

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791510

研究課題名(和文) 網羅的遺伝子発現解析による脳血管攣縮発症メカニズムの解明とバイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Gene expression profiling of cerebral artery and search for biomarkers of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage

研究代表者

吉川 雄一郎(Kikkawa, Yuichiro)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：80423515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：くも膜下出血(SAH)後の脳血管攣縮は、頭蓋内主幹動脈の遅発性持続性狭小化により脳虚血を引き起こし、SAH患者の予後を大きく左右する。しかし、脳血管攣縮発症の詳細なメカニズムは解明されていない。本研究では、くも膜下出血後のウサギ攣縮脳血管において、rabbit オリゴ DNA マイクロアレイを用いて経時的な遺伝子発現解析を行った。マイクロアレイの結果、SAH発症3日目において遺伝子の数および発現比、発現パターンが最も著しく変化していた。一方、CT angiographyを用いて脳血管攣縮の経過を評価した結果、脳血管攣縮は遺伝子発現変動に遅れて発症5日目にピークに達することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Cerebral vasospasm is one of the most important cerebrovascular events following subarachnoid hemorrhage (SAH) and characterized by delayed and prolonged contraction of cerebral arteries, which may cause cerebral ischemia and lead to death or neurological deficits in patients with SAH. However, the molecular mechanisms which contribute to the development of vascular events including cerebral vasospasm remain to be elucidated. In this study, we investigated the time course of changes in the gene expression of cerebral artery using rabbit SAH model by using Agilent rabbit oligo DNA microarrays. Microarray analysis revealed that the number, magnitude of fold change, and gene expression pattern were most dynamically changed on day 3, whereas CT angiography revealed significant narrowing of basilar artery with a peak on day 5 after SAH.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：Cerebral vasospasm Subarachnoid hemorrhage Microarray Gene expression CT angiography

1. 研究開始当初の背景

脳血管攣縮はくも膜出血後に生じる脳血管イベントの中でも最も重要なものの1つであり、遅発性かつ持続性の脳血管狭窄という特徴を有している。これにより、くも膜下出血患者に脳虚血を引き起こし神経脱落症状を来したり死亡に至ることもある。それ故、くも膜下出血患者治療においては脳血管攣縮の予防と治療が重要な役割をになっている。脳血管攣縮の進行に寄与すると考えられるさまざまな原因がこれまでに明らかにされてきているが、くも膜下出血後の脳血管における遺伝子発現の詳細は未だに影になっていない。

マイクロアレイ法は同時に何万もの遺伝子解析を可能にする解析手法である。本手法によりチップに搭載された遺伝子全体を一度に解析できるため、何万もの遺伝子相互作用の全体像を一度に得ることができる。この手法は、多くの疾患のメカニズム解明に役立っており、例えば心筋梗塞や脳動脈瘤といった疾患において、病態の鍵となる遺伝子の抽出やそれらの相互作用が解明されつつある。

脳血管攣縮は複雑で様々な因子が関与した病態であると考えられている。よって、この新しい手法により、病態の鍵となるような遺伝子の抽出や、それらの多彩な遺伝子機能ネットワーク内の相互作用の解明により、病態メカニズムの全体像の把握が可能であると考えられる。さらに、遅発性の発症という脳血管攣縮の特徴的病態を考えると、経時的な脳血管の遺伝子発現解析は脳血管攣縮の病態解明に大いに役立つと考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではウサギSAHモデルの脳底動脈における経時的な遺伝子発現をマイクロアレイ法を用いて解析する。さらに、脳血管攣縮期における発現変動遺伝子の相互作用を解明するために Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA) を用いたパスウェイ解析を行う。これを、SAH後の脳血管攣縮の経時的推移と比較し、脳血管攣縮の病態に関与する分子の同定、遺伝子ネットワークの解明を行う。

