

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592126

研究課題名(和文) 脳虚血のメタボローム解析：脳虚血前後代謝変化の包括的解析によるバイオマーカー探索

研究課題名(英文) metabolome analysis of cerebral ischemia: exploration of biomarkers by comprehensive analysis of metabolic changes before and after cerebral ischemia

研究代表者

細田 弘吉 (Hosoda, Kohkichi)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90403261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ラット中大脳動脈閉塞モデルを用いて脳梗塞を作成し閉塞側と健側の大脳皮質を採取、ガスクロマトグラフ質量分析装置を用いてメタボローム解析を行い虚血脳に特異的な代謝変化を調べたところ、虚血脳では、TCA回路は止まり、リンゴ酸-アスパラギン酸シャトルやプリンヌクレオチド・サイクルなどの補充反応の亢進とペントースリン酸経路の亢進が示唆された。これより、脳虚血超急性期においては、ATPの枯渇により、TCA回路が止まり、補充反応が行進し、ペントースリン酸経路が亢進してNADPH産生が増加し、虚血による活性酸素の発生に対応しようとしていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We created cerebral infarction by use of rat middle cerebral artery occlusion and sampled the cerebral cortex, which was analyzed by metabolome analysis with the use of gas-chromatography/mass-spectrometry. The result implicated that the tricarboxylic acid cycle (TCA) cycle was stopped and that the anaplerotic responses such as malate-aspartate shuttle and purine nucleotide cycle were upregulated and that the pentose phosphate pathway (PPP) was also upregulated. Consequently, during ultra-acute stage of cerebral ischemia, it is most likely that TCA cycle was stopped due to ATP depletion and the anaplerotic responses was upregulated and PPP was upregulated to increase NADPH to deal with the reactive oxygen species.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：metabolomics cerebral ischemia metabolic pathway

1. 研究開始当初の背景

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り、その本態は動脈硬化性疾患であることが多い。脳血管障害においては、動脈硬化により脳虚血を来し、最終的には脳梗塞へと至るが、その際、脳組織がどのような循環動態や代謝の変化を来すかを知らなくてはならない。申請者は、脳血管障害に於ける脳循環動態とその意義について、脳血流シンチグラムや灌流MRIを用いて研究して来た (Stroke 2001, Stroke 2003, Neurosurgery 2005, J Neurosurg 2007, AJNR 2011)。

近年の質量分析装置の発達に伴い、臨床の現場で入手される体液中・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、従来研究されてきたゲノム解析 (数万の遺伝子)・プロテオーム解析 (数百万の蛋白質) と比較し、解析対象数が限定的であること (約4000種の代謝産物)、蛋白質による生命現象の後に産生される物質であり生体の表現形に近いこと、個々の低分子代謝物に関して古くからの生化学的な知見が蓄積していることなどが臨床研究に有利である。しかし疾患によって変化する体液中・組織中のメタボロームを包括的に解析するプロジェクトは国内外に於いていまだ非常に少ない。当施設では、平成20年にメタボローム解析の臨床医学研究への応用を目指して質量分析総合センターが設立された。

頸動脈狭窄症は脳梗塞の主な原因の一つであるが、頸動脈内膜剥離術あるいは頸動脈ステント術によって有効に脳梗塞を予防することができる。従って本症に対するこれらの治療法の合併症 (脳塞栓症) を減らすことは重要である。一方、頸動脈内膜剥離術は術中に内頸動脈血流遮断が必須であり、この血流遮断中の脳代謝の包括的变化を前述のメタボローム解析により知ることは、ヒトの脳虚血における脳代謝の変化に関するより深い知識を提供し脳虚血の新しいバイオマーカーに結びつく可能性がある。また、摘出する頸動脈プラークそのもののメタボローム解析により動脈硬化進展のメカニズムに迫りうる。

さらに、ラットの脳梗塞モデルを用いて静脈血や脳組織を解析し、脳虚血に特異的な代謝変化を同定することにより、脳梗塞の新たな治療法の開発へと展開する為の研究基盤を確立する事ができると期待される。

2. 研究の目的

- (1) 脳虚血に特異的な代謝産物の同定と、それによるバイオマーカーと脳虚血治療薬の開発
- (2) 脳虚血後再灌流障害に特異的な代謝物の同定とそれによるバイオマーカーと治療薬の開発
- (3) 頸動脈の不安定プラークに特異的な代謝

産物の同定とそれによるバイオマーカーと治療薬の開発

3. 研究の方法

I. ラット中大脳動脈閉塞モデルの作成

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し中大脳動脈閉塞前、閉塞後 30, 60, 120 分に採血し、120 分後の時点で脳梗塞部位の組織と対側正常脳組織 (対照群) を採取し、すべて -80 で保存する。

