

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591692

研究課題名（和文）アガツトンスコアを基準とした頸動脈プラークの網羅的遺伝子発現解析

研究課題名（英文）Microarray analysis of carotid plaques on the basis of Agatston scores

研究代表者

片野 広之 (KATANO HIROYUKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：30295612

研究成果の概要（和文）：頸動脈狭窄症患者の MDCT 画像を再構成しアガツトンスコア (AS) を算出した。標本の mRNA を抽出し、Gene tip expression array 解析を行い AS100 を基準として 1:1 の比較解析を行ったところ、炎症関連遺伝子等について共通して 2 倍以上の変動がみられた。特に石灰化の強い頸動脈プラークでは NFAT, ADAMTS, Angpt14 の発現が有意に多く Angpt17 の発現が抑制傾向にあった。

研究成果の概要（英文）：We reconstructed MDCT images of the patients of carotid stenoses and calculated Agatston scores (AS). Gene tip expression array analysis was performed after extraction of mRNAs from carotid plaques. Over double difference was noted for the intensity of the expression for inflammation-related genes after comparison of specimens classified based on AS100. Upregulation of NFAT, ADAMTS, Angpt14 and downregulation of Angpt17 were observed in severely calcified plaques.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：脳血管障害学、頸動脈狭窄症

1. 研究開始当初の背景

頸動脈狭窄症は欧米人に多い動脈硬化性疾患であったが、近年の食習慣、生活習慣の欧米化に伴い、日本でもその罹患率が増加傾向にあり、一過性脳虚血発作、脳梗塞の原因疾患として、年々その重要性が増している。この頸動脈狭窄症に対する外科治療の適応は、現在、NASCET, ACAS, ACSTといった3000人規模のRCT (randomized controlled trial

1)に基づいて主として狭窄率を基準に決められている。しかし、頸動脈プラークの性状との関係を考えると、例えば、1980年代の報告ではプラーク中のB潰瘍(10-40mm³)の存在で4.5%、C潰瘍(>40mm³)で7.5%の脳卒中リスクを生じるという報告(Hennerich M et al. Brain 1987)とそうでないとする報告(Haward TR et al. Am J Surg 1983)があり、NASCET studyでの70%以上狭窄例で潰

瘍あり230例、潰瘍なし429例のサブ解析で、非手術群の患側責任卒中率は潰瘍が存在すると卒中率は高く、頸動脈内膜剥離術はその率を低下させたという結果 (Eliasziw M et al. Stroke 1994) の一方で、症候と潰瘍との関連はないとする報告も少なくない。AHA治療ガイドライン(Biller J et al. Circulation 1998) ではB、C潰瘍を伴う50%以上の無症候性頸動脈狭窄は、余命5年、手術リスク3%未満でも手術効果の意義は明らかでないとしている。われわれもプラーク性状と発症形式との関係を報告してきた (片野広之ら、第63回日本脳神経外科学会総会, 2004) が、近年、いわゆるsoft plaque, 不安定プラークについて頸動脈エコーで動いて見えるものや経頭蓋ドップラーでMES (microembolic signals) のみられるもの (Kimura K et al. AJNR 2001)、MRI MPRAGE法で高信号を示すプラークと虚血症候との相関が報告されている (Yamada N et al. AJNR 2007)。しかし、プラーク性状と発症との関係、狭窄率、手術適応との関係は未だ明らかになっていない。最近、われわれはプラークの性状を考えるうえで石灰化に注目し、描出に優れている3D-CTを用いて頸動脈狭窄症の治療前後の状態について詳細な描出を試み、さらにワークステーション上でHounsfield値やカルシウムスコア(アガツトンスコア)を用いて石灰化の定量評価を試みることにより、術前の硬度の評価が頸動脈ステント留置術、頸動脈内膜剥離術の治療選択と治療効果予測に役立つことを報告した (Katano H and Yamada K. Stroke 2007 Epub)。折しも、バージニア大学の研究者らから石灰化率が45%を超えるプラークを有する患者は脳卒中の前駆症状や一過性脳虚血症状を起こすリスクが低かったとの報告 (Nandalur KR et al. Stroke 2007)があった。このことは、プラーク中のカルシウムは安定性・不安定性のマーカーとなりうる可能性があることを示唆している。そこで、われわれが頸部プラークについて確立しているこのアガツトン・カルシウムスコアを適用すれば、soft plaqueあるいは不安定プラークとよばれる様々な形態や程度があり量的評価の難しいプラーク群を、カルシウムという逆の視点から定量的に分類

