

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592121

研究課題名(和文) もやもや病及び類縁疾患に対する新たなバイオマーカーの確立と臨床応用について

研究課題名(英文) Biomarker research for moyamoya disease in cerebrospinal fluid

研究代表者

岡本 奨 (OKAMOTO, Sho)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10378036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：もやもや病患者(MMD)の髄液に対しプロテオミクス解析を行いバイオマーカー候補を発見した。このペプチドはMMDととりわけ小児群において高値を示し、術後の血管新生や血管の狭窄性変化との高い相関関係があった。次にこのペプチドの物質同定を行った。PENK 143-183(uniprotkb: P01210 143-183)であった。Sandwich ELISAにより、MMD群とcontrol群における髄液中の濃度を測定した。PENK 143-183がMMDの髄液中において有意に上昇しておりMMD診断に有効なバイオマーカーとなり得た。今後さらにPENK 143-183の生理活性を明らかにしたい。

研究成果の概要(英文)：We previously discovered elevated levels of m/z 4588 and m/z 4473 peptides in cerebrospinal fluid (CSF) in moyamoya disease(MMD) patients and the age dependent decrease of m/z 4473 peptide, and correlation between m/z 4473 peptide and postoperative angiogenesis were also suggested. These peptides were revealed to be a proenkephalin 143-183. We quantified the concentration of proenkephalin 143-183 in the samples using sandwich ELISA. It was significantly higher in MMD (median 8,270pmol/L) than in control (median 3,760pmol/L) (P<0.001), and decreased as age dependent manner in MMD (r=-0.57; P<0.001). The AUC of the ROC curve in children (age<18 y.o) was 0.085 (95%CI, 0.741-1). A proenkephalin 143-183 in CSF may be a promising diagnostic biomarker, especially in pediatric MMD patients.

The etiology of MMD is unknown, but the effect of enkephalin peptides through opioid growth factor receptor or delta opioid receptor might be associated with the pathophysiology of MMD.

研究分野：脳血管障害

キーワード：バイオマーカー もやもや病 プロテオミクス解析

1. 研究開始当初の背景

(1) もやもや病は原因不明の脳血管疾患で、ウィリス動脈輪閉塞症ともよばれ、両側内頸動脈終末部の緩徐進行性の狭窄や閉塞と脳底部を中心とした拡張した血管(もやもや血管)の出現を特徴とする。発症年齢は5歳を中心とした高いピークと40歳を中心とした低いピークの二峰性を示し、その診断は放射線学的な特徴によってなされる。虚血症状を呈する場合手術が有効で、硬膜を介した血管新生が得られることがもやもや病の特性として示されている。1963年に日本人により初めて報告された疾患で、難病特定疾患に指定されており、およそ本邦で13000人の医療受給者がいる。家族性発症を全体の10-15%に認めることや他の地域と比べ東アジア地域に多い疾患であることから、遺伝的要因がその発症と関連すると考えられている。また、ダウン症候群、レックリングハウゼン病、放射線照射後血管閉塞、動脈硬化性病変、髄膜炎、その他の血管閉塞性疾患なども合併することがあり、その場合には類もやもや病と呼ばれ、もやもや病と類似の病態として扱われる。

(2) もやもや病の病因に関する研究として現在までにさまざまな側面からの研究がなされてきた。病理学的側面からは、血管の中膜から内膜への平滑筋細胞の移動、増殖させる因子として考えられている basic fibroblast growth factor(bFGF)、transforming growth factor-(TGF-)、platelet-derived growth factor(PDGF)、hepatocyte growth factor(HGF)など種々の growth factor や、脳血管障害時に強く発現される intercellular adhesion molecule type1(ICAM-1)、vascular cell adhesion molecule(VCAM-1)などの炎症反応のプロセスで白血球の活性化や、組織への遊走を促進させる adhesion molecules がターゲットとなり、それぞれがもやもや病の患者

