

スポーツ脳震盪の診断と競技復帰に関わる 唾液中のバイオマーカー探索研究

大阪大学大学院 中 村 洋 平
(共同研究者) 同 松 本 寿 健
同 戸 上 由 貴
大 阪 大 学 奥 崎 大 介
大阪大学大学院 織 田 順

Study of Biomarkers in Saliva as Indicators for Diagnosis of Sports Related Concussion and Return to Play

by

Youhei Nakamura, Hisatake Matsumoto,
Yuki Togami, Jun Oda

*Department of Traumatology and Acute Critical Medicine
Osaka University Graduate School of Medicine*

Daisuke Okuzaki

*Laboratory of Human Immunology (Single Cell Genomics),
WPI Immunology Frontier Research Center,
Osaka University, Osaka, Japan*

ABSTRACT

Biomarkers as indicators for the diagnosis of sports related concussion have not been established. The purpose of this study was to analyze saliva samples from student American football players for microRNA and protein expression before and after concussion injury and during recovery, and to identify biomarkers in saliva as indicators of concussion diagnosis and recovery.

Six samples were analyzed before concussion (Pre), nine samples during concussion (Post), and three samples during concussion recovery (Rec). MicroRNA extraction and protein mass spectrometry were performed on these samples to analyze and identify biomarkers whose expression changed at each phase. The results showed that the expression of SPRR1A (small proline-rich repeat protein1A) protein, which is considered to be related to nerve regeneration, increased significantly from Pre to Post and decreased from Post to Rec, suggesting that it may be a biomarker in saliva in sports related concussion.

キーワード

スポーツ脳震盪, 唾液, 競技復帰, バイオマーカー, プロテオーム解析

Keyword

Sport related concussion, Saliva, Return to play, Biomarker, Proteome analysis

要 旨

スポーツ脳震盪の診断の指標となるバイオマーカーは確立されていない。本研究の目的は、学生アメリカンフットボール部の選手を対象に、侵襲無く採取可能な唾液検体を用いて、脳震盪受傷前後および脳震盪からの回復時のmicroRNAおよび蛋白発現を解析し、脳震盪の診断および回復の指標となる唾液中のバイオマーカーを探索することである。

解析対象となったのは、脳震盪受傷前(Pre)の6検体、脳震盪受傷後(Post)の9検体、脳震盪回復後(Rec)の3検体であった。これらの検体からmicroRNAの抽出および蛋白質量分析により、Pre→Post→Recの各段階で発現の変化するバイオマーカーを解析し同定した。解析の結果、神経再生に関係するとされるSPRR1A (Small proline-rich repeat protein1A) 蛋白が、Pre→Postで有意に発現が増加し、Post→Recで発現が低下する傾向にあり、スポーツ脳震盪における唾液中のバイオマーカーになる可能性が示唆された。

緒 言

スポーツに関連する脳震盪 (Sports Related Concussion: SRC) は、セカンドインパクト症候群や慢性外傷性脳症といった重篤な後遺症を引き起こす可能性があり、サッカーやラグビー、アメリカンフットボールといったコンタクトスポーツ分野で特に注目されている。しかし、SRCを正確に診断することは難しく、頭部CTやMRI検査でも異常所見を認めないため、自覚症状や他覚的な神経所見、認知機能の評価に依存している。実際、スポーツの現場では「国際スポーツ脳震盪会議」が提供している、SCAT (Sports Concussion Assessment Tool) やCRT (Concussion Recognition Tool) といった脳震盪評価のツールや、Cog Sport, ImPACTといったコンピューターによる認知機能測定検査を行い総合的に診断されている¹⁻⁴⁾。

一方で、血液や尿、唾液などの生体材料から得られるバイオマーカーによる診断手法は確立されておらず、このようなバイオマーカー検査の確立はスポーツ頭部外傷領域での重要な課題である。

また、SRCでは脳震盪から回復し、競技復帰が可能と判断するための指標についても課題がある。現状では、各競技団体やチーム毎に段階的競技復帰プロトコル (Graduated Return to Play : GRTP) を作成し、選手の自覚症状を基に競技へ復帰しているため、脳震盪状態から改善しないままプレーに復帰してしまうリスクを伴う。脳震盪からの回復していることを正確に評価出来るバイオマーカー検査の確立も、脳震盪の診断と同様に重要である。

