

令和元年6月12日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15758

研究課題名(和文) 網羅的解析による急性腸間膜虚血の早期診断法の開発

研究課題名(英文) Challenges of new biomarkers of acute mesenteric ischemia

研究代表者

中田 孝明 (Nakada, Taka-aki)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：20375794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：急性腸間膜虚血の診断は困難であり、近年でもその問題は未解決である。Cell free DNAは細胞が崩壊した時に放出されるDNA断片であり、様々な疾患で有用なbiomarkerとなることが報告されている。そこで我々は急性腸間膜虚血の動物モデルにおいてcfDNAを測定し、cfDNAのbiomarkerとしての早期診断や腹膜炎などの鑑別能力を他のbiomarkerと比較することを目的として本研究を計画した。結果、Cell free DNAは急性腸間膜虚血の早期診断および腹膜炎などの鑑別においても有用なbiomarkerとなることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性腸間膜虚血の診断は困難であり、診断の遅れは致命的な結果をもたらす。にも関わらず確実な診断方法は未だなく、早期診断方法の確立は急務である。本研究では、Cell-free DNAがこれまで報告されてきたbiomarkerと比較しても急性腸間膜虚血における早期診断・かつ他の腹膜炎などの鑑別に有用なbiomarkerとなり得る可能性が示唆されており、今後の臨床応用も期待でき、価値ある業績である。

研究成果の概要(英文)：Early diagnosis of acute mesenteric ischemia (AMI) is difficult. Circulating cell-free DNA (cfDNA) is released in response to cell breakdown due to invasion. cfDNA has recently been attracting clinical interest as a useful diagnostic index in various disease. We therefore designed the present study, aiming at measurement of plasma cell free DNA(cfDNA) in animal models to compare the performance of cfDNA and other biomarkers in early diagnosis of AMI and differentiation of AMI from peritonitis. cfDNA is a useful biomarker in early diagnosis of intestinal ischemia and differentiation from the other acute abdomen, such as peritonitis. Further investigation is needed to establish the clinical usefulness of cfDNA.

研究分野：救急集中治療医学

キーワード：急性腸間膜虚血 cell free DNA biomarker 早期診断

## 1. 研究開始当初の背景

急性腸間膜虚血 (Acute Mesenteric Ischemia (AMI)) は動脈の塞栓、動脈の血栓、非閉塞性  
の原因 (non-occlusive mesenteric ischemia: NOMI)、静脈塞栓の4つの原因の結果として発  
症し、稀だがその死亡率は高い。AMIの死亡率を減らすためには発症から6-8時間以内に診断  
することが非常に重要である。しかし、AMIは画像所見や検査所見が非特異的であり早期診断  
は容易ではなく、AMIと腹膜炎などの急性腹症との鑑別も困難である。

この問題を解決するため、これまで Lactate、creatin kinase(CK)、I-FABP など各種  
biomarkerの研究がされてきた。I-FABPは感度・特異度に優れ、最も信頼がおける biomarker  
と報告されている。しかしながら、I-FABPの早期診断能は不明であり、また I-FABPは虚血  
時のみならず腹膜炎などでも上昇することが知られており、急性腹症における鑑別能はまだ十  
分に研究がされていない。以上から、急性腸間膜虚血の biomarkerの開発は急務であると言え  
る。

## 2. 研究の目的

近年蛋白質網羅的解析 (プロテオミクス解析) や cell-free DNA/RNA の解析の発達は著しく、  
各種疾患で良好な biomarker が発見されている。そこで我々は急性腸間膜虚血のヒト・動物モ  
デルの血漿を用いて質量分析計を用いた蛋白質網羅的解析 (プロテオミクス解析)、Sequencer  
を用いた cell-free DNA/RNA の網羅的解析を行い、急性腸間膜虚血の早期診断法の開発を目的  
とした本研究を計画した。本研究は特定の蛋白質 biomarker に限定されていたこれまでの  
biomarker 研究と異なり、バイアスなく網羅的解析方法を用いるため biomarker の新規発見が  
期待でき、cell-free DNA/RNA/蛋白質を多層的に網羅的解析を行う独創性を持つ。

