脳梗塞バイオマーカー探索研究 REBIOS (Research for Biomarkers in Ischemic Stroke) における成果と今後 —Biomarker を用いた reverse translational research を中心に—

鈴木 一夫¹⁾, 北園 孝成²⁾

要約: 発症 24 時間以内の脳梗塞患者 (ラクナ梗塞, アテローム血栓性脳梗塞, 心原性脳塞栓症) 180 名と, 年齢と性をマッチングした健常者 172 名を対照とし, 100 項目の血中タンパク質マーカーの経時的測定と新規マーカー探索を実施した. 脳梗塞各病型に特異的あるいは共通する多くのマーカーが見出され, 脳梗塞の病態解明に有用であることが期待される. さらにサル脳梗塞モデルを用いて, 臨床データとの類似点や相違点を明確にすることができた. 臨床バイオマーカーの探索結果をもとに, 動物実験や細胞実験といった基礎研究でその機能を検証する reverse translational research は, 脳梗塞の病態解明に有用であるとともに, 新たな脳梗塞治療戦略の構築に有意義であると考えられた.

はじめに

脳卒中はわが国において心疾患に次いで第 3 位の死亡原因となっているのみならず⁽¹⁾, 身体機能障害や言語障害などの重篤な後遺症のために日常生活に大きな困難を伴う場合が多く, 日本における寝たきりの最も大きな原因となっている. 今後, 高齢化が進み, 生活習慣病が増加することが予想されており, 脳卒中 (特に脳梗塞) は益々増加することが予想され社会に与える影響は甚大である.

脳梗塞の予後 (日常生活への復帰度) を改善するためには, 専門施設への早期搬送, 迅速な診断とそれに基づく早期治療が重要であり, そのために種々の画像診断技術が開発されているが, いまだ不十分であり, 血液検査を含めた新たな診断技術の開発が望まれている.

九州大学および久山生活習慣病研究所は, 本邦における脳卒中に関するエビデンスを構築することを目的に, 多施設共同脳卒中登録研究である福岡脳卒中データベース研究 (Fukuoka stroke registry: FSR) を行っている. さらに, FSR と三菱化学ならびにモレキュエンスの共同研究として, 脳梗塞バイオマーカー探索研究 (Research for Biomarkers in Ischemic Stroke: REBIOS) を行っている. 本稿では, 臨床研究 REBIOS

で見出したバイオマーカーと動物モデルを中心とした基礎研究への橋渡し研究 (reverse translational research) を中心に紹介する.

1. 臨床研究 REBIOS での脳梗塞関連マーカーの発見とバイオマーカーによる疾患解析

1) 臨床検体からのバイオマーカー探索のストラテジー

脳梗塞に関連するバイオマーカーは, これまでさまざまな報告が行われている (2-7). しかしながら, 過去の報告では研究デザイン, 試験規模, サンプルサイズなど不十分な点も多く, 臨床応用されたタンパク質マーカーは未だ存在しない. 本臨床研究では, 九州大学病院腎・高血圧・脳血管内科, 国立病院機構九州医療センター脳血管内科 (福岡市), 聖マリア病院脳血管内科 (久留米市) に入院した発症 24 時間以内の脳梗塞患者 180 名 (ラクナ梗塞, アテローム血栓性梗塞, 心原性脳塞栓症の 3 群) を前向きに登録し, 年齢および性をマッチングさせた久山町 (福岡県) 在住の健常者 172 名を対照として解析を行った. 採血は発症 24 時間以内, 3 日後, 7 日後, 14 日後あるいは退院時, 3 ヶ月後に行い, 同時に神経症状重症度の指標である NIH Stroke Scale (NIHSS) を評価した. 14 日後, 3 ヶ月後には日常生活活動度 (activity of daily living: ADL) を modified Rankin Scale を用いて評価した. 三菱化学メディエンス社において 16 項目, 米国 RBM 社 Human MAP-Antigens (version 1.6) により 90 項目の血中タンパク質を測定するとともに, モレキュエンス社においてプロテオミクスの手法を用いて未知のタンパク質マーカーを探索した. さらに臨床研究と同時に細胞・動物モデルでの検証実験を実施してきた.

