

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16584

研究課題名（和文）網羅的タンパク質解析を用いた心停止/心停止後症候群に関わる新規物質の発見

研究課題名（英文）Identification of novel substances related to cardiac arrest and post-cardiac arrest syndrome through comprehensive proteomic analysis

研究代表者

今枝 太郎 (Imaeda, Taro)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30598230

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：心停止後の神経学的予後を、より早期により高い精度で予測可能なバイオマーカーの発見を目的とし、集中治療室へ入室した20歳以上の心停止後患者を対象として実施した。神経学的予後良好群（CPC 1-2）と予後不良群（CPC 3-5）の蘇生後1時間以内の血漿検体を質量分析装置を用いてタンパク質の網羅的解析を行なった。その結果、予後不良群でのみ、Serpin B1とI-FABPが発見された。続いてvalidation解析でこれらのタンパク質をELISA法を用いて測定したところ、神経学的予後不良群(n=31)は予後良好群(n=27)に比較し、両タンパク質ともに統計学的有意差をもって高値であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、心停止患者に対する人工心肺補助装置を用いた蘇生術や脳低温療法を含む包括的な集中治療が、心停止患者の転帰改善に寄与しているとして注目されている。費用対効果や倫理的側面を考慮し、これらの高価な治療の適応を的確に判断する早期の神経学的予後予測の重要性が高まっている。今回、高性能プロテオーム解析機器を用いて、心停止後患者の神経学的予後をより早期に高い精度で予測可能なバイオマーカーになり得るタンパク質を明らかにした。また、これらタンパク質が心停止後の神経学的予後に大きく関与する全身の臓器の虚血/再灌流障害により引き起こされる心停止後症候群の病態解明にもつながるものと考えている。

研究成果の概要（英文）：To discover biomarkers that can predict neurological prognosis after cardiac arrest at an earlier stage and with higher accuracy, we conducted a study of post-cardiac arrest patients aged 20 years or older who entered the intensive care unit. We performed a comprehensive protein analysis using mass spectrometry on plasma samples within one hour after resuscitation from patients with good neurological prognosis (CPC 1-2) and those with poor prognosis (CPC 3-5). Serpin B1 (Leukocyte elastase inhibitor) and Fatty acid-binding protein 2 (I-FABP) were found only in the poor prognosis group. These proteins were validated using clinical specimens. The results of ELISA analysis between the good neurological prognosis group (n=27) and the poor prognosis group (n=31) showed that both proteins were significantly higher in the poor prognosis group than in the good neurological prognosis group, with a statistically significant difference between the two groups.

研究分野：救急集中治療医学

キーワード：心停止後 心停止後症候群 神経学的予後予測

1. 研究開始当初の背景

心停止患者に対する治療は近年進歩しており、ECPR(extracorporeal cardiopulmonary resuscitation:人工心肺補助装置を用いた蘇生術)や脳低温療法を含む包括的な集中治療が、心停止患者の転帰改善に寄与しているとして注目されている。

費用対効果や倫理的側面を考慮し、人工心肺補助装置の使用や脳低温療法などの高価な治療の適応を的確に判断する早期の神経学的予後予測の重要性が高まってきており、画像検査や電気生理学的検査とともに新たなバイオマーカーの探索が必要とされている。また神経保護療法をはじめとする心停止後症候群(自己心拍再開後、虚血再灌流によって脳や心臓をはじめとする臓器に更なる障害が発生する状態)に対する新規治療法の開発につながる既存の知見を超えた発見が必要と考えられてきている。

特定のバイオマーカーによる心停止後患者の神経学的予後予測に関する研究では、脳損傷によるバイオマーカーである neuron specific enolase, S100B, 脳以外の臓器虚血に伴うバイオマーカーであるアンモニア, 乳酸, 心停止蘇生後の全身性炎症反応に伴うバイオマーカーである interleukin-6 などが、心停止後患者の神経学的予後の予測バイオマーカーとして既に報告されている。しかしながら、満足できる精度が得られていない。低い精度は、脳以外の臓器虚血の影響(心停止後の中枢神経機能障害は、全身の臓器の虚血/再灌流障害:心停止後症候群の一部であるため)、心停止後症候群に対する脳低温療法などの治療の影響、検体採取のタイミングなどが考えられている。この問題を解決すべく、高性能プロテオーム解析機器を用いて、動物実験モデル、心停止患者の臨床検体を段階的に解析する研究を計画した。