しうると考えた。本研究ではこのカルシウムスコアに基づいてプラークを再分類し、微少な石灰化についても組織学的検討を行い、さらにスコアの低いものと高いものを比較しその特徴をとらえるため、我々の教室で既に採用しているDNAマイクロアレイによる網羅的発現情報解析を行い、遺伝子発現の特徴から soft plaqueまたはプラーク内カルシウム生成のメカニズムを明らかにしようとするものである。

2. 研究の目的

冒頭に述べたように、本疾患は本邦でも年々増加しており、一過性脳虚血発作、脳梗塞の原因疾患としてその重要性は増すばかりであり、本疾患の病態、治療に関する研究は国内外で盛んになされているが、これまで特に石灰化に着目し放射線学的、病理学的に検討したものはほとんどなかった。われわれはこれまで多くの頸動脈狭窄症の治療を行ってきており、これらの患者の頸動脈について3DCTAを用いて周術期評価を行い特に石灰化の描出と評価に優れていることを病理学的検討とともに報告してきた (Katano H et al. *Br J Neurosurg* 18:138-148;2004, Niwa Y, Katano H, Yamada K. *Neurol Res* 26:778-784;2004)。さらに、石灰化をアガツトンスコアで定量評価することにより硬度からみた頸動脈狭窄治療における治療選択と効果予測に役立つ可能性を報告した (Katano H and Yamada K. Stroke 2007 Epub)。soft plaque, 不安定プラークの研究は上項に述べたように頸動脈エコー、MRIを中心に画像に関する様々な報告がある (Kimura K et al. AJNR 22:1037-1042, 2001, Yamada N et al. AJNR 28:287-292, 2007)。また microarrayを用いた研究も数件みられるが (Ijas P et al., *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 27: 154-160, 2007, Vamuganti R et al., *Neuroscience* 131: 359-374, 2005)、石灰化の視点からアプローチして定量的に分類し、分子生物学的に探究した報告はない。従前の報告では soft plaque, 不安定プラークについて逆の石灰化の視点から詳細に検討したものはなく、我々がこれまでの研究で頸動脈狭窄症の治療選択、治療効果予測に役立つことを初めて

明らかにした (Katano H and Yamada K. Stroke 2007 Epub) アガツトンスコアで定量化して検討する。また、この硬度を基準として標本から RNA を抽出して網羅的遺伝子情報検索によってプラーク生成機構を明らかにしようとしたものもない。本研究により困難であった soft plaque, 不安定プラークの定量評価が可能となる可能性があり、さらに分子生物学的検討を加えることによって、プラーク生成の機構についての知見が得られる可能性がある。soft plaque もしくはカルシウム生成にともなう特徴的な遺伝子の候補を検出することができれば、プラークの生成メカニズムの解明のみならず、プラーク生成、進展を抑える治療への手がかりとなる可能性も期待できる。

3. 研究の方法

(1) 3DCTAによるデータの収集とアガツトンスコア算出、摘出プラーク標本の組織学的検討

64列マルチスライスCT (Siemens Definition) を用いて3D-CTAを撮像し、DICOM dataを医局内の3D workstation (Aquarius®, Terarecon) に転送し再構成し (Katano H et al. Br J Neurosurg 18: 138-148, 2004)、さらにworkstation上で石灰化部分の体積とCT値を算出し、その質・量データをもとに分類、分析する (Katano H and Yamada K. Stroke 2007 Epub)。アガツトン・カルシウムスコアは、CT値130HU以上の病変として確認される連なるピクセルのエリアをとり、このエリアに対象となる病変のピークCTナンバーへ比例するスカラー ($130 \leq \text{HU} < 200$ のとき1、 $200 \leq \text{HU} < 300$ のとき2、 $300 \leq \text{HU} < 400$ のとき3、 $400 \leq \text{HU}$ のとき4) をかけて算出する。 (Agatston A et al. J Am Coll Cardiol 15:827-832, 1990) アガツトンスコア低値のものは組織学的検討も加え、PC上で顕微鏡下の石灰化の占有面積を画像処理ソフトを用いて計算する。

