

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592110

研究課題名(和文)脳卒中バイオマーカー(miRNA, oxLDL, LOX-1, sRAGE)の検証

研究課題名(英文)Clinical implication of biomarker for patients with acute stroke

研究代表者

横田 千晶(YOKOTA, Chiaki)

独立行政法人国立循環器病研究センター・病院・医長

研究者番号：80300979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：脳卒中急性期入院例を対象として採血を行い、脳卒中の診断、予後に関連するバイオマーカーについて検討した。発症3日以内の急性期脳卒中例と吹田コホート例に対して採血を行い、血糖(終末糖化産物受容体関連物質、ペントシジンなど)と脂質(sLOX-1)に関するバイオマーカーを測定した。その結果、脳卒中例でのペントシジン値は、急性期～亜急性期にかけて変動せず、脳梗塞であるカットオフ値は114pmol/mL以上で感度0.798、特異度0.800ともに良好であった。sLOX-1は急性期脳梗塞で1週間以内は高値であるが、3ヶ月後には低下し、脳梗塞発症のマーカーとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：A secreted isoform of receptor for advanced glycation end products (sRAGE) involves sRAGE and endogenous sRAGE (esRAGE). Pentosidine is one of an advanced glycation end product (AGE). Lectin-like oxidized LDL receptor 1 is responsible for the uptake of oxidized LDL and is released to serum in part as the soluble form (sLOX-1). Few studies addressed the pivotal roles of the AGEs-RAGE system or sLOX-1 in acute stroke patients. We measured plasma sRAGE/esRAGE, pentosidine, and sLOX-1 levels associated with clinical features in acute stroke. Both plasma sRAGE and esRAGE levels correlated with estimated glomerular filtration rate. Higher levels of plasma pentosidine compared with normal were demonstrated in patients with acute stroke. The cut off value 114 pmol/mL of pentosidine has high sensitivity (0.798) and specificity (0.800) for acute stroke. High level of sLOX-1 was examined within a week after the onset of ischemic stroke, however, they decreased at 3 month.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：終末糖化産物受容体関連物質 ペントシジン LOX-1 吹田コホート 急性脳卒中

## 1. 研究開始当初の背景

脳卒中診療における重要な点は、「正確な診断」、「的確な病態把握」、「予後予測」に基づいた「適切な治療選択」にある。2005年10月より脳梗塞超急性期患者に対する遺伝子組み換え組織プラスミノゲンアクチベーター (recombinant tissue plasminogen activator; rt-PA) 静注療法が認可されて以来、脳卒中発症後の「迅速な診断」がより一層重要となった。また最近、一過性脳虚血発作 (Transient ischemic attack; TIA) は発症早期に完成型脳梗塞を発症するリスクが極めて高いことから、救急に対処すべき疾患として捉えられるようになってきた。TIA を正確に診断するのは、脳卒中専門医であっても必ずしも容易とはいえない。脳障害の血中バイオマーカーは、画像に現れない脳組織障害、血栓栓病態の診断に有用である可能性がある。脳卒中病態に関しては、脳卒中発症後、血栓線溶系の活性に伴い、ダイナミックに血行動態が変化する場合が多く、「的確な病態把握」には、専門的な脳卒中診療の経験、技術を要する。治療選択の際には、「正確な診断」、「的確な病態把握」に加え、機能予後、他の心血管疾患も含めた再発リスク、生命予後の予測が不可欠である。現在、「診断」、「病態把握」に関しては、臨床症候、画像診断を中心として判断されているが、「再発・予後予測」に関しては、判断根拠となる有用なバイオマーカーはない。脳卒中が国民病の一つであることから、脳卒中の非専門病院であっても用いることが出来る、急性期脳卒中の「診断」、「病態把握」、「予後予測」に対する血中バイオマーカーの同定は、脳卒中診療における重要な課題のひとつである。

