

「メタボローム解析による新たな脳虚血バイオマーカーの探索とその検証」

神戸大学大学院医学研究科 脳神経外科額分野 細田弘吉

1 研究の背景と目的

脳血管障害は日本人の死因の第4位を占める重要な疾患である。その中でも最も多い脳梗塞における循環動態や代謝の変化を知ることがきわめて重要である。近年の質量分析装置の発達に伴い、体液中・組織中の微量な蛋白質・ペプチド・低分子代謝物も高感度に解析できるようになってきた。なかでもメタボローム解析は解析対象数が限定的（約4000種）で、生体の表現形に近く、低分子代謝物に関する生化学的な知見の蓄積があり、臨床研究に有利である。この手法を用いて脳虚血の代謝変化を包括的に調べることにより、新たな脳虚血のバイオマーカーや治療法を発見できる可能性がある。本手法を用いて以下の3項目を目的として本研究を計画した。

- (1) 頸動脈内膜剥離術の術中内頸動脈遮断前後に内頸静脈血と末梢血を採取し、包括的メタボローム解析を行い虚血性脳血管イベント（脳梗塞，一過性脳虚血）の有無により変動する代謝産物を明らかにする。
- (2) ラットの中大脳動脈閉塞モデルを用いて脳虚血急性期の内頸静脈血と末梢血を採取し、包括的メタボローム解析を行い、脳虚血急性期に変動する代謝産物を明らかにする。
- (3) 2で明らかにしたバイオマーカー候補の代謝産物が、実際のヒトの脳梗塞症例で本当に特異的に変動しているかを検証する。

2 研究方法・研究内容

I. 頸動脈狭窄症患者における虚血性脳血管イベントの有無による代謝変化

- (1) 頸動脈内膜剥離術の通常の手術操作として、内頸静脈と顔静脈を剥離し顔静脈を切断するが、その際に同静脈から内頸静脈末梢方向へ向けて18 gage カテーテルを挿入し、内頸動脈の血流遮断前に末梢血と内頸静脈血をヘパリン採血にて採取、遠心分離し、血漿を-80℃にて保存した。
- (2) 内頸静脈血の血漿から水溶性代謝物・脂溶性代謝物を抽出し、水溶性代謝物はオキシム化・トリメチルシリル誘導体化後、また脂溶性代謝物は加水分解後、得られる脂肪酸をメチル誘導体化し、ガスクロマトグラフ質量分析装置にかけてメタボローム解析を行った。

II. ラット中大脳動脈閉塞モデルを用いた脳梗塞急性期代謝変化

- (1) 麻酔下に Wistar rat の内頸動脈を露出し nylon 糸を挿入、中大脳動脈を閉塞して脳梗塞を作成。同じ手術を行い nylon 糸を挿入しないラットを対照群とした。
- (2) 中大脳動脈閉塞前、閉塞後 30, 60, 120 分に頸静脈から採血し、遠心分離して血漿を-80℃に保存。
- (3) 再灌流実験として、閉塞 60 分後にナイロン糸を抜去し、24 時間後にラットを断頭し、脳梗塞を組織学的に確認。同時に内頸静脈から採血も行い遠心分離して血漿を-80℃に保存。
- (4) I と同じ処理を行い、ガスクロマトグラフ質量分析装置にかけてメタボローム解析を行った。

### III. 急性期脳梗塞のメタボローム解析

- (1) 発症 24 時間以内の脳梗塞患者から採血を行なった。
- (2) 健康な成人から採血を行なった。
- (3) 上記 2 群のサンプルを用いてメタボローム解析を行い、脳梗塞急性期に変動する代謝物を同定する。現在、脳梗塞患者と健康な成人（未破裂脳動脈瘤を含む）それぞれ 50 人を目標に現在血液サンプルの収集を行なっている。