頸動脈内膜剥離術によって摘出された標本を処理、組織標本 (HE 染色) と 3DCTA 画像所見を参照して、データ処理で得られた数値と比較検討し、石灰化を正確に評価する。とくに微小な石灰化についても組織画像を画像処

理し占有度を計算する。これらの結果からカルシウムを基準にしたプラークの定量的分類を行う。

(2) DNAマイクロアレイ法による網羅的発現情報解析によるプラークの検討

カルシウムスコアに従って分類されたプラーク (頸動脈内膜剥離術によって摘出した新鮮標本あるいは -80°C で凍結保存中の標本) を粉砕処理し mRNA を抽出、RNeasy lipid tissue mini kit (QIAGEN) を用いて精製、2100 Bioanalyzerにて RNA quality を確認し cDNA を合成、Cyanin 3-CTP、Cyanin 5-CTP で Agilent linear Amplification kits (Agilent) を用いてラベルし、Cy3-sample cRNA および Cy5-reference cRNA を Agilent rat oligo microarrays ($\sim 20,000$ unique 60 mer oligonucleotides) Agilent hybridization solution とともに 60°C でハイブリダイゼーションさせる。Agilent DNA Microarray Scanner (G2565BA) でアレイをスキャンし Feature Extraction software で検出する。

4. 研究成果

64列 multidetector CT (Siemens Definition) を用いて頸動脈狭窄症患者の術前の病変の DICOM データを得、3D-Workstation soft Aquarius® (Terarecon) を用いて CT 画像を再構成しデータ処理しアガツトンスコアを算出した。頸動脈内膜剥離術によって摘出された標本を処理、組織標本 (HE 染色) と 3DCTA 画像所見を参照して、データ処理で得られた数値と比較検討し、石灰化を正確に評価した。とくに微小な石灰化についても組織画像を画像処理し占有度を計算し、これらの結果からカルシウムを基準にしたプラークの定量的分類を行った。新たに行われた頸動脈内膜剥離術によって摘出された標本の mRNA を抽出し、比較する各々のサンプルを逆転写時に Cy3, 5 で標識し cDNA を合成して数万種類の遺伝子をアレイ化したスライドガラス上でハイブリダイゼーションさせ、各スポットの蛍光強度を蛍光スキャナーで検出した。これらについて Gene tip expression array 解析を行い、ARR, CEL, CHP の raw data と single array analysis としてのシグナルデータを得た。アガツトンスコア 100 を基準として 6 検

体について 1:1 の比較解析を行ったところ、慢性炎症に関する遺伝子等について共通して 2 倍以上の変動がみられた。とくに、石灰化の強い頸動脈プラークでは炎症関連遺伝子である NFAT, ADAMTS, Angpt14 の発現が有意に多く、Angpt17 の発現が抑制傾向にあった。

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 6 件)

- ① Katano H, Yamada K. The twisted carotid bifurcation and micro-thrombendarterectomy. *Atherosclerosis* 査読有 11:184, 2010
- ② Osawa T, Mase M, Tanikawa M, Fujita M, Katano H, Aoyama K, Ohno T, Sakurai K, Sasaki S, Yamada K. Hypoxia-inducible factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor in the carotid atheroma are expressed more in symptomatic cases than in asymptomatic cases. *Nagoya Med J* 査読有 51: 41-54, 2010
- ③ Katano H, Yamada K. Carotid endarterectomy for stenoses of twisted carotid bifurcations. *World Neurosurgery* 査読有 73: 147-154, 2010
- ④ 片野広之、山田和雄. 脳卒中の再発予防：外科的治療。頸動脈内膜剥離術。動脈硬化予防 査読無 9: 63-72, 2010
- ⑤ 片野広之、山田和雄. 無症候性頸動脈狭窄症。CEA の適応、治療成績。脳と循環 査読無 14: 147-151, 2009
- ⑥ 片野広之、南光徳偉、日向崇教、大蔵篤彦、岡 雄一、間瀬光人、山田和雄. GOS, ADL からみた頸動脈狭窄症ハイリスク症例。The 26th Mt. Fuji Workshop on CVD 査読有 26:65-71, 2008

