

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16559

研究課題名(和文)重症頭部外傷の脳代謝についてメタボロミクス分析を用いた病態解析と予後予測の検討

研究課題名(英文)Metabolomics Study for New Candidate Biomarkers in Severe Brain Injury

研究代表者

中井 友昭(Nakai, Tomoaki)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：60596089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生体内代謝物を網羅的に検出するメタボロミクス分析技術を用い、重症頭部外傷急性期における脳脊髄液および末梢血液中での経時的变化を解析し、神経学的予後と関連し得る物質を探索した。結果、髄液や血液内で特徴的な経時的变化を呈する物質を複数同定し得た。これらは、外傷に伴う出血や挫傷から直接的に由来する可能性とともに、生体内での様々な代謝を反映した応答産物とも考えられ、頭部外傷急性期の変化を鋭敏に捉えるマーカーとしての役割が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床検体を利用し、客観的に、簡便かつ鋭敏に頭蓋内圧の上昇や予後の予測を出来る指標が得られれば、手術などの積極的治療介入の要否やそのタイミング、多発外傷時の加療優先順位の判断、長期的予後も踏まえてリハビリや社会復帰プログラムの関わり方など、急性期治療の段階のみならず、福祉介入の方針決定においても非常に有意義になると考えられる。

また、神経損傷に特異的な代謝経路の特定・考察は、脳虚血をはじめとする他の病態においても、新たな脳保護治療の開発の一助となり得ることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We analyzed chronological change of the cerebrospinal fluid and the peripheral blood in acute severe head injury patients using metabolomics study which detected comprehensive metabolites, and searched for the new biomarkers related to neurological prognosis.

As a result, we could identify plural candidates. Those are regarded as the direct products resulted from brain contusion and/or hemorrhage and as the reactants reflected in vivo various metabolism.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：brain injury metabolomics biomarker

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

重症頭部外傷の神経学的ならびに生命予後は未だ不良である。治療に際しては、受傷時の直接力学的損傷への対応および合併する出血や脳浮腫などによる二次損傷の防止が主体となるため、頭蓋内圧 (Intracranial Pressure; ICP) 亢進などの臨床病態の推移や神経学的予後を早期に把握することが極めて重要であるが、その病態は多因子的であり、現状では重症度や予後を特異的かつ簡便に頭すバイオマーカーは皆無といえる。文献上、凝固・線溶系あるいは炎症関連マーカーと、予後・転帰との関連を示唆する報告<sup>1,2)</sup>は散見されるが、多臓器損傷の合併をはじめその複雑な病態から、頭部外傷に特異的な予測因子とは言えない。結果、現状での画像検査や ICP、臨床徴候に沿った治療では、外傷後の二次損傷防止が遅きに失する例も少なからず存在する。

これらを克服する活路として、臨床検体を利用し、客観的に、簡便かつ鋭敏に ICP 上昇や予後の予測を出来る指標が得られれば、手術などの積極的治療介入の要否やそのタイミング、多発外傷時の加療優先順位の判断、長期的予後も踏まえたりハビリや社会復帰プログラムの関わり方など、急性期治療の段階のみならず、福祉介入の方針決定においても非常に有意義になると考えられる。また、神経損傷に特異的な代謝経路の考察は、脳虚血をはじめとする他の病態においても、新たな脳保護治療の開発の一助となり得ることが期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では、重症頭部外傷急性期の脳脊髄液を検体として、生体内代謝物を網羅的に検出するメタボロミクス分析の技術を用い、脳の直接的かつ即時的・経時的な代謝変化を捉えることで、既知とは異なる次元での予後予測マーカーの探索を試みる。さらに末梢血液でも同分析を行い、髄液代謝と比較し、理論的裏付けにて重症頭部外傷の病態把握を行うとともに、少量の血液から外傷患者の神経機能・生命予後を予測し得る新たな因子候補物質の探索を試みる。

### 3. 研究の方法

(1) 対象：当施設および関連施設に搬送された重症頭部外傷患者 (GCS; Glasgow Coma Scale 8 点以下) を対象とした。受傷後 24 時間以内の死亡例、合併する多臓器外傷による死亡が明らかな場合、本研究に対して対象者本人の家人あるいは親権者・後見人による同意が得られない場合などは対象から除外とした。

