

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462169

研究課題名(和文) MicroRNAプロファイリングによる頸動脈石灰化粥腫の安定化機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of stability of calcified plaque by miRNA profiling

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

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)：ヒト頸動脈プラークをCaスコアを基準として分類し、miRNA microarray 分析を行った。TGS>50, Log2>1, FDR<0.05 を群・個別比較より抽出、miResearch にて血管新生に関する成長因子と、石灰化生成に関する因子に関わる遺伝子 70 種のうち context score がmedian以上かつ群比較にてFDR<0.1のものを加え、計19miRNA抽出した。qRT-PCRにより検証すると、hsa-miR-4530,133b, 1-3p の有意な発現低下が認められ、target geneとしてANGPTL4によりプラークの安定に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ten plaques removed from carotid endarterectomy patients were classified into high- and low-calcified plaques on the basis of Agatston calcium score. Microarray analysis for miRNA profiles was performed followed by validation with miRNA quantitative real-time (qRT) PCR analysis. Genes which satisfied total gene signal (TGS) >50 and [Log2 ratio <-1 or >1] were selected. Among carefully selected 70 angiogenesis or calcification-related transcripts, reliably expressed miRNAs marking median and high context scores with miSearch and FDR <0.1 by the two-group comparison were also extracted. In high-calcified carotid plaques, specific profile for miRNA may be shown and expression of hsa-miR-4530 and hsa-miR-133b had inverse correlation with calcium score in plaques, suggesting miRNA may play a modulating role in calcification in plaque and plaque stability.

研究分野：脳神経外科

キーワード：carotid plaque calcification microRNA microarray PCR

1. 研究開始当初の背景

(1) 申請者らはこれまで頸動脈粥腫病変の硬さに注目し、頸動脈狭窄症外科治療として頸動脈内膜剥離術と頸動脈ステント留置術の効果的選択のため、放射線学的、病理学的検討を行い、石灰化には病理学的に比較的柔らかな顆粒状と、塊状・層状タイプがあること、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などを報告してきた(Katano et al. Stroke 2007, JSCVD 2012)。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(Niwa, Katano et al. Neurol Res 2004, Osawa, Katano et al. Nagoya MJ 2010) が、冠動脈病変との差異など、血管石灰化の生成機構やその臨床的意義については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。したがって、石灰化プラークの性質を検討して、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と考えた。

(3) 我々は、これまでに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カルシウムスコアで分類し microarray 分析を行い、real-time PCR での mRNA 定量分析により、石灰化プラークでは ANGPTL4 mRNA の発現増強と FGFR2 mRNA 発現抑制が認められることを報告した。(Katano et al. JSCVD 2013) これらは Western blotting, 免疫染色での蛋白レベルでも確認された。ANGPTL4 は VEGF 誘導性の血管新生を抑制する作用があり、FGFR2 抑制とともに血管新生を抑えることにより石灰化プラークの安定性に寄与していると考えられた。つまり、石灰化病変そのものの病理学的安定性ととも、プラークとしての安定性は血管新生の抑制によってもたらされていることが重要であることが示唆された。しかし、本研究において有意発現基準には至らなかったものの、高石灰化プラークでの mRNA 発現量の比較的多かったものの中には、壁細胞の血管内皮細胞近傍への動員に働く PDGFB や FGF, IGFBP などの血管新生を助長すると考えられる成長因子も含まれていた。これらは mRNA 発現はするものの、蛋白発現に至らずプラークが安定性を保ったと考えられることから、mRNA 発現後に何らかの調節機構が働いた可能性が考えられた。

(4) 蛋白質への翻訳が成されない non-coding RNA (ncRNA) が重要な役割を果たしていることに注目が集まってい

るが、この ncRNA の中で、microRNA(miRNA)は、細胞内に存在する 20-25 塩基前後の RNA で、標的 RNA の 3'UTR 内に存在する標的部位に結合することによって遺伝子サイレンシングを誘導し、蛋白質翻訳抑制、または mRNA 分解を介して蛋白質生成を阻害すると考えられている。これにより、miRNA は、脂質代謝、免疫応答、老化、低酸素症、ニューロン新生などの生理学的過程に広く関与し、さらに癌、神経疾患、心疾患など多くの疾患に関わっている可能性が報告されてきている。今回我々は、これまでの結果に基づいて、ヒト頸動脈プラークの動脈硬化進行過程の中で、この miRNA による血管新生と石灰化に関する mRNA 制御、修復が行われることにより、プラークの不安定性、安定性の決定に寄与している可能性があると考え、本研究を企画した。

