

脳梗塞における代謝変化のメタボロミクス包括的解析と新たな脳虚血バイオマーカー探索

細田弘吉

神戸大学大学院医学研究科 脳神経外科学分野

【研究の背景】

脳梗塞は、tPA による血流再開療法が確立されたとは言え発症後 4.5 時間以内という適応制限により全脳梗塞患者の数% がその恩恵に預かるに過ぎない。最近、新たな脳血栓回収用機器（ステント）の開発により、急性期血行再建の適応は、発症 8 時間以内にまで拡がった。しかし、これらの治療の治療成績の向上、あるいは新たな治療法の開発の為には脳梗塞の病態解明は極めて重要である。我々は、オミクス解析の手法を用いて虚血脳組織における包括的変化を調べ、脳虚血において特異的な意義を有する代謝経路を特定するべく本研究を立案した。

【目的】

本研究は、脳梗塞急性期における代謝産物の変化をオミクスの手法により解析し脳梗塞で特異的に変化する代謝経路・代謝産物を同定して、新たなバイオマーカーや治療法開発の基盤を確立する。

【方法】

I. ラット中大脳動脈閉塞モデルの作成

monofilament 挿入により中大脳動脈を閉塞して脳梗塞を作成し、経時的に虚血領域の大脳皮質を採取する。

II. 虚血脳組織のメタボローム解析

虚血脳組織から水溶性代謝物・脂溶性代謝物を抽出し、ガスクロマトグラフ質量分析装置（GC-MS）にかけてメタボローム解析を行う。

III. 虚血脳組織のトランскリプトーム解析

上述のラット中大脳動脈閉塞モデルの脳組織経時サンプルから total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイにより、脳梗塞群と対照群の遺伝子発現状態の相違、虚血時間の影響や再灌流の影響を調べる。

IV. 脳虚血特異的な代謝経路の精査

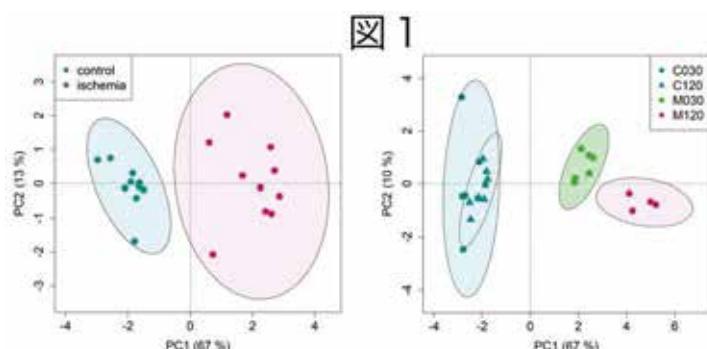
同定した脳虚血に特異的な代謝経路について、RT-PCR、Western blot、免疫組織染色、酵素活性測定などで精査し詳細を明らかにする。

【結果】

I. ラット中大脳動脈閉塞モデルのメタボローム解析

ラット中大脳動脈閉塞 2 時間後の脳虚血組織を GC-MS にかけて、92 種類の代謝物を一気に分析した。

主成分分析のスコアプロット（図1左）や Heatmap（図2上）により虚血群と対照群が綺麗に分離された。中大脳動脈閉塞 30 分後、2 時間後と経時的な変化を同様に調べたところ、やはり、主成分分析のスコアプロット（図1右）や Heatmap（図2下）が



綺麗に分離された。

脳虚血特異的に変化する代謝経路をさらに探索すると、ケトン体の増加、GABA shunt の亢進、ペントースリン酸経路の亢進などが示唆された(図3)。

II. ラット中大脳動脈閉塞モデルのトランスクリプトーム解析

マイクロアレイ解析を行って、脳虚血2時間後に有意に亢進している転写物を同定した(図4)。その中でも、heat shock protein 27(HSP27別名HSPB1)は、ペントースリン酸経路の律速酵素である glucose 6-phosphate dehydrogenase(G6PD)の活性を上昇させる因子として注目に値した。この経路は NADPHを産生することにより抗酸化状態を維持するのに貢献しているからである。

III. 脳虚血特異的な代謝経路の精査

上述の結果より、ペントースリン酸経路に的を絞ってさらに分析した。RT-PCRでは、中大脳動脈閉塞による脳虚血で HSP27 の転写は脳虚血後大幅に増加していた(図5)。Immunoblotでは G6PD 蛋白の増加は見られなかったが、HSP27 蛋白の僅かな増加とリン酸化 HSP27(pHSP27)の顕著な増加が認められた(図6)。

【考 察】

本研究の結果で最も興味深いものは、虚血時の内因性ペントースリン酸経路亢進である。この経路はNADPHを産生することにより還元型グルタチオンの再生産を促進し、抗酸化状態を維持するのに貢献している。HSP27 はリン酸化されるとペントースリン酸経路の律速酵素(G6PD)と結合してこれを活性化させること(Cosentino 2011)、脳虚血の際に HSP27 が protein kinase D によってリン酸化されること(Stetler 2012)は報告されているが、in vivo で内因性の抗酸化状態の増強回路が働いているかどうかは不明である。我々の結果はこの仮説を支持していた。

