

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791496

研究課題名(和文)もやもや病における脳脊髄液タンパク解析の定量的評価システムの確立および遺伝子解析

研究課題名(英文) Establishment of measuring system of proteomic using cerebrospinal fluid and genetic analysis in patients with moyamoya disease

研究代表者

荒木 芳生 (ARAKI, YOSHIO)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：80467290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では脳脊髄液中からもやもや病の脳脊髄液にて特異的に高発現しているペプチドを抽出・精製することには成功し、そのペプチドがどのタンパク質の断片であるかも同定した。続いて、特異的抗原抗体反応(ELISA)によって、血漿や脳脊髄液検体でのバンド出現の有無を確認したが、こちらについては条件を変更して行ったものの最終的には抽出にいたらなかった。もう一方の目的である、もやもや病手術において採取された血管検体を使用した遺伝子解析については、マイクロアレイによる発現解析を実施し、こちらはすでに報告されているRNF213に関連したpathwayにおける変異を認めた。

研究成果の概要(英文)：In our biomarker research study for MMD, the 4473Da peptide is supposed to be a reliable biomarker of MMD. The higher 4473Da peptide peaks in younger MMD patients are proved to be highly associated with postoperative angiogenesis (Maruwaka M, J Stroke and Cerebrovasc Dis.2015). This research was unfortunately unsuccessful to establish a quantitative assessment system of biomarker using ELISA. On the other hand, genetic analysis of vessel samples showed mutation in RNF 213 related pathway.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：もやもや病 脳脊髄液 タンパク解析 遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

申請者もやもや病およびその類縁疾患患者脳脊髄液の網羅的タンパク解析により質量4000-5000Da(m/z:4473, 4588, 4746)のタンパク(ペプチド)がコントロール群と比較して、もやもや病およびその類縁疾患において有意差をもって高発現していることを報告した(Araki Y et al. BMC Neurology. 2010)。さらに高速液体クロマトグラフ質量分析を応用し同タンパクの同定に成功した(未発表)。一方遺伝子解析のアプローチとしては、2010年東北大学のKamadaらによって患者血清、口腔粘膜を用いてDNAチップ785720のSNP解析をおこない72症例のもやもや病と45例のコントロール間を比較したところ、もやもや病、特に家族性もやもや病に強い関連性のある7個のSNPを17q25-terのRNF213といわれる部位に認められることが初めて報告された。同年京都大学および海外の共同研究グループより同部位のSNPが報告され、さらにRNF213 morphatsにおいて頭蓋内動静脈のsproutingを認め血管形成との関連性が示唆された。しかしこれらはいくまでも感受性遺伝子の発見であり、ヒトもやもや病における直接的意義は明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では(1)同定されたタンパクの脳脊髄液からの分離・同定からELISAを使用した定量的測定システムの構築を行うとともに(2)もやもや病およびその類縁疾患患者の手術において採取される中大脳動脈・硬膜・浅側頭動脈を検体として用いて網羅的に遺伝子発現解析を加えることで同タンパクとの関連と本疾患における意義に関して新たな知見を得ること(3)さらには網羅的遺伝子発現パターン解析より得られた知見より動物モデル作成を行うことが本研究の主な目的であり、本疾患

の病態解明や治療戦略への足がかりをつかみたいと考えている。

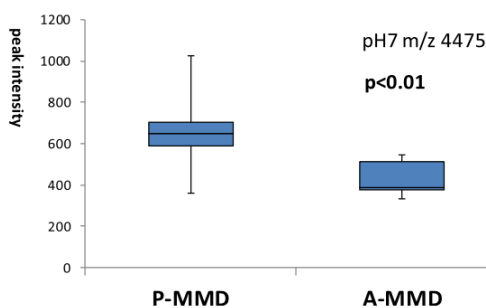
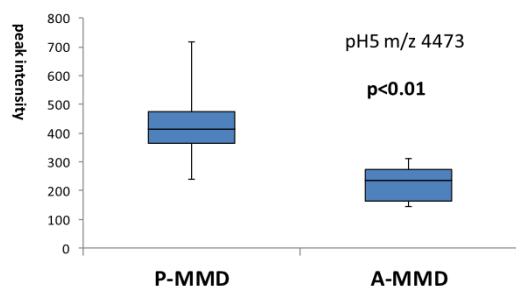
3. 研究の方法

- (1) もやもや病およびその類縁疾患脳脊髄液より目的とするタンパクの分離・精製を効率的に行うシステムを構成する。さらに小児と成人例におけるターゲットペプチドの含有量に差があるかないかを検証し、病態における関与を検討する。MRIにおける血行再建効果についてscoringシステムを作成し、年齢による差があるかどうかについても検討する。
- (2) 同タンパクの定量的評価のためのELISAシステムの構築を行う。
- (3) 得られた定量的データを臨床応用するための統計学的処理法の検討を行う。
- (4) 手術にて得られた中大脳動脈・硬膜・浅側頭動脈よりRNAを抽出しcDNAを作成後DNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析を行い、コントロール群との比較検討を行う。
- (5) 得られた遺伝子データと目的タンパクから類推される遺伝子配列との比較を行う。
- (6) もやもや病および類縁疾患脳脊髄液中に高発現するタンパクの遺伝子情報と中大脳動脈・硬膜・浅側頭動脈より得られた遺伝子データより動物モデル構築の検討を行う。