II. ボランティアからのサンプルの採取

脳血管障害のない正常ボランティアを募集し、末梢血を採取し、血漿を -80 に保存する。

III. 頸動脈狭窄症患者からのサンプルの採取 (慢性期脳虚血)

(1) 頸動脈内膜剥離術の術中に内頸動脈の血流遮断前および遮断後経時的に末梢血と内頸静脈血を採取する。

(2) 血流遮断解除後にも経時的に末梢血ならびに内頸静脈血を採取する。

IV. サンプルのメタボローム解析

(1) サンプルの解析: 脳組織・血漿から水溶性代謝物を抽出し、ガスクロマトグラフ-質量分析計を用いたメタボローム解析を行い、疾患群と対照群の代謝プロファイルの相違を多変量解析にて分析する。これにより脳梗塞急性期に特異的に変動する代謝産物を同定する。

(3) ラット中大脳動脈閉塞モデルにおける脳組織と血漿の結果を比較し、両者で一致して変化する代謝物を同定することにより、結果を検証する。また、マイクロアレイや RT-PCR などの手法を用いて遺伝子発現レベルでの虚血に特異的な変化を追求する。

(4) ヒト脳梗塞患者と正常ボランティアのメタボローム解析の結果を比較し、ヒトにおいて脳梗塞に特異的に変化する代謝物を同定する。この際、ラット中大脳動脈閉塞モデルにおける脳組織と血漿の結果とも比較し、種差があるかどうかを確認する。

4. 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

頸動脈狭窄症例で1年以内に虚血性脳血管イベント (脳梗塞と一過性脳虚血) のあった群となかった群で内頸動脈剥離術中に内頸静脈血と末梢血を採取し、水溶性代謝物を抽出してガスクロマトグラフ質量分析装置でメタボローム解析を行った。主成分分析等の多変量解析を行い両群の代謝物が異なるパターンを呈することを発見し、Ascorbic acid, Gluconic acid, Glycerol, Histidine, Lactic acid, Methionine, p-Hydroxybenzoic acid, Valine の8つの代謝物により、虚血性脳血管イベントの有無を高精度に予測するモデルを作成した。これらの代謝物は虚血性脳血管イベントのバイオマーカー候補と

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の頸静脈血における代謝変化
ラット中大脳動脈閉塞による急性梗塞群と対照群の頸静脈血を収集し、ガスクロマトグラフ質量分析装置でメタボローム解析を行った。このデータを多因子分析で解析し、両群で特に異なる変化を示す 30 代謝物が同定された。

III. ヒト脳梗塞急性期のメタボローム解析
2013 年度より新たに、発症後 24 時間以内の脳梗塞症例と対照群(未破裂脳動脈瘤を含む)の末梢血を採取し、上記と同様にメタボローム解析を行うために症例を集積中である。この解析により、脳梗塞急性期の新たなバイオマーカーを同定する予定である。また、対照群の中の未破裂脳動脈瘤症例を用いて 320 列 CT angiography の有効性を検討し、論文として発表した。

IV. ラット中大脳動脈閉塞モデルを用いた脳梗塞急性期の脳組織における代謝変化

(1) 組織サンプル training set の主成分分析では第 1 主成分で虚血群と非虚血群が明瞭に分離し、第 1 主成分負荷量の高い 14 代謝物(GABA, クエン酸など)のみを用いて別の validation set で主成分分析を行うと同様に第 1 主成分で虚血群と非虚血群が分離された。
(2) 組織サンプルの heatmap でも 2 群は明瞭に区別された。

(3) 虚血脳では、TCA 回路は止まり、malate-aspartate shuttle や purine nucleotide cycle などの補充反応の亢進とペントースリン酸経路の亢進が示唆された。

(4) GABA の増加は脳虚血特異的で、その意義を更に追求する必要がある。

(5) マイクロアレイや RT-PCR の結果は、虚血超急性期代謝変化に対する代謝酵素の転写レベルでの制御の関与は少ない事が示唆される一方で、炎症などより長期的な反応を示唆する経路の転写レベルが上昇していた。
(6) ラット血漿の主成分分析では組織のような明瞭な 2 群の分離は得られなかった。部分最小二乗法により 2 群を判別する可能性のある代謝物(glycerol, lactic acid など)を見出したが脳組織の結果とすべて一致はしなかった。

【結論】脳虚血超急性期においては、TCA 回路が止まり、補充反応が亢進し、ペントースリン酸経路が行進して NADPH の産生が増加し、虚血による活性酸素の発生に対応しようとしていること、および、これらの変化は転写レベルではなく、酵素活性の変化など生化学的な調整(アロステリック効果など)により行われていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Inoue S, Hosoda K, Fujita A, Ohno Y,

Fujii M, Sugimura K, Kohmura E: Utility of 320-detector row CT for diagnosis and therapeutic strategy for paraclinoid and intracavernous aneurysms. Acta Neurochir (Wien) 査読有 156:505-514, 2014. DOI: 10.1007/s00701-014-1996-x.

