

プロテオミクスの手法による院外心停止蘇生患者の
神経学的予後予測バイオマーカー探索
に関する研究

氏名 秋吉 祐樹
所属 山口大学大学院医学系研究科
システム統御医学系専攻
救急・生体侵襲制御医学

平成26年 6月

目次

1. 要旨	1
2. 研究の背景	1
3. 目的	2
4. 方法	2
5. 結果	7
6. 考察	14
7. 結語	16
8. 謝辞	16
9. 参考文献	17

1. 要旨

本研究は、院外心停止蘇生患者における脳脊髄タンパク質の主要サブセットの同定、およびそれらタンパク質と神経学的予後の相関性の評価のための解析プラットフォームを確立することを目的とした。院外心肺停止蘇生後 48 時間以上生存した 13 例を登録し、脳脊髄液を採取した。患者の転帰は、心拍再開 6 ヶ月後の Glasgow Outcome Scale に基づいて、“good recovery”および“moderate disability”を予後良好群 (favorable outcome group: group F)、“severe disability”、“persistent vegetative state” および “death” を予後不良群 (unfavorable outcome group: group U) に分類した。対照群の脳脊髄液は、明らかな神経障害のない 8 名の被験者から採取した (normal control group: group N)。タンパク質同定は、各群 1 例ずつ、計 3 例の検体について液体クロマトグラフィー・質量分析システムにより実施後、全 21 例の検体についてウェスタンブロットにより確認した。合計 107 種類のタンパク質が脳脊髄液中に同定され、そのうち、enolase 2、calbindin 1、aldolase C などの脳特異的タンパク質を含む 40 種類のタンパク質が group U の患者のみで同定された。各脳脊髄液中の calbindin 1 濃度は、group N と group F と比較して、group U で有意に高く、Glasgow Outcome Scale スコアと有意に相関した。液体クロマトグラフィー・質量分析システムとウェスタンブロットの組み合わせは、救急症例の脳脊髄液の分析に有用である。

2. 研究の背景

院外心停止から蘇生した患者の予後は悪く、その主要な要因は、全脳虚血後の神経障害に起因する¹。Neuron specific enolase²、a protein soluble in 100% ammonium sulfate³、interleukin-8^{4, 5}、および high mobility group box 1⁶などのいくつかのバイオマーカーが蘇生患者の神経学的予後の予測マーカーとして既に報告されている。しかしながら、本領域において多くの研究が行われているにも関わらず、これらのバイオマーカーを用いた予後予測のタイミングや最適な手法については、議論の余地がある⁷。従って、より良い診療のためには、感度、特異度、また情報価値が従来のものより高く、転帰について早期判別が可能なバイオマーカーが現在も必要とされている。抗体に基づく手法は、バイオマーカー探索においてある種のタンパク質バイオマーカーの同定や確認にしばしば採用されている。しかしながら、優れた感度と特異度を併せ持つ抗体は、必ずしも入手可能とは限らない上に、多くの場合、市販の抗体は高価である。よって、抗体技術を基盤とした手法は、網羅的な研究よりむしろ、限られた数の“ありがちな候補”を標的とした研究に最適かもしれない。

質量分析を基盤としたプロテオミクスによる研究法を体液または生体組織に適用するこ

とで新たなクラスの疾患バイオマーカー候補を提供できる可能性がある。そのような新たな疾患特異的バイオマーカーは、予後予測マーカーとして有用であるだけでなく、病態のより良い理解の一助となる可能性がある。脳脊髄液（Cerebrospinal fluid：CSF）は、脳室およびくも膜下腔を循環しているため、中枢神経疾患の病態に関連するバイオマーカーの供給元として適切である。それ故、プロテオーム解析は、近年の研究において脳卒中⁸、アルツハイマー病⁹、多発性硬化症¹⁰の患者からのCSF試料に応用されてきた。

3. 目的

これまでに院外心停止蘇生患者のCSFを用いたプロテオーム研究に関する報告はない。そこで本研究は、質量分析を基盤とした解析による院外心停止蘇生患者のCSFタンパク質の同定、およびそれらと患者の神経学的予後の相関性を評価するための解析プラットフォームを確立することを目的とした。

4. 方法

対象

本研究は、前向き観察研究であり、2000年9月から2005年4月に実施された。本研究に登録された患者は、以前の報告と同一である⁶。本研究は、山口大学医学部附属病院医薬品等治験・臨床研究等審査委員会によって承認されている。本研究への参加に対するインフォームドコンセントは、来院時に各患者の近縁者から得た。心停止から心拍再開に成功した患者は、引き続き当院集中治療室へ入院となった。体外循環による心肺蘇生、重症脳卒中や外傷による心停止、神経疾患の既往、透析を伴う腎不全を有する患者は除外した。経皮的冠動脈形成術後のヘパリン投与などにより出血傾向を有する患者や終末期患者も本研究より除外した。また、心拍再開後48時間以内の死亡例も本研究より除外した。患者の深部体温は、少なくとも心拍再開後72時間は、体表面冷却装置（BlanketrolTM、シンシナティサブゼロプロダクツ社、オハイオ州、米国）を用いて36°Cから37°Cに維持した。鎮静薬（ミダゾラム、0.1-0.2 mg/kg/hour）、鎮痛薬（酒石酸ブトルファノール、0.01-0.02 mg/kg/hour）および筋弛緩薬（臭化ベクロニウム、0.05 mg/kg/hour）を投与し、用量は、適宜調整した。これらの薬物投与中止後に患者の意識レベルを評価し、意識が回復した患者は抜管後、深昏睡患者は気管切開後に集中治療室を退室した。患者は、少なくとも6ヶ月間追跡調査した。心拍再開後6ヶ月の神経学的予後は、Glasgow Outcome Scale（GOS）スコアに基づく5つの区分により評価した¹¹。“good recovery”および“moderate disability”を予後良好群

(favorable outcome group : group F) と定義し、一方、“severe disability”、“persistent vegetative state” および “death” を予後不良群 (unfavorable outcome group : group U) と定義した。

CSF 採取

CSF は、少なくとも 24 時間以内にヘパリンが投与されておらず、かつ頭部 Computed Tomography にて頭蓋内圧亢進の疑いがない患者から採取した。CSF 試料は、4°C、3,000 回転で 10 分間遠心分離を行い、その上清は、解析に供するまで -80°C の冷凍庫で保管した。神経学的に正常な対照被験者に由来する CSF (n = 8) は、整形外科手術前の脊椎麻酔時に、腰椎穿刺により採取した (normal control group : group N)。その内訳は、男性 3 名および女性 5 名で、年齢は、中央値 64 歳 (四分位範囲 : 45-80 歳) であった。