(2) 検体収集：原則、搬入時から、受傷 3 時間、6 時間、12 時間、24 時間、48 時間、1 週間において脳脊髄液を採取し、遠心分離の上、上清を分析まで -80℃ にて保存した。なお、当該施設においては、ICP に基づいた治療介入・方針決定のため、原則として、重症例では救急外来搬入時に、穿頭にて ICP センサーおよび髄液排除カテーテルを留置しており、脳脊髄液の採取に際し、容易かつ安全に、また治療上廃棄すべき材料を検体とした。同じタイムポイントにて、一般採血とともに末梢血液も検体として、その血漿を分析まで -80℃ で保存した。各検体とも、25  $\mu$ l を下記分析に供した。

(3) 検体分析：検体集積後、神戸大学大学院医学研究科質量分析総合センターにおいて、質量分析を応用し、Gas Chromatography - Mass spectrometry (GC-MS) にて、主に分子量 3000Da 以下の低分子水溶性代謝物 (糖、アミノ酸、有機酸、ペプチド、脂肪酸など) を網羅的に検出し、内部標準物質 Sinapinic Acid (0.5mg/ml, 10  $\mu$ l) との比による半定量化を行った。

(4) 解析：得られた多次元のデータをもとに、オンライン解析ソフト MetaboAnalyst 4.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/home.xhtml>) により、主成分分析 (Principal Component Analysis; PCA)、PLSDA (Partial Least Square Discriminant Analysis; 部分的最小二乗法判別分析)、sPLSDA (sparse PLSDA)、oPLSDA (orthogonal PLSDA) などの多変量解析を行い、末梢血ならびに髄液において、経時的変化に富む物質やその挙動、正常髄液との比較、神経学的予後 (第 30 病日時点での転帰 (Glasgow Outcome Scale; GOS)) との関連などについて考察した。

### 4. 研究成果

(1) 蓄積症例ならびに検体分析：21 例の対象症例を経験した。内訳は、平均年齢 58.2 歳 (22-87 歳) 男性 14 例、女性 7 例、受傷機転として交通外傷 10 例、転倒・転落 10 例、重板落下 1 例で、来院時 GCS 3-8 (平均 5.81) であった。30 日後の転帰 (GOS) は、1. Dead (D) 2 例、2. Vegetative State (VS) 6 例、3. Severely Disabled (SD) 8 例、4. Moderately Disabled (MD) 5 例、5. Good Recovery (GR) なし、であった。

