

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861265

研究課題名(和文) 頸動脈プラークにおける新規血小板活性化受容体CLEC-2の役割

研究課題名(英文) The role of a novel platelet activated receptor CLEC-2 in the carotid plaque

研究代表者

橋本 幸治 (HASHIMOTO, Koji)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：10644792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：頸部頸動脈狭窄症において、頸動脈プラークの不安定性が脳梗塞と強く関連することが報告されているが、その機序ははまだ解明されていない。一方、新規血小板活性化受容体(CLEC2)は、そのリガンドであるポドプラニンと共働し、プラークの不安定化に関与することが示唆されている。そこで本研究では、頸動脈狭窄症の不安定性プラーク形成におけるポドプラニン-CLEC2の関与を検討した。その結果、免疫組織学的検討において、ポドプラニンは頸動脈内膜内のマクロファージや平滑筋細胞に発現しており、術前MRプラークイメージングでの不安定プラークを示唆される病変や症候性病変でその発現が増強されている傾向を認めた。

研究成果の概要(英文)：The vulnerability of the carotid plaque is strongly associated with cerebral infarction. However, the mechanism has not been elucidated. On the other hand, C-type lectin-like receptor 2 (CLEC2), a novel platelet activated receptor, is suggested to participate in the vulnerability of the atheromatous plaque, cooperating with its ligand podoplanin. Immunohistochemical analysis indicated that podoplanin was localized to macrophages and smooth muscle cell in the intima of carotid artery. Vulnerable plaque by preoperative diagnostic MR plaque imaging and symptomatic lesions were more likely to express podoplanin.

研究分野：脳神経外科

キーワード：頸動脈プラーク CLEC-2 ポドプラニン 頸部頸動脈狭窄症 不安定プラーク

1. 研究開始当初の背景

プラークの不安定化は病変部におけるマクロファージや T-リンパ球の浸潤と血管平滑筋細胞などの血管壁構成細胞の活性化により規定される。不安定化したアテローム性プラークが破裂すると、露出した内皮下組織のコラーゲンに、血小板が粘着し、活性化されて血管壁上に血栓が形成される。血栓が成長して血管内腔を塞ぐと心筋梗塞、脳梗塞などの動脈血栓症となる。動脈血栓症は癌に次ぐ日本人の死因であり、その発症の主役である血小板の研究は、動脈血栓症の治療・予防のために必須の研究である。

最近同定された血小板活性化受容体 CLEC-2(C-type lectin-like receptor 2)は、蛇毒蛋白の一種で強力な血小板活性化能をもつロドサイチンの受容体として血小板上で発見された。これまで知られていた ADP 受容体、Thrombin 受容体および ThromboxanA2 受容体などの 7 回膜貫通型受容体や、コラーゲン受容体 Glycoprotein VI(GPVI) および FcγR1A などの免疫グロブリンスーパーファミリーとは異なる C-type lectin スーパーファミリーに属する受容体であるが、これまで生理的役割が全く解明されていなかった。しかし、2006 年に共同研究者の本学臨床検査医学教室により CLEC-2 が全く新たな血小板活性化受容体である事が初めて報告され、さらに 2007 年に、この CLEC-2 の生体内リガンドが細胞外基質蛋白のポドブラニンである事が明らかとなった。このポドブラニンは、血小板凝集を惹起する蛋白として同定され、その後、この蛋白が腎臓の上皮細胞の podocyte から発見された膜糖蛋白のポドブラニンと同一分子であることが判明し、2007 年に、ポドブラニンの血小板上の受容体が CLEC-2 であることが同定された。ポドブラニンは正常な血管内皮には発現しないことが知られているが、動脈硬化部位の病理標本では、平滑筋と思われる細胞がポドブラニン抗

体で染色され、CLEC-2 との結合が認められたとの報告がある。これより、血管平滑筋細胞にポドブラニンが発現し、これに対して CLEC-2 が結合することにより血栓形成に関わる可能性を考えた。また、ポドブラニンは CLEC-2 を介して、活性化血小板内 α 顆粒から血小板由来成長因子 (PDGF)、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 等の増殖因子を放出し、動脈硬化病巣の炎症を促進するのみならず、透過性亢進によるプラーク内圧の亢進や新生血管の血栓形成によるプラークの拡大に関与している可能性がある。従って、血栓形成のみならず、粥腫の不安定化に関係している可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、頸部頸動脈狭窄症におけるプラークの不安定性を規定する局所因子を解明する目的で、当院で外科治療(内膜剥離術)を行った頸部頸動脈狭窄症患者の頸動脈プラーク標本でのポドブラニンの発現と、関連する因子について検討した。

