

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K08989

研究課題名(和文) 動脈硬化性大動脈瘤の網羅的糖鎖解析による新たな疾患関連指標の探索

研究課題名(英文) Exploratory investigation for new indicators based on comprehensive glycan-based analysis of arteriosclerotic aortic aneurysms

研究代表者

杉浦 知範 (Sugiura, Tomonori)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員

研究者番号：60535235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：外科的手術を行った27症例に対して大動脈瘤組織切片の血管壁構造の破綻部と比較的構造が保たれた部位でレクチンアレイ分析をおこなった。まずNet intensityでの比較を行ったが、全体での部位間の比較では大きな差は認められなかったが、同一検体の部位間で有意差があるレクチンが挙げられた。代表的な標本において血管構造が比較的保たれた組織部位と血管構造の破綻した動脈瘤組織の部位でのコントラストが強いレクチンの選定を行った。しかし異なる検体ではコントラストに一定の傾向は認められなかった。血液中への分泌物に対してマイクロRNAアレイ解析を実施したが、動脈瘤のレクチン強度を反映する指標は同定できていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の検討では異なる検体間での差異、同一検体の組織部位での差の検討においても予想と異なるものであり、効果的な手法を見いだせなかった。また、血液中への分泌性に関してアレイ解析を行い、それらの関連性を検討したが今回の検討では代理指標となりうる候補は得られなかった。今回の研究では大動脈瘤を簡易的にスクリーニングする手法は見いだせず、研究手法を再考する必要があると考えられた。一方、並行して実施した非侵襲的中心血圧測定において、腹部大動脈瘤患者では上腕・中心血圧と肺機能との間には有意な相関を認め、上腕・中心血圧の上昇と肺機能の減弱は腹部大動脈瘤の病態に関連することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Lectin array analysis was performed on the ruptured part of the vessel wall structure and the part where the structure was relatively preserved in the tissue sections of the aortic aneurysm in 27 patients who underwent surgical operation. First, we compared the net intensity, and although no significant difference was observed between sites overall, some lectins showed significant differences between sites of the same sample. We selected lectins with strong contrast between tissue regions where the vascular structure was relatively preserved and aneurysmal tissue regions where the vascular structure was destroyed in representative specimens. However, no consistent tendency was observed in the contrast between different specimens. MicroRNA array analysis was performed on secretions into the blood, but indices reflecting the lectin intensity of aneurysms have not been identified.

研究分野：clinical laboratory medicine

キーワード：atherosclerosis aortic aneurysm

1. 研究開始当初の背景

大動脈瘤の発生機序には大動脈の脆弱化が大きく関与しており、その脆弱化は炎症、結合組織異常、粥状硬化等による血管壁の構造異常や形体破綻によってもたらされる。なかでも腹部大動脈瘤では、血管腔側に強い動脈硬化性病変を認めることが多く、瘤の発生に動脈硬化が強く関連すると考えられている。しかしながら、腹部大動脈瘤の発生には糖尿病や脂質異常との関連性が乏しいなどといった報告もあることから、動脈硬化性病変の進展のみでは説明できない点もあり他の要因の関与が示唆されている。

腹部大動脈瘤のなかでも壁の三層構造が保たれた真性瘤では、ほとんどの症例が無症候で腹部触診や CT スキャンで偶発的に発見される。このため発症初期から診断されることは珍しく、瘤がある程度拡大してから、あるいは破裂や解離の徴候が出現してからようやく診断に至ることがしばしばあり、一旦破裂すると致死率が高く救命困難な疾患である。このように、腹部大動脈瘤の早期診断が急務となっているが、局所の血栓形成が進んだ場合などに血液凝固異常を認めることはあるが特異性は乏しく、これまでのところ血液検査などで簡便に評価が可能な信頼性の高い指標は皆無である。現状では CT スキャンといった画像検査に頼らざるを得ず、診断の確定した患者に対する定期的な検査は有効であるが、健診や人間ドックなどで安易に撮像を繰り返すことは被爆や費用の観点からも好ましくなくスクリーニング検査としては不向きである。

