

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592121

研究課題名(和文) 新しい蘇生後脳症予後判定マーカーは善玉か悪玉か？

研究課題名(英文) Is a novel prognostic marker for post cardiac arrest brain injury beneficial or detrimental?

研究代表者

泉 友則 (IZUMI TOMONORI)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00261694

研究成果の概要(和文)：蘇生後脳症の新規予後判定マーカーについて、分子構造、分子機能、および細胞内の局在を解析した。生理的環境では細胞内の核・細胞質に局在したが、ストレス条件下では細胞外へ放出され、さらに新たな翻訳後修飾も付加された。また、本マーカーの安定発現細胞株が得られていないことから、蘇生後脳症における本新規マーカーの発現上昇と細胞外への放出が病態を悪化させる要因のひとつになり得ると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Molecular structures, functions, and cellular components of a novel prognostic marker for post cardiac arrest brain injury were investigated. The marker protein was expressed and localized in the cytoplasm and/or nucleus of cultured cells under the physiological conditions. In contrast, the marker protein was released into the extracellular space, and underwent a unique post-translational modification under the stress conditions. Because we were not able to establish a stable cell line expressing the marker protein constitutively, it might be possible that the increased expression of the marker protein followed by the release into the extracellular space could be detrimental to the clinical course of post-cardiac arrest brain injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生体物質化学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：蘇生後脳症、予後予測、バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

(1) 心肺停止にともなう蘇生後脳症の予後は悪い

心肺停止の病因は心原性の心停止が最も多く、それ以外にもくも膜下出血、窒息や溺水、外傷など、様々な原因により引き起こされる。迅速な心肺蘇生術により心拍の再開が得られる場合もあるが、全脳虚血に加え虚血再灌流に伴う二次的な脳障害が発生し、さら

に複雑な病態を形成する。心肺停止に伴う急性中枢神経障害の予後は“社会復帰率数%程度”と非常に悪く、病態解明と早期判定法・治療法の開発が急務である。これまでに報告されている脳障害マーカーは neuron specific enolase (NSE)、S100B、glial fibrillary acidic protein (GFAP) などの中枢神経特異的なタンパク質で (Lamers KJ, et al., Brain Res Bull, 2003)、主にニューロ

ンやグリア細胞の物理的な損傷の大きさを反映していると考えられる。

(2) 新しいタイプの早期予後判定マーカー

一方、申請者らは 2005 年より大規模疾患マーカー探索を開始し、蘇生後脳症患者脳脊髄液より新規の早期予後判定マーカー（新規マーカー）を同定した。新規マーカーは、近年、腫瘍細胞より見出されたタンパク質で、その分子機序は不明ではあるが TNF α による細胞死を抑制する生物活性が報告されている。全身の臓器にユビキタスに分布し、中枢神経組織での発現特異性は見られない。既知マーカー同様、細胞内に局在するタンパク質ではあるが、一般的なハウスキーピングタンパク質とは異なり、特定条件下での発現誘導が報告されている。すなわち、新規マーカーは、生体侵襲による発現誘導と組織損傷による細胞からの漏出の両者の程度を反映し、特に脳脊髄液中では中枢神経組織全体の機能障害（神経学的予後）と密接に相関する全く新しいタイプの病態マーカーと考えられた。

(3) 未解明の新規マーカータンパク質の構造と機能

mRNA の塩基配列から予想される新規マーカーは、分子量 10 kDa のタンパク質であるが、ゲル電気泳動では 20~30 kDa の分子量を示す。立体構造の相同性から、酵素機能やタンパク質結合作用が想定されるが、その活性中心のモチーフや結合ドメインは欠失している。遺伝子の配列比較に基づいた機能推定が行われている一方で、新規マーカーの末端アミノ酸配列や翻訳後修飾構造に関する実験的な解析は行われていない。依然として新規マーカーの構造と機能の全容は不明である。

