

研究テーマ

世界初の大規模脊髄損傷患者血清の網羅的タンパク質解析

研究代表者

施設名 : 九州大学大学院 整形外科

氏 名 : 小野 玄太郎

研究テーマ：世界初の大規模脊髄損傷患者血清の網羅的タンパク質解析

所属先：九州大学整形外科/総合せき損センター

氏名：小野 玄太郎

【目的】

脊髄損傷は、中枢神経系の重篤な損傷として知られており、患者の生活の質に重大な影響を及ぼす疾患である。本邦においても年間5000人程度新規に発症しており、医学的な問題にとどまらず、社会的・経済的にも大きな課題となっている。特に重度の脊髄損傷患者における早期の機能予後予測は、適切な治療方針の決定やリハビリテーション計画の立案において極めて重要な課題となっている。従来の画像診断や神経学的診察のみでは、個々の患者の回復可能性を正確に予測することは困難であり、より客観的かつ定量的な予後予測指標の確立が求められている。

近年、様々な疾患において血液バイオマーカーによる病態評価や予後予測の有用性が報告され、脊髄損傷患者においても様々な手法で予後予測が試みられている。特に、神経特異的タンパク質や炎症性サイトカインなどの血中濃度測定により、損傷の重症度や予後との関連性が報告されてきた。しかしながら未だ、急性期における予後予測は確立されていない。その理由として、大規模かつ網羅的な研究が行われていないこと、測定時期や方法の標準化が不十分であることなどが挙げられる。

脊髄損傷後の神経組織では、一次損傷に続いて炎症反応や虚血による二次損傷が進行し、その後瘢痕組織の形成、神経組織の再生など複雑な病態を呈する。この過程では、損傷された神経細胞やグリア細胞から様々な物質が放出され、また炎症細胞の浸潤に伴う生理活性物質の産生も認められる。これらの物質の一部は血中に移行することで、疾患特異的なバイオマーカーとして検出可能となる。特に急性期においては、神経細胞死の程度を反映するマーカー、軸索損傷の指標となるマーカー、さらには炎症反応の強度を示すマーカーなど、異なる病態を反映する複数のバイオマーカーを総合的に評価することで、より正確な予後予測が可能になると考えられる。

また、近年の分析技術の進歩により、微量な生理活性物質の高感度かつ再現性の高い測定が可能となり、さらに機械学習などの新しい解析手法の導入により、複数のバイオマーカーを組み合わせた予測モデルの構築が現実的となってきている。これらのバイオマーカーを網羅的に解析し、バイオマーカーを同定、あるいはそれらのバイオマーカーを組み合わせることで予測モデルを構築することができれば、個々の患者の予後をより正確に予測することが可能となる。

このような背景から、本研究では重度脊髄損傷患者における血液バイオマーカーの網羅的解析を行い、運動機能回復の予測に有用なバイオマーカーの同定を目指すこととした。具体的には、急性期の重度脊髄損傷患者を対象として、神経特異的タンパク質、

炎症性サイトカイン、細胞死関連分子など、生体内の様々な病態を反映する血清タンパク質の網羅的測定を行い、その後の運動機能回復との関連を詳細に検討する。さらに、同定されたバイオマーカーの組み合わせによる予測モデルを構築し、その臨床的有用性を検証することを目的とした。

本研究により、従来の評価方法では困難であった早期からの客観的な予後予測が可能となれば、個々の患者に最適化された治療戦略の立案に貢献することが期待される。特に、急性期における治療介入の強度や方法の選択、リハビリテーションプログラムの最適化において、客観的な指標に基づいた意思決定が可能となる。また、患者や家族に対して、より具体的な予後情報を提供することで、治療方針の決定における shared decision making の実現にも寄与すると考えられる。

さらに、近年脊髄損傷治療の分野では、幹細胞移植や電気刺激療法、新規薬物療法など、様々な革新的治療法の開発が進められている。これらの新規治療法の臨床試験においては、適切な患者選択が治療効果の実証において極めて重要となる。特に、治療介入のタイミングや、期待される効果の程度を予測する上で、客観的な重症度評価・予後予測法の確立は不可欠である。本研究で同定されるバイオマーカーは、このような臨床試験における患者層別化の指標としても活用できる可能性があり、新規治療法の開発促進にも貢献することが期待される。

