

令和元年6月10日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10726

研究課題名（和文）頸動脈プラーク破綻におけるエピジェネティクス変化の解明

研究課題名（英文）Elucidation of epigenetic change in carotid artery plaque rupture

研究代表者

佐山 徹郎（Sayama, Tetsuro）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：30346788

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：頸動脈プラーク破綻の予知、治療、予防を目指し、そのエピジェネティクス変化の解明というテーマの中で、マイクロRNA(miRNA)変化に焦点を絞り頸動脈プラーク手術標本の解析、動物モデル、培養モデルの確立、解析の目的で研究を行った。プラーク標本の解析にて、miRNA145を中心に、プラーク破綻を示す各臨床プロファイル、画像との関連性を解析した。臨床プロファイルの中で症候性プラークにおいてmiRNA145が有意差はなかったものの高く、マーカーの一つとして役立つ可能性が示唆された。今後、網羅的発現解析による他miRNAの検出、症例の累積が必要である。動物、培養モデルのmiRNA解析は今後の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞は、現代社会の大きな問題である寝たきりの一番の大きな要因である。その中で、食生活の変化等、生活習慣の変化により増加しているのが、アテローム血栓性脳梗塞であり、その大きな原因であるのが、頸動脈のプラーク破綻である。なぜプラークが不安定になり、破綻するのはわかっていなかったが、そこにエピジェネティクス変化という新しい概念を導入し、本研究だけでは行えなかったが、将来的にその予防、治療までをマイクロRNAの観点から行える可能性を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：In order to predict, treat and prevent carotid plaque rupture, among the various epigenetic changes within the theme of elucidation of its epigenetic changes, we focused on micro RNA (miRNA) changes. In order to achieve that purpose, we analyzed the carotid plaque surgical specimens, and intended to establish animal models and culture models. In analysis of plaque specimens, the correlation with each clinical profile and image showing plaque rupture was analyzed focusing on miRNA145. Although there was no significant difference between miRNA145 in symptomatic plaque among clinical profiles, it was high, suggesting that it might serve as a marker. In the future, detection of other miRNAs by comprehensive expression analysis and accumulation of cases are required. Micro RNA analysis of animals and culture models is for further study.

研究分野：医学

キーワード：プラーク破綻 エピジェネティクス マイクロRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

頸動脈プラーク破綻は、脳梗塞における最も重要なメカニズムである。それにもかかわらず、プラーク破綻の病態生理は、解明されていない。現在、プラーク破綻に最も関与する因子が、プラークの脆弱性といわれている。その脆弱性を引き起こすのに不可欠な役割を果たしているのが、炎症、血管新生等の他因子による影響であり、これまでの報告から単一の遺伝子異常が病態形成に関連しているという報告は得られていない。

近年、エピジェネティクスの異常が癌、炎症性疾患などさまざまな疾患の発症に関与していることが明らかになっている。エピジェネティクスとは、DNAの塩基配列によらない遺伝情報の発現制御であり、細胞分裂を経て安定して伝達される遺伝子機能の変化や、その仕組みと定義され、ゲノムDNAの後天的な修飾、制御により、ゲノム情報を活用する高次生態系である。

エピジェネティクスの概念には、

1. DNAのメチル化修飾
2. ヒストン蛋白のアセチル化等のクロマチン修飾
3. ポリコーム群蛋白
4. クロマチンの高次構造とオーガニゼーション
5. microRNA(miRNA)、double-stranded non-coding RNAによる制御

を含み、これらの調節機構は、互いに密接に関係し、相互、協力作用より細胞内の遺伝子発現を促進、抑制により調節する。エピジェネティクスによる遺伝子発現調節は、aging, stress, 炎症、癌化等、外因子によって変化する可逆性変化であり、多くの疾患の発症に関与することがわかっている。

この中でmicroRNAは、約22塩基のnon-coding RNAで、mRNAに結合しmRNAの分解、蛋白質の翻訳抑制を促進し、エピジェネティクス機構において重要な役割を果たす。蛋白質に関連する遺伝子全体の約30%がmiRNAによる転写後制御されており、発生、分化、癌化等、多種多様な役目を担っている。