3. 研究の方法

1)ウサギくも膜下出血モデル作成
オスの日本白色ウサギ (2.5~3.0 kg) に、ケタミンの筋肉内注射(40 mg/kg 体重)及びペントバルビタールナトリウムの静脈内注射(20 mg/kg 体重)により麻酔を施した。0日目、ウサギを腹臥位にし、23ゲージ翼状針を用いて0.5 mLの脳脊髄液を大槽から経皮的に吸引し、代わりに耳動脈の中枝から得た2.5mLの自家動脈血を注入した。その後、頭部を30度下方に傾斜させた状態で30分間保持した。2日目、1回目と同様に2回目の自家血注入を施行した。対照モデルとしては、SAH未発症モデルを用いた(day 0)。

2)CT angiography を用いた血管径の測定
それぞれのウサギに対し、初回の血液注入の直前 (day 0)、day 3、day 5 および day 7 の計4回のCTAを行った。Philips社製の256列多列検出器型CT (BrillianceTM iCT 256-Slice) を使用し、超高解像度モードにより撮像を行った。撮像条件は以下の通りである: voltage; 120 kV, current; 400 mA/slice, collimation; 20×0.625 mm, slice thickness; 0.67 mm, helical pitch; 0.35, rotation time; 0.5 s, matrix; 1024×1024, focal size; 0.6×0.7 mm。造影剤には60% ウログラフィンを用い、耳介静脈から耐圧翼状針を用いて毎秒1 mlの速度で注入した。造影剤投与のタイミングは、最初にCT perfusionを行い、頭蓋外内頸動脈におけるピーク増強時間を測定した後に決定した。血管径の計測には付属のワークスペース (Extended Brilliance Workspace; Philips社) とソフトウェア (Advanced Vessel Analysis; Philips社) を用いた。Advanced Vessel Analysisにより、脳底動脈先端部から中枢側へ1cmまでを等間隔に10か所抽出し、その断面積を算出し、最大狭窄部位の断面積を測定した。

3)脳底動脈からのTotalRNAの採取
TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いて脳底動脈からTotal RNAを抽出した。Total RNA純度は吸光度計 (Nano-Drop2000c; ThermoScientific, Wilmington, DE, USA) と電気泳動 (Experion; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) で測定した。260/280比が1.8以上かつRNA Quality Index が9.0以上のsampleを使用した。

4)ウサギ脳底動脈を用いたマイクロアレイ解析
Low Input Quick Amp one-color Labeling kit (Agilent Technologies)を用いて50 ngのtotal RNAからcRNAを増幅させ、標識し、Rabbit マイクロアレイ (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) とハイブリダイズさせ、Agilent Microarray scanner G2505B (Agilent Technologies) でスキャンした。Feature Extraction Software (9.5.1.1) (Agilent Technologies)を用いて、相対的シグナル値とバックグラウンドを算出した。アジレント社推奨のプロトコールでハイブリダイゼーションによって得られるシグナル値とスポット情報より各プローブのシグナル値とフラグを算出した。サンプルのシグナル値をlog₂変換しBioconductorの'preprocessCore'を用いてquantile法で正規化を行った。続いて各時点でのsample間の遺伝子発現の分布を調べるために散布図を作成し統計ソフトR (version 2.9.0, <http://cran.ism.ac.jp/>)を用いて相関係数を算出した。その後、Bioconductorのlinear

models for microarray analysis (limma)を用いて SAH モデルの発現変動遺伝子を同定した。本研究では対照モデル(day 0)と比較して、SAH サンプルにおいて (days 3, 5 and 7) で limma value of $P < 0.05$ かつ $|\text{limma log}_2 \text{ fold change}| > 1.0$ を満たすものを発現変動遺伝子と定義した。本マイクロアレイデータは Gene Expression Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)より閲覧可能である(GSE44910)。1羽のウサギから得られる脳底動脈は非常に小さいため本研究では1羽につき、1マイクロアレイの実験を行った。