2. 研究の目的

早期予後判定に有用な新規マーカータンパク質を病態機序と関連付けるためには「本来、どこで何をしているのか？蘇生後脳症の予後不良群ではなぜ脳脊髄液中へ放出されるのか？どのようにして 24 kDa のタンパク質に変わるのか？」という問題を解く必要がある。そこで

(1) 新規マーカータンパク質の発現と翻訳後修飾を含む分子構造

(2) タンパク質間相互作用にもとづく分子機能

(3) 新規マーカータンパク質の細胞内局在、

(4) 細胞内動態と侵襲応答における役割、

以上 4 点を明らかにし、蘇生後脳症における新規マーカータンパク質の機能的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヒト株化培養細胞でのタグ付き新規マーカータンパク質の発現

ヒト末梢血 RNA より逆転写-PCR 法にて増幅した新規マーカーコーディング領域 DNA 断片を哺乳類細胞タンパク質発現ベクター pCMV-Tag に組み込み、FLAG タグ付きタンパク質発現ベクターを作製した。リポフェクションにより 293 細胞へ導入し、40 時間後の細胞を回収、抗 FLAG 抗体、および抗新規マーカー抗体を使用したウエスタンブロッティングによりタグ付き組換えタンパク質のトランジェントな発現とその分子量を確認した。タグがタンパク質発現や翻訳後修飾に与える影響を考慮し、N 末端 FLAG タグ (Tag2) および C 末端 FLAG タグ (Tag4) の両方を用意した。

(2) タグ付き新規マーカータンパク質の翻訳後修飾解析

タグ付き SH3BGRL3 発現細胞の抽出液より、抗 FLAG 抗体固定化ビーズを利用してタグ付き新規マーカータンパク質を精製した。変性、還元アルキル化、トリプシン消化後、ナノフロー液体クロマトグラフィー・四重極飛行時間型質量分析装置により混合物中の各ペプチド断片の精密質量を測定した。新規マーカーのアミノ酸配列に基づく理論値と照合し、帰属されない分子内の領域を特定した。

(3) プルダウン法とナノフロー液体クロマトグラフィー・四重極飛行時間型質量分析装置による相互作用タンパク質解析

タグ付き新規マーカー発現細胞の抽出液より、抗 FLAG 抗体固定化ビーズを利用してマイルドな条件下でタグ付きタンパク質とそれに結合した相互作用タンパク質を精製した。ゲル電気泳動でのパターンをコントロール試料（空ベクター）と比較し、新規マーカー側に特異的なバンドを決定した。トリプシンによるゲル内消化試料からペプチドを抽出し、講座所有のナノフロー液体クロマトグラフィー・エレクトロスプレーイオン化四重極飛行時間型質量分析装置 nanoLC-Qtof MS にて MS/MS 分析、MASCOT ソフトウェアを利用した配列データベース検索によりタンパク質を同定した。

(4) 組換え新規マーカータンパク質の安定発現細胞株の樹立

リポフェクション法にて発現ベクターを培養細胞（ヒト腎臓系：293 細胞）に導入し、G418 でタグ付き新規マーカー発現細胞をセレクトした。得られた G418 耐性細胞株における発現量はウエスタンブロットにより解析した。

(5) 免疫沈降・ウエスタンブロットによる

タンパク質間相互作用の確認

質量分析にて同定された相互作用タンパク質の複合体形成を確認するために、細胞抽出液より各抗体にて免疫沈降し、試料中の新規マーカーをウエスタンブロットにより検出した。

(6) 新規マーカータンパク質の細胞内動態解析

タグ付き新規マーカータンパク質発現細胞に関して、抗 FLAG 抗体を使用した蛍光抗体染色により新規マーカータンパク質の細胞内局在を解析した。細胞死にともなう細胞外への新規マーカーの放出は経時的に培地を採取し、抗新規マーカー抗体を使用したウエスタンブロットにより解析した。

