

主論文の要旨

**Biomarker research for moyamoya disease
in cerebrospinal fluid using SELDI-TOF-MS**

SELDI-TOF-MS を用いたもやもや病の髄液検体における
バイオマーカー研究

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻
脳神経病態制御学講座 脳神経外科学分野

(指導：若林 俊彦 教授)

圓若 幹夫

【諸言】

もやもや病（別名：ウィルス動脈輪閉塞症）は小児期と成人期に2峰性の発症ピークを持つまれな脳血管疾患で、緩徐進行性に両側内頸動脈の高度狭窄や閉塞を来し、脳梗塞や脳出血を生じる。我々はもやもや病のバイオマーカー検索を目的として、手術時に採取した髄液検体を用いて質量分析器 Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (SELDI-TOF-MS) によりもやもやバイオマーカー候補の解析をおこなった。以前にも我々は同測定器を用いてもやもや病のバイオマーカー検索をおこなったがもやもや病群と対照群の年齢分布に優位差があったため、新規に検体を加えて測定をおこない、臨床的評価を新たに指標として加えた。

【対象および方法】

2009年4月から2012年12月までに名大病院において外科治療をおこなったもやもや病20症例（3-44歳）を解析対象とした（Table 1）。もやもや病を18歳までのもやもや病患者（11症例、小児もやもや病：平均年齢8.67歳）と18歳以上のもやもや病患者群（9症例、成人もやもや病：平均38.1歳）に分け、コントロール群（17症例、平均27.9歳）と比較した。陰イオン交換プロテインチップ（Q10）を用いて、5, 7, 9の各pHの結合バッファー（Citrate phosphate buffer Tri-HCl buffer）で前処理後、バッファー希釈髄液を添加、脱塩、洗浄操作後に飽和マトリックス（0.5%トリフルオロ酢酸入り50%アセトニトリル飽和シナピン酸）を添加・乾燥後、質量分析器 SELDI-TOF-MS にて測定した。データはプロテインチップシステム 4000SELDI-TOF-MS (Enterprise version Bio Laboratories にて作成され、Cipergen Express version 3.0.6 software interface (Bio-Rad Laboratories) による自動データ採取プロトコールによりなされた。スペクトル作成のための最適レーザー強度は3000から4500nJまでの手動レーザーショットによりなされた。最大のプロテインピークとスペクトル再現性を決定するために、データは0から100kDa（0から10万ダルトンまで）で、イオンフォーカスマスは7000Daで、マトリックス減衰は1000Daとした。2回の initial warning shot の後、53ポイントのチップ上に等分布した点を10回ずつタンパクのイオン化のためにレーザー刺激した。もやもや病群と対照群の発現差異マッピング EDM (Expression differential mapping) をシグナルノイズ比 (S/N比) 5以上、S/N比2以下をセカンドパスとして、同定のためにはスペクトルの20%以上存在することを設定条件として作成し、2群間比較し Man-Whitney U test で P 値が0.05未満のものを統計学的有意差ありとした。すべての検体の測定は同日に行い、同一ロットのプロテインチップを用いた。血行再建後の血管新生を術後MRIにて①直接吻合の開通の有無②間接血行再建の項目に分け、前頭葉側および側頭葉側を評価した (Table 2)。SELDI-TOF-MS のデータと術後MRIによる血管新生の評価のデータの相関関係を調べるため、症例の年齢と得られたデータのピークおよびスコアにつきスピアマン順位相関関係検定を行った。相関係数が0.5以上で正の相関があるとし、P値

0.05未満の場合も2変数が相関関係にあると判定した。

【結果】

前回得られた34バイオマーカー候補についてももやもや病群コントロール群および、もやもや病群同士について比較した(Table 3)。4473Da, 4475Da, 6253Daのペプチドが小児および成人もやもや病の両者の群においてそれぞれのコントロール群と有意差が見られた(Figure 1)。4473Daと4475Daのペプチドは小児もやもや病群と成人もやもや病群間でも有意差が見られた(Figure 2)。4473Daのペプチドは年齢依存的なピークの減少があることが示された。一方で対照群は同様の分布を示さなかった(Figure 3)。4473Daのペプチドと術後の血管新生(血管新生スコア)のピアソン相関係数は0.63でP値は0.004であった(Figure 4)。4473Daのペプチドと6253Daのペプチドを診断バイオマーカーとして用いると95%の感受性と94%の特異度を持ってもやもや病と診断することができた(Fig 5)。

【考察】

我々は以前もやもや病のバイオマーカー候補を34個報告し、今回新たに髄液検体を採取し、年齢を調整し、さらに小児群、成人群に分けて再評価した。その結果34個から3個のバイオマーカー候補に絞ることに成功した。これまでもやもや病患者のプロテオミクス研究において、basic fibroblast growth factor(bFGF)や、transforming growth factor beta(TGF- β)、platelet-derived growth factor(PDGF)やhepatocyte growth factor(HGF)などの成長因子や、E-selectin、vascular cell adhesion molecule(VCAM)-1、intercellular adhesion molecule(ICAM)-1などの接着因子が優位に上昇していることが報告されている(Table 4)。そのうち、術後の血管新生と相関がみられたものはHGFのみである。今回我々が報告した4473Daのペプチドも同様の性質を示しており、血管新生と関連のあるペプチドである可能性が示唆される。また同ペプチドは年齢特異性を示し、特に小児もやもや病において高いピークを示したことはもやもや病の発症との関連も同時に示唆される。小児もやもや病と成人もやもや病群の間で4473Daペプチドが有意差を示したことは小児群と成人群における虚血耐性の違いや頭蓋内の炎症の差を示すものかもしれない。SELDI-TOF-MSを用いたことで10000Da以下の低分子量のタンパク、ペプチドを等電点の違いによる選択的プロテオミクス解析を可能とし、再現性を持って証明することに成功した。SELDI-TOF-MSは各種癌やアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患におけるバイオマーカーの発見にもつながっており、今回我々の研究においてもその特性を活かすことで、これまでもやもや病および他疾患で報告がなされていない新たなペプチドを報告することに至ったと考えている。

【結論】

4473Daのペプチドがもやもや病において信頼できるバイオマーカー候補であるこ

とが示され、術後の血管新生との関連が示唆された。4473Da のペプチドがいかにもやもや病の病態に関わるかについてはアミノ酸配列の解明とともに今後解決すべき課題である。