5) Ingenuity Pathway Analysis (IPA)解析 BioMart (<http://www.biomart.org/>)を用いて、発現変動遺伝子(ウサギ)のオルソログ情報から各々のウサギプローブに対応する human ensembl ID を割り当てた。発現変動遺伝子のバイオインフォマティクス解析は IPA version 9.0 (Ingenuity Systems) を用いて human Ensembl ID のリストを解析した。

4. 研究成果

1) 血管径の推移

CT angiography の結果、SAH 後の脳底動脈の最大狭窄部位の断面積は発症5日目を極期として、発症3日目から発症7日目まで有意な低下を示した(図1)。

2) 遺伝子発現変化

搭載された 43,623 genes の内、1,121 genes が少なくとも 1 time point で有意な発現変動を認めた。発症前 (day 0)と比較し発症3日目においては 868 genes (全体の 1.99%で 555 genes が発現亢進、313 genes が発現低下)が有意な発現変動を呈していた。発症5日目と7日目には各々603 genes (全体の 1.38%)、564 genes (全体の 1.29%) が有意な発現変動を呈していた。

マイクロアレイ解析より、day 3, 5, 7 のおのおの time point で発現変動比が高い遺伝子を抽出した(表1)。

3) くも膜下出血後ウサギ脳底動脈における発現変動遺伝子群の IPA を用いたバイオインフォマティクス解析

発現変動遺伝子群の生物学的な役割を検討する目的でバイオインフォマティクス解析を行った。遺伝子のオルソログ情報を利用して発現変動遺伝子群の rabbit gene ID を human ensemble gene ID に転換した。これらの転換した human ensemble gene ID のデータを IPA にアップロードし解析を行った。Ingenuity ナレッジベースをもとに、発現変動遺伝子群のデータより 25 個の functional group に分類がなされた(図2)。

発症3日目に最も $-\log(p\text{-value})$ が高値である biological function は以下に示す 10 カテゴリーであった (“cellular growth and

proliferation”, “cellular movement”, “cellular development”, “lipid metabolism”, “small molecule biochemistry”, “molecular transport”, “vitamin and mineral metabolism”, “DNA replication, recombination, and repair”, “cell cycle” そして “cell morphology”)。発症5日目に最も $-\log(p\text{-value})$ が高値である biological functions は 11 カテゴリーあり、“cell-to-cell signaling and interaction”, “cell death”, “antigen presentation”, “cellular function and maintenance”, “free radical scavenging”, “cell signaling”, “post-translational modification”, “protein degeneration”, “protein synthesis”, “cellular assembly and organization” そして “cellular compromise” であった。発症7日目に最も $-\log(p\text{-value})$ が高値である biological functions は “carbohydrate metabolism”, “drug metabolism”, “energy production” と “nucleic acid metabolism” の4つであった。

本研究ではくも膜下出血発症後のウサギ脳底動脈における経時的な遺伝子発現と、遺伝子機能定義に基づいたそれらの発現変動遺伝子の有する生物学的な役割を明示した。発現変動遺伝子数と発現比は発症3日目に最も著しく変化し、次第に収束する傾向を辿った。CT angiography を用いた脳血管攣縮評価は簡便であり、SAH 発症3日目より始まり、発症5日目に極期をむかえ、発症7日目も持続する脳血管攣縮を捉えることができた。以上より、遺伝子発現の極期と脳血管攣縮の極期には時間差があることが判明した。

さらに IPA を用いたバイオインフォマティクス解析により、“cellular growth and proliferation”, “cellular movement” と “cellular development” に関与している遺伝子がウサギ脳底動脈における脳血管攣縮の初期に著しく変動しており、“cell-to-cell signaling and interaction”, “cell death” と “antigen presentation” に関与する遺伝子は脳血管攣縮の極期に著しく変動していることが判明した。この遺伝子発現解析に基づいた結果は、くも膜下出血発症後脳血管に生じる、脳血管攣縮を含む事象について考えられている様々メカニズムを結ぶ基盤となりうると考えられる。

