

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592102

研究課題名(和文) 頸動脈石灰化含有プラークにおける炎症・石灰化関連遺伝子に関する分子生物学的研究

研究課題名(英文) calcified carotid plaque and inflammation/calcification-related genes

研究代表者

片野 広之 (Katano, Hiroyuki)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30295612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：頸動脈狭窄症18例についてCaスコアにより高・低石灰化粥腫群(平均 587.0 ± 204.0 vs. 61.8 ± 26.9)に分類し、CEAで摘出した粥腫内の遺伝子発現の差異について検討した。血管新生・成長因子関連遺伝子として1)を満たす、175プローブセット・93転写物のうち、2)を満たしたのは、ANGPTL4(発現増強)とFGFR2(発現抑制)であった。両者の蛋白発現はWB解析、免疫染色で確認された。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、高度石灰化頸動脈粥腫における安定性、無症候性を分子生物学的に支持する結果と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Carotid plaques from 18 endarterectomy patients were classified into high- and low-calcified plaques on the basis of Agatston calcium score. Microarray analysis demonstrated 93 angiogenesis or growth factor-related transcripts that are reliably expressed (175 probe sets). Among them, angiopoietin-like protein 4 (ANGPTL4) expression was significantly elevated, whereas fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) expression was significantly suppressed. Quantitative messenger RNA analysis was performed with real-time PCR. Augmented or decreased protein expression of each gene was confirmed by Western blotting analysis and immunohistochemistry. Conclusions: In high-calcified plaques, ANGPTL4 might be upregulated for antiangiogenic modulating function together with the downregulation of FGFR2, contributing to the stability of the plaques.

研究分野：脳神経外科

キーワード：頸動脈狭窄症 頸動脈プラーク 石灰化 網羅的遺伝子発現 マイクロアレイ ANGPTL4 FGFR2

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々はこれまで頸動脈粥腫病変の硬さに注目し、頸動脈狭窄症の治療としての頸動脈内膜剥離術と頸動脈ステント留置術の効果的な選択において、ステントの拡張度を念頭に放射線学的、病理学的検討を行い、石灰化には比較的柔らかな顆粒状と、塊状・層状の病理学的なタイプがあること、術前の MDCTA による評価とくにカルシウムスコアを用いることにより石灰化の質的、量的評価からステント拡張の予測に役立つことなどを報告してきた。この石灰化病変の検討を進める中で、石灰化病変の生成機構や症候との関連についても臨床病理学的、分子生物学的研究を行ってきたが、血管石灰化のメカニズムやその臨床的意義については様々な報告があり未だ多くが解明されていない。

(2) 従来、石灰化は動脈硬化における壊死または apoptosis に陥った組織の終末的形態であり、比較的安定な組織であると考えられており、頸動脈動脈硬化病変においては、不安定プラークとされるのは出血性のものや、いわゆる soft plaque と呼ばれる柔らかな粥腫、可動性のある mobile plaqueなどを指し、石灰化病変は病変として安定しているので、症候を惹起しにくいプラークであると考えられている。頸動脈病変の本邦全国調査である JCAS でも無症候性頸動脈狭窄症における石灰化病変含有率が症候性のものよりも高く、海外でも石灰化率が 45%を超える頸動脈プラークを有する患者は脳卒中の前駆症状や一過性脳虚血症状を起こすリスクが低かったとの報告がある。

(3) 今日、心循環器領域では、冠動脈の石灰化は粥腫内の出血や fibrin cap の菲薄化などとともに、いわゆる不安定プラークの一

要因としてあげられており、石灰化の増加が臨床的イベントの増加と相関するとする種々の報告がなされている。

(4) 同じ動脈硬化病変であり、同時に罹患することの多い頸動脈病変と冠動脈病変でありながら、なぜ石灰化病変については臨床的に逆の状態となるのか、粥腫の状態、遺伝子、蛋白の発現動態なども本当に逆の状態となっているのか。この点を明らかにすべく行った頸動脈内膜剥離術によって摘出した頸動脈プラークに対してマイクロアレイを用いた予備実験では、石灰化の強い頸動脈プラークでは炎症関連遺伝子である NFAT, ADAM, Angpl4 の発現が有意に多く、Angpl7 の発現が抑制傾向にあった。とくに、NFAT は自身で ADAM 同様、atherosclerosis を促進させる他、炎症促進と石灰化双方に関連する osteopontin(OPN) を下流で発現させ、Angpl4 は慢性炎症および脂質代謝促進に働き、粥腫の活動性、熟成に寄与している。従って遺伝子レベルで示唆される如く、頸動脈石灰化病変でも冠動脈と同様に動脈硬化の進んだ状態、炎症の盛んな状態として類似の不安定な状態を内在している可能性があると考えた。また、心循環器系の血管石灰化との関連が示されている RANKL/OPG 系の発現増強がみられず、石灰化誘導に関与する OPN を下流に持つ転写因子である NFAT の発現増強がみられたことから、頸動脈では NFAT が石灰化生成機構での主導的役割を果たしている可能性があると考えた。