で有意に高いことが示された。また家族性もやもや病患者が10%程度存在することより、その発病に遺伝的要因が関連するとも考えられ、3世代にわたり家系内にもやもや病の患者がいる8家系に対して遺伝子解析がされ RNF213 というもやもや病の感受性遺伝子が同定された。しかしまだそれらの遺伝子異常と、病因との関連は明らかにされていない。以上のようにもやもや病の病因に関して種々の側面からの研究がなされているが、未だその biomarker と呼ぶべき因子は特定されていない。その理由としては、これらの因子が直接病因となるのか、単に疾患発症に関連しているのみであるのかが不明であるからである。また、死亡率が少ない疾患であることと、外科的に摘出可能な血管病変の採取が限られていること、動物モデルが存在しないことなどから研究となる対象が限られることも要因として考えられる。

2. 研究の目的

(1) 本研究においては、もやもや病および類もやもや病患者を対象に、手術中に比較的容易に採取される検体として髄液を用い、髄液中に含まれる蛋白の網羅的蛋白質量分析(プロテオミクス)を行い対照群との比較検討を行う。プロテオミクスには Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS)法を採用し、タンパク質専用質量分析装置として Bio-Rad 社製のプロテインチップシステムを用いる。この方法は多数のサンプルの中から迅速に蛋白の発現データを解析可能であり、疾患のメカニズム解明や創薬のターゲット抽出また臨床的には癌の早期診断、進行度および予後予測、感染症の診断、Alzheimer 病やパーキンソン病などの神経疾患の原因解明などに使用され始めている。本研究の目的は、日本人に特有なもやもや病および類もやもや病患者の髄液中の蛋白の分子レベルにお

ける研究を包括的に実施することにより、その治療、診断に応用、貢献することである。質量分析装置は、Bio-Rad 社製の Protein Chip システムを用いる。解析法として SELDI-TOF-MASS 法を採用する。この測定方法を用いて、収集したもやもや病、類もやもや病患者の髄液検体のタンパク質発現プロファイルと比較、あるいはもやもや病、類もやもや病以外の脳脊髄疾患患者の髄液検体との比較をおこない、スペクトルの差異から特有のプロファイルを見出し、もやもや病、類もやもや病のマーカ（シングルマーカ、マルチプルマーカ）を探索することを目標とする。脳脊髄液の bFGF の測定等、単一のファクターの発表はすでに散見されるが網羅的研究はなく、また今回の study design のように類縁疾患も含めグループ分けを行なった報告はない。この研究によりもやもや病の成因や治療予後因子を解明が期待できる。

3. 研究の方法

Protein Chip 法の条件検討を行い最良の検出手法を確立した後、疾患特有のプロファイルを見出し、もやもや病、類もやもや病のマーカ（シングルマーカ、マルチプルマーカ）を探索する。次に、得られたもやもや病や類もやもや病のマーカ情報と、それらの臨床情報（鈴木 stage 分類、治療法と効果、予後等）を詳細に照合し、治療感受性や予後に関する因子を抽出し、scoring system を構築する。

(1) Protein Chip 法の条件検討

ProteinChip SELDI システム（Bio-Rad Laboratories, K.K., Tokyo, Jpn）による網羅的蛋白質質量分析（プロテオミクス）法 ProteinChip にはクロマトグラフィーチップ、活性型チップ、SEND（Surface-Enhanced Neat Desorption）ID チップがあり、目的に応じてどのチップを使用するか検討する必要がある。そのためそれぞれ異なる性質をも

つチップにおいて検体と反応させ、イオン化・レーザー技術を駆使したレーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計（SELDI-TOF MS）を使用し ProteinChip 上に選択的に捕捉された微量のタンパク質を解析した。さらにチップ選択の後、より高い再現性を得られる測定条件を検討した。

ProteinChip SELDI システムによるプロテオミクスには簡便には以下の手順がある。

- サンプルの添加とインキュベーション
- チップの洗浄
- エネルギー吸収分子（EAM）の添加
- ProteinChip リーダーによる測定
- 専用ソフトウェアによる解析

