

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：15201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659845

研究課題名(和文)全血液成分を対象とするプロテオミクスによる脳低体温療法に関する網羅的研究

研究課題名(英文)Proteomic analysis of the changes in blood induced by therapeutic hypothermia

研究代表者

織田 禎二(Oda, Teiji)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：50448198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：蘇生後脳症に対する脳低体温療法を実施した9症例の低体温導入直前、導入24時間経過後、復温終了の3時点で採血した。血漿サンプルのプロテオミクス解析にて、188個の蛋白質を同定し、低体温導入と復温による蛋白質発現変化をバイオインフォマティクスにて解析した。低体温導入により、セリンプロテアーゼインヒビター、免疫関連蛋白質が有意に増加し、復温によりこれらのタンパクの他に、アポリポプロテイン、補体成分の有意な増加を認めた。全9症例のうち、3症例は全く後遺症なく退院したが、6症例は死亡1例を含め高度脳障害を認めた。蛋白質発現変化と予後との関連を検討すると、複数のタンパクで予後との関連が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Therapeutic hypothermia after cardiac arrest is increasingly utilized, but its pleiotropic effects are as yet incompletely elucidated. In order to analyze these mechanisms, we comparatively investigated plasma proteomic changes induced by both induction of hypothermia and rewarming in nine patients undergoing therapeutic hypothermia. We utilized iTRAQ labeling tandem mass spectrometry to assess quantitative protein changes. In total, the analysis identified 188 proteins. Bioinformatic analyses showed significant up-regulation of serine protease inhibitor and defense/immunity protein at hypothermia. After rewarming, both apolipoprotein and complement component proteins were also significantly up-regulated. Out of nine patients, three patients have recovered without any neurological complications, but the other six patients have had serious neurological defects. These outcomes were associated with the levels of several proteins belonging to oxidative stress and innate immunity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：プロテオミクス 低体温

1. 研究開始当初の背景

心停止後蘇生後脳症に対する軽度低体温療法は急速に臨床現場に普及しつつあるが、低体温が生体に与える影響やその臓器保護メカニズムについては限定的な理解しか得られていない。低体温療法の生体に及ぼす影響は多面的であるため(pleiotropic effect)、研究手法は体系的・網羅的でなければならず、また厳しい患者の臨床背景よりサンプル採取はより低侵襲でなければならない。蛋白質発現レベルでの網羅的解析(プロテオミクス解析)により、血液中の諸成分(血清のみでなく、赤血球、血小板、好中球、リンパ球、単球)のプロテオミクス解析が可能となれば、脳低体温療法が生体に与える影響をより低侵襲かつ強力に探索することが可能となる。

2. 研究の目的

心停止蘇生後脳症に対して脳低体温療法を実施する症例より少量の血液サンプルを採取して血液全成分に対するプロテオミクス解析に挑戦し、血清・血小板・好中球・リンパ球・単球中の蛋白質発現変化の網羅的解析により低体温が生体に与える諸変化のバイオインフォマティクス解析に挑戦する。

3. 研究の方法

心停止後蘇生後脳症に対する脳低体温療法の適応があり、実施予定の症例に対して、倫理委員会で承認されたプロトコールに基づいて、まずご家族の承諾を頂いた症例において低体温導入前、導入後 24 時間経過時点、復温終了後の 3 回血液サンプルを採取する。この血液サンプルを血漿成分と細胞成分に分け、細胞成分は密度勾配遠心分離法によりリンパ球、好中球を分離し、単球は magnetic cell separation 法にて分離する。各成分のプロテオミクス解析は蛋白処理後に、それぞれ別々の iTRAQ 試薬(iTRAQ=isobaric Tags for Relative and Absolute Quantiation)でラベルした 3 サンプル(低体温前、低体温導入後、復温後)を混合し、強陽イオン交換カラムで 6 分画に分離し、各分画を NanoLC クロマトグラフィーによりフラクショネーション後 MALDI-TOF/TOF MS/MS (マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計)法により測定する。その後 PANTHER software などを用いてバイオインフォマティクス解析を行う。