[学会発表] (計 11 件)

- ① 片野広之、大野貴之、西川祐介、間瀬光人、山田和雄. 頸部頸動脈狭窄症治療～石灰化の視点からの再考。第 69 回日本脳神経外科学会総会 2010 年 10 月 27

日 福岡

- ② 片野広之、大沢知士、三浦敏靖、間瀬光人、山田和雄. Clinicopathologic analysis of carotid plaques obtained during carotid endarterectomy. 第 42 回日本動脈硬化学会総会 (シンポジウム) 2010 年 7 月 15 日 岐阜
- ③ Katano H, Yamada K. The twisted carotid bifurcation and micro-thrombendarterectomy. The 78th European Atherosclerosis Society Congress (EAS 2010) 2010. 6.20-23 Hamburg
- ④ 片野広之、櫻井圭太、宮地重徳、中野真有子、廣瀬保次郎、間瀬光人、山田和雄. 側副血行から見た頸動脈狭窄症術前 SPECT 検査の必要性の検討。第 39 回日本脳卒中の外科学会総会 2010 年 4 月 15 日 盛岡
- ⑤ 間瀬光人、山田健太郎、片野広之、山田和雄. 無症候性頸動脈狭窄症の全経過と治療成績に関する観察研究 (CASTER) の中間報告。第 35 回日本脳卒中学会総会 2010 年 4 月 15 日 盛岡
- ⑥ 片野広之、櫻井圭太、宮地重徳、中野真有子、廣瀬保次郎、間瀬光人、山田和雄. Fine-SRT による頸動脈狭窄症治療前後の局所脳血流の検討。第 21 回日本脳循環代謝学会総会 2009 年 11 月 20 日 大阪
- ⑦ 片野広之、大野貴之、間瀬光人、山田和雄. 石灰化プラークを伴う頸動脈狭窄病変の MRA VR 像による評価。第 68 回日本脳神経外科学会総会 2009 年 10 月 14 日 東京
- ⑧ 片野広之、遠山淳子、櫻井圭太、宮地重徳、阿部直子、間瀬光人、山田和雄. CEA, CAS 後の局所脳血流動態の比較：Fine-SRT による評価。第 38 回日本脳卒中の外科学会総会 2009 年 3 月 20 日 松江
- ⑨ 片野広之、遠山淳子、櫻井圭太、宮地重徳、阿部直子、間瀬光人、山田和雄. Fine-SRT を用いた頸動脈狭窄症治療前後の脳血流評価。CEA vs CAS. 第 67 回

日本脳神経外科学会総会 2008年10月
1日 盛岡

- ⑩ 片野広之、南光徳偉、日向教崇、大沢知士、青山公紀、山田和雄. “ねじれ頸動脈”狭窄症に対する内膜剥離術. 第37回日本脳卒中の外科学会総会 2008年3月22日 京都
- ⑪ 片野広之、中塚雅雄、竹内洋太郎、相原徳孝、間瀬光人、山田和雄. 頸動脈プラークの硬さ. カルシウムスコアによる石灰化の評価と臨床的意義. 第31回日本脳神経CI学会総会 2008年2月21日 東京

[図書] (計2件)

- ① Katano H, Mase M, Yamada K. Evaluation for hardness of carotid plaque with Volume Score - Hounsfield Unit matrix and Calcium Score. (ed. Berhardt LV) In: Advances in Medicine and Biology Vol. 29. Nova Science Publishers, Inc. NY, 2011 (in press)
- ② 片野広之、山田和雄. 頸動脈エコー検査のあてにならない所見とは?. 小川彰編. 脳神経検査のグノーティ・セアウトン pp130-135 シナジー出版, 東京 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片野 広之 (KATANO HIROYUKI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：30295612

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

間瀬 光人 (MASE MITSUHIITO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：60238920

谷川 元紀 (TANIKAWA MOTOKI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：20343402

山田 和雄 (YAMADA KAZUO)