上記においてそれぞれの条件を変更することにより最も最適な解析条件を検討し、その条件にて得られた結果の再現性を確認した。2009 年 1 月から 2012 年 7 月にかけて、我々は脳血管撮影により確定診断した 21 症例の連続したもやもや病、類もやもや病、片側もやもや病（男性 8 症例女性 13 症例 平均 21.3 歳 3 歳-46 歳）から髄液を採取した。対照群の 17 症例（男性 13 症例女性 4 症例 0-58 歳 平均 27.9 歳）から同様に髄液を採取した。すべての髄液サンプルは SELDI-TOF-MS により陰イオン交換樹脂のプロテインチップ（Q10）でバッファ条件を変えて測定をおこない、前回の報告結果¹と比較した。もやもや病群は 19 歳以下（小児もやもや病 12 症例）と 20 歳以上（成人もやもや病 9 症例）の 2 群に分け、それぞれ年齢をマッチさせたコントロール群と比較した。追加的な臨床データとして、術前後の主幹動脈の狭窄閉塞性変化と血管新生の評価をそれぞれもやもや病グレーディングスコアと MRA TOF 画像を用いた方法で点数化した。それぞれの変数についてバイオマーカ候補のペプチドと

の相関関係をピアソンの相関係数の検定、スピアマン順位相関係数検定によって調べた。

<参考文献>

Yoshio Araki, Kazuhiro Yoshikawa, Sho Okamoto, Masaki Sumitomo, Mikio Maruwaka, Toshihiko Wakabayashi.

Identification of novel biomarker candidates by proteomic analysis of cerebrospinal fluid from patients with moyamoya disease using SELDI-TOF-MS:

BMC Neurology 2010, 10:112

(2) 得られた疾患特異的タンパクの同定測定結果を用いて、収集したもやもや病、類もやもや病患者の髄液検体のタンパク質発現プロファイルと比較、あるいはもやもや病、類もやもや病以外の脳脊髄疾患患者の髄液検体との比較をおこない、スペクトルの差異から特有のプロファイルを見出し、もやもや病、類もやもや病のマーカー(シングルマーカー、マルチプルマーカー)を探索する。

SDS-PAGE によるターゲットとするタンパクの分離、In gel digestion、PMF 法(Peptide mass

fingerprinting method)によるアミノ酸配列同定上記により得られた結果から、biomarker の候補となるタンパクを Crude な髄液検体より分離するため、SDS をリガンドとした電気泳動を行い、銀染色後ターゲットとする Molecular weight 付近のバンドの存在を確認した。今後、トリプシンによる In gel digestion を施行し切断されたペプチドを抽出の上、Fingerprinting method によりアミノ酸配列同定を行う。

ÄKTA purifier、SMART SYSTEM(GE Healthcare, Tokyo, Jpn)を用いたタンパク精製 Biomarker の候補となるタンパク量が髄液検体内に pM - fM(10^{-12} - 10^{-15})オーダー程度で存在することが上記 SDS-PAGE などの予備実

験にて得られたため、我々はその同定をすすめるべく以下のような方針でさらに検討した。Crude な髄液検体から上記により得られた Molecular weight のタンパクを精製するため、いくつかのカラムを最適な条件で組み合わせクロマトグラフィーを施行し、それにより精製単離されたターゲットとするタンパクにつき最終的にアミノ酸配列を同定、機能解析を行う。クロマトグラフィーシステムには、ÄKTA purifier、SMART SYSTEMを採用する。このシステムは高精度な流速コントロール、高いシステム耐圧を基本としており、標準的なゲルろ過、イオン交換、アフィニティーへの対応している。ターゲットとする low abundance protein を精製するにあたり、遠心式限外濾過デバイスなどを用いて Crude な髄液検体に含まれる Albumin、IgG などの質量の大きなタンパクを除去しながら、カラムを組み合わせ、事前の最適な条件検討(スカウティング)を行い、アミノ酸解析を実施可能な純度までの精製を短時間で効率的に行う。カラムにはイオン交換カラム、ゲルろ過カラム、逆相カラムなどを適宜組み合わせで使用する。

(3) もやもや病に対する biomarker 定量による予後・治療感受性因子の探索と scoring system の構築

得られたもやもや病や類もやもや病のマーカー情報と、それらの臨床情報(鈴木 stage 分類、治療法と効果、予後等)を詳細に照合しもやもや病の確定診断因子(現在の確定診断は、画像情報に加え除外診断としてダウン症候群、レックリングハウゼン病、放射線照射後血管閉塞、動脈硬化性病変、髄膜炎、その他の血管閉塞性疾患などの合併のないこととしている。)の検出や治療感受性や予後に関する因子を抽出し、scoring system を構築する。

