

令和元年5月27日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11421

研究課題名(和文) プロテオーム解析による敗血症の重症度診断

研究課題名(英文) Evaluation of the severity of sepsis by proteomic analysis

研究代表者

射場 敏明 (Iba, Toshiaki)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：40193635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症の定義は「感染により制御不能な宿主反応に起因した生命を脅かす臓器障害を合併した状態」である。しかし「侵襲自体の評価」や「生体反応の程度」を正確に評価することは容易ではなく、新規評価法の開発が求められてきた。今回、プロテオミクスを用いた敗血症の重症度診断法により、高度侵襲下においては1)凝固関連タンパク質、2)鉄代謝関連タンパク質、3)補体関連タンパク質の変動が重要であることが明らかになった。さらに、これらのうち凝固関連因子の変化に焦点を当てると各種の細胞から放出されるextracellular vesicleとの関連が大きいことが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロテオミクス解析を用いた新たな研究手法により、敗血症の重症化は各種タンパク質の変動で評価することが可能であることが明らかになった。そして特に、凝固関連タンパク質、鉄代謝関連タンパク質、補体関連タンパク質の変化と重症化は強い関連がみられることが明らかにされた。よってこれらを総合的に評価することにより、従来にはない重症化評価の手法を開発できる可能性が考えられた。さらにこれらのタンパク質産生の調節や拮抗剤の開発が新たな治療手段の開発につながる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Sepsis is defined by "infection-induced inappropriate host-immune response that induces life-threatening organ dysfunction". The evaluation of "the degree of the insult" and "the degree of host response" have not been properly performed, and new approach has been required. In the present study, we newly performed a diagnostic approach that comprised of measuring the changes of 1) coagulation-related proteins 2) iron-metabolism-related proteins 3) complement-related proteins by using proteome analysis. Among three components, we further elucidated that the changes of coagulation-related proteins are related to the expression of extracellular vesicles.

研究分野：敗血症

キーワード：敗血症 プロテオミクス 凝固因子 鉄代謝 補体

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

敗血症においては、**細胞死**にともなって**核内から逸脱する宿主由来のタンパク質**が **damage-associated molecular pattern (DAMPs)** として敗血症の病態形成に関与している。今回、プロテオーム解析により DAMPs をはじめとする各種タンパク質の挙動を網羅的に観察し、さらにその中からキーとなり機能するタンパク質を同定して敗血症重症化と関連を明らかにしていくことは従来にない手法であり、複雑な敗血症病態理解へのユニークなアプローチである。

2. 研究の目的

敗血症は重症化により治療が困難となるため、重症化のメカニズムを正しく理解して、発症時からその重症度を正しく把握することが重要である。これまで重症度評価に用いられてきた種々の血中マーカーについては、個別に測定するのは非効率であるため、基礎試験、および臨床例において経時的な変動が大きい血中タンパク質をプロテオーム解析によって網羅的に同定し、これをパターン化認識することによって、重症度評価や治療方針の決定に有用と思われるバイオマーカーを選択し、病態への関与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 30名の患者血清から継時的に採取した検体から14種類の大量含有タンパク質を除去した後、二次元電気泳動を行って敗血症患者の血清に含有される蛋白質の二次元電気泳動画像を得た。さらに68名の健常者から同様の方法で正常サンプルのデータを取得した。これらのデータを利用して敗血症重症度識別モデルを作成し、評価を行った。

2) 次に得られたデータを転移学習と深層学習の組み合わせにより Deep Neural Network (DNN) を構築し、構築した DNN に転移先の教師ラベル毎にデータを入力してラベル毎に関連度ベクトルを算出した。このようにして関連度ベクトルを算出することにより、ドメイン (転移元/転移先) が異なっても、同一数値に対応する変数の値が大きくなっていることを確認して、重症化関連 DAMPs の候補とした。このとき関連度ベクトルは、転移元と転移先の教師ラベルの関係性を、転移元データを用いて構築したモデルに従って評価した結果を示すものである。その際、関連度ベクトルの推定方法には何らかの基準が必要となるが、本研究では転移先の教師ラベル毎の出力ベクトルの平均を基準とした。そして最後に関連度ベクトルを転移先データの教師ラベルとして扱い、微調整を行った。

3) 以上の方法で抽出された DAMPs の変動と臨床経過を関連づけて、候補の中から特に重症化と関連するタンパク質の同定を行った。

4. 研究成果

H29年度までの研究では、上述のプロテオミクス解析を用いて敗血症の重症度診断法の開発を行った。その結果、高度侵襲症例においては、1) 急性相タンパク質、2) 補体関連タンパク質、3) 鉄代謝関連タンパク質、4) 凝固関連タンパク質の変動が顕著にみられ(下図)、これらと関連する補体、free-heme、トロンビンをはじめとする凝固因子などが重要な DAMPs の候補として挙げられた。また1-4を複合して得られる敗血症の診断成績は極めて高い(感度:0.933, 特異度:0.941)ことが確認された。しかし、各因子がどのようにして敗血症の重症化に寄与しているかまでは明らかではなかった。そこでH30年度の研究においては、これらのうち最も挙動が顕著であった凝固関連因子に焦点を当て、まず敗血症においてみられる凝固異常においては、各種の細胞から放出される extracellular vesicle の関与が大きいことを確認した。すなわち、特に単球や好中球などの白血球系細胞、および活性化血小板から放出される