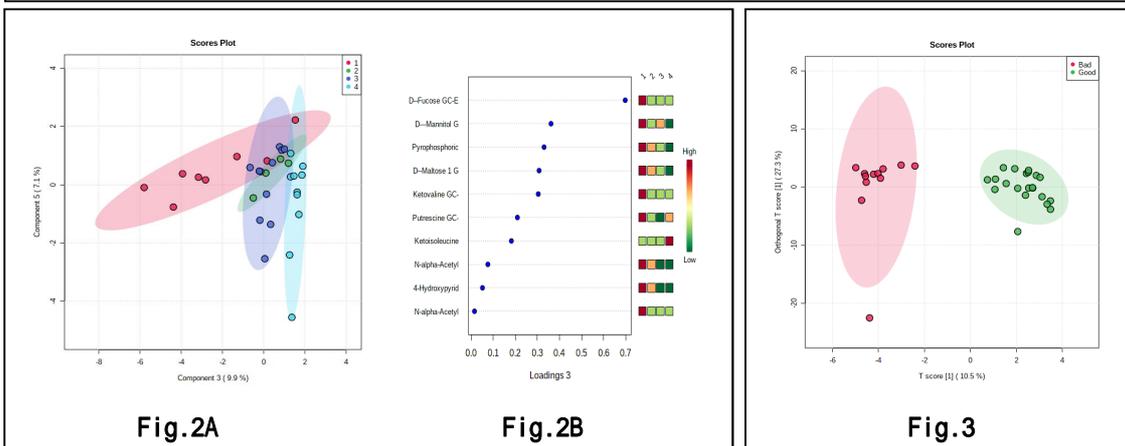
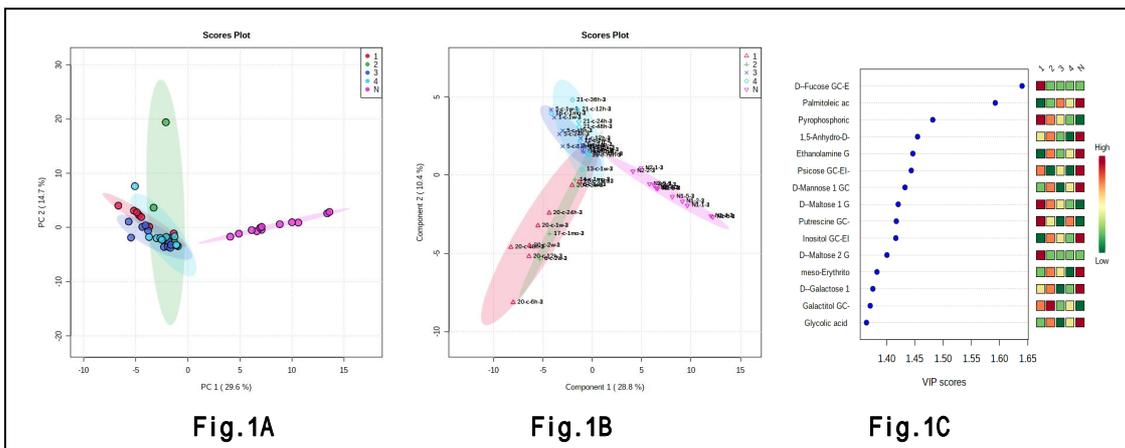
各タイムポイントでの検体を GC-MS にて分析すると、髄液・末梢血液いずれにおいても、約 100 種類の代謝物質が同定・半定量化された。なお、健常人 (2 検体) における髄液について、GC-MS にて同様に代謝物を網羅的に分析すると、やはり複数の物質が同定・半定量化されたが、外傷症例で得られる多彩な検出とは異なり、わずか 31 種のみにとどまった。

(2) 髄液に関する分析：対象症例中、11 例で髄液の経時的検体採取・分析を完遂した。

正常検体も含め、髄液のみに基づき主成分分析を行うと、第 1 主成分 (Contribution 29.6%) で、正常髄液と外傷群でのクラス分けが明瞭であった (Fig. 1A)。この成分に強く寄与する代謝物を、Loading Map ないし Loading Score にて抽出していくと、Ethanolamine、Psicose、Inositol、D-Mannose、meso-Erythritol、D-Galactose、1,5-Anhydro-D-glucitol、Glycolic acid、Palmitoleic acid、D-Allose、D-Galactose、D-Arabitol、D-Lyxose、L-(-)-Sorbitol、Methylsuccinic acid、L-(+)-Lactic acid、Urea、n-Propylamine、Glycerol、Hydroxybutyric

acidなどが挙げられた。

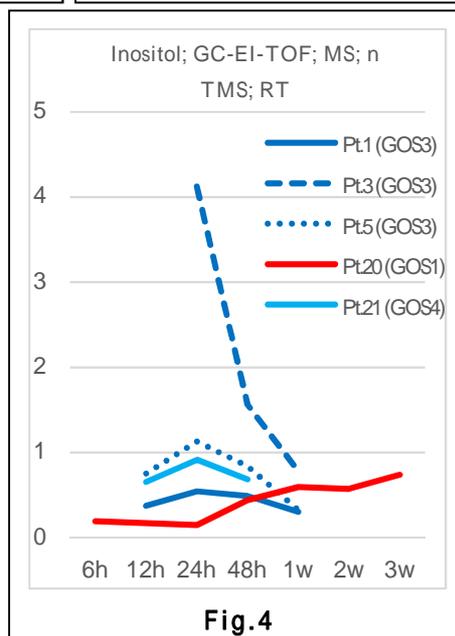
さらに、PLSDA解析では、第1軸(Contribution 28.8%)で、正常髄液と外傷群でのクラス分けが明瞭であるとともに、第2軸(Contribution 10.4%)において、30日後の神経学的転帰 GOS 1+2群および3+4群でのクラスターが分離される傾向にあった(Fig.1B)。この第2軸に寄与する物質をVIP(variable importance in projection) scoreにて列挙すると、D-(+)-Fucose、Palmitoleic acid、Pyrophosphoric acid、1,5-Anhydro-D-glucitol、Ethanolamine、Psicose、D-Mannose、D-(+)-Maltose、Putrescine、Inositolなどが上位に挙げられた(Fig.1C)。また、個別の検体採取タイムポイントに関し、第2軸にてばらつきが反映される傾向にあった(Fig.1B)。



