

Proteome analysis of hemofilter adsorbates to identify novel substances of sepsis: a pilot study

*1千葉大学大学院医学研究院救急集中治療医学

*2千葉大学医学部附属病院マススペクトロメトリー検査診断学

橋田 知明*1, 中田 孝明*1, 佐藤 守*2, 富田 啓介*1, 川口 留以*1,
野村 文夫*2, 織田 成人*1

*Tomoaki HASHIDA, Taka-aki NAKADA, Mamoru SATOH, Keisuke TOMITA,
Rui KAWAGUCHI, Fumio NOMURA, Shigeto ODA*



1. はじめに

敗血症の病態にはサイトカインなどのmediatorsが重要な役割を果たしており, mediators吸着能を有する膜素材を用いた血液浄化法が, その臨床効果を期待され施行されている¹⁾。しかし, これまで報告されている研究の多くは血液浄化膜前後のmediatorの血中濃度差を測定し吸着を間接的に示唆するにとどまり, 膜へ吸着した物質の詳細な解析には至っていない。そこで血液浄化膜への吸着の実態究明と, 敗血症に関連した新規の物質を同定するために, プロテオミクス的手法を用いて網羅的解析を行う本研究を計画した。

2. 方法

通常診療として, 血液浄化法を行った施行済みの血液浄化膜を使用し, 吸着した物質の溶出分離を行った。血液浄化法はpolymethyl methacrylate膜hemofilterを用いたcontinuous hemodiafiltration (PMMA-CHDF) を選択した。次に溶出した物質をsodium dodecyl sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) により分離した。そのゲルをCBB染色で可視化した後, 切り出しを行い, trypsinを用いてゲル内消化を行った。そのサンプルを用いてliquid

本受賞レポートの対象論文はJ Artif Organ誌に掲載されています。Hashida T, Nakada T, Satoh M, et al. J Artif Organs 20: 132-37, 2017

■ 著者連絡先

千葉大学大学院医学研究院救急集中治療医学
(〒260-8677 千葉県千葉市中央区玄鼻1-8-1)
E-mail. gblpgt1003@yahoo.co.jp

chromatography mass spectrometry (高速液体クロマトグラフ質量分析) を行い, 得られた質量分析結果を解析した。前述の手法で重症敗血症患者群5例と, 敗血症でない急性腎不全患者群5例を比較検討した。

3. 結果

前述の手法で同定された蛋白質は, 重症敗血症群では429種類, 急性腎不全群では357種類であった。そのうち重症敗血症群のみで認められた物質は197種類であり, さらに敗血症群全例において認められた物質は11種類であった。

検出された物質を機能的に分類したところ, 敗血症群に有意にimmune system process とbiological adhesionを認めた(表1)。また敗血症群全例において認められた11種類の蛋白質のうち, 血球の破碎成分であると思われたヘモグロビンの分枝鎖の2種を除いた9種類を表2に示す。このうち6種類に関しては, すでに敗血症との関連を指摘する報告があった。

そこで既報のない3種類の物質に関して, 重症敗血症群10例と非敗血症群10例の血清でどのように差があるかを, Western Blotting法を用いて検討したところ, carbonic anhydrase 1 (CA1), leucine-rich alpha-2-glycoprotein (LRG1) に関して敗血症患者に有意に存在していることが分かった(図1)。

CA1は炭酸脱水素酵素の1種であり, 酸塩基平衡や電解質バランスを司っているが, その機能は完全には解明されていない。腹部大動脈瘤における血管壁の炎症細胞浸潤や²⁾, 炎症性腸疾患と関連している³⁾との報告がある。

LRG1は血清中に存在する糖蛋白質の1種であり, その機能は完全には解明されていない。近年, 自己免疫性疾患の

表1 プロテオーム解析で得られた蛋白質の機能的解析結果

	敗血症群 (429種類)	非敗血症群 (357種類)	P値
Function annotation-n (%)			
Metabolic process	228 (53.1)	209 (58.5)	0.13
Response to stimulus	187 (43.6)	138 (38.7)	0.16
Immune system process	100 (23.3)	59 (16.5)	0.018
Biological adhesion	31 (7.2)	14 (3.2)	0.047
Antioxidant activity	15 (3.5)	6 (1.7)	0.12
Chemokine activity	10 (0.2)	10 (0.3)	0.68
Cytokine activity	7 (1.6)	5 (1.4)	0.79