なお、以上の結果は、現在、国際ジャーナルに投稿準備中である。

図5

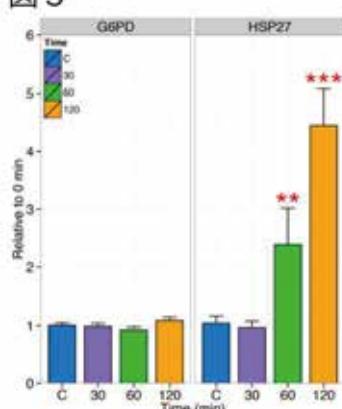


図6

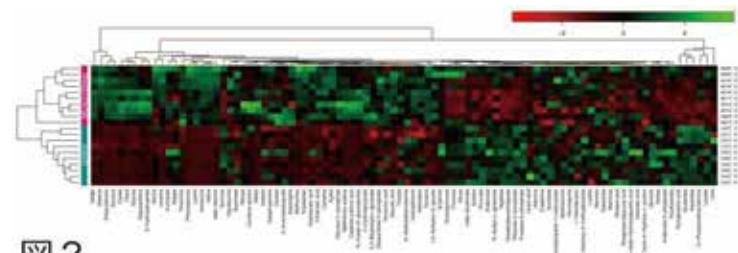
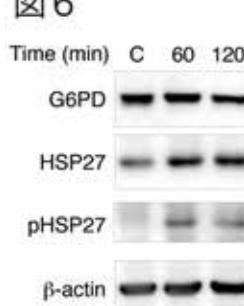


図2

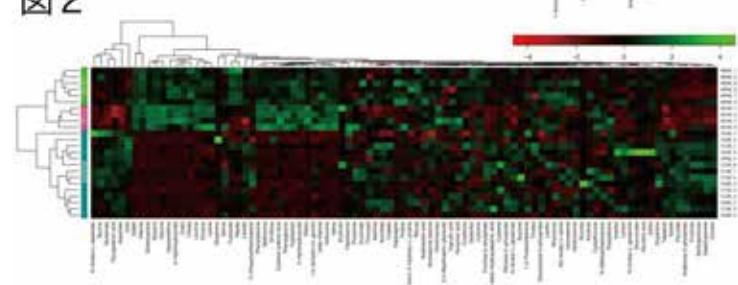


図4

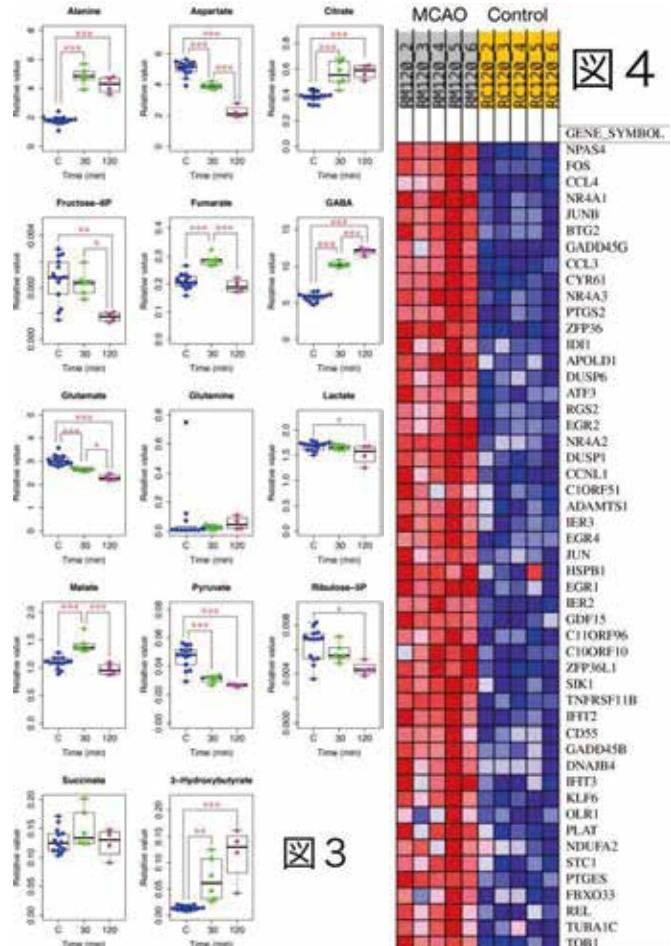


図3

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究のもつとも重要な結果は、脳虚血超急性期において、HSP27 のリン酸化を介して G6PD が活性化され、NADPH の産生増加から還元型グルタチオンが増加し、ROS を処理するという内因性保護機構の存在を示唆したことである。これは HSP27 が新たな治療ターゲットと成りうることを示しており、新たな薬物治療の開発を目指して、今後さらに追求していくたい。

【参考・引用文献】

1. Cosentino, C., Grieco, D., and Costanzo, V. Atm activates the pentose phosphate pathway promoting anti-oxidant defence and dna repair. *EMBO J* 30:546--55, 2011.
2. Stetler, R. A., Gao, Y., Zhang, L., Weng, Z., Zhang, F., Hu, X., Wang, S., Vosler, P., Cao, G., Sun, D., Graham, S. H., and Chen, J. Phosphorylation of hsp27 by protein kinase d is essential for mediating neuroprotection against ischemic neuronal injury. *J Neurosci* 32:2667--82, 2012.

以下は本研究に関連して我々が発表した論文

1. Hosoda, K. The significance of cerebral hemodynamics imaging in carotid endarterectomy: A brief review. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 55, 10 (Oct 2015), 782--8.
2. Imahori T, Hosoda K, Fujita A, Yamamoto Y, Mizowaki T, Miyake S, Kimura H, Kohta M, Kohmura E. Long-term outcomes of carotid endarterectomy and carotid artery stenting for carotid artery stenosis: Real-world status in japan. *J Stroke Cerebrovasc Dis* (Nov 2015).