詳細解析として、正常髄液を除いた上で、外傷症例での GOS 転帰ごとに同様に多変量解析を行うと、sPLSDAにより第3軸(Contribution 9.9%)で GOS の細分化が見られる傾向を得た(Fig.2A)。これに寄与する物質を、Loading Scoreにて列挙すると、D-(+)-Fucose、D-(-)-Mannitol、Pyrophosphoric acid、D-(+)-Maltose、Ketoalaine、Putrescine、Ketoisoleucine、N-alpha-Acetyl-L-ornithineなどが挙げられた(Fig.2B)。これらは、そのほとんどが、正常髄液では検出されないものであった。さらに、第5軸(Contribution 7.1%)により、同様に、経時的な変化に富む物質を Loading 結果から抽出すると、D-(+)-Allose、Propylene glycol、L-Leucine、L-(-)-Threonine、L-Serine、Pyruvic acid、L-Valineなどが挙げられた。

30日後転帰 GOS1+2を予後不良、GOS3+4を転帰良好として、oPLSDAによる2群判別を行うと(Fig.3)、Pyrophosphoric acid、D-(+)-Fucose、D-(+)-Maltose、Galactitol、Putrescine、D-(+)-Galactose、D-(-)-Mannitol、N-alpha-Acetyl-L-ornithine、Cadaverine、2,3-Bisphospho-glyceric acid、Palmitoleic acid、D-Glutamine、D-(+)-Allose、L-Tryptophan、3-Hydroxyisovaleric acid、L-2-Aminobutyric acid、Ketoisoleucine、L-Cysteineなどが、判別指標として有意であった。

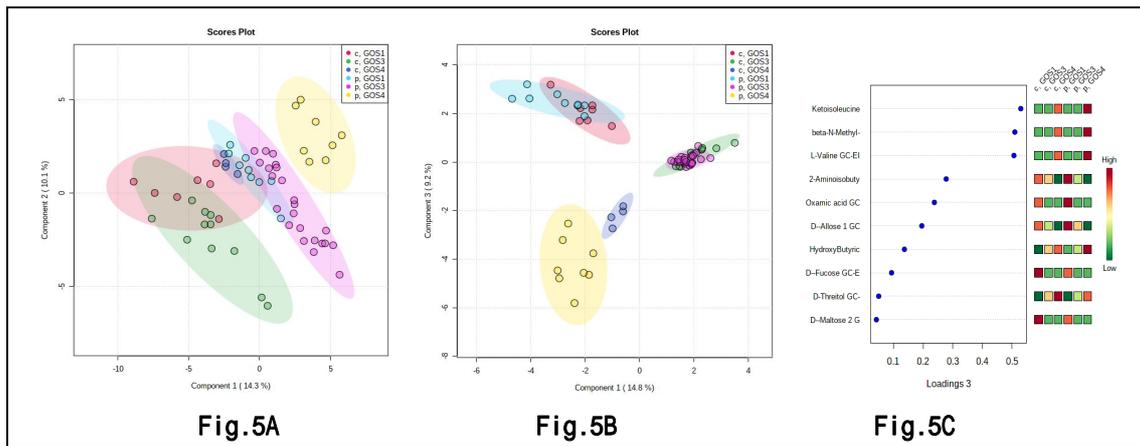
上記の種々の代謝物が、重症頭部外傷急性期の髄液内において、経時変化が大きく、かつ、神経学的予後と相関し得る物質の候補として挙げられた。その挙動を、代謝物ごとに個別に追跡してみると、経時的に上昇、あるいは減少、一旦は上昇/減少もその後に減少/上昇に転じるなど、様々なパターンがみられた。代表例として、Inositolでは、GOS3,4の比較的予後良好な転機に



