

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08433

研究課題名(和文)ロイシンリッチ 2グリコプロテインの脳梗塞バイオマーカーとしての有用性

研究課題名(英文)Utilities of leucine rich alpha-2 glycoprotein as a biomarker for the progression of cerebral infarction

研究代表者

入江 圭一(Irie, Keiichi)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：50509669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ロイシンリッチ 2グリコプロテイン(LRG1)が脳梗塞病態の進行を予測するマーカーとして有用であることを検討した。脳梗塞モデルマウスを用いて、血液中LRG1濃度を経時的に測定した結果、MCA閉塞24時間後、血中LRG1濃度は有意に増加することが明らかとなった。また、ヒト血液検体を用いて、血中LRG1濃度を測定した結果、脳梗塞患者では健常人と比べて、血中LRG1濃度が有意に高値であった。これらのことから、脳梗塞病態において、血中LRG1濃度が増加することが示唆された。よって、血中LRG1濃度は脳梗塞病態のバイオマーカーの候補となることが期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞の複雑な病態の重症度を反映する脳梗塞バイオマーカーの候補となる分子を探索することで、患者個別の予後に応じた治療計画を提案することが可能となる。本研究は脳梗塞発症時のLRG1の動態を解析した結果、脳梗塞病態において、血中LRG1濃度が増加することを明らかにした。よって、血中LRG1濃度の増加は脳梗塞病態のバイオマーカーの候補となることが期待され、血中LRG1濃度を測定することで、脳梗塞後の適切な治療計画を個別に立てるために役立つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined whether leucine rich 2 glycoprotein (LRG1) is useful as a marker for predicting the progression of cerebral ischemia using cerebral ischemic model mice and human clinical samples. As a result, we found that the plasma LRG1 concentration increases after cerebral ischemia. Thus, it was expected that the plasma LRG1 concentration would be a candidate for a biomarker of for the progression of cerebral infarction.

研究分野：応用薬理学

キーワード：脳梗塞 バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化が進む我が国の脳卒中総患者数(入院・通院を含む)は 134 万人であり (厚生労働省平成 20 年「患者調査の概況」より)、今後、さらなる患者数の増加が予測される。そのため、脳卒中の大部分を占める脳梗塞に対する医療ニーズは高い。脳梗塞後の脳内では、血栓形成、グルタミン酸の過剰遊離による神経毒性、炎症反応、グリア細胞の活性化などを伴う脳のリモデリングなど、複雑な病態が進行する。脳梗塞の複雑な病態の重症度を反映するバイオマーカーが策定されることで、患者個別の予後に応じた治療計画を提案することが可能となる。そのため、脳梗塞バイオマーカーの候補となる分子について、知見を集積することが急務である。

ロイシンリッチ 2 グリコプロテイン (Leucine rich 2 glycoprotein, LRG1) は、ロイシンリッチリピートと呼ばれるドメインを含むタンパク質である。近年、LRG1 は関節リウマチや炎症性腸疾患の活動性を評価するバイオマーカーとして利用されることが期待されている (藤本, 臨床リウマチ 27: 147-9, 2015)。関節リウマチ、炎症性腸疾患は悪化と緩解を繰り返し、その症状は炎症を含む複雑な経路をたどって進行する。そのため、その疾患活動性は評価しづらく、LRG1 の様なバイオマーカーが存在することは治療計画を立てる上で、あるいは治療効果を確認する上で重要である。脳梗塞後の複雑な病態時にも LRG1 の動態は症状を反映することが予想された。しかし、脳梗塞発作後の LRG1 の動態や生理的役割などについてほとんど報告されていない。そのため、脳梗塞亜急性期以降に起こる血管新生を伴う脳内リモデリングや炎症反応がみられる時期に LRG1 がどのような動態を示すのかについて興味深い、明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究は、ロイシンリッチ 2 グリコプロテイン (LRG1) が脳梗塞病態の進行を予測するマーカーとして有用であることを検討した。実験では、マウス脳梗塞モデルを用い、LRG1 の動態を明らかにした後、脳梗塞患者の検体を用い、血中 LRG1 濃度を測定することで、脳梗塞バイオマーカーとしての有用性を検証した。

3. 研究の方法

3-1). 実験動物

実験には、体重 25-30g の ddY 系雄性マウスを用いた。マウスはプラスチックケージの中に、室温 23 ± 2 °C、湿度 $60 \pm 2\%$ および 12 時間の明暗サイクル (7:00 AM 点灯) の環境で飼育した。なお、水および餌 (CE-2; 日本クレア株式会社 東京) は自由に摂取できるようにした。実験動物の取り扱いには福岡大学動物実験委員会 (Experimental animal care and use committee) に準じた。