当科でもmiRNAに着目し、悪性神経膠腫をはじめとする原発性脳腫瘍とmiRNAの関与を明らかにしてきた<sup>1,2,3</sup>。

粥状動脈硬化発症の過程で、miRNA発現に影響を与えることが、培養細胞や、動物モデル実験で示されている。近年、CVDのバイオマーカーとしてのmiRNA群について、血液分画を用いて、研究されだしているが、実際のヒト粥状動脈硬化でのmiRNA発現に関する有用な報告は少なく、ヒトの粥状動脈におけるmiRNAの機能はまだまだよく知られていない。

エクソソームは新たな細胞間情報伝達機構として注目されており、血管細胞、プラークが分泌するエクソソームが、プラーク形質転換、血管新生、破綻に関与していることが推測される。プラーク破綻のメカニズムを、解明するためには血管細胞とプラーク細胞の新たな細胞間伝達機構となり得るエクソソームの機能解明が今後重大な課題となる。エクソソームは豊富なmiRNAを含有するが、近年、分泌型miRNAはエクソソーム内のみではなく、AGO2などの蛋白と結合し生体内で安定して存在していることも解明されている。本研究ではエクソソームとあわせ分泌型miRNAにも注目し、研究を進める。

### 2. 研究の目的

近年、頸動脈プラーク破綻に関与するエピジェネティクス異常が、報告され、その変化に重要な役割を担っているmicroRNA(miRNA)に着目し、これに網羅的解析を加えることで、頸動脈プラーク破綻の機序を解明する。miRNAはバイオマーカーとしても注目されており、これにはエクソソーム内に含まれる分泌miRNAが大きな役割を担い、エクソソーム内分子は細胞相互作用において重要な役割を担い、頸動脈狭窄症患者におけるプラーク破綻においても関与している可能性がある。miRNA,エクソソーム、分泌型miRNAを解析することによりプラーク破綻の新たな治療戦略を確立することを目標とした。

### 3. 研究の方法

#### 頸動脈サンプルの収集

プラーク破綻の判定は、術前のMRIイメージ、頸動脈エコーを基に診断し、組織学的に確認する。頸動脈内膜剥離術患者、頸動脈ステント術患者より前者は、頸動脈プラーク摘出サンプルより、後者からは、ステントの際の、distal protectionにて収集されたプラークをサンプルとして、網羅的発現解析を基にプラーク破綻における特異的なmiRNA, mRNA, proteinの同定を行う。

#### 頸動脈プラーク破綻モデルの作成：

マウスの頸動脈 tandem stenosis モデルを作成する<sup>4</sup>。実験には12週齢マウスを用いる。マウスにケタラール(100 mg/kg)とキシラジン(10 mg/kg)の腹腔内投与による麻酔を行い、完全な鎮痛、鎮静下にて作成を行う。仰臥位として手術台上に固定し、卓上顕微鏡を用い、頸部正中切開後に右総頸動脈を周囲組織から剥離し露出する。内頸動脈分岐部から1mmのところにて遠位部狭窄を、そこから、3mm近位部に近位部狭窄を作成する。狭窄は、150µmの針を総頸動脈と一緒に6-0ナイロン糸にて結紮し、後から針を結紮から引き抜くことにより完成する。

左総頸動脈は、剥離露出までとしてsham手術とする。

動物は、術後2週、4週、7週、11週において安楽死させ、それぞれの解析に使用する。

## 組織学的解析

安楽死後、血液サンプルを収集し、灌流固定を行う。灌流固定後、左右総頸動脈を含む頸部全体の凍結切片を作成し、Mayer's hematoxylin/eosin 染色を行い、sham 手術である左総頸動脈と tandem stenosis を作成した右頸動脈を同時に比較する。

術後2週、4週、7週、11週の各週において、ヒト頸動脈プラーク破綻の特徴である1) fibrin cap 2) 中心壊死、3) 脂質の蓄積、4) マクロファージ、泡沫細胞の集積、5) 血小板、フィブリンの出現、6) 中心壊死まで到達するプラーク内出血、7) 血管内血栓、8) プラーク内血管新生、9) 動脈硬化巣の偏心成長による血管のリモデリング、10) 炎症関連蛋白の発現等を確認する。