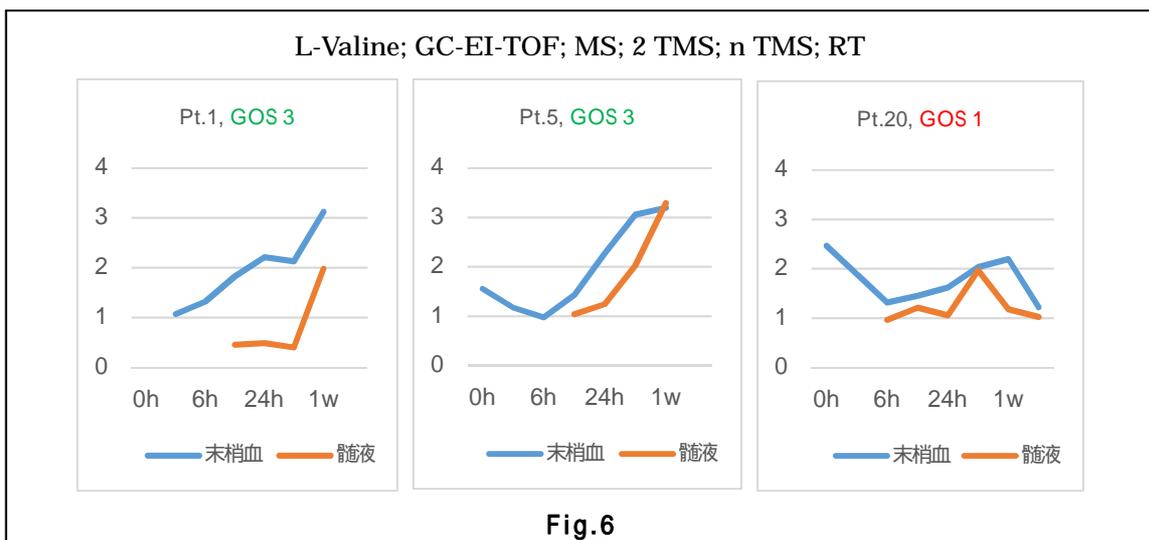
至る症例では経時的に減少する傾向にあったが、一方で、死亡転帰に至った GOS1 症例 (Pt.20) では経時的に上昇を呈するなど、予後により対照的な変化を示していた (Fig.4)。

(3) 髄液および末梢血液に関する分析：血液および髄液を同時採取し得た症例で、同様にして多変量解析を行った。PLSDA にて、第 1 軸 (Contribution 14.3%) および第 2 軸 (Contribution 10.1%) を用いて、髄液ならびに末梢血ごとに、概ね GOS に応じたクラスター分けが得られた (Fig.5A)。第 1 軸に係る VIP score にて関連物質を探ると、L-Isoleucine、L-Ornithine、L-(+)-Lactic acid、L-(-)-Sorbitose、L-Tryptophan、Psicose、meso-Erythritol、D-Lyxose、L-Glutamic acid、L-(+)-Lysine、L-Valine、D-(+)-Fucose、L-Tyrosine などが挙げられた。

さらに、sPLSDA では、第 1 軸 (Contribution 14.8%) と第 3 軸 (Contribution 9.2%) の組み合わせにて、髄液・末梢血が共通して、GOS ごとに明瞭に区別された (Fig.5B)。主に第 3 軸の Loading を用いて、その判別に関わる代謝物を並べると、Ketoisoleucine、beta-N-Methyl-amino-L-alanine、L-Valine などが挙げられた (Fig.5C)。



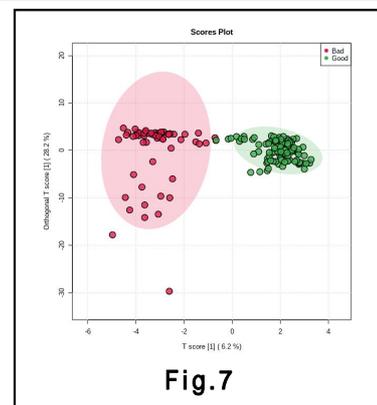
これらが、髄液と末梢血で経時変化が似通う物質と考えられ、その挙動を個別に追跡してみると、L-Valine に代表されるように、実際に髄液および末梢血での経時変化に相関がみられた。また、GOS3 と比較的予後良好な転帰に至る症例 (Pt.1,5 など) では経時的に上昇する傾向にあったが、反対に、死亡転帰に至った GOS1 症例 (Pt.20) では減少に転じるなど、予後により対照的な変化を示していた。 (Fig.6)