試料調製

図 1 に CSF 試料のタンパク質同定の手順を示した。各群 1 例ずつより採取した、計 3 例の CSF 試料を既報に従い若干の改変を加え処理した¹²。CSF 試料の一定分量を 0.22 μm のフィルターで濾過後、冷アセトンによるタンパク質沈殿、および沈殿物の洗浄を行い、8 M 尿素/トリス緩衝液 (pH 8.8) にて可溶化した。タンパク質試料は、2 mM ジチオスレイトールで還元後、5 mM ヨードアセトアミドでアルキル化し、純水で 4 倍希釈した。タンパク質試料は、TPCK 処理トリプシン (プロメガ社、ウィスコンシン州、米国) で 16 時間消化し、生成したペプチド混合物をナノフロー液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析装置 (LC-MS/MS) に供した。加えて、CSF 試料は、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) によって分離後、既報に従いゲル内トリプシン消化した試料も調製した¹³。

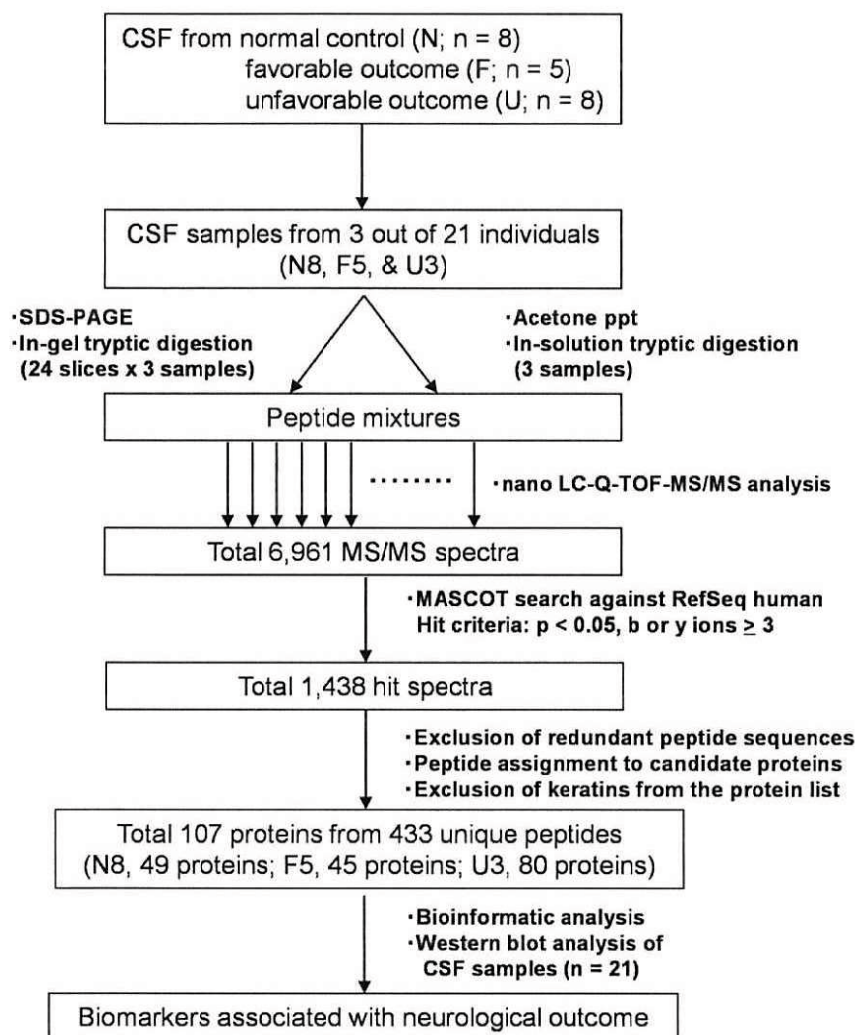


図1 タンパク質同定手順の概要

ナノフローLC-MS/MS分析

ペプチド混合物は、逆相クロマトグラフィーを用いた自動化ナノフローLC-MS/MS システムにより分析した¹⁴。概要は、ペプチド混合物を脱塩のためにトラップカラム (Mightysil C18, 0.5 mm internal diameter × 1 mm long, 3 μm particles ; 関東化学社、東京、日本) に吸着させ、次いで Mightysil C18 カラム (0.15 mm internal diameter × 40 mm long, 3 μm particles ; 関東化学社) を使用し、アセトニトリルの直線濃度勾配を用いて流速 100 nl/min で分離した (0-80%、勾配溶出 35 分)。溶出したペプチドは、オンラインで四重極飛行時間型質量分析装置 (Q-ToF Ultima、マイクロマス社、マンチェスター、英国) 内へ直接噴霧され、親イオン (MS) とその断片イオン (MS/MS) の質量を逐次測定した。

データベース検索によるタンパク質同定

Masslynx ソフトウェア（マイクロマス社）により得られた MS/MS スペクトルを ProteinLynx ソフトウェア（マイクロマス社）によりテキストに変換した。データベース検索は、MASCOT ソフトウェア（マトリックスサイエンス社、ロンドン、英国）を用いてアミノ酸配列データベース RefSeq human（米国バイオテクノロジー情報センター、米国）に対して検索を行った。検索条件を以下に示す。固定修飾：carbamoylmethylation (Cys)、可変修飾：oxidation (Met)、maximum miss cleavages：2、peptide mass tolerance：500 ppm、MS/MS tolerance：0.5 Da。検索結果は、STEM ソフトウェアを用いて、以下のタンパク質の帰属アルゴリズムに従い処理した¹⁵。i) 3 例の CSF 試料に由来する全てのデータセットを結合し、ii) 確率ベース MOWSE (molecular weight search) スコアが閾値 ($p < 0.05$) を越え、かつ、b イオンおよび y イオンの少なくともどちらか一方について 3 箇所以上の MS/MS シグナルが検出されたペプチド配列を選択し、iii) 重複したペプチド配列を除去した。iv) 各ペプチド配列を割り当て可能なペプチド数が最大となる候補中のタンパク質に帰属し、v) 最終的にこれらペプチド割り当てのルールを各患者のデータセットに一律に適用した。潜在的な混入物、すなわち、ケラチンおよびブタトリプシンは、同定タンパク質の最終リストから除外した。本研究で同定された CSF タンパク質は、Expression Analysis System Explorer (EASE) ソフトウェアを用いて Gene Ontology (GO) カテゴリーに従い分類した¹⁶。各臓器における相対的な遺伝子発現量は、UniGene データベース (NCBI) の Expressed Sequence Tag (EST) Profile Viewer を用いて算出した。