4. 研究成果

(1) 髄液のプロテオミクス解析により複数のバイオマーカー候補が得られた。その中で pH5 pH7 バッファー条件下において 4473Da のペプチドが小児もやもや病、成人もやもや病両方において有意差が見られ、小児もやもや病の患者においてより高いピークを示した。4473Da ペプチドのピークは年齢依存的な直線的減少を示し、4473Da ペプチド-年齢のプロットと術前後の MRA score の差-年齢、angiogenesis score-年齢のプロットがそれぞれ高い相関関係を示した。(P=0.0008, P=0.001 R=0.68) つまり、4473Da ペプチドの分布は術後の血管新生や血管の狭窄性変化に高い相関関係が示された。この結果、もやもや病の診断バイオマーカーとして高い感度、特異度を示した。

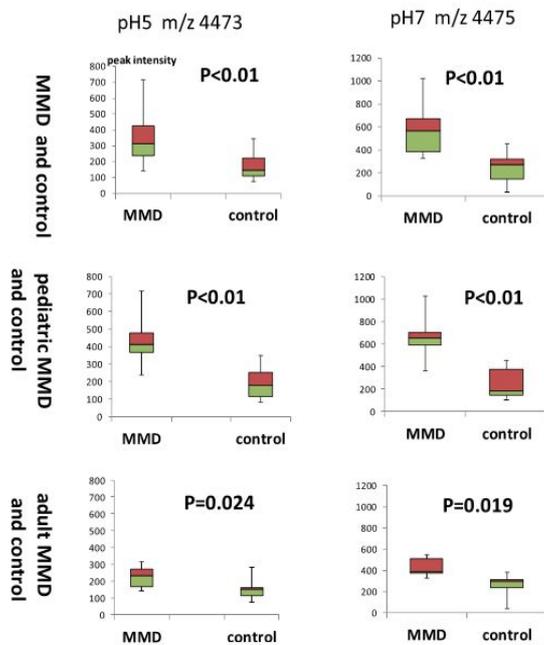


図1 MMD バイオマーカーピーク値

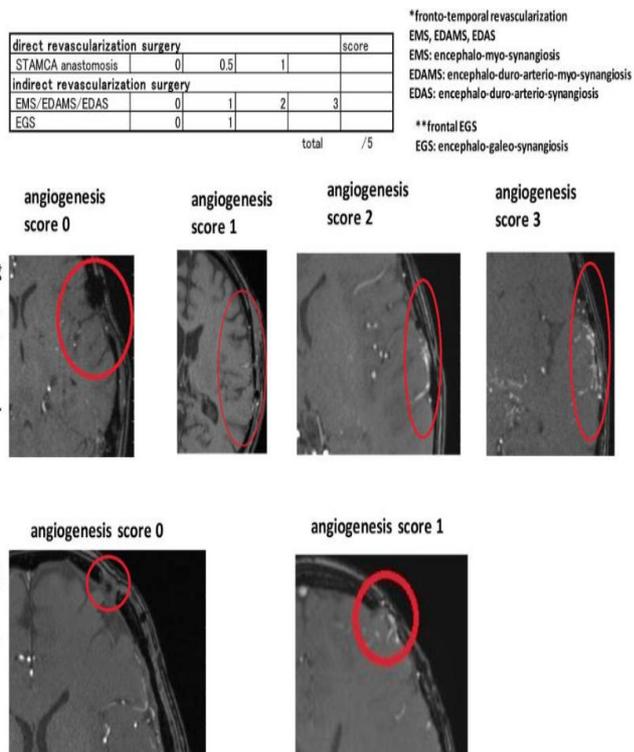


図2 間接結構再建術後の血管新生スコア

(2) 4 kDa のペプチドの精製、物質同定精製、Trypsin 消化した m/z 4588, m/z 4473 の断片 peptide を LC-MS/MS によりイオンを開裂させ、得られた mass spectrum に対し MS-Tag を用いたデータベース検索を行った。その結果、4 種類の Trypsin 消化断片が生じており、これらは PENK 143-183(uniprotkb: P01210 143-183)を構成する peptide であった。化学発光基質を用いた Sandwich ELISA により、MMD 群と control 群における髄液中の PENK 143-183 濃度を測定した。MMD 群は control 群に比べて有意に上昇していた(P<0.001)。小児(age<18 y.o)および成人(age 18 y.o)に分けて比較した場合でも、MMD 群において PENK 143-183 濃度は有意に上昇しており、小児(P<0.001)の方が成人(P<0.01)より顕著であった。MMD 患者 17 例、19 側の手術時に採取した血清検体中の PENK 143-183 濃度を Sandwich ELISA を用いて測定した。測定感度の下限は 12.5pmol/L であった。これらの患者で髄液濃度と血清濃度との相関関係を調べたところ、有意な相関は認

