

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19810

研究課題名（和文）自己抗体マーカーによる脳梗塞発症予測の精緻化に関する疫学研究

研究課題名（英文）Epidemiological study on the elaboration of the prediction of cerebral infarction by autoantibody markers

研究代表者

磯 博康（Iso, Hiroyasu）

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50223053

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：日本人において最も多い動脈硬化性疾患である脳梗塞の症例と一般健康住民である対照について、過去の凍結保存血漿中の動脈硬化候補マーカーの抗体レベルを高感度ELISAであるAlphaLISA法によりハイスループットに測定し、nested case-control studyの手法を用いて、脳梗塞の発症との関連を分析した。その結果、複数の抗体について発症予測マーカーとしての活用可能性が見出された。なお、特に顕著な関連が見られた一部のマーカーについては、特許申請中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血清自己抗体は個人の病歴を反映しており、疾患が発症する前に存在する抗体が明らかになれば、疾患の発症予測マーカーとしての活用が期待される。既にかんや自己免疫疾患については特異的な自己抗体が出現することが報告されているが、動脈硬化性疾患については自己抗体が関与するという着想はこれまで乏しく、厳密な疫学手法を用いた脳梗塞の発症に關与する自己抗体マーカーの包括的な解明は皆無であった。本研究において、脳梗塞の発症前の血清中に特異的に存在する抗体が複数同定されたことから、これらの抗体を発症予測マーカーとして活用することで脳梗塞の前駆病態の早期発見・早期治療に繋げることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The antibody levels of candidate markers of atherosclerosis in past cryopreserved plasma were measured with high throughput using AlphaLISA, a high-sensitivity ELISA, and the association with the incidence of cerebral infarction (CI) was analyzed using the nested case-control study method in cases of CI, the most common atherosclerotic disease in Japan, and controls in the general population. We found several antibodies which may be used as predictive markers of CI incidence. A patent is pending for some markers that were found to be of particular relevance.

研究分野：疫学・循環器予防学

キーワード：予防医学 疫学 症例対照研究 自己抗体マーカー 脳梗塞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者の礎はこれまで、日本の地域住民の大規模なコホート研究(CIRCS、JPHC、JACC 研究)において主導的立場で研究を進め、日本人の生活習慣、生理学・生化学的な危険因子、社会心理的要因等と脳卒中、虚血性心疾患の発症・死亡について数々の成果を上げてきた。中でも、生物学的危険因子として、脂質(総(LDL-)コレステロール(NEJM 1989, J Clin Epidemiol 1994, Atherosclerosis 2007, 2012, Circulation 2009, Prev Med 2011)、HDL コレステロール(Circulation 1994, Stroke 2013)、トリグリセリド(Am J Epidemiol 2001)、脂肪酸(Stroke 2002)、HDL- コレステロール粒子系(Stroke 2013)、凝固線溶系(フィブリノーゲン(Stroke 2006))、抗酸化マーカー(ホモシステイン(Circulation 2004))等と脳卒中、虚血性心疾患との関連についての分析を通して、脳卒中、虚血性心疾患等の動脈硬化性疾患のメカニズムに迫ってきた。免疫・炎症マーカーについても高感度 CRP(Stroke 2012)、T 細胞(Atherosclerosis 2004)等と動脈硬化性疾患との関連について検討を加えてきた。

血清中には様々な自己抗体が存在しており、特定の疾患に関連する抗原が存在する時、抗原抗体反応により、その抗原に特異的な抗体が産生される仕組みとなっている。したがって血清自己抗体は個人の病歴を反映している可能性があり、疾患が発症する前に存在する抗体が明らかになれば、疾患の発症予測マーカーとして活用できると期待される。既にがんや自己免疫疾患については特異的な自己抗体が出現することが報告されているが、脳梗塞については、そのメカニズムに免疫反応が関与すると考えられてはいるものの、自己抗体が関与するという報告はこれまで乏しく、脳梗塞の発症に関与する抗体マーカーの包括的な解析は皆無であった。分担研究者の日和佐は、RPA2 や SOSTDC 等の脳梗塞関連マーカーを多数発見してきたが、それらが脳梗塞の発症に関与する証拠は未だ得られていない。

