

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10755

研究課題名(和文) 冷却・復温による血中遊離ヘモグロビン減少の機序解明とその成果の臨床応用

研究課題名(英文) Study of down-regulation of plasma free hemoglobin during therapeutic hypothermia

研究代表者

織田 禎二 (Oda, Teiji)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授

研究者番号：50448198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：体外循環により生じる溶血はヘモグロビンの血漿への流出により腎・肺などの臓器障害の原因になる。我々はこれまでの研究より低体温・復温により血漿遊離ヘモグロビンが有意に減少(増加抑制)するという全く新しい知見を得た。本研究では、ヘモグロビンと蛋白質相互作用(PPI)を有するタンパク質として、新たにhaptoglobin-related protein (HPR), protein asteroid homolog 1 (ASTE1), Proteasome subunit beta type-1 (PSMB1)を同定した。今後これらの蛋白質とヘモグロビン消去系との関連の詳細の検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究をさらに発展させれば、血中遊離ヘモグロビンに対する新しい中和剤を開発できるため、体外循環治療を受ける患者群(心臓大血管手術を受ける患者、血液透析を受ける患者)に対して血中遊離ヘモグロビンの有害作用を減少させる治療法を提供できるようになる。

研究成果の概要(英文)：Extracorporeal circulation causes hemolysis, resulting into increased free hemoglobin. This plasma free hemoglobin can work for a toxic oxidant and induce acute kidney and lung injury. We have previously demonstrated that hypothermia can decrease plasma free hemoglobin levels during therapeutic hypothermia in resuscitated patients after cardiac arrest for the first time. In this study, we have demonstrated that hemoglobin can bind to haptoglobin-related protein (HPR), protein asteroid homolog 1 (ASTE1) and proteasome subunit beta-1 (PSMB1) as well as haptoglobin, a well-known scavenger protein by biotinylated protein interaction pull-down assay and co-immunoprecipitation assay. Among these proteins, only both ASTE1 and PSMB1 have interacted hemoglobin protein during hypothermia (34) and normothermia (36). Future study will search for detailed mechanisms scavenging hemoglobin protein.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：ヘモグロビン 低体温 溶血 体外循環

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで心臓大血管手術の補助手段として用いられる低体温人工心肺および救急の現場で心停止蘇生後脳症の治療として用いられる脳低体温療法について、臨床サンプル(血漿)を用いて低体温導入(復温)に対する生体反応を主にプロテオミクスを用いて網羅的に解析してきた。その研究成果の一つとして、低体温の導入によりその後の復温まで引き続いて血中遊離ヘモグロビン減少が起きることを世界で初めて見出した¹⁾。この血中遊離ヘモグロビン減少の機序解明に成功すれば、生体酸化を引き起こす有毒物質である血中遊離ヘモグロビンを減少させる治療法の発見につながる可能性がある。

2. 研究の目的

低体温導入による血中遊離ヘモグロビン減少のメカニズムを解明し、その成果の臨床応用をめざす。

3. 研究の方法

脳低体温療法実施例(9例)の冷却直前に採取した血漿サンプル(T1)、冷却(34℃)24時間維持後(復温直前)に採取したサンプル(T2)、復温終了後に採取したサンプル(T3)を用いて血中遊離ヘモグロビンの消去系を探索するため、蛋白質-蛋白質相互作用(PPI)の解析を行った。まず Pierce Biotinylated protein interaction pull-down kit(ThermoFisher Scientific製)を用いて、タグ付き蛋白質を用いた蛋白質相互作用解析(プルダウンアッセイ)を行い、ヘモグロビンと相互作用を示すタンパク質を溶出液のプロテオミクス解析により同定した。iTRAQ 試薬を用いたラベル化を行い、Nano-LC クロマトグラフィーにより分画化しマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計を用いて同定した(NanoLC-MALDI-TOF/TOF MS/MS)。次にキットのマニュアル通りの4℃での実験だけでなく、臨床での実際の体温である34℃、36℃での蛋白質-蛋白質相互作用を確認するため、その温度でプルダウンアッセイを行い温度の影響を検討した。実際の体温である34℃、36℃での測定で、血中遊離ヘモグロビンの変化と相関のある候補蛋白質を絞り込みだ後、Pierce Co-Immunoprecipitation kit(Thermo Scientific製)を用いて、共免疫沈降法(Co-immunoprecipitation: Co-IP)を行い、ヘモグロビンと相互作用するタンパク質溶出液を用いてこの蛋白質候補のwestern blottingを行い血中遊離ヘモグロビンの変化との相関を確認することでヘモグロビン消去に関与するタンパク質候補を定める。

4. 研究成果

初期の検討では血漿サンプルとビオチン化ヘモグロビン溶液を用いたプルダウンアッセイをマニュアルの指示温度である4℃で施行して得た溶出液をiTRAQ 試薬でラベルした後、質量分析(nano-LC MALDI TOF/TOF MS/MS)にて網羅的に解析した。ProteinPilot softwareを用いた解析により95%以上の信頼性で同定できたのは、以下の8蛋白質であった(表1)。

表1. ビオチン化ヘモグロビン溶液を用いたプルダウンアッセイ(4℃)の溶出液解析

| 蛋白質名 | 遺伝子名 |
|---|--------|
| Haptoglobin | HP |
| Haptoglobin-related protein | HPR |
| Ras GTPase-activating protein nGAP | RASAL2 |
| IQ and AAA domain-containing protein 1-like | IQCA1L |
| Leucine-rich LG1 family member 4 | LG14 |
| Serum amyloid A-1 protein | SAA1 |
| Keratin type II cytoskeletal 79 | KRT79 |
| WD repeat-containing protein 72 | WDR72 |