P values were calculated using chi-square tests.
Reprinted from J Artif Organs 20:132-37,2017 with permission

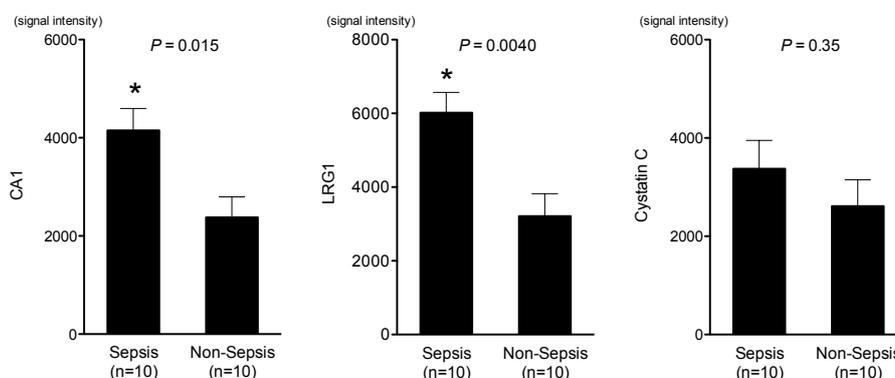


図1 敗血症群と非敗血症群におけるCA1, LRG1, CysCの血中濃度

Reprinted from J Artif Organs 20:132-37,2017 with permission

表2 敗血症群のみで認めた蛋白質

敗血症と関連する既報のない蛋白質

CA1, CysC, LRG1

敗血症と関連する既報のある蛋白質

BM-sHSPG, CFD, EGL, FGG, IGFBP4, TN

BM-sHSPG, basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein; CA1, carbonic anhydrase 1; CFD, complement factor D; CysC, Cystatin-C; EGL, extracellular glycoprotein lacritin; FGG, fibrinogen gamma chain; IGFBP4, insulin-like growth factor-binding protein 4; LRG1, leucine-rich alpha-2-glycoprotein; TN, tetranectin.

Reprinted from J Artif Organs 20:132-37,2017 with permission

新規biomarkerになる可能性⁴⁾や、TGF- β (transforming growth factor- β) シグナル伝達を介して血管新生を促進する機能から、病的な血管新生を制御する治療標的となりうる⁵⁾との報告がある。両者とも敗血症の新規biomarkerとしても期待できるだろう。

4. まとめ

プロテオミクスの手法を用いた、敗血症に関する研究を行った報告はあるが、血液浄化膜に吸着した物質を溶出分

離し、さらに網羅的解析をした報告はなく、本研究が初めてであった。そして新規病態関連物質を同定し、その物質が敗血症患者の血清に有意に存在していることを証明した。

本稿のすべての著者には規定されたCOIはない。

文献

- 1) Nakada TA, Hirasawa H, Oda S, et al: Blood purification for hypercytokinemia. *Transfus Apher Sci* **35**: 253-64, 2006
- 2) Ando T, Iizuka N, Sato T, et al: Autoantigenicity of carbonic anhydrase 1 in patients with abdominal aortic aneurysm, revealed by proteomic surveillance. *Hum Immunol* **74**: 852-7, 2013
- 3) Yagi S, Abe M, Yamashita M, et al: Carbonic anhydrase 1 epitope peptide improves inflammation in a murine model of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **22**: 1835-46, 2016
- 4) Serada S, Fujimoto M, Ogata A, et al: iTRAQ-based proteomic identification of leucine-rich alpha-2 glycoprotein as a novel inflammatory biomarker in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* **69**: 770-4, 2010
- 5) Wang X, Abraham S, McKenzie JAG, et al: LRG1 promotes angiogenesis by modulating endothelial TGF- β signalling. *Nature* **499**: 306-11, 2013