

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2014

課題番号：23659748

研究課題名(和文)急性肺損傷における肺上皮被覆液プロテオームの解析

研究課題名(英文)Proteomic analysis of lung epithelial lining fluids collected from the patients suffering from acute lung injury.

研究代表者

佐和 貞治(Sawa, Teiji)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10206013

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):ヒトの肺上皮を覆う上皮被覆液(ELF)を対象に、液体クロマトグラフィー-マスマスプロトメトリー(LC-MS)を用いた網羅的かつ定量的なプロテオーム解析を確立した。急性肺傷害の病的状態におけるELFプロテオームを網羅的に捉え、疾患ベースでの病態把握・予後改善に関わるバイオマーカー探索や治療の効果判定に応用できるように解析可能な技術を開発した。我々が開発したウェブブラウザで作動するプロテオーム分析Elficatは、多くの患者を含む急性肺傷害のプロテオームの群間比較分析を行う上で有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文):We established the new method for the proteomic analysis of the lung epithelial lining fluids. In this study, we harvested the lung epithelial lining fluids by using bronchoscopic micro sampling (BMS), and analyzed them by LC/MS/MS. This method enabled us to efficiently and effectively analyze the micro volume samples, in comparison with classic methods such as bronchoalveolar lavage (BAL). To analyze the proteomic data by web-browser based computer technology, we developed a new analysis software named "Elficat". Elficat uses various software technologies such as XML-database, and sever-side XSLT and SVG. By using the Elficat, we can visualize the data from multiple groups that contain the data from a set of patients. We can apply this method to the proteomic analysis for acute lung injury such as acute respiratory distress syndrome.

研究分野：集中治療医学

キーワード：急性肺傷害 気管支鏡下マイクロサンプリング法 プロテオーム 肺上皮被覆液 LCMSMS ELFICAT

1. 研究開始当初の背景

急性肺障害 (acute lung injury, ALI) は、敗血症、肺炎、外傷、誤嚥などによって引き起こされる集中治療の対象となる肺の急性炎症性疾患である。集中治療での治療法に関しては、人工呼吸法の発達や体外循環式の人工肺の導入などにより、延命につながる医療技術の進歩は認められてきた反面、依然、決定的な治療法は無く高い死亡率を示す。急性肺損傷の発生率や転帰については、Gordon らの米国での調査報告によると、発生率は 10 万人/年当り 86.2 例、院内死亡率は 38.5% であり、急性肺損傷が公衆衛生に大きな影響を与えているとされる。

急性肺障害につながる外的な誘発因子と、それ起因に発生する複雑な生体反応を理解し、死亡率改善につながる予防・治療法を見つけるためには、より詳細な病態形成に至る生体分子の動態の把握が必要である。そのような観点において、急性肺障害患者において、より非侵襲的に臨床検体試料を採取でき、経時的で詳細な生体分子の分析ができることが特に重要である。上皮被覆液 (epithelial lining fluid, ELF) は、呼吸上皮を覆う水、電解質、生体分子で構成され、その液中に含まれるタンパク質の分析は、病態の把握、治療の効果などの評価に重要であると考えられる。

2. 研究の目的

ヒトの肺上皮を覆う上皮被覆液 (epithelial lining fluid, ELF) を対象に、LC-MS を用いた網羅的かつ定量的なプロテオーム解析を確立することを目的とした。ELF の採取方法は、従来の一般的な採取方法である気管支洗浄法 (Bronchoalveolar lavage, BAL) との比較において、より非侵襲的で経時的な採取が可能な気管支鏡下マイクロサンプリング法 (Bronchoscopic microsampling, BMS) が可能となる。生理的な状態や、急性肺障害 (成人呼吸緊迫症候群[ARDS]、肺炎など) などの病的状態における ELF プロテオーム・プロフィールを網羅的に捉え、疾患ベースでの診断学や病態把握・予後改善に関わるバイオマーカー探索や治療の効果判定に応用できるように探求した。

3. 方法

BMS 法にて ELF を採取し、一次元電気泳動、それに続く MS ショットガン法、つまりタンパク質のゲル内トリプシン消化、LC-MS/MS 法によるペプチド・マス・フィンガープリンティング (PMF) 法、タンパク質データベースより MS/MS イオンサーチ法に

よるタンパクの同定を行う。それらのデータを元に健常成人における ELF 液プロテオームデータベースを作成する。第二に、急性肺障害に関わる病態の解明のため、さらに解析を進展させ、Isotope-coded affinity tags (ICAT) 法を用いた定量的な ELF 病態プロテオーム解析を行った。

4. 研究成果

生理的な状態や、急性肺障害 (成人呼吸緊迫症候群[ARDS]、肺炎など) などの病的状態における ELF プロテオーム・プロフィールを網羅的に捉え、疾患ベースでの診断学や病態把握・予後改善に関わるバイオマーカー探索や治療の効果判定に応用できるように分析結果について解析可能な技術を開発した。今後、さらに確立した方法について病態モデルに適用して、病態特有のプロファイリング解析に繋げていく基礎技術が確立された。特に今回、ウェブブラウザベースの解析ソフトウェア Elficat を開発した。Elficat はプロテオーム由来の多量のタンパク情報を視覚化して、グループごとに統計解析を加えて、また既存のタンパクデータベースに自動リンクできる (図 1)。特にサーバーサイド SXML 技術を XML データベースと連動させて、情報をプロテオーム由来のタンパクプロファイリング情報を SVG 画像化することで、Elficat を用いた解析により今後、急性肺障害に関わる疾患プロテオーム解析が簡便にできるようになった (図 2)。

図 1. Elficat によるプロテオーム解析.