(4) 末梢血液に関する分析：対象 21 例すべてについて、同様に多変量解析を行った。

受傷 30 日後の転帰 (GOS) について、oPLSDA による 2 群判別の統計分析手法を用い (Fig.7) GOS 1+2 の予後不良群と、GOS3+4 の予後良好群との判別に関わる代謝物をリストアップすると、Elaidic acid、Cadaverine、D-(+)-Galactose、2-Aminoisobutyric acid、L-Serine、Inositol、D-Glutamine、Palmitoleic acid などが挙げられた。

なお、GOS3 を予後不良と解釈し、GOS 1+2+3 の予後不良群と、GOS4 の予後良好群との判別に携わる因子を同様に探索すると、Ketoisoleucine、DL-Glyceraldehyde、Ascorbic acid、L-



Valine、Urea、D-(+)-Galactose、Inositol、D-(+)-Allose、Pelargonic acid、L-Glucoseなどが候補に挙げられた。

(5) 考察：当研究においては、重症頭部外傷の治療過程で持続的に排液される脳脊髄液に注目し、遺伝子やタンパク質に比べ、より表現型に直結するとされるメタボロミクス分析を用い、頭蓋内の直接的かつ即時的な代謝変化を網羅的に捉えることで、従来とは異なる研究デザインで外傷マーカーの検出を試みた。実臨床症例で、同一個体での経時的変化や、末梢血との関連を追求した点は、斬新なものと考えられる。

結果の項に記したとおり、重症頭部外傷急性期の髄液内において、D-(+)-Fucose、Palmitoleic acid、Pyrophosphoric acid、1,5-Anhydro-D-glucitol、Ethanolamine、Psicose、D-Mannose、D-(+)-Maltose、Putrescine、Inositol、D-(+)-Galactose、Galactitol、D-(-)-Mannitol、N-alpha-Acetyl-L-ornithine、Cadaverine、2,3-Bisphospho-glyceric acid、Palmitoleic acid、D-Glutamine、D-(+)-Allose、L-Tryptophan、3-Hydroxyisovaleric acid、L-2-Aminobutyric acid、Ketoisoleucine、L-Cysteineなど、種々の物質で経時的変化や30日後転帰との関連が示された。その一部は、我々のGC-MS分析では健常人の髄液では検出されないものであり、おそらくは、外傷による出血・血腫や挫傷脳組織に由来するものと考えられる。文献上、2,3-Bisphosphoglyceric acidは、ヘモグロビンの還元に関わる物質で、貧血、低酸素、PaCO<sub>2</sub>など身体的状態にも影響されるとされ、頭部外傷との関係が示されている<sup>3)</sup>。また、Inositolは、脳をはじめとする生体内組織に広く存在しており、細胞の浸透圧調整に関わり、脳出血や脳浮腫との関連を指摘する報告がある<sup>4,5)</sup>。本研究では、予後良好群と不良群で異なる経時的変化を呈しており、脳組織損傷を鋭敏に表し、予後とも直結するマーカーとしての役割を担うことを期待する。

髄液および末梢血液に関する分析では、L-Isoleucine、L-Ornithine、L-(+)-Lactic acid、L-(-)-Sorbose、L-Tryptophan、Psicose、meso-Erythritol、D-Lyxose、L-Glutamic acid、L-(+)-Lysine、L-Valine、D-(+)-Fucose、L-Tyrosine、Ketoisoleucine、beta-N-Methyl-amino-L-alanine、L-Valineなどが、経時的に似通った挙動を示し、予後とも関連し得る物質と考えられた。必須アミノ酸のひとつであるL-Valineについては、動物実験において、頭部外傷と血漿中濃度との相関が示され<sup>6)</sup>、また、挫傷脳における特徴的変化のひとつとしても報告されている<sup>7)</sup>。これらは、先の考察同様、外傷による出血や挫傷に由来する直接的物質である可能性もさることながら、生体内での様々な反応の結果を反映した、二次的ないしより複雑な応答の結果とも考えられる。