大阪大学大学院医学系研究科救急医学教室では高度救命救急センターへ搬送される重症患者の血液や尿中の蛋白やRNAの網羅的解析を行い、バイオマーカーの探索を行ってきた (急性期ゲノムプロジェクト <http://www.osaka-u-tacc.com/occonomix/index.html>)。本研究は、スポーツのフィールドにおいて簡便かつ無侵襲に採取可能である唾液検体に注目し、脳震盪に関連するバイオマーカーを、我々が持つ網羅的蛋白、RNA解析の手法を用いて探索するものである。

1. 研究方法

研究対象は関西学生アメリカンフットボール

連盟Division1に所属する関西学院大学アメリカンフットボール部ファイターズ (以下ファイターズ) の選手の中で、研究の参加に同意を得た選手である。唾液検体の採取方法について、図1に示す。2022年4月のシーズン開幕前に、脳震盪発症前検体 (コントロール検体) を採取した。さらに、2022年4月-2023年5月の間に脳震盪を生じた選手の唾液を、脳震盪と判断後24時間以内と脳震盪から回復したと判断された時点において各々採取した。唾液検体は保存液であるRNA later1mlに唾液1mlの採取量とし、唾液採取用の専用キットを用いて採取を行なった。RNA laterはRNAの解析およびタンパク質量分析にも対応した保存液であり、常温では1週間まで保存可能で、液化窒素中のsnap-freezingと同等とされる^{5,6)}。採取した唾液検体は永久保存可能な-30℃の冷凍庫内で保存した。

1. 1 網羅的miRNA分析

唾液検体からのRNA抽出については、exoRNeasy Midi kitおよびQIAzol Lysis Reagent (いずれもQiagen社,オランダ) を用いて抽出し、バイオアナライザー 2100での質的評価を行なっ



図1 唾液検体の採取方法

1mlの保存液 (RNA later) に対して1mlの唾液を採取した。採取は関西学院大学アメリカンフットボール部ファイターズのチームスタッフにより行われた。採取後は速やかに-30℃で冷凍保存を行った。

た。

1. 2 網羅的蛋白質質量分析

RNA later Bufferで保存した唾液検体から蛋白質質量分析を行った。蛋白質の同定には、Swiss Prot_all species, humanのデータベースでMascot検索を行った。

1. 3 質量分析結果の解析

脳震盪受傷前 (Pre), 受傷後 (Post), 脳震盪から回復後 (Rec) の3群の測定結果を解析対象とした。解析はRを用いて行なった。

発現量の少ない蛋白質は除外し、少なくとも7つのサンプルでcounts-per-millionが0.5以上の蛋白質のみを解析対象とした。limma-voom法によりデータの正規化を行い、Fold Changeの絶対値が2以上で、p値が0.05以下のものを有意に変動した蛋白質と定義した。

PreとPostおよび、PostとRecの比較を行なった。2群間での蛋白質発現解析の結果から、脳震盪後に発現がup-regulationし、脳震盪から回復時には再度発現がdown-regulationするような蛋白質の候補を検索した。

1. 4 脳震盪の判断と診断, 脳震盪からの回復の判断

脳震盪の判断については、国際スポーツ脳震盪会議の共同声明^{1,7)}によるCRT5 (Concussion Recognition Tool 5)⁸⁾ および SCAT5 (Sports Concussion Assessment Tool 5)⁹⁾ に基づいて脳震盪の判断を下し、医療機関により脳震盪の診断が行われた (図2)。

脳震盪からの回復の判断については、公益社団法人日本アメリカンフットボール協会の段階的競技復帰 (GRTP) プログラムに基づいて行われた (図3)