連携研究者の Sawamura らは、酸化 LDL 受容体である LOX-1 を同定し (Sawamura T, et al: Nature 1997; 386: 73-77)、動物実験より、血中総 LDL コレステロールよりむしろ酸化 LDL 単独の低下が動脈硬化進展を抑制することを見出した (Ishigaki Y, et al: Circulation 2008)。分担研究者の Kokubo らは、吹田コホート研究より、脳卒中と酸化 LDL、可溶性 LOX-1 とは正相関があることを報告した (Inoue, et al. Clin Chem. 2010)。酸化 LDL、可溶性 LOX-1 (sLOX-1) は、動脈硬化性疾患の血栓病態、すなわち凝固線溶病態を反映している可能性がある。

申請者は、急性期脳卒中例を対象に、血中 sRAGE 濃度と病型、重症度、機能予後との関連を調べた。sRAGE 低値は、MRI 上の重症白質病変、入院時の重症度 (NIHSS score 高値)、喫煙習慣と正の関連を有したことから、AGE-RAGE シグナルは、重症白質病変における神経損傷の進展に寄与している可能性があると考えられた (Yokota C, et al.: J Neurol Sci 287, 2009)。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者らの研究をもとに着

想した血中バイオマーカー、sLOX-1、RAGE 関連物質が脳卒中の「診断」、「病態把握」、「予後予測」に対して有用であるかを検討することである。

## 3. 研究の方法

### (1) RAGE 関連物質

sRAGE, esRAGE: 2007年12月~2009年10月に入院した急性期脳卒中 381例 (男性 227例、平均 72歳) を前向き登録した。発症 3日以内に測定した sRAGE、esRAGE を三分位に分けた。

Pentosidine (PENT): 2008年8月~2010年12月に入院した急性期脳梗塞 (患者群) 401例のうち 60~84歳の 282例 (男性 189例、平均 73歳) とその病型別性・5歳階級年齢比例配分させた吹田研究の対照者 80例を対象とした。患者群は発症 3日以内に採血した。

sRAGE, esRAGE, Pentosidine: 2013年6月から 2013年11月に当院に入院した急性期脳卒中 100例 (男性 52例、73±12歳) の発症 3.2±1.8日 (第1採血) と 14.7±1.6日 (第2採血) に採血を行い、各バイオマーカー値の変動を調べた。

### (2) sLOX-1

2008年8月から 2010年8月に当院に入院した発症 3日以内の急性期脳梗塞患者連続 420例 (男性 257例、74±11歳) と吹田コホート 1004例 (男性 430例、62±9.5歳) を対象とした。sLOX-1 の採血はケース群では発症後 3日以内の、コントロール群では任意の早朝空腹時に施行した。

2010年2月~4月に発症 3時間以内で入院となった虚血性脳卒中連続 20例 (男性 13例、平均 76歳) に対して、入院時、6時間、12時間、1日、2日、7日、90日に採血を行って sLOX-1 の変動を調べた。

## 4. 研究成果

(1) 脳梗塞、TIA、脳出血は、247、39、95例で、sRAGE/esRAGE の中央値は 891/250、853/270、728/200pg/ml であった。sRAGE は、単変量解析では、年齢、喫煙習慣、body mass index (BMI)、心房細動 (AF)、推算糸球体濾過率 (eGFR)、入院時 NIHSS と関連し、多変量解析では、sRAGE 低値が eGFR 正常 (90ml/min/1.73m<sup>2</sup>) とのみ関連した (OR; 2.81, 95%CI; 1.62-4.87)。esRAGE は、単変量解析では年齢、喫煙習慣、BMI、AF、脳出血、入院時拡張期血圧値、HDL コレステロール値、eGFR と関連し、多変量解析では、esRAGE 低値と喫煙習慣があること (1.39, 1.03-1.88)、AF 合併率が低いこと (0.43, 0.23-0.81)、拡張期血圧高値 (1.02, 1.001-1.03)、eGFR 正常 (2.01, 1.17-3.64) が関連した。以上より、脳卒中急性期の血中 sRAGE、esRAGE 濃度はともに eGFR と関係した。sRAGE 低値よりもむしろ esRAGE 低値が、動脈硬化のマーカーとなる可能性があると考えられた。

