

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09011

研究課題名（和文）急性腸間膜虚血における新規biomarkerの開発・検証

研究課題名（英文）Validation of apolipoproteinB-100,serum paraoxonase-1,cell-free DNA as a biomarker for mesenteric ischemia

研究代表者

柄澤 智史（Karasawa, Satoshi）

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20646393

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：投稿中であったcell-free DNAの腸管虚血動物モデルにおける論文が受理された（J Surg Res. 2022 Jan;269:28-35.）。本研究の主題である2種の蛋白質（ApolipoproteinB-100/Serum paraoxonase-1）の体内動態/経時的变化を動物モデルにおける定量検査においてはまだ十分な実験数が行えておらず、今後遂行予定である。ヒト臨床検体におけるApolipoproteinB-100/Serum paraoxonase-1(PON-1)/Cell-free DNAの3つのbiomarkerの検証は、検体集中であり、順調に進んでいる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸間膜虚血は早期診断が困難かつ致死的な疾患であり、早期診断方法、biomarkerの開発は同疾患の救命率向上に貢献する。Proteomicsを用いて導出した新規biomarkerの探索は、他の疾患にも応用できる可能性があり、発展性がある。

研究成果の概要（英文）：A paper on an animal model of intestinal ischaemia with cell-free DNA, which was in the process of submission, has been accepted (J Surg Res. 2022 Jan;269:28-35.). The quantitative testing of the two proteins (ApolipoproteinB-100/Serum paraoxonase-1) in animal models has not yet been performed in sufficient number of experiments and will be carried out in the future. The validation of the three biomarkers ApolipoproteinB-100/Serum paraoxonase-1 (PON-1)/Cell-free DNA in human clinical specimens is specimen-intensive and progressing well.

研究分野：救急集中治療医学

キーワード：Cell-free DNA Proteomics ApolipoproteinB-100 Serum paraoxonase-1

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

急性腸間膜虚血(acute mesenteric ischemia)は進行すると腸管壊死に至り、その死亡率は高い。救命のために早期診断の重要性が認識されている一方で、早期診断につながる有用な画像検査法や biomarker は見つかっていない。研究代表者/研究分担者は既にラットの急性腸間膜虚血モデルを用いた蛋白質網羅的解析を含めた測定結果から、2種の蛋白質(ApolipoproteinB-100/paraoxonase-1)と cell-free DNA が有用な新規 biomarker 候補となりえることを見出した。(J Surg Res. 2022 Jan;269:28-35.)

#### (1) ApolipoproteinB-100/Serum paraoxonase-1(PON-1)

本研究者はラットの急性腸間膜虚血モデル/腹膜炎モデルを作成し、作成後2時間の血液検体を用いて蛋白質の網羅的解析を行い、早期診断/鑑別いずれにも優れた新規 biomarker 候補を探索した。急性腸間膜虚血モデルでは46種類の蛋白質、腹膜炎モデルでは44種類の蛋白質が同定され、急性腸間膜虚血のみで検出された蛋白質は ApolipoproteinB-100/Serum paraoxonase-1(PON-1)の2種類であった。ApolipoproteinB-100は炎症性サイトカインの刺激により肝臓から過剰に分泌されるとされる蛋白であり、PON-1は抗酸化・抗炎症作用を持ち酸化ストレスに対して保護的に働く酵素である。その産生機序から双方ともに急性腸間膜虚血の病態に大きく関わると考えられる。実際に動物モデルの血液検体を用いた Western blot 法で腹膜炎モデルに比べて急性腸間膜虚血モデルで PON-1 発現が有意に上昇していた(図1)。以上のことから、これらの蛋白質が有用な急性腸間膜虚血の biomarker となりえることが示唆された。

