

主論文の要旨

**Elevation of Proenkephalin 143-183 in Cerebrospinal  
Fluid in Moyamoya Disease**

〔もやもや病髄液中のプロエンケファリン 143-183 の上昇〕

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)

横山 欣也

## 【背景】

もやもや病において、小児と成人の臨床像の違い、そしてもやもや血管の経時的な変化の原因については殆ど分かっていない。我々はこれまでに SELDI-TOF-MS を用いたプロテオミクス解析を行い、もやもや病患者の髄液中で m/z 4588 および m/z 4473 のペプチド濃度の上昇がみられることを報告した。この研究の目的はこれらのペプチドのアミノ酸配列を解明し、検体中の定量的な濃度測定を行うこと、その病態生理を明らかにすることである。

## 【対象】

名古屋大学医学部附属病院および関連施設において、もやもや病(MMD, n=40)および control として非もやもや病の頭蓋内疾患(non-MMD, n=40)にて開頭術を受けた患者から術中に頭蓋内の髄液を採取し検体とした。もやもや病患者からは血清も同時に採取した。対象となった患者の詳細を Table 1 に示す。

## 【方法】

高速液体クロマトグラフィーと限外濾過を用いてもやもや病患者髄液検体中の m/z 4588 および m/z 4473 のペプチドを精製・濃縮した。トリプシン処理したペプチドを LC-MS/MS 解析を行い両ペプチドのアミノ酸配列を特定した。sandwich ELISA を用いて、もやもや病患者と非もやもや病患者の髄液中およびもやもや病患者の血清中のペプチド濃度を定量した。もやもや病患者において、MRA にて間接血行再建術後の血管新生の程度をスコアリングした(Figure 1)。また術前の脳血管撮影所見に基づき、もやもや病の病期毎に分類を行った。得られた結果について統計学的な解析を行った。

## 【結果】

### m/z 4588 および m/z 4473 ペプチドの同定

m/z 4588 および m/z 4473 のペプチドのトリプシン断片は、すべて proenkephalin143-183 (PENK 143-183)に由来した(Figure 2B)。両ペプチドの差異は N 末端のアスパラギン酸(分子量 115)の有無だけであった(Figure 2A)。

### 髄液中の PENK 143-183 濃度測定

測定値の中央値と範囲を Table 1 に示した。髄液中の PENK 143-183 濃度はもやもや病患者群(中央値 8,270 pmol/L)が非もやもや病患者群(中央値 3,760pmol/L)に比較して有意に高く(Figure 3A)、特に 18 歳未満の小児で顕著であった(Figure 3C)。またもやもや病患者群では髄液中の PENK 143-183 濃度と年齢との間に有意な相関関係を認めしたが、非もやもや病患者群では認めなかった(Figure 4)。ROC 曲線による解析では特に小児において、髄液中の PENK 143-183 濃度測定は高い診断的意義を認めた(Figure 5B)。

### 髄液中と血清中の PENK 143-183 濃度の相関関係

髄液中と血清中の PENK 143-183 濃度の間にはあきらかな相関関係は認めなかった

(Figure 6)。

#### 術後血管新生と髄液中の PENK 143-183 濃度の相関関係

術後血管新生と年齢との間には緩やかな相関関係を認めたが(Figure 7A)、髄液中の PENK 143-183 濃度との間には相関関係はほとんど認められなかった(Figure 7B)。

#### もやもや病の各病期における髄液中の PENK 143-183 濃度

もやもや病患者 37 症例 52 側について、もやもや病の病期毎の髄液中の PENK 143-183 濃度を Figure 8 に示す。PENK 143-183 濃度は 2 期に上昇し、その後病期の進行とともに減少する傾向がみられた。

### 【考察】

#### 髄液中 PENK 143-183 はもやもや病の新たなバイオマーカーとなり得る

近年、もやもや病感受性遺伝子が報告されたものの、もやもや病の診断は現在も画像所見と類似する頭蓋内動脈の変化を来し得る基礎疾患の除外によってなされ、特異的なバイオマーカーは存在してこなかった。今回の研究では、特に 18 歳未満のもやもや病群と control 群の比較において、髄液中の PENK 143-183 濃度閾値を 9.17nmol/L とすると感度は 92.3%、特異度は 83.3% (AUC 0.885, 95%信頼区間 0.724 - 1)であった。髄液中の PENK 143-183 はとくに小児もやもや病において、新たなもやもや病の診断バイオマーカーとなる可能性を持っていると考える。