近年、特定の糖鎖と疾患の発症および増悪との関連が報告され、病態との関連を示す指標として糖鎖が注目されている。糖鎖は、核酸、タンパク質に次ぐ第 3 の生命鎖を形成する生体情報高分子でタンパク質や脂質その他の低分子と結合して多様な分子を作り出し、多くの場合細胞表面に存在して細胞の性質を示すため「細胞の衣裳」とも例えられ、個々の細胞に特異的な情報提示や細胞間コミュニケーションなどの機能と役割を果たしている。糖鎖は体液中では分泌タンパク質として存在し、インターフェロンやエリスロポエチンなどの分泌タンパク質の凝集や分解等の防止や、生体内における輸送シグナルとして多岐に機能し、生体内で重要な生理作用を担うことが分かっている。しかしながら糖鎖の研究はまだ途上であり、多くの疾患との関連はまだ研究されておらず、腹部大動脈瘤の指標として広く受け入れられているものはない。

一方、RNA の splicing により産生される microRNA は遺伝情報を持たないものの、タンパク質への翻訳を制御して重要な要素を反映することが報告されており、安定した状態で血中に分泌され存在する分泌型 microRNA と各種疾患や病態との関連が報告されている。我々も最近の研究で喫煙による血管障害に microRNA-126 が関連することを報告している。さらに、近年、腹部大動脈瘤と関連の深い microRNA も報告されているが、矛盾した報告もあり定まった見解に至っておらず、一般的な指標としては受け入れられていない。

2. 研究の目的

我々は、腹部大動脈瘤患者の摘出病変から指標となりうる糖鎖および microRNA を網羅的に解析し、腹部大動脈瘤の進展、増悪に関わる因子の探索を行い、それらの相互関連および血液中への分泌性、さらには病態や治療介入による変化を検討することにより信頼性の高い指標を導くことを目標としている。腹部大動脈瘤では、多くの例が発症から進展過程において無症候であり、早期診断が困難である。本研究の最終的な目的は無症候の動脈硬化性腹部大動脈瘤の発症や進展に関わる新たなバイオマーカーを同定することにより早期発見や早期治療に結びつけることである。信頼性の高い指標が同定されれば治療法を決定するうえでの選択枝も広がり、また治療後の経過を評価することも可能となる。

3. 研究の方法

動脈硬化性腹部大動脈瘤の診断で当院心臓血管外科にて人工血管置換手術予定の患者に対して、術前にエコーや脈波等の血管機能検査を行うとともに血液中の酸化ストレスや炎症などの指標を評価し、血清を一部保存する。その後、人工血管置換手術の際に摘出された組織のパラフィンブロック標本から病変部位と正常対照となる周辺領域を同面積切り出し、タンパク質を抽出してレクチンアレイ解析および質量分析によるプロテオミクス解析を実施し、候補となる糖鎖をピックアップする。次いで、候補となる糖鎖および microRNA を術前に採取した保存血清において評価し、血中への分泌性を検討する。最終的な候補を腹部大動脈瘤の診断で保存的に定期通院されている患者に対して病変の進行および治療効果との関連を評価し、その有用性を検証する。

通院中の患者のなかで心臓血管外科にて人工血管置換手術の予定となった患者に対し、研究代表者と教室内の研究協力者らにより手術前に脈波検査(脈波伝播速度、中心血圧)と頸動脈エコー等による動脈硬化の評価を行い、同時に末梢血を採取し、酸化ストレス・炎症・内皮依存性作動物質などの測定を行う。また、次のステップで評価する予定の血清を一部凍結保存する。連携研究者である心臓血管外科須田らにより、人工血管置換術実施の際に摘出した病変部組織の

一部と対照となる人工血管留置予定部の上端遠位側の組織を採取し、病理標本とする。また、それぞれの組織の一部から RNA を抽出し、動脈硬化に関連した microRNA アレイ解析を実施する。