今後、マイクロアレイの解析をすすめ脳血管攣縮の発症に関与する遺伝子を抽出してゆきたい。

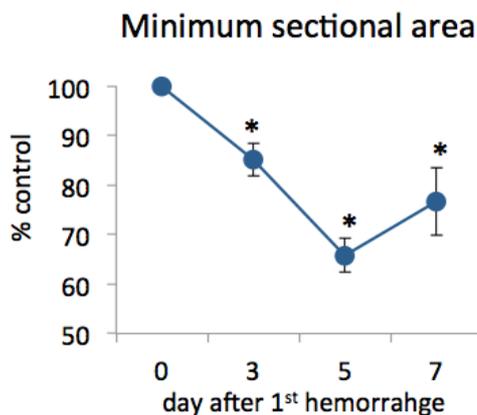


図 1. CT angiography で測定した脳底動脈の最大狭窄部位の経時的変化(N=11, * P<0.01; one-way ANOVA with Dunnett's post hoc)

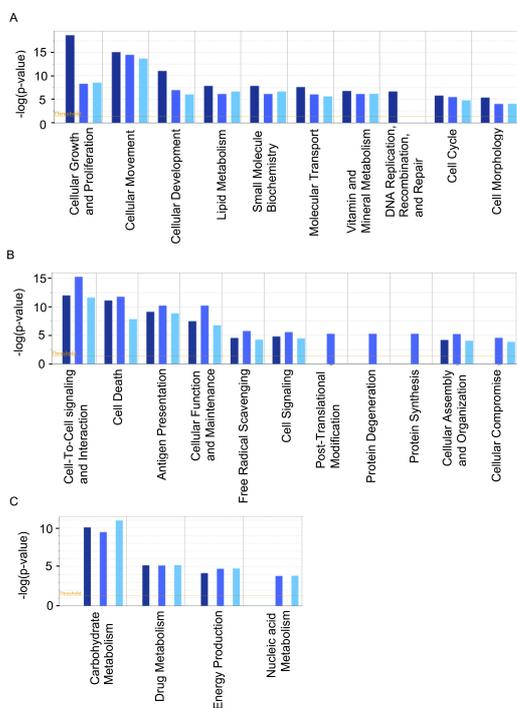


図 2. くも膜下出血発症後のウサギ脳底動脈において発現変動する遺伝子群を IPA 解析し同定されたカテゴリー (functional categories)

IPA によって同定された各々のカテゴリーは各々の -log (p-value) のピークにより 3 つのグループにわけ (day 3, day 5, day 7)、カテゴリー (functional categories) を降順に配置した。各々のカテゴリーの day 3, day 5 そして day 7 における -log (p-value) は各々濃青、青、淡青で表示している。橙の水平線は有意差を示している (P 値は 0.05 に設定)

	Day 3		Day 5		Day 7	
	Gene	Log ₂ FC	Gene	Log ₂ FC	Gene	Log ₂ FC
1	SAA	6.02	RLN1	4.73	RLN1	4.82
2	SAA3P	5.88	SAA3P	3.50	SAA3P	3.93
3	HP	5.78	HP	3.40	HP	3.47

表 1. くも膜下出血後の脳血管において発現変動する上位 3 遺伝子
SAA, Serum amyloid A; SAA3P, Serum amyloid A3 protein; HP, Haptoglobin; RLN1, relaxin-1; Log₂FC, Log₂ fold change

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

1. Kameda K, Kikkawa Y, Hirano M, Matsuo S, Sasaki T, Hirano K
Combined argatroban and anti-oxidative agents prevents increased vascular contractility to thrombin and other ligands after subarachnoid hemorrhage
Br J Pharmacol, 2012; 165(1): 106-119, 2012.01.
DOI: 0.1111/j.1476-5381.2011.01485.x (査読あり)