電気泳動およびウェスタンブロット

適量の CSF 試料を SDS-PAGE で分離し、タンパク質バンドをポリフッ化ビニリデン膜に電氣的に転写した。ブロットは、5%スキムミルクでブロッキングし、一次抗体として抗ヒト calbindin 1 ウサギポリクローナル抗体 (ab11426、アブカム社、マサチューセッツ州、米国)、抗ヒト aldolase C ウサギポリクローナル抗体 (ab71294、アブカム社)、あるいは抗ヒト enolase 2 マウスモノクローナル抗体 (ab16807、アブカム社) とインキュベーション後、二次抗体は、ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体 (NA931、GE ヘルスケアバイオサイエンス社、ニュージャージー州、米国)、または同標識抗ウサギ IgG 抗体 (NA934、GE ヘルスケアバイオサイエンス社) とさらにインキュベーションした。ブロットに化学発光試薬 (ECL Plus Western Blotting Detection System、GE ヘルスケアバイオサイエンス社) を加え、室温 5 分間反応後、X 線フィルムに露光し、可視化した。X 線フィルム上のバンド強度は、

ImageJ ソフトウェア（米国国立衛生研究所、メリーランド州、米国）を用いて定量した。

統計解析

統計解析は、統計解析ソフトウェアプログラム SPSS version 11.0（エスピーエスエス社、イリノイ州、米国）を使用した。CSF 中の各タンパク質濃度や蘇生時間などの正規分布に従わない連続変数は、中央値および四分位範囲で表記した。3 群比較のための統計解析は、Kruskal-Wallis H test により実施し、引き続き、2 群間の比較は、Mann-Whitney U test により実施した。P 値は、Bonferroni 法により補正した。性別やバイスタンダー心肺蘇生などのカテゴリー変数は、数値および百分率で示した。スピアマン順位相関係数は、GOS スコアと CSF 中の各タンパク質濃度より算出した。P<0.05 を統計学的有意差ありと判定した。

5. 結果

患者の特徴

430名の院外心停止患者のうち130名が心拍再開した。130名のうち94名は、集中治療室に搬入された。除外基準を適用後、14名の患者が本研究に登録された。しかしながら、1例の患者からは十分なCSFが得られなかったため、結果的に13検体が本研究で解析された。登録された患者の臨床的な特徴を表1に示す。心停止の原因は、心原性6例で、初期調律は心室細動3例であった。5例の患者転帰は、GOSで“good recovery (n=2)”および“moderate disability (n=3)”であり、group Fに分類された。一方、8例の患者転帰は、GOSで“persistent vegetative state (n=3)”および“death (n=5)”であり、group Uに分類された。死亡症例5例の死因は重度脳障害で、死亡に至るまで植物状態であった。

表1 本研究の対象となった患者の特徴

	患者数 (n = 13)
年齢 (歳)	
中央値	50
四分位範囲	44 - 68
性別	
男性、n (%)	11 (85)
目撃者あり、n (%)	7 (54)
バイスタンダーCPR ^a あり、n (%)	7 (54)
心停止時間 (心停止から CPR ^a 開始まで) (分)	
中央値	8
四分位範囲	5 - 12
蘇生時間 (CPR ^a 開始から ROSC ^b まで) (分)	
中央値	32
四分位範囲	26 - 37
心原性心停止、n (%)	6 (46)
初期調律、n (%)	
心室細動/無脈性心室頻脈	3 (23)
無脈性電気活動	2 (15)
心静止	8 (62)
Glasgow outcome scale、n (%)	
good recovery	2 (15)
moderate disability	3 (23)
severe disability	0 (0)
persistent vegetative state	3 (23)
death	5 (38)

^aCPR、cardiopulmonary resuscitation：心肺蘇生

^bROSC、return of spontaneous circulation：心拍再開

院外心停止蘇生患者の CSF タンパク質プロファイル

3 症例に由来する CSF タンパク質のゲル内あるいは溶液中トリプシン消化物の連続的な
ノフロー LC-MS/MS 解析によって、合計 6,961 の MS/MS スペクトルが得られた。これらス
ペクトルから 433 種類のユニークなペプチド配列を割り当て、最終的に合計 107 種類のタ
ンパク質に帰属した (図 1)。GO データベースに基づいてこれら CSF タンパク質に割り当
てられた主要なアノテーションは、cellular components に関して “extracellular” (57.9%) お
よび “cytoplasm” (15.9%)、molecular function に関して “binding” (29.0%) および “transporter”
(16.8%)、biological process に関して “transport” (15%) および “metabolism” (10.3%) で
あった (図 2A)。これらは、CSF の特性から当然期待される体液タンパク質の典型的な特
徴を示していた。従って、同定された全タンパク質のリストは、CSF タンパク質の主要サ
ブセットを含んでいると見なした。433 種類のペプチド配列と 107 種類のタンパク質の間で
のペプチド帰属ルールを患者ごとのデータセットに一貫して適用した結果、group N の被験
者 (症例番号 N8) からは 49 種類、group F の患者 (症例番号 F5) からは 45 種類、group U
の患者 (症例番号 U3) からは 80 種類のタンパク質があいまいさの余地なく同定された (図
1)。3 例の患者から同定されたタンパク質のアノテーションを比較した結果、cellular
component カテゴリーに注目すべき相違を認めた (図 2B)。“Extracellular” または “cytoplasm”
に分類されたタンパク質の種類は、患者 U3 (49 種類および 17 種類) が、患者 F5 (36 種類
および 0) または被験者 N8 (36 種類および 1 種類) より多かった。Cellular component カテ
ゴリーを単純に “extracellular” と “intracellular” に 2 分した場合、“intracellular” の
割合は、患者 F5 (13%) または被験者 N8 (22%) より患者 U3 (33%) が多かった (図 2B)。
107 種類のタンパク質のうち、23 種類は 3 例で共通に同定され、それらは albumin や
apolipoprotein E などの既知の主要 CSF タンパク質を含んでいた (図 2C)。一方、63 種類の
タンパク質は、3 症例のうち一つのみで同定された (被験者 N8、12 種類; 患者 F5、11 種類;
患者 U3、40 種類) (図 2C)。共通に同定されたタンパク質とは対照的に、患者 U3 のみに同
定された 40 種類のタンパク質に含まれる細胞内タンパク質の割合は高かった (4%対 58%)
(図 2C)。さらに、患者 U3 に特異的に同定されたタンパク質は、急性期タンパク質、一般
的な代謝酵素、および脳特異的タンパク質など、数々のバイオマーカー候補を含んでいた
(表 2)。これらの結果を検証するために、ヒットペプチド数 (≒含量) が多く (≥2)、かつ、
脳での EST レベル (≒脳特異性) が高い (≥0.1) aldolase C、calbindin 1 および enolase 2 を
group U 特異的タンパク質候補として選択した。

