

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：34519

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670794

研究課題名(和文)新しいペプチド解析法を用いた敗血症性ショック診断に有用なバイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Development of useful biomarkers for diagnosis of septic shock by using a new method for peptidome analysis

研究代表者

若林 一郎 (Wakabayashi, Ichiro)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：70220829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：BLOTCHIP MS法により、敗血症患者の血中ペプチドを網羅的に解析した。敗血症患者20名のうち、播種性血管内凝固症候群(DIC)合併有無の2群間で血中ペプチドのディファレンシャル解析を行い、13個のMSピークをDIC診断のマーカー候補として選抜した。さらにROC解析でAUC = 1となる組合せを求めたところ、4ピークの組合せ11組が見つかった。このうち出現頻度が高いペプチドについて精密質量測定およびMS/MS構造解析を行ったところ、 $m/z = 2743$ と $m/z = 2886$ のペプチドはそれぞれ27個のアミノ酸から成る2-HS-glycoproteinとfibrinogen chainであった。

研究成果の概要(英文)：Peptides in the blood of patients suffering from sepsis were inclusively analyzed using the BLOTCHIP MS method. Twenty patients with sepsis were divided into two groups of patients with and those without a complication of disseminated intravascular coagulation (DIC). By differential analysis of peptides in blood for these groups, we selected thirteen MS peaks as candidate marker peptides for prediction of DIC. By further ROC analysis, eleven sets, each consisting of four peak peptides, were found to show AUC of 1. Among the thirteen peptides, four frequently detected peptides were subjected to precision mass measurement and subsequent MS/MS analysis. Consequently, two peptides of  $m/z = 2743$  and  $m/z = 2886$  were identified to be 2-HS-glycoprotein and fibrinogen chain, respectively, both of which consist of 27 amino acids. These peptides are expected to be biomarkers for prediction of DIC in patients with sepsis.

研究分野：予防医学

キーワード：敗血症 循環不全 血管内凝固症候群 ペプチドマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

世界中の重症敗血症患者数は年間 1800 万人と推定され(1)、救急・集中治療領域での敗血症性ショックの予後は不良で、米国からの報告ではその死亡率は 40~80%とされている(2)。重症敗血症・敗血症性ショックの症例に対しては早期目標指向療法 (EGDT: early goal-directed therapy) が有効であることが知られている。最近発表されたガイドライン (Surviving sepsis campaign guideline: SSCG 2012) では、初期蘇生目標値は重症敗血症診断後 6 時間以内に中心静脈圧 8~12 mmHg、平均動脈圧 65 mmHg 以上、中心静脈血酸素飽和度 70%以上または混合静脈血酸素飽和度 65%以上、尿量 0.5 ml/kg/hr 以上、血中乳酸値の正常化とされている(3)。しかし重症敗血症の症例では、たとえ循環動態や酸素運搬の指標が改善しても局所的な低灌流は持続するため、これまで用いられてきた臨床的なモニターやマーカー値では評価できないとされている。また上記の測定項目は循環障害や組織の代謝障害の結果を反映するものであり、敗血症の重症度判定に有用な循環動態を直接反映する血中バイオマーカーは未だ報告されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では敗血症性ショック初期の循環動態変化を反映する体液性因子に焦点を当て、最近開発された新しいペプチドーム解析技術を用いて、重症敗血症時に変動する血中タンパク質・ペプチド分解産物(ペプチド断片)を網羅的に解析し、循環不全の予知に関連する新規の血管作動性ペプチドを探索した。また、血管内凝固症候群 (DIC, disseminated intravascular coagulation) は敗血症における重要な合併症であり、敗血症性ショックの病態とも関連する。そこで、敗血症性ショックとともに、DIC と関連するペプチドについてもペプチドーム解析により網羅的に探索した。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象者

対象者は敗血症患者 20 名で年齢は  $68.9 \pm 11.4$  歳、APACHE II スコアは  $26.2 \pm 8.9$ 、SOFA スコアは  $5.7 \pm 4.2$  であった。このうち、ショックを併発した患者は 10 名であり、DIC を合併した患者は 8 名であった。入院時に対象者から血清を採取し、下記の BLOTCHIP® MS 法を用いて、敗血症性循環不全(ショック)および DIC をアウトカムとして、ディファレンシャル解析を行った。

### (2) BLOTCHIP®解析システムによる血清検体のプロファイリング

被験者より採取した各血清検体を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、レーンごとニゲルを切断し BLOTCHIP®に電気転写し、MALDI 型質量分析計により質量分析を

行った。1 測定につき 29 個のスペクトルデータを得た。そして得られた積算スペクトルを用いて、ショックの合併の有無で群分けしたショック未発症敗血症検体群 (non-shock 群) およびショック発症敗血症検体群 (shock 群) ならびに DIC の合併の有無で群分けした DIC 未発症敗血症検体群 (non-DIC 群) および DIC 発症敗血症検体群 (DIC 群) の各 2 群間のディファレンシャルプロファイリング解析を行った。解析には ClinProTools 2.2 および BlotMate 2.0 ソフトウェアを用いた。ClinProTools 2.2 を用いて、質量分析計 UltraFlex II により得られたスペクトルデータから各ピークの有意差検定を行った。そして、有意差を認めたピークについて、BlotMate 2.0 を用いて各ピークのデータを抽出し、ピーク描画後、目視によるノイズピークの除去を行った。ノイズを含まないピークを選出後、平均値の差の検討および receiver operating characteristic (ROC) 分析を行い、各ペプチドの診断性能を検討した。