2) 疾患, 病型における共通マーカーおよび個別マーカー

100 の測定項目の中で脳梗塞と関連性があると思われるタンパク質の変動を経時的に観察すると, いくつかの変動パターンに分類された. すなわち, 一過性上昇パターン, 持続性上昇パターン, 慢性期上昇パターンである (8). また, 脳梗塞の 3 つの臨床病型につい

キーワード: レビオス研究, 脳梗塞バイオマーカー, リバーストランスレーショナルリサーチ

¹⁾ (株)モレキュエンス (〒227-8502 横浜市青葉区鴨志田町1000 三菱化学横浜リサーチパーク内) E-mail: 1904802@cc.m-kagaku.co.jp

²⁾ 九州大学 大学院 医学研究院 病態機能内科学 (第二内科) (〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1)

E-mail: kitazono@intmed2.med.kyushu-u.ac.jp

Title: New findings about plasma Biomarkers from the Research for Biomarkers in Ischemic Stroke. Reverse Translational Research using multiple clinical biomarkers. Author: Kazuo Suzuki, Takanari Kitazono 原稿受領日: 2011 年 1 月 27 日, 依頼原稿

て解析すると、それぞれの病型に特有の変動を示すタンパク質存在が明らかになった。当初、梗塞サイズが小さく血中タンパク質の変動が小さいことを予測していたラクナ梗塞でも特異的に変動する多くのタンパク質があり、脳梗塞発症後のバイオマーカーの変動は予想外に複雑であることが推測された。

また、病型に共通に変動するマーカーがある一方、個々の患者によってその変動パターンや変動幅が大きく異なるマーカーも数多く認められ、これらの詳細な解析は患者毎の診断・治療、あるいは薬剤の評価に役立つ可能性が示唆された。以下に代表的な結果を紹介する。

3) 脳梗塞の診断のためのバイオマーカー

救急搬送された患者が脳梗塞であるのか、あるいは、他の疾患（神経変性疾患、耳鼻科疾患、循環器疾患など）であるのかの判別は、緊急かつ正確に行うことが求められる。たとえば、本研究から VEGF はいずれの病型を問わず感度 82%、特異度 76% で脳梗塞を診断することができた(9)。また、他の複数のタンパク質を組み合わせることで、より診断精度を高めることができ (multi-markers)、さらに、臨床所見のデータを合わせて勘案することで、高い確率で脳梗塞の診断を確定することが可能であった。

4) 進行性脳梗塞バイオマーカー

入院数日後に病態が悪化する進行性脳梗塞は、脳梗塞患者の約 10~20% に認められ (FSR, 未発表データ)、現在まで有効な診断予測手段がなく治療上問題となっている。全患者の中から患者背景には差が無い進行性患者群と回復患者群の 2 つのサブグループを設定しバイオマーカーを探索した結果、進行性患者群で血中のフェリチンレベルが発症直後より 1 週間目にかけて急激に上昇し 2 倍にまで達した (図 1)。一般に、フェリチンは細胞内、トランスフェリンは血液中での鉄代謝を担っているとされている。鉄イオンは傷害性のある活性酸素を生成することが報告されており、進行性脳梗塞患者の神経症状悪化と時期を同じくした血中フェリチンの急激な増加は、脳組織の傷害を示している可能性もある。

5) 予後予測マーカー

脳梗塞患者の ADL を早期に予測することは、各患者の治療方針の決定や、脳梗塞治療薬の効果を早期に予測する上で有用なマーカーと考えられる。そこで発症 3 ヶ月後における予後良好群と予後不良群の患者の中から、入院時における年齢、性別、既往、入院時重症度等の背景が同一のサブグループを設定し、バイオマーカーを探索した。その結果、IL-7, FGF-basic, stem cell factor (図 2) など組織 (血管・神経) 修復に関係することが報告されている一連のタンパク質が、予後不良群では良好群に比し急性期~慢性期を通じて有意に低値であることを見出した。現在これらのタンパク質の変動が各病態の進行にどのように関係しているのかを各種細胞系および動物モデルを用いて検討中であり、今後順次、結果を発表する予定である。

