

令和 6 年 6 月 1 8 日現在

機関番号： 1 2 6 0 2

研究種目： 研究活動スタート支援

研究期間： 2022 ～ 2023

課題番号： 2 2 K 2 0 9 5 6

研究課題名（和文）頸動脈狭窄症の発症・進行に対するタンパクのシトルリン化が与える影響に関する研究

研究課題名（英文）Influence of Citrullination for Carotid Artery Stenosis

研究代表者

青山 二郎（Aoyama, Jiro）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号： 3 0 9 6 4 7 1 2

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,200,000 円

研究成果の概要（和文）：症候性群8例・無症候性群12例と、安定プラーク(S)群8例・不安定プラーク(U)群12例の比較では患者背景にそれぞれ有意差はなかった。PAD4とPDIA1の血中濃度は症候性群・無症候性群・健常者群と、S群・U群・健常者群のそれぞれ3群間で有意差はなかった。  
頸動脈プラーク標本を作成しHE染色とMPO、Histone H3、PAD4の免疫染色を行った。HE染色では大部分は炎症細胞を認めず紡錘形の線維芽細胞や石灰化が主体だった。炎症細胞集積部位では好中球はほとんど認めず単球・マクロファージが主体だった。免疫染色ではMPO、Histone H3、PAD陽性細胞数は2群間で有意差はなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頸動脈狭窄症に対して内膜剥離術を施行した患者を対象に、頸動脈狭窄症の発症様式やプラーク性状の違いに好中球タンパクシトルリン化がどのように関与しているかを検討した。症候性群・無症候性群、並びに安定プラーク群・不安定プラーク群の2群間で患者背景に違いはなく、プラーク内の活性化好中球数やヒストンH3、PAD4陽性細胞数にも違いはなかった。これまでの研究では好中球シトルリン化は細胞接着現象に関与していることが示唆されているが、本研究結果からは頸動脈狭窄症の発症形式やプラーク性状の違いには関与していない可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：There were no significant differences in patient backgrounds between the 8 symptomatic and 12 asymptomatic groups and the 8 stable (S) and 12 unstable (U) plaque groups, respectively.

Carotid plaque specimens were prepared and subjected to HE staining and immunostaining for MPO, Histone H3, and PAD4. In the inflammatory cell accumulation sites, neutrophils were rarely observed, and monocytes and macrophages were predominant. Immunostaining showed no significant difference in the number of MPO-, Histone H3-, and PAD-positive cells between the each two groups.

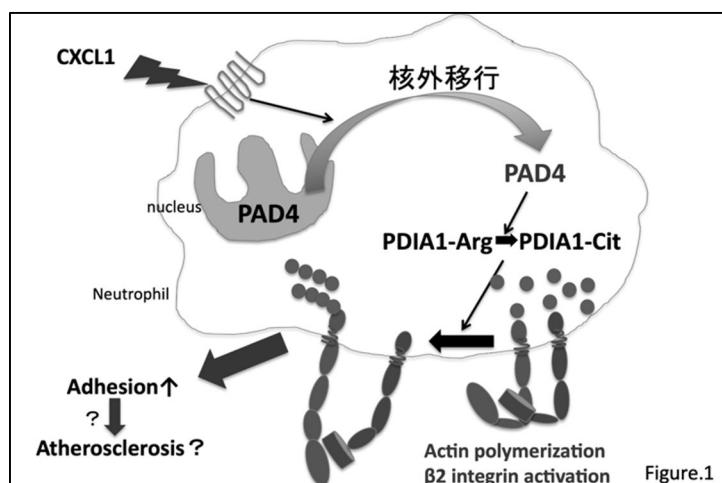
研究分野： 動脈硬化

キーワード： 好中球 シトルリン化 動脈硬化症 頸動脈狭窄症 PAD4

## 1. 研究開始当初の背景

我々のグループでは過去に生体顕微鏡を用いてマウスの大腿動脈における血管炎症の初期段階の白血球接着現象を観察してきた。普通食を与えたマウスでは白血球の接着が見られない一方で、高脂肪食を負荷したマウスでは白血球のローリング、接着が認められ、その接着する白血球は monocyte ではなく好中球であることを突き止めた。以上のことから、高脂肪食誘導性の血管炎症の初期段階においては monocyte ではなく好中球の活性化が重要であることが示唆された (Osaka M et al. Sci Rep, 2016)。次に高脂肪食を負荷したマウスでは血管炎症が起きるその初期段階において好中球の大腿動脈への接着が見られ、動脈硬化症モデルマウスである LDLR-/-マウスに高脂肪食を負荷するとその接着数が有意に亢進したこと、LDLR-/-マウスに高脂肪食を負荷すると血中の好中球数と、好中球活性化マーカーである MPO, NE が優位に上昇していたこと、LDLR-/-マウスでは好中球の核内におけるヒストン H3 のシトルリン化が見られたことを報告し、好中球におけるヒストン H3 のシトルリン化が好中球の活性化・接着に関与している可能性を示した (Osaka M et al. JACC Basic Transl Sci, 2021)。