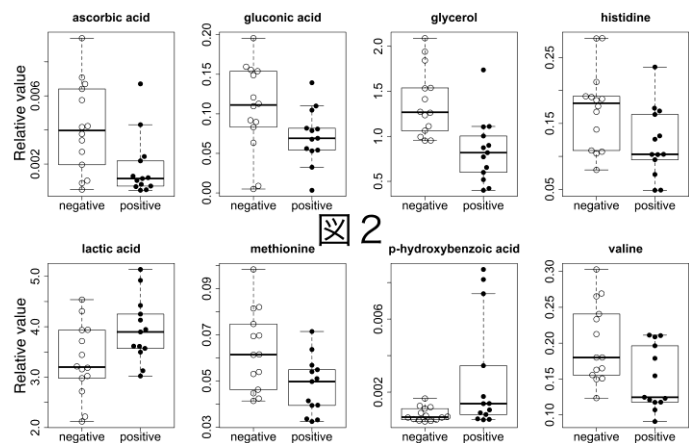
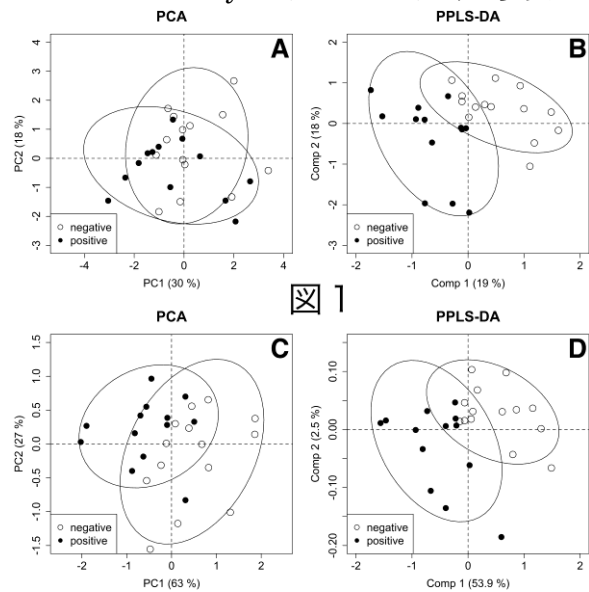
### 3 研究成果

#### I. 頸動脈狭窄症患者における虚血性脳血管イベントの有無による代謝変化

1 年以内の虚血性脳血管イベントのある群とない群との内頸静脈血検体で、主成分分析、Powered Partial Least Square Discriminant Analysis (PPLS-DA) 等の多変量解析を行うと、両群の代謝物は異なる挙動を呈していた (図 1)。

PPLS-DA の loading weight を用いて、これらを裏付ける代謝物を絞り込むと、Ascorbic acid, Gluconic acid, Glycerol, Histidine, Lactic acid, Methionine, p-Hydroxybenzoic acid, Valine 等が変化していた (図 2)。8 つの代謝物による PPLS-DA のスコアを用いた判別モデルは、内頸静脈血を対象とすると感度 92%、特異度 100%で、さらに、末梢血を対象としても、感度 81%、特異度 88%で、両群の判別が可能であった。

1 年以内の TIA ないし脳梗塞は上記の 8 つの代謝物と関連していた。これらの代謝物は脳虚血に対するバイオマーカーの候補となり得ると考えられた。



## II. ラット中大脳動脈閉塞モデルを用いた脳梗塞急性期代謝変化

中大脳動脈閉塞による急性梗塞群と対照群を多因子分析 (multiple factor analysis) を用いて解析すると、両群の代謝物は異なる挙動を呈していた (図3). さらに主成分と高い相関を示す代謝物を選択することにより、両群で特に異なる変化を示す30代謝物が同定された (図4).