図 1 進行性脳梗塞予測マーカーの例

図 2 予後予測マーカーの例

6) バイオマーカーによる疾患解析

前述のような疾患・病型の解析と並行して、100 のタンパク質を炎症、免疫、血栓・線溶系、組織傷害、動脈硬化、代謝関連等の機能別カテゴリーに分け、急性期 (入院時) から慢性期 (3 ヶ月後) までの変動パターンを俯瞰した。入院時から 1 週間目にかけて、これまでの報告にあるように、炎症に関連したタンパク質 (10)、続いて免疫系、組織傷害性を示す様々なタンパク質 (11) が数倍の高値を示した。驚くべきことに、組織保護・修復機能が報告されている多くのタンパク質も脳梗塞発症 24 時間以内から健常人の数倍にも上昇していた。退院時 (発症 2 週間後) においても、ほとんど全てのカテゴリーのタンパク質が高値であった。さらに発症 3 ヶ月後でも、病態悪化に関連するタンパク質や、逆に病態回復に関連するタンパク質が、依然として大きく変動していることが明らかになった。これまでは脳梗塞の病態進行に関連する反応は亜急性期の 2~4 週間程度で一応の終息をむかえと考えられており、脳梗塞の治療は急性期を中心に行われ、その後は再発予防、リスク管理およびリハビリテーションが治療の主体であった。ところが本研究では、従来の認識とは異なり発症 3 ヶ月後においても多くのマーカーが大きく変動しており、梗塞部位周辺では依然として様々な反応が持続していると考えられた。このことは慢性期においても積極的に治療介入する余地があることを示唆しており、薬剤開発はもちろん、再生医療などを含めた新たな治療戦略構築の可能性がある (図 3)。

図3 脳梗塞治療のパラダイムシフト

2. Reverse Translational Research —臨床バイオマーカーを用いた動物モデルの プロファイリング—

一般に病態動物モデルは、その疾患に関する特定の標的タンパク質、遺伝子変動、疾患の表現型や病理学的評価、さらに種々のアゴニスト、アンタゴニストや薬剤への反応性等の薬理学的手法を用いてヒトの疾患・病態と比較し、病態動物モデルとしての評価、特徴づけが行われ使用されてきた。前述のようにREBIOSで100項目以上のバイオマーカーを経時的測定した結果、ラクナ梗塞、アテローム血栓性脳梗塞、心原性脳塞栓症の3つの病型に共通および各々に特徴的なタンパク質群の変動があること、また、急性期から慢性期にかけて各病型に特徴的な経時変化があること、さらに発症後3ヵ月の時点においても引き続き多くの血中タンパク質が大きく変動していることが観察された。

今回患者より得られた血中のタンパク質（バイオマーカー）の変動の知見を基に脳梗塞動物モデルと実際の疾患との類似点、相違点を明らかにするため、プロファイリングを実施した。我々は、このような「臨床研究」における知見・成果を動物モデルや細胞系などの「基礎研究」へフィードバックする橋渡し研究を特に「Reverse Translational Research」と呼び、バイオマーカーを用いた疾患モデルの評価を進めている。

1) 脳梗塞動物モデルでのバイオマーカー変動

脳梗塞モデルは主にマウス、ラットおよびサルが使用されているが、今回はタンパク質の構造および機能面でヒトとのホモロジーが高く、経時的採血が可能であり、さらに意識レベル、知覚、手足の麻痺および姿勢・行動など高次の神経症状を観察できるカニクイザルあるいはアカゲザルを用いた。中大脳動脈（middle cerebral artery: MCA）の永久閉塞モデルと虚血-再開通モデル作成にあたり、侵襲による炎症等や痛みによるストレスの影響を最小限にするために、大腿動脈より血管カテーテルを挿入してMCAにコイルを留置する方法を採用した（本庄生物科学株式会社へ委託）。