## 3. 研究の方法

本研究ではモデルを動物を用いた網羅的解析で診断 biomarker 候補を導出し、ヒト検体を用い  
て検証する。

- (1) 急性腸間膜虚血ラット実験モデル (acute mesenteric ischemia AMI 群) を作成し、血漿  
サンプルを収集する。対照群として感染の影響の強い盲腸穿孔モデル (cecal puncture CP  
群) と開腹術のみ施行の sham 群の2群を用意する。血漿の採取にあたっては虚血時間の長  
短が biomarker に及ぼす影響を検討するため虚血後短時間(2時間)、長時間(6時間)の  
2point で検体の採取を行う。
- (2) 採取された血漿を用いて 質量分析計を用いたプロテオーム解析、 cell-free DNA/RNA  
を sequencer (shotgun 法) で網羅的解析する。網羅的解析結果は別の検出法 (ウエスタンブ  
ロット/ELISA/PCR 法) で発現を検証し、診断 biomarker 候補を導出する。
- (3) ヒト血漿 (患者/健常者群) を用い、導出された診断 biomarker を測定し、ROC 解析を用い  
て診断能を評価し、精度の高い早期診断に有用な新規 biomarker を同定する。

#### 4 . 研究成果

上記の血漿検体採取は全て終え、解析については下記のような結果になっている。

##### (1) プロテオーム解析

採取した血漿検体を用いて網羅的解析を行った。その結果、ApolipoproteinB-100 , Serum paraoxonase/arylesterase1 といったタンパク質が biomarker 候補として導出されたため、今後は、動物検体・ヒト血漿での検証を行っていく予定である。

(2) cell-free DNA 値を測定した。既報にて急性腸間膜虚血の良好な biomarker であると報告されている I1-FABP も測定し、比較した。3 群間で比較した。2 時間時点での I-FABP は 3 群で有意差は認めなかったが ( $5.01 \pm 0.56$  vs  $6.54 \pm 0.70$  vs  $5.90 \pm 0.80$  ng/ml;  $p=0.30$ ) , cfDNA 値は Group (AMI) で有意に上昇し ( $52.9 \pm 5.74$  vs  $27.6. \pm 4.70$  pg/ml;  $p=0.009$ ) , Group (CP) と比較しても有意に上昇していた ( $12.4 \pm 1.95$  vs  $12.5 \pm 1.91$  ng/ml;  $p=0.98$ ) . また、6 時間時点での I-FABP は Group (AMI) で Group1(Sham) と比較して優位に上昇していたが ( $12.4 \pm 1.95$  vs  $5.60 \pm 0.95$  ng/ml;  $p=0.016$ ) , Group (CP) との間に有意差は認めなかった ( $12.4 \pm 1.95$  vs  $12.5 \pm 1.91$  ng/ml;  $p=0.98$ ) . cfDNA の値は Group (AMI) で Group (Sham) と比較して優位に上昇しており ( $42.1 \pm 6.86$  vs  $19.0 \pm 5.60$  pg/ml;  $p=0.014$ ) , Group (CP) と比較すると有意差はないものの 2 時間の結果と同様に Group (AMI) の方が高い傾向があった ( $42.1 \pm 6.86$  vs  $27.7 \pm 7.97$  pg/ml;  $p=0.10$ )