加えて、本研究で構築される予測モデルは、脊髄損傷の病態解明にも新たな知見をもたらす可能性がある。複数のバイオマーカーの組み合わせによる解析は、従来の単一マーカーでは捉えることができなかった病態の複雑性や、回復過程における生体反応の多様性を明らかにする可能性を秘めている。これにより、新たな治療標的の同定や、治療効果の評価指標の確立にもつながることが期待される。

このように、本研究は臨床現場における予後予測の改善のみならず、脊髄損傷治療の発展における基盤的な役割を果たすことが期待され、その臨床的・学術的意義は極めて高いと考えられる。

【方法】

本研究は総合脊損センターにて実施された残血検体を用いて観察研究である。過去5年間（2019年1月から2024年12月まで）に入院した脊髄損傷患者480名を対象としたスクリーニングを行った。このうち受傷後72時間以内に入院し、48-96時間以内に採血を行った症例で、入院時のAIS（ASIA Impairment Scale）グレードA及びBの症例を抽出した。除外基準として、16歳未満の症例、重篤な合併損傷（重症頭部外傷、主要臓器損傷）を有する症例、既存の神経疾患（脳血管障害、神経変性疾患など）を有する症例、および同意取得が困難な症例を設定した。最終的な解析対象は30名となり、これらの患者を受傷後3ヶ月の運動機能回復の有無により、回復群13名と非回復群17名に分類した。

運動機能の評価は、アメリカ脊髄損傷協会（ASIA）の評価基準に厳密に従って実施し

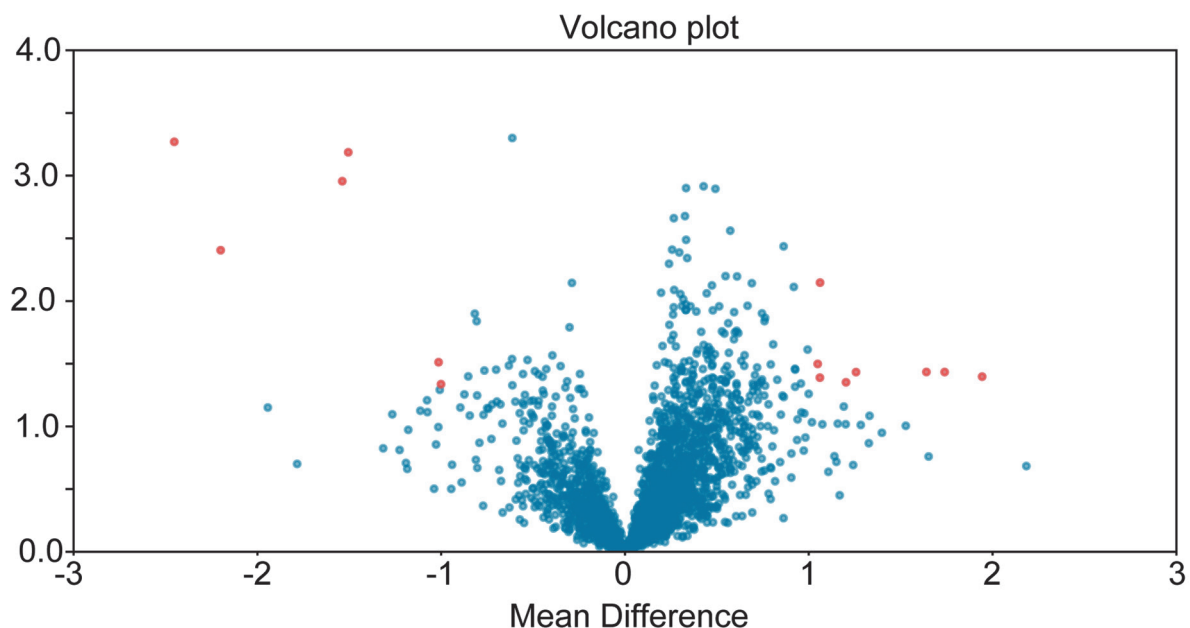
た。具体的には、C5からS1までの10の主要筋群について徒手筋力テスト（MMT）を用いて評価を行い、運動スコアを算出した。また、神経学的高位の決定、感覚機能の評価、括約筋機能の評価も併せて実施した。これらの評価は、AISの評価に熟練した医師が複数で行い、評価結果に相違がある場合は協議の上で最終判定を行った。運動機能の評価は、入院時、受傷後1週間、1ヶ月、3ヶ月の時点で定期的実施した。

