

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390389

研究課題名（和文） 高度低体温により誘導される蛋白質発現・リン酸化の  
網羅的プロテオミクス解析研究課題名（英文） Proteomic analysis of global changes induced by deep hypothermia  
in both protein synthesis and phosphorylation.

## 研究代表者

織田 禎二 (ODA TEIJI)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：50448198

研究成果の概要（和文）：低体温導入に対する生体の反応を心臓外科手術で採取した心筋組織及び動物組織（肝、心筋）を用いて最新のプロテオミクス手法による網羅的解析により検討した。ラット心臓では、低体温（23℃）導入により、ATP 産生に関する蛋白やトロポミオシンなどの心筋収縮を調節する蛋白発現の減少を認めた。一方肝臓では、低体温導入により小胞体やミトコンドリア内の ATP 産生やアミノ酸代謝、尿素回路、抗酸化蛋白、アポトーシス抑制に関与する蛋白の減少を認めた。これらの変化はすでに報告されている冬眠動物の冬眠開始時の変化と類似していたが、低体温で減少した小胞体の分子シャペロン蛋白（蛋白の折りたたみに関与）は冬眠動物では逆に増加することが報告されており、この差異は今後の重要な研究課題になるものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：Hypothermia is utilized with increasing frequency to protect organs such as the brain against ischemic injury. Though a principal mechanism of hypothermic protection would be suppression of metabolism, its pleiotropic effects are as yet incompletely understood. To analyze hypothermia-induced proteomic changes, we employed fluorescence-based two-dimensional (2-D) difference gel electrophoresis (DIGE) and matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight (MALDI-TOF/TOF) tandem mass spectrometry. Deep hypothermia produced significant down-regulation of the proteins that regulates ATP synthesis or muscle contraction in rat heart muscle. Hypothermia also produced significant down-regulation of the following cellular components and biological processes or pathways in rat livers: endoplasmic reticulum (ER), mitochondria, ATP binding, amino acid metabolism, urea cycle, response to oxidative stress, anti-apoptosis, negative regulation of apoptosis. These changes were similar to those in hibernating animals except for both ER and apoptosis-related pathways, which are conversely up-regulated in hibernating mammals. This discrepancy needs to be investigated further in future research.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2010年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2011年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：心臓大血管外科学・低体温療法・プロテオミクス解析・冬眠

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 心臓手術（小児心臓手術、弓部大動脈手術）では以前から表面冷却あるいは人工心肺装置を用いた中心冷却によって体温を20℃前後まで低下させることで、循環停止の安全限界の延長を図ってきた。また最近、頭部外傷、脳卒中、心停止蘇生後脳症に対する脳低温療法（32℃～34℃）の有効性が報告されている。これらの低体温療法において、低体温がもたらす、代謝（酸素消費量）の抑制により臓器保護効果を生じると考えられているが、低体温導入に対する生体の反応に関する基礎的データは極めて少なく、網羅的な解析（蛋白発現など）は行われていない。

(2) 冬眠には虚血・再灌流障害を軽減する作用が認められ、冬眠中のリスから摘出された腎や肝を通常の臓器保存法で保存しても、機能を保ったままの長期保存（72-96 h）が可能であることが報告されている。冬眠動物の冬眠中の変化を恒温動物の低体温導入による変化と比較することは、より副作用の少ない効果的な低体温療法開発の契機となる可能性がある。

### 2. 研究の目的

高度低体温循環停止法を用いる胸部大動脈手術例において低体温導入により誘導される生体反応をプロテオミクスによる網羅的解析で明らかにし、合わせて動物実験を行ない、冬眠研究の成果と照らし合わせて、より副作用の少ない高度低体温循環停止法、虚血・再灌流障害に対する新しい保護法を探る。

### 3. 研究の方法

(1) ラットに全身麻酔をかけ表面冷却を加えて軽度（34℃）あるいは高度（23℃）まで下げ、3時間後に肝組織、心筋組織、血漿を採取し、プロテオミクス解析を行う。

(2) 胸部大動脈瘤手術で高度低体温法を用いる症例と常温で行う症例を設定して、①人工心肺開始直後（冷却前）、②冷却後、③復温後の3点で右房壁、血清、筋肉、脂肪組織を採取し、プロテオミクス解析を行い、常温群と低体温群での比較を行う。

### (3) プロテオミクス解析法

各組織より蛋白質を抽出・処理し、蛍光標識2次元ディフュゼンシャル電気泳動（2D-DIGE）にかけて低体温導入により増減する蛋白質のスポットを解析する。次に有意の増減を示した蛋白質スポットをマトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計にて解析する（MALDI-TOF/TOF MS/MS）。なお、ヒト組織ではiTRAQ試薬によるラベル化後、よりハイスループットな解析