採血および神経症状の観察は急性期（Day1）から慢性期（3ヵ月）まで12ポイントで実施し、REBIOSにおいて患者で採血できなかった2週間～3ヵ月目を補完した。バイオマーカーは米国RBM社のSimian MAP ver. 1.6で測定した。その結果、永久閉塞と虚血-再開通モデルの違い、経時変化等について多くの興味深い新知見が得られている。今回は紙面の関係で個々のマーカー変動について紹介できないが、サルモデルと患者の間で次のような違いが観察された。

①患者と共通なマーカー77項目の中で61項目がサル血中で検出できた（16項目で検出限界以下）、②脳梗塞発症後正常レベルの十数倍～数十倍の変動するマーカーが多数観察され、患者に比しその変動幅が極めて大であった、③急性炎症系マーカーは発症1日目をピークに、その後3日～1週間以内に正常化した、一方患者では2週間の時点でも依然高値であった、④Th-1系、Th-2系サイトカインの変動に患者との大きな違いが観察された、⑤代謝関連マーカーの変動があまり観察されなかった、⑥組織傷害因子の大きな変動と同時に、組織修復作用が報告されている多くのタンパク質が急性期から極めて大きく変動した。

2) 加齢によるサル脳梗塞バイオマーカーの変動

脳梗塞患者は中年以降の発症者が多く、種々の基礎疾患を有している。しかし、一般に動物モデルの場合、その入手のしやすさ、価格、扱いやすさなどの理由から比較的若齢の動物を用いた研究が主流となっている。今回バイオマーカーを指標として患者と比較した結果、変動するバイオマーカーの種類の違いとともに経時変化のパターンに大きな違いが観察された。この違いの原因として、種差の他に加齢の影響あるいは高血圧、高脂血症や糖尿病などの基礎疾患の有無が考えられた。そこで、まずは加齢の影響を検討するために、通常用いている若齢（4～5歳齢）と比較対照として老齢（15～18歳齢）カニクイザルを用い、コイル塞栓法によるMCA永久閉塞脳梗塞モデルにおけるバイオマーカーの変動を検討した。たとえば若齢サルでは、炎症急性期の指標であるC-reactive protein（CRP）や炎症性サイトカインであるinterleukin-6（IL-6）は、ともに脳梗塞発症後急上昇するが1日目をピークに数日でほぼ正常レベルに戻った。しかし、老齢サルでは2週間後も高値を維持し、脳梗塞患者の変動パターンと同様であった（図4）。また、若齢サルでは全く変動せず脳梗塞患者と顕著な違いが観察された複数のバイオマーカーが、老齢サルでのモデルでは患者と同様のパターンで変動していた。脳梗塞における神経症状も老齢サルでは若齢サルに比し重篤であり回復速度も緩徐であ

図4 脳梗塞患者とサル脳梗塞モデルにおけるマーカー変動の例

った。以上のように、加齢によって脳梗塞後のバイオマーカーの変動パターンが脳梗塞患者と類似してくることがわかった。今後脳梗塞治療薬への反応性・効果に加齢が影響するかどうか評価が必要となろう。

3) マウスならびに培養細胞を用いた研究

REBIOSで脳梗塞の診断に有用であることが示唆されたバイオマーカーの脳梗塞病態における役割を検討するために、マウスの脳梗塞モデルや培養細胞を用いた研究も行っている。マウスに脳梗塞を作製し摘出した脳組織におけるバイオマーカーの発現を免疫染色法で探索し、虚血後にこれらのバイオマーカーが発現する細胞を同定している。さらにこれらのバイオマーカーが発現する細胞の培養系を用いて、虚血負荷時の機能について検討している。ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスを用いることで、さらなる機能解析を行う予定である。