血液サンプルは受傷後48-96時間の間に採取した。採血後、速やかに遠心分離（3000rpm、15分、4℃）を行った後、血清を500 μ Lずつ分注して-80℃で凍結保存した。検体の解凍は測定直前に行い、複数回の凍結融解を避けるため、一度の測定で使い切れる量のみを解凍することとした。

【結果】

本研究の解析対象となった30名の患者背景について、年齢の中央値は回復群が50±28歳、非回復群が54±28歳であった。性別構成は回復群が男性12名、非回復群が男性16名・女性2名であった。入院時のAIS分類は、回復群でAIS Aが4名、AIS Bが8名、非回復群でAIS Aが15名、AIS Bが3名であった。また受傷後3ヶ月の時点では回復群でAIS C7名、AIS D5名、非回復群でAIS Aが13名、AIS Bが5名であった。

血清に含まれるタンパク質の相対的解析結果において、測定された3072種類のマーカーのうち、回復群と非回復群の間に165種類のタンパク質で統計学的に有意な差が認められた。その中から回復群と非回復群間で大きく変動していた（2倍以上平均値が異なっていた）14種類のタンパク質を回復するかどうかを見極めることができるマーカーとして同定した。



次に、下肢運動機能の改善度合いを評価する指標として、ASIAの評価基準の中に含ま

れる下肢運動スコア (Lower extremity motor score) との相関を評価した。しかしながらいずれも、高い相関は得られなかった。

そこで、回復するかどうかを前述の14種類の血清タンパク質でフィルタリングし、その上で最も下肢運動スコアとの相関が高い血清タンパク質がどのタンパク質であるか解析を行った。するとNEFLでフィルタリングし、Inositol Polyphosphate-5-Phosphatase J (INNP5J) で機能予後を予測するという組み合わせが最もスピアマンの相関係数・決定係数ともに高値となった。他にも神經常在細胞であるアストロサイトに含まれるGlial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) とミオグロビン (MB) あるいはCoiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix Domain Containing 10との組み合わせなどがスピアマンの相関係数・決定係数ともに高値を示しており、今後の大規模検証におけるバイオマーカー候補として同定された。

【考察】

本研究では、重度脊髄損傷患者の急性期における血清プロテオーム解析により、運動機能回復を予測する新規バイオマーカーの同定を試みた。単一のマーカーでは高い相関を持つものではなく、複数のマーカーを組み合わせることで、より高い相関が得られることが明らかとなった。これは、脊髄損傷後の病態が単一のメカニズムではなく、様々な生物学的プロセスの相互作用によって規定されることを反映していると考えられる。

最も高い可能性を示したのは、NEFLとINPP5Jの組み合わせである。NEFLは神経細胞の軸索を構成する主要タンパク質であり、その血中濃度上昇は軸索損傷の程度を反映すると考えられる。特に急性期における血中NEFL濃度は、軸索の構造的破綻の程度を直接的に反映する指標として有用であり、現在までに複数の報告にて。一方、INPP5Jはイノシトールリン酸代謝に関与する酵素であり、神経細胞の生存や可塑性に重要な役割を果たすことが知られている。特に、細胞膜リン脂質の代謝調節を介して、神経細胞の生存シグナルや軸索伸長に関与することが報告されている。この組み合わせが高い予測性能を示した理由として、NEFLが初期の組織損傷の程度を、INPP5Jが組織修復や神経可塑性の潜在的能力を反映している可能性が考えられる。

また、GFAPとMBの組み合わせも有望なマーカーとして同定された。GFAPはアストロサイトのマーカーとして知られ、中枢神経系損傷後に血中へ漏出することが知られている。実際に幾つかの報告で、GFAPはバイオマーカーとしての可能性が報告されている。アストロサイトは損傷後の組織修復過程において重要な役割を果たすことが知られており、特に急性期におけるその活性化の程度は、その後の組織修復の方向性を規定する可能性がある。一方、MBは筋組織の損傷マーカーである。脊髄損傷では、神経組織の直接的な損傷に加えて、傍脊柱筋など周囲組織の損傷を伴うことが多い。軟部組織の損傷が持続的な物理的ストレスを神経組織に与えている可能性は否定できず、今回の結果は軟部損傷が与える影響の大きさを示している可能性がある。