## RNA の抽出；

術後2週、4週、7週、11週後に、安楽死させ、頸部血管を摘出し、mirVana™ miRNA Isolation Kit を用いて miRNA を含めた total RNA を抽出する。Total RNA 純度は吸光度計(Nano-Drop2000c; ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE, USA) と電気泳動(Experion; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) で測定する。260/280 比が 1.8 以上かつ RNA Quality Index が 9.0 以上の sample を使用する。

## 内皮細胞-平滑筋細胞-単核細胞の共培養モデルの確立

プラーク破綻に適した培養系を確立するために血管内皮細胞、血管平滑筋のみでは不十分で、少なくとも共培養が必要とされる。近年、動脈硬化の in vitro の研究モデルとして、内皮細胞(endothelial cell; EC)-平滑筋細胞(smooth muscle cell; SMC)-単核細胞(mononuclear cell; MC)の共培養モデルが報告され<sup>5,6</sup>、動脈硬化における炎症機転や、プラーク安定性に関する機能解明に適したモデルとされる。EC, SMC の単培養、EC, SMC の共培養もコントロールとして、それぞれの培養系にて細胞より mirVana Isolation KIT を用いて miRNA を含有する total RNA を抽出する。

## マイクロ RNA マイクロアレイを用いた網羅的解析

total RNA を、3D-gene(TORAY)を用いて、網羅的な miRNA 及び mRNA の発現解析を行い、プラーク破綻血管において変動が強い、miRNA 及び mRNA を同定する。mRNA に関してはクラスタ解析、GO 解析、パスウェイ解析を行い、治療のターゲットを検討する。また、変動が強い miRNA が同定できれば、Target scan (<http://www.targetscan.org/>)を用いて、miRNA の標的となる mRNA を予測する。

Tandem stenosis model より得られたプラーク破綻血管、その対側血管をコントロールとして上記と同じ解析を行い、そのプロファイルと比較検討する。

## TaqMan® Small RNA Assays

標的となる miRNA に対する probe を使用し定量 RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) を行い mRNA, miRNA の定量を行う。

## EC-SMC-MC 共培養モデルにおけるエクソソーム、分泌 miRNA の回収

EC-SMC-MC 共培養、通常培養で培養した系で培養液上清よりエクソソーム、分泌型 miRNA を回収する。エクソソーム分離法には超遠心法、抗体法、限界濾過法、Kit を用いてエクソソームを回収し、最適な回収方法を再度検証し確立する。2 系統の細胞由来のエクソソームより miRNA、mRNA を抽出し網羅的に発現解析を行い、そのプロファイルと比較検討し、共培養細胞由来エクソソームに特異的な分子を同定する。さらに元の細胞の発現プロファイルとの比較により、細胞内のプロファイルと分泌型のプロファイルに差が生じるかを検討し、その分泌機構を検討する。

## 4. 研究成果

頸動脈サンプルの収集：九州大学 IRB 申請済み（許可番号 29-323、期間 H29/10/16-H34/3/31）

プラーク破綻の判定は、術前の MRI イメージ、頸動脈エコーを基に診断し、組織学的に確認する。頸動脈内膜剥離術患者、頸動脈ステント術患者より前者は、頸動脈プラーク摘出サンプルより、後者からは、ステントの際の、distal protection にて収集されたプラークをサンプルとして、網羅的発現解析を基にプラーク破綻における特異的な miRNA、

	症候性	進行性	放射線	MPRAGE 胸鎖乳突筋比
1	+	ND	-	2.5 倍
2	+	ND	-	2.7 倍
3	-	+	-	2.6 倍
4	-	-	-	1 倍
5	-	-	+	2 倍
6	+	+	-	4.8 倍
7	-	+	+	1.3 倍
8	+	ND	-	3.3 倍
9	+	ND	-	3.2 倍
10	-	ND	-	2 倍