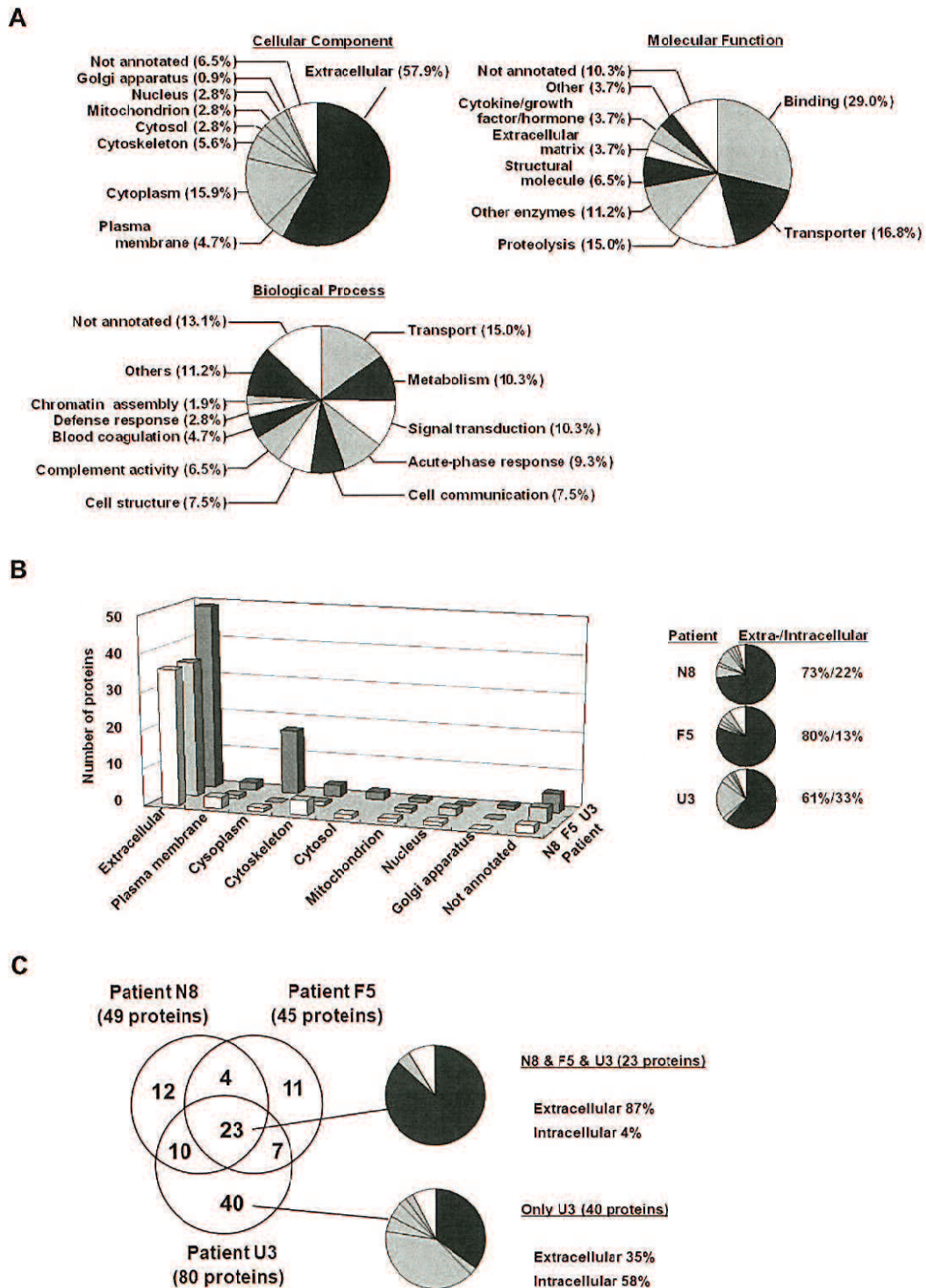


図2 神経学的予後が異なる3症例から同定されたCSFタンパク質の生物情報科学的特徴づけ

(A) 3症例(症例番号N8、F5、U3)から同定された合計107種類のタンパク質をgene ontologyカテゴリーに従って分類した。(B)細胞内分布(左図)、および細胞外/細胞内タンパク質の割合(右図)を3症例間で比較した。(C)各症例で同定されたCSFタンパク質数をベン図で示した。