病理標本のなかから動脈硬化部と正常組織に近い対照領域を指定し、研究分担施設である産業技術総合研究所に標本を送り、レクチンアレイ解析および質量分析によるプロテオミクス解析を実施する。具体的には、ホルマリン固定されたパラフィンブロック標本をレーザーマイクロダイセクション (LMD) 法により指定された病変部位と対照領域を同面積切り出し、タンパク質を抽出してレクチンアレイ解析を行い、候補をピックアップする。次いで、組織のアレイ解析で候補となったレクチン結合タンパク質を質量分析により同定し、インフォマティクスなどにより糖鎖マーカーを絞り込む。

候補となる糖鎖および microRNA を術前に採取した保存血清において評価し、血中への分泌性を検討し、末梢血での判定可能な指標の確立を目標にさらに候補を絞り込む。絞り込まれた最終的な候補となる指標を、(A) 人工血管置換術を施行した患者、ならびに (B) 動脈硬化性腹部大動脈瘤の診断で保存的に名古屋市立大学病院内科外来へ定期通院されている患者に対して、病変の進行および治療効果との関連を評価し、包括的指標としての有用性を検証する。

4. 研究成果

動脈硬化性腹部大動脈瘤の診断で外科的手術に至り病理組織採取に至った症例は 27 症例であった。侵襲性の低い大動脈ステントグラフト治療が選択される対象が増加しているため、当初の予定に比べて外科治療が選択される対象が少なく登録が予定よりも遅れた。

まず、26 検体のうち大動脈瘤組織切片の血管壁構造の破綻部と比較的構造が保たれた部位が揃った 15 検体をスライド染色とレーザーマイクロダイセクション法 (LMD) で分析することとした。LMD にて 0.3mm² を切り出し、0.2 mm² 相当量をレクチンアレイ分析した。レクチンアレイでは、まず Net intensity での比較を行ったが、全体での部位間の比較では大きな差は認められなかったが、同一検体の部位間で有意差があるレクチンが挙げられた (LTL, SNA, ACG, TxLC-1)。病変部ではこれらのシグナル強度が低下する傾向であった。次いで、全体でのシグナル強度が平均的であった Jacalin を標準レクチンとして用い、標準化したデータの比較をしたところ全体の部位間比較では大きな差を認めなかった。同一検体の部位間比較では PHA-L のみ比較的構造が保たれた部位での発現が強く見られた。続いて組織染色用レクチンとして、血管構造の保たれた部位選択的に発現しているレクチンは RCA120, DSA, TxLC-1, TJA- , SNA, TJA-I、血管構造の破綻した部位選択的に発現しているレクチンは ABA, MAL-I, AAL, ACA, MPA, MAH であり、発現性から有用と思われる MAL-I, MPA, MAH, TxLC-1, TJA- 、PHA-L が候補として挙げられた。組織形態を見やすくするためのコントロールレクチンとして WGA レクチンも使って 2 重染色を実施し、代表的な標本において血管構造が比較的保たれた組織部位と血管構造の破綻した動脈瘤組織の部位でのコントラストが強い 2 レクチン (TJA- 、PHA-L) に絞りさらに検討を進めた。

別の 9 検体で WGA では差がないところを確認したうえで TJA- 、PHA-L のシグナル強度を比較した結果、9 検体間での検討では定まった傾向は認められなかった。同一検体内で血管構造が比較的保たれた組織部位と血管構造の破綻した動脈瘤組織の部位での検討では、正常構造に近いと部位であっても組織障害が始まっているところもあり動脈瘤病変部とのレクチンコントラストが出にくい可能性があるかと推察された。

今回の検討では異なる検体間での差異、同一検体の組織部位での差の検討においても予想と異なるものであり、個々の組織標本を見直して糖鎖蛋白の発現に関して検討したが現時点では効果的な手法を見出せておらず、引き続き検討を行っていく。また、血液中への分泌性に関して microRNA が代理指標となることを期待してアレイ解析を行った。ターゲットとなる糖鎖蛋白が定まっていないため、現時点ではサロゲートマーカーとなりうる指標は特定に至っておらず、引き続き検討課題である。