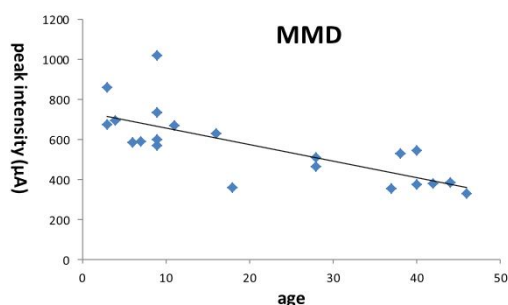
4. 研究成果

- (1) MonoQ (高性能液体クロマトグラフィー用の単分散系親水性ポリマービーズ)、Iontrap MS: LTQ Velosを用いることにより約500 μ lの脳脊髄液サンプルより目的とするタンパク断片(ペプチド)を抽出することに成功した。その確認には、液体クロマトグラフィーと質量分析計を組み合わせたLC-MSシステムを利用して、アミノ酸配列ま

で同定することができた。この結果については、現在論文作成中であり、物質名についての公表は差し控える。特に本研究においては、小児例と成人例における脳脊髄液中のタンパク解析により、ターゲットとするペプチドは有意差をもって小児例におおく含まれることがわかった (以下の図に示す)。これはコントロール群(動脈瘤症例など)とも比較して、

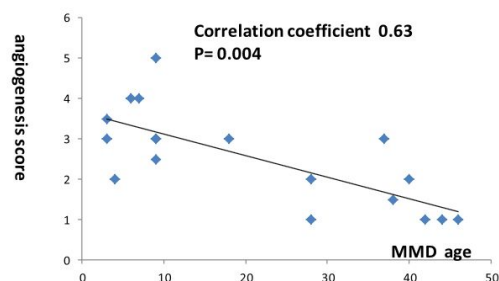


P: pediatrics, A: Adult 4473Da, 4475Da のペプチドは小児例に多く含まれる。

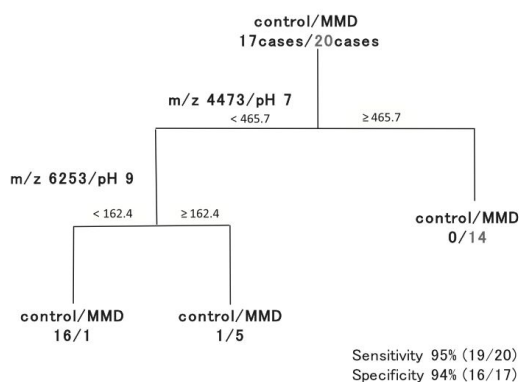


4475Da のペプチドにおける年齢による含有量の分布。小児例ほどこのペプチドが多い。

また、MRI における血行再建効果の scoring システムにより、小児例ほど、間接血行再建効果が大きいことも判明した。つまり 4475Da と、血行再建効果(血管新生)との関連が示唆された。



年齢が低いほど、angiogenesis score が高値となっている ($P=0.004$)。



同定されている3つのペプチドの cut off 値を使用した決定木によって、もやもや病とコントロール群は有意差をもって判別可能であった。

(2) 同定したペプチドに対する特異的抗体を作成し、ELISA 法によって、血清や脳脊髄液と反応させたが、有意なバンドは得られなかった。しかしながら追跡研究により、同ペプチドが分解酵素によって、生体外ではさらに断片化されることがわかったため、現在は脳脊髄液採取直後に分解酵素阻害剤を使用することで、crude な脳脊髄液中からも捕捉できないかどうかをさらに検討する必要があると考えられる。

(3) (2)によって有意なバンドは得られなかったため、統計学的な定量の処理には至らなかった。

(4) 浅側頭動脈より RNA をビーズ法により機械的に抽出し、もやもや病とコントロール群(動脈硬化性病変患者)をマイクロアレイによって比較した。一方中大脳動脈についてはサンプルサイズが非常に小さく、同じ方法ではマイクロアレイに耐

えうる RNA 量を採取できなかった。硬膜検体についてはレーザーキャプチャーマイクロダイセクション法を用いて硬膜上の血管を採取可能であったが、こちらについても、硬膜組織の contamination によって RNA を十分に採取することができなかった。

(5) 浅側頭動脈におけるマイクロアレイの結果からは、もやもや病患者において、先行論文にて発表されている RNF213 変異に関連する pathway における変異が認められた。この結果については、論文作成中である。

(6) (5) で得られた結果はサンプル数が非常に小さく、validation が不可能であった。従ってノックアウトマウスを作成する段階にないと判断した。

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2件)

1 . Maruwaka M, Yoshikawa K, Okamoto S, Araki Y, Sumitomo M, Kawamura A, Yokoyama K, Wakabayashi T. Biomarker Research for Moyamoya Disease in Cerebrospinal Fluid Using Surface-enhanced Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectroscopy, Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases, 査読あり, 24, 2015, 104-111

2 . Araki Y, Takagi Y, Ueda K, Ubukata S, Ishida J, Funaki T, Kikuchi T, Takahashi JC, Murai T, Miyamoto S. Cognitive Function of

Patients with Adult Moyamoya Disease. Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases, 査読あり, 23, 2014, 1789-1794

[学会発表](計2件)

1 . Araki Y, Maruwaka M, Yokoyama K, Wakabayashi T. (Oral) Clinical Practice and Basic Research on Moyamoya Disease in Nagoya University. NU-SKKU Joint Symposium 2014 (BIO session), 27 November, 2014, Suwon, Korea

2 . 横山欣也, 岡本奨, 荒木芳生, 住友正樹, 圓若幹夫, 河村彰乃, 坂本悠介, 若林俊彦, SELDI-TOF-MS を用いた小児と成人もやもや病患者の髄液検体におけるバイオマーカーの研究, 脳神経外科学会学術総会, 2013年10月18日, パシフィコ横浜(神奈川県, 横浜市)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 芳生 (ARAKI, Yoshio)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号 : 80467290

(2) 研究分担者

なし