

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860257

研究課題名(和文) 脳動脈瘤の破裂に関連する遺伝子発現制御ネットワークの解明

研究課題名(英文) Gene Expression Profiling Reveals Distinct Molecular Signatures Associated With the Rupture of Intracranial Aneurysm

研究代表者

中岡 博史(Hirofumi, Nakaoka)

国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・特任研究員

研究者番号：70611193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：未破裂および破裂脳動脈瘤の網羅的遺伝子発現解析を行うことで脳動脈瘤破裂と関連する遺伝子を同定を試みた。結果として、破裂脳動脈瘤検体が発症時年齢によって若年と高齢患者で異なる遺伝子発現パターンを示すことを明らかにした。次いで、若年破裂脳動脈瘤が破裂しやすい脳動脈瘤の分子特性を有していると考え、若年破裂と未破裂脳動脈瘤の遺伝子発現量を比較し、有意な差が認められた1,047遺伝子を同定した。これら遺伝子は、マクロファージを介した炎症性反応亢進が脳動脈瘤破裂と関連する分子特性であることを示唆するものであった。本研究で同定した遺伝子群はバイオマーカーや治療標的分子探索に有益な情報をもたらすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We compared gene expression profiles in aneurysmal domes between unruptured and ruptured intracranial aneurysms (UIAs and RIAs, respectively) to elucidate biological mechanisms predisposing to the rupture. By classifying the samples into subgroups showing similar gene expression patterns, we demonstrated RIAs segregated into 2 distinct subgroups (early and late RIAs). Comparing gene expression levels between early RIAs and UIAs, we identified 430 upregulated and 617 downregulated genes in early RIAs. The results suggest that macrophage-mediated inflammation is a key biological pathway for IA rupture. The identified genes can be good candidates for molecular markers of rupture-prone IAs and therapeutic targets.

研究分野：統計遺伝学

キーワード：脳動脈瘤 くも膜下出血 網羅的遺伝子発現解析 炎症 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

脳動脈瘤の破裂は生命の危険を伴う重篤な疾患であるくも膜下出血を起こすため、破裂前診断が予防のために重要となる。我々は国際共同研究による脳動脈瘤ゲノムワイド関連解析(GWAS)により、脳動脈瘤発症に關与する複数の遺伝子座を同定してきた(Yasuno et al. 2010 Nat Genet; Yasuno et al. 2011 PNAS; Akiyama et al. 2010 J Hum Genet)。さらに、脳動脈瘤は、破裂・未破裂、多発性、病変部位や瘤のサイズなどの表現型(subphenotype)が患者の転帰に差異をもたらす疾患であることから、GWASで同定したSNPsが特定のsubphenotypeと強く關連する可能性について検討した。その結果、9p21領域のSNPの効果は、脳動脈瘤の発症部位によって異なり、破裂リスクの高い後交通動脈および後方循環の瘤の形成に強く關連することを明らかにした(Nakaoka et al. 2010 Stroke)。これらは、脳動脈瘤の発症メカニズムという複雑な生命現象の解明に向けた基盤的知見になりうる。しかし、同定したSNPsは脳動脈瘤リスクを1.3倍程度高める効果しかなく、これだけで病態に迫ることはできないと考えられる。

一年あたりの脳動脈瘤破裂リスクは約1%と推定されており、生涯にわたり未破裂のままである可能性も高い。先制医療として適切な治療介入を決定する上で、脳動脈瘤の将来の破裂リスクと關連する分子表現型同定が最重要課題である。本課題では、脳動脈瘤組織について網羅的遺伝子発現解析を行い、破裂脳動脈瘤という表現型を全転写産物の発現量によって精緻な特徴づけることで、脳動脈瘤破裂に關わる遺伝子制御メカニズムを解明する。

2. 研究の目的

破裂脳動脈瘤は未破裂脳動脈瘤と比較して、炎症反応、免疫反応やエピジェネティックな発現制御、細胞接着、細胞外マトリックスや成長調節といったパスウェイに關わる遺伝子発現に異常をきたし、細胞の過剰な増殖が生じている状態にあるとの仮説を検証すべく網羅的遺伝子発現解析を行う。さらに、破裂・未破裂脳動脈瘤の表現型の分子特性を同定することで、脳動脈瘤破裂に關わる遺伝子制御メカニズム解明を試みる。

3. 研究の方法

破裂および未破裂脳動脈瘤の間で発現量に差のある遺伝子プロファイルを同定するために、破裂脳動脈瘤8検体、未破裂脳動脈瘤5検体および浅側頭動脈10検体について網羅的遺伝子発現解析を行う。

脳動脈瘤病変組織を用いた網羅的遺伝子発現解析の有用性は指摘されてきたが、破裂・未破裂脳動脈瘤組織検体は収集が難しいため、網羅的遺伝子発現を比較した報告自体が少ない。しかしながら、これまでの脳動脈

