

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09087

研究課題名(和文) -Klothoの冠動脈プラーク組織性状評価における役割と臨床的意義の解明

研究課題名(英文) Investigation for clinical impact of serum Klotho level in tissue characterization of coronary artery plaque

研究代表者

古賀 聖士(KOGA, Seiji)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：00398158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血中可溶性 -Klothoが冠動脈プラークの石灰化量を反映するバイオマーカーになり得るかを調べた。そのために、血清 -Klotho値と血管内超音波で測定したcalcium indexの関係を検討した。その結果、血清 -Klothoとcalcium indexの間には非常に強い逆相関関係があることが判明し、多変量解析で交絡因子の影響を補正しても、血清 -Klothoはcalcium indexの有意な独立予測因子であった。以上から、本研究によって、血清 -Klothoは冠動脈プラーク内の石灰化量を反映する有用なバイオマーカーとして日常臨床に応用可能であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Klotho protein plays a crucial role in calcium/phosphate metabolism. However, physiological significance of serum -Klotho has not yet been elucidated in detail. We analyzed coronary artery calcification in 75 patients with stable angina pectoris who underwent percutaneous coronary intervention following intravascular ultrasound (IVUS). The main outcome measure was the calcium index which was calculated from IVUS-derived total calcium length, lesion length, and maximal calcium arc. Serum -Klotho levels correlated significantly and positively with estimated glomerular filtration rate (eGFR), and negatively with fibroblast growth factor 23 (FGF23) and calcium index. Multivariate regression analysis showed that serum -Klotho was a significant independent factor associated with calcium index. In conclusion, an independent, inverse relationship was observed between serum -Klotho level and coronary calcification in patients with stable angina pectoris.

研究分野：循環器内科

キーワード：石灰化 冠動脈疾患 動脈硬化 血管内イメージング 慢性腎臓病

1. 研究開始当初の背景

-klotho 遺伝子は、血管石灰化などのヒトの多彩な老化症状によく似た表現型を有する遺伝子変異マウスの責任遺伝子として同定され、抗老化遺伝子として報告された。

-Klotho は一回膜貫通型タンパクで、腎臓、副甲状腺などで発現しており、fibroblast growth factor-23 (FGF23) 受容体と複合体を形成することで同受容体への FGF23 に対する親和性を増大させる。その後の解析で、-Klotho はリン代謝、ビタミンD代謝、カルシウム代謝の制御因子であることが明らかにされた。

一方、細胞膜に存在する -Klotho の細胞外ドメインの一部は切断され循環血中に放出される。血中に遊離した -Klotho は、酸化作用や血管内皮機能改善作用を通じて、心血管系に対して保護的に作用している可能性も報告されている。すなわち、膜蛋白としての -Klotho だけでなく、循環血中の可溶性 -Klotho の意義も注目されるようになった。

最近、循環血中の可溶性 -Klotho の血清値測定 ELISA キットが開発され、簡便にその血清値を測定可能となった。しかしながら、その測定値の臨床的意義については未だ不明な点が多く、心血管病、特に冠動脈疾患における意義は明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究は、未だ解明されていない血清 -Klotho 値の冠動脈疾患における意義を、冠動脈プラークの組織性状との関連を通して明らかにし、冠動脈イベントのリスク層別化マーカーとしての臨床応用へ展開するための基盤を確立することが目的である。

具体的には、(1)血清 -Klotho 値と冠動脈プラークの石灰化をはじめとした組織性状との関連の解明、(2)血清 -Klotho 値へ影響を与える患者背景因子や基礎疾患の同定、(3)動脈硬化・石灰化と関連するその他の血液マーカーと比較した血清 -Klotho 値の優位性の証明、の3点を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 対象：冠動脈責任病変に対して経皮的冠動脈インターベンション (percutaneous coronary intervention; PCI) を行った安定狭心症患者 75 人を対象とした。末期腎不全のため透析中の患者は除外した。

(2) 血液サンプルの採取：PCI を行う前に末梢静脈血を採取し、血液一般、生化学、糖脂質代謝、心筋傷害マーカーに加えて、-Klotho、FGF23、intact parathyroid hormone (PTH)、calcium (Ca)、inorganic phosphate (IP)などを測定した。