(1) アテローム血栓性脳梗塞 (ABI) 47例、ラクナ梗塞 (LC) 54例、心原性脳塞栓 (CES) 92例、

その他脳梗塞(OT)89例であったがみられた。症例、対照群の順に、高血圧(80 vs、53%、 $p < 0.001$ )、糖尿病(28 vs、15%、 $p = 0.019$ )の頻度は患者群で有意に高く、喫煙者(23、11%、 $P = 0.03$ )は患者群で有意に高かった(23 vs 11%、 $p = 0.027$ )。血中PENT値(平均 $\pm$ SD)はケースで有意に高かった( $171 \pm 81$  vs  $92 \pm 33$  pmol/mL、 $p < 0.001$ )。PENTの平均値は、対照群( $92 \pm 33$  pmol/mL)と比べ、各病型別血中PENT値の方が高値であった(ABI  $143 \pm 60$ 、LC  $169 \pm 98$ 、CES  $185 \pm 89$ 、OT  $173 \pm 67$  pmol/mL)であった。軽症例(124例;  $170 \pm 75$  pmol/mL)、と非軽症例(154例;  $172 \pm 85$  pmol/mL)との間では血中PENT値は両者に有意差はなかった( $170 \pm 75$  vs  $172 \pm 85$  pmol/mL)。ROC分析解析により、脳梗塞のための血中PENT値のカットオフ値は114 pmol/mL以上で感度0.798、特異度0.800、AUC 0.885であった。以上より、血中PENT 114 pmol/mL以上は脳梗塞発症に対して高リスクである。急性期病型別脳梗塞において、血中PENT値は対照群と比べて高値であり、感度特異度も比較的良好であった。

(1) 脳梗塞59例、TIA 8例、脳出血33例であった。第1採血の虚血性脳卒中(脳梗塞、TIA)のsRAGE/esRAGE、PENTは各々、 $1311 \pm 764/290 \pm 182$  pg/mL、 $163 \pm 77$  pmol/mL、脳出血では $841 \pm 430/166 \pm 81$  pg/mL、 $143 \pm 52$  pmol/mLであり、sRAGE/esRAGEは脳出血の方がいずれも低値であった。PENTは両者に有意差はなかった。虚血性脳卒中ではsRAGE、esRAGE、PENTいずれも第1採血、第2採血の値に有意差は見られず、脳出血でのPENTにも有意差はなかった。脳出血のsRAGE、esRAGEでは、第2採血値が第1採血値に比べて有意に高かった(sRAGE  $841 \pm 430$  vs  $954 \pm 469$ 、 $p = 0.037$ 、esRAGE  $166 \pm 81$  vs  $219 \pm 105$ 、 $p < 0.001$ )。従って、PENT値は脳卒中病型別、発症後の採血時期別に有意差はなかったが、sRAGE、esRAGEは急性期に低下している可能性がある。

(2) ケース群の内訳はABI61例、LC75例、CES142例、OT142例であった。sLOX-1の測定値はケース群で102-6,167 (mean 777, median 527) ng/L、コントロール群で104-12,142 (mean 623, median 481) ng/Lであった。sLOX-1を四分位に分け、第4四分位と比較した場合の第1四分位の脳梗塞発症オッズ比は性、年齢、BMI、飲酒、喫煙、高血圧、糖尿病、脂質異常症で補正後、全脳梗塞1.72 (1.10-2.69  $p = 0.015$ )、ABI 3.74 (1.41-10.4  $p = 0.008$ )、CES 2.38 (1.28-4.46  $p = 0.006$ )、LC 1.82 (0.78-4.23  $p = 0.16$ )、OT 0.76 (0.47-1.26  $p = 0.29$ )であった。sLOX-1高値は独立して脳梗塞発症と関連し、特にABIやCESと強い関連を示した。