瘤の網羅的遺伝子発現解析においては、破裂を特徴づける遺伝子を多数同定するには至っていない。その原因として、脳動脈瘤が一般的な表現型を持つ疾患ではないことが考えられる。例えば、未破裂脳動脈瘤の中にも将来破裂のリスクの高いものから、生涯未破裂のままである症例もある。本研究では、網羅的遺伝子発現プロファイルを用い、破裂・未破裂脳動脈瘤検体をより均一なサブセットに分類・比較することで、破裂および未破裂脳動脈瘤の遺伝子発現における差異の検出力を高める。具体的には、次元縮小法の一つである非負値行列因子分解法(Brunet et al. PNAS 2004)および階層的クラスター分析を用い、多数の転写産物からなる遺伝子発現データの情報を少数の潜在変数(meta-genes)の情報に落とし込み、類似した遺伝子発現プロファイルをもつ検体をグループ化する。

4. 研究成果

網羅的遺伝子発現プロファイルに対する次元縮小法に基づく統計解析により、破裂脳動脈瘤検体が発症時年齢によって若年と高齢患者で異なる遺伝子発現パターンを示すことを世界に先駆けて明らかにした(Nakaoka et al. 2014 Stroke; 図1)。

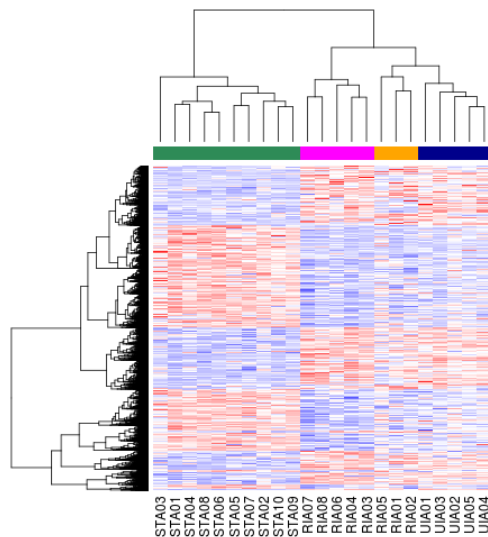


図1. 脳動脈瘤サンプルの網羅的遺伝子発現解析に基づくクラスタリング解析の結果。

STAは浅側頭動脈、RIAは破裂脳動脈瘤、UIAは未破裂脳動脈瘤を表す。

STAおよびUIAはそれぞれ個別のクラスターを形成しているが、RIAは二つのクラスターに分かれている。マゼンタで識別されるクラスターに属するRIAの発症時年齢の平均が46.6歳であったのに対し、オレンジで識別されるRIAの平均年齢は80.7歳であり、両者には有意な差が認められた($P=6.9 \times 10^{-3}$)。このことは、破裂脳動脈瘤検体は発症時年齢によって遺伝子発現パターンが異なることを示唆している。

さらに、若年破裂脳動脈瘤は、破裂しやすい脳動脈瘤の分子的特性を有していると考え、若年破裂と未破裂脳動脈瘤の遺伝子発現量を比較し、有意な差異が認められる 1,047 遺伝子を同定した。同定した遺伝子群は、マクロファージを介した炎症反応亢進が脳動脈瘤破裂と関連する分子特性であることを示唆するものであった(Nakaoka et al. 2014 Stroke; 図2, 3)。

本研究で同定した遺伝子群は、血中バイオマーカーや治療標的分子探索に有益な情報をもたらすと考えられる。破裂脳動脈瘤で顕著な発現減少が認められた、抗炎症に関わる転写因子である KLF ファミリー (KLF2, KLF12, KLF15) に注目している。スタチン投与が KLF の発現上昇を介して血管の炎症や動脈障害を抑制する (Bu et al. 2010 J Clin Invest)、また、脳動脈瘤動物モデルでスタチン投与が瘤増大抑制効果を示す (Aoki et al. 2008 Stroke) という知見から、脳動脈瘤破裂に関連する分子表現型である KLF ファミリー発現低下を、スタチン投与によって補うことで、脳動脈瘤増大抑制が期待でき、ひいては破裂予防効果につながると考えられる。