並行して登録した患者に対して腹部大動脈瘤を有する患者の臨床所見についても検討を行った。大動脈瘤の発生進展には遺伝子や免疫疾患など動脈硬化以外の疾患が示唆されており、なかでも肺機能は心機能や血圧調節機構に関与し、肺機能の低下が腹部大動脈瘤の形成に影響を及ぼすことが報告されている。標準的な血圧測定などで用いられる上腕血圧に対して、非観血的手法により測定した中心血圧は上腕血圧と異なる意義を有する可能性が示唆されており、腹部大動脈瘤を有する患者の中心血圧はその病態を考察するうえで重要な指標である。そこで腹部大動脈瘤を有する患者における上腕および中心血圧と心電図の左室電位および肺機能との関連性に関して検討を行った。

腹部大動脈瘤の診断で治療介入予定の患者 40 名 (平均年齢 71 ± 5 歳) を対象とした (AAA 群)。また、年齢性別をマッチさせた正常血圧者 50 名を対照とした (Control 群)。上腕血圧、および HEM-9000AI (オムロン社) を用いて橈骨動脈血圧波形の収縮期第 2 ピーク圧 (SBP2) を測定し、中心大動脈の収縮期最大血圧の代理指標とした。心電図の左室電位所見には標準 12 誘導心電図における V1 誘導の S 波と V5 誘導の R 波の和 (SV1+RV5) を用い、肺機能は標準的なスパイロメトリーにより検討した。

AAA 群の 79% に高血圧の合併を認め、高血圧症例は全例降圧剤の投薬を受けていた。また AAA 群では約 58% に喫煙習慣を認めた。全対象で検討すると、上腕血圧と中心血圧はともに % 予測肺

活量と正の相関を、一秒率と負の相関を示したが SV1+RV5 とは有意な相関を示さなかった。群間で比較すると AAA 群では Control 群に比して上腕血圧と中心血圧が有意に高い傾向を示したが、上腕中心血圧の差に関しては両群で有意差を認めなかった。同様に SV1+RV5 に関しても両群で有意差を認めなかったが、AAA 群では Control 群に比して一秒率が有意に低い結果を示した ($p < 0.0001$)。

腹部大動脈瘤患者では正常血圧の対照に比して左室電位所見は有意差なく、%予測肺活量は保たれていたが一秒率は低下していた。また上腕・中心血圧と左室電位に相関関係は認められなかったが肺機能との間には有意な相関を認めた。今回の検討では中心血圧測定の付加的な意義は見いだせなかったが、上腕・中心血圧の上昇と肺機能の減弱は腹部大動脈瘤の病態に関連することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村井 俊介, 杉浦 知範, 土肥 靖明, 高瀬 浩之, 溝口 達也, 山下 純世, 瀬尾 由広, 大手 信之
2. 発表標題 腹部大動脈瘤を有する患者における上腕および中心血圧と心電図左室電位、肺機能との関連性の検討
3. 学会等名 日本高血圧学会臨床高血圧フォーラム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 溝口達也, 杉浦知範, 市橋拓, 村井俊介, 大手信之, 瀬尾由広
2. 発表標題 腹部大動脈瘤を有する患者の上腕および中心血圧：健常者との比較検討
3. 学会等名 第157回日本循環器学会東海地方会
4. 発表年 2021年

〔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
研究分担者	久野 敦 (Kuno Atsushi) (50302287)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長 (82626)	

	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
連携研究者	田中 靖人 (Tanaka Yasuhito) (90336694)	熊本大学・消化器内科学・教授 (17401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
連携研究者	稲垣 宏 (Inagaki Hiroshi) (30232507)	名古屋市立大学・臨床病態病理学・教授 (23903)	
連携研究者	須田 久雄 (Suda Hisao) (50206562)	名古屋市立大学・心臓血管外科学・教授 (23903)	

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