

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06262・19K21354

研究課題名(和文) 頸動脈狭窄症における脆弱プラーク形成への小胞体ストレス応答関与機構の解明

研究課題名(英文) Study of mechanism involved in unfolded protein response to the formation of fragile plaques in carotid atherosclerosis

研究代表者

今堀 太一郎 (Imahori, Taiichiro)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：30604277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、脳梗塞の重要な原因である頸動脈狭窄症において、脆弱プラーク形成への小胞体ストレス応答関与機構の解明と、その解明により脆弱プラーク形成のサロゲートマーカーを探索することを目的とした。頸動脈プラークにおける小胞体ストレス関連抗体の陽性細胞数は、無症候群、症候群、進行性脳卒中群、の順で増加しており、小胞体ストレスの持続が頸動脈プラークの重症度や不安定性と関連していることを示した。臨床成績からは、進行性脳卒中群の成績は他群よりも優位に不良であり、群内では頸動脈内膜剥離術よりもステント留置術の成績が有意に不良であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の頸動脈プラークにおける小胞体ストレスの関連と臨床成績の結果から、進行性脳卒中群の治療成績向上のためには、現時点ではCEAによるプラーク除去が有効なことを示唆された。これらの所見より、頸動脈で局所的に小胞体ストレスを制御する方法が存在すれば、頸動脈プラークの安定化を図ることが可能となり、外科的治療を含めた総合的な脳卒中予防の治療成績向上が期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the mechanisms involved in unfolded protein response to the formation of fragile plaques in carotid atherosclerosis, an important cause of cerebral infarction, and to search for surrogate markers of fragile plaque formation based on the elucidation. The number of positive cells for unfolded protein response associated antibodies in carotid plaques increased in the order of asymptomatic, symptomatic, and progressive stroke group, indicating that persistent unfolded protein response is associated with carotid plaque severity and frangibility. Clinical outcomes showed that the progressive stroke group had predominantly poor outcomes compared to the other groups, and within the group, the outcomes of the patients treated by CAS group was significantly worse than those treated by CEA.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：頸動脈狭窄 小胞体ストレス 脳卒中

1. 研究開始当初の背景

脳血管障害は日本人の4大死因の一つであり、要介護となる原因の第1位である。脳血管障害の7~8割が脳梗塞であるが、頸動脈狭窄症は脳梗塞の原因の約1割を占め、その手術治療(頸動脈内膜剥離術又は頸動脈ステント留置術)による脳梗塞予防の有効性は大規模臨床試験により証明されている。しかし、従来は主に症候の有無と狭窄度により手術適応が判断されていたが、その後の内科的治療の成績向上もあり、特に無症候性狭窄に対しての手術適応基準は未だ明確ではない。近年では、脳梗塞発症を来しやすいプラークの脆弱性が注目されており、MRIによるプラークイメージの発達などにより、脂質に富んだ壊死性コア、プラーク内出血、線維性被膜の菲薄化などを示唆する所見が比較的容易に把握できるようになり、現在ではプラーク所見も内科的治療や手術適応の大きな判断要素とされている。よって、脆弱性プラーク形成のメカニズム解明と、手術治療が効果的と見込まれる症例の選択に貢献するサロゲートマーカーの発見は臨床上極めて有用と考えられる。

