

ラマン分光法とリポドミクス解析による 大動脈瘤破裂予測因子の探索

杉山 夏緒里*

Institute for Advanced Research of Biosystem Dynamics,
Waseda Research Institute for Science and Engineering, Waseda University

Kaori SUGIYAMA*

Thoracic aortic aneurysm (TAA) presents a clinically silent yet highly lethal threat, primarily attributed to its propensity for spontaneous rupture and dissection. Despite current imaging-guided management strategies, the lack of reliable pre-rupture indicators necessitates a deeper understanding of TAA's molecular mechanisms. Abnormalities in the extracellular matrix (ECM), particularly involving proteins such as Fibulin-4 (Fbln4) and Fibrillin-1 (FBN1), contribute to TAA development. Leveraging Raman spectroscopy, this study focuses on lipid components to unveil potential rupture predictors. By decoding the molecular signatures of murine TAA aortic tissues, I aim to enhance risk stratification and therapeutic strategies for this life-threatening condition. This research could pave the way for personalized approaches to TAA management, ultimately improving patient outcomes and reducing the incidence of rupture-related fatalities.

1. 背景

胸部大動脈瘤（TAA）は、大動脈径が通常よりも少なくとも 50% 拡張する疾患であり、その発生機序についてはまだ十分に理解されていない。患者は自覚症状が乏しいが、破裂や解離による死亡率が 60% 以上と非常に高いため、早期の発見が重要である。しかし、破裂前の予兆は少なく、根本的な治療法はまだ確立されていない。臨床では、超音波検査や CT 検査で動脈内径の拡張をモニターし、破裂予測径である 5.5 cm 以上の瘤径となると外科的修復を行うが、破裂予測域外での破裂報告例も多数あり、瘤破裂のメカニズム解明が喫緊の課題である。

血管壁には、弾性線維や膠原線維などの複雑な集合構造を持つ細胞外マトリクス（ECM）が存在し、ECM の異常によって大動脈瘤が形成される。弾性線維形成に必要なタンパク質として、Fibulin-4 や Fibrillin-1 (FBN1) があり、平滑筋特異的 Fibulin-4 欠損マウス (*Fbln4*^{SMKO})¹ や Fibrillin-1 遺伝子発現抑制マウス (*Fbn1*^{mgR/mgR})² は大動脈瘤を引き起こす。ただし、*Fbln4*^{SMKO} は瘤を形成するが破裂はせず、*Fbn1*^{mgR/mgR} は瘤が破裂するが、破裂時期が安定しないため、破裂の経時的なメカニズムはまだ不明である。

ラマン分光法は、散乱光を用いて細胞や組織のタンパク質や脂質などの生体分子の骨格構造を非染色・非侵襲的に取得でき、分子構造に基づくクラスタリングやラベルフリーイメージングが可能な光学的手法である。これまでの研究で、*Fbln4*^{SMKO} とヒト大動脈瘤患者の大動脈組織を用いたラベルフリーラマンイメージング法を確立した。そして、多変量スペクトル分解を用いて、弾性線維由来と膠原線維由来の胸部大動脈瘤に特異的なマーカースペクトル成分を同定し、スペクトルに基づく疾患バイオマーカーの概念を提唱した³。この手法を用いて、瘤破裂因子の探索を検討したが、破裂地点を定めたモデルに乏しいため、瘤破裂因子の同定は困難であった。そこで、本研究は、破裂地点を定めたモデルを作製し、ラマンイメージングとリポドミクス解析を用いて、TAA 破裂に関与する因子の同定を目指した解析を行った。

2. 手法

マウス大動脈組織サンプル

1 ヶ月齢の野生型マウス (WT) と *Fbn1*^{mgR/mgR} に、昇圧剤であるアンジオテンシン II (AngII) (投与群) と生理食塩水 (コントロール群) を浸透圧ポンプを用いて持続投与した。投与後 X 地点で大動脈組織を採取し、ラマン測定用

に OCT コンパウンドによる凍結ブロック、質量分析用に凍結組織それぞれのフレッシュフローゼンサンプルを作成した。凍結ブロックは、クライオスタットを用いて薄切切片をスライドガラス上に作成した。

ラマンイメージング測定とその解析

WT と Fbn1^{mgR/mgR} のコントロール群と投与群の大動脈組織切片を PBS で洗浄後、60 倍水浸レンズを用いた共焦点ラマン顕微鏡によるマッピング測定を行った。測定は、532 nm レーザーを用いて、露光時間 0.5 秒、積算 1 回、解像度 2x2 μm で行った。得られたスペクトルの多変量スペクトル分解 (MCR-ALS)⁴ を行い、ラマンイメージを構築した。