4. 研究成果

研究期間中、9 症例の血液サンプルを採取して解析を行った。その症例の内訳を表 1 に

示す。

表 1. 心停止蘇生後脳症に対する脳低体温療法例の内訳

	Age/sex	原因	転帰
#1	78/F	窒息	JCS* 300
#2	78/F	縊頸	Dead
#3	91/M	窒息	JCS* 200
#4	46/F	代謝性 acidosis	独歩退院
#5	65/F	縊頸	JCS* 300
#6	62/M	AnS#	独歩退院
#7	86/M	窒息	独歩退院
#8	75/M	窒息	JCS* 200
#9	76/F	窒息	JCS* 200

* : Japan Coma Scale; #: アナフィラキシーショック

血漿タンパク質のプロテオミクス解析により 188 個の蛋白質を同定した。このうち、9 症例中 5 症例以上で同定できた蛋白質でかつ低体温導入前と比較して 1.2 倍以上増加した蛋白群について、PANTHER software を用いて解析した(低体温導入後サンプル: 29 蛋白質、復温終了後: 32 蛋白質)。なお、0.83 倍以下に減少した蛋白は少数のため解析を施行できなかった。各蛋白質を Gene Ontology に基づいて、biological process で分類した(低体温 24 時間経過後: 図 1、復温終了時: 図 2)。

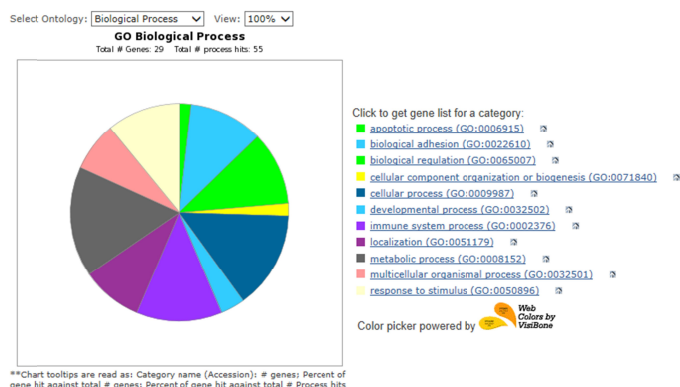


図 1. 低体温導入 24 時間経過時増加血漿タンパク質解析

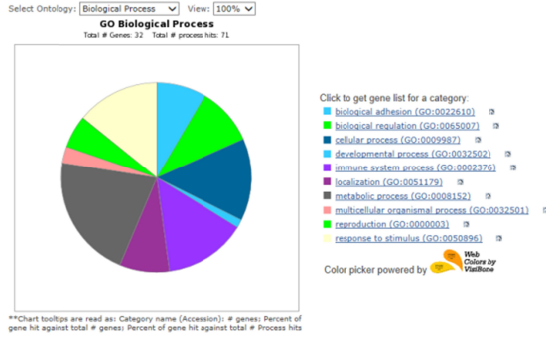


図 2 . 復温終了時増加蛋白質解析

PANTHER protein class で分類して statistical overrepresentation test を実施したところ、低体温 24 時間経過時では、serine protease inhibitor、defense/immunity protein などが統計学に有意に up-regulation していた (表 2)。一方、復温終了時ではさらに apolipoprotein, complement component 蛋白が統計学的に有意に up-regulation していた (表 3)。

表 2 . 低体温導入 24 時間経過時増加血漿タンパク質の解析 (PANTHER protein class の statistical over representation test)

	Homo sapiens (RF)	Plasma sample		
	No of genes	No of observed genes	No of expected genes	p value
Serine protease inhibitor	119	6	0.13	4.43E-07
Protease inhibitor	193	6	0.20	7.68E-06
Defense/immunity protein	572	6	0.60	4.03E-03
Signaling molecule	1048	7	1.11	1.32E-02
Transfer/carrier protein	439	5	0.46	1.48E-02
Antibacterial response protein	118	3	0.12	4.66E-02

表 3 . 復温終了時増加血漿タンパク質の解析 (PANTHER protein class の statistical over representation test)