(3) 冠動脈プラークの性状評価：PCI を行う際に、血管内超音波 (Intravascular ultrasound; IVUS) を用いて冠動脈責任病変プラークを観察し、主に冠動脈プラーク容積の定量、石灰化成分の定量、プラーク内組織成分の定量を行った。IVUS のカテーテルは Opticross (Boston Scientific) を使用し、コンソールは iLab (Boston Scientific) を使用した。石灰化成分の定量には echoPlaque3 (INDEC) を使用し、石灰化の指標として Calcium index (total calcium length/lesion length × maximum calcium arc/360°) を用いた (図 1 に計測の典型例を示す)。プラーク内組織成分の分析には iMap-IVUS software および QIVUS2.1 (Medis medical imaging systems, Inc.) を使用し、Fibrotic、Lipidic、Necrotic、Calcified の4つの組織成分に分類し定量した (図 2 に計測の典型例を示す)。

(4) 主要評価項目：血清 -Klotho 値と calcium index の関連、血清 -Klotho 値と冠動脈プラーク組織成分の関連、血清 -Klotho と腎機能の関連、血清 -Klotho と FGF23、intactPTH、Ca、IP の関連、以上を主な評価項目とした。

(5) 研究デザイン：本研究は単施設、非介入、前向き観察研究である。

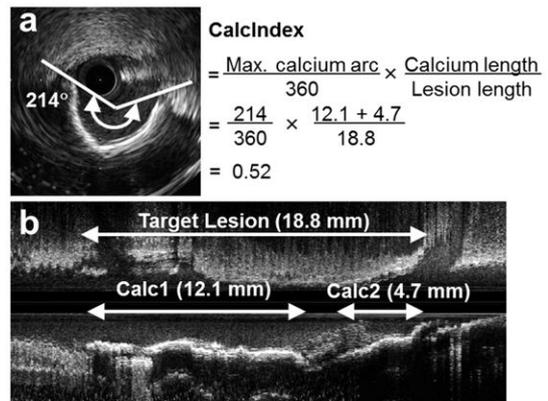


図1. IVUSを用いたCalcium indexの測定例

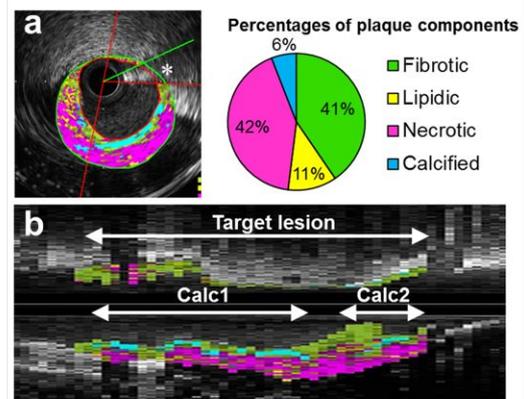


図2. iMap-IVUSを用いたプラーク内組織成分の測定例

4. 研究成果

(1) 患者背景：

対象患者の平均年齢は66歳で、男性は61人(81%)であった。血清 α -Klotho の中央値は460 pg/mLであった。その他の患者背景を表1に示す。

表1. 患者背景

	(n = 75)
Age (y)	66 ± 11
Male	61 (81%)
Hypertension	54 (72%)
Hypercholesterolemia	41 (55%)
Diabetes mellitus	39 (52%)
Current smoker	17 (23%)
Body mass index > 25	23 (31%)
Triglyceride (mg/dL)	101 (79-165)
LDL cholesterol (mg/dL)	100 ± 34
HDL cholesterol (mg/dL)	42 ± 11
HbA1c (%)	6.2 ± 0.7
eGFR (mL/min/1.73 m ²)	66 ± 20
α -Klotho (pg/mL)	460 (367-567)
FGF23 (pg/mL)	46 (37 - 59)

(2) α -Klotho 値による比較：

血清 α -Klotho の中央値460 pg/mLをもとに、460 pg/mL以上の患者を high-Klotho 群(38人)、460 pg/mL未満の患者を low-Klotho 群(37人)に分類した。

この2群間で分類すると、high-Klotho 群と比較して、low-Klotho 群は有意に estimated glomerular filtration rate (eGFR) が低く(55 ± 16 vs. 69 ± 20 mL/min/1.73 m², p < 0.001)、血清 FGF23 値が有意に高く(67 ± 41 vs. 51 ± 24 pg/mL, p = 0.010)、calcium index が有意に高値であった(0.24 ± 0.23 vs. 0.17 ± 0.21, p = 0.043)。%calcified tissue volume (%CV)に有意差はなかった(図3)。

