

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17920

研究課題名(和文) 頸部内頸動脈狭窄症におけるプラーク破綻同定のバイオマーカー開発

研究課題名(英文) Development of new biomarkers for the detection of plaque rupture in patients with cervical internal carotid artery stenosis

研究代表者

安藤 和弘 (Ando, Kazuhiro)

新潟大学・脳研究所・非常勤講師

研究者番号：20849004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、1. PDPN の発現量が高い IDH 野生型悪性神経膠腫の術後で可溶性 CLEC-2 値、C2PAC 指数が上昇していることが判明しました。2. 静脈血栓塞栓症を合併した際、可溶性 CLEC-2 値、C2PAC 指数が上昇しており、IDH 野生型悪性神経膠腫症例の静脈血栓塞栓症発症に血小板活性が強く関わっていることが判明しました。これまで、静脈血栓塞栓症合併には凝固系が強く関わっていると考えられてきましたが、本研究では、凝固系の亢進の前段階に血小板の活性化も強く関与していることが示唆され、IDH 野生型悪性神経膠腫症例に合併する静脈血栓塞栓症の病態解明に繋がりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果は術後に可溶性 CLEC-2 値を評価することで静脈血栓塞栓症合併をより早期に予知・発見することが可能となり、臨床におけるより安全な術後管理に寄与できることが期待されます。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that the sCLEC-2 level and C2PAC index tended to be higher in patients with IDH-wildtype high grade gliomas, which were suggested that the platelet activation was enhanced. In addition, we found that platelet activation is strongly involved in the development of VTE in patients with IDH-wildtype high grade gliomas as well as the coagulation system, which may be useful for elucidation the pathology of VTE and providing a new biomarker for VTE associated with IDH-wildtype high grade gliomas.

研究分野：脳神経外科

キーワード：Podoplanin CLEC-2 静脈血栓塞栓症 悪性神経膠腫

1. 研究開始当初の背景

頸部内頸動脈狭窄症は、狭窄部に生じる**プラークが破綻に伴って塞栓子(血栓)を形成し、これが飛散して脳梗塞を引き起こす**。CT, MRI, 頸動脈エコーでプラークの性状は評価可能であるが、**破綻を来しているか否かを同定することは不可能**である。プラークの破綻と共に血液中に漏れ出るタンパクが存在し、それらを実評価できればプラークの破綻を早期に同定することが可能となる。近年、動脈硬化が強い部分でポドプラニン陽性細胞の発現増加が注目されている。一方、ポドプラニンを生体内リガンドとして結合する血小板活性受容体 CLEC-2 (C-type lectin-like receptor 2)は、ポドプラニンと結合することで活性化し、可溶型 CLEC-2 となって血中に遊離することが報告されている。その他、血栓塞栓症であっても血小板が関わっている場合は CLEC-2 の上昇が報告されている。

2. 研究の目的

頸動脈プラークにおけるポドプラニンの発現や血液中の CLEC-2 値を実評価することで不安定性の予測を行い、より安全な周術期管理に繋げる。また、頸動脈疾患以外でも脳神経外科疾患における血栓塞栓症を合併する可能性のある脳腫瘍などの症例でもポドプラニンや CLEC-2 が臨床へ応用できないか模索する。

3. 研究の方法

まずは過去の手術検体で**頸動脈プラーク内のポドプラニン発現の評価 (step)**を行い、患者から採取した血液の**血中ポドプラニン濃度の測定、可溶型 CLEC-2 の血中濃度の測定 (step)**を行うこととする。また、これら値の測定は頸動脈狭窄症症例に限らず、脳腫瘍や良性疾患の手術症例でも行うこととした。可溶型 CLEC-2 の測定に関しては市販の ELISA キットは存在しないが、応募者らは**既に LIS メディエンスと共同研究を締結**し、キットの提供を受け、ELISA 法による測定を行えることとなった。

4. 研究成果

手術で摘出した頸動脈プラークをポドプラニン (PDPN)で染色し評価を行い、組織学的に炎症細胞が目立つ領域で PDPN の発現が管腔構造を形成するように目立っており、血栓形成や炎症に PDPN 陽性の管腔構造が関わっている可能性が示唆された (図 1)。PDPN がリンパ管内皮に発現するタンパクであることに注目すると、肥厚した内皮にリンパ管が発現している可能性が示唆された。リンパ管マーカーである LYVE-1 で染色を行うと炎症の強い領域で LYVE-1 陽性の管腔構造が目立っていた (図 2)。さらに生化学的な観点から炎症領域の組織でウエスタンブロットも行い、LYVE-1 の発現を確認することができた。以上の結果から頸動脈の動脈硬化部分にはリンパ管が発現しており、炎症細胞などの供給源になっていることが示唆された。この結果は、動脈硬化のメカニズムを明らかにする点では今後の治療へのアプローチなど臨床的な意義は大きいと考える。