リポドミクス解析

WT と Fbn1^{mgR/mgR} のコントロール群と投与群の大動脈バルク組織から MeOH, CHCl₃, H₂O を用いて脂質成分の抽出を行い、LC-MS/MS による測定を行った。その後、ノンターゲットリポドミクス解析⁵を行った。

3. 結果と考察

マウス大動脈組織のラマンイメージングと多変量スペクトル分解を行うことで、弾性線維、細胞核、脂質成分の抽出とラマンイメージの構築を行った (図 A-B)。それぞれのラマンスペクトルには特異的なピークが見られ (図 A)、弾性線維ではタンパク質を示すフェニルアラニン (1007 cm^{-1})、Amide III (1255 cm^{-1}) や、エラスチンの架橋構造に特徴的なデスモシン・イソデスモシン (528 cm^{-1} , 954 cm^{-1}) が見られた。細胞核では、DNA (787 cm^{-1}) や核酸 (1094 cm^{-1}) が見られ、脂質成分では CH₂/CH₃ 変角 (1312 cm^{-1}) と C=O 伸縮 (1748 cm^{-1}) が見られた³。ラマンイメ

ージでは、Fbn1^{mgR/mgR} 投与群、つまり TAA 破裂前において、弾性線維の断裂と脂質成分の増加が見られた。この脂質成分の網羅的探索を行うため、ノンターゲットリポドミクス解析を行ったところ、約 600 分子種の脂質と約 40 種サブクラスの脂質成分を同定することができ、クラスタリング解析を行うことができた (図 C)。

本研究では、TAA 破裂前において脂質成分が増加していることを同定した。横隔膜よりも下部に形成される腹部大動脈瘤 (AAA) ではアラキドン酸の関与が報告されているが⁶、TAA 破裂に脂質成分が関与している報告はこれまでにない。今後はこの脂質の詳細成分の探索や、高解像度で脂質成分の分布の違いなどを同定する。さらに、同定した脂質成分の起源や、この脂質成分を抑制するとどのような効果が得られるかを探索し、病態解明へつなげていきたい。将来的には脂質成分に焦点を当てた破裂直前の非侵襲バイオマーカーの同定を行い、臨床現場で患者救命に貢献したい。

REFERENCES

- 1) J. Huang, *et al.*, *Circ Res*, **106** (2010) 583-592.
- 2) L. Pereira, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96** (1999) 3819-3823.
- 3) K. Sugiyama, *et al.*, *Cell Rep Med*, **2** (2021) 100261.
- 4) M. Ando and H. O. Hamaguchi, *J Biomed Opt*, **19** (2014).
- 5) H. Tsugawa, *et al.*, *Nat Biotechnol*, **38** (2020) 1159-1163.
- 6) K. Allen-Redpath, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **116** (2019) 8038-8047.

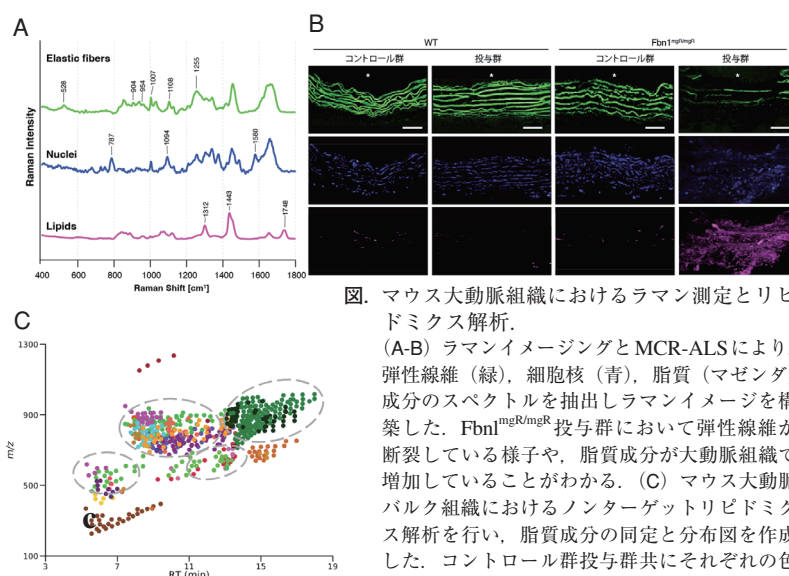


図. マウス大動脈組織におけるラマン測定とリポドミクス解析.
(A-B) ラマンイメージングとMCR-ALSにより、弾性線維 (緑)、細胞核 (青)、脂質 (マゼンダ) 成分のスペクトルを抽出しラマンイメージを構築した。Fbn1^{mgR/mgR} 投与群において弾性線維が断裂している様子や、脂質成分が大動脈組織で増加していることがわかる。(C) マウス大動脈バルク組織におけるノンターゲットリポドミクス解析を行い、脂質成分の同定と分布図を作成した。コントロール群投与群共にそれぞれの色で示す様な脂質成分を同定することができた。