

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：23903
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2023
課題番号：18K08977
研究課題名（和文）石灰化スコア分類に基づく頸動脈粥腫安定化機構解明のためのオミックス解析の展開

研究課題名（英文）Omics analysis for stabilization mechanism of carotid plaques based on the classification with calcium score

研究代表者
片野 広之（Katano, Hiroyuki）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・准教授

研究者番号：30295612
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：頸動脈高度石灰化プラークにおいて、ANGPTL4発現増強はFGFR2発現抑制とともに、主に血管新生抑制作用に関連して惹起されたものと推察され、またANGPTL4はTargetScan algorithmにて hsa-miR-4530、hsa-miR-133b の target gene の可能性があり、miRNAレベルでもこれらのmiRNA抑制によりANGPTL4作用が増強され、血管新生が抑制される方向で調整されていることが示唆された。また、頸動脈粥腫高石灰化群と低石灰化群の全エクソーム解析によりゲノム変異の特徴を比較検討し、血管石灰化に関与する遺伝子の一塩基多型の差異を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頸動脈高度石灰化粥腫においてANGPTL4作用が増強され、miRNAレベルでも本因子に関連して血管新生が抑制される方向で調整されていること、および血管石灰化に関与するDNA一塩基多型の差異を明らかにし、特にANGPTL4を中心としたゲノム、エピゲノム変異による修飾、調節が、頸動脈粥腫の症候化予防の手掛かりとなる可能性を示した。将来的に症候率の高い、一般的には石灰化の少ない不安定プラークと呼ばれる粥腫において、症候化を抑え安定化を図るために血管新生抑制遺伝子の導入あるいは、血管新生促進遺伝子をtargetとするmicroRNA導入などの遺伝子治療への応用が考えられる。

研究成果の概要（英文）：In severely calcified carotid artery plaques, enhanced ANGPTL4 expression was presumably induced mainly in association with the suppression of angiogenesis, together with suppression of FGFR2 expression, and ANGPTL4 was found to be a possible target gene of hsa-miR-4530 and hsa-miR-133b by the TargetScan algorithm, suggesting that ANGPTL4 action was enhanced by suppression of these miRNAs at the miRNA level, and that angiogenesis was suppressed. In addition, the characteristics of genomic mutations were compared between the highly calcified and low calcified groups of carotid artery plaques by whole exome analysis, and differences in single nucleotide polymorphisms of genes involved in vascular calcification and embolism were found.

研究分野：頸動脈狭窄症

キーワード：頸動脈狭窄症 頸動脈プラーク 石灰化 ゲノム エピゲノム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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。研究代表者らはこれまで頸動脈粥腫病変の硬さに注目し、放射線学的、病理学的検討を行い、術前MDCTAのカルシウムスコアを用いた石灰化の質的、量的評価がステント拡張予測に役立つこと、冠動脈石灰化病変との症候の差異などを報告してきた(*Stroke 2007, JSCVD 2012,2015*)。しかし、血管石灰化の生成機構や意義については未だ多くが解明されていない。従来、石灰化は動脈硬化における壊死またはアポトーシスに陥った組織の終末の形態であり、比較的安定な組織であると考えられてきた。特に頸動脈硬化病変においては、不安定プラークとされるのは柔らかく、出血性、可動性のものなどを指し、石灰化粥腫は病変として安定しているため、症候を惹起しにくいプラークであると考えられている。従って、石灰化粥腫の性質を検討して、プラーク安定化のメカニズムを明らかにすることで、逆に症候化しやすいプラークの性質を焙り出したり、症候化しにくくする治療の手がかりになる可能性がある。

近年、オミックス分析技術が進み、これまでに我々が明らかにしたトランスクリプトーム、microRNA情報のほか、ゲノム、エピゲノムの高速シーケンス解析が次世代シーケンサー(NGS)を用いて行われるようになり、各種疾患の原因遺伝子、疾患特異変異が明らかにされている。我が大学にも、イオン半導体シーケンスNGSである Ion Torrent PGM (Life Technologies) が配備され、数時間で100-500万リードが可能となった。本研究は、NGSを活用しこれまでの結果を発展させ、「頸動脈石灰化粥腫におけるプラーク安定性を制御しているゲノム、エピゲノム変異の差異、特徴は何か」を問うもので、新たな側面から頸動脈粥腫の安定化、不安定化機序を解明し臨床への応用へ繋げようとするものであった。