これまで、ポドブラニンが正常血管内皮に発現せず、動脈硬化部位の血管平滑筋細胞にのみ発現していることが報告されているが、このポドブラニンの生体内受容体が CLEC-2 であるという事実は判明したばかりであり、CLEC-2 に焦点をあてたプラークの不安定化についての検討は、いまだなされていない。ポドブラニンがプラークの不安定性を規定する局所因子と仮定できるならば、動脈硬化病巣の血管平滑筋細胞に発現するポドブラニンと CLEC-2 との相互作用がプラークの不安定化に関与している可能性が高いと考えられる。以上より CLEC-2 がプラークの不安定化に果たす役割を検討する事は、新たな脳梗塞治療薬の開発につながる有意義な研究であると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 対象

当院にて、2012年4月から2013年3月までに頸部頸動脈狭窄症に対して、内膜剥離術を施行した16例を対象とした。年齢は72.4 ± 6.25歳、全例男性であった。術前の画像検査により、不安定プラークの特徴であるプラーク内出血やlipid coreを示唆するtime of flight法MRAにおける高信号域を呈した症例は12例であった。症候性が10例で無症候性例が6例であった。

(2) 免疫染色

内膜剥離術により摘出したプラーク病変をホルマリン固定し、パラフィン包埋組織切片を作成し、抗ポドプランイン抗体を用いて染色した。

また、発現部位を明らかにする目的で、血管内皮細胞を標識するCD31、マクロファージを標識するCD68、平滑筋細胞を標識するSMAについても、それぞれ免疫染色を行った。その後、蛍光二重染色を行い、ポドプランインが発現している部位を同定した。

(3) 統計学的解析

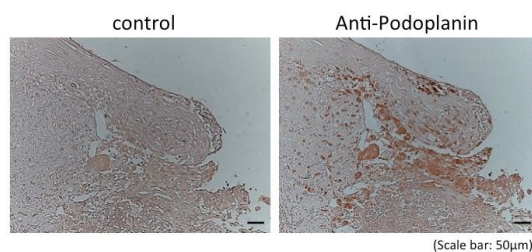
ポドプランインの発現と関連する因子について評価した。データは平均値 ± 標準偏差で示した。二群間の検定には、Student's t-test を使用した。P<0.05 をもって統計学的有意差ありと判断した。

4. 研究成果

(1) 頸動脈内膜内のポドプランインの発現

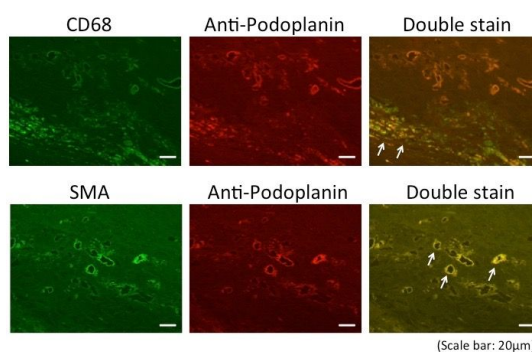
頸動脈内膜剥離術を施行した16例中、頸動脈内膜内にポドプランインの発現が確認できたのは12例であった (Fig.1)

Fig.1



CD31、CD68、SMA との蛍光 2 重染色では、ポドプランインと CD68、及びポドプランインと SMA がそれぞれ共染色された (Fig.2)

Fig.2



(2) 頸動脈内膜内のポドプランインの発現に関連する因子

頸動脈内膜剥離術を施行した16例において、頸動脈内膜内のポドプランインの発現と術前画像検査にて狭窄部の内膜でのTOF法MRA高信号域の有無、臨床での症候の有無との関連を検討した。

術前の画像検査にて、不安定プラークを示す所見がある群において、ポドプランインの発現を認める傾向があったが、明らかな有意差はなかった。また、症候性を呈した頸動脈狭窄症群でも同様に、ポドプランインの発現を認める傾向があったが、明らかな有意差はなかった。

(3) 結果のまとめ

今回の我々の研究により、頸部頸動脈狭窄症例において、頸動脈内膜内にCLEC2のリガンドであるポドプランインが発現していることが示された。発現部位に関しては、従来の報告と同様に、頸動脈内膜内のマクロファ-

ジと平滑筋細胞である可能性が示唆された。
また、ポドプラニンが発現している群では、
プラークの性状が不安定プラークで、症候性
となる傾向があったが、有意差を認めず、今
後更なる症例の蓄積が重要な課題となる。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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

橋本 幸治 (HASHIMOTO, Koji)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：10644792