法として nanoLC-MALDI-TOF/TOF MS/MS 法を用いて解析、蛋白質のリン酸化についても検討する。

### 4. 研究成果

(1) 高度低体温（23℃）導入による蛋白質発現変化（ラット、肝）  
高度低体温と常温における蛋白質発現変化を蛍光標識 2D-DIGE で示すと 2414 個のスポットが同定された（図1）。

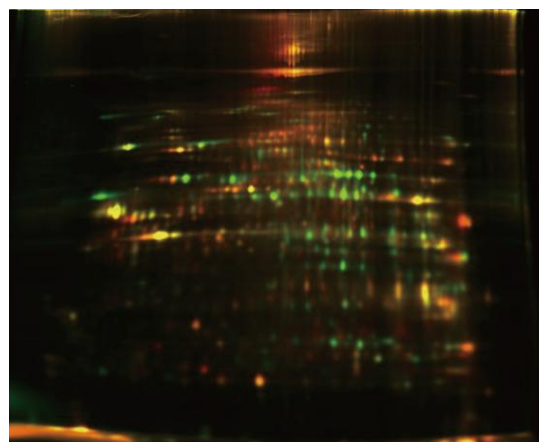


図1. 蛍光標識二次元電気泳動：赤いスポットは低温で増加、緑色のスポットは低温で減少を示す

このうち低体温導入により1.5倍以上の増減を示したスポットは264個あった。これらのうち、質量分析で蛋白を同定できたのは21個、このうち低体温で減少した蛋白：19個、増加した蛋白質：2個であった（図2）

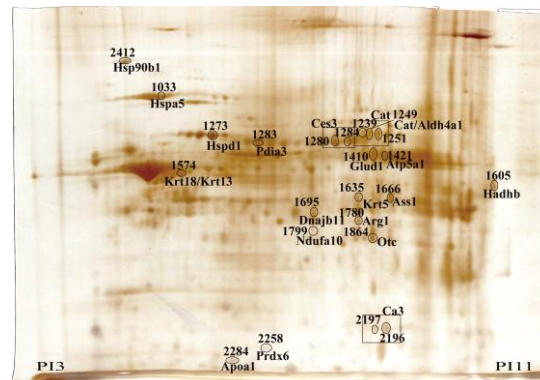


図2. ラット肝において高度低体温により有意に発現が変化した蛋白質スポットを2次元電気泳動スポット上に遺伝子名にて表示

この同定された蛋白質をバイオインフォマティクス解析によりパスウェイで分類すると表1の如くであった。

Pathway ID	Description	Input genes	p-value
GO0000050	Urea cycle	Arg1, Ass1, Otc	0.01
RN00330	Arginine and proline metabolism	Aldh4a1, Arg1, Ass1, Glud1, Otc	0.01
GO0010043	Response to zinc ion	Arg1, Ass1, Otc	0.01
RN00250	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	Aldh4a1, Ass1, Glud1	0.01
GO0001889	Liver development	Arg1, Ass1, Otc	0.025
GO0006979	Response to oxidative stress	Ca3, Cat, Hsa5, Hspd1	0.025
GO0043066	Negative regulation of apoptosis	Krt18, Cat, Hspa5, Hspd1	0.025
GO0006916	Anti-apoptosis	Hspa5, Hsp90b1, Hspd1	0.025
GO0042493	Response to drug	Arg1, Ass1, Hspd1, Apoa1, Otc	0.025
GO0032496	Response to lipopolysaccharide	Arg1, Ass1, Hspd1	0.025

表1: 増減した蛋白質のバイオインフォマティクス解析(enrichment analysis)

低体温により尿素回路やアミノ酸代謝に関係する酵素が有意に減少した。また、抗酸化作用、抗アポトーシス作用に関係する蛋白質も減少したが、これらは低体温の虚血に対する臓器保護作用から期待した変化とは逆の変化であったが、これらの変化は全体として冬眠中のリスの肝組織の変化と類似していた。しかし、ラットに対する低体温導入では減少した小胞体の分子シャペロン蛋白質(Hspa5, Hsp90b1, Pdia3, Dnajb11)は冬眠動物では逆に増加していた。この相違はこの分子シャペロンがアポトーシスと関係し、小胞体ストレスによりアポトーシスが惹起されることから、今後の極めて重要な研究課題である。

(2) 軽度低体温 (34°C) 導入による蛋白質発現変化 (ラット、肝)

同様の方法にて軽度低体温導入群と常温群のラット肝組織のプロテオミクス解析を行った。34°Cでの変化は37°C、34°C、23°Cの3群比較では、37°Cに近く(図3)、34°Cと37°Cを比較して有意の発現変化を示す蛋白数は少なく、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase と ATP synthase subunit gamma, mitochondrial の2蛋白のみが有意に減少した。これは低体温暴露の時間が3時間と短いこともあり、新規の蛋白質合成よりも翻訳後修飾による変化がおもに起きているのではないかと想定された。今後より長時間暴露実験の設定、リン酸化など翻訳後修飾の解析が必要と思われる。

