バイオマーカー探索研究 REBIOS による脳梗塞病態解明の試み

北園 孝成¹⁾ 吾郷 哲朗¹⁾ 鴨打 正浩²⁾

要旨：我々は脳卒中コホート研究(Fukuoka Stroke Registry; FSR)のサブスタディーとして脳梗塞のバイオマーカー探索研究(Research for Biomarkers in Ischemic Stroke; REBIOS)を行っている。これまでの解析の結果、脳梗塞の病態に関連するバイオマーカーとして有用な複数のタンパク質を発見している。さらに、動物実験や培養細胞を用いた基礎研究によって、REBIOSで発見されたバイオマーカーの機能を解析することで脳梗塞の病態解明につながる知見を得ている。脳梗塞のバイオマーカーの探索は基礎研究を組み合わせることで脳梗塞の病態解明と新規治療法の確立につながる可能性がある。

Key words: cerebral infarction, biomarker, S100A12, RANTES

はじめに

我々はFSR^{1,2)}のサブスタディーとして脳梗塞のバイオマーカー探索研究REBIOSを行っている。REBIOSでは、発症24時間以内の脳梗塞患者171名を前向きに登録し、年齢および性をマッチングさせた久山町在住の健康者171名を対照として解析を行っている。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カ月後の5ポイントで行い、106種類の既知のタンパク質を測定するとともに、プロテオミクスの技術を用いて未知のタンパク質マーカーを探索している。これまでの解析の結果、脳梗塞の病態に関連するバイオマーカーとして有用なタンパク質を複数発見している³⁻⁵⁾。さらに、動物実験や培養細胞を用いた基礎研究によってREBIOSで発見されたバイオマーカーの機能を解析することで、脳梗塞の病態解明につながる知見を得ている。本稿では代表的な成果として、S100A12⁴⁾ならびにRANTES⁵⁾の解析結果について解説する。

S100A12による脳梗塞の予後予測⁴⁾

Receptor for advanced glycation end products(RAGE)は

内皮細胞やマクロファージなどの炎症細胞表面に発現し、advanced glycation end products(AGEs)をはじめとしたリガンドの刺激によって様々なサイトカインを産生し、炎症を惹起することが知られている。S100A12はextracellular newly identified RAGE-binding protein(EN-RAGE)とも言われ、顆粒球に特異的に発現し、RAGEのリガンドとして炎症反応の進展に寄与している⁶⁾。脳梗塞急性期において白血球におけるS100A12の発現が増加することや低酸素負荷によって白血球の膜に局在するS100A12が増加することが報告されているが、脳梗塞急性期における可溶性S100A12のバイオマーカーとしての意義は明らかではない。そこで、REBIOSにおいて特に脳梗塞の機能予後との関連を中心に検討を行った。脳梗塞群の入院時(発症24時間以内)の血漿S100A12濃度は1.6 ng/mlであり、対照群の0.9 ng/mlと比して有意に高値であった($P<0.001$)。90日後のmodified Rankin Scale(mRS)0~1を機能予後良好、mRS 2~6を機能予後不良として、脳梗塞群を2群に分けて、血漿S100A12濃度を比較したところ機能予後不良群では発症直後から14病日までのいずれのポイントでも機能予後良好群に比して血漿S100A12濃度が有意に高値であった(Fig. 1)。さらに、入院時の血漿S100A12濃度で脳梗塞症例を4群に分けて(Q1, 0.11–0.75 ng/ml; Q2, 0.76–1.59 ng/ml; Q3, 1.60–3.49 ng/ml; Q4, 3.50–46.6 ng/ml)、90日後の予後不良についてQ1群に対するオッズ比を算出したところ、多変量調整後も入院時の血漿

¹⁾九州大学大学院医学研究院病態機能内科学

²⁾同 医療経営・管理学

(2015年9月1日受付、2015年9月3日受理)

doi: 10.3995/jstroke.10382

S100A12 濃度高値が予後不良と独立して関連することが明らかになった (Table 1)。一方、REBIOS では白血球数、CRP、フィブリノーゲンなど他の炎症関連バイオマーカーと予後の間に有意な関連は示されず、S100A12 は脳梗塞の機能予後を予測する特異性の高いバイオマーカーと考えられた。前述のとおり、S100A12 は血管内皮細胞や単球などの炎症細胞膜上の RAGE に結合することで、種々の炎症促進因子の発現を誘導することが知られており、血漿中に増加した S100A12 は脳梗塞病巣の進展に関連することが示唆される。