熱ショック蛋白(heat shock protein: HSP)はストレス条件下に発現して細胞保護に働くストレス蛋白群であるが、小胞体ストレス蛋白(glucose-regulated protein 78: GRP78など)もHSPの類縁蛋白として機能する。HSPと小胞体ストレス蛋白は、共に分子シャペロンとして機能し、高温や虚血などのストレス環境で正常な構造を保てなくなった蛋白に結合してその構造が非可逆的に変性するのを阻止し、蛋白の構造を元に戻す役割を果たしている。小胞体ストレスは様々な原因によって生じた変性蛋白が小胞体に蓄積し、それにより細胞への影響が生じる状態である。小胞体ストレスによる細胞ダメージを回避するために、細胞は3種のセンサー分子を活性化して対応する。まず、PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)の働きにより翻訳を抑制して小胞体の負荷を軽減し、次いでActivating transcription factor 6 (ATF6)およびInositol requiring 1 (IRE1)の働きによりGRP78/BiPなどの小胞体シャペロンを転写誘導して蛋白の折り畳み能力を強化し、小胞体関連分解構成因子を転写誘導して変性蛋白の分解能力を亢進させる。しかし、それでも小胞体の恒常性が維持されなければ、小胞体表面に存在する前述の小胞体ストレスセンサーからのシグナルにて特異的アポトーシス誘導転写因子であるC/EBP homologous protein (CHOP)を発現させ、アポトーシスに至る。これらの反応を総称して小胞体ストレス応答(unfolded protein response: UPR)と呼んでいる。小胞体ストレスは、糖尿病、神経変性疾患、癌、心臓疾患など様々な疾患での関与が報告されており、アテローム性動脈硬化等の発症・進展への関与の報告もみられるが、頸動脈狭窄についての研究は報告が少ない。

2. 研究の目的

ヒトの血液や頸動脈プラークという臨床上極めてクリティカルなサンプルを用いて、サンプル中の小胞体ストレス応答と臨床症状やMRI・超音波エコーなどの画像所見との間の関連性を調べることにより、脆弱プラークのサロゲートマーカーを探索する点が本研究の特色であり、このような研究は頸動脈プラークにおいてはほとんど行われていないのが現状である。また、手術治療(頸動脈内膜剥離術と頸動脈ステント留置術)後の小胞体ストレスの変化が術後の予後と関連している可能性もあるが、これに関してはこれまで全くと言ってよいほど検討されていない。本研究において予想される結果は、以下の通りである。頸動脈狭窄症患者の血液中で特異的に変化する小胞体ストレス応答が明らかとなる。頸動脈狭窄症患者の頸動脈脆弱プラークの画像所見と相関して増加減少あるいは局在が変化する小胞体ストレス応答蛋白を同定する。手術治療前後の小胞体ストレス応答の変化と術後合併症(脳塞栓症など)との関連を解明する。前述の結果から判明したサロゲートマーカー候補の小胞体ストレス応答蛋白を新たな症例で検証し、その有用性を確立する。特定した小胞体ストレス応答蛋白を標的として精査することにより、頸動脈プラークの病態生理を新たな視点から解明する。このように本研究を通して脆弱プラークのサロゲートマーカーが判明すれば、症候性頸動脈狭窄だけでなく、無症候性頸動脈狭窄の中の高危険群を同定することにより、無症候性狭窄に対する効率的かつ効果的な早期手術治療の施行が可能となり、臨床上極めて有用である。また、頸動脈狭窄症に対する手術治療後の合併症の予測・対策のための新たな研究基盤を確立できる可能性もある。

3. 研究の方法

本研究は頸動脈狭窄症の脆弱プラーク形成における小胞体ストレス応答の関与を解明し、それを通じて脆弱プラークの新たなサロゲートマーカーの同定とその検証を行うことを目指し、以下のことを明らかにする。

頸動脈狭窄症患者の血液中において小胞体ストレス応答の変化を対照群と比較する。また、手術治療(頸動脈内膜剥離術と頸動脈ステント留置術)後の変化も明らかにする。

頸動脈狭窄症患者の頸動脈プラークにおける小胞体ストレス応答の程度や局在を転写・翻訳・免疫組織学的手法を用いて明らかにする。

上記の結果と、超音波エコーやMRプラークイメージなど画像所見や病理学的所見を比較し、頸動脈の脆弱プラークと相関している小胞体ストレス応答蛋白を同定する。

上記の結果と、頸動脈狭窄症における症候の有無との関連を調べ、症候発生と関連する小胞体ストレス応答蛋白を同定する。また、手術治療後の変化との関連も調べる。

上述の研究に用いたものとは別に、新たな頸動脈狭窄症例を集積して、上記小胞体ストレス応答蛋白が脆弱プラークのサロゲートマーカーとして有用かどうかを検証する。

研究計画・方法の概要は、以下の通りである。

頸動脈狭窄症性患者の手術前後の画像データ、血液及び頸動脈プラークサンプルを収集する。また対照として、未破裂脳動脈瘤患者の血液を収集する。

血液中の小胞体ストレス応答蛋白を RT-PCR、ELISA、Western blot などにより手術前後で測定する。具体的には、小胞体シャペロン (GRP78、calnexin、calreticulin、ERp57 など)、小胞体ストレス応答活性化のマーカー (ATF3)、特異的アポトーシス誘導転写因子である CHOP やその下流の CHAC1 の発現を転写レベルでは RT-PCR、タンパク質レベルでは特異抗体による ELISA や Western blot を用いて測定する。