3-2). 脳梗塞モデルマウスの作製

マウスを麻酔下で仰向けに手術台に固定した。マウスの頸部中央を切開した後、左側総頸動脈と外頸動脈を結紮した。総頸動脈分岐部を切開して、塞栓子を中大脳動脈 (middle cerebral artery: MCA) の起始部に到達するように切開口から挿入した。4 時間経過した後、塞栓子を手前に引き抜くことによって再灌流した。塞栓子は長さ 11 mm の 8-0 ナイロンモノフィラメント (Ethilon; Ethicon, NJ, USA) の先端から 4 mm をシリコン樹脂 (Xantopren; Bayer Dental, Osaka, Japan) でコーティングしたものを使用した。また、梗塞巣の変化を観察するため MCA 閉塞 24 時間後に 2,3,5,-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色を行い、梗塞巣の体積を測定した。

3-3). 脳梗塞モデルマウスの血中 LRG1 濃度の測定

作製した脳梗塞モデルマウスを用いて、MCA 閉塞 6、24、72、168 時間後に下大静脈より血液を採取した。採取した血液サンプルについて、Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) 法を用いて、LRG1 濃度を測定した。

3-4). ヒト脳梗塞検体の LRG1 濃度の測定

福岡大学病院救命救急センターに搬送された脳梗塞患者の血液を採取した (倫理委員会承認済み)。取得した血漿中の LRG1 濃度を LRG1 ELISA kit を用いて測定した。また、対象患者のカルテから、脳梗塞発症後の経過時間、各種検査値と脳卒中重症度評価スケール (National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS)) を抽出した。

4. 研究成果

4-1). 脳梗塞モデルマウスの血中 LRG1 濃度

マウスに MCA 閉塞を処置した 24 時間後に TTC 染色を行い、梗塞巣の体積を測定した。その結果、MCA 閉塞は有意に梗塞巣面積を増加したことが明らかとなった (data not shown)。梗塞巣を形成することが認められた脳梗塞モデルマウスを用いて、MCA 閉塞後 6、24、72、168 時間時点における血液中 LRG1 濃度を評価した。その結果、MCA 閉塞 24 時間後、血中 LRG1 濃度は有意

に増加した(図1)。また、その後、MCA 閉塞 72、168 時間後の血中 LRG1 濃度は減少した(図1)。

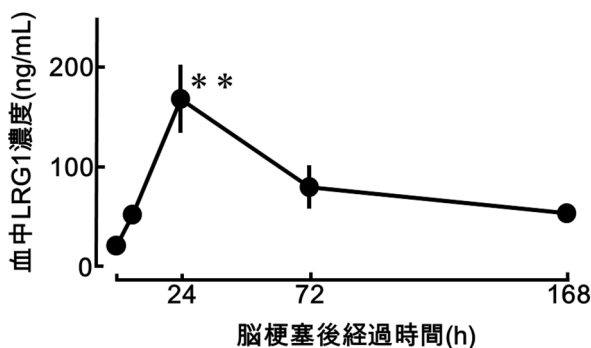


図1. 脳梗塞モデルマウスの血中 LRG1 濃度の経時的変化

Values are expressed as means \pm SEM, ** P < 0.01 vs. sham (Tukey's test).

4-2). ヒト脳梗塞検体の LRG1 濃度

ヒト血液検体(健常人、脳梗塞患者あわせて約 100 例)を用いて、血中 LRG1 濃度を測定した。その結果、脳梗塞患者では健常人と比べて、血中 LRG 濃度が有意に高値であった(図2)。また、脳梗塞発症後の経過日数別に比較したところ、脳梗塞患者間で LRG 濃度に差はみられなかった(図2)。さらに脳梗塞患者の血中 LRG 濃度と入院時 National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS)を評価した結果、強い相関関係を認めないことが示唆された (data not shown)。

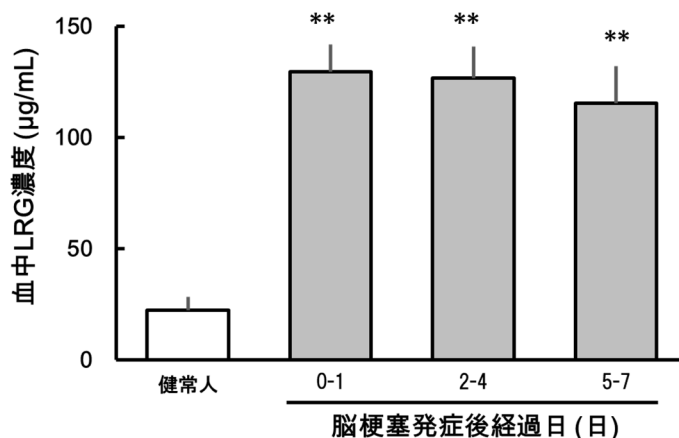


図2. 脳梗塞患者の血中 LRG 濃度の経日的変化

Values are expressed as means \pm SEM, ** P < 0.01 vs. 健常人 (Tukey's test).