また in vitro の実験で、高脂肪食誘導性の好中球の血管内皮細胞への接着は、PAD4 の核外移行によって PDIA1 がシトルリン化することにより、アクチン重合と活性化  $\beta 2$  インテグリンを介して亢進することを見出した (Aoyama J et al. J Atheroscler Thromb, 2021) (Figure.1)。



動脈硬化性疾患の1つである頸動脈狭窄症においても同様の機序が予想されるものの、その発症・進行において好中球内のシトルリン化タンパクがどの程度関与しているは不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、PAD4 によってシトルリン化したタンパクが頸動脈狭窄症の発症、進行に寄与しているかを解明することにより、新規治療薬の開発につなげることである。現在、頸動脈狭窄患者に対しては頸動脈内膜剥離術、頸動脈ステント留置術、あるいは内科的治療としては降圧剤による血圧管理やスタチン製剤などによる LDL-cholesterol の厳重な管理などが広く行われている。一方で頸動脈狭窄の発症や進行を予防するような薬剤は現時点ではない。そこで頸動脈狭窄のメカニズムの詳細を解明することにより、狭窄の進行を予防する新規薬剤の開発を目指す。

これまでの先行研究により、PAD4 阻害剤を用いてタンパクのシトルリン化を抑制することで好中球の血管内皮細胞への接着の抑制を介して頸動脈プラークの形成抑制や、プラーク性状の安定化をはかることにつながる可能性がある。これによって頸動脈狭窄症の発症予防や進行抑制に PAD4 阻害剤というこれまでとは全く違った切り口の薬剤を開発できる可能性がある。また、シトルリン化タンパクの新たな候補分子がスクリーニングされた場合にはその抑制や阻害剤が頸動脈狭窄症の発症予防や進行抑制に効果を示す可能性がある。

## 3. 研究の方法

本研究では、まず頸動脈狭窄症患者のプラーク検体や血液検体を用いて、PAD4 やシトルリン化タンパクがプラーク形成や頸動脈狭窄症の発症に与える影響を確認した。

実験は以下の項目を行った。

患者のカルテより病歴、血液検査、生理検査 (心電図、レントゲン、エコー)、画像所見 (CT、MRI) のデータを得る。

頸動脈狭窄症患者と健常者の血液サンプルを用い、血中の PAD4・PDIA1 の濃度を ELISA 法にて測定する。

頸動脈狭窄症患者の頸動脈プラークの HE 染色標本と、単球・好中球活性化に関する因子、ならびに PAD4 とヒストン H3 の免疫組織化学染色標本を作成し、プラーク中の活性化好中球、PAD4 やヒストン H3 陽性細胞数を定量化する。

これらが頸動脈狭窄症の発症・進行に与える影響を比較するために、症候性と無症候性の 2 群、

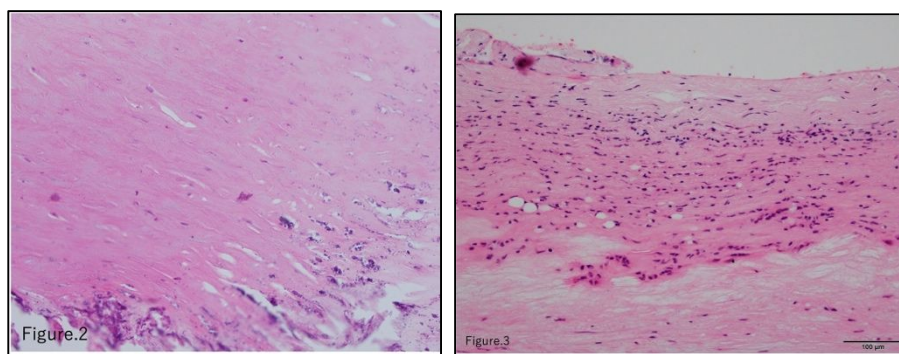
または安定プラークと不安定プラークの2群(血液サンプルについてはこれに健常者群を加えて3群)に分けて統計解析を行い、群間で有意な所見があるかを調べた。