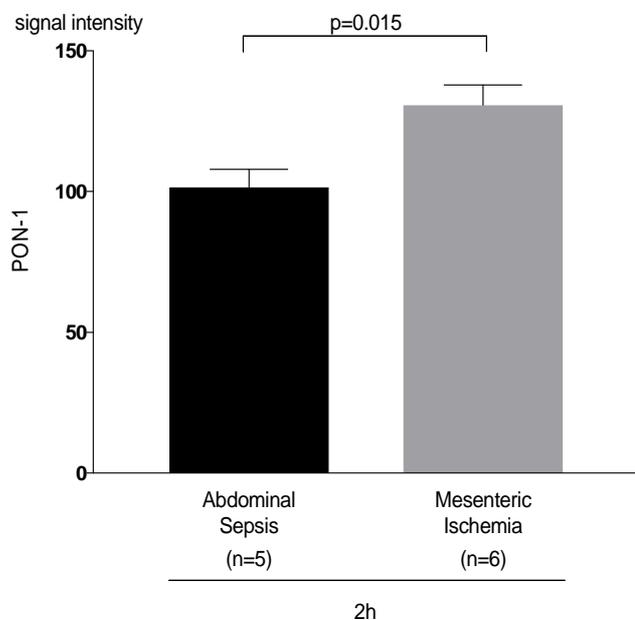


図1(左): ラット腹膜炎モデル (Abdominal sepsis, n=5) と急性腸間膜虚血モデル (Mesenteric ischemia, n=6) の Paraoxonase-1 (PON-1) 発現の比較

#### (2) Cell-free DNA

Cell-free DNAは細胞が壊死/崩壊した際に放出される。近年、各種疾患で cell-free DNA/RNA が網羅的に解析され有用な診断指標となることが発見され注目を集めているが (Sci Transl Med 2014)、本疾患を対象とした研究成果は未だなかった。

本研究代表者/研究分担者は、動物実験モデルで cell-free DNA が急性腸間膜虚血において早期に上昇することを確認した(図2)。この結果から、Cell-free DNA が本疾患の有用な biomarker となる可能性が示された。

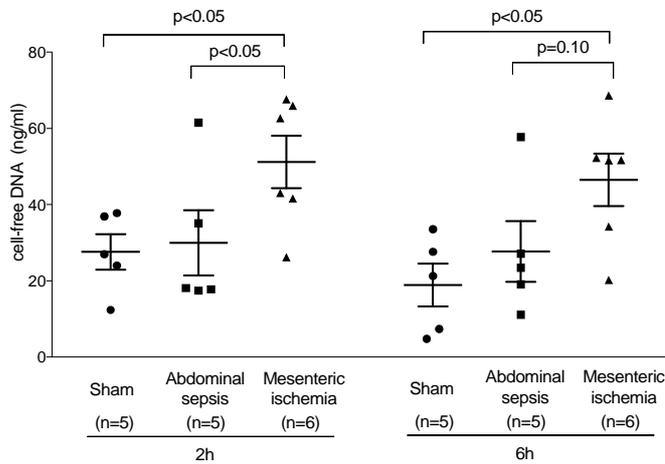


図2：ラットモデルにおける Cell-free DNA 値の比較（モデル作成後2時間，6時間値で比較）

以上の先行研究から3つの有力な新規 biomarker 候補を同定した。「ApolipoproteinB-100・Serum paraoxonase-1(PON-1)・Cell-free DNA が急性腸間膜虚血の早期診断に有用な biomarker になるか」という学術的「問い」に対して、動物実験モデルを用いた蛋白動態解析とヒト臨床検体を用いた biomarker の診断能を検証する本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

急性腸間膜虚血の病態での振る舞いが明らかでない2種の蛋白質(ApolipoproteinB-100/Serum paraoxonase-1)の体内動態/経時的变化を動物モデルで確認し、急性腸間膜虚血の早期診断の biomarker となりえるかを検証することと、それに加え、cell-free DNA のヒト臨床検体における有用性を検証することが目的である。

