

令和 2 年 5 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17907

研究課題名(和文)悪性腫瘍合併脳梗塞のバイオマーカー、マイクロRNAによる革新的アプローチの探索

研究課題名(英文)Biological markers of cancer-associated stroke

研究代表者

柁津 智久 (Nezu, Tomohisa)

広島大学・医系科学研究科(医)・助教

研究者番号：10457260

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文):悪性腫瘍関連脳梗塞は血液凝固異常を基盤とし、短期的に再発を繰り返し、治療に難渋することが多い。多施設前向き観察研究から、D-dimerが高いこと、多血管領域支配の脳梗塞であること、ムチン産生腫瘍のバイオマーカーCA-125が悪性腫瘍関連脳梗塞に関連することが示唆された。またCA-125高値は入院中の脳梗塞再発や死亡に関連していた。マイクロRNA探索においてはmir-671-5Pが候補となる可能性が示唆され、その有効性を検証していく予定である。今後、悪性腫瘍患者を対象とした血栓症発症、出血合併症のリスクの層別化や新たな治療法開発に本研究成果を応用したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性腫瘍関連脳梗塞は血液凝固異常を背景とした血栓症であり短期的に再発を繰り返し、治療に難渋することが多い。悪性腫瘍患者の深部静脈血栓症の治療には近年直接作用型経口抗凝固薬(DOAC)の有効性が示唆されつつあるが、悪性腫瘍患者がDOAC内服中に脳梗塞を起こす報告も散見され、DOACが悪性腫瘍関連脳梗塞に有効かは明らかでない。現状ではヘパリン皮下注を導入する症例が多いが、精神的・身体的苦痛を伴い障壁は大きい。悪性腫瘍患者における血栓症の一次予防、二次予防のリスク管理と最適な治療法確立が求められている。

研究成果の概要(英文):Cancer-associated ischemic stroke are caused by a hypercoagulation disorder related to malignant tumors. Our prospective cohort study for acute ischemic stroke patients with cancer have revealed that younger age, increased quartile of CA-125 levels, increased D-dimer levels, and infarcts in multiple vascular lesions were independently associated with the cancer-associated stroke. The cancer-associated stroke patients with poor outcome (mortality or recurrence of stroke during hospital) had increased CA-125 levels compared to those without. Hence, increased CA-125 levels were useful for diagnosis of cancer-associated stroke and associated with its poor clinical outcomes. The CA-125 is a marker used to monitor patients with ovarian cancer, but could be also a mucinous serum marker expressed in patients with various types of cancer. Therefore, it might reflect to the condition of cancer-associated hypercoagulation caused to ischemic stroke.

研究分野：脳卒中医学、脳神経内科学

キーワード：悪性腫瘍関連脳梗塞 バイオマーカー トルーソー症候群 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞の20-40%は原因不明の脳梗塞であり、その中に悪性腫瘍関連脳梗塞が少なからず存在する。悪性腫瘍関連脳梗塞患者において、進行癌でD-dimerが有意に上昇することや(文献1)、原因不明脳梗塞患者のD-dimerが脳梗塞分布パターンに関連し、脳梗塞分布パターンが予後に関連すること、原因不明の脳梗塞患者の予後に潜在的悪性腫瘍の影響が示唆されることを以前に報告した(文献2)。

悪性腫瘍に関連した脳梗塞は短期的再発が高率に起こり、患者の日常生活レベルを著しく低下させる。しかしながら、既存の治療、経口抗凝固薬であるワルファリンは無効であることが多い。近年、深部静脈血栓症の治療としてDirect oral anticoagulants(DOAC)が使用されるが、担癌患者の血栓症に対するDOACの有効性は不確かである。悪性腫瘍関連脳梗塞の病態は非細菌性血栓性心内膜炎によるもの、ムチン産生など腫瘍自体による血液凝固能の活性化、下肢静脈血栓症に伴う奇異性脳塞栓症など多岐にわたるものの、その病態や背景となる癌の種類に応じたアプローチは殆ど行われていないのも問題である。担癌患者の原因不明脳梗塞にムチン産生腫瘍のマーカーであるCA125が高値であったことが報告されている(文献3)