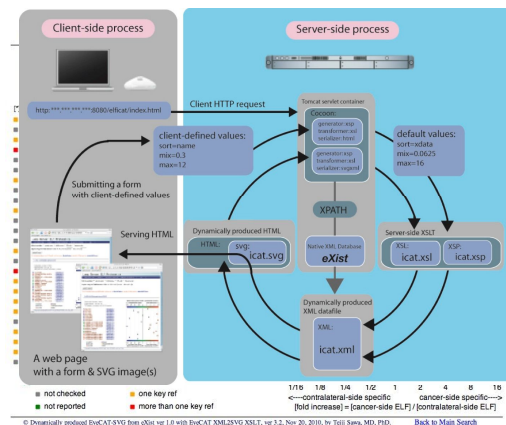


図 2. Elficat 動作の仕組み

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 9 件)

- 1) Shibasaki M, Nakajima Y, Shime N, Sawa T, Sessler DI. Prediction of optimal endotracheal tube cuff volume from tracheal diameter and

from patient height and age: a prospective cohort trial. *J Anesth* 査読有, 2012, 26:536-40, doi: 10.1007/s00540-012-1371-0.

2) Satake S, Hirai H, Yahashi Y, Shime N, Tamura A, Yao H, Yoshioka S, Miura Y, Inaba T, FUjita N, Ashihara E, Imanishi J, Sawa T, Maekawa T. C/EBP β is involved in the amplification of early granulocyte precursors during candidemia-induced "emergency" granulopoiesis. *J Immunol* 査読有 189, 2012, 4546-3455. doi: 10.4049/jimmunol.1103007.

3. Fujikawa M, Ibuki T, Matsumura K, Sawa T. Inflammatory hyperalgesia: the role of the prostaglandin system in the spinal cord. *Advances in neuroimmune biology* 査読有 3, 2012, 197-207.

4, Ishii S, Shime N, Shibasaki M, Sawa T. Ultrasound-guided radial artery catheterization in infants and small children. *Pediatr Crit Care Med* 査読有 14, 2013, 471-3, doi: 10.1097/PCC.0b013e31828a8657.

5. Nakayama Y, Shibasaki M, Shime N, Nakajima Y, Mizobe T, Sawa T. The RACHS-1 risk category can be a predictor of perioperative recovery in Asian pediatric cardiac surgery patients. *J Anesth* 査読有, 27, 2013, 850-854. doi: 10.1007/s00540-013-1645-1.

6. Sawa T, Shimizu M, Moriyama K, Wiener-Kronish JP. Association between *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: a review. *Crit Care* 査読有, 18, 2014, 668. doi: 10.1186/s13054-014-0668-9

7. Sawa T, Ito E, Nguyen VH, Haight M. Anti-PcrV antibody strategies against virulent

Pseudomonas aeruginosa. *Hum Vaccin Immunother* 査読有 10, 2014, 2843-52. Doi:10.4161/21645515.2014.971641.

8. Sawa T, Katoh H, Yasumoto H. V-antigen homologs in pathogenic gram-negative bacteria. *Microbiology and Immunology* 査読有 58, 2014, 267-85, 2014 doi: 10.1111/1348-0421.12147.

9. Sawa T. The molecular mechanism of acute lung injury caused by *Pseudomonas aeruginosa*: from bacterial pathogenesis to host response. *J Intensive Care* 査読有 18, 2014, 2:10. doi:10.1186/2052-0492-2-10.

〔学会発表〕(計5件)

1. 佐和貞治. 緑膿菌性急性肺傷害とその分子機構. Shiga Sepsis Forum. 2014年2月20日, 大津.

2. 佐和貞治. 急性肺傷害のトランスレーショナルリサーチ. 福井県麻酔科講演会. 2014年3月14日福井.

3. 佐和貞治. 細菌感染と急性肺傷害. ARDS 最新治療戦略のためのトランスレーショナルリサーチ. 第89回日本薬理学会. 2014年3月19日. 仙台.

4. Sawa T. The molecular pathogenesis of acute lung injury induced by *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. 2014 Annual Meeting of Chinese Association of Anesthesiologists. Shanghai, China, 2014.4.19.

5. 佐和貞治. 細菌感染とガンマグロブリン療法. 敗血症 Forum2014. 2015年2月7日. 年東京

〔図書〕(計3件)

1. 佐和貞治, 橋本悟, 松山広樹, 安本寛章, 加藤秀哉. XML データベース eXist と Cocoon 2 による Server-Side XSLT を用いた Elficat データ解析 - 肺上皮被覆液

- (ELF) プロテオーム解析への応用- 麻酔・集中治療とテクノロジー-2012, 2013.
2. 佐和貞治. TEXT 麻酔・蘇生学 第6章外科的侵襲に対する生体反応. 改訂4版 土肥修司, 澄川耕二編 p.149-153 南山堂, 東京. 2014 ISBN978-4-525-30844-5
 3. 佐和貞治. 感染症. よくある術前合併症. 研修ノートシリーズ 麻酔科研修ノート 改訂第2版. 総監修永井良三、責任編集者稲田栄一、編集 上村裕一、土田英昭、村川雅洋. 診断と治療社. 2014. 東京 ISBN978-4-7878-2046-4

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐和 貞治 (SAWA, Teiji)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号: 10206013

(2) 研究分担者

池川雅哉 (IKEGAWA, Masaya)

同志社大学・生命科学・教授

研究者番号: 60381943

橋本悟 (Hashimoto, Satoru)

京都府立医科大学・医学研究科・病院教授

研究者番号: 90167578

松山広樹 (MATSUYAMA, Hiroki)

京都府立医科大学・医学研究科・客員講師

研究者番号: 80515289