ファイターズでは、シーズン開幕前にSCAT5のベースラインデータを測定することで、より正確な脳震盪の判断を行っている。

2. 研究結果

2. 1 採取検体

脳震盪前の唾液検体 (コントロール検体) を採取できた選手数は計104選手、104検

体であった。脳震盪を生じた選手からの採取できた唾液検体は8選手から合計9検体 (Post1-9) であった。この9検体の中で、脳震盪前のコント

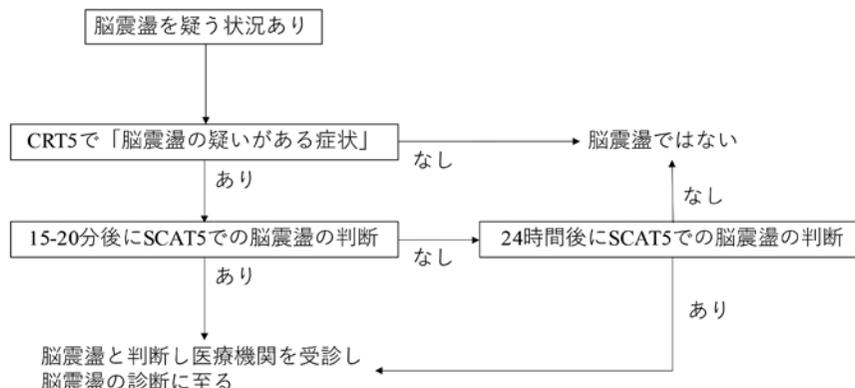


図2 脳震盪の判断と診断

脳震盪の判断はトレーナーやディレクター、メディカルスタッフがCRT5およびSCAT5を使用して行った。脳震盪と判断されれば速やかに競技から離脱し、医療機関を受診し最終的な脳震盪の診断に至る。

ステップ	許可される運動	例	条件
受 傷 日			
1	一般的な日常生活動作	通常の日常生活動作による症状の有無を確認 (例:ウォーキングなど)	最低24時間以上 無症状
2a	軽度の有酸素運動	ウォーキング・バイク・トレッドミル・水泳など (最大心拍数*55%未満)	最低24時間以上 無症状
2b	中等度の有酸素運動	ウォーキング・バイク・トレッドミル・水泳など (最大心拍数*70%未満)	最低24時間以上 無症状
3	アメリカンフットボールに関連した個人で出来る運動	個人練習:アジリティドリル/ステップドリル/スローイングドリル/キャッチドリルなど	最低24時間以上 無症状
ステップ4に入る前に医師によるメディカルチェックを推奨			
4	接触プレーのない練習	ユニット練習:ハンドオフドリル/パススケルトン/バシュートドリルなど	最低24時間以上 無症状
5	接触プレーを含む練習	接触プレー:ブロックやタックルドリル/スクリメージなど(※複数回目的の脳振盪では、特にキッキングゲームへの参加は回避することを検討)	最低24時間以上 無症状
6	競技復帰	試合復帰	-

* 最大心拍数=208 - 0.7 × 年齢 (例) 20歳の選手の場合: 208 - 0.7 × 20=194

図3 公益社団法人日本アメリカンフットボール協会の段階的競技復帰 (GRTP) プロトコール
各ステージの間は24時間以上の期間を確保し、症状の再発が無いことを確認する。

ロール検体が採取できていたのは6検体 (Pre1-6) であった。また、脳震盪から回復した選手の唾液検体を3選手、3検体 (Rec1-3) 採取した。

2. 2 microRNA 分析

脳震盪発症前の5検体と脳震盪発症後の5検体のRNAの抽出結果について、バイオアナライザー2100によるRNAの評価結果を図4に示す。抽出されたRNAの評価の指数であるRNA integrity number equivalent (RINe) はPost1の1検体のみ5.3と評価されたが、その他の検体は抽出されたRNA量が少なく測定範囲外であった。このため、今回採取した唾液検体からのmicroRNA測定は不可能であった。

2. 3 網羅的蛋白質質量分析

抽出された蛋白質は595であった。この中で、発現量の少ない蛋白質は除外し472の蛋白質を解析対象とした。Pre, Post, Recの3群におけるTotal read countsは均一であり、Multidimensional Scaling (MDS) においては、いずれの3群もク

ラスターは形成せず、分布は散在しており、特徴的な蛋白発現の傾向は認めなかった (図5,6)。Pre-Post間およびPost-Rec間での発現遺伝子解析 (Differential Expressed Genes:DEGs) の結果についてのvolcano plotを図7,8に示す。脳震盪後 (Post) の唾液検体では脳震盪前 (Pre) の唾液検体に比べ、12の蛋白発現がup-regulationし、2つの蛋白発現がdown-regulationしていた。脳震盪回復後 (Rec) の唾液検体では脳震盪後 (Post) の唾液検体に比べ、2つの蛋白発現がdown-regulationしていた。さらに、脳震盪後にup-regulationし、脳震盪回復時にdown-regulationしている蛋白発現を解析したところ、SPRR1A (Small proline-rich repeat protein1A) 蛋白が候補蛋白であった (図9)。SPRR1A蛋白はPreからPostにおいては有意に発現がup-regulationしており、PostからRecにおいて、有意ではないがdown-regulationの傾向を認めた (図8,9)。