2. 研究の目的

心停止後の神経学的予後を、より早期により高い精度で予測可能なバイオマーカーの発見と、心停止後の神経学的予後に大きく関与する全身の臓器の虚血/再灌流障害により引き起こされる心停止後症候群の病態解明である。

3. 研究の方法

集中治療室へ入室した20歳以上の心停止後患者を対象とした。

血液検体は、①蘇生中、②蘇生後1時間以内、③CPAから6時間後、④CPAから12時間後、⑤CPAから24時間後、⑥第7病日の計6ポイントで、血清および血漿を採取した。神経学的予後良好群(CPC 1-2)と神経学的予後不良群(CPC 3-5)の②蘇生後1時間以内の血漿検体を、質量分析装置を用いてタンパク質の網羅的解析を行った。

患者検体をマイクロチューブに、血漿と sample buffer (62.5 mM Tris, 2% SDS, 10%, Glycerol, 0.005% BromophenoBlue, pH 6.8 / BIORAD 社)を1mL入れ、100°C, 5分間 boiling し、その抽出液を採取した(溶出分離)。その後、その抽出液を、20µL ずつ well に注入し 200V, 90分間で電気泳動し、SDS-PAGEを行った。GELは10-250kDaをより詳細に分離できるもの(DRC Perfect NT Gel NTH-7G6HP)を用いた。泳動後のGELはクーマシー染色を行い、可視化した。

次に、GEL から可視化したバンドを 1mm サイズで切り出した。網羅的解析を行うため、可視化されていない部分についても同様に切り出しを行った。その後、トリプシン消化を行い、さらに精製を行った(In-gel digestion)。

その後、Liquid Chromatography Mass Spectrometry (高速液体クロマトグラフ質量分析)を行った。物質をイオン化させ質量ごとに分離した後、不活性ガスに衝突させイオン化を解離し、物質を分離検出した。機器は、LTQ-Orbitrap XL (Thermo Scientific, USA) を使用した。そして得られた質量分析結果を解析ソフト Scaffold (Proteome Software, Inc., USA) にて解析した。

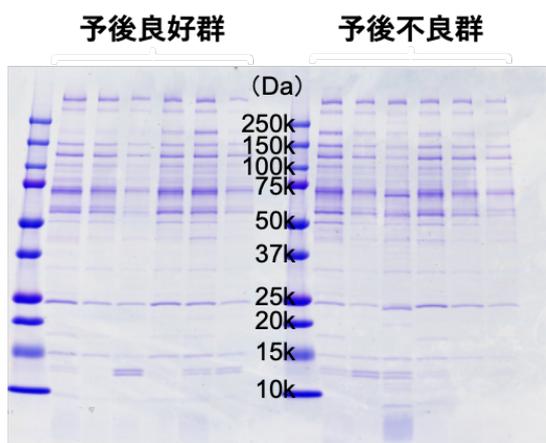
その結果、神経学的予後不良群 (CPC 3-5) でのみで検出されたタンパク質を、ELISA 法を用いて両群間で比較検討した。

4. 研究成果

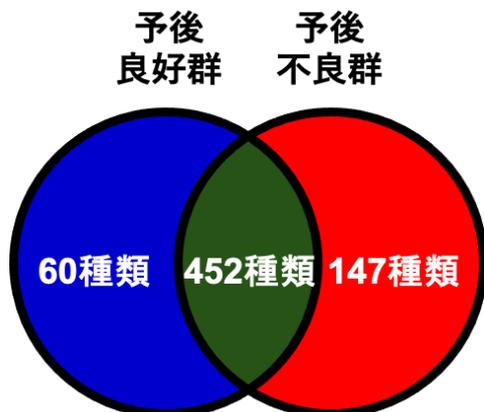
20 歳以上の心停止患者 24 検体を採取し、これらの検体の中から、悪性疾患、脳血管障害、敗血症などが併存している検体ならびに院内心肺停止蘇生後患者の検体は、プロテオミクス解析の対象から外した。その結果 12 検体でプロテオミクス解析を行った。

神経学的予後良好群(CPC 1-2) は 6 症例で、心停止の原因疾患は、急性心筋梗塞 3 例、不整脈 2 例、外傷出血性ショック 1 例であった。神経学的予後不良群(CPC3-5)は 6 症例で、心停止の原因疾患は、急性心筋梗塞 4 例、不明 2 例であった。