## 3. 研究の方法

(1)「急性腸間膜虚血モデルを用いた ApolipoproteinB-100/Serum paraoxonase-1(PON-1)の動態解析」

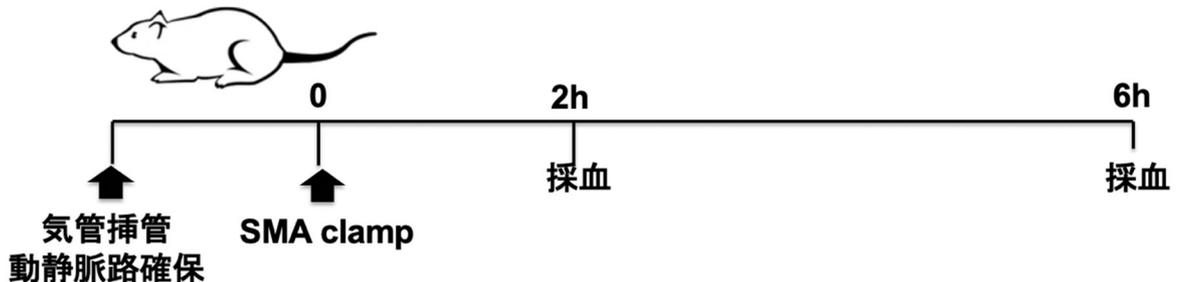
【概要】網羅的解析のみでは biomarker の経時的变化を捉えるのは困難である。本実験では二つの蛋白質の測定手法の妥当性を確認し、急性腸間膜虚血の病態における動態を経時的に解析し、biomarker としての能力を評価するため動物モデルを用いた実験を行う。

### 【研究方法】

Sprague-Dawley(SD)rat を用いる。イソフルレンを用いて全身麻酔し、開腹後上腸間膜動脈をブルドック鉗子で clamp する。clamp 後2時間，6時間で血液検体を採取する。

採取した検体で ApolipoproteinB-100(ELISA)/Serum paraoxonase-1(PON-1)(WB 法)を定量する。またこの二つの biomarker に関わると思われる酸化ストレスマーカーや炎症性サイトカインも同時に測定し、その特徴・動態を明らかにする。

腹膜炎モデルのラットも作成し、この二つの biomarker が腹膜炎との鑑別に有用かを検証する。



(2)「急性腸間膜虚血患者における ApolipoproteinB-100/Serum paraoxonase-1(PON-1)/Cell-free DNA の診断能の検証」(2022-3年度)

【概要】ApolipoproteinB-100/Serum paraoxonase-1(PON-1)/Cell-free DNA の3つの biomarker 候補の有用性をヒト臨床検体で検証する。

【研究方法】急性腸間膜虚血と診断された患者群(n=40)とコントロール群(健常者コントロール群 [n=20], ICU 入室患者コントロール群[n=40])の血漿を用いて 3 つの biomarker を測定し, receiver operating characteristic (ROC) curve analysis で area under the curve (AUC) を算出し, 診断 biomarker としての有用性を評価する .

#### 4 . 研究成果

投稿中であった cell-free DNA の腸管虚血動物モデルにおける論文が受理された ( J Surg Res. 2022 Jan;269:28-35. ). 本研究の主題である 2 種の蛋白質 ( ApolipoproteinB-100/Serum paraoxonase-1 ) の体内動態/経時的変化を動物モデルにおける定量検査においてはまだ十分な実験数が行えておらず、今後遂行予定である .

ヒト臨床検体については順調に収集が進んでいるが、急性腸間膜虚血患者の収集はまだ 20 例弱と十分ではなく、今後も収集を進める .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Karasawa Satoshi, Nakada Taka-aki, Sato Mamoru, Miyasho Taku, Shimada Tadanaga, Oshima Taku, Suda Koichi, Shinozaki Koichiro, Oda Shigeto	4. 巻 269
2. 論文標題 Early Elevation of Cell-Free DNA After Acute Mesenteric Ischemia in Rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Surgical Research	6. 最初と最後の頁 28 ~ 35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jss.2021.07.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	中田 孝明  (Nakada Takaaki)  (20375794)	千葉大学・大学院医学研究院・教授    (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関