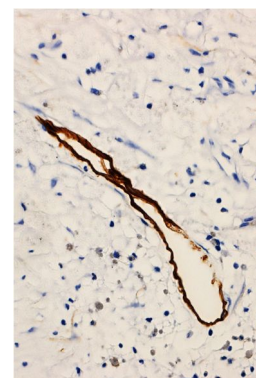


図 1 PDPN 陽性の管腔構造

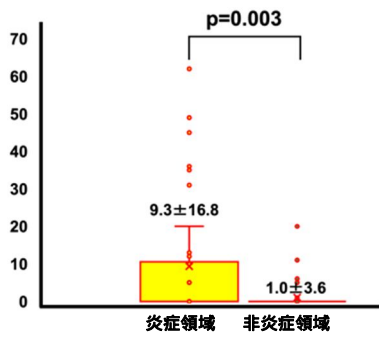


図2 LYVE-1 陽性の管腔構造

「血栓形成・炎症反応」に注目して血中のPDPN値、またPDPNのリガンドであり血小板表面に発現するCLEC-2の値(血小板の活性化マーカー)に着目して様々な症例(頸動脈狭窄症症例、脳腫瘍術後症例、その他良性疾患症例)で測定を行った。すると悪性脳腫瘍術後の静脈血栓塞栓症(VTE)合併症例、特にIDH-wildtypeの悪性神経膠腫症例でCLEC-2値が上昇していることが示された。そこで、健常人(HV)、微小血管減圧術症例(脳実質に操作が加わらない手術症例)、IDH-mutant症例、IDH-wildtype症例でCLEC-2値を比較するとIDH-wildtype症例で有意にCLEC-2値は上昇していた(図3)。IDH-wildtype症例の中で、VTE合併例と非合併例とで比較するとVTE合併例でCLEC-2値は上昇する傾向にあった。CLEC-2は血小板表面上に発現しているので血小板数に影響を受けることを考え、CLEC-2値を血小板数で除した指標=C2PAC indexで比較するとVTE合併症例で有意に上昇していた。C2PAC index = 3.7でカットオフ値とした場合、VTE合併予測は感度87.5%、特異度51.9%で可能だった(図4)。以上の結果からIDH-wildtypeの悪性神経膠腫における血小板活性はVTE合併に関与しており、C2PAC indexはVTE合併を予測する新しいバイオマーカーとなる可能性があることが示された。本研究はThrombosis research 223 (2023), 36-43に投稿されている。

「血栓形成・炎症反応」に注目して血中のPDPN値、またPDPNのリガンドであり血小板表面に発現するCLEC-2の値(血小板の活性化マーカー)に着目して様々な症例(頸動脈狭窄症症例、脳腫瘍術後症例、その他良性疾患症例)で測定を行った。すると悪性脳腫瘍術後の静脈血栓塞栓症(VTE)合併症例、特にIDH-wildtypeの悪性神経膠腫症例でCLEC-2値が上昇していることが示された。そこで、健常人(HV)、微小血管減圧術症例(脳実質に操作が加わらない手術症例)、IDH-mutant症例、IDH-wildtype症例でCLEC-2値を比較するとIDH-wildtype症例で有意にCLEC-2値は上昇していた(図3)。IDH-wildtype症例の中で、VTE合併例と非合併例とで比較するとVTE合併例でCLEC-2値は上昇する傾向にあった。CLEC-2は血小板表面上に発現しているので血小板数に影響を受けることを考え、CLEC-2値を血小板数で除した指標=C2PAC indexで比較するとVTE合併症例で有意に上昇していた。C2PAC index = 3.7でカットオフ値とした場合、VTE合併予測は感度87.5%、特異度51.9%で可能だった(図4)。以上の結果からIDH-wildtypeの悪性神経膠腫における血小板活性はVTE合併に関与しており、C2PAC indexはVTE合併を予測する新しいバイオマーカーとなる可能性があることが示された。本研究はThrombosis research 223 (2023), 36-43に投稿されている。

図3 各症例でのCLEC-2平均値

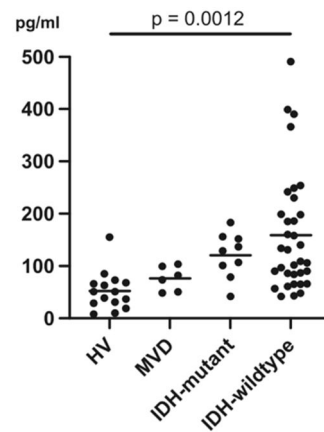
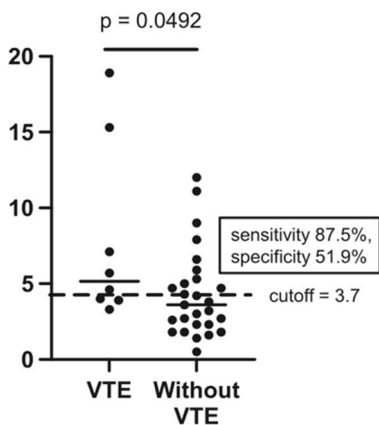


図4 IDH-wildtypeにおけるVTE合併例と非合併例のC2PAC index



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ando Kazuhiro, Natsumeda Manabu, Kawamura Masahide, Shirakawa Kamon, Okada Masayasu, Tsukamoto Yoshihiro, Eda Takeyoshi, Watanabe Jun, Saito Shoji, Takahashi Haruhiko, Kakita Akiyoshi, Oishi Makoto, Fujii Yukihiko	4. 巻 223
2. 論文標題 Elevated ratio of C-type lectin-like receptor 2 level and platelet count (C2PAC) aids in the diagnosis of post-operative venous thromboembolism in IDH-wildtype gliomas	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Thrombosis Research	6. 最初と最後の頁 36 ~ 43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.thromres.2023.01.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安藤和弘
2. 発表標題 可溶性CLEC-2による悪性神経膠腫術後静脈血栓塞栓症の病態解明とモニタリングの可能性
3. 学会等名 第80回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 可溶性CLEC2を用いた癌患者における血栓症リスクの予測方法	発明者 藤井 幸彦	権利者 LSIメディエンス
産業財産権の種類、番号 特許、2021-001-P	取得年 2021年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 可溶性LEC2を用いた癌患者における血栓症リスクの予測方法	発明者 藤井幸彦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、用途特許	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	白川 嘉門 (Shirakawa Kamon)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	川村 雅英 (Kawamura Masahide)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関