2. 研究の目的

本研究ではこれまで進めてきた頸動脈石灰化粥腫についてのトランスクリプトーム、microRNAなどのオミックス研究をさらに展開し、ゲノム、エピゲノムの状態の差異を明らかにして、頸動脈粥腫の安定化、不安定化機構を解明するとともに、遺伝子治療への応用への基礎データとすることを目的とした。

我々は、これまでに網羅的な生体分子についての情報であるオミックス情報のうち、既にトランスクリプトーム、microRNAの解析を施行し、「血管新生を抑制するANGPTL4 mRNAの発現増強と蛋白生成促進」、および「血管新生を促進するFGFR2 mRNAの発現抑制と蛋白生成抑制」を示した(*JSCVD 2014*)。またsmall RNA解析として、「microRNA (hsa-miR-4530, hsa-miR-133b)の発現抑制」も明らかにした。これらはともにANGPTL4をtarget geneとする可能性があることから、microRNAの蛋白翻訳生成抑制作用を抑制することで、ANGPTL4の作用を増強させる方向に働くことがわかった(*JSCVD 2017, in press*)。つまり、頸動脈石灰化粥腫のプラークとしての安定性は、石灰組織の生成や沈着よりもむしろ「血管新生抑制遺伝子(mRNA)の発現増強や血管新生促進遺伝子の抑制」によってもたらされ、さらにこれらの「血管新生関連遺伝子を標的としたmicroRNA(miRNA)」によっても安定化が調節されていることを明らかにした。これらの結果から、将来的に症候率の高い、一般的には石灰化の少ない不安定プラークと呼ばれる粥腫において、症候化を抑え安定化を図るために血管新生抑制遺伝子の導入あるいは、血管新生促進遺伝子をtargetとするmicroRNA導入などの遺伝子治療への応用が考えられた。

本研究ではこれまでの我々の結果で明らかとなったANGPTL4などの血管新生抑制作用のある

遺伝子変異によるものの他、血管新生促進関連遺伝子に対する DNA 変異、エピゲノムの状態の差異が安定化・不安定化制御に関与している可能性が予想された。また、トランスクリプトーム、プロテオームでは確認できなかった血管石灰化病変の生成促進に関連するゲノム、エピゲノムが変異により修飾、調節されている可能性もあり、石灰化促進自体が粥腫制御、つまり粥腫の症候化予防の手掛かりとなる可能性も考えられた。新規の関連ゲノム、エピゲノムの変異が明らかとなれば、不安定プラークに対する新たな遺伝子導入または DNA メチル化による発現調節などの遺伝子制御治療への展開も視野に入れた。

3. 研究の方法

頸動脈凍結組織からゲノム DNA を抽出し、NGS によりターゲットシーケンス分析を行い、高・低石灰化プラークにおける遺伝子変異の差異を明らかにし、粥腫安定化・不安定化調節制御に関わる DNA 変異を探った。ヒト頸動脈プラークは、頸動脈内膜剥離術によって摘出した標本 (-80 凍結) を用いる。石灰化含有度の評価は術前 MDCTA で計測したカルシウムスコアおよび HE 染色組織標本で行い、高石灰化と低石灰化プラーク群に分類した。mRNA microarray 分析による網羅的遺伝子発現検索と qRT-PCR、Western blotting (WB) 解析・免疫染色による蛋白発現確認を行った。さらに microRNA についても microarray, qRT-PCR 分析を行い関与を検討した。また、核酸を抽出後、エクソンを濃縮してシーケンスライブラリーを作成、次世代シーケンサー (HiSeq2500, Illumina) を用いて塩基配列を取得した。Quality Score 30 以上の塩基は 91.8-94.5% と良好であった。hg19 ヘマッピング (99.6-99.7%) し、Picard により Duplicate リードを除去した (ユニーク率 95.6-96.5%)。平均カバー率 (> 10x) は 97.6% であった。