3. 考 察

2022年10月にアムステルダムで開催された

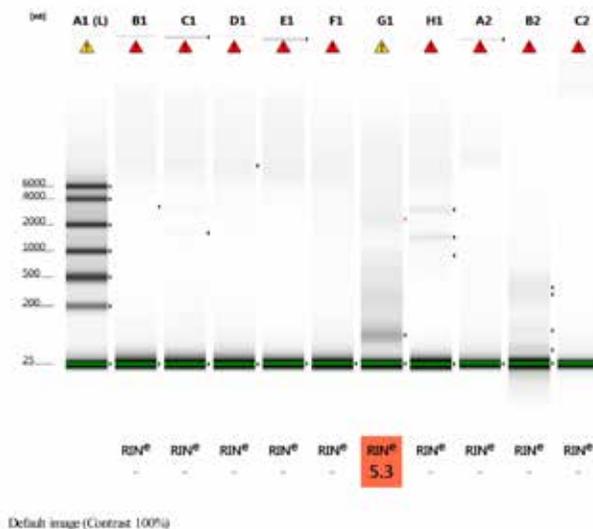


図4 バイオアナライザー2100でのmicroRNAの質の評価

RINは1検体で5.3, それ以外は測定範囲外であり, microRNAの解析は困難であった. 一般的に, RNA抽出の質を担保するためには, RINは6以上が必要とされる.

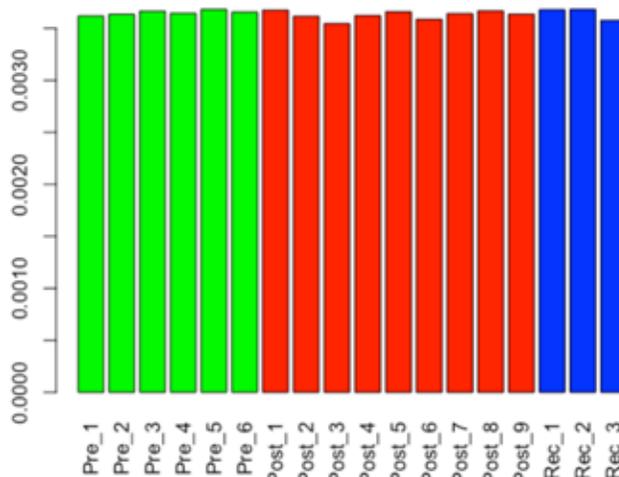


図5 Total read counts

Tota read countsは転写産物の断片数を表す. 各群でのリード数に大きな差は認めなかった.

第6回国際スポーツ脳震盪会議による consensus statement では, 体液を用いたバイオマーカーや遺伝子検査はまだ研究段階であり, 臨床現場での使用には適さないという位置付けである¹⁰⁾.

本研究では, スポーツ脳震盪を生じた学生アメリカンフットボール選手を対象に, 脳震盪発症前後の唾液中のバイオマーカーの探索を網羅的に行なった. ターゲットとしたバイオマーカーは miRNA とタンパク質であった. 脳震盪を含む軽

症頭部外傷におけるバイオマーカー研究の対象として唾液は近年注目されてきた¹¹⁾. Di pietro らは, ラグビー選手を対象に, 脳震盪を起こした選手と起こさなかった選手の唾液検体を解析し, 5つの microRNA が脳震盪を起こした選手において up-regulate されていることを報告した¹²⁾. さらに, 同グループは, microRNA を含む14の唾液中の small non-coding RNA の組み合わせが, 英国のラグビーのプロ選手に生じる脳震盪の診断に有用