protein name					
1	Transthyretin	18	Haptoglobin Fragment	35	C4d A
2	Transthyretin	19	Haptoglobin	36	Complement factor B
3	Transthyretin	20	HP protein	37	Complement factor B
4	C reactive protein	21	HP protein	38	Complement factor B Fragment
5	Haptoglobin	22	Haptoglobin Fragment	39	Complement factor B
6	C reactive protein	23	Ceruloplasmin	40	Complement factor B
7	C reactive protein	24	Alpha 2 macroglobulin	41	Complement factor B
8	Ceruloplasmin	25	Microtubule associated serine threonine protein kinase 4 Fragment	42	Complement factor B
9	Haptoglobin Fragment	26	C reactive protein	43	Alpha 2 macroglobulin
10	Hemoglobin beta 1 and beta 2 chains	27	Prothrombin	44	Alpha 2 macroglobulin
11	Hemoglobin beta	28	VWF protein	45	Alpha 2 macroglobulin
12	Hemoglobin subunit beta	29	Microtubule associated serine threonine protein kinase 4 Fragment	46	Beta defensin 109
13	Hemoglobin alpha chain	30	Complement component 4A Rodgers blood group		Olfactory receptor 1E3
14	Alpha 2 globin chain	31	Complement component C4B Childo blood group		Mucin 20
15	Carbonic anhydrase 1 Fragment	32	C4A2 Fragment	47	Chondroadherin like protein Fragment
16	HP protein	33	Complement C4 B	48	Alpha 2 macroglobulin
17	HP protein	34	cDNA FLJ54023 highly similar to Heat shock protein HSP 90 beta	49	Complement C5

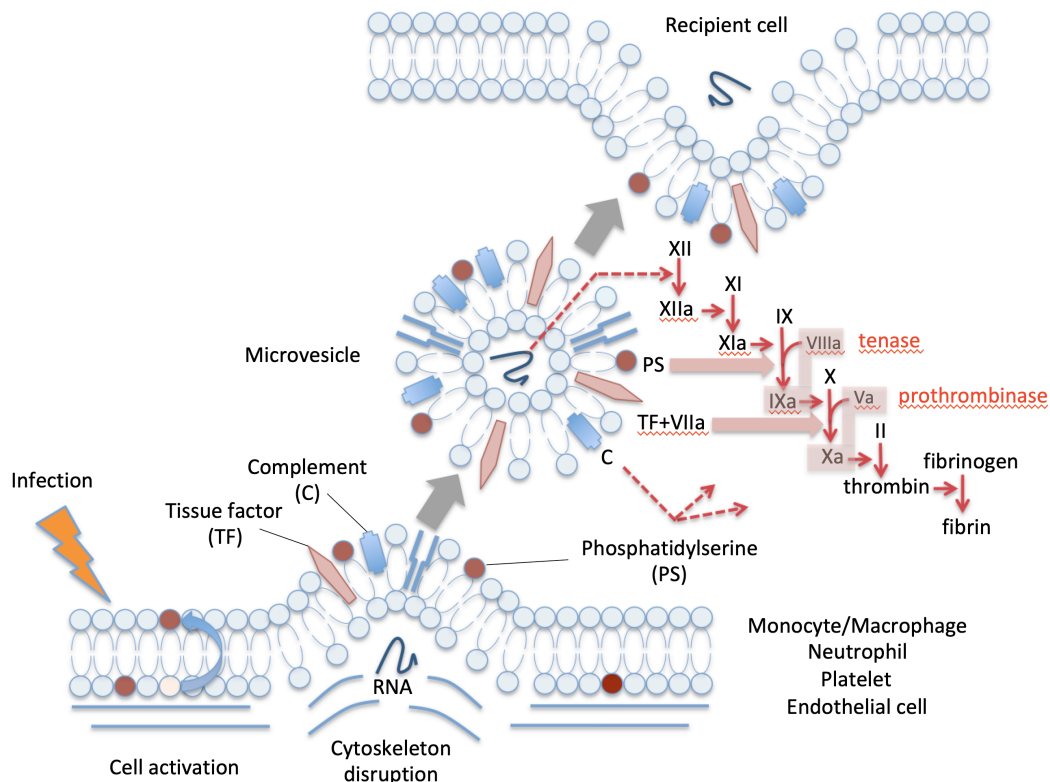
■ : 急性相タンパク質

■ : 補体系タンパク質

■ : 鉄関連タンパク質

■ : 凝固・血栓関連タンパク質

Extracellular vesicle の表面には tissue factor やフォスファチジルセリンなどの内、外因系凝固カスケードのイニシエータが発現しており、これを起点とする凝固反応が敗血症重症化に寄与していることが明らかとなった。



今後の研究では、特に鉄代謝関連タンパク質が関与していると考えられる free-heme による組織障害、凝固活性化によって生じる臓器障害の発生機序に関して研究を継続していく予定である。

〔学会発表〕 (計 1 件)

1. Iba T. A hemostasis perspective on how to mitigate sepsis mortality. 64th International Society on Thrombosis and Haemostasis. Dublin 7.21

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年：
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：林 宣宏

ローマ字氏名：Nobuhiro Hayashi

所属研究機関名：東京工業大学

部局名：生命理工学院

職名：准教授

研究者番号（8桁）：80267955

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。