

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07215

研究課題名（和文）血中タンパク質を指標とした脳梗塞バイオマーカーの探索

研究課題名（英文）Utilities of plasma protein 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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、脳梗塞バイオマーカー候補として血中タンパク質の有用性について、脳梗塞モデルマウスを用いて、解析した後、脳梗塞患者の検体を用いて検証するために実施した。その結果、脳梗塞モデルマウスにおいて、脳梗塞処置後、経日的に血中タンパク質であるSAA、Hapt血中濃度は有意に増加し、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、研究期間内に脳梗塞患者の主要なカルテデータの収集と血液検体の回収について、完了した。今後、脳梗塞モデルマウスの解析結果より得られたバイオマーカー候補となる血中タンパク質の動態が脳梗塞の重症度などを反映する優れたバイオマーカーとなることが期待される。

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や進行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SAAとHaptの動態を解析した結果、脳梗塞病態において、血中SAAとHapt濃度が増加することを明らかにした。よって、血中SAAとHapt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、これらの血中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 plasma protein is useful as a marker for predicting the progression of cerebral ischemia using cerebral ischemic model mice. And we prepared human clinical samples. As a result, we found that the plasma Serum Amyloid A (SAA) proteins and Haptoglobin (Hapt) concentration increases after cerebral ischemia. Thus, it was expected that the plasma SAA and Hapt 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

## 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。

脳梗塞は炎症を含む複雑な病態をたどり、現病状を正確に把握することが難しい。そのため、脳梗塞の複雑な病態を反映するバイオマーカーが策定されることで、患者個別の治療計画を提案することが可能となる。申請者は、脳梗塞バイオマーカーを探索するため、マウス脳梗塞モデルを作製して、脳梗塞処置後 1 日目、血液を回収した後、LC-MS/MS 法を用いて、血液中に含まれるタンパク質を解析した。その結果、いくつかの血中タンパク質が脳梗塞後、増減していることが明らかとなった(図 1)。しかし、脳梗塞発作後、これらのタンパク質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。本研究では増加の大きかった Serum Amyloid A (SAA) と Haptoglobin (Hapt) について、検討した。

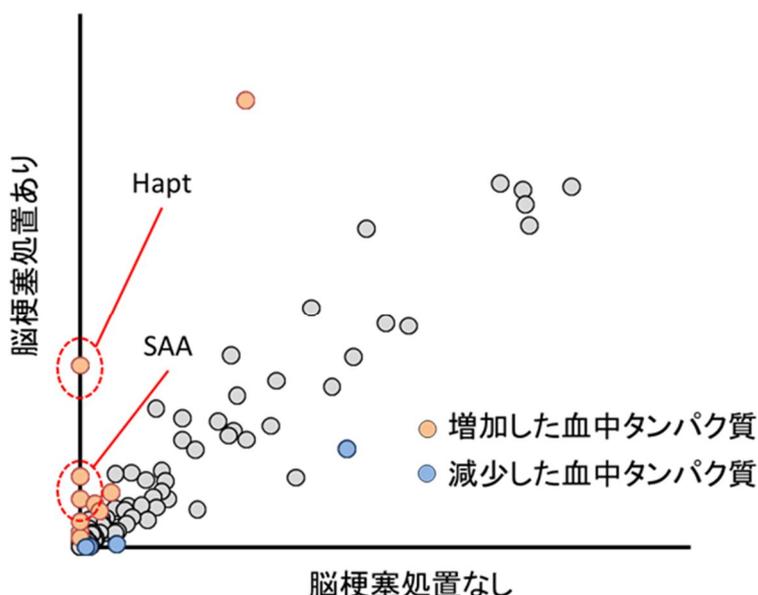


図 1. 脳梗塞モデルマウスにおける血中タンパク質の増減

## 2. 研究の目的

本研究は、脳梗塞処置したマウスにおいて、増減が検出された血中タンパク質 (SAA, Hapt) の血中濃度を経日的に測定することで、脳梗塞バイオマーカーとしての有用性を検討した。その後、脳梗塞モデルマウスを用いて、血中タンパク質 (SAA, Hapt) が病態に与える影響を確認した。また、脳梗塞患者の検体を用いて検証する準備を行った。

## 3. 研究の方法

### 3-1). 脳梗塞モデルマウスの作製

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。

### 3-2). 脳梗塞モデルマウスの血中 SAA、Hapt 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 1, 3, 7, 14 日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 Immuno Sorbent Assay (ELISA) 法を用いて、SAA、Hapt 濃度を測定した。MCAo 処置後 1, 3, 7, 14 日目に血液を採取した。Serum Amyloid A