表2 予後不良患者において特異的に同定されたタンパク質リスト

Accession	Protein name	Protein mass (Da)	Unique peptides	Total spectra	Cellular component	Molecular function	Biological process	Brain EST level	Liver EST level
gi 4885063	aldolase C, fructose-bisphosphate	39,830	11	15	Mitochondrion	enzyme	metabolism	0.234	0.01
gi 4826655	calbindin 1	30,291	6	6	Cytoplasm	binding	metabolism	0.11	0.053
gi 21464101	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide	28,456	4	4	Cytoplasm	binding	signal transduction	0.063	0.012
gi 4557032	lactate dehydrogenase B	36,900	4	4	Cytoplasm	enzyme	metabolism	0.017	0.015
gi 21735625	tyrosine 3/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta polypeptide	27,899	3	3	Cytoplasm	binding	signal transduction	0.021	0.021
gi 4504349	beta globin	16,102	3	3	Cytoplasm	transporter activity	transport	0.004	0.005
gi 5803225	tyrosine 3/tryptophan 5-monooxygenase activation protein epsilon polypeptide	29,326	3	3	Cytoplasm	binding	signal transduction	0.032	0.032
gi 16418467	leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1	38,382	2	2	Extracellular	not annotated	not annotated	0.003	0.212
gi 4501887	actin, gamma 1 propeptide	42,108	2	2	Cytoskeleton	structural molecule	cell structure	0.021	0.013
gi 4504345	alpha 2 globin	15,305	2	2	Cytoplasm	transporter activity	transport	0	0
gi 4507951	tyrosine 3/tryptophan 5-monooxygenase activation protein eta polypeptide	28,372	2	2	Cytoplasm	binding	signal transduction	0.04	0.018
gi 5803011	enolase 2	47,581	2	2	Cytoplasm	enzyme	metabolism	0.196	0.003
gi 51460659	PREDICTED: similar to Ig kappa variable region	16,693	1	2	Not annotated	not annotated	not annotated	0	0
gi 10835095	serum amyloid A4, constitutive	14,854	1	1	Extracellular	transporter activity	acute-phase response	0	0
gi 11038662	complement component 1, c subcomponent, beta polypeptide precursor	26,915	1	1	Extracellular	binding	complement activity	0.015	0.014
gi 11056061	thymosin, beta 4	5,050	1	1	Cytoplasm	binding	cell structure	0.011	0.022
gi 13325072	phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatase isoform a	105,392	1	1	Golgi apparatus	enzyme	cell structure	0.025	0.01
gi 13775198	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 3	10,488	1	1	Cytoplasm	not annotated	not annotated	0.012	0.017
gi 17136078	VEGF nerve growth factor inducible precursor	67,275	1	1	Extracellular	transporter activity	not annotated	N/A	N/A
gi 19557645	secretogranin III	52,973	1	1	Extracellular	not annotated	not annotated	0.208	0.005
gi 19923362	Thy-1 cell surface antigen	18,151	1	1	Plasma membrane	binding	not annotated	0	0
gi 21071030	alpha 1B-glycoprotein	54,790	1	1	Extracellular	not annotated	not annotated	0.017	0.489
gi 21071039	carboxypeptidase Y	56,770	1	1	Cytosol	proteolysis	proteolysis and peptidolysis	0.389	0
gi 21359871	SPARC-like 1	76,057	1	1	Extracellular	binding	cell communication	0.091	0.001
gi 21361091	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thioesterase)	25,151	1	1	Cytoplasm	proteolysis	protein catabolism	0.06	0.017
gi 31542984	inter-alpha (globulin) inhibitor H4 (plasma kallikrein-sensitive glycoprotein)	103,521	1	1	Extracellular	proteolysis	acute-phase response	0.009	0.551
gi 32490572	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3	121,458	1	1	Cytoplasm	structural molecule	cell structure	0.051	0
gi 40316910	serum amyloid A1 isoform 2	13,581	1	1	Extracellular	transporter activity	acute-phase response	0	0
gi 41058276	PREDICTED: similar to Triosephosphate isomerase (TIM)	27,211	1	1	Not annotated	not annotated	not annotated	0	0
gi 4502397	complement factor B preproprotein	86,819	1	1	Extracellular	proteolysis	complement activity	0.005	0.196
gi 4502511	complement component 9	64,615	1	1	Extracellular	binding	complement activity	0	0
gi 4502805	chromogranin A	50,829	1	1	Extracellular	binding	negative modulator of the neuroendocrine system	0.035	0
gi 4504067	aspartate aminotransferase 1	46,447	1	1	Cytoplasm	enzyme	metabolism	0.057	0.035
gi 4505763	phosphoglycerate kinase 1	44,985	1	1	Cytoplasm	enzyme	metabolism	0.013	0.042
gi 4506155	kallikrein 6 preproprotein	27,523	1	1	Extracellular	proteolysis	protein metabolism; protease	0.025	0
gi 4507509	tissue inhibitor of metalloproteinase 1 precursor	23,840	1	1	Extracellular	proteolysis	negative regulation of proteolysis	0.005	0.012
gi 45580727	microtubule-associated protein 1A	293,155	1	1	Cytoskeleton	structural molecule	microtubule stabilization	0.181	0.006
gi 51464757	PREDICTED: similar to Keratin, type I cytoskeletal 18 (Cytokeratin 18)	47,176	1	1	Not annotated	not annotated	not annotated	0	0
gi 5174539	cytosolic malate dehydrogenase	36,631	1	1	Cytosol	enzyme	metabolism	0.02	0.016
gi 5803227	tyrosine 3/tryptophan 5-monooxygenase activation protein theta polypeptide	28,032	1	1	Cytoplasm	binding	signal transduction	0.024	0.015

N/A: 未特定

バイオマーカー候補の定量的スクリーニングおよび GOS スコアとの関連

Calbindin 1、aldolase C および enolase 2 の濃度を確認するために、group N の 8 例、group F の 5 例、group U の 8 例からの CSF 検体をウェスタンブロット解析した。Group U において calbindin 1 の強いバンドシグナルが検出されたが、group N あるいは group F では強いバンドは検出されなかった (図 3A)。この傾向は aldolase C および enolase 2 においても明らかであった (図 3A)。Group U の CSF 中 calbindin 1 濃度の中央値 (U3 に対して 75%) は、group N (U3 に対して 0%) ($p=0.001$) および group F (U3 に対して 2%) ($p=0.005$) と比較して有意に高く、group F は group N と比較して有意に高かった ($p=0.003$) (図 3B)。Group U の CSF 中 enolase 2 濃度の中央値 (U3 に対して 154%) は、group N (2%) ($p=0.008$) および group F (0%) ($p=0.003$) と比較して有意に高かった (図 3D)。Group U の CSF 中 aldolase C 濃度および総タンパク濃度の中央値 (91%および 1,414 $\mu\text{g/ml}$) は、group N (22%および 473 $\mu\text{g/ml}$) および group F (23%および 554 $\mu\text{g/ml}$) と比較して高かったが、統計学的有意差は認めなかった (図 3C および図 3E)。

