

令和 7 年 6 月 10 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2024

課題番号：21K08063

研究課題名（和文）高度石灰化冠動脈病変を標的とした新規メタボライトの探索

研究課題名（英文）Exploring the novel metabolites targeting advanced calcified coronary artery lesions

研究代表者

赤尾 浩慶（AKAO, Hironobu）

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50398997

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）：Rotablator施行前、施行直後、3時間後、24時間後に経静脈的に採血を行い、得られたサンプルをメタボローム解析に使用した。Agilent CE-TOFMSによる網羅的な解析を行った。その結果、50種類を超えるメタボライトが検出された。Rotablator施行により影響を受けたメタボライトも多く、PCA解析の結果、施行前と施行直後は似たパターンを示していたが、施行後3時間、24時間後にはそれぞれ大きく異なる結果が得られた。興味深いことに、体内での代謝マップの中でアミノ酸の代謝経路に関わるメタボライトが変動している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

冠動脈硬化症は死因の上位を占め、生活様式の変化により近年増加している。また高度な石灰化を伴う冠動脈病変は治療困難な場面が多い。本研究では、冠動脈Rotablator治療後に冠循環から体循環に流出する動脈硬化血管壁由来分子を含む血液検体を用いることにより、in vivoの血清中に含まれるメタボライトを同定し、治療前後の動態ならびにそのパスウェイを解明してきた。これらの網羅的な解析結果を活かして、変動が観察された特定のメタボライトについて多数の検体にて解析を実施していくことで、新たな治療法開発への発展につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：We performed blood samples were collected venous before, immediately after, 3 hours, and 24 hours after rotablator treatment, and the samples were used for metabolomic analysis. Comprehensive analysis was performed using Agilent CE-TOFMS. As a result, more than 50 types of metabolites were detected. Many metabolites were affected by rotablator treatment, and PCA analysis showed similar patterns before and immediately after treatment, but the results were significantly different 3 hours and 24 hours after treatment. Interestingly, it was suggested that metabolites related to the metabolic pathway of amino acids may have fluctuated within the metabolic map in the body.

研究分野：循環器内科学

キーワード：冠動脈硬化症 rotablator メタボローム メタボライト 疾患マーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

冠動脈硬化症はステントの登場により冠動脈カテーテル治療 (percutaneous coronary intervention: PCI) が飛躍的に向上したが、高度な石灰化を伴う冠動脈病変は、血管解離などの合併症が多いことや、再狭窄率が高いなど未解決の問題が多く、アテローム性動脈硬化の成因解明や有効な予防法・治療法の開発は重要な社会課題である。最近では血管石灰化は骨芽細胞の分化マーカーである osteopontin (OPN)、alkaline phosphatase (ALP)、core binding factor alpha-1 (cbfa-1) など骨形成に関わるタンパク質の発現が血管石灰化部分に確認され、なおかつ実際に石灰化能を有することも確認されている (Abedin M, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1161-70. Johnson RC, et al. *Circ Res* 2006;99:1044-59.)。このような血管壁の石灰化が fetuin-A、matrix Glaprotein (MGP)、osteoprotegerin (OPG)、bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) など様々な因子の調節を受けている報告もある。

石灰化冠動脈病変に対する rotablator 治療は石灰化を含む進行した冠動脈硬化症に対する debulking device であり、動脈壁の成分を赤血球サイズ以下に粉碎して削り取る。治療前後で変動する新規バイオマーカーを見いだしたところ、本治療により血管壁構成成分が冠循環に流出し、体循環に一定時間停滞するとの仮説が成り立った。申請者は、90 症例において治療前後で OPN と血管炎症マーカーであるペントラキシン 3 (PTX3) の血中レベルが特異的かつ有意に ($P < 0.0001$) 上昇し、それぞれの上昇幅は強い正相関を認めることを明らかにしてきた (平成 26 年欧州心臓病学会発表)。他の石灰化関連分子である OPG は治療前後での変化を認めない事より (平成 28 年日本循環器学会学術集会発表)、血管壁に存在する分子が体循環に流出するこの仮説の妥当性を強く支持している。

さらに OPN は miR-181a との相関が報告され、新しい分子マーカーとして注目されている

(Remus EW et al. *Atherosclerosis* 2013) ことより、rotablator 治療前後に採取した血液検体を用いマイクロアレイ解析にて網羅的にエクソソーム内包 miRNAs を測定し、その経時的挙動から石灰化動脈硬化巣形成に関わる動脈硬化関連新規 miRNAs の発見を目指した。その結果マイクロアレイ解析、次世代シーケンサーでの解析の結果、治療前後の血液検体及びコントロール検体から得られたエクソソーム内 miRNA より AKT、NF-KB、MEK への経路への関与が示唆された。

メタボライト (代謝物) を網羅的に解析するメタボローム解析により得られた代謝物はセントラルドグマの最下流に位置するため、ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオームで得られる、より上流の情報よりも表現型に近く、生体内の状態を知る最適な方法であると考えられる。また、エクソソーム内には、数百種類にも及ぶ DNA、メッセンジャー RNA、miRNA やタンパク質が内包されているといわれており、細胞が局所で分泌したエクソソームは一定期間血中に存在することも分かっている。エクソソーム内に含まれる代謝物を測定した例についてはほとんど報告がなかったが、近年報告がされ始めている。このことから、石灰化冠動脈の切削後の動脈硬化血管壁由来分子を含む血液検体を用いることにより、血清中のメタボライト (代謝物) およびアテローム性動脈硬化血管壁に存在する白血球由来細胞 (マクロファージ) 平滑筋細胞等のエクソソーム由来メタボライト (代謝物) を同定し、治療前後の動態ならびにその機能を解明することにより治療法開発への発展を目指す研究に意義がある。