3. 今後の展開

ーバイオマーカー探索から創薬へー

今回、REBIOSでのバイオマーカー（タンパク質）変動や、サルの脳梗塞部位でのバイオマーカー変動、さらに脳梗塞部位周辺の遺伝子変動の解析の結果、脳梗塞患者ではこれまでの認識とは異なり2週間目のみならず3ヵ月目の時点でも血液中で極めて多くの因子がアクティブに変動しており、多くの「傷害因子」と「修復因子」が競合状態にあることが明らかになった。このことは、発症後2週間以降から慢性期においても脳梗塞部位で進行している傷害を抑制する薬剤、あるいは神経修復を促進する薬剤の開発が脳梗塞患者の予後を大きく改善することを期待させてくれるものであり、発症直後の急性期を中心としたこれまでの脳梗塞治療の原則を大きく変えること、すなわち脳梗塞治療戦略のパラダイムシフトにつながると考える。

今回、脳梗塞患者血液のプロテオミクス（トップダウンアプローチ、ボトムアップアプローチ）により、

機能未知のタンパク質や未だ脳梗塞との関連の報告の無い多くのタンパク質の変動が検出された。これらタンパク質の時空間的な変動をマウス、ラット、サルの脳梗塞モデルを用いて検証している。動物実験においては、血液中はもちろん、標的臓器である脳において、それらタンパク質レベルおよび遺伝子発現レベルについて、①脳梗塞巣周辺などに存在すること、②標的部位と非梗塞側、脳梗塞と対照群など、存在量に差があること、③病期、重症度、治療などによって、標的部位の量的変動があること、④疾患関連パスウェイに存在するなど疾患との関連があること、を確認し関連性を慎重に検討している。

たとえば、galectin-3 binding protein (G-3 BP)は脳梗塞患者では健常者に比べ血中レベルが有意に上昇していたが、3ヵ月後での予後不良の患者では予後良好者に比べ急性期より低値であり、予後不良に関連するタンパク質として検出された(8)。サル脳梗塞モデルにおいても患者と同様血中G-3BPレベルが上昇していたことから、脳梗塞との関連解明のためにサル脳梗塞部位でのmRNAの発現を検討した。脳梗塞部位ではG-3BPおよびgalectin-3が有意に上昇し、両者のmRNA発現量は有意な相関を認めた。さらに、タンパク質発現量はgalectin-3が梗塞部位特異的に上昇していることがわかった(8)。現在までG-3BPが直接脳梗塞に関係するとの報告は無いが、galectin-3は神経前駆細胞および血管内皮細胞の増殖を促進すること(12)や虚血下での神経細胞のsurvivalを増加させるとの報告(13)もあり、脳梗塞の治療薬のターゲットになる可能性が示唆された。

おわりに

多数の血中マーカータンパク質（マルチマーカー）の変動を調べることは、診断・治療に役立つとともに、より深い疾患解析や個別の患者の状態の違いを明らかにすることができ有用と考えられた。また、治療薬の探索・開発・評価において、患者（臨床）と実験動物モデル（基礎）の橋渡し研究として、これらマルチマーカーは有用なツールと考えられる。

文 献

- 1) 厚生労働省：平成21年人口動態統計月報年計(概数)の概略。
- 2) Foerch C, et al. Neurology. 2009;73:393-399.
- 3) Kang DW, et al. Stroke. 2009;40:1653-1658.
- 4) Montaner J, et al. Stroke. 2008;39:2280-2287.
- 5) Laskowitz DT, et al. Stroke. 2009;40:77-85.
- 6) Whiteley W, et al. Stroke. 2009;40:e380-e389.
- 7) Whiteley W, et al. Stroke. 2008;39:2902-2909.
- 8) 鴨打正浩, 他. 脳卒中. 2010;32:544-551.
- 9) 松尾 龍, 他. Significance of VEGF in prognosis of ischemic stroke -Research for Biomarkers in Ischemic Stroke(REBIOS)-. 第35回日本脳卒中学会. 2010.
- 10) den Hertog HM, et al. J Neurol. 2009;256:2003-2008.
- 11) Waje-Andreassen U, et al. Acta Neurol Scand. 2005;111:360-365.
- 12) Yan Y, et al. Brain Res. 2009;1288:116-124.
- 13) Ohtaki H, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105:14638-14643.