2. 研究の目的

本研究では、一般集団を対象に脳梗塞を含む動脈硬化性疾患のマーカーである血清抗体レベルを測定し、その脳梗塞の発症への関与を、古典的危険因子や生活習慣を統計学的に調整して分析する。そして、脳梗塞の効率的な発症予測を行うための疫学的エビデンスを得ることを目的とする。具体的には、日本人住民 40~69 歳男女約 6 万人のコホートの中から、nested case control study の手法を用いて、脳梗塞の発症例と、性、年齢、地域をマッチさせた対照例に対して、凍結保存血漿中の脳梗塞・動脈硬化候補マーカーの抗体レベルを測定し、脳梗塞の発症予測マーカーとしての可能性を検証する。さらに、得られた脳梗塞発症予測マーカーにより、脳梗塞の発症確率予測モデルの開発を目指す。

3. 研究の方法

日本人において、脳梗塞の発症予測を効率的に進めるため、動脈硬化の血清抗体候補マーカーと脳梗塞発症との関連を分析する。そのためには、各マーカーに関して多変量解析を行う必要があり、大規模で精度の高い血清抗体レベルの測定と追跡データを必要とする。そこで申請者が運営委員・班員として参画している多目的コホート(JPHC: Japan Public Health Center-based Cohort Study)を研究対象とした。1990 年に開始されたわが国最大規模の多目的コホート研究で、14 地域住民 40~59 歳男女約 5 万人のコホートと、15 地域住民 40~69 歳男女約 5 万人年のコホートがある。がん、脳卒中(脳梗塞、脳出血、くも膜下出血)や虚血性心疾患の発症を追跡しており、地域住民コホートとしての脳梗塞登録件数はわが国最大である。そのうちの約 50%の対象者(コホート、を合わせて約 6 万人)の血漿が保存されている。

本研究では、多目的コホートの対象者で、血漿保存がなされている約 6 万人の中から、脳梗塞の発症例と、性、年齢、地域をマッチさせた対照例を分析対象とする。これらの対象者には、古典的危険因子(高血圧、脂質代謝異常、糖代謝異常等)の測定、生活習慣(喫煙、飲酒、詳細な栄養摂取状況、身体活動状況)の把握が、研究のベースライン時に実施されている。本研究では、これらの対象者のうち、ベースライン調査時において血漿が凍結保存されており、脳梗塞発症者 375 例と、性・年齢・地域をマッチさせた対照 375 例について、血漿中の動脈硬化の血清抗体候補マーカーの抗体レベルを測定する。具体的には、前述の症例・対照例について、抗原タンパク質を精製し、glutathione-ドナービーズと抗ヒト IgG- アクセプタービーズを用いた AlphaLISA 法により、血清と抗原と 2 種類のビーズを混合した後、7 日後、14 日後、21 日後に血清の抗体レベルを測定する。

AlphaLISA 法

Alpha(Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay)システムは、ドナーとアクセプターの 2 つのビーズを使用し、ドナービーズに結合した分子が、アクセプタービーズに結合した分子と生物学的に相互作用し、2 つのビーズが近接した状態の時のみ、発光シグナルを検出する。このシステムを ELISA に応用した方法が AlphaLISA 法で、洗浄ステップを踏むことなく混ぜるだけで、非常に正確で高感度に血清抗体レベルを測定することが可能である。

そして、これらと脳梗塞発症との関連を、生活習慣や健診成績の影響を考慮した上で条件付きロジスティック回帰モデルにより分析する。

4. 研究成果

1) 動脈硬化候補マーカーの測定

コホート内の脳梗塞発症例のうち、375 症例と性・年齢・地域を一致させた 375 対照について、動脈硬化候補マーカー40 種類の抗体レベルを測定した。

2) 動脈硬化候補マーカーと脳梗塞発症との関連

多目的コホート研究の運営上の取り決めにより、未刊行データの公表が認められていないため、概要のみを報告する。

40 種類の動脈硬化候補マーカーについて、測定日ごとの抗体レベル 1 標準偏差あたり、及び四分位あたりの脳梗塞発症リスクとの関連を分析した。ここでは、全てのマーカーで測定がされている 21 日目の抗体レベルを用いた結果について概説する。抗体レベル 1 標準偏差あたりの脳梗塞発症のオッズ比の結果では、26 種類のマーカーが有意な正の関連を示した(図 1)。また、抗体レベルを四分位に分けた結果では、抗体レベルが下位 25 パーセンタイルの群と比べて、上位 25 パーセンタイルの群で脳梗塞に何倍罹りやすいかを検討した。これにより、31 種類のマーカーが有意な正の関連を示した(図 2)。