これらの検体を溶出分離し、SDS-PAGE を行いクーマシー染色し可視化したものが以下である。

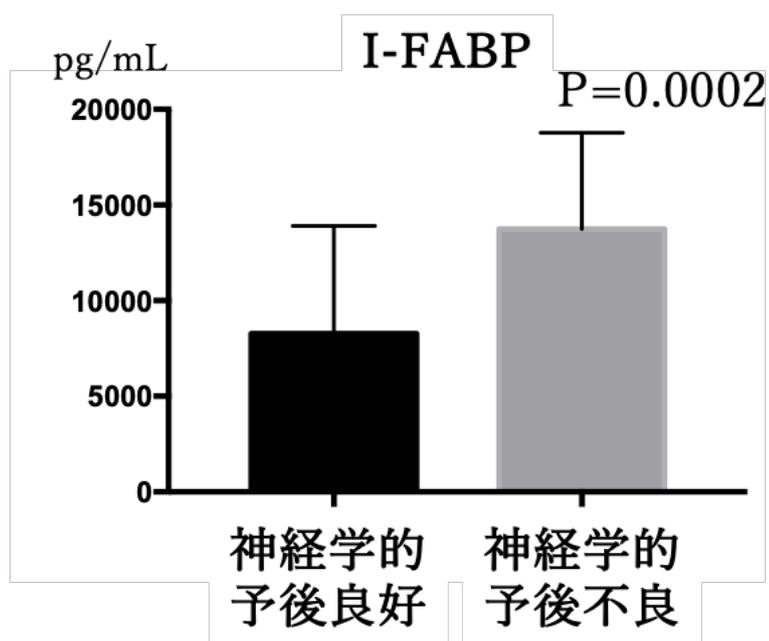
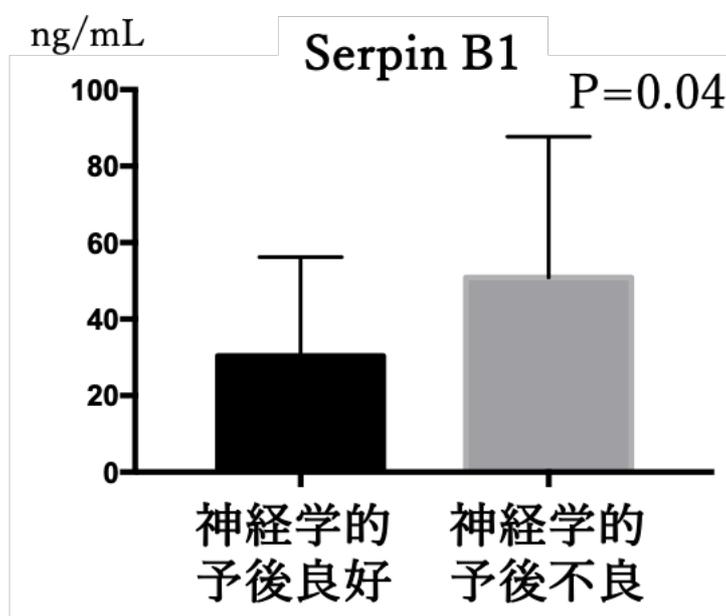


これら GEL から可視化したバンドを 1mm サイズで切り出し、In-gel digestion を行い、プロテオーム解析を行った結果、以下の数のタンパク質が検出された。



これらの中で、予後不良群でのみで検出され、6 症例中 3 症例で認められたタンパク質は、Cathepsin D, Nucleoside diphosphate kinase B, Cytoplasmic aconitate hydratase, Formimidoyltransferase-cyclodeaminase, Thioredoxin domain-containing protein 17 の 5 種類で、6 症例中 4 症例で認められたタンパク質が、Serpine B1 (Leukocyte elastase inhibitor), Fatty acid-binding protein 2 (I-FABP) の 2 種類であった。

その後、6 症例中 4 症例で認められた Serpin B1 (Leukocyte elastase inhibitor) と Fatty acid-binding protein 2 (I-FABP) を、臨床検体を用いて validation を施行した。ELISA 法を用いて神経学的予後良好群(n=27)と予後不良群(n=31)とで比較検討した結果、神経学的予後不良群において両タンパク質ともに、統計学的有意差をもって高値であった。



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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------