4. 研究成果

(1) ヒト株化培養細胞でのタグ付き新規マーカータンパク質の発現

新規マーカーをコードする cDNA をヒト白血球よりクローニングし、タグ付組み換えタンパク質として 293 細胞で一過性に発現させた。発現タンパク質の分子量は塩基配列から予想される約 15 kDa で、患者脳脊髄液より見出された 24 kDa とは異なっていた。両タンパク質の同一性は特異抗体によるウエスタンブロッティング解析と抗原ペプチドを利用した中和実験により確認した。これらの結果は、新規マーカーの翻訳後修飾が病態特異的である可能性を示唆している。

(2) 新規マーカータンパク質の細胞内局在

タグ付き新規マーカータンパク質を 293 細胞で一過性に発現させ、40 時間後の細胞を抗 FLAG 抗体、および Alexa 633 標識二次抗体により染色し、レーザー共焦点顕微鏡にて観察した。発現細胞の多くは、細胞全体に広がる蛍光像（細胞質・核局在）を、また、一部の細胞は、PI 染色とオーバーラップする蛍光像（核局在）を示した。

(3) 新規マーカータンパク質の翻訳後修飾

タグ付き新規マーカータンパク質は SDS-PAGE において還元剤耐性のダブレットを示すことから、ゲル内消化後のペプチドを LC/MS にて解析した。同定された 7 種類のペプチド配列中に、N 末端アセチル化を含む 3 箇所の翻訳後修飾部位を見出した。また、ゲル上の分子量と質量分析データから 71 番目のシステイン残基を含む領域に約 1 kDa の修飾が付加していることが想定された。

(4) 新規マーカーの結合タンパク質

新規マーカーの分子機能解析を目的として、相互作用タンパク質の一斉同定を試みた。新規マーカーのタグ付組み換えタンパク質

を大腸菌にて発現させ、Ni-NTA カラムにより精製した。コントロールビーズと比較して大腸菌組み換えタンパク質を固定化したアガロースビーズに特異的に結合した 293 細胞抽出タンパク質のうち、SDS-PAGE で強く染色された 16 組のゲルバンドについて、ゲル内トリブシン消化を行い、ナノフロー液体クロマトグラフィー・質量分析システムによりタンパク質同定を行った。同定された結合タンパク質には、いくつかの翻訳開始因子、RNA 結合タンパク質、シャペロン、DNA 結合タンパク質、キナーゼ・フォスファターゼなどの酵素類が含まれ、それらの局在情報は、蛍光抗体染色で確認した新規マーカーの核・細胞質局在とよく一致していた。

(5) 安定発現株の作製

マーカータンパク質をコードする cDNA を含むベクターを 293 細胞に導入し、G418 存在下でのクローニングと長期培養後に複数の G418 耐性クローンを得た。抗タグ抗体を利用したウエスタンブロット法では、いずれのクローンもマーカータンパク質陰性であり、定常的、あるいは高濃度のタンパク質発現が 293 細胞の増殖に対して抑制的に働くと考えられた。

(6) 侵襲条件下での動態解析

293 細胞で一過性に発現させたタグ付きタンパク質は無血清培養時、血清存在下と同等のタンパク質発現を示した。細胞抽出試料のウエスタンブロット解析において、細胞内の発現タンパク質の大部分は未修飾の分子量 (15 kDa) を示した。一方、発現タンパク質の培地中への放出は無血清培養時に顕著であり、そのほとんどは高分子量 (25 kDa) の修飾付加型分子として検出された。精製したタグ付きタンパク質を 293 細胞の培養系へ添加した場合、血清存在下、あるいは無血清培養時、いずれの条件下でも細胞抽出試料中に修飾付加型分子が検出された。しかしながら、修飾付加型分子の割合は、圧倒的に無血清培養時で高く、侵襲条件下の細胞では、生理的なレベルを大きく超える新規マーカータンパク質の放出と翻訳後修飾付加が起ると考えられた。このような侵襲応答性の修飾付加型分子を、敗血症患者血清において測定したところ、患者群の修飾タンパク質濃度はコントロール群と比較して有意に高く、また重症度と正の相関を示した。