められなかった($r=0.149$, $p=0.53$)。今回の研究で我々は、髄液中の pH 5 m/z 4588 と pH 7 m/z 4473 のペプチドが、ともに PENK 143-183 を構成することを明らかにした。免疫学的アッセイ法を用いて MMD と非 MMD 患者の髄液中の PENK 143-183 の濃度の定量を行い、PENK 143-183 がもやもや病患者の髄液中において明らかに(significant)上昇しており髄液中の PENK 143-183 が MMD 診断に有効なバイオマーカーとなり得ることを示した。今後 PENK 143-183 の生理活性を明らかにすることが必要であると考えられた。

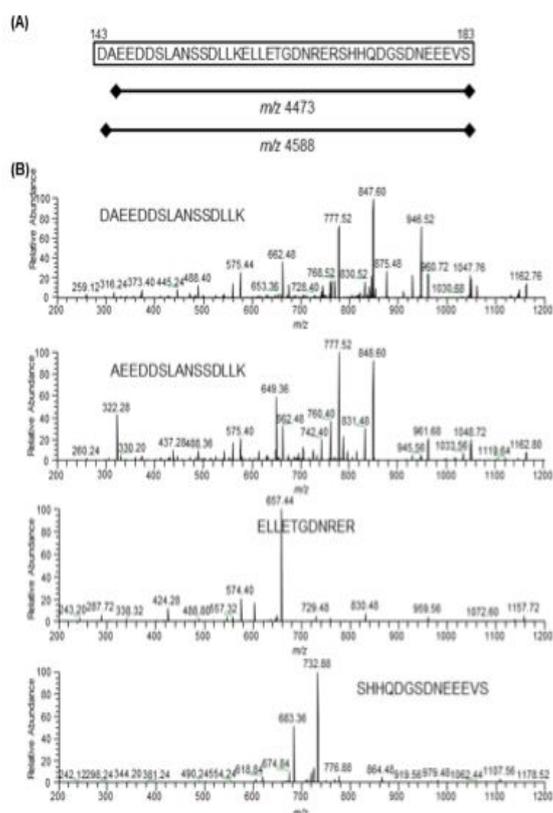


図3 PENK 精製、同定。4つのフラグメント

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1件)

Mikio Maruwaka, Kazuhiro Yoshikawa, Sho Okamoto, Yoshio Araki, Masaki Sumitomo, Akino Kawamura, Kinya Yokoyama, Toshihiko Wakabayashi. Biomarker Research for Moyamoya Disease in Cerebrospinal Fluid Using Surface-enhanced Laser

Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry. J Stroke Cerebrovasc Dis. Jan;24(1):104-11,2015

査読あり

[学会発表](計2件)

横山欣也、岡本奨、園若幹夫、清水賢、坂本悠介、宇田憲司、太田慎次、和田健太郎、村岡真輔、荒木芳生、吉川和宏、若林俊彦：もやもや病患者における髄液中での神経ペプチドの上昇と病態生理についての考察、第74回日本脳神経外科学会総会、2015年10月14日～10月16日、ロイトン札幌(北海道 札幌市)

横山欣也、岡本奨、園若幹夫、清水賢三、坂本悠介、宇田憲司、太田慎次、和田健太郎、村岡真輔、荒木芳生、吉川和宏、若林俊彦：もやもや病患者における髄液中での神経ペプチドの上昇と病態生理についての考察、第74回日本脳神経外科学会総会、2015年8月28、アクトシティ浜松(静岡県 浜松市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 奨 (OKAMOTO, Sho)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：10378036

(2) 連携研究者

吉川和宏 (YOSHIKAWA, Kazuhiro)
愛知医科大学・高度研究機器部門・特任教授
研究者番号：60109759