Tanaka H, Sasayama T, Tanaka K., Nakamizo S, Nishihara M, Mizukawa K, Kohta M, Koyama J, Miyake S, Taniguchi M, Hosoda K, Kohmura E: MicroRNA-183 upregulates HIF-1 by targeting isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) in glioma cells. J Neurooncol 査読有 111:273-83, 2013. DOI: 10.1007/s11060-012-1027-9

Nakamizo S, Sasayama T, Shinohara M, Irino Y, Nishiumi S, Nishihara M, Tanaka H, Tanaka K, Mizukawa K, Itoh T, Taniguchi M, Hosoda K, Yoshida M, Kohmura E: GC/MS-based metabolomic analysis of cerebrospinal fluid (CSF) from glioma patients. J Neurooncol 査読有 113:65-74, 2013. DOI: 10.1007/s11060-013-1090-x

細田弘吉. Arterial Spin Labeling による脳循環測定の臨床応用. 脳循環代謝 査読無 23: 181-186, 2012. <http://www.cbfm.jp/journal2/contents/assets/023020181.pdf>

〔学会発表〕(計 12 件)

国際学会

Imahori T, Hosoda K, Nakai T, Iriono Y, Kohmura E: Metabolomic Profiling of Middle Cerebral Artery Occlusion Models in the Rats Using GC-MS for Exploration of Blood Metabolic Biomarkers Associated with Acute Cerebral Ischemia 9th World Stroke Congress Turkey, Istanbul, 2014 October 23-25.

Hosoda K, Inoue S, Ohno Y, Fujii M, Sugimura K, Kohmura E: Utility of 320-detector row CT for diagnosis and therapeutic strategy for paraclinoid and intracavernous aneurysms. 9th World Stroke Congress Turkey, Istanbul, 2014 October 23-25

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, Paris, 2014 February 27-28. 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, Paris, 2014 February 27-28.

国内学会

細田弘吉「脳虚血代謝変動のメタボローム解析によるバイオマーカーの探索」第40回日本脳卒中学会総会 シンポジウム4(卒中S3)2015年3月26日, 広島

今堀太一郎、細田弘吉、入野康宏、山本祐輔、田中潤、中井友昭、甲村英二「ラット中大脳動脈閉塞モデルのメタボローム解析による急性期脳虚血の代謝変動: Part I 脳組織の変化」第40回日本脳卒中学会総会 一般講演 2015年3月26日, 広島

山本祐輔、細田弘吉、入野康宏、今堀太一郎、田中潤、中井友昭、甲村英二「ラット中大脳動脈閉塞モデルのメタボローム解析による急性期脳虚血の代謝変動 Part 血漿中の変化」第40回日本脳卒中学会総会 一般講演 2015年3月26日, 広島

細田弘吉、今堀太一郎、入野康宏、山本祐輔、田中潤、中井友昭、甲村英二「ラット中大脳動脈閉塞モデルのメタボローム解析による急性期脳虚血時の代謝変化 Part II: 血漿中の変化」第26回日本脳循環代謝学会総会 2014年11月21日, 岡山

今堀太一郎、細田弘吉、入野康宏、山本祐輔、田中潤、中井友昭、甲村英二「ラット中大脳動脈閉塞モデルのメタボローム解析による急性期脳虚血時の代謝変化 Part I 脳組織の変化」第26回日本脳循環代謝学会総会 2014年11月21日, 岡山

今堀太一郎、細田弘吉、山本祐輔、田中潤、中井友昭、入野康宏、甲村英二「ラット中大脳動脈閉塞モデルの血漿メタボローム解析(GC/MS)による急性期脳虚血中バイオマーカー探索」日本脳神経外科学会第73回学術総会 2014年10月9日, 東京

〔図書〕(計2件)

細田弘吉: 虚血性脳血管障害急性期の全身管理. 脳血管障害の急性期マネジメント 文光堂 2014 p121-126.

細田弘吉. 「術前に行う病態診断検査と評価」頸動脈内膜剥離術プラクティス 編集: 永田泉, 遠藤俊郎 メディカ出版, 2013

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細田弘吉 (HOSODA KOHKICHI)
神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 90403261

(2) 研究分担者

小山 淳二 (KOYAMA JUNJI)
神戸大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号: 00594508

甲村英二 (KOHMURA EIJI)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 30225388

内橋義人 (UCHIHASHI YOSHITO)
神戸大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号: 80605999

(3) 連携研究者

吉田 優 (YOSHIDA MASARU)
神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 00419475