表1 頸動脈サンプルと臨床プロファイル

mRNA、protein の同定を行った。プラーク破綻の術前イメージとして、当院では MPRAGE(magnetization prepared rapid acquisition with gradient echo)法を用いた MRI によるプラーク性状評価を行った。MPRAGE と症候学との関係については、有意な相関が報告されている<sup>7</sup>。高信号(胸鎖乳突筋より 200%以上)は低信号より有意に壊死性コアが大きく、プラーク内出血の程度が強く、これによりプラーク破綻の画像評価を行った。その他にプラーク破綻の指標となる、臨床プロファイルとして、現病歴より脳梗塞発症、経過観察中の狭窄進行、放射線療法施行の情報を得た(表 1)。

#### RNA の抽出：

手術標本の頸動脈プラーク(10~160 mg)を、プラークのみ、内膜のみ、プラーク+内膜を使用し、Homogenate:BioMasher / Handy Sonic のいずれかでおこなった。mirVana™ miRNA Isolation Kit を用いて miRNA を含めた total RNA を抽出した。Total RNA 純度は吸光度計(Nano-Drop2000c; ThermoScientific, Wilmington, DE, USA)で 260/280 比が 1.8 以上で、濃度 10~40.7ng/ml であった。同検体でプラークのみと内膜のみより microRNA 抽出したが、miRNA145 では内膜のみが有意に発現量が多かった(図 1)。プラークは石灰化症例が多く、RNA 抽出が困難なためである可能性が示唆された。

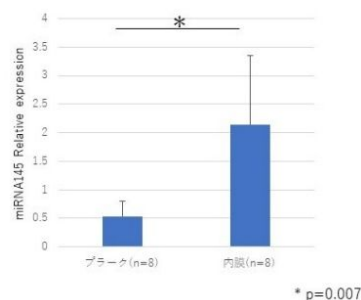


図 1 プラークの部位別の miRNA145 の発現量

#### TaqMan® Small RNA Assays

標的となる miRNA に対する probe を使用し定量 RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction)を行い mRNA, miRNA の定量を行った Preliminary に標的として miRNA 145 を測定した。miRNA145 は血管平滑筋分化、スタチンにより増加し、平滑筋に取り込まれ動脈硬化病変の形成を抑制するとされている<sup>8</sup>。内在性コントロール: U6 snRNA, Ct 法を用いて解析した結果を示す。miRNA の採取はプラーク単体よりは内膜のみの方がより発現量が多かった(表 2)。

	症候性	進行性	放射線	MPRAGE 胸鎖乳突筋比	プラーク+内膜	プラーク	内膜
1	+	ND	-	2.5 倍	0.4143		
2	+	ND	-	2.7 倍	4.5875		
3	-	+	-	2.6 倍	2.7191		
4	-	-	-	1 倍	31.013		
5	-	-	+	2 倍	4.5181		
6	+	+	-	4.8 倍	0.5061		
7	-	+	+	1.3 倍		0.1282	0.9202
8	+	ND	-	3.3 倍		0.8156	1.6055
9	+	ND	-	3.2 倍		0.5331	3.1934
10	-	ND	-	2 倍		0.8230	2.2799

表 2 臨床プロファイル、MPRAGE 胸鎖乳突筋比と miRNA145 発現量

#### 臨床プロファイル、術前画像イメージによる miRNA145 の発現量の比較

プラークの破綻により症候性となり、狭窄の進行は、プラークの増大を意味し、破綻前の状態に近づいているといえる。放射線誘発頸動脈狭窄のプラーク性状は、脆弱で、潰瘍性、可動性が多いため、プラーク破綻の特長を備えている<sup>9</sup>。症候性において miRNA145 の発現はやや高かったものの、有意差は認められなかった(p=0.276)(図 2)。進行性頸動脈狭窄に関しても有意差がなかったものの非進行性が高い結果(P=0.112)であるが、経過観察後に手術施行した症例に限定されるため、症例数が少ないことと、非進行性の 1 例で異常に高い症例があるため、結果は懐疑的であった(図 3)。放射線誘発例は 2 症例のみであるが、差は認められなかった(p=0.799)(図 4)。MPRAGE 胸鎖乳突筋比と miRNA145 の発現量に相関は認められなかった(図 5)。純度の高い RNA の抽出は困難であり、症例数の蓄積と血液サンプルでの施行、他 microRNA での発現量の測定などが必要である。