### (3) ペプチドの精製と精密質量の測定

標的ペプチド群のピーク強度が高値を示す検体 3 種類を選別し、それぞれの検体より泳動用サンプルを調整し、BLOTCHIP®を用いて電気泳動を行った。BLOTCHIP®上にキャリブレーション用のペプチドをスポットした後、UltraFlex II のリフレクトロンモードにて各ペプチドの精密質量測定を行った。

### (4) ペプチドの構造解析

標的ペプチドの  $m/z$  を指定し、UltraFlex II の LIFT モードによって MS/MS 構造解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 敗血症性ショックおよび DIC についてのディファレンシャル解析

ディファレンシャルプロファイリング解析により、各 MS ピークの高さおよび面積について比較したところ、敗血症性ショックの有無に関しては 64 個のピークで、また DIC の有無に関しては 63 個のピークで、有意差を検出した。さらに平均積算スペクトルを算出して各 MS ピークの形状および強度を精査したところ、ショックの有無では 16 個の MS ピークを(表 1)、DIC の有無では 13 個の MS ピークを(表 2)、それぞれマーカー候補として選抜した。敗血症性ショックで MS ピーク高が増大したのは  $m/z$  3243, 3374, 3404, 3445, 3519, 3589, 4374, 4598, 4984, 6060, 13384, 16753 であり、MS ピーク高が低下したのは、 $m/z$  2129, 2589, 3954, 5926 であった(表 1)。一方、DIC 群で MS ピーク高が増大したのは  $m/z$  2792, 3589, 3618 で、MS ピーク高が低下したのは、 $m/z$  2743, 2862, 2886, 2903, 2962, 3259, 3282, 3954, 5357, 9310 であった(表 2)。

## (2) ROC 解析

MS ピークについて ROC 解析を行い、area under the curve (AUC)を算出した。non-shock 群と shock 群間、ならびに non-DIC 群と DIC 群間における感度、特異度および AUC を下表 (表 1,2) に示す。

表 1. non-shock 群と shock 群間の ROC 解析

m/z	感度	特異度	AUC
2129	90	60	0.72
2589	70	70	0.68
3243	80	60	0.70
3374	100	50	0.73
3404	90	60	0.74
3445	100	30	0.67
3519	100	30	0.63
3589	60	80	0.65
3954	50	90	0.59
4374	80	80	0.76
4598	90	50	0.66
4984	80	80	0.76
5926	40	90	0.62
6960	70	100	0.80
13384	70	90	0.76
16753	60	100	0.76

矢印は shock 群での MS ピークの増減を示す。

表 2. non-DIC 群と DIC 群間の ROC 解析

m/z	感度	特異度	AUC
2743	37.5	100	0.71
2792	62.5	83.3	0.66
2862	37.5	91.7	0.65
2886	50	91.7	0.59
2903	75	66.7	0.72
2962	100	41.7	0.73
3259	87.5	58.3	0.72
3282	62.5	83.3	0.68
3589	87.5	91.7	0.88
3618	87.5	58.3	0.70
3954	62.5	91.7	0.76
5357	62.5	83.3	0.74
9310	87.5	83.3	0.84

矢印は DIC 群での MS ピークの増減を示す。

さらに敗血症性ショックおよび DIC に関して 2~6 ピークの組合せを作成し、ROC 解析を行い AUC = 1 となる組合せを求めたところ、DIC に関しては 4 ピークの組合せ 11 組が見つかった (表 3)。一方ショックに関しては AUC = 1 となる組合せは見つからなかった。

## (3) 精密質量および MS/MS 構造解析

DIC に関するペプチドの中で出現頻度が高い m/z = 2743、2862、2886、2903、3589 について精密質量測定を実施し、さらに MS/MS 構造解析を行ったところ、2 種類のペプチドについて帰属が明らかになった。すなわち、

それぞれいずれも 27 個のアミノ酸から成る  $\alpha$ -2 HS glycoprotein と fibrinogen chain であった。一方、他の 3 種類のペプチドについては、親イオンのピークは得られるものの、フラグメンテーションが不完全であり、同定には至らなかった。各ペプチドの精密質量を下表 (表 4) に示す。尚、帰属の明らかになった 2 つのペプチドのアミノ酸配列については、今後の知的財産への活用を考慮して、現時点での公開を控える。

表 3. non-DIC 群と DIC 群間の ROC 解析で AUC = 1 となった MS ピークの組合せ

MS ピークの組合せ (m/z)			
2743	2792	3589	3618
2743	2886	2903	2962
2743	2886	2903	3259
2743	2886	2903	3282
2743	2886	2903	3589
2743	2886	2903	3954
2743	2886	2903	9310
2862	2886	2903	3589
2862	2886	3589	3954
2886	2903	3259	3589
2886	2903	3589	3954