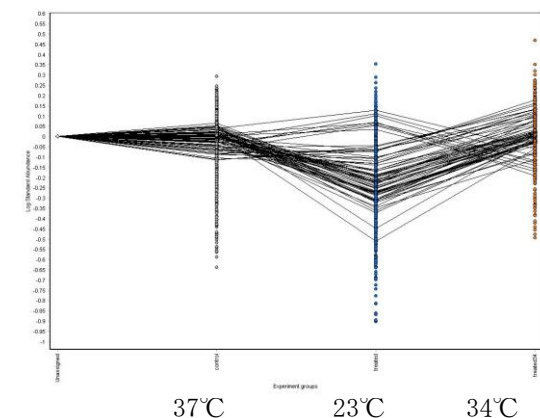


図3. 2D-DIGEでの各スポットの増減変化: 37°C、34°C、23°Cの3群比較(ラット、肝)

(3) 高度低体温 (23°C) 導入による蛋白質発現変化 (ラット、心)

同様の方法で高度低体温 (23°C) と常温群での心筋組織の蛋白質発現変化をプロテオミクス解析にて比較検討した。高度低体温導入により12個の蛋白質が有意に減少したが、増加した蛋白は同定できなかった(図4)。減少した蛋白質はATP産生に関するもの、心筋収縮蛋白の制御に関するものなどであった。

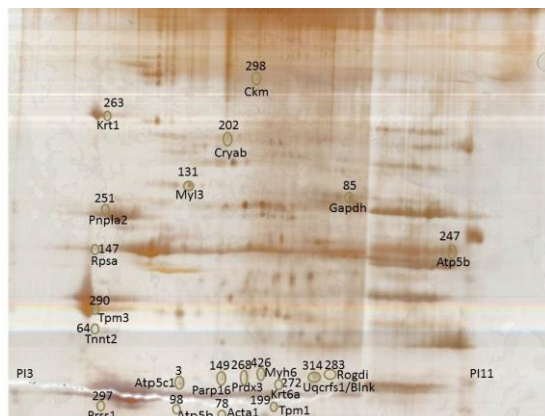


図4. 高度低体温 (23°C) による減少した心筋蛋白質スポットを遺伝子名とともに表示

(4) 軽度低体温 (34°C) 導入による蛋白質発現変化 (ラット、心)

同様の方法で解析を行ったが、軽度低体温では有意に増減した蛋白質を同定できなかった。今後は、長時間の低体温設定あるいはリン酸化などの翻訳後修飾の解析を行う予定である。

(5) 胸部大動脈瘤手術時に採取したサンプルの解析

現在、高度低体温例と常温例のサンプルを nanoLC-MALDI-TOF/TOF MS/MS 法によりプロテオミクスを行い、データの統計解析 (蛋白質発現変化、リン酸化部位の同定) を行っている。

## 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 5 件)

1. Teiji Oda, Kouji Shimizu, Akane Yamaguchi, Kazumi Satoh, Ken-ichi Matsumoto, Hypothermia produces rat liver proteomic changes as in hibernating mammals but decreases endoplasmic reticulum chaperones, Cryobiology, 査読あり、in press

[DOI:10.1016/j.cryobiol.2012.05.004](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.05.004)

2. Ken-ich Matsumoto, Tomoko Maniwa, Tetsuya Tanaka, Kazumi Satoh, Hideki Okunishi, Teiji Oda, Proteomic analysis of calcified abdominal and thoracic aortic aneurysm, International Journal of Molecular Medicine, 査読あり、2012, Apr 30 Epub ahead of print,

[DOI:10.3892/ijmm.2012.985](https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.985)

3. Masao Yokoyama, Teiji Oda, Is the use of effective orifice area index calculator appropriate in definition of prosthesis-patient mismatch? Ann Thorac Surg, 査読あり、91, 2011, 644-645

<http://ats.ctsnetjournals.org/>

4. Kazumi Satoh, Marie Tsukamoto, Masanobu Shindoh, Yasunori Totsuka, Teiji Oda, Ken-ichi Matsumoto, Increased expression of tenascin-x in thoracic and abdominal aortic aneurysm tissues, Biol. Pharm. Bull, 査読あり、33, 2010, 1898-1902

<http://bpb.pharm.or.jp/>

5. Teiji Oda, Acute kidney injury after off-pump coronary artery bypass grafting, Circulation Journal, 査読あり、74, 1069-1070, 2010

[DOI:10.1253/cirj.CJ-10-0329](https://doi.org/10.1253/cirj.CJ-10-0329)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

織田 禎二 (ODA TEIJI)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：50448198

### (2) 研究分担者

松本 健一 (MATSUMOTO KENICHI)

島根大学・総合科学研究支援センター・教授

研究者番号：30202328

### (3) 連携研究者

豊田 浩作 (TOYOTA KOUSAKU)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：30322225

二階 哲朗 (NIKAI TETSUROU)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：20314643