(2) sLOX-1値は入院時、7日後、90日後で $242 \pm 84$ 、 $192 \pm 53$ 、 $167 \pm 39$  ng/Lであり、1週間以内に比べて3ヶ月後は有意に低下した。sLOX-1高値は脳梗塞発症マーカーとなる可

能性がある。

#### 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. Itabashi R, Yokota C, Yakushiji Y, Minematsu K : Predictors of an increase in the number of cerebral microbleeds after a first-ever stroke. Euro J of internal Med, 23: e208-e209, 2012. (査読あり)
2. Nagasawa H, Yokota C, Toyoda K, Ito A, Minematsu K: High level of plasma adiponectin in acute stroke patients is associated with stroke mortality. J Neurol Sci, 304: 102-106, 2011. (査読あり)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 横田千晶, 小久保喜弘, 宮本恵宏, 豊田一則, 峰松一夫: 急性期脳梗塞例における血中ペントシジンの臨床的意義: 吹田研究との比較. 第25回日本脳循環代謝学会総会. 札幌, 2013年11月1-2日
2. Fukuda M, Yokota C, Kokubo Y, Sawamura T, Miyamoto Y, Toyoda K, Minematsu K: Elevated Serum Soluble Lectin-like Oxidized LDL Receptor-1 (sLOX1) is Associated With Increased Ischemic Stroke Risk: A Case-control Study. International Stroke Conference, New Orleans, USA, Feb.1-3, 2012.
3. Yokota C, Fukuda M, Kokubo Y, Miyamoto Y, Toyoda K, Minematsu K: Clinical implications of plasma pentosidine in acute ischemic stroke. Asia Pacific Stroke Conference, Tokyo, Japan, Sep.10-12, 2012.
4. 横田千晶, 福田真弓, 小久保喜弘, 宮本恵宏, 豊田一則, 峰松一夫: 急性期脳梗塞例における血中ペントシジン値の臨床的意義. 第37回日本脳卒中学会総会福岡, 2012年4月26-28日
5. 横田千晶, 福田真弓, 小久保喜弘, 豊田一則, 峰松一夫: 急性期脳梗塞例における血中終末糖化産物ペントシジン値の臨床的意義. 第24回日本脳循環代謝学会総会. 広島, 2012年11月8-9日
6. Yokota C, Fukuda M, Sato K, Toyoda K, Minematsu K : Clinical implications for soluble forms of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in patients with acute ischemic stroke. XXVth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function & Xth International Conference. Barcelona, Spain. May 24-28, 2011.

7. 横田千晶、福田真弓、佐藤和明、豊田一則、峰松一夫: 可溶性終末糖化産物受容体 sRAGE, esRAGE はバイオマーカーとなりえるか: 急性期脳卒中例での検討  
第 36 回日本脳卒中学会総会 京都、  
2011 年 7 月 30 日-8 月 1 日

廣川 剛 (HIROKAWA,Go)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・室長  
研究者番号: 90450890

〔図書〕(計 0 件)

〔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:  
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

横田 千晶 (YOKOTA,Chiaki )  
独立行政法人国立循環器病研究センター・病院・医長  
研究者番号: 80300979

##### (2)研究分担者

小久保 喜弘 (KOKUBO,Yoshihiro )  
独立行政法人国立循環器病研究センター・病院・医長  
研究者番号: 20393217

##### (3)連携研究者

沢村 達也 (SAWAMURA,Tatsuya )  
独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・部長  
研究者番号: 30243033

##### (4)連携研究者

西村 邦宏 (NISHIMURA,Kunihiro )  
独立行政法人国立循環器病研究センター・開発基盤センター・室長  
研究者番号: 70397834

##### (4)連携研究者