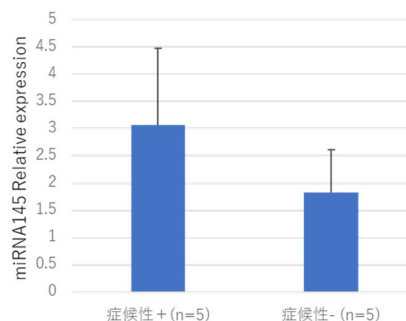


図 2 症候性の有無による miRNA145 の発現量の比較

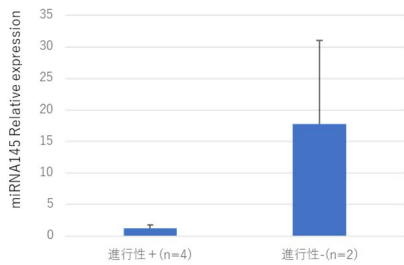


図3狭窄進行の有無によるmiRNA145発現量の比較

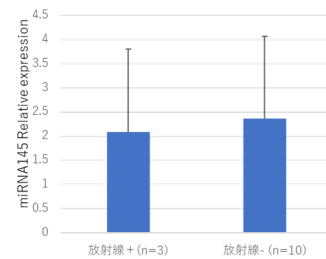


図4 放射線誘発の有無によるmiRNA145発現量の比較

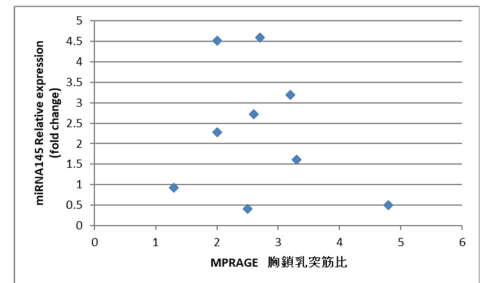


図5 MPAGEとmiRNA145発現の関係

内皮細胞-平滑筋細胞-単核細胞の共培養モデルの解析を行うための実験として、コントロールとしての意味もあるEC, SMCの単培養、それからmiRNAを含有するtotal RNAを抽出は行えた。さらにプラーク破綻に適した培養系を確立するためにシェアストレスをかけられるシステムも取り入れ、頸動脈狭窄におけるshare stress負荷を想定した、機械的血流負荷装置を用いて培養内皮細胞、平滑筋細胞に対するshare stress負荷時のmRNA発現変化を解析した。培養細胞に乱流負荷を行なったところ、内皮細胞においては、血管壁の炎症に関連することが報告されているMCP-1やNox4の発現上昇を認めた。また平滑筋細胞においてもNox4の発現上昇を認め、炎症系の分子が上昇していることが確認された。miRNAにおいてもこれらの炎症系に作用するものが上昇していることが予想された。その結果に基づいて、まず、内皮細胞、平滑筋細胞にて共培養を施行し、share stress負荷を与えたモデルでmRNA、miRNA解析を施行予定である。

頸動脈プラーク破綻モデルの作成においては、動物実験施設の使用準備、機器の整備等により開始が遅れた。当初の予定通り、アポE欠損マウスと高脂肪食により完成するマウスの頸動脈tandem stenosisモデルを使用としたが、まず、第一段階として正常マウスのtandem stenosisモデルの作成を行った。プラーク破綻の特徴は備えていないが組織学的解析、miRNAを含んだRNAの抽出は行えることを確認した。次の段階で、12匹のアポE欠損マウスを6匹tandem stenosis modelを作成し、6匹をsham operationとし、高脂肪食による12週間の実験にて、組織学的検討、mRNAの検討を行う。