本研究のリミテーションとして、現時点では少数の症例での検討であることが挙げられる。また、採血のタイミングが48-96時間と幅があり、マーカーの経時的変化を考慮すると、最適なタイミングを評価する必要があるだろう。さらに、3ヶ月という比較的短期の機能予後との関連を検討しており、長期予後との関連については今後の検討課題である。加えて、本研究では血清マーカーのみを検討しており、画像所見や病歴などの患者背景などとの統合的な評価などは行っていない点などが挙げられる。今後は、同定されたバイオマーカーの組み合わせについて、より大規模な検証研究を行うとともに、採血タイミングの最適化や、長期予後との関連の検討が必要である。また、これらのマーカーを用いた予測モデルの確立により、個々の患者に対する最適な治療戦略の立案や、新規治療法の開発における患者層別化への応用が期待される。特に、現在開発が進められている様々な治療法の効果予測や、治療介入のタイミング決定における客観的指標として、本研究で同定されたバイオマーカーが活用できる可能性がある。

【結論】

本研究により、重度脊髄損傷患者において14種類の血液バイオマーカーが運動機能回復の予測に有用であることが示された。特に3種類のマーカーの組み合わせによる予測モデルは高い相関を示し、臨床応用の可能性が示唆された。

【参考文献】

Albayar AA, Roche A, Swiatkowski P, Antar S, Ouda N, Emara E, Smith DH, Ozturk AK, Awad BI. Biomarkers in Spinal Cord Injury: Prognostic Insights and Future Potentials. *Front Neurol*. 2019 Jan 29;10:27. doi: 10.3389/fneur.2019.00027. PMID: 30761068; PMCID: PMC6361789.

Kauer SD, Fink KL, Li EHF, Evans BP, Golan N, Cafferty WBJ. Inositol Polyphosphate-5-Phosphatase K (*Inpp5k*) Enhances Sprouting of Corticospinal Tract Axons after CNS Trauma. *J Neurosci*. 2022 Mar 16;42(11):2190-2204. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0897-21.2022. Epub 2022 Feb 8. PMID: 35135857; PMCID: PMC8936595.

Miyakoshi N, Suda K, Kudo D, Sakai H, Nakagawa Y, Mikami Y, Suzuki S, Tokioka T, Tokuhiko A, Takei H, Katoh S, Shimada Y. A nationwide survey on the incidence and characteristics of traumatic spinal cord injury in Japan in 2018. *Spinal Cord*. 2021 Jun;59(6):626-634. doi: 10.1038/s41393-020-00533-0. Epub 2020 Aug 11. PMID: 32782342.

Hayakawa K, Okazaki R, Ishii K, Ueno T, Izawa N, Tanaka Y, Toyooka S, Matsuoka N,

Morioka K, Ohori Y, Nakamura K, Akai M, Tobimatsu Y, Hamabe Y, Ogata T. Phosphorylated neurofilament subunit NF-H as a biomarker for evaluating the severity of spinal cord injury patients, a pilot study. *Spinal Cord*. 2012 Jul;50(7):493-6. doi: 10.1038/sc.2011.184. Epub 2012 Jan 24. PMID: 22270191.

Ahadi R, Khodagholi F, Daneshi A, Vafaei A, Mafi AA, Jorjani M. Diagnostic value of serum levels of GFAP, pNF-H, and NSE compared with clinical findings in severity assessment of human traumatic spinal cord injury. *Spine* (2015) 40:E823-30. 10.1097/BRS.0000000000000654

He Q-Y, Chiu J-F. Proteomics in biomarker discovery and drug development. *J Cell Biochem*. (2003) 89:868-86. 10.1002/jcb.10576

Parker CE, Borchers CH. Mass spectrometry based biomarker discovery, verification, and validation - Quality assurance and control of protein biomarker assays. *Mol Oncol*. (2014) 8:840-58. 10.1016/j.molonc.2014.03.006