメタボローム解析による疾患診断の有用性の検証と応用」

1. 研究開発の目的

本事業では、疾患特異的な保存血清試料の代謝解析の有用性を検証した上で、国立大学法人東京大学医科学研究所バイオバンク・ジャパン (BBJ) に登録されている 47 疾患のうち、悪性腫瘍の一部、肺線維症、肺気腫などの呼吸器疾患、慢性関節リウマチなどの感染症を対象とし、以下に示したメタボロミクス、エキソソーム、異常糖鎖、チオール修飾解析を指標とした疾患バイオマーカー探索を行い、有用なマーカーの組合せ（バイオマーカーシグナチャー）によって特異性と感度の高い診断方法の確立を目指した研究を行うことを目的とする。

2. 研究開発の概要

以下に示した独自の先端計測技術を駆使して疾患血清中に含まれる疾患バイオマーカー探索を行う。

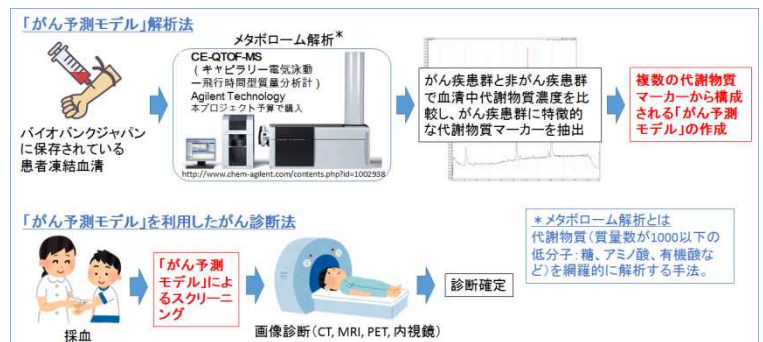
- (1) 保存血清の水溶性および脂溶性メタボロミクスの実施と血清試料の品質評価
- (2) エキソソーム計測技術を駆使して、慢性炎症性疾患、感染症、悪性腫瘍で、保存血清あるいは試料中のエキソソームに存在する異常構造を探索する
- (3) 網羅的糖鎖検出が可能なレクチンアレイシステムを駆使して、代謝システムの一部に Somatic mutation の入った悪性腫瘍から放出される各種の比較的安定な異常糖鎖を検出
- (4) 血清中に大量に存在するタンパク質の酸化的修飾ないしはチオール修飾の網羅的検出を行う。

3. 研究開発の成果（平成 27 年度）

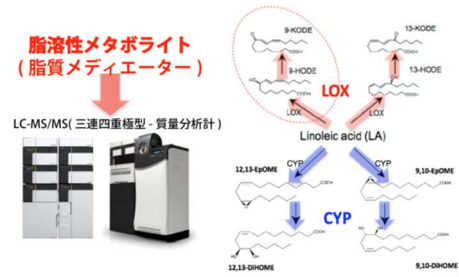
（1）保存血清のメタボロミクスの実施と血清試料の品質評価

悪性腫瘍群として、肺がん、胃がん、卵巣がん、大腸がんの 4 群、非がん疾患群として、肺気腫、間質性肺炎・肺線維症、気管支喘息、関節リウマチ、

アトピー性皮膚炎、緑内障の保存血清を用いて水溶性代謝物の定量解析を行い、悪性腫瘍群、あるいは各疾患特異的な、バイオマーカー候補の組み合わせから構成される「がん予測モデル」の創出を目指す。平成 27 年度は、10 疾患、各疾患 14 検体ずつ（合計 140 検体）から得たデータをもとに検討を行った結果、クエン酸、イソクエン酸、フェニルアラニン、さらに未同定の化合物 4 種を含む合計 7 化合物から構成される「がん予測モデル」が得られ、さらなる検討を行っている (Suhara T., et. al. (2015) Proc Natl Acad Sci U S A., Kawano Y., et. al. (2015) J Biosci Bioeng.)。