以上より、複数の抗体について発症予測マーカーとしての活用可能性が見出された。特に顕著な関連が見られた一部のマーカーについて、その成果を国際専門学術誌に投稿中である。

3) 脳梗塞発症予測マーカーの特許申請

上記の結果から、特に顕著に脳梗塞発症との関連が見られた一部のマーカーについて、特許申請を行い、現在審査中である。

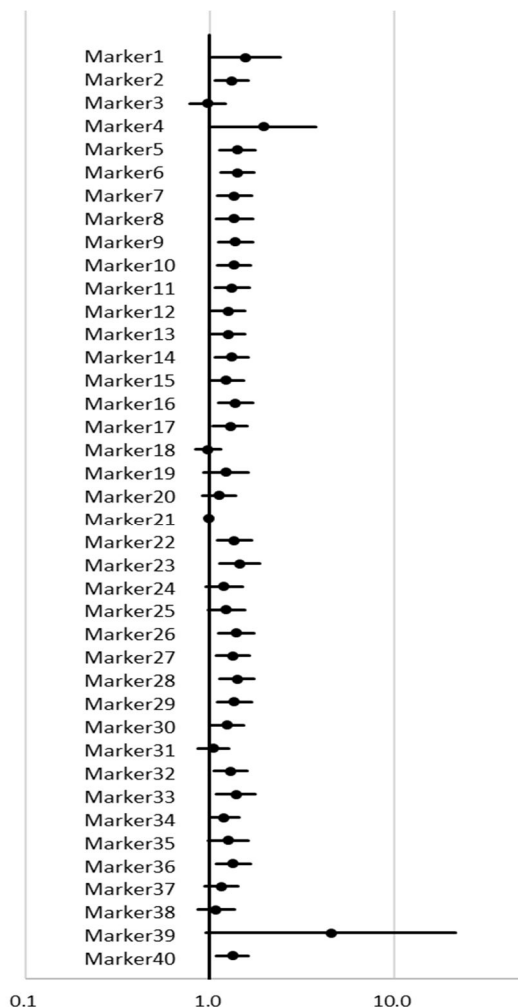


図1. 動脈硬化候補マーカーと脳梗塞発症との関連(抗体レベル 1 標準偏差あたりのオッズ比)