2. 研究の目的

本研究で強調したい最大の特徴は動脈壁を切削前後に経時的に採取した血液検体サンプルを用いることである。石灰化をはじめとする進行したヒト動脈硬化巣における分子メカニズムに

については、剖検例ならびに実験系における病理学的解析のみであり、臨床例を用いた解析は見当たらない。さらに、進行した冠動脈硬化症に対する rotablator 施行後に、血管壁に存在する分子が体循環に流出し分子特異的に変動していることから、治療前後の血清中のメタボライト(代謝物)ならびに血液中に流出した経時的なエクソソーム内に含まれるメタボライト(代謝物)挙動に着目して解析を行うことを目的とした。このような証明した報告は国内外において前例がなく、血管壁内の動脈硬化巣にかかわる代謝物を生体内で評価する革新的な研究である。従来は、動脈硬化巣内に存在する物質は組織学的にしか解析できなかったが、rotablator 治療は、それらを血中へ遊離させると推測される。

3. 研究の方法

本研究では高度石灰化冠動脈硬化症に対する治療として rotablator 治療を行った症例を対象とし、rotablator 施行前、施行直後、3 時間後、24 時間後に経静脈的に EDTA 採血を行い、得られたサンプルをメタボローム解析に使用した。サンプルはキャピラリー電気泳動と飛行時間型質量分析装置 (TOFMS) の組み合わせで解析し、メタボライトを半定量的に同定した。本研究の要となるメタボローム解析は、実績のあるヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ社の受託により Agilent CE-TOFMS system (Agilent Technologies 社) を用いて実施した。

4. 研究成果

血清サンプルについて Agilent CE-TOFMS による網羅的な解析を行った。その結果、50 種類を超えるメタボライトが検出された。Rotablator 施行により影響を受けたメタボライトも多く、PCA 解析の結果、施行前と施行直後は似たパターンを示していたが、施行後 3 時間、24 時間後にはそれぞれ大きく異なる結果が得られた。興味深いことに、体内での代謝マップの中で芳香族アミノ酸の代謝経路に関わるメタボライトが変動している可能性が示された。今後、網羅的な解析結果を活かして、変動が観察された特定のメタボライトについて多数の検体にて解析を実施していく予定である。得られたメタボローム解析の結果からは、芳香族アミノ酸代謝に加えていくつかのパスウェイの関与が示唆されてきた。特に 24 時間後に大きく変動したメタボライトが多く、治療による影響を時間経過を追って検出できる可能性が高いと考えている(下図に一部を示した)。今後は、患者のサブグループ(例えば透析治療の有無)に基づいてデータの再解析を行うことによって、再現性を求めていく予定である。

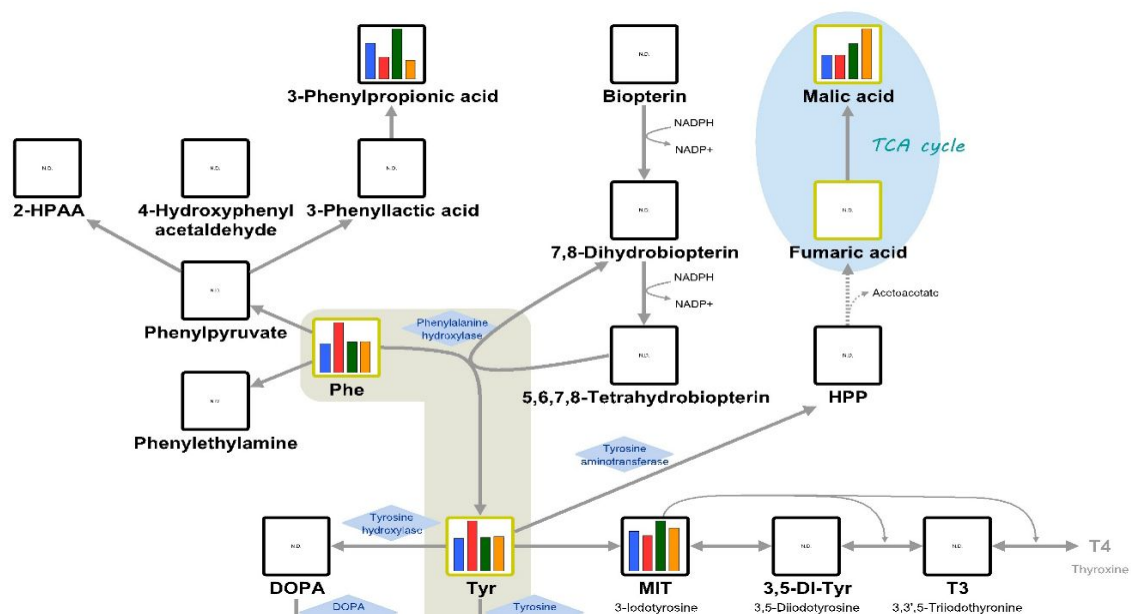


図 メタボローム解析結果を KEGG 上で表示したもの

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	中村 有香 (NAKAMURA Yuka) (00565632)	金沢医科大学・総合医学研究所・助手 (33303)	
研究分担者	飯田 安保 (IIDA Yasuo) (10337173)	金沢医科大学・一般教育機構・教授 (33303)	
研究分担者	梶波 康二 (KAJINAMI Kouji) (40262563)	金沢医科大学・医学部・教授 (33303)	

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