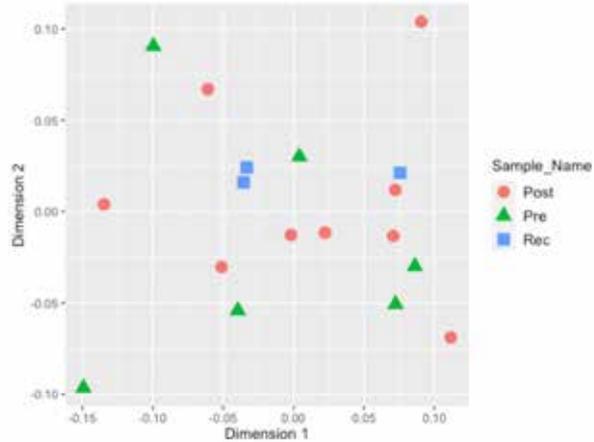


図6 Multidimensional scaling

Pre,Post,Recの各群の発現蛋白の分布は散在しており、特定のクラスターを形成するなどの特徴は認めなかった。

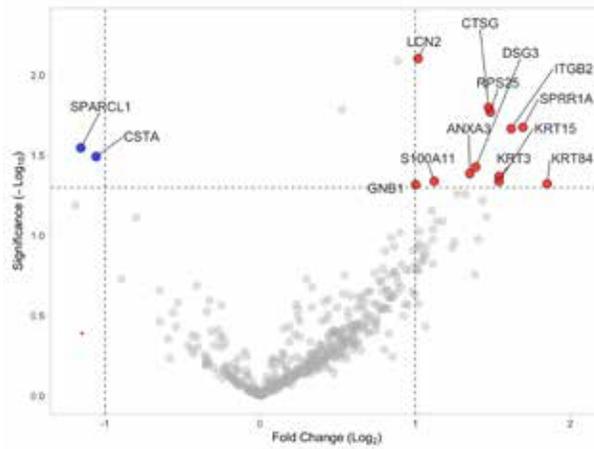


図7 Volcano plot (Pre vs Post)

脳震盪後 (Post) の唾液検体では脳震盪前 (Pre) の唾液検体に比べ、12の蛋白発現 (赤丸) がup-regulationし、2つの蛋白発現 (青丸) がdown-regulationしていた。

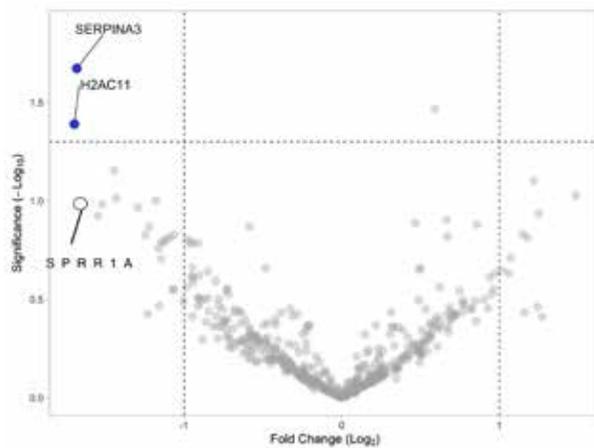


図8 Volcano plot (Post vs Rec)

脳震盪回復後 (Rec) の唾液検体では脳震盪後 (Post) の唾液検体に比べ、2つの蛋白発現 (青丸) がdown-regulationしていた。SPRR1Aに関して有意差はないが、down-regulationの傾向にあった。

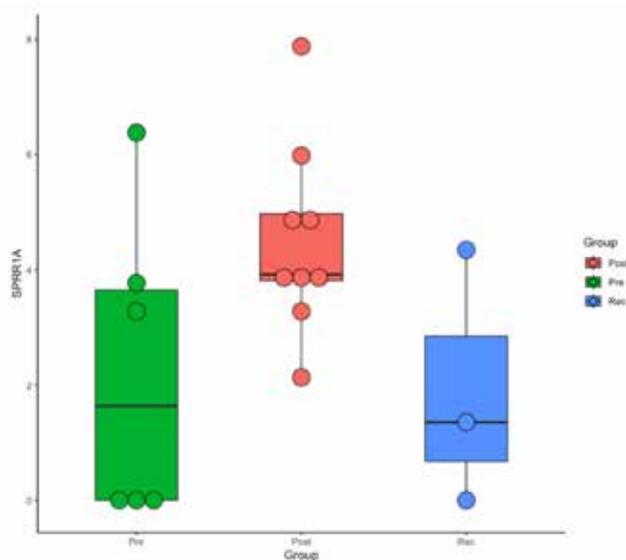


図9 Pre,Post,RecでのSPRR1A蛋白発現
SPRR1A蛋白発現はPre→Postで有意に増大し, Recでは発現の低下傾向が認められた。

であることを、前向き研究によって報告している¹³⁾。一方、頭部外傷領域において、蛋白発現の解析は血液や尿を中心に行われてきた¹⁴⁻¹⁷⁾。例えば脳震盪や軽症頭部外傷患者の血液中で上昇することが知られている蛋白として、細胞内カルシウム濃度調整機能に関わるS100B蛋白や中枢神経の軸索における構造蛋白であるNFL蛋白があるが、唾液検体における有用性は示されていない¹⁸⁾。これらの先行研究はいずれも欧米からの報告が主であり、国内からの報告はない。人種や性差、年齢などが影響する遺伝子発現解析において、国内の学生スポーツ選手を対象とした検討は意義が高いと考え、本研究を行うに至った。