上記の蛋白質群の中で、ヘモグロビンとの結合能を有する蛋白質は、haptoglobin, haptoglobin-related protein (HPR)のみであった。これらのタンパク質のvalidationをwestern blottingで行ったが、その発現量と血中遊離ヘモグロビン変化の間で有意の関連は見いだせなかった。このため、実際の生体での反応は36℃あるいは低体温(34℃)で行われているため、ビオチン化ヘモグロビン溶液と血漿サンプルを用いたプルダウンアッセイを4℃、34℃、36℃の温度で実施して比較し、溶出液のプロテオミクス解析を行った。表2に示すように4℃よりも34℃、36℃でより多くの蛋白質が相互作用を示した。この中で、最終的に34℃、36℃で特に多数の症例サンプルで同定された二つのタンパク質、proteasome subunit beta type-1 (PSMB1), protein asteroid homolog 1 (ASTE1)を血中遊離ヘモグロビンの減少に係るタンパク質候補と判定した。

PSMB1, ASTE1のvalidationを行うため、レジン結合ヘモグロビン抗体、negative controlと

してレジン結合 normal IgG とそれぞれ血漿サンプルを加え 34 で反応させて共免疫沈降を行い、溶出液を用いて PSMB1 抗体による western blotting を行った。結果を下図に示す。

表 2.4 .34 .36 でのビオチン化ヘモグロビンを用いたプルダウンアッセイ抽出液中に同定された蛋白質

| 11 | | | | | | | | | 12 | | | | | | | | | 13 | | | | | | | | | Gene | | |
|--|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----------|--|--|
| #1 | #2 | #3 | #4 | #5 | #6 | #7 | #8 | #9 | #1 | #2 | #3 | #4 | #5 | #6 | #7 | #8 | #9 | #1 | #2 | #3 | #4 | #5 | #6 | #7 | #8 | #9 | | | |
| [Heatmap grid showing protein expression levels across 27 samples (11, 12, 13) for various genes. The grid uses a color scale from light yellow (low) to dark red (high).] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| HP | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 4°C | | |
| HBA1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 34°C | | |
| HBB | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 36°C | | |
| FGA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 4°C・34°C | | |
| APOA1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 4°C・36°C | | |
| SAA1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 34°C・36°C | | |
| HPR | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 4・34・36 | | |
| HRNR | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| KRT79 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| APOC3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BPNT1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ASRGL1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NCOA3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| WDR72 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| TTN | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GALNT13 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ASTE1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| RNF157 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CPNE7 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PLXNC1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GALNT13 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| UPF3A | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GALNT14 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C20orf194 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| TRIOK | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PSMB1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AMER1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| WRNIP1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

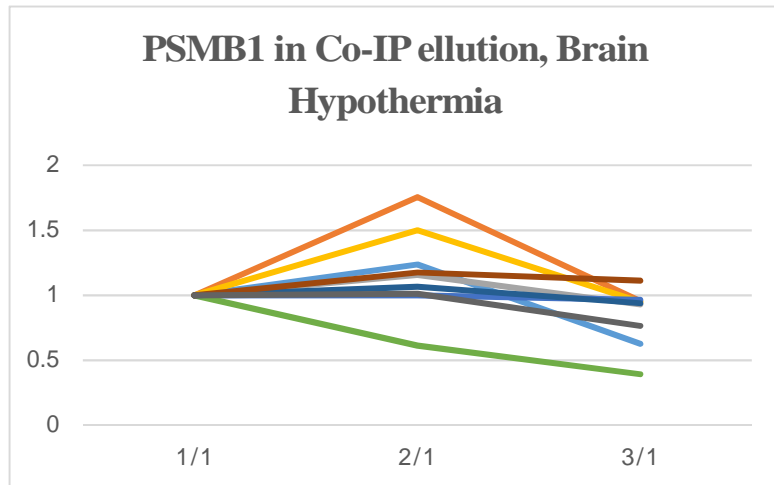


図 .34 でヘモグロビンとの共免疫沈降を行い、溶出液の PSMB1 抗体との western blotting を行うと、2/1つまり低体温時に増加していることが分かった。さらに個々の症例の PSMB1 の増加度と血中遊離ヘモグロビンの減少度に良好な相関が示された。

今後さらに Proteasome subunit beta type-1(PSMB1)と今回は抗体が入手できず western blotting による validation ができなかった Protein asteroid homolog 1 (ASTE1)が低体温により血中遊離ヘモグロビンとの蛋白質相互作用を強め、それがヘモグロビン消去へとつながるメカニズムを明らかにしていきたい。

引用文献 Oda T, Yamaguchi A, Ishida R, Nikai T, Shimizu K, Matsumoto K. Plasma proteomic changes during therapeutic hypothermia in resuscitated patients after cardiac arrest. *Experimental and Therapeutic Medicine* 18:2019,1069-1080

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 松本 健一 (Matsumoto Ken-ichi) (30202328) | 島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授 (15201) | |
| 研究分担者 | 今井 健介 (Imai Kensuke) (60457182) | 島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教 (15201) | |
| 研究分担者 | 末廣 章一 (Suehiro Shouichi) (90596545) | 島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教 (15201) | |