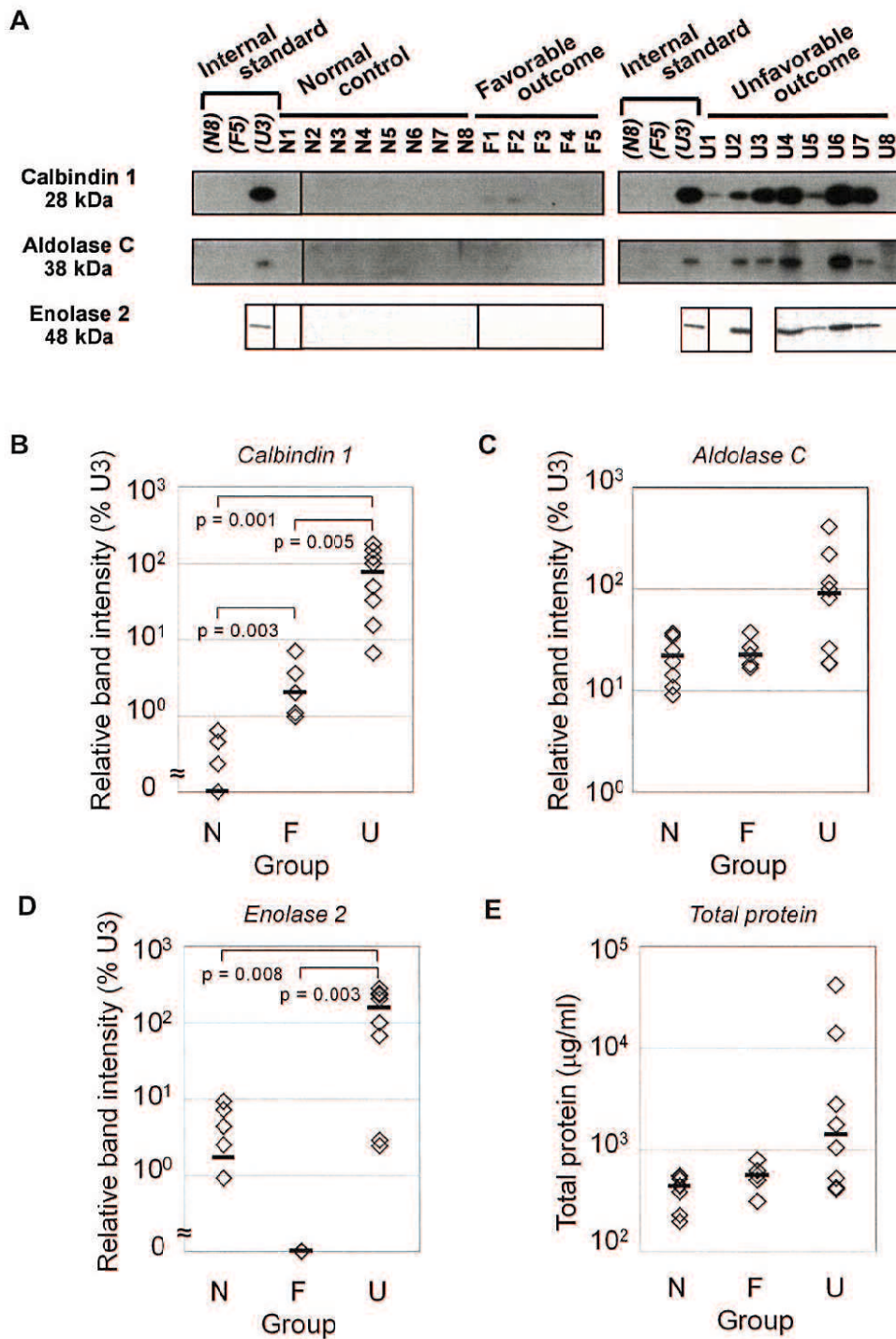


図3 ウェスタンブロット解析による CSF 中 calbindin 1、aldolase C および enolase 2 濃度の確認

(A) ウェスタンブロット解析は group N の 8 例、group F の 5 例、group U の 8 例の CSF 検体を用いた。ブロットは直接比較するため患者識別番号順に並べ替えた。Enolase 2 について U3 は内部標準のレーンにのみ泳動を行った。(B) calbindin 1、(C) aldolase C、(D) enolase 2 の濃度は、U3 に対する相対バンド強度として患者毎に表した。(E) 総タンパク質量は Bradford assay により測定した。(B-E) 各群の中央値は水平線で表した。P 値は Mann-Whitney U test により算出し、Bonferroni 法により補正した。

院外心停止蘇生患者における心拍再開 6 ヶ月後の GOS スコアは、calbindin 1 濃度 ($r_s = 0.73$ 、 $p = 0.005$) および enolase 2 濃度 ($r_s = 0.851$ 、 $p < 0.001$) と有意な相関を認めたが、aldolase C 濃度とは相関しなかった (図 4A および図 4B)。

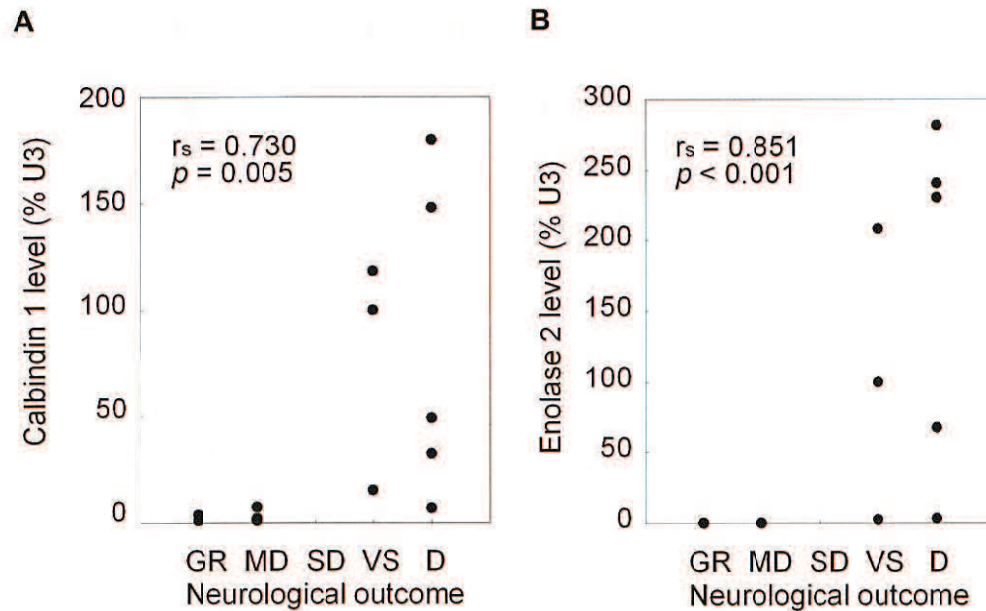


図 4 GOS スコアと院外心停止蘇生全 13 症例の CSF 中 calbindin 1 濃度 (A) または enolase 2 濃度 (B) との関連

GOS スコアは calbindin 1 濃度または enolase 2 濃度と有意に正の相関を示した (スピアマン順位相関係数 : $r_s = 0.730$ 、 $p = 0.005$ または $r_s = 0.851$ 、 $p < 0.001$)。GR : good recovery、MD : moderate disability、SD : severe disability、VS : persistent vegetative state、D : death。

6. 考察

本研究は、院外心停止蘇生患者の CSF における神経学的予後予測マーカーを同定するために LC-MS/MS を基盤としたプロテオーム解析の適用を実証した。はじめに、神経学的予後が異なる 3 例について CSF タンパク質をダイレクトナノフロー LC-MS/MS により解析し、1 例の予後不良患者 (U3) に特異的な 40 種類のタンパク質を含む 107 種類のタンパク質を同定した。次に、本研究に登録された全 21 症例について、これらの結果をウェスタンブロットにより定量的に確認し、神経学的予後不良を早期に予測する新たなマーカーとして calbindin 1 を同定した。我々の知る範囲で、本研究は、LC-MS/MS に基づく研究方法を用いて院外心停止蘇生患者の CSF タンパク質を解析した最初の研究である。本研究において確立した解析プラットフォームは、以下に示す幾つかの利点がある。第一に、本研究に使用したダイレクトナノフロー LC-MS/MS システムは、フリットレスキャピラリーカラムとスプリットレス・グラジエント溶出システムを備えており¹⁴、迅速、高分離能、かつ高感度に早期予後予測マーカーの検出を可能とした。第二に、ヒットペプチドによる定量法は、一般的な 2 次元電気泳動による定量法と比較して操作が単純かつ簡便であり¹⁷、本研究において同定したタンパク質リストから候補を選択するためのタンパク質発現量に関する有用な情報をもたらした。第三に、プロテオーム解析に供した CSF 検体は少数であったにも関わらず、遺伝子のアノテーション情報や臓器分布などに関する同定タンパク質のバイオインフォマティクスによる解析は、続く定量スクリーニングに供するバイオマーカー候補の効率的な選択を可能とした。