末梢血液の解析においては、受傷30日後の転帰良好ないし不良に関し、Elaidic acid、Cadaverine、D-(+)-Galactose、2-Aminoisobutyric acid、L-Serine、Inositol、D-Glutamine、Palmitoleic acid、Ketoisoleucine、DL-Glyceraldehyde、Ascorbic acid、L-Valine、Urea、D-(+)-Allose、Pelargonic acid、L-Glucoseなどの物質が差異を示した。InositolやL-Valineについては、前述の通り、髄液中での即時変化や、髄液と末梢血液との相関が示唆される物質でもあり、予後との関係が証明されれば、頭蓋内病態を反映し、かつ簡便に採取可能な、理想的なバイオマーカーになり得るものと大いに期待する。

多岐にわたる観点から、重症頭部外傷に関与する可能性を秘めた代謝物を列挙した。Limitationとして、現時点では個々の症例に基づいた事象を捉えたものであり、その機序を含めた理論的考察や、予後予測マーカー確立に向けた前向きなvalidationについては、今後のさらなる症例蓄積と研究継続を要する。

(6) 結語：重症頭部外傷急性期において、髄液や血液内で特徴的な経時的変化を呈する物質を複数同定し得た。今後のさらなる症例蓄積により、簡便かつ鋭敏にICP上昇や予後の予測を出来る指標の絞り込み、同定を目指していく。

#### <引用文献>

- 1) Implications of fibrinogenolysis in patients with closed head injury. Kushimoto S et al. J Neurotrauma. 2003 Apr;20(4):357-63.
- 2) The effect of brain injury on the inflammatory response following severe trauma. Lustenberger T et al. Immunobiology. 2016 Mar;221(3):427-31.
- 3) Human Serum Metabolites Associate With Severity and Patient Outcomes in Traumatic Brain Injury. Orešič M et al. EBioMedicine. 2016 Oct;12:118-126.
- 4) Inositol transport proteins. Schneider S. FEBS Lett. 2015 Apr 28;589(10):1049-58
- 5) MicroRNA-23b Alleviates Neuroinflammation and Brain Injury in Intracerebral Hemorrhage by Targeting Inositol Polyphosphate Multikinase. Liuting Hu et al. Int Immunopharmacol 2019 Nov;76:105887.
- 6) Plasma metabolomics profiles in rats with acute traumatic brain injury. Zheng F et al. PLoS One. 2017 Aug 3;12(8):e0182025.
- 7) Discovery and validation of temporal patterns involved in human brain ketometabolism in cerebral microdialysis fluids of traumatic brain injury patients. Eiden M et al. EBioMedicine. 2019 Jun;44:607-617.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中井友昭， 山川 皓， 相原英夫， 当麻美樹， 篠原正和， 甲村英二
2. 発表標題 重症頭部外傷の脳代謝についてメタボロミクス分析を用いた病態解析の試み
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第78回学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中井友昭， 山川 皓， 相原英夫， 当麻美樹， 篠原正和， 甲村英二
2. 発表標題 重症頭部外傷における急性期脳代謝変化についてメタボロミクス解析を用いた病態解析と予後予測因子の探求
3. 学会等名 第43回日本脳神経外傷学会（誌上開催）
4. 発表年 2020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
研究協力者	山川 皓  (Yamakawa Akira)	神戸大学大学院医学研究科・脳神経外科学分野・大学院生	
研究協力者	相原 英夫  (Aihara Hideo)	兵庫県立加古川医療センター・脳神経外科・脳神経外科部長	

## 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
研究協力者	当麻 美樹  (Toma Yoshiki)	兵庫県立加古川医療センター・救急救命センター・救命科部長	
研究協力者	篠原 正和  (Shinohara Masakazu)	神戸大学大学院医学研究科・疫学分野・准教授	
研究協力者	甲村 英二  (Kohmura Eiji)	神戸大学大学院医学研究科・脳神経外科学分野・名誉教授	