検体の採取に関しては、関西学院大学アメリカンフットボール部の選手ならびにスタッフの協力のもとに、プロトコール通りの採取が可能であった。解析の第一段階として、microRNAの抽出と解析を行ったが、図4のようにRINeが低く、解析が困難であった。抽出されたRNAの評価の指数であるRINeは、1-10段階で抽出されたRNAの質を評価し、6以上が必要である。今回の唾液検体では、含まれるRNA量が少なかったことが

RINe低値の原因と考えられた。次に述べる蛋白解析では、蛋白の抽出が充分可能であったことを鑑みると、唾液検体の用量不足ではなく、保存中にmicroRNAの分解が進んだことが主な原因と考えられる。

今回、唾液検体の保存に使用したRNAlater™は、常温(25℃)で7日間、-20℃で無期限の唾液検体保存が可能である。唾液の保存については採取後1週間以内に-30℃の冷凍庫への保管としていたが、常温期間での保存期間中にRNAの分解が進んだ可能性がある。今後、唾液の保存については、より厳密・迅速に冷凍保存を行う必要がある。

解析の第二段階として、網羅的な蛋白発現の解析を行った。Post検体において発現が上昇し、Rec検体において発現が再度低下するような蛋白質が、脳震盪診断および回復の判断におけるバイオマーカー候補になりうると思った。候補となったSPRR1A蛋白は、上皮分化に関わる遺伝子群の1つであり、通常の神経細胞では検出されないが、軸索切断時の神経細胞において発現することが報告されており¹⁹⁾、損傷を受けた神経細胞の再生

に関わるバイオマーカーとして、頭部外傷動物モデルにおいて大脳皮質や海馬で重要な役割を担っている可能性がある^{20,21)}。

本研究においても、SPRR1Aは脳震盪発症後に有意に上昇し、脳震盪回復時には減少する傾向が認められており、今後ELISA法での再現性の検証にて脳震盪のバイオマーカーとしての有用性を評価することが重要であると考えらる。

4. 結 語

学生アメリカンフットボール選手を対象として、脳震盪の診断および回復の指標となる唾液中のバイオマーカー探索を行った。候補となったバイオマーカーは神経損傷時の神経細胞に再生に関わるとされるSPRR1A蛋白であった。今後、検証コホートやELISA法による解析を追加することで、スポーツ脳震盪におけるバイオマーカーとしての有用性を確認することが必要である。

謝 辞

本研究を行うに際し、唾液検体の採取に協力頂き、スポーツ脳震盪の現場における諸問題について多くの助言を頂きました関西学院大学アメリカンフットボール部ファイターズの部員と保護者の皆様、メディカルスタッフの皆様、トレーナーの小山智士先生、ディレクターの小野宏先生に感謝を申し上げます。

microRNAの抽出については、大阪大学免疫学フロンティア研究センターの石川昌和先生に協力頂きました。蛋白質量分析については、大阪大学微生物研究所の二宮彰紀先生にご協力頂きました。深く感謝申し上げます。