2. Kikkawa Y, Matsuo S, Kameda K, Hirano M, Nakamizo A, Sasaki T, Hirano K
Mechanisms underlying potentiation of endothelin-1-induced myofilament Ca²⁺ sensitization after subarachnoid hemorrhage
J Cereb Blood Flow Metab, 2012; 32: 341-352, 2012.02.
DOI: 10.1038/jcbfm.2011.132.
(査読あり)

3. Sasaki T, Kikkawa Y
Proposed Mechanism of Cerebral Vasospasm: Our Hypothesis and Current Topics
Acta Neurochir Suppl., 2013; 115: 53-56, 2012.07.
DOI: 10.1007/978-3-7091-1192-5_12.
(査読なし)

4. 吉川 雄一郎、松尾 諭、黒木 亮太、森 恩、中溝 玲、吉本 幸司、溝口 昌弘、

佐々木 富男
超高解像度 256 列多列検出器型 CT を用いた
ウサギくも膜下出血モデルにおける攣縮血
管径の経時的評価
脳血管攣縮, 28: (脳卒中の外科 40(suppl)),
25-27, 2012.12.
(査読無し)

5 . Matsuo S, **Kikkawa Y**, Hokama M,
Kurogi R, Nakamizo A, Mizoguchi M,
Sasaki T
Gene Expression Profiling and
Bioinformatic Analysis of Rabbit Basilar
Artery after Experimental Subarachnoid
Hemorrhage
J Neurol Neurophysiol: (in press)
(査読あり)

6 . **Kikkawa Y**
A Rabbit Cisterna Magna Double Injection
Subarachnoid Hemorrhage Model
Acta Neurochir Suppl (in press)
(査読なし)

7 . **Kikkawa Y**, Kameda K, Matsuo S,
Kurogi R, Nakamizo A, Mizoguchi M,
Sasaki T
Mechanism underlying Increased Vascular
Smooth Muscle Contractility in the Rabbit
Basilar Artery following Subarachnoid
Hemorrhage
Acta Neurochir Suppl (in press)
(査読なし)

[学会発表](計 16 件)

1 . **吉川雄一郎**, 松尾諭, 森恩, 中溝玲, 吉
本幸司, 溝口昌弘, 佐々木富男
超高解像度 256 列 MDCT を用いたウサギく
も膜下出血モデルの攣縮血管径評価
第 28 回スパズムシンポジウム 2012 年 4 月
26 日 福岡国際会議場 (福岡)

2 . 松尾諭, **吉川雄一郎**, 外間政朗, 中溝玲,
吉本幸司, 溝口昌弘, 佐々木富男
くも膜下出血後ウサギ脳血管における遺伝
子発現プロファイリング
第 28 回スパズムシンポジウム 2012 年 4 月
26 日 福岡国際会議場 (福岡)

3 . **吉川雄一郎**, 松尾諭, 黒木亮太, 森恩,
中溝玲, 吉本幸司, 溝口昌弘, 佐々木富男
超高解像度 256 列 MDCT を用いたウサギく
も膜下出血モデルの脳血管攣縮評価
第 71 回日本脳神経外科学会総会 2012 年 10
月 14 日 大阪国際会議場 (大阪)

4 . 松尾諭, **吉川雄一郎**, 外間政朗, 黒木亮
太, 中溝玲, 吉本幸司, 溝口昌弘, 佐々木富
男
ウサギ SAH モデルの脳血管における遺伝子

発現の経時的変化とその意義
第 71 回日本脳神経外科学会総会 2012 年 10
月 14 日 大阪国際会議場 (大阪)

5 . **吉川雄一郎**
関連文献レビュー (基礎編)
第 29 回スパズムシンポジウム 2013 年 3 月
20 日 グランドプリンスホテル新品川(東京)

6 . 松尾諭, **吉川雄一郎**, 黒木亮太, 中溝玲,
吉本幸司, 溝口昌弘, 佐々木富男
ウサギくも膜下出血後脳血管における
relaxin の発現とその意義
第 29 回スパズムシンポジウム 2013 年 3 月
20 日 グランドプリンスホテル新品川(東京)