マイクロRNAは遺伝子発現を転写後レベルで調整するノンコーディングRNAであり、癌診断の血液バイオマーカーとして期待される一方で、生体内に多面的に作用しており病態を把握するのもにも有効である。研究開始当初において、悪性腫瘍関連脳梗塞の発症、凝固亢進状態の反映、脳梗塞再発に強く関連するマイクロRNAは不明である。マイクロRNAは疾患バイオマーカーのみならず、疾患特異的に発現亢進したマイクロRNAの抑制、もしくは疾患特異的に発現低下したマイクロRNAを補充することによって治療薬開発にも応用しうる可能性がある。悪性腫瘍関連脳梗塞患者に関連するマイクロRNAを同定することで、既存の抗血栓療法に加え、新たな治療薬開発にも応用できるのでは、という着想に至った。

2. 研究の目的

悪性腫瘍関連脳梗塞の病態や予後を反映する血液バイオマーカーにD-dimerやCA125を候補とし、悪性腫瘍関連脳梗塞の臨床的特徴を単施設、ならびに多施設共同研究で調査し、D-dimerやCA125の意義を検証する。また悪性腫瘍関連脳梗塞患者における現状の課題を抽出する。同意が得られた症例においては血清を保存して悪性腫瘍関連脳梗塞患者とその他の病型の脳梗塞患者(ラクナ梗塞、アテローム血栓性、心原性)、健康対象者と比較して特異的なマイクロRNA発現を網羅的に探索し、その臨床的意義を検証する。

その他、悪性腫瘍は低栄養状態が影響していることが示唆され、栄養状態と脳卒中に関する疫学研究も行い、栄養状態と脳卒中予後の関連を明らかにする。

3. 研究の方法

以下の3点の計画を立案し施行した。

1) 悪性腫瘍関連脳梗塞の予後に関連する因子の検討(多施設共同研究)

悪性腫瘍関連脳梗塞における当院の現状と課題を症例報告レベルで抽出する。さらに、悪性腫瘍合併脳梗塞患者を対象としたデータベースを作成し、多施設共同で運用する。悪性腫瘍は活動性・非活動性にわけ、前者は脳梗塞発症6か月以内に診断、もしくは腫瘍に対して治療中、再発あるいは転移のある腫瘍と定義され、原発性脳腫瘍は除外する。脳梗塞の病型や悪性腫瘍の活動性の有無、組織型、D-dimer、CEA、CA19-9、CA125、脳梗塞分布パターンの関連性を横断的に検討し、脳梗塞発症1年以内の脳卒中再発、死亡を縦断的に調査する。

2) 悪性腫瘍合併脳梗塞の疾患特異的マイクロ RNA の検討

広島大学病院脳神経内科外来通院中、もしくは入院中の脳血管障害患者を対象とし、悪性腫瘍の有無、脳梗塞病型を調査し、マイクロ RNA 用の血清を確保し、凍結保存する。悪性腫瘍関連脳梗塞と一般的な脳梗塞（ラクナ梗塞、アテローム血栓性、心原生）とのマイクロ RNA 発現の違いをマイクロアレイもしくは次世代シーケンサーで比較検証する。悪性腫瘍関連脳梗塞に特異的なマイクロ RNA を同定後、RT-PCR 法によって定量的に解析をおこない、血液凝固異常との関連、予後との関連を調査する。