解析に協力頂いた吉村恂平先生、大西伸也先生、小倉裕司先生をはじめとする大阪大学救急医学教室の皆様にも感謝申し上げます。

最後に、本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人石本記念デサントスポーツ

科学振興財団および関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) McCrory P., Meeuwisse W., Dvorak J., et al., Consensus statement on concussion in sport-the 5 (th) international conference on concussion in sport held in Berlin, October, *Br. J. Sports Med.*, 2017;51:838-847(2016)
- 2) Goodwin G.J., John S.E., Donohue B., et al., Changes in ImpACT Cognitive Subtest Networks Following Sport-Related Concussion. *Brain Sci.*, 13 (2023)
- 3) Schatz P., Long-term test-retest reliability of baseline cognitive assessments using ImpACT. *Am. J. Sports Med.*, 38:47-53(2010)
- 4) Makdissi M., Collie A., Maruff P., et al., Computerised cognitive assessment of concussed Australian Rules footballers. *Br. J. Sports Med.*, 35:354-360(2001)
- 5) Kohl C., Wegener M., Nitsche A., Kurth A., Use of RNALater ((R)) Preservation for Virome Sequencing in Outbreak Settings. *Front Microbiol.*, 8:1888(2017)
- 6) Mutter G.L., Zahrieh D., Liu C., et al., Comparison of frozen and RNALater solid tissue storage methods for use in RNA expression microarrays. *BMC Genomics*, 5:88(2004)
- 7) Meeuwisse W.H., Schneider K.J., Dvorak J., et al., The Berlin 2016 process: a summary of methodology for the 5th International Consensus Conference on Concussion in Sport. *Br. J. Sports Med.*, 51:873-876(2017)
- 8) Echemendia R.J., Meeuwisse W., McCrory P., et al., The Concussion Recognition Tool 5th Edition (CRT5) : Background and rationale. *Br. J. Sports Med.*, 51:870-871(2017)
- 9) Echemendia R.J., Meeuwisse W., McCrory P., et al., The Sport Concussion Assessment Tool 5th Edition (SCAT5) : Background and rationale. *Br. J. Sports Med.*, 51:848-850(2017)
- 10) Patricios J.S., Schneider K.J., Dvorak J., et al., Consensus statement on concussion in sport: the 6th International Conference on Concussion in Sport-Amsterdam, October 2022. *Br. J. Sports Med.*, 57:695-711(2023)

- 11) Hicks S.D., Johnson J., Carney M.C., et al., Overlapping MicroRNA Expression in Saliva and Cerebrospinal Fluid Accurately Identifies Pediatric Traumatic Brain Injury. *J. Neurotrauma*, 35:64-72 (2018)
- 12) Di Pietro V., Porto E., Ragusa M., et al., Salivary MicroRNAs: Diagnostic Markers of Mild Traumatic Brain Injury in Contact-Sport. *Front Mol. Neurosci.*, 11:290 (2018)
- 13) Di Pietro V., O'Halloran P., Watson C.N., et al., Unique diagnostic signatures of concussion in the saliva of male athletes: the Study of Concussion in Rugby Union through MicroRNAs (SCRUM) . *Br. J. Sports Med.*, 55:1395-1404 (2021)
- 14) Daisy C.C., Varinos S., Howell D.R., et al., Proteomic Discovery of Noninvasive Biomarkers Associated With Sport-Related Concussions. *Neurology*, 98:e186-e198 (2022)
- 15) Vorn R., Mithani S., Devoto C., et al., Proteomic Profiling of Plasma Biomarkers Associated With Return to Sport Following Concussion: Findings From the NCAA and Department of Defense CARE Consortium. *Front Neurol*, 13:901238 (2022)
- 16) Anto-Ocrah M., Jones C.M.C., Diacovo D., Bazarian J.J., Blood-Based Biomarkers for the Identification of Sports-Related Concussion. *Neurol. Clin.*, 35:473-485 (2017)
- 17) Papa L., Ramia M.M., Edwards D., Johnson B.D., Slobounov S.M., Systematic review of clinical studies examining biomarkers of brain injury in athletes after sports-related concussion. *J. Neurotrauma*, 32:661-673 (2015)
- 18) Monroe D.C., Thomas E.A., Cecchi N.J., Granger D.A., Hicks J.W., Small S.L., Salivary S100 calcium-binding protein beta (S100B) and neurofilament light (NfL) after acute exposure to repeated head impacts in collegiate water polo players. *Sci. Rep.*, 12:3439 (2022)
- 19) Bonilla I.E., Tanabe K., Strittmatter S.M., Small proline-rich repeat protein 1A is expressed by axotomized neurons and promotes axonal outgrowth. *J. Neurosci.*, 22:1303-1315 (2002)
- 20) Marklund N., Fulp C.T., Shimizu S., et al., Selective temporal and regional alterations of Nogo-A and small proline-rich repeat protein 1A (SPRR1A) but not Nogo-66 receptor (NgR) occur following traumatic brain injury in the rat. *Exp. Neurol.*, 197:70-83 (2006)
- 21) Starkey M.L., Davies M., Yip P.K., et al., Expression of the regeneration-associated protein SPRR1A in primary sensory neurons and spinal cord of the adult mouse following peripheral and central injury. *J. Comp. Neurol.*, 513:51-68 (2009)