(7) 成果のまとめ・位置づけ・展望

① 以上の結果から、蘇生後脳症患者より見出した新規マーカータンパク質は、様々な組織損傷において細胞から放出され、翻訳後修飾の付加を受けるとともに、細胞と相互作用することで病態の分子機序に直接関与する

可能性が示唆された。

② 本研究により、生理的な条件下での新規マーカーの分子機能として、「核-細胞質間をシャトルし、mRNAからタンパク質への翻訳過程に関与する役割」が示唆された。さらに、ストレス条件下では、「細胞外への放出と翻訳後修飾付加」という、全く新しい機能が明らかになった。新規マーカーの分子機能に関する国内外のグループからの新しい報告はなく、本研究成果は、ユニーク、かつ重要な知見と言える。

③ これまでのデータに基づき、蘇生後脳症における新規マーカーの役割を「悪玉」として想定している。同様なタンパク質の例として、HMGB-1が挙げられる。敗血症状態などの生体侵襲に応答し、細胞（特に核）より放出される。細胞外で炎症反応を増強する機能を有することから、現在では、メディエーターとして認知され、治療ターゲットとしての利用も進められている。新規マーカーについて、生体侵襲時の機能解析をさらに進めることで、蘇生後脳症の新たな治療法の開発も期待できる。

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0件)

[学会発表] (計7件)

① 秋吉祐樹, 泉友則, 宮内崇, 前川剛志: 敗血症患者血清中のTNF α 誘導性タンパク質の動態解析. 第82回日本生化学会総会, 神戸, 2009年10月23日.

② 泉友則, 小田泰崇, 荒木由佳, 大村真裕子, 秋吉祐樹, 鶴田良介, 笠岡俊志, 前川剛志: 心肺停止蘇生後脳症患者脳脊髄液のショットガンプロテオーム解析. 第4回医学系研究科ライフサイエンスセミナー「ゲノムからプロテオームへ、そして」, 日本ヒトプロテオーム機構 (JHUP0) 第7回サテライトシンポジウム合同会議, 宇部, 2009年7月29日.

③ 泉友則, 小田泰崇, 荒木由佳, 大村真裕子, 秋吉祐樹, 鶴田良介, 笠岡俊志, 前川剛志: 急性脳障害患者脳脊髄液のショットガンプロテオーム解析. 日本ヒトプロテオーム機構 (JHUP0) 第7回大会, 東京, 2009年7月28日.

④ 秋吉祐樹, 泉友則, 大村真裕子, 荒木由佳, 前川剛志: SH3結合ドメインを欠くSH3BGR familyタンパク質SH3BGR13のタンパク質間相互作用. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2008年12月13日.

⑤ 荒木由佳, 山下哲平, 市原清志, 泉友

則, 前川剛志: 重症頭部外傷における脳脊髄液タンパク質の大規模定量解析. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2008年12月12日.

⑥ 泉友則, 前川剛志: ショットガン法を利用した臨床検体からの大規模タンパク質同定と病態解析への応用. The 7th Cell Biology Summer Meeting, 鴨川, 2008年7月5日.

⑦ 荒木由佳, 大村真裕子, 山下哲平, 秋吉祐樹, 市原清志, 泉友則, 前川剛志: 重症頭部外傷患者脳脊髄液の大規模タンパク質解析. 第49回日本生化学会中国・四国支部例会, 高松, 2008年5月17日.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

泉友則 (IZUMI TOMONORI)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 00261694

(2) 研究分担者

笠岡俊志 (KASAOKA SHUNJI)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 90243667

前川剛志 (MAEKAWA TSUYOSHI)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 60034972

(H20~H21)

(3) 連携研究者

なし