さらに、脂質メディエーター（生理活性脂質）群に焦点を当てた網羅的解析を実施し、非がん疾患と、大腸がん検体を識別可能な 20 化合物を得ており、リノレン酸を基質としたリポキシゲナーゼ(LOX)代謝産物が多く含まれていた。現在、これらのマーカー候補分子として有用性検証を行っている。



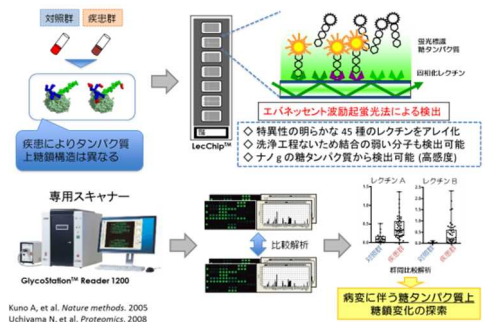
(2) 血清試料における遺伝情報収集技術の実施と品質評価

エクソソームは mRNA や miRNA などの遺伝情報が内包され細胞・組織間の情報伝達に重要な役割を担い、がんの成長と転移にも関与していることが明らかになりつつある。我々がこれまでに開発してきた新規のエクソソーム定量計測技術を用いて、がん細胞株などにおいて放出されたエクソソームを検出し、非常に高感度に正確なエクソソーム数をカウント出来るシステムを確立した。さらに、BBJ 血清サンプルを用いた疾患に応じたエクソソーム量の変動の解明を目指して解析を行い、大腸がん血清試料を解析し、健常血清サンプルと比較して、がん検体においてエクソソーム数が顕著に増加していることを見出した。このシステムによる血清中エクソソーム数を正確に定量することにより、エクソソーム中に含まれる異常糖鎖や代謝物などの絶対的な補正が可能になることが示唆された。

(3) レクチンアレイによる慢性疾患の異常糖鎖検出（再委託先：独立行政法人産業技術総合研究所）

血清中に含まれる糖鎖構造の網羅的解析が可能なレクチンアレイシステムを用いて慢性関節リウマチにおける分子内糖鎖修飾異常を検出するか検討し、保存血清への当該技術の使用が可能か検証し、関節リウマチ患者の保存血清中に含まれる標的分子の糖鎖の修飾の違いが活動性と相関があることを見出した。この糖鎖修飾の変化を有する活動性の高いリウマチ患者血清中のそれとプロファイルが酷似していた。それに対し、変形性関節炎患者の滑液中のタンパク質の糖鎖はむしろ健常者血清中のタンパク質のそれと類似していた。以上により、保存血中に含まれるタンパク質の関節リウマチの活動性に相関のある糖鎖変化を発見するに至った (Takeshita M, et al., Arthritis Res Ther. 2016)。

レクチンマイクロアレイによる比較糖鎖プロファイリング



(4) チオールプロテオームによる慢性疾患マーカーの探索（再委託先：国立大学法人東北大学）

組織の慢性炎症に伴う酸化ストレスはシステイン、メチオニン、グルタチオン等イオウを含む代謝物にその痕跡が残り、最終的にはタンパク質の活性チオールに様々な構造を有する修飾体として痕跡が残ることが明らかになりつつある。我々が開発しているチオールプロテオーム分析技術は、標的となるタンパク質の同定（1）および、当該タンパク質のイオウ修飾体の定量的分析（2）、を可能にする技術である。これらを駆使することにより、ペプチドマッピングにより 40 種を超えるポリサルファ化タンパク質を同定し、タンデム質量分析計を用いてポリサルファ化修飾の高感度の定量に成功し、がん検体における特異的チオール修飾候補分子を見出している。さらに、化学反応性の異なる各種親電子剤を組み合わせたポリサルファ化解析法 (PEG-maleimide-labeling gel shift assay, PMSA) を構築した。各種組換えタンパク質、培養細胞試料を用いた検討をおこない、同解析法により、がん検体における特定のタンパク質分子中のポリサルファ化状態を精密に評価できることを見出している。