	Homo sapiens (RF)	Plasma sample		
	No of genes	No of observed genes	No of expected genes	p value
Serine protease inhibitor	119	6	0.13	5.88E-07
Apolipoprotein	91	5	0.10	9.07E-06
Protease inhibitor	193	6	0.21	1.02E-05
Defense/immunity protein	572	8	0.63	2.04E-05
Complement component	81	4	0.09	3.43E-04
Transfer/carrier protein	439	6	0.48	1.18E-03
Antibacterial response protein	118	3	0.13	5.30E-02

さらに各蛋白質の発現変化と予後の関係を調べると、酸化ストレスに関連する蛋白、アポリポタンパク、補体などの関連が推定された。Genesis software を用いた functional clustering の結果を図 3 に示す。

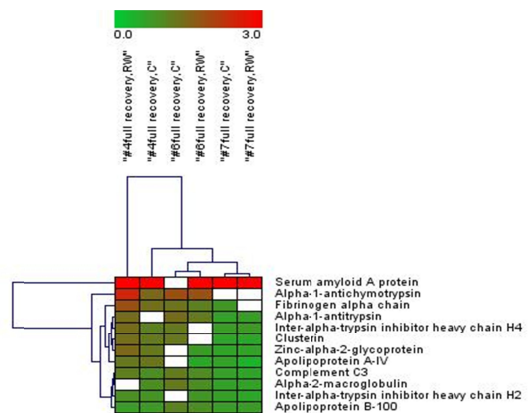


図 3 . 予後良好例において有意な変化を認め

た蛋白質の functional clustering

血球成分の分離精度について、分離法を各種工夫してフローサイトメトリー法でその分離純度を検討したが、研究期間中に基準となる95%以上の純度を安定的に達成することはできなかった（好中球では純度79%~97%）。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

Ken-ichi Matsumoto, Tomoko Maniwa, Tetsuya Tanaka, Kazumi Satoh, Hideki Okunishi, Teiji Oda, Proteomic analysis of calcified abdominal and thoracic aortic aneurysms, Int J Mol Med, 査読あり、30, 417-429, 2012
DOI: 10.3892/ijmm.2012.985

Teiji Oda, Kouji Shimizu, Akane Yamaguchi, Kazumi Satoh, ken-ichi Matsumoto, Hypothermia produces rat liver proteomic changes as in hibernating mammals but decreases endoplasmic reticulum chaperones, Cryobiology, 査読あり、65, 104-112, 2012
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.05.004>

Ken-ichi Matsumoto, Kazumi Satoh, Tomoko Maniwa, Asuka Araki, Riruke Maruyama, Teiji Oda, Noticeable decreased expression of tenascin-X in calcific aortic valves, Connective Tissue Research, 査読あり、53, 460-468, 2012
DOI: 10.3109/03008207.2012.702818

Kazumi Satoh, Tomoko Maniwa, Teiji Oda, Ken-ichi Matsumoto, Proteomic profiling for the identification of serum diagnostic biomarkers for abdominal and thoracic aortic aneurysms, Proteome Science, 査読あり、11, 27, 2013
<http://www.proteomesci.com/content/11/1/27>

Ken-ichi Matsumoto, Kazumi Satoh, Tomoko Maniwa, Tetsuya Tanaka, Hideki Okunishi, Teiji Oda, Proteomic comparison between abdominal and thoracic aortic aneurysms, Int J Mol Med, 査読あり、33, 1035-1047, 2014
DOI: 10.3892/ijmm.2014.1627

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.shimane-u.ac.jp/medicine/outline/2ge.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

織田 禎二 (ODA, Teiji)
島根大学・医学部・教授
研究者番号：50448198

(2) 研究分担者

松本 健一 (MATSUMOTO, Ken-ichi)
島根大学・総合科学研究支援センター・教授
研究者番号：30202328

清水 弘治 (SHIMIZU, Kouji)
島根大学・医学部・助教
研究者番号：70548578

(3) 研究連携者

三原 亨 (MIHARA, Toru)
島根大学・医学部・助教
研究者番号：30437537