ケモカイン RANTES による脳保護作用⁵⁾

RANTES はケモカインの一種であり内皮細胞や炎症

細胞など幅広い細胞で発現し、炎症細胞の誘導を介して炎症反応の進展に重要な役割を担う⁷⁾。RANTES ノックアウトマウスは対照マウスと比して脳梗塞巣のサイズが縮小したとの報告がある一方で、RANTES の受容体である CCR5 ノックアウトマウスでは梗塞サイズが拡大したという報告もあり、RANTES の脳梗塞病態における役割は明らかになっていない。そこで、脳梗塞患者の血漿 RANTES 濃度の推移を検討するとともに、動物モデルや培養細胞を用いて RANTES の脳梗塞病態との関連を解析した。脳梗塞群の入院時の血漿 RANTES 濃度は 11.9 ± 7.3 ng/ml であり、対照群の 8.7 ± 5.1 ng/ml と比して有意に高値であった ($P < 0.001$)。経時的な変化を検討したところ、脳梗塞では入院時より血漿 RANTES 濃度が

Fig. 1 血漿 S100A12 濃度と脳梗塞症例の機能予後
脳梗塞群 171 例を 3 カ月後の mRS 0~1 を予後良好群、mRS 2~6 を予後不良群として、血漿 S100A12 濃度を比較した。その結果、機能予後不良群では発症直後から 14 病日までのいずれのポイントでも機能予後良好群に比して血漿 S100A12 濃度が有意に高値であった。(文献 4 より改変引用)

Table 1 入院時 S100A12 濃度と 90 日後の予後不良との関係

	n	(%)	Age- & sex-adjusted			Multivariate-adjusted		
			OR	95% CI	P	OR	95% CI	P
Q1	11	26.2	1.00	reference		1.00	reference	
Q2	13	31.0	1.17	0.45–3.12	0.74	1.09	0.30–4.04	0.89
Q3	23	52.3	2.97	1.20–7.66	0.02	3.61	1.02–13.85	0.04
Q4	27	62.8	4.24	1.67–11.35	0.002	4.01	1.09–16.10	0.03
P for trend					<0.001			0.006

有意に上昇し、第 14 病日をピークに減少する傾向にあった(Fig. 2)⁵⁾。次に脳梗塞病態における RANTES の機能を解析するために、マウス脳梗塞モデルを用いて検討を進めた。マウスの中大脳動脈を閉塞することで脳梗塞を作製したところ、脳梗塞症例と同様に血漿 RANTES 濃度が上昇した(Fig. 3A)。各臓器における RANTES の mRNA 発現レベルを解析したところ、脳組織で特異的にその発現が亢進していることを見いだした

(Fig. 3B)。実際に脳切片の免疫染色を行ったところ、梗塞巣周囲組織に虚血早期から著明な RANTES の発現を認め、さらに RANTES を発現している細胞は神経細胞そのものであることが明らかになった(Fig. 3C)。一方、RANTES 受容体である CCR1, CCR3, CCR5 の発現を免疫染色で解析したところ、CCR1 は血管内皮細胞に発現し、CCR3 と CCR5 は神経細胞に発現していた。さらに培養 PC12 細胞を RANTES で刺激すると神経栄養因

Fig. 2 血漿 RANTES 濃度の推移

脳梗塞群 171 例(▲：ラクナ梗塞, ■：アテローム血栓性脳梗塞, ◆：心原性脳塞栓症)と対照群 171 例(●)の血漿 RANTES 濃度の推移を検討した。脳梗塞各病型ともに発症直後から血漿 RANTES 濃度は上昇した。(文献 5 より改変引用)

Fig. 3 マウス脳梗塞モデルにおける RANTES の発現

マウスを用いて中大脳動脈を閉塞することで脳梗塞を作製し RANTES の発現を検討した。その結果、血漿 RANTES 濃度が上昇(A)、脳組織特異的に RANTES の発現が亢進し(B)、特に脳梗塞巣周囲領域の神経細胞に虚血早期から著明な RANTES の発現上昇を認めた(C)。(文献 5 より改変引用)