神経学的な予後が不良であった患者 (U3) に特異的な 40 種類のタンパク質を同定し、このうち alpha 1B-glycoprotein、SPARC-like 1、kallikrein 6 preproprotein、tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein (14-3-3 タンパク質としても知られている)、および ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 は、アルツハイマー病、多発性硬化症、クロイツフェルト・ヤコブ病などの幾つかの神経変性疾患において CSF 中のバイオマーカー候補として既に報告されている¹⁸⁻²⁰。定量的スクリーニング法を用いて、さらに研究を進めることで、これらの疾患関連タンパク質と院外心停止蘇生患者の予後との関連を明らかにすることができるであろう。

Calbindin 1 は、カルシウム結合タンパク質であり、中枢神経において細胞内カルシウム濃度の調節に関与している²¹。本研究により、CSF 中の calbindin 1 濃度の上昇が院外心停止蘇生患者の神経学的予後の悪化と相関することを示した。さらに、生前および死後の CSF 検体のプロテオーム比較研究において、死後の CSF 中の calbindin 1 濃度上昇が報告されてい

る²²。従って、CSF 中の calbindin 1 濃度の上昇は、心停止に伴う虚血性神経細胞死の進行を反映しているかもしれない。Calbindin 1 の小脳における発現量は、他の中枢神経系領域と比較して約 10 倍高く²³、calbindin 1 の CSF 中濃度の上昇は、小脳疾患におけるプルキンエ細胞の障害を推定するために有用であることが報告されている²⁴。一方、enolase 2 は、神経や神経内分泌細胞に圧倒的に多く発現している²⁵。このことから、CSF 中の calbindin 1 濃度と enolase 2 濃度を組み合わせることで、心停止により引き起こされる脳障害の部位を個々の患者で推定するために適用できるかもしれない。LC-MS/MS 解析において aldolase C はもっぱら group U 患者 (U3) において同定されたものの、ウェスタンブロット解析においてはおそらくその低いシグナル強度 (または高バックグラウンド) によって統計学的に有意な差を示すことはできなかった。従って、aldolase C 濃度と神経学的予後との関連は、高い感度を有する他の抗体を用いて再検討を実施する必要がある。

本研究によって、プロテオミクスを基盤とした院外心停止蘇生患者のバイオマーカー探索における幾つかの課題が明らかとなった。第一に、CSF のタンパク質組成が 3 症例間で大きく異なっていた。それ故、院外心停止蘇生患者の CSF から同定されたバイオマーカー候補は、個人差による可能性を排除するために広範な確認が必要である。第二に、group U 患者から得られた CSF の総タンパク質濃度は、明らかな血液のコンタミネーションが無かったにも関わらず、極めて広範囲 (最大 100 倍) に分布していた。高いタンパク質濃度は、トリプシン消化の効率に影響し、電気泳動やクロマトグラフィーにおける分離能を低下させ、しばしば同定タンパク質数を低下させ得る。院外心停止蘇生患者の病因の多様性を考慮すると、プロテオミクスを基盤としたバイオマーカー探索において、これらは不可避の問題であるかもしれない。これらの問題を克服するためにいくつかの方法が考えられる。例えば、個々の CSF 検体を解析し、膨大な労力をかけて、多数の候補タンパク質 (それらの多くは個人差に基づくノイズ) を同定し検証するよりも、グループ毎に CSF 検体をプールすることによって、ノイズ (個人差) を減弱させ、シグナル (真のバイオマーカー) を増強する。また、高濃度のタンパク質を含む CSF 検体のプール検体への混入は、ノイズの増強に繋がることから、予めタンパク質濃度に関して均質な検体を選別することも重要となる。さらに、プール検体の繰り返し分析により、MS テクノロジーにおける低再現性を補い、個々の患者由来の生体試料におけるタンパク質プロファイルの幅広い変動を最小限にすることができる。本研究で確立した分析プラットフォームに安定同位体標識を用いた定量解析を組み合わせることで²⁶、質量分析を基盤としたプロテオーム解析が院外心肺停止蘇生患者の CSF タンパク質の特徴づけにおいてより有益となるであろう。

7. 結語

ナノフローLC-MS/MS とウェスタンブロットスクリーニングを組み合わせた解析プラットフォームは、救命救急患者の CSF 検体の解析に適用することができる。本研究において同定された calbindin 1 は、院外心停止蘇生患者における予後不良の新たな早期予測マーカーとなりうる。本研究の成果は、院外心停止蘇生患者に由来する CSF プロテオームの今後の大規模網羅的研究に寄与し、それによって患者の神経学的予後に関連または影響する有益な分子の同定をさらに加速させるであろう。

8. 謝辞

本研究に関して終始懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました山口大学大学院医学系研究科修復医学教育研究センターの泉友則准教授に深甚なる謝辞を表します。また、本研究の遂行にあたりご親切なるご助言とご協力を賜りました、山口県立総合医療センター前川剛志院長、山口大学大学院医学系研究科救急・生体侵襲医学講座の鶴田良介教授ならびに小田泰崇准教授に厚く御礼申し上げます。山口大学大学院医学系研究科救急・生体侵襲医学講座プロテオーム研究室の方々、および山口大学医学部附属病院先進救急医療センターの皆様方に心より感謝いたします。最後に、大学院在学中に温かく見守り支えてくださった家族や友人に心から感謝いたします。