7 . 黒木亮太, **吉川雄一郎**, 松尾諭, 中溝玲,
吉本幸司, 溝口昌弘, 佐々木富男
くも膜下出血後ウサギ脳血管における細胞
外基質関連タンパク質の発現とその役割
第 29 回スパズムシンポジウム 2013 年 3 月
20 日 グランドプリンスホテル新品川(東京)

8 . **Yuichiro Kikkawa**
Rabbit cisterna magna double injection
model
12th International Conference on
Neurovascular Events after SAH,
Vasospasm2013, 2013 年 7 月 11 日, Lucerne
(Switzerland)

9 . **Yuichiro Kikkawa**, Katsuharu Kameda,
Satoshi Matsuo, Ryota Kurogi, Akira
Nakamizo, Tomio Sasaki
Impaired feedback inhibition of receptor
activity contributes to increased vascular
contractility after subarachnoid
hemorrhage
12th International Conference on
Neurovascular Events after SAH,
Vasospasm2013, 2013 年 7 月 10 日, Lucerne
(Switzerland)

10 . Satoshi Matsuo, **Yuichiro Kikkawa**,
Ryota Kurogi, Akira Nakamizo, Tomio
Sasaki
Expression of relaxin and RFXP-1 in the
rabbit basilar artery after experimental
subarachnoid hemorrhage
12th International Conference on
Neurovascular Events after SAH,
Vasospasm2013, 2013 年 7 月 10 日, Lucerne
(Switzerland)

11 . Ryota Kurogi, **Yuichiro Kikkawa**,
Satoshi Matsuo, Akira Nakamizo, Tomio
Sasaki
Expression of TIMP-1 and MMP-9 in the
rabbit basilar artery after subarachnoid
hemorrhage

12th International Conference on
Neurovascular Events after SAH,
Vasospasm2013, 2013年7月10日, Lucerne
(Switzerland)

12. 松尾 諭、吉川 雄一郎、黒木 亮太、
中溝 玲、吉本 幸司、溝口 昌弘、佐々木 富
男
ウサギくも膜下出血モデル脳底動脈におけ
る relaxin の発現とその役割
第 72 回日本脳神経外科学会総会 2013 年 10
月 16 日 パシフィコ横浜 (神奈川県)

13. 黒木 亮太、吉川 雄一郎、松尾 諭、
中溝 玲、吉本 幸司、溝口 昌弘、佐々木 富
男
ウサギくも膜下出血モデル脳底動脈におけ
る細胞外マトリックスのモデリングに関
わるタンパク質の発現変動とその役割
第 72 回日本脳神経外科学会総会 2013 年 10
月 16 日 パシフィコ横浜 (神奈川県)

14. 吉川雄一郎、松尾 諭、黒木亮太、
中溝 玲、溝口昌弘、飯原弘二、佐々木富男
ウサギくも膜下出血モデルにおける
ultra-high resolution CT を用いた
脳血管攣縮と微小脳循環評価の試み
第 30 回スパズムシンポジウム 2014 年 3 月
13 日 大阪国際会議場 (大阪)

15. 松尾 諭、吉川 雄一郎、黒木 亮太
中溝 玲、溝口 昌弘、飯原 弘二、佐々木 富
男
ウサギくも膜下出血モデルにおける relaxin
の発現とその役割
第 30 回スパズムシンポジウム 2014 年 3 月
13 日 大阪国際会議場 (大阪)

16. 黒木 亮太、吉川 雄一郎、松尾 諭
中溝 玲、溝口 昌弘、飯原 弘二、佐々木 富
男
ウサギくも膜下出血モデルの脳血管におけ
る細胞外マトリックス代謝調節メカニズム
とその役割に関する検討
第 30 回スパズムシンポジウム 2014 年 3 月
13 日 大阪国際会議場 (大阪)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
吉川雄一郎 (九州大学・大学病院・助教)
研究者番号：80423515

(2)研究分担者
該当なし

(3)連携研究者
該当なし