表 4. 各ペプチドの精密質量 [M+H]<sup>+</sup> および帰属タンパク質

m/z	Monoisotopic m/z	Protein name
2743	2739.519	$\alpha$ 2-HS-glycoprotein
2862	2858.533	同定されず
2886	2882.549	Fibrinogen $\beta$ chain
2903	2898.539	同定されず
3589	3583.677	同定されず

## (4) 検出されたペプチドと敗血症の病態に関する考察

本研究ではディファレンシャルプロファイリング解析により敗血症性ショックの有無でスペクトル強度の異なる 16 個の MS ピークをマーカー候補として選別したが、ROC 解析の結果、敗血症ショックに関する新規ペプチドを発見することはできなかった。

一方、敗血症ではしばしば DIC を合併し、DIC は敗血症性ショックの病態と関連することが知られている (4)。一般に、DIC の診断にはプロトロンビン時間、部分トロンボプラスチン時間、血小板数、フィブリノーゲン、フィブリン分解産物 (D-ダイマーや可溶性フィブリンモノマー) などの、さまざまな血液凝固系のマーカーが用いられる (5)。本研究では、敗血症に合併する DIC の有無でスペクトル強度の異なる 13 個の MS ピークをマーカー候補として選別し、この中から ROC 解析にて AUC = 1 となる 4 ピークの組合せ 11 組が見つかった。さらに、このなかで出現頻度が高い

4つのペプチドの精密質量およびMS/MS構造解析を試行したところ、2つのペプチドを同定することができた。これらはいずれも27個のアミノ酸から成る $\alpha$ -2 HS glycoproteinとfibrinogen chainであった。このうちfibrinogen由来のペプチドについては、血液凝固線溶系異常であるDICの病態を考慮すると理解しやすい。一方、 $\alpha$ -2 HS glycoproteinはfetuin-Aとも呼ばれ、糖代謝、骨代謝、免疫調節などへの作用が報告されている。最近の研究では、血中fetuin-Aレベルの変動が敗血症患者の予後の予知因子として有用であることが示されている(6)。さらに敗血症モデルマウスにfetuin-Aを投与するとHMGB1 (high mobility group box 1)が減少し、予後が改善することが報告されている(7)。DICの合併は敗血症の予後の決定因子の一つであることから、本研究での $\alpha$ -2 HS glycoprotein断片ペプチドの血中レベルと敗血症に合併するDICとの関連性は興味深い。そこで $\alpha$ -2 HS glycoproteinとfibrinogen chainについては、今後さらに症例数を増やして敗血症の予後を予知するためのバイオマーカーとしての意義を明らかにしたい。

さらに、本研究で同定までには至らなかった残りのDIC関連ペプチド(表2)の構造解析を進め、これらのペプチドを敗血症に合併するDICの早期予知に応用することにより、敗血症患者の予後改善に役立てたい。

#### <引用文献>

Slade E, Tamber PS, Vincent JL. The Surviving Sepsis Campaign: raising awareness to reduce mortality. *Crit Care*. 2003;7(1):1-2.

Martin GS. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012; 10(6): 701-6.

Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubenfeld GD, Webb SA, Beale RJ, Vincent JL, Moreno R; Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including the Pediatric Subgroup. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med*. 2013; 41(2): 580-637.

Hartemink KJ, Hack CE, Groeneveld AB. Relation between coagulation/fibrinolysis and lactate in the course of human septic shock. *J Clin Pathol*. 2010; 63(11): 1021-6.

Wada H, Thachil J, Di Nisio M, Mathew P, Kurosawa S, Gando S, Kim HK, Nielsen

JD, Dempfle CE, Levi M, Toh CH; The Scientific Standardization Committee on DIC of the International Society on Thrombosis Haemostasis. Guidance for diagnosis and treatment of DIC from harmonization of the recommendations from three guidelines. *J Thromb Haemost*. 2013 Feb 4. doi: 10.1111/jth.12155.

Karapela I, Kandri E, Antonakos G, Vogiatzakis E, Christodoulatos GS, Nikolaidou A, Dimopoulos G, Armaganidis A, Dalamaga M. Kinetics of circulating fetuin-A may predict mortality independently from adiponectin, high molecular weight adiponectin and prognostic factors in critically ill patients with sepsis: A prospective study. *J Crit Care*. 2017; 41:78-85.

Li W, Zhu S, Li J, Huang Y, Zhou R, Fan X, Yang H, Gong X, Eissa NT, Jahnen-Dechent W, Wang P, Tracey KJ, Sama AE, Wang H. A hepatic protein, fetuin-A, occupies a protective role in lethal systemic inflammation. *PLoS One*. 2011; 6(2):e16945. doi: 10.1371/journal.pone.0016945.

#### 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)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

若林 一郎 (WAKABAYASHI, Ichiro)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 70220829

##### (2)研究分担者

小谷 穰治 (KOTANI, Joji)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 80360270

丸茂 幹雄 (MARUMO, Mikio)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 40333950