9. 参考文献

1. Schneider, A., Böttiger, B.W. and Popp, E.: Cerebral resuscitation after cardiocirculatory arrest. *Anesth. Analg.*, 108: 971-979, 2009.
2. Reisinger, J., Höllinger, K., Lang, W., Steiner, C., Winter, T., Zeindlhofer, E., Mori, M., Schiller, A., Lindorfer, A., Wiesinger, K. and Siostrzonek, P.: Prediction of neurological outcome after cardiopulmonary resuscitation by serial determination of serum neuron-specific enolase. *Eur. Heart J.*, 28: 52-58, 2007.
3. Hachimi-Idrissi, S., Van der Auwera, M., Schiettecatte, J., Ebinger, G., Michotte, Y. and Huyghens, L.: S-100 protein as early predictor of regaining consciousness after out of hospital cardiac arrest. *Resuscitation*, 53: 251-257, 2002.
4. Ito, T., Saitoh, D., Fukuzuka, K., Kiyozumi, T., Kawakami, M., Sakamoto, T. and Okada, Y.: Significance of elevated serum interleukin-8 in patients resuscitated after cardiopulmonary arrest. *Resuscitation*, 51: 47-53, 2001.
5. Oda, Y., Tsuruta, R., Kasaoka, S., Inoue, T. and Maekawa, T.: The cutoff values of intrathecal interleukin 8 and 6 for predicting the neurological outcome in cardiac arrest victims. *Resuscitation*, 80: 189-93, 2009.
6. Oda, Y., Tsuruta, R., Fujita, M., Kaneda, K., Kawamura, Y., Izumi, T., Kasaoka, S., Maruyama, I. and Maekawa, T.: Prediction of the neurological outcome with intrathecal high mobility group box 1 and S100B in cardiac arrest victims: a pilot study. *Resuscitation*, 83: 1006-1012, 2012.
7. Nolan, J.P., Neumar, R.W., Adrie, C., Aibiki, M., Berg, R.A., Böttiger, B.W., Callaway, C., Clark, R.S., Geocadin, R.G., Jauch, E.C., Kern, K.B., Laurent, I., Longstreth, W.T., Merchant, R.M., Morley, P., Morrison, L.J., Nadkarni, V., Peberdy, M.A., Rivers, E.P., Rodriguez-Nunez, A., Sellke, F.W., Spaulding, C., Sunde, K. and Hoek, T.V.: Post-cardiac arrest syndrome: epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication. A Scientific Statement from the International Liaison Committee on Resuscitation; the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee; the Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; the Council on Clinical Cardiology; the Council on Stroke. *Resuscitation*, 79: 350-379, 2008.
8. Zimmermann-Ivol, C.G., Burkhard, P.R., Le Floch-Rohr, J., Allard, L., Hochstrasser, D.F. and Sanchez, J.C.: Fatty acid binding protein as a serum marker for the early diagnosis of stroke: a pilot study. *Mol. Cell. Proteomics*, 3: 66-72, 2004.
9. Choe, L., D'Ascenzo, M., Relkin, N.R., Pappin, D., Ross, P., Williamson, B., Guertin, S., Pribil, P. and Lee, K.H.: 8-plex quantitation of changes in cerebrospinal fluid protein expression in subjects undergoing intravenous immunoglobulin treatment for Alzheimer's disease. *Proteomics*, 7: 3651-3660, 2007.
10. Stoop, M.P., Singh, V., Dekker, L.J., Titulaer, M.K., Stingl, C., Burgers, P.C., Sillevs Smitt, P.A., Hintzen, R.Q. and Luiders, T.M.: Proteomics comparison of cerebrospinal fluid of relapsing remitting and primary progressive multiple sclerosis. *PLoS One*, 5: e12442, 2010.
11. Jennett, B. and Bond, M.: Assessment of outcome after severe brain damage. *Lancet*, 1: 480-484, 1975.
12. Zhao, J., Izumi, T., Nunomura, K., Satoh, S. and Watanabe, S.: MARCKS-like protein, a membrane protein identified for its expression in developing neural retina, plays a role in regulating retinal cell proliferation. *Biochem. J.*, 408: 51-59, 2007.

13. Katagiri, T., Hatano, N., Aihara, M., Kawano, H., Okamoto, M., Liu, Y., Izumi, T., Maekawa, T., Nakamura, S., Ishihara, T., Shirai, M. and Mizukami, Y.: Proteomic analysis of proteins expressing in regions of rat brain by a combination of SDS-PAGE with nano-liquid chromatography-quadrupole-time of flight tandem mass spectrometry. *Proteome Sci.*, 8:41, 2010.
14. Natsume, T., Yamauchi, Y., Nakayama, H., Shinkawa, T., Yanagida, M., Takahashi, N. and Isobe, T.: A direct nanoflow liquid chromatography - tandem mass spectrometry system for interaction proteomics. *Anal. Chem.*, 74: 4725-4733, 2002.
15. Shinkawa, T., Taoka, M., Yamauchi, Y., Ichimura, T., Kaji, H., Takahashi, N. and Isobe, T.: STEM: a software tool for large-scale proteomic data analyses. *J. Proteome Res.*, 4: 1826-1831, 2005.
16. Hosack, D.A., Dennis, G.Jr., Sherman, B.T., Lane, H.C., Lempicki, R.A.: Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol.*, 4: R70, 2003.
17. Gao, J., Friedrichs, M.S., Dongre, A.R. and Opiteck, G.J.: Guidelines for the routine application of the peptide hits technique. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 16: 1231-1238, 2005.
18. Kroksveen, A.C., Opsahl, J.A., Aye, T.T., Ulvik, R.J. and Berven, F.S.: Proteomics of human cerebrospinal fluid: discovery and verification of biomarker candidates in neurodegenerative diseases using quantitative proteomics. *J. Proteomics*, 74: 371-388, 2011.
19. Hsich, G., Kenney, K., Gibbs, C.J., Lee, K.H. and Harrington, M.G.: The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *N. Engl. J. Med.*, 335: 924-930, 1996.
20. Day, I.N. and Thompson, R.J.: UCHL1 (PGP 9.5): neuronal biomarker and ubiquitin system protein. *Prog. Neurobiol.*, 90: 327-362, 2010.
21. Baimbridge, K.G., Celio, M.R. and Rogers, J.H.: Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci.*, 15: 303-308, 1992.
22. Finehout, E.J., Franck, Z., Relkin, N. and Lee, K.H.: Proteomic analysis of cerebrospinal fluid changes related to postmortem interval. *Clin. Chem.*, 52: 1906-1913, 2006.
23. Kurobe, N., Inaguma, Y., Shinohara, H., Semba, R., Inagaki, T. and Kato, K.: Developmental and age-dependent changes of 28-kDa calbindin-D in the central nervous tissue determined with a sensitive immunoassay method. *J. Neurochem.*, 58: 128-134, 1992.
24. Kiyosawa, K., Mokuno, K., Murakami, N., Yasuda, T., Kume, A., Hashizume, Y., Takahashi, A. and Kato, K.: Cerebrospinal fluid 28-kDa calbindin-D as a possible marker for Purkinje cell damage. *J. Neurol. Sci.*, 118: 29-33, 1993.
25. Kaiser, E., Kuzmits, R., Pregant, P., Burghuber, O. and Worofka, W.: Clinical biochemistry of neuron specific enolase. *Clin. Chim. Acta*, 183: 13-31, 1989.
26. Abdi, F., Quinn, J.F., Jankovic, J., McIntosh, M., Leverenz, J.B., Peskind, E., Nixon, R., Nutt, J., Chung, K., Zabetian, C., Samii, A., Lin, M., Hattan, S., Pan, C., Wang, Y., Jin, J., Zhu, D., Li, GJ., Liu, Y., Waichunas, D., Montine, T.J. and Zhang, J.: Detection of biomarkers with a multiplex quantitative proteomic platform in cerebrospinal fluid of patients with neurodegenerative disorders. *J. Alzheimers Dis.*, 9: 293-348, 2006.