2. 研究の目的

(1) 頸動脈石灰化について申請者らの研究を含め、病理学的検討や放射線学的研究がなされ、頸動脈狭窄治療への検討が成されてきた。また、これに先行して心循環器領

域でも冠動脈の石灰化に対する病理学的、放射線学的研究により上述したように冠動脈イベントとの相関を示す臨床的意義が示されてきた。しかし、冠動脈、頸動脈双方の違いに着目しその粥腫の性状、石灰化生成機構を分子生物学的手法により比較検討した報告はこれまでない。

(2) マイクロアレイによる予備実験の結果では、石灰化が不安定プラーク要因に挙げられている冠動脈プラークと同様に、安定していると考えられている頸動脈石灰化病変においても、活動性を示唆する炎症関連遺伝子の発現が確認されており、本研究により頸動脈プラークにおける蛋白レベル、mRNA レベルでの発現を証明することで、石灰化を伴う頸動脈動脈硬化における現状認識とは異なり、活動性、不安定性の点で冠動脈プラークとの相同点を示すことができる可能性がある。

(3) 頸動脈における石灰化の生成機構に関連し、主に冠動脈など心循環器系の研究において血管石灰化との関連が示唆されている RANKL/OPG 系遺伝子の発現がみられず、石灰化を誘導する OPN を下流に持ち炎症との関連も司る転写因子である NFAT の発現増強がみられたことから、上述の点とは別に石灰化生成機構の観点からは、頸動脈と冠動脈での石灰化生成メカニズムでの相違点を明らかにする手がかりとなる可能性がある。

(4) Angiopoietin-like protein family のうち、これまで機能のまだよく解明されていない Angptl7 について、Angptl4 とは逆に発現抑制されていたことから、炎症あるいは血管新生に関連して Angptl4 とは異なった作用が見いだせる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) 対象とする頸動脈プラークは、頸動脈内膜剥離術によって摘出した標本（摘出後ただちに RNA later 処理）を用いた。石灰化含有度の評価は術前 MDCTA での Ca スコアおよび HE で行った。

(2) NFAT, ADAM, Angpl4, FGFR2 の蛋白、mRNA レベルでの発現の検証 (Western blotting, RT-PCR) を行った。Western blotting は SDS-PAGE で分離し、1 次、2 次抗体とインキュベートするスタンダードな方法で行った。

(3) RT-PCR は遺伝子特異的 primer を用いた逆転写により、cDNA を template として PCR 反応を行った。

4. 研究成果

(1) 頸動脈狭窄症 18 例について Ca スコアにより高・低石灰化粥腫群（平均 587.0 ± 204.0 vs. 61.8 ± 26.9 ）に分類し（両群とも症候性 66.7%）、CEA で摘出した粥腫内の遺伝子発現の差異について検討した。Microarray 分析による網羅的遺伝子発現検索、RT-PCR と、WB 解析・免疫染色による蛋白発現検索を行った。高・低石灰化粥腫群の比較で、1) Log2 比が 1 以上で高石灰化群での検出 call 陽性、または Log2 比が -1 以下で低石灰化群での検出 call 陽性、2) 7 セットの両群比較のうち、5 セット以上で 1) を満たすものを有意な発現遺伝子とした。

(2) 血管新生・成長因子関連遺伝子として 1) を満たす、175 プローブセット・93 転写物のうち、2) を満たしたのは、ANGPTL4（発現増強）と FGFR2（発現抑制）であった。両者の蛋白発現は WB 解析、免疫染色で確認された。Microarray 分析により、高度石灰化粥腫における ANGPTL4 の有意な

発現を初めて明らかにした。しかし ANGPTL 4 発現増強は当初の仮説に反し、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、高度石灰化頸動脈粥腫における安定性、無症候性を分子生物学的に支持する結果と考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Katano H, Yamada K. Upregulation of ANGPTL4 messenger RNA and protein in severely calcified carotid plaque. J Stroke Cerebrovasc Dis、査読有、23:933-947, 2014 (DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis. 2013. 07.046)

〔学会発表〕(計 3 件)

片野広之、大沢知士、三浦敏靖、櫻井圭太、西川祐介、間瀬光人、山田和雄。頸動脈狭窄の質的診断と治療方法の選択。第 16 回日本栓子検出と治療学会 (Embolus2013, シンポジウム) 2013 年 10 月 13 日 ウィンクあいち (愛知県名古屋市)

Katano H, Yamada K. Differential gene expression in carotid plaques with calcification. The 81th European Atherosclerosis Society Congress (EAS 2013) 2013 年 6 月 2 日 リヨン (フランス)

片野広之、間瀬光人、西川祐介、山田和雄。高度石灰化頸動脈粥種の種類網羅的遺伝子発現解析。第 42 回日本脳卒中の外科学会 2013 年 3 月 23 日 グランドプリンスホテル新高輪 (東京都)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

片野 広之 (KATANO, Hiroyuki)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号 : 30295612

(2)研究分担者

山田 和雄 (YAMADA, Kazuo)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号 : 90150341