3) 脳卒中患者における栄養状態と予後についての検討

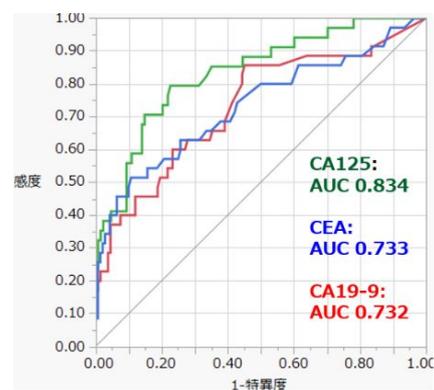
悪性腫瘍患者の低栄養状態は予後に関連することが知られており、リンパ球、アルブミン、コレステロール値から栄養状態の重症度を評価する Controlling Nutritional Status (CONUT) score の有効性が報告されている。脳卒中患者における CONUT score の意義は報告なく、また脳卒中病型での検討も少ない。単施設ならびに関連施設で脳卒中患者における CONUT score で評価した栄養状態が予後と関連するかを検討する。

4. 研究成果

1) 悪性腫瘍関連脳梗塞の予後に関連する因子の検討（多施設共同研究）

2011 年～2017 年の広島大学病院脳神経内科に入院した急性期脳梗塞患者 328 例中、26 例（7.9%）が悪性腫瘍関連脳梗塞であった。26 例中 5 例が抗凝固療法中（2 例ワルファリン、3 例 DOAC）の発症であり、また 26 例中 11 例が脳梗塞発症後、積極的治療から緩和治療へ治療方針が変更になった（文献 4）。

次に研究協力施設 3 施設を含む多施設でデータベースを作成し、悪性腫瘍関連脳梗塞に関連する因子を検討した。悪性腫瘍を有する急性期脳梗塞患者 221 例（活動性 101 例、非活動性 110 例）を調査した。活動性群は非活動性群に比べて若年で、深部静脈血栓症既往が多く、その他の病型（TOAST 分類）や多血管領域の脳梗塞部位の割合が多く、D-dimer, CEA, CA19-9, CA125 はいずれも高値であった。全体で 38 例が悪性腫瘍関連脳梗塞と診断され、多変量解析では若年（OR 0.93, 95%CI 0.88-0.98）、D-dimer 高値（OR 1.05, 95%CI 1.00-1.11）、CA125 高値（OR 1.85, 95%CI 1.06-3.39）、多血管領域の脳梗塞（OR 3.91, 95%CI 1.33-12.30）が関連した。悪性腫瘍関連脳梗塞を予測する ROC 曲線の AUC は各腫瘍マーカーの中で CA125 がもっとも高値であった（右図）。悪性腫瘍関連脳梗塞 38 例中、3 例が入院中脳梗塞再発、7 例が死亡した。短期予後不良の症例はそれ以外と比べて CA125 が有意に高値であったが、CEA, CA19-9 は差がなかった。



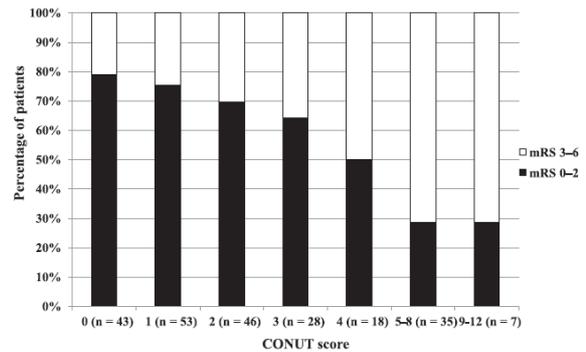
2) 悪性腫瘍合併脳梗塞の疾患特異的マイクロ RNA の検討

活動性悪性腫瘍（肺腺癌）に関連する脳梗塞 5 例（M 群）とラクナ梗塞 4 例（LI 群）、心原性脳塞栓症 5 例（CE 群）、無症候性頸動脈狭窄症患者 5 例（C 群）の RNA を抽出し、次世代シーケンサーによって発現しているマイクロ RNA を網羅的に探索した。各群のマイクロ RNA 発現の平均値を求め、M/LI、M/CE、M/C で発現比が高く、共通しているマイクロ RNA を調査した。mir-671-5P と mir-3656-3P がいずれにおいても発現比が高く、今後これらのマイクロ RNA の臨床的