#### <引用文献>

1. Guan Y, Mizoguchi M, Yoshimoto K, Hata N, Shono T, Suzuki SO, Araki Y, Kuga D, Nakamizo A, Amano T, Ma X, Hayashi K, Sasaki T. MiRNA-196 is upregulated in glioblastoma but not in anaplastic astrocytoma and has prognostic significance. *Clin Cancer Res*. 2010 Aug 15;16(16):4289-97.
2. Ma X, Yoshimoto K, Guan Y, Hata N, Mizoguchi M, Sagata N, Murata H, Kuga D, Amano T, Nakamizo A, Sasaki T. Associations between microRNA expression and mesenchymal marker gene expression in glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2012 Sep;14(9):1153-62.
3. Mizoguchi M, Guan Y, Yoshimoto K, Hata N, Amano T, Nakamizo A, Sasaki T. MicroRNAs in Human Malignant Gliomas. *J Oncol*. 2012;2012:732874.
4. Chen YC, Rivera J, Peter K. Tandem Stenosis to Induce Atherosclerotic Plaque Instability in the Mouse. *Methods Mol Biol*. 2015;1339:333-8.
5. Nam MH, Lee HS, Seomun Y, Lee Y, Lee KW. Monocyte-endothelium-smooth muscle cell interaction in co-culture: proliferation and cytokine productions in response to advanced glycation end products. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Sep;1810(9):907-12.
6. Li Y, Guo Y, Chen Y, Wang Y, You Y, Yang Q, Weng X, Li Q, Zhu X, Zhou B, Liu X, Gong Z, Zhang R. Establishment of an interleukin-1 $\alpha$ -induced inflammation-activated endothelial cell-smooth muscle cell-mononuclear cell co-culture model and evaluation of the anti-inflammatory effects of tanshinone IIA on atherosclerosis. *Mol Med Rep*. 2015 Aug;12(2):1665-76.
7. Fukuda K, Iihara K, Maruyama D, Yamada N, Ishibashi-Ueda H. Relationship between carotid artery remodeling and plaque vulnerability with T1-weighted magnetic resonance imaging. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2014 Jul;23(6):1462-70.
8. Maitrias P, Metzinger-Le Meuth V, Massy ZA, M'Baya-Moutoula E, Reix T, Caus T, Metzinger L. MicroRNA deregulation in symptomatic carotid plaque. *J Vasc Surg*. 2015 Nov;62(5):1245-50.
9. Sano N, Satow T, Maruyama D, Kataoka H, Morita K, Ishibashi-Ueda H, Iihara K. Relationship between histologic features and outcomes of carotid revascularization for radiation-induced stenosis. *J Vasc Surg*. 2015 Aug;62(2):370-7.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2件)

Miki K, Arimura K, Nishimura A, Yoshimoto K, Sayama T, Iihara K. Revascularization Operation for Moyamoya Disease with Concurrent von Willebrand Disease.

World Neurosurg. 2017 Dec;108:991.e17-991.e21. doi: 10.1016/j.wneu.2017.08.141. Epub 2017 Sep 1.

Kawamura Y, Sayama T, Maehara N, Nishimura A, Iihara K.

Ruptured Aneurysm of an Aberrant Internal Carotid Artery Successfully Treated with Simultaneous Intervention and Surgery in a Hybrid Operating Room. World Neurosurg. 2017 Jun;102:695.e1-695.e5.

Kurogi R, Kada A, Nishimura K, Kamitani S, Nishimura A, Sayama T, Nakagawara J, Toyoda K, Ogasawara K, Ono J, Shiokawa Y, Aruga T, Miyachi S, Nagata I, Matsuda S, Yoshimura

〔学会発表〕(計 2 件)

①Sayama T. Investigation of Factors That Influence Discharge to Home After Treatment of Stroke Recovery Phase Using Stroke Cooperation Pathway. Asian pacific stroke conference 2018 (Jakarta) 2018年9月28日

②Sayama T. Stroke mimics presenting with thunderclap headache of spontaneous cerebrospinal fluid hypovolemia. Asian pacific stroke conference 2017 (Nanjing) 2017年10月27日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕ホームページ等;なし

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：空閑 太亮

ローマ字氏名：KUGA, daisuke

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院

職名：助教

研究者番号(8桁)：40759932

研究分担者氏名：迎 伸孝

ローマ字氏名：MUKAE, nobutaka

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院

職名：助教

研究者番号(8桁)：60532843

研究分担者氏名：飯原 弘二

ローマ字氏名：IIHARA, koji

所属研究機関名：九州大学

部局名：医学研究院

職名：教授

研究者番号(8桁)：90270727

研究分担者氏名：西村 中

ローマ字氏名：NISHIMURA, ataru

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院

職名：助教

研究者番号(8桁)：90452755

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。