現在急性期脳梗塞の脳組織サンプルを採取し、血漿と同時にメタボローム解析を行う実験を遂行して、上記の変化が脳組織の代謝変化に由来するものであることを確認中である。

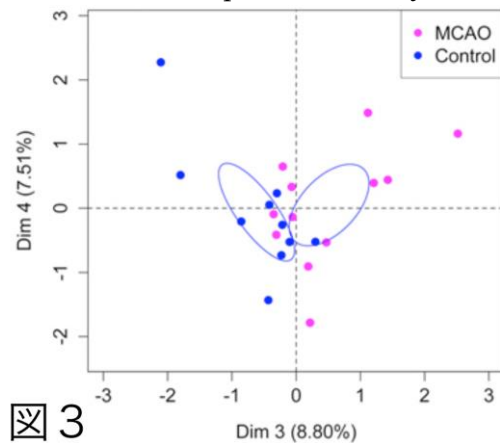


図3

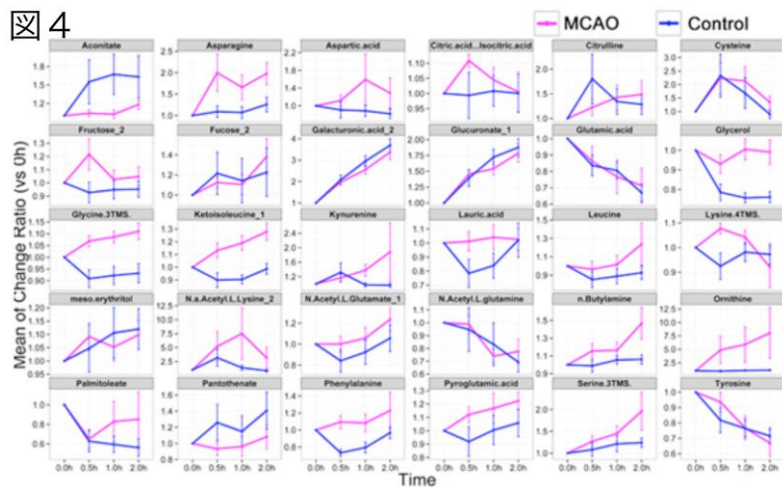


図4

## III. 研究発表

### 論文

Inoue, S., Hosoda, K., Fujita, A., Ohno, Y., Fujii, M., Sugimura, K., and Kohmura, E. Utility of 320- detector row ct for diagnosis and therapeutic strategy for paraclinoid and intracavernous aneurysms. *Acta Neurochir (Wien)* 156, 3 (Mar 2014), 505-14.

(脳梗塞急性期の対照群としての未破裂脳動脈瘤群を用いて行なった本研究の派生的研究の論文)

### 国際学会発表

- (1) Nakai T, Hosoda K, Imahori T, Nishiumi S, Yoshida M, Kohmura E. Metabolomics study for new candidate biomarkers in cerebral ischemia. The 2nd International Conference on Heart & Brain. March 2014 (Paris)
- (2) Imahori T, Hosoda K, Nakai T, Iriono Y, Kohmura E. Metabolomics profiling in cerebral ischemic rats using GC-MS for identification of blood biomarkers associated with acute ischemic stroke. The 2nd International Conference on Heart & Brain. March 2014 (Paris)

#### 国内学会発表

- (1) 中井友昭、細田弘吉、今堀太一郎、甲村英二、西海信、吉田優. メタボロミクス解析による新たな脳虚血バイオマーカー探求. 日本脳神経外科学会第 72 回学術総会 2013 年 10 月 (大阪)
- (2) 中井友昭、細田弘吉、今堀太一郎、甲村英二、西海信、吉田優. メタボロミクス解析を用いた新たな脳虚血バイオマーカーの探求・脳虚血の既往の判別について. Stroke2014 2014 年 3 月 (大阪)
- (3) 今堀太一郎、細田弘吉、中井友昭、入野康宏、甲村英二. 脳虚血ラットの血漿メタボローム解析 (GC-MS) による急性期脳梗塞血中バイオマーカー探索. Stroke2014 2014 年 3 月 (大阪)

#### 4 生活や産業への貢献および波及効果

疾患によって変化する体液中・組織中のメタボロミクスを包括的に解析するプロジェクトは国内外でいまだ非常に少ない。急性期あるいは慢性期の脳虚血に特異的なバイオマーカーを同定することは、血液検査による脳虚血のスクリーニングや急性期脳虚血の簡便かつ迅速な脳虚血の発見につながり、心筋虚血におけるトロポニンのように、その臨床的意義は非常に大きい。また、脳虚血に特異的に変動する代謝産物の同定は、その物質の補充などにより本邦で最多の疾患である脳梗塞に対する新しい治療法につながる可能性がある。治療施行時の塞栓性合併症を術前に予測できるバイオマーカーの発見は、治療法、治療手技、術後管理手法などを症例ごとに最善のものにする、いわばオーダーメイドすることを可能とし、臨床上也大きな意義を有する。本研究はまだその端緒にいたばかりであり、最終的な結果は出ていないが、以上のことを通じて、県民生活の向上に寄与するものと考えられる。