意義を検討していく予定である。なお、本検討では当初は各群ともに 20 例程度の血清保存を予定していたが、活動性悪性腫瘍関連脳梗塞患者の大半が進行癌であり、治療方針が緩和医療へと移行する症例も少なからずいた。そうした臨床的背景を加味すると、活動性悪性腫瘍関連脳梗塞の血清保存においては患者、あるいは患者家族の研究協力の説明がしがたく、同意が非常に得られにくい実態が明らかとなった。

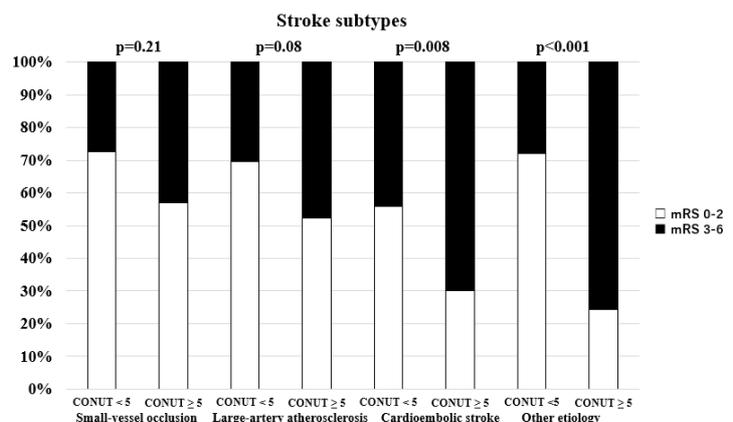
3) 脳卒中患者における栄養状態と予後についての検討

急性期脳梗塞患者において栄養状態の指標である CONUT score が転帰と関連するか検討した。急性期脳梗塞 230 例において、CONUT score が高値になるにつれて 3 か月後の転帰良好 (mRS0-2) の割合は徐々に低下した(右図)。年齢や入院時の重症度で補正後も、低栄養状態 (CONUT score 5 点以上) は独立して転帰不良に関連した (OR 4.15, 95%CI 1.52-11.67, P=0.005) (文献 5)。



次に、歯の欠損状態と栄養状態、脳梗塞転帰の関連について検討した。8 本以上の歯の欠損 (OR 3.93, 95%CI 1.31-11.8, P=0.015) CONUT score 高値 (OR 1.33, 95%CI 1.02-1.74, P=0.036) は患者背景因子で補正後も独立して転帰不良に関連した (文献 6)。これらの結果をうけて、脳梗塞患者において栄養状態改善や口腔内環境改善への積極的な介入が転帰改善に寄与するか今後の検証が必要である。

さらに、研究協力施設とともに、栄養状態と脳梗塞病型の関連について症例数を増やして検討した。急性期脳梗塞患者 1518 例を対象に、TOAST 分類での病型別に CONUT score と脳梗塞転帰不良との関連を検討してみると悪性腫瘍関連脳梗塞が含まれる「その他の病型 (Other etiology)」において、低栄養状態 (CONUT 5 点以上) と脳梗塞転帰不良の関連が顕著であることが明らかとなった (右図)