科学的発見から臨床応用の可能性を検討する上で、これら炎症反応関連遺伝子が破裂脳動脈瘤組織において発現異常を呈する分子メカニズム解明が求められる。

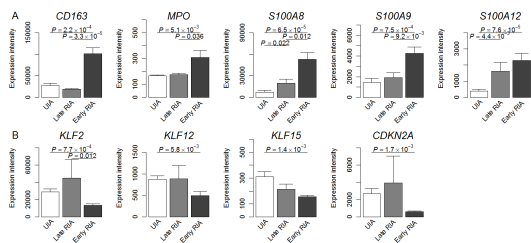


図 2. 破裂・未破裂脳動脈瘤で顕著な発現レベルの差異が認められ、マクロファージを介した炎症反応に関わる遺伝子群の発現プロフィール。

UIA は未破裂脳動脈瘤、Late RIA は高齢破裂脳動脈瘤、Early RIA は若年破裂脳動脈瘤を示す。

CD163 はマクロファージのマーカーであり、破裂動脈瘤において血管へのマクロファージ浸潤が顕著であることを示唆している。

酸化ストレスのマーカーである MPO の増加はマクロファージによる低比重リポタンパクの取り込みによって生じる泡沫細胞蓄積とアテローム形成を示唆している。

S100/calgranulin の上昇はマクロファージのリクルートや血管障害促進と関連することが知られている。

CDKN2A は脳動脈瘤の GWAS で最も強い関連を示した 9p21 領域に存在する。KLF ファミリーについては上述を参照。

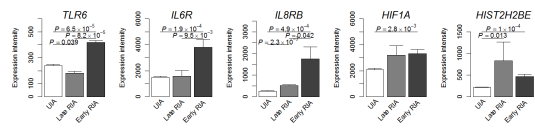


図 3. 破裂・未破裂脳動脈瘤で顕著な発現レベルの差異が認められ、図 2 の遺伝子群と協調的に機能し炎症反応を促進する遺伝子群の発現プロフィール。

<引用文献>

- (1) Yasuno et al. Genome-wide association study of intracranial aneurysm identifies three new risk loci. *Nat Genet.* 2010; 42: 420-425.
- (2) Yasuno et al. Common variant near the endothelin receptor type A (EDNRA) gene is associated with intracranial aneurysm risk. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108: 19707-19712.
- (3) Akiyama et al. Genome-wide association study to identify genetic variants present in Japanese patients harboring intracranial aneurysms. *J Hum Genet.* 2010; 55: 656-661.
- (4) Nakaoka et al. Differential effects of chromosome 9p21 variation on subphenotypes of intracranial aneurysm: site distribution. *Stroke.* 2010; 41: 1593-1598.
- (5) Brunet et al. Metagenes and molecular pattern discovery using matrix factorization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 4164-4169.
- (6) Bu et al. Statin-induced Krüppel-like factor 2 expression in human and mouse T cells reduces inflammatory and pathogenic responses. *J Clin Invest.* 2010; 120:1961-1970.
- (7) Aoki et al. Simvastatin suppresses the progression of experimentally induced cerebral aneurysms in rats. *Stroke.* 2008; 39: 1276-1285.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- (1) Nakaoka H, Inoue I. Distribution of HLA haplotypes across Japanese Archipelago: similarity, difference and admixture. *J Hum Genet.* 2015; in press. (査読有)
- (2) Nakaoka H, Tajima A, Yoneyama T, Hosomichi K, Kasuya H, Mizutani T, Inoue I. Gene expression profiling reveals distinct molecular signatures associated with the rupture of intracranial aneurysm. *Stroke.* 2014; 45: 2239-2245. (査読有) doi: 10.1161/STROKEAHA.114.005851.

(3) 中岡博史、細道一善、光永滋樹、猪子英俊、井ノ上逸朗：HLA 遺伝子多型からみた日本人集団の混合的起源．日本組織適合性学会誌 MHC 2014； 21： 37-44．（査読有）
<http://doi.org/10.12667/mhc.21.37>

〔学会発表〕(計 4 件)

(1)国際学会

Nakaoka H, Gurumurthy A, Hayano T, Hosomichi K, Inoue I. Allele specific chromatin interaction of 9p21 endometriosis risk locus regulates expression of ANRIL. The American Society of Human Genetics 64th Annual Meeting. October 18-22, 2014. San Diego, California, USA.

(2)国内学会

中岡博史、Aishwarya Gurumurthy、早野崇英、細道一善、井ノ上逸朗．アレル特異的クロマチン相互作用を介した子宮内膜症感受性領域の転写制御メカニズム解明．日本人類遺伝学会大 59 回大会．東京．2014 年 11 月 19 日～22 日．

中岡博史、細道一善、井ノ上逸朗．ターゲットリシーケンシングと ENCODE データを用いた子宮内膜症感受性領域のファインマッピングと転写制御メカニズムの解明．日本人類遺伝学会第 58 回大会．仙台．2013 年 11 月 20 日～23 日．

中岡博史、光永滋樹、細道一善、猪子英俊、井ノ上逸朗．HLA 遺伝子多型からみた日本人集団の混合的起源．第 22 回日本組織適合性学会大会．福島．2013 年 9 月 15 日～17 日．

6．研究組織

(1)研究代表者

中岡博史 (NAKAOKA, Hirofumi)

国立遺伝学研究所 総合遺伝研究系

特任研究員

研究者番号：70611193