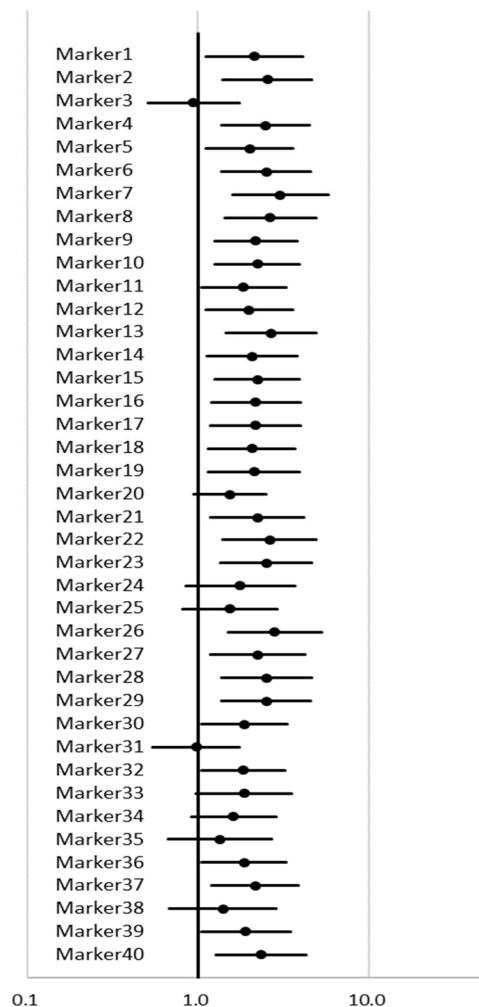


図2. 動脈硬化候補マーカーと脳梗塞発症との関連(抗体レベル第 4 四分位におけるオッズ比)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 17件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yoshizaki T, Ishihara J, Kotemori A, Yamamoto J, Kokubo Y, Saito I, Yatsuya H, Yamagishi K, Sawada N, Iwasaki M, Iso H, Tsugane S; JPHC Study Group	4. 巻 30
2. 論文標題 Association of Vegetable, Fruit, and Okinawan Vegetable Consumption With Incident Stroke and Coronary Heart Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Epidemiol	6. 最初と最後の頁 37～45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2188/jea.JE20180130	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 Murai U, Yamagishi K, Sata M, Kokubo Y, Saito I, Yatsuya H, Ishihara J, Inoue M, Sawada N, Iso H, Tsugane S; JPHC Study Group	4. 巻 110
2. 論文標題 Seaweed intake and risk of cardiovascular disease: the Japan Public Health Center-based Prospective (JPHC) Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Clin Nutr	6. 最初と最後の頁 1449～1455
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ajcn/nqz231	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 Hayashi R, Iso H, Yamagishi K, Yatsuya H, Saito I, Kokubo Y, Eshak ES, Sawada N, Tsugane S; Japan Public Health Center-Based (JPHC) Prospective Study Group	4. 巻 83
2. 論文標題 Working Hours and Risk of Acute Myocardial Infarction and Stroke Among Middle-Aged Japanese Men The Japan Public Health Center-Based Prospective Study Cohort II	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circ J	6. 最初と最後の頁 1072～1079
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1253/circj.CJ-18-0842	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 Li Y, Yatsuya H, Iso H, Yamagishi K, Saito I, Kokubo Y, Sawada N, Tsugane S	4. 巻 29
2. 論文標題 Body Mass Index and Risks of Incident Ischemic Stroke Subtypes: The Japan Public Health Center-Based Prospective (JPHC) Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Epidemiol	6. 最初と最後の頁 325～333
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2188/jea.JE20170298	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 Yoshida Y, Hiwasa T, Machida T, Kobayashi E, Mine S, Matsushima J, Takiguchi M, Iwadata Y	4. 巻 58
2. 論文標題 Elevation of Autoantibody in Patients with Ischemic Stroke	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurol Med Chir	6. 最初と最後の頁 303 ~ 310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/nmc.ra.2018-0022	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 Wang H, Zhang XM, Tomiyoshi G, Nakamura R, Shinmen N, Hiwasa T, et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 Association of serum levels of antibodies against MMP1, CBX1, and CBX5 with transient ischemic attack and cerebral infarction	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 5600 ~ 5613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.23789	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 Yoshida Y, Wang H, Hiwasa T, Machida T, Kobayashi E, Mine S, Tomiyoshi G, Nakamura R, Shinmen N, Kuroda H, Takizawa H, Kashiwado K, Kamitsukasa I, Shin H, Wada T, Aotsuka A, Nishi E, Ohno M, Takemoto M, Yokote K, Takahashi S, Zhang XM, Takiguchi M, Iwadata Y	4. 巻 9
2. 論文標題 Elevation of autoantibody level against PDCD11 in patients with transient ischemic attack	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 8836 ~ 8848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.23653	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 Ikeda A, Iso H, Yamagishi K, Iwasaki M, Yamaji T, Miura T, Sawada N, Inoue M, Tsugane S; JPHC Study Group	4. 巻 277
2. 論文標題 Plasma tea catechins and risk of cardiovascular disease in middle-aged Japanese subjects: The JPHC study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Atherosclerosis	6. 最初と最後の頁 90 ~ 97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.atherosclerosis.2018.08.001	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 柿崎真沙子、澤田典絵、山岸良匡、八谷寛、斉藤功、小久保喜弘、磯博康、津金昌一郎、康永秀生	4. 巻 65
2. 論文標題 DPCデータを用いた脳卒中・急性心筋梗塞発症把握の可能性の検討	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本公衆衛生雑誌	6. 最初と最後の頁 179 ~ 186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11236/jph.65.4_179	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 Zhang XM, Wang H, Mine S, Takemoto M, Yokote K, Kitamura K, Kobayashi Y, Machida T, Kobayashi E, Yoshida Y, Matsutani T, Iwadate Y, Tomiyoshi G, Nakamura R, Shinmen N, Kuroda H, Hiwasa T	4. 巻 8