ELISA kit を用いて回収した血液中の Hapt, SAA 濃度を測定した。

### 3-3). Hapt 投与による脳梗塞改善効果

作製した脳梗塞モデルマウスに MCA 閉塞 1 日目から Hapt を投与し始めて、1 日 1 回 7 日間、腹腔内に投与を行った。Rota-rod 装置は、直径 3 cm のプラスチック製の棒が一定の速度で回転しており、この上にマウスを回転方向と逆向きに頭の位置がくるように乗せ、落下するまでの時間を測定した。また、MCA 閉塞 2, 3 日前より rota-rod に 120 秒間乗れるように訓練をしたのちに MCA 処置を行った。回転速度は 15 rpm で行い、観察時間を最大 120 秒とし、3 回の平均を評価値とした。

### 3-4). ヒト脳梗塞患者情報の収集

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うち、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 SAA, Hapt 濃度

脳梗塞モデルマウスを用いて、MCA 閉塞後 1, 3, 7, 14 日目における血液中 SAA 濃度を評価した。その結果、MCA 閉塞 1 日後、血中 SAA 濃度は有意に増加した。また、その後、MCA 閉塞 3, 7, 14 日後の血中 SAA 濃度は減少した。一方、MCA 閉塞 1 日後、血中 Hapt 濃度は有意に増加した。また、その後、MCA 閉塞 7, 14 日後の血中 Hapt 濃度は減少した。

### 4-2). 脳梗塞モデルマウスにおける Hapt の改善効果

MCA 閉塞は処置後 1 日目より有意な rota-rod 時間の短縮を示した。更に、MCA 閉塞は処置後 7 日目まで rota-rod 時間を有意に短縮した。Hapt は MCA 閉塞後 7 日目において、rota-rod 時間の短縮を有意に改善した (Morimoto et al., 10.1161/JAHA.121.024424. (2022))。

### 4-3). ヒト脳梗塞検体の収集

本研究期間中に必要な 249 件の患者の主要なカルテデータとヒト血液検体の収集が完了した。

本研究成果より、脳梗塞モデルマウスの増減が検出された血中タンパク質である SAA, Hapt 血中濃度は有意に増加し、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。以上のことから、脳梗塞病態において、血中 SAA, Hapt 濃度が増加することが示唆された。よって、これらの血中タンパク質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。また、脳梗塞時、投与した Hapt は改善効果を示しており、有益な作用を示すことが示唆された。一方、これらの結果を検証するために必要な患者の主要なカルテデータと血液検体を収集した。今後、更なる研究成果が得られることで、脳梗塞患者の血中タンパク質は複数組み合わせることを含めて、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 1件）

1. 著者名 Morimoto M, Nakano T, Egashira S, Irie K, Matsuyama K, Wada M, Nakamura Y, Shigemori Y, Ishikura H, Yamashita Y, Hayakawa K, Sano K, Mishima K	4. 巻 11
2. 論文標題 Haptoglobin Regulates Macrophage/Microglia-Induced Inflammation and Prevents Ischemic Brain Damage Via Binding to HMGB1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Am Heart Assoc	6. 最初と最後の頁 e024424
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/JAHA.121.024424.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakano T, Nakamura Y, Irie K, Okano S, Morimoto M, Yamashita Y, Kozako T, Hayashi T, Honda SI, Matsuo K, Kamimura H, Ishikura H, Egawa T, Mishima K	4. 巻 252
2. 論文標題 Antithrombin gamma attenuates macrophage/microglial activation and brain damage after transient focal cerebral ischemia in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Sci	6. 最初と最後の頁 117665
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lfs.2020.117665	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 江頭 早紀、中野 貴文、田頭 祐依、仲村 佳彦、江口 幸臣、亀谷 富由樹、細川 雅人、佐藤 朝光、入江 圭一、山下 郁太、佐野 和憲、三島 健一
2. 発表標題 脳梗塞モデルマウスにおける血中タンパク質の動態
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田頭 祐依、江頭 早紀、森本 麻友香、江口 幸臣、中野 貴文、入江 圭一、細川 雅人、山下 郁太、佐野 和憲、三島 健一
2. 発表標題 中大脳動脈閉塞マウスを用いた脳梗塞遅延期におけるanti-HMGB1抗体の治療効果
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022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)	
研究分担者	細川 雅人  (Hosokawa Masato)  (00435116)	福岡大学・薬学部・准教授   (37111)	
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	中野 貴文  (Nakano Takafumi)  (40804539)	福岡大学・薬学部・助教   (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・教授   (37111)	
研究分担者	山下 郁太  (Yamashita Yuta)  (90823964)	福岡大学・薬学部・助教   (37111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------