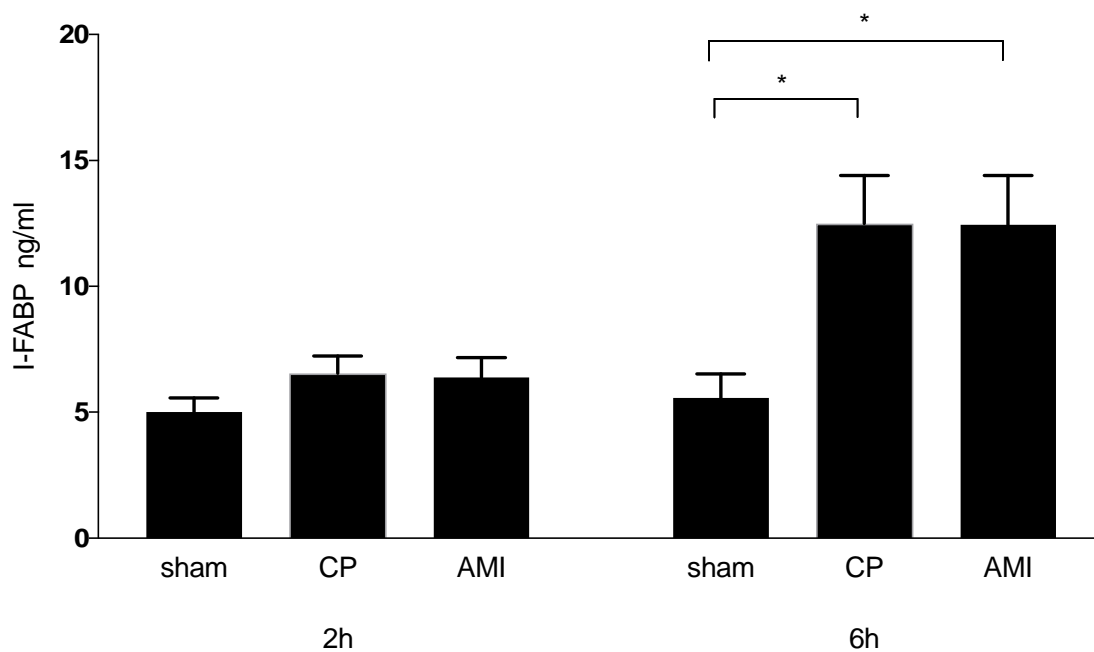


Figure1A

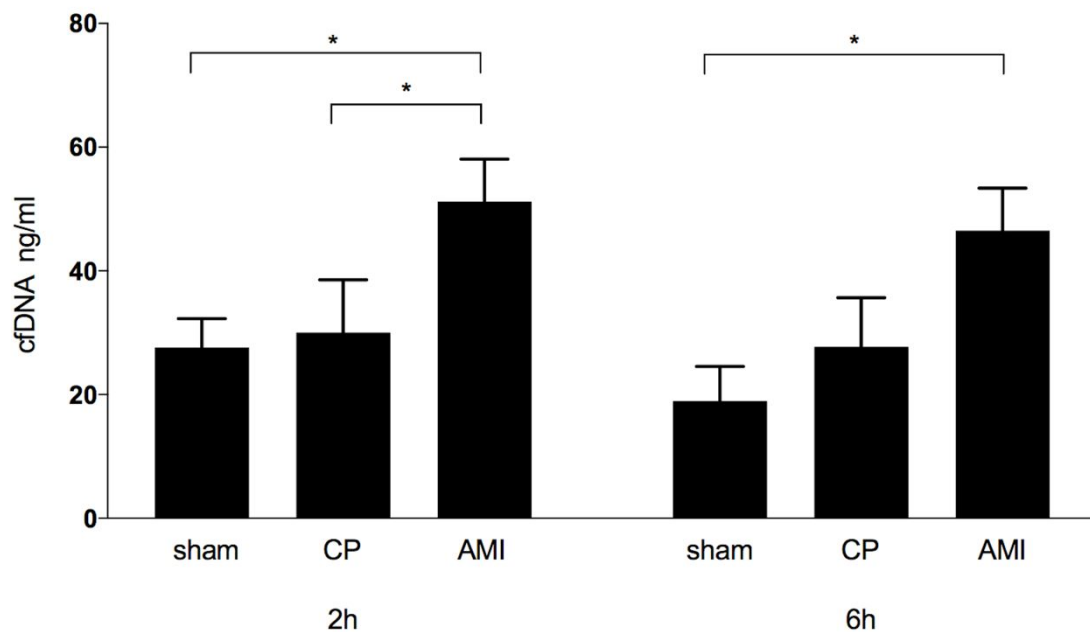


Figure1B

(3)急性腸間膜虚血モデルにおける Cell-free DNA は2時間時点で盲腸穿孔モデル Sham と比較して有意に上昇しており、これは他の biomarker には見られない特徴であった。本研究は、Cell-free DNA が急性腸間膜虚血における早期診断・かつ他の腹膜炎などの鑑別に有用な biomarker となり得る可能性を示唆している。临床上での有用性を確立するためさらなるヒト検体での検証を行っていく。

## 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〕  
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

研究協力者：柄澤 智史  
ローマ字氏名：( KARASAWA, satoshi )

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。