2. 論文標題 Association of Serum Anti-Prolylcarboxypeptidase Antibody Marker with Atherosclerotic Diseases Accompanied by Hypertension	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Mol Biomark Diagn	6. 最初と最後の頁 361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4172/2155-9929.1000361	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 Hiwasa T, Tomiyoshi G, Nakamura R, Shinmen N, Kuroda H, Kunimatsu M, et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Serum SH3BP5-specific antibody level is a biomarker of atherosclerosis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Immunome Res	6. 最初と最後の頁 132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Nakamura R, Tomiyoshi G, Shinmen N, Kuroda H, Kudo T, Hiwasa T, et al.	4. 巻 3
2. 論文標題 An anti-deoxyhypusine synthase antibody as a marker of atherosclerosis-related cerebral infarction, myocardial infarction, diabetes mellitus, and chronic kidney disease	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 SM J Cardiol Cardiovasc Dis	6. 最初と最後の頁 1008s
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Matsumura T, Terada J, Kinoshita T, Sakurai Y, Yahaba M, Ema R, Amata A, Sakao S, Nagashima K, Tatsumi K, Hiwasa T	4. 巻 13
2. 論文標題 Circulating Anti-Coatomer Protein Complex Subunit Epsilon (COPE) Autoantibodies as a Potential Biomarker for Cardiovascular and Cerebrovascular Events in Patients with Obstructive Sleep Apnea	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Clin Sleep Med	6. 最初と最後の頁 393 ~ 400
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5664/jcsm.6488	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 Saito I, Yamagishi K, Kokubo Y, Yatsuya H, Iso H, Sawada N, Inoue M, Tsugane S	4. 巻 265
2. 論文標題 Association of high-density lipoprotein cholesterol concentration with different types of stroke and coronary heart disease: The Japan Public Health Center-based prospective (JPHC) study	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Atherosclerosis	6. 最初と最後の頁 147 ~ 154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.atherosclerosis.2017.08.032	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 Kubota Y, Iso H, Yamagishi K, Sawada N, Tsugane S; JPHC Study Group	4. 巻 48
2. 論文標題 Daily Total Physical Activity and Incident Stroke	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Stroke	6. 最初と最後の頁 1730 ~ 1736
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/STROKEAHA.117.017560	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 Kubota Y, Iso H, Yamagishi K, Sawada N, Tsugane S; JPHC Study Group (Japan Public Health Center)	4. 巻 135
2. 論文標題 Daily Total Physical Activity and Incident Cardiovascular Disease in Japanese Men and Women	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Circulation	6. 最初と最後の頁 1471 ~ 1473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.026557	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 Dong JY, Iso H, Yamagishi K, Sawada N, Tsugane S; Japan Public Health Center-based Prospective Study Group	4. 巻 260
2. 論文標題 Chocolate consumption and risk of stroke among men and women: A large population-based, prospective cohort study	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Atherosclerosis	6. 最初と最後の頁 8~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.atherosclerosis.2017.03.004	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 日和佐隆樹
2. 発表標題 疾患抗体マーカーの探索
3. 学会等名 第14回日本臨床プロテオーム研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田陽一、日和佐隆樹、小林英一、峯清一郎、町田利生、瀧口正樹、岩立康男
2. 発表標題 一過性脳虚血発作に対応するprogrammed cell death 11抗体の同定
3. 学会等名 第76回日本脳神経外科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 日和佐隆樹、後藤憲一郎、張曉萌、新免奈津子、杉山隆夫、峯清一郎、西英一郎、大野美紀子、竹本稔、北村健一郎
2. 発表標題 急性期脳梗塞の患者血清におけるFOXJ2自己抗体レベルの上昇
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 / ConBio2017 (第40回日本分子生物学会・第90回日本生化学会 合同大会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 脳梗塞の発症リスクを高感度に検出する体液抗体バイオマーカー	発明者 日和佐隆樹、山岸良 匡、津金昌一郎、澤 田典絵、磯博康、他	権利者 千葉大、国立が ん研究C、筑波 大、大阪大、他
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-230639号	出願年 2017年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 脳梗塞の診断マーカー	発明者 後藤憲一郎、日和佐 隆樹、松村竜太郎、 杉山隆夫	権利者 日和佐隆樹
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-050502	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔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	山岸 良匡 (Yamagishi Kazumasa) (20375504)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	
研究 分担者	日和佐 隆樹 (Hiwasa Takaki) (30260251)	千葉大学・大学院医学研究院・特任准教授 (12501)	
連携 研究者	澤田 典絵 (Sawada Norie) (00446551)	国立研究開発法人国立がん研究センター・社会と健康研究セ ンター・室長 (82606)	