2. 研究の目的

(1)これまでの研究から、高石灰含有頸動脈プラークにおいて、石灰化病変の病理学的安定性と別に、プラークとしての安定性が血管新生を抑制する遺伝子発現の増強によってもたらされていることが明らかとなったが、これに加えて血管新生促進遺伝子を標的とした蛋白質翻訳・生成抑制によっても安定化が誘導されている可能性が示唆された。

(2) 本研究では、mRNA 分解を介して蛋白質生成を阻害するとされる microRNA(miRNA)により動脈硬化の過程が修飾、調節をうけている可能性を、

ヒト頸動脈で探った。特に、プラーク不安定性に密接に関係する血管新生関連因子・成長因子と、プラーク安定性に関する石灰化生成に関与する RNA の調節制御に関わる miRNA を明らかにすることを主たる目的とした。

(3) これまでの申請者らの研究から、症候を呈することが少なく安定化しているとされる高石灰化含有頸動脈粥腫では、石灰化病変そのものの病理学的安定性と別には別に、プラークとしての安定性が血管新生の抑制によってもたらされていることが示された。これまでの結果で明らかとなった血管新生抑制作用のある ANGPTL4 の直接発現増強による作用の他に、RNA として発現した血管新生促進関連遺伝子に対する miRNA による蛋白質生成抑制制御が安定化に関与している可能性が予想された。

(4) また、病理学的に安定していると考えられる血管石灰化病変の生成促進に関連する BMP (bone morphogenetic protein)や osteopontin 等の遺伝子が、とくに低石灰化プラーク群に含まれる soft plaque や動脈硬化初期～中期の段階では miRNA の発現により抑制されている可能性があり、逆に石灰化促進が粥腫制御のひとつの手掛かりとなる可能性が考えられた。

3. 研究の方法

(1) 頸動脈内膜剥離術で採取したヒト頸動脈プラークをカルシウムスコアを基準として分類し miRNA microarray 分析を

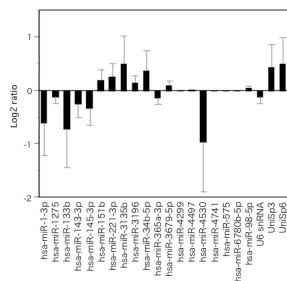
行った。特に不安定性に関係する血管新生に関する成長因子と、安定性に関係する石灰化生成に關与する RNA の調節制御に關わる miRNA を探索した。

(2) miRNA microarray の結果について、qRT-PCR により miRNA の検出、定量を行った。

4. 研究成果

(1) 697 の有意な信号を認めたプローブのうち、657 は downregulation であった。 $|\text{Log}_2 \text{ratio}| > 1$ のものは 423、内 raw TGS > 50 以上のものは 46 であった。このうち、1) 群比較で $\text{FDR} < 0.05$, 2) 群比較で $0.05 \leq \text{FDR} < 0.1$, miRSearch で context score ++ が median/high 3) 個別比較 10 セットで $\text{FDR} < 0.1$ のいずれかを満たすものを 19 miRNA 抽出した

(2) qRT-PCR にて定量確認をしたところ、hsa-miR-4530, hsa-miR-133b, hsa-miR-1-3p が $|\text{Log}_2 \text{ratio}| > 0.58$ であった。Spearman 順位相関分析にて microarray の TGS(log2) と calcium score は逆相関を示した ($\rho = -0.964, -0.927, -0.927$)。前二者は qRT-PCR Cq 値とも順相関した ($\rho = 0.770, 0.812$)。



(3) TargetScanHuman の context score ++ は ANGPTL4 (-0.09), RUNX2 (-0.07)

で、hsa-miR-133b は ANGPTL4 (-0.21), FGFR1 (-0.39), RUNX2 (-0.10) であり、target gene としての ANGPTL4 の血管新生抑制作用について後者の調節関与が強いと考えられた。

(4) miRNA の downregulation により血管新生抑制因子の発現が強まり、安定性に寄与している可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Riyahi-Alam S, Morbiducci U, Ali S, Katano H, Yokoyama K, Molinari F, Audenino A. Preoperative image-based simulation of carotid artery stenting using Finite Element Analysis by considering Agatston score of calcified plaques. Recent Patents and Topics on Imaging、査読有、5:104-111, 2016

〔学会発表〕(計 1 件)

片野 広之、西川 祐介、山田 紘史、間瀬 光人。石灰化粥腫と microRNA 発現。第 46 回日本脳卒中の外科学会 2017 年 3 月 18 日 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)

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