本研究成果より、脳梗塞モデルマウスの血中 LRG 1 濃度は、MCA 閉塞処置によって、有意に増加し、その増加は時間が経過すると減少することが明らかとなった。また、ヒト血液検体の血中 LRG 1 濃度について、脳梗塞患者では健常人と比べて、有意に高値であることが明らかとなった。以上のことから、脳梗塞病態において、血中 LRG 1 濃度が増加することが示唆された。よって、血中 LRG 1 濃度の増加は脳梗塞病態のバイオマーカーの候補となることが期待された。一方、脳梗塞患者の血中 LRG1 濃度は、脳卒中重症度評価スケールを直接、反映することは明らかとされなかった。今後、更なる研究成果が得られることで、脳梗塞患者の血中 LRG1 濃度は複数のバイオマーカーと合わせるなど、脳梗塞病態のバイオマーカーの 1 つとして応用されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takafumi Nakano, Yoshihiko Nakamura, Kiyoshi Matsuyama, Keiichi Irie, Mako Yasumura, Yurie Hirata, Motoki Yamasaki, Kanae Misumi, Yuta Yamashita, Takayuki Myose, Koichi Matsuo, Kazunori Sano, Hidetoshi Kamimura, Hiroyasu Ishikura, Takashi Egawa, Kenichi Mishima	4. 巻 119
2. 論文標題 Long-Term Treatment with Thrombomodulin Improves Functional Outcomes after Cerebral Ischemia Even if Administration is Delayed.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Thromb Haemost	6. 最初と最後の頁 467-478
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/s-0038-1677532	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takafumi Nakano, Chisa Nishigami, Keiichi Irie, Yutaka Shigemori, Kazunori Sano, Yuta Yamashita, Takayuki Myose, Koji Tominaga, Koichi Matsuo, Yoshihiko Nakamura, Hiroyasu Ishikura, Hidetoshi Kamimura, Takashi Egawa, Kenichi Mishima	4. 巻 27
2. 論文標題 Goreisan Prevents Brain Edema after Cerebral Ischemic Stroke by Inhibiting Aquaporin 4 Upregulation in Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Stroke Cerebrovasc Dis	6. 最初と最後の頁 758-763
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.10.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 森本 麻友香, 中野 貴文, 岡野 志のぶ, 神崎 愛, 入江 圭一, 山下 郁太, 佐野 和憲, 江川 孝, 三島 健一
2. 発表標題 4)遊離ヘモグロビン吸着剤ハプトグロビンの脳梗塞慢性期治療薬への応用
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野 貴文, 岡野 志のぶ, 入江 圭一, 森本 麻友香, 山下 郁太, 佐藤 朝光, 仲村 佳彦, 佐野 和憲, 江川 孝, 三島 健一
2. 発表標題 5)脳梗塞後の脳内炎症反応に対するアンチトロンピンIIIの治療効果
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神崎 愛, 中野 貴文, 山崎 元貴, 岡野 志のぶ, 入江 圭一, 山下 郁太, 明瀬 孝之, 西上 知佐, 佐藤 朝光, 三島 健司, 松尾 宏一, 佐野 和憲, 三島 健一
2. 発表標題 脳梗塞マウスにおけるロイシンリッチ 2 グリコプロテインの動態
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takafumi Nakano, Keiichi Irie, Yuta Yamashita, Takayuki Myose, Kazunori Sano, Yoshihiko Nakamura, Tomomitsu Satho, Mamiko Kai, Koji Tominaga, Hidetoshi Kamimura, Kenichi Mishima, Takashi Egawa
2. 発表標題 Effect of delayed treatment with ADAMTS13 on cerebral ischemic injury compared with tPAs
3. 学会等名 Neuroscience 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoshihiko Nakamura, Takafumi Nakano, Keiichi Irie, Kazunori Sano, Junichi Tanaka, Yuta Yamashita, Tomomitsu Satho, Koichi Matsuo, Masayuki Fujioka, Hiroyasu Ishikura, Kenichi Mishima
2. 発表標題 Recombinant human soluble thrombomodulin ameliorates cerebral ischemic injury through a high-mobility group box 1 inhibitory mechanism without hemorrhagic complications in mice
3. 学会等名 Neuroscience 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	三島 健一 (Mishima Kenichi) (00320309)	福岡大学・薬学部・教授 (37111)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	仲村 佳彦 (Nakamura Yoshihiko) (20632201)	福岡大学・医学部・講師 (37111)	
研究分担者	佐野 和憲 (Sano Kazunori) (50534343)	福岡大学・薬学部・准教授 (37111)	
研究分担者	佐藤 朝光 (Satho Tomomitsu) (90369025)	福岡大学・薬学部・准教授 (37111)	
研究分担者	中野 貴文 (Nakano Takafumi) (40804539)	福岡大学・薬学部・助教 (37111)	