頸動脈プラークを RT-PCR、ELISA、Western blot や、免疫組織学的染色により精査し、小胞体ストレスの評価を行う。具体的には、上記と同様の測定に加え、さらに、前述の各種特異抗体や小胞体シャペロンを認識する KDEL 抗体による免疫組織学的染色を行い、プラーク及びその近傍における各種マーカーの発現状態を評価する。

上記結果と画像所見や病理学的所見を比較し、脆弱プラークと関連する、あるいは、手術前後で変動する小胞体ストレス応答蛋白を探索し、合併症や症候発生との関連も調査する。

新たな症例を集積して同定したサロゲートマーカーの検証を行う。

4. 研究成果

頸動脈狭窄症性患者の手術前後の画像、血液及び頸動脈プラークサンプル、対照とする未破裂脳動脈瘤患者の血液サンプルなどから、既に収集したデータを用いて解析を進行した。頸動脈狭窄症性患者は、症候の様式によって、無症候群、症候群、進行性脳卒中群、の3群に群別して解析を行った。

収集した頸動脈プラークに対しては、小胞体ストレス関連抗体 (CD34、CD146、NG2、CD68、GADD153、KDEL、GRP78、CHOP) を用いた免疫染色によって、小胞体ストレス応答の関与機構に関して解析を行った。GRP78 陽性細胞数は、無症候群、症候群、進行性脳卒中群、の順で増加しており、小胞体の分子シャペロンである GRP78 の発現とプラーク不安定性との関連が示唆された。CHOP 陽性細胞数は、無症候群、症候群、進行性脳卒中群、の順で増加しており、小胞体ストレスによるアポトーシスのマーカーである CHOP とプラーク不安定性との関連が示唆された。本研究では、因果関係については結論を出せないが、小胞体ストレスの持続が頸動脈プラークの重症度や不安定性と関連していることを示した。

また、臨床成績からは、進行性脳卒中群の成績は他群よりも優位に不良であり、群内では CEA はよりも CAS の成績が有意に不良であった。この結果は、進行性脳卒中群の治療成績向上のためには、CEA によるプラーク除去が有効なことを示唆した。

これらの頸動脈プラークおよび臨床成績からの所見より、頸動脈で局所的に小胞体ストレスを制御する方法が存在すれば、頸動脈プラークの安定化を図ることが可能となり、外科的治療を含めた総合的な脳卒中予防の治療成績向上が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Imahori Taichiro, Tanaka Kazuhiro, Arai Atsushi, Kohmura Eiji | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Surgical thromboendarterectomy for free-floating thrombus associated with cervical carotid artery dissection: A case report | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Annals of Vascular Surgery | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.avsg.2020.04.076 | 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 Imahori Taichiro, Koyama Junji, Tanaka Kazuhiro, Okamura Yusuke, Arai Atsushi, Iwahashi Hirofumi, Mori Tatsuya, Yokote Akiyoshi, Matsushima Kazushi, Matsui Daisaku, Kobayashi Makoto, Hosoda Kohkichi, Kohmura Eiji | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 Impact of introducing endovascular treatment on acute ischemic stroke outcomes: A shift from an era of medical management to thrombectomy in Japan | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Heliyon | 6. 最初と最後の頁 e03945 ~ e03945 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2020.e03945 | 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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 細田弘吉 |
| 2. 発表標題 小胞体ストレスは頸動脈プラークの不安定性と関連しているのか？ |
| 3. 学会等名 脳神経外科学会総会 |
| 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 |
|---------------------------|-----------------------|----|