

石灰化プラークのイオン半導体ゲノムシーケンス分析による頸動脈粥腫安定化機序の究明

片野広之

名古屋市立大学大学院医学研究科 脳神経外科 医学医療情報管理学

【研究の背景】

我々は頸動脈粥腫の硬さに注目し、頸動脈内膜剥離術 (CEA) と頸動脈ステント留置術 (CAS) の効果的選択のために Agatston カルシウム (Ca) スコアを算出し放射線学的、病理学的検討を行ってきた¹⁾。また石灰化病変の分子生物学的研究として、CEA 摘出標本を Ca スコアで分類後、microarray, qRT-PCR および Western blotting を行い、石灰化粥腫では VEGF 誘導性血管新生の抑制作用を持つ ANGPTL4 発現増強と FGFR2 抑制が mRNA, 蛋白レベルで認められることを報告した²⁾。石灰化粥腫では石灰化と血管新生に関わる両因子が複雑に安定性を調節している可能性が示された。また、石灰化粥腫の microRNA microarray, qRT-PCR にて miR-4530, 133b, 1-3p の有意な発現抑制と Ca スコアとの有意な逆相関を明らかにした。TargetScanHuman の context score++ より microRNA レベルでも miR-4530, 133b の target gene として ANGPTL4 が増強を示すことで石灰化粥腫の安定制御に関与している可能性を明らかにした³⁾。

【目 的】

上記の結果を踏まえて、本研究では、DNA ゲノム変異によるプラーク安定化の差異の可能性をヒト頸動脈で探り、粥腫安定制御機構をさらに究明し、頸動脈狭窄症の症候化を予防する治療への応用を図ることを目的とした。DNA が伸長する際に放出される水素イオン濃度を半導体チップ上で検出し塩基配列に変換する新型次世代シーケンサー (NGS) である Ion Torrent PGM (Life Technologies) により、数時間のシーケンシングで 100-500 万リードが可能となった。これまで明らかにした転写翻訳に関する粥腫安定化調節機構に加え、安定・不安定プラークにおける DNA 変異の差異、特徴を NGS により明らかにすることで、新たな側面から頸動脈粥腫の安定化機序を解明する研究を企画した。

【方 法】

当初 CEA で採取したヒト頸動脈粥腫を Ca スコアを基準に高・低石灰化群に分類し、特に血管新生関連因子と石灰化生成に関与する DNA に関わるライブラリーを作成し、末梢血および頸動脈凍結組織からゲノム DNA を抽出後、Ion Torrent PGM システムによるターゲットシーケンス、選択的に全エクソームシーケンシングまたは、全ヒトゲノムシーケンスを行い、遺伝子変異の網羅的解析を行うことにより、高・低石灰化粥腫における遺伝子変異の差異を明らかにする計画を立てた。予算、人員の調整により計画を再検討し、まず CEA にて摘出した 10 粥腫について Ca スコアをもとに高・低石灰化 2 群に分けた。核酸を抽出後、全エクソームを濃縮後、シーケンスライブラリーを作成した。品質検定後、NGS は最終的に HiSeq2500 (Illumina) を採用して塩基配列を取得した。情報解析として GATK UnifiedGenotyper によりエクソームターゲット領域上の SNV (SNP), Indel 変異を検出した。dbSNP の HGVD と 1000Genomes Project の ExAC を付与し変異を絞り込み、Snpeff, VCF tools (Annotation Impact) および ClinVar (Pathogenic) を考慮した上で、dbNSFP に記載のミスセンス変異 mutation 影響度予測値として FATHMM score を採用した。

【結 果】

取得した塩基配列は Quality Score 30 以上の塩基が 91.8-94.5%と良好であった。BMA-MEM により UCSC hg19 ヘマッピング(99.6-99.7%)し、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。Genedata Profiler Genome ソフトウェアを用いてゲノム変異解析を行った。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。変異塩基の出現頻度を比較すると、高石灰化粥腫群で FGFR4(c.1162G>A), ABCC6(c.1841T>C; c.1896C>A)の SNP の平均 AF が 1.5-2.1 倍と高かった。

【考 察】

高石灰化粥腫において、全エクソームシーケンスにより血管新生および石灰化に関与する遺伝子の一塩基多型の差異を認めた。今回高石灰化粥腫群で変異頻度差がみられた FGFR4 は、トランスクリプトーム解析と同様、粥腫内の血管新生を抑制することで粥腫安定性に寄与する可能性がある。また、ABCC6(=MRP6)は、GACI(血管への異常石灰化を特徴とする疾患)で少なくとも 13 変異が認められている⁴⁾。これらの変異は MRP6 蛋白の欠失あるいは機能消失をきたし、細胞からの ATP 放出が障害され、pyrophosphate が産生されず Ca が血管その他の組織に沈着する。MRP6 欠乏は通常 mineralization を防ぐ物質輸送も障害し石灰沈着に至ると考えられる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

石灰化を主体とする頸動脈安定プラークにおける DNA 変異の差異、特徴を明らかにした。これらの頸動脈粥腫生成・安定化に関わる遺伝子の動向を把握することにより、粥腫安定制御機構が明らかとなり、今後粥腫の分子生物学的制御を通して、頸動脈狭窄症の症候化を予防する治療への応用が期待される。

【参考・引用文献】

- 1) Katano H, Yamada K. Analysis of calcium in carotid plaques with Agatston scores for appropriate selection of surgical intervention. *Stroke* 38: 3040-3044, 2007
- 2) Katano H, Yamada K. Upregulation of ANGPTL4 messenger RNA and protein in severely calcified carotid plaque. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 23:933-947, 2014
- 3) Katano H, Nishikawa Y, Yamada H, Yamada K, Mase M. Differential expression of microRNAs in severely calcified carotid plaques. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 27:108-117, 2018
- 4) Qiaoli Li1, Jill L. Brodsky, Laura K. Conlin et al. Mutations in the ABCC6 Gene as a Cause of Generalized Arterial Calcification of Infancy: Genotypic Overlap with Pseudoxanthoma Elasticum. *Journal of Investigative Dermatology* 134, 658-665, 2014