#### 4. 研究成果

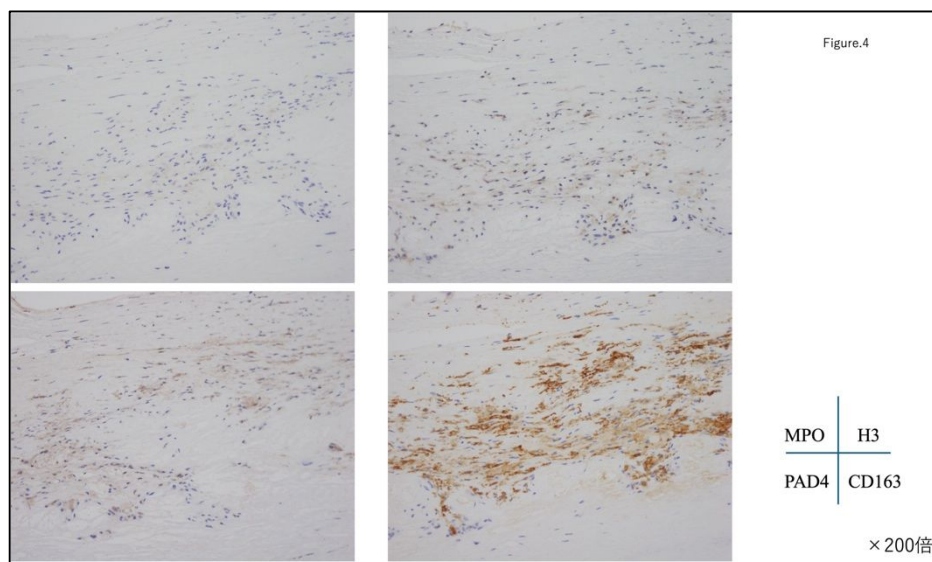
症候性群8例・無症候性群12例の比較では患者背景(年齢、性別、WBC数、好中球の比率、Cre値、HbA1c値、LDL-cholesterol値、中性脂肪値、BNP値、狭窄率(NASCET法)、生活習慣病(高血圧症、脂質異常症、糖尿病)の既往歴の有無)にそれぞれ有意差は認めなかった。同様に安定プラーク(S)群8例・不安定プラーク(U)群12例の比較でも上記項目に有意差は認めなかった。

次に健常者とCEAを行った患者の血液検体を用いてPAD4とPDIA1の血中濃度を測定した。PAD4値は症候性群・無症候性群・健常者群でそれぞれ $0.74 \pm 0.78$ ,  $1.04 \pm 1.59$ ,  $0.90 \pm 0.60$ (ng/ml)で有意差は認めなかった。S群・U群・健常者群でも同様に $0.69 \pm 0.86$ ,  $1.11 \pm 1.60$ ,  $0.90 \pm 0.60$ (ng/ml)で有意差は認めなかった。PDIA1値は症候性群・無症候性群・健常者群でそれぞれ $0.60 \pm 0.25$ ,  $0.59 \pm 0.47$ ,  $0.50 \pm 0.28$ (ng/ml)で有意差は認めなかった。S群・U群・健常者群でも同様に $0.49 \pm 0.22$ ,  $0.69 \pm 0.47$ ,  $0.50 \pm 0.28$ (ng/ml)で有意差は認めなかった。

次に頸動脈プラーク標本を作成しHE染色とMPO、Histone H3、PAD4の免疫染色を行った。HE染色では大部分は炎症細胞を認めず紡錘形の線維芽細胞や石灰化が主体だった(Figure.2)。炎症細胞集積部位では好中球はほとんど認めず単球・マクロファージが主体だった(Figure.3)。



免疫染色では好中球の活性化マーカーであるMPO、Histone H3、PAD4、単球のマーカーであるCD163の染色を行った。代表例をFigure.4に示す。症候性群、無症候性群、S群、U群いずれにおいてもMPO、Histone H3、PAD4陽性細胞は少数であり、CD163陽性細胞を多数認めた(Figure.4)。



症候性群の1視野あたりのMPO、Histone H3、PAD4陽性細胞数は $1.5 \pm 1.3$ ,  $2.8 \pm 1.7$ ,  $2.1 \pm 2.4$ (個)、無症候性群ではそれぞれ $1.6 \pm 2.5$ ,  $2.5 \pm 2.2$ ,  $2.2 \pm 3.2$ (個)で有意差は認めなかった。同様に安定プラーク群と不安定プラーク群でも上記の陽性細胞数はそれぞれ $1.5 \pm 2.1$ ,  $2.5 \pm 3.5$ ,  $3 \pm 4.2$ ,  $1.5 \pm 2.1$ ,  $2.6 \pm 1.8$ ,  $2.0 \pm 2.7$ (個)であり有意差は認めなかった。

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------