4. 研究成果

血管新生、石灰化関連遺伝子で基準を満たす 175 probe・93 転写物のうち、ANGPTL4 mRNA の有意な発現増強と FGFR2 mRNA の有意な発現抑制を認めた。WB 解析、免疫染色により蛋白レベルでも両者が確認された。miRNA microarray では、抽出された 19miRNA のうち、qRT-PCR 定量を行い検証すると、hsa-miR-4530, hsa-miR-133b, hsa-miR-1-3p の有意な発現抑制が認められた。Spearman 順位相関解析では、hsa-miR-4530, hsa-miR-133b が total gene signal, Cq 値のいずれも Ca score との相関を認めた。また、エクソームターゲット領域上の総 SNV (SNP) 数は 1 標本あたり 115,982-126,947、Ins 数は 6,722-7,794、Del 数は 8,739-10,006 であった。最も頻度の高い SNV は G > A, 次いで A > G, C > T, T > C であった。挿入は (G)InsC, (A)InsG が、欠失は (CT)delC, (GC)delG が高頻度であった。高品質変異塩基 (FILTER), 中高度変異影響重篤度 (SnpEff), ミスセンス変異影響度 (FATHMM), 臨床重要度 (ClinVar) を考慮し、群および個別比較にて抽出、さらに変異塩基出現頻度を考慮すると、高石灰化粥腫群で ABCC6 (c.1841T > C; c.1896C > A etc.)、低石灰化粥腫群で KLKB1 (c.428G > A; c.314G > A etc.) の SNP の平均 AF 比が 2.15/4.86 倍と高かった。今回の結果から、ANGPTL4 発現増強は FGFR2 発現抑制とともに、主に血管新生抑制作用に関連して惹起されたものと推察され、また ANGPTL4 は TargetScan algorithm にて hsa-miR-4530, hsa-miR-133b の target gene の可能性があり、miRNA レベルでもこれらの miRNA 抑制により ANGPTL4 作用が増強され、血管新生が抑制される方向で調整されていることが示唆された。また、頸動脈粥腫について、高石灰化群と低石灰化群の全エクソーム解析によりゲノム変異の特徴を比較検討し、血管石灰化および塞栓に関連する遺伝子の一塩基多型の差異を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Katano H, Nishikawa Y, Yamada H, Yamada K, Mase M	4. 巻 27
2. 論文標題 Differential expression of microRNAs in severely calcified carotid plaques	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Stroke Cerebrovasc Dis	6. 最初と最後の頁 108-117
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.08.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katano H, Nishikawa Y, Yamada H, Iwata T, Mase M	4. 巻 11
2. 論文標題 Profile of genetic variations in severely calcified carotid plaques by whole-exome sequencing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surg Neurol Int	6. 最初と最後の頁 286
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.25259/SNI_387_2020. eCollection 2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 片野広之、西川祐介、内田 充、山田和雄、間瀬光人
2. 発表標題 頸動脈狭窄症における高度石灰化粥腫の網羅的ゲノム・エピゲノム解析
3. 学会等名 第80回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片野広之、西川祐介、山田和雄、間瀬光人
2. 発表標題 頸動脈病変の遺伝子発現：石灰化粥腫の安定性を支えているもの
3. 学会等名 第46回日本脳卒中学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Katano H, Mase M
2. 発表標題 Molecular stabilizing mechanism in calcified carotid plaques
3. 学会等名 The 88th European Atherosclerosis Society Congress (EAS 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片野広之、西川祐介、鳥飼武司、間瀬光人
2. 発表標題 高度石灰化頸動脈プラークのゲノム変異
3. 学会等名 第78回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 片野広之、西川祐介、柴田帝式、間瀬光人
2. 発表標題 全エクソーム解析による頸動脈石灰化粥腫の一塩基多型の検出
3. 学会等名 第48回日本脳卒中の外科学会
4. 発表年 2019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

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
---------	---------