A | B | C

Fig. 4 血漿 RANTES 濃度と血漿 BDNF, EGF, VEGF 各濃度との関係

脳梗塞 171 例の血漿 RANTES 濃度と血漿 BDNF, EGF, VEGF 各濃度との間に有意な相関を認めた。(文献 5 より改変引用)

子である BDNF, EGF, VEGF の発現が亢進し, RANTES が細胞保護作用を有することが明らかになった. REBIOS のデータを再度検証すると, 血漿 RANTES 濃度と血漿 BDNF, EGF, VEGF との間に有意な正の相関があった(Fig. 4). これらの結果から脳梗塞において虚血コアの周囲の神経細胞には虚血早期から RANTES が発現し, 神経細胞自身に作用することで神経栄養因子を介した細胞保護作用を引き起こしている可能性が示唆された.

おわりに

脳梗塞のバイオマーカー研究である REBIOS のデータから, S100A12 ならびに RANTES に関する解析結果を概説した. 脳梗塞の病態は複雑であり, 血漿バイオマーカーの詳細な解析によって, さらなる病態の解明や新規治療法の開発につながることを期待したい.

著者は日本脳卒中学会への COI 自己申告を完了しており, 本論文の発表に関して, 開示すべき COI はない.

参考文献

- 1) Kamouchi M, Matsuki T, Hata J, et al: Prestroke glycemic control is associated with the functional outcome in acute ischemic stroke: the Fukuoka Stroke Registry. *Stroke* 42: 2788–2794, 2011
- 2) Kumai Y, Kamouchi M, Hata J, et al: Proteinuria and clinical outcomes after ischemic stroke. *Neurology* 78: 1909–1915, 2012
- 3) Matsuo R, Ago T, Kamouchi M, et al: Clinical significance of plasma VEGF value in ischemic stroke — research for biomarkers in ischemic stroke (REBIOS) study. *BMC Neurol* 13: 32, 2013
- 4) Wakisaka Y, Ago T, Kamouchi M, et al: Plasma S100A12 is associated with functional outcome after ischemic stroke: Research for Biomarkers in Ischemic Stroke. *J Neurol Sci* 340: 75–79, 2014
- 5) Tokami H, Ago T, Kamouchi M, et al: RANTES has a potential to play a neuroprotective role in an autocrine/paracrine manner after ischemic stroke. *Brain Res* 1517: 122–132, 2013
- 6) Yang Z, Tao T, Raftery MJ, et al: Proinflammatory properties of the human S100 protein S100A12. *J Leukoc Biol* 69: 986–994, 2001
- 7) Maghazachi AA, Al-Aoukaty A, Schall TJ: CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56+ cells. *Eur J Immunol* 26: 315–319, 1996

Abstract**Research for biomarkers in ischemic stroke (REBIOS)**

Takanari Kitazono, M.D.,¹⁾ Tetsuro Ago, M.D.,¹⁾ and Masahiro Kamouchi, M.D.²⁾

¹⁾Department of Medicine and Clinical Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

²⁾Department of Health Care Administration and Management, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

Fukuoka Stroke Registry (FSR) is a multicenter hospital-based registry. In this cohort, we are collecting the data of acute stroke patients. As a substudy of FSR, we are doing research for biomarkers in ischemic stroke (REBIOS). In the peri-infarct area, a variety of responses such as inflammation, angiogenesis, and neurogenesis occur. In these responses, a lot of proteins are released, some of which may go into the blood stream due to blood-brain barrier (BBB) breakdown. Newly developed techniques including proteomics have enabled us to explore such biomarkers. For example, we have shown that plasma levels of S100A12 on admission in patients with ischemic stroke are higher than those in age- and sex-matched healthy control subjects, and that high plasma S100A12 levels on admission are associated with a poor functional outcome in the patients. We also have shown that RANTES, a chemokine, is produced from neurons after ischemic stroke and may have a potential to protect neurons directly or indirectly through the production of neurotrophic factors in peri-infarct areas. These biomarkers may be useful for investigation of pathophysiology of cerebral infarction.

Key words: cerebral infarction, biomarker, S100A12, RANTES

(Jpn J Stroke 38: 186–190, 2016)