5. 文献

- 1) Kono T, et al. Geriatr Gerontol Int, 2012.
- 2) Nezu T, et al. Stroke, 2016.
- 3) Jovin TG, et al. Neurology, 2005.
- 4) Naito H, Nezu T, et al. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2018.
- 5) Naito H, Nezu T, et al. Nutrition, 2018.
- 6) Shiga Y, Nezu T, et al. Nutrition, 2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Naito H, Nezu T, Hosomi N, Aoki S, Ueno H, Ochi K, Maruyama H	4. 巻 27
2. 論文標題 Antithrombotic Therapy Strategy for Cancer-Associated Ischemic Stroke: A Case Series of 26 Patients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases	6. 最初と最後の頁 e206 ~ e211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.04.021	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 Naito H, Nezu T, Hosomi N, Aoki S, Kinoshita N, Kuga J, Shimomura R, Araki M, Ueno H, Ochi K, Maruyama H	4. 巻 -
2. 論文標題 Controlling nutritional status score for predicting 3-mo functional outcome in acute ischemic stroke.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nutrition	6. 最初と最後の頁 55-56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nut.2018.02.025.	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 Hara N, Nezu T, Kobatake K, Morino H, Kawakami H, Maruyama H.	4. 巻 15
2. 論文標題 Treatment of intractable resting tremor of spinocerebellar ataxia 42 with zonisamide.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of neurological science	6. 最初と最後の頁 119-120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2018.11.013.	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 Shimomura Ryo, Nezu Tomohisa, Hosomi Naohisa, Aoki Shiro, Sugimoto Takamichi, Kinoshita Naoto, Araki Mutsuko, Takahashi Tetsuya, Maruyama Hirofumi, Matsumoto Masayasu	4. 巻 25
2. 論文標題 Alpha-2-macroglobulin as a Promising Biological Marker of Endothelial Function	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Atheroscler Thromb	6. 最初と最後の頁 350-358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.41335	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 Nezu T, Kitano T, Kubo S, Uemura J, Yamashita S, Iwanaga T, Inoue T, Hosomi N, Maruyama H, Matsumoto M, Kimura K, Yagita Y.	4. 巻 265
2. 論文標題 Impact of D-dimer levels for short-term or long-term outcomes in cryptogenic stroke patients.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neurol	6. 最初と最後の頁 628-636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00415-018-8742.	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7件(うち招待講演 2件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 祢津 智久、細見 直永、葛目 大輔、内藤 裕之、青木 志郎、金星 匡人、森本 優子、志賀 裕二、木下 直人、上野 弘貴、丸山 博文
2. 発表標題 延髄吻側腹外側野への血管圧迫は脳梗塞患者の亜急性期血圧変動に影響する
3. 学会等名 第44回日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 祢津 智久、細見 直永
2. 発表標題 脳小血管病のバイオマーカー
3. 学会等名 第50回日本動脈硬化学会総会・学術集会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 祢津智久、北野貴也、久保智司、城本高志、植村順一、和田裕子、細見直永、丸山博文、八木田佳樹
2. 発表標題 原因不明脳梗塞患者における右左シャント、D-dimerと再発の検討
3. 学会等名 第42回日本脳卒中学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nezu T, Hosomi N, Maruyama H, Matsumoto M
2. 発表標題 Overview: Carotid intima-media thickness
3. 学会等名 第49回日本動脈硬化学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nezu T, Naka H, Hosomi N, Takamatsu K, Nomura E, Kitamura T, Torii T, Oshita T, Nakamori M, Imamura E, shimomura R, Aoki S, Maruyama H, Matsumoto M.
2. 発表標題 Microbleeds evaluation study for prevention of brain hemorrhage in ischemic stroke (MB-evidence): pilot analysis for multicenter longitudinal study.
3. 学会等名 XXIII World Congress of Neurology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 祢津智久、細見直永、下村怜、青木志郎、高橋哲也、林 奉権、松本昌泰、丸山博文
2. 発表標題 血清 2マクログロブリンと炎症性サイトカインの関連：脳心血管リスク因子保有例での検討
3. 学会等名 第60回日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Naito H, Nezu T, Hosomi N, Aoki S, Kinoshita N, Shimomura R, Araki M, Ueno H, Ochi K, Maruyama H
2. 発表標題 Controlling Nutritional Status Score Predicts 3-Month Functional Outcome in Patients With Acute Ischemic Stroke
3. 学会等名 International Stroke Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----