#### 髄液中の PENK143-183 濃度の上昇ともやもや病の病態生理

PENK 143-183 は前駆体である proenkephalin A のプロセッシングの過程で生じる断片ペプチドである。4 コピーのメチオニン-エンケファリン(Met-ENK)、1 コピーのロイシン-エンケファリン(Leu-ENK)とそのほかのエンケファリンペプチドを生じる(Figure 9)。PENK 143-183 は髄液中・血清中でも安定して存在し、これらの エンケファリンペプチドの濃度を反映している。

今回の研究においてもやもや病の髄液中で PENK143-183 の上昇が見られたことについて、我々は 2 つの仮説を持っている。

第一に、Met-ENK は opioid growth factor(OGF)とも呼ばれ、その機能は opioid growth factor receptor (OGFr)を介して DNA 合成を抑制し、細胞増殖を抑制することである。OGF は正常細胞と腫瘍細胞に対する抑制因子であり、血管新生に対しては抑制すると報告されている。これらの事実から、もやもや病髄液中の PENK 143-183 は、もやもや病に生じた血管新生に対する抑制系の活性化を反映しているという仮説が成り立つ。血行再建術後の血管新生と PENK 143-183 濃度に僅かにしか相関関係を示さなかったのは、PENK 143-183 が血管新生を間接的にしか反映しないためかもしれない。この仮説はもやもや病の各病期において PENK 143-183 がもやもや血管の形成され始める 2 期に上昇し、その後もやもや血管の退縮とともに低下していくように見受けられた現象をある程度説明可能である。しかし、もやもや血管の増勢期である 3 期に PENK 143-183 濃度が減少に転じていることや、OGF が上昇したため病期が進んだのか、あるいはその他の原因でもやもや血管が退縮し細胞増殖が盛んではなくなっ

たため OGF 産生も低下したのかについてなど、不明な点も残る。

第二に、Met-Enk、Leu-ENK は delta-opioid と呼ばれるオピオイドペプチドの一種であり、その主な作用点は delta-opioid receptor(DOR)である。これまでの研究は、オピオイド系が低酸素と虚血イベントに対する神経保護作用に関係し、この作用は主として delta-opioid peptide と DOR を介することを示している。このことからもやもや病髄液中の PENK143-183 濃度の上昇は、脳虚血に対する delta-opioid と DOR による神経保護効果を反映しているのではないかと考えられる。PENK 143-183 濃度のもやもや病の病期に伴った上昇につづく低下や年齢との相関関係は、脳虚血の進行や加齢に伴って生じる脳萎縮が原因であるかもしれない。あるいはもやもや病患者は他の脳虚血疾患患者と比較して delta-opioid-DOR 系による虚血耐性が発達しているのかもしれない。

### 研究の限界と展望

最大の問題点は healthy normal control を用いていないことであるが、これは髄液検体を用いたもやもや病についてのこれまでの研究と同様である。また control 群には様々な頭蓋内疾患が用いられているが、これらの中で PENK143-183 濃度に有意差は見られなかった。

PENK 143-183 の上昇が単に脳虚血に対する反応を見ているに過ぎない可能性がある。もやもや病において年齢とともに PENK 143-183 濃度が低下するのは、加齢とともに虚血耐性が低下することを反映しているのかもしれない。若年者の虚血性脳卒中患者の検体との比較を行うことが必要である。

PENK 143-183 の診断バイオマーカーとして使用は、血清中濃度との相関がなく髄液採取を必要とし侵襲的であることや、術後にしか結果が分からないことから限定的である。

将来的に我々の仮説を検証するためには PET や SPECT を用いた脳内の DOR や OGF<sub>r</sub> の発現量の定量解析が有効かもしれない。

### 【結論】

PENK 143-183 は小児もやもや病において有用なバイオマーカーとなる可能性がある。OGF<sub>r</sub> または DOR を介したエンケファリンペプチドの作用はもやもや病の病態と関係するかもしれない。