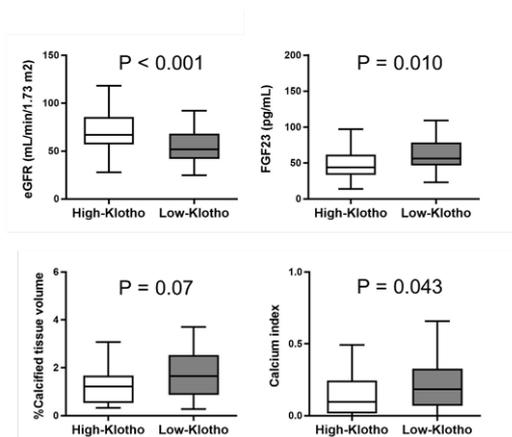


図3. High-Klotho群とLow-Klotho群での比較

(3) α -Klotho と相関する因子：

血清 α -Klotho 値は、eGFR と有意に正相関し(r = 0.30, p = 0.009)、FGF23 (r = -0.24, p = 0.038)、calcium index と有意に逆相関した(r = -0.31, p = 0.006) (表2)。

表2. α -Klotho との相関関係

	Overall (n=75)	
	r	P-value
eGFR	0.30	0.009
Intact PTH	0.06	0.77
cCa	0.14	0.47
IP	-0.31	0.086
FGF23	-0.24	0.038
Vessel volume	0.02	0.88
Lumen volume	0.19	0.18
Plaque volume	-0.04	0.76
%Plaque volume	-0.11	0.46
Calcium index	-0.31	0.006
%FV	0.08	0.60
%LV	-0.06	0.69
%NV	-0.09	0.55
%CV	-0.24	0.053

注目すべきことに、eGFR < 60 mL/min/1.73 m² の患者のみで解析すると、血清 α -Klotho と calcium index の逆相関はさらに強くなり(r = -0.52, p < 0.001)、%CV とも有意な逆相関を示した(r = -0.46, p = 0.006) (表3)。

一方、eGFR ≥ 60 mL/min/1.73 m² の患者のみで解析すると、今まで見られた相関関係は見られなくなった(表3)。

表3. α -Klotho との相関関係 (eGFR 60で分類)

	eGFR<60 (n=35)		eGFR≥60 (n=40)	
	r	P-value	r	P-value
eGFR	0.18	0.32	0.09	0.64
Intact PTH	-0.04	0.89	0.33	0.23
cCa	-0.06	0.83	0.27	0.32
IP	-0.36	0.19	-0.17	0.51
FGF23	-0.35	0.042	-0.13	0.52
Vessel volume	0.07	0.76	0.04	0.85
Lumen volume	0.09	0.70	0.30	0.12
Plaque volume	0.05	0.82	-0.07	0.72
%Plaque volume	0.05	0.83	-0.29	0.12
Calcium index	-0.52	0.001	-0.13	0.41
%FV	-0.02	0.95	0.19	0.32
%LV	-0.09	0.69	-0.05	0.79
%NV	0.05	0.84	-0.23	0.23
%CV	-0.46	0.006	0.23	0.24

FV; fibrotic volume. LV; lipidic volume. NV; necrotic volume. CV; calcified volume.

(4) α -Klotho による石灰化成分の予測：

今までの解析結果から、血清 α -Klotho 値は冠動脈プラークの石灰化成分と相関していることが明らかになった。

そこで、血清 α -Klotho が石灰化成分の独立した予測因子であるかを検討するために、calcium index および%CV を目的変数として重回帰分析を行った。

Calcium index の予測：

目的変数を calcium index、説明変数を α -Klotho、年齢、性別、高血圧、高コレステロール、糖尿病、eGFR、FGF23 として、重回帰分析を行った。その結果、 α -Klotho 値は calcium index の独立した予測因子であった (standardized coefficient $\beta = -0.45$, $p = 0.047$) (表 4)。

表4. Calcium indexを目的変数とした重回帰分析

	Calcium index	
	Std β	P-value
Age	-0.35	0.88
Sex (Male)	0.04	0.87
Hypertension	0.16	0.47
Hypercholesterolemia	0.10	0.66
Diabetes Mellitus	-0.15	0.50
Body mass index	0.04	0.86
eGFR	-0.03	0.90
FGF23	0.25	0.28
α -Klotho	-0.45	0.047

Std β , standardized coefficient β .

%CV の予測：

目的変数を%CV、説明変数を α -Klotho、年齢、性別、高血圧、高コレステロール、糖尿病、eGFR、FGF23 として、重回帰分析を行った。その結果、 α -Klotho 値は%CV の独立した予測因子であった (standardized coefficient $\beta = -0.49$, $p = 0.027$) (表 5)。

表5. %calcified tissue volume (%CV)を目的変数とした重回帰分析

	%CV	
	Std β	P-value
Age	0.20	0.34
Sex (Male)	0.32	0.12
Hypertension	0.10	0.63
Hypercholesterolemia	0.14	0.55
Diabetes Mellitus	-0.34	0.09
Body mass index	0.30	0.15
eGFR	-0.36	0.083
FGF23	0.20	0.38
α -Klotho	-0.49	0.027

Std β , standardized coefficient β .

(5) 考察：

本研究によって明らかとなったことを以下にまとめる。

血清 α -Klotho が低値であるほど、eGFR が低く、血清 FGF23 値が高く、calcium index が高値を示した。

これらの関係は、eGFR < 60 mL/min/1.73 m² の患者ではより強く認められたが、eGFR \geq 60 mL/min/1.73 m² の患者のみでは認められなかった。

多変量解析の結果、血清 α -Klotho 値は calcium index および%CV の独立した予測因子であった。

以上より、血清 α -Klotho は、PCI を行う冠動脈責任病変プラークの石灰化成分量を予測するバイオマーカーになりうるということが明らかになった。

これまでの臨床研究の結果から、冠動脈石灰化量が多いほど冠動脈疾患患者の予後は不良であることが知られている。また、高度石灰化病変に対する PCI は非常に難易度および危険性が高く、バルーンやステントの通過困難、拡張不良、冠動脈破裂、血栓症などを生じやすいことも知られている。

よって、血清 α -Klotho の測定によって冠動脈石灰化量を予測できるようになれば、冠動脈疾患患者の心血管イベント発生リスクの層別化マーカーとしてだけでなく、PCI の合併症リスク予測マーカーとしても応用可能である可能性がある。

したがって、今後の検討課題としては、血清 α -Klotho と冠動脈疾患患者の予後や、PCI の成功率や合併症発生率との関連を検討するための前向き観察研究を計画する必要がある。

一方、血清 α -Klotho が、冠動脈責任病変プラークの石灰化のみを反映しているかも今後の検討課題である。本研究では、頸動脈、大動脈、下肢末梢動脈などの冠動脈以外の血管石灰化に関しては検討できていない。さらに、全身の動脈硬化を反映しうるかについても明らかになっていない。

このためには、頸動脈エコー、血管エコー、全身 CT 検査、脈波伝播速度 (pulse wave velocity ; PWV)、足関節上腕血圧比 (ankle brachial pressure index ; ABI) などの血管機能検査なども利用した観察研究を計画する必要がある。

また、今回は除外基準とした末期腎不全患者、透析患者についても検討が必要である。

今後、さらに症例数を増やし、かつ前向きに患者を追跡調査していき、最終的には多施設共同研究の形で研究を積み重ねることで、血清 α -Klotho が冠動脈疾患のリスク管理に大きく寄与し、臨床的に有用な指標となることが証明されることが期待される。

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 6 件)

1. Yamagata Y, Ikeda S, Nakata T, Yonekura T, Koga S, Muroya T, Koide Y, Kawano H, Maemura K. Balloon pulmonary angioplasty is effective for treating peripheral-type chronic thromboembolic pulmonary hypertension in elderly patients. *Geriatr Gerontol Int*. 2018;18(5):678-684. (査読あり)
2. Yoshida T, Kawano H, Hayashi T, Abe K, Doi Y, Fukae S, Koga S, Ikeda S, Maemura K. Expression of plakoglobin in the myocardium was reduced in an elderly patient with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Geriatr Gerontol Int*. 2017;17(7):1132-1133. (査読あり)
3. Miura M, Kawano H, Yoshida T, Yamagata Y, Nakata T, Koga S, Ikeda S, Kageyama K, Abe K, Maemura K. The Histological Features of a Myocardial Biopsy Specimen in a Patient in the Acute Phase of Reversible Catecholamine-induced Cardiomyopathy due to Pheochromocytoma. *Intern Med*. 2017;56(6):665-671. (査読あり)
4. Koga S, Ikeda S, Nakata T, Kawano H, Abe K, Maemura K. Diverse Findings in Calcified Thrombus Between Histopathology and In Vivo Imaging Including Intravascular Ultrasound, Optical Coherence Tomography, and Angioscopy. *Int Heart J*. 2015;56(6):661-663. (査読あり)
5. Koga S, Ikeda S, Miura M, Yoshida T, Nakata T, Koide Y, Kawano H, Maemura K. iMap-Intravascular Ultrasound Radiofrequency Signal Analysis Reflects Plaque Components of Optical Coherence Tomography-Derived Thin-Cap Fibroatheroma. *Circ J*. 2015;79(10):2231-7. (査読あり)
6. Nakata T, Ikeda S, Koga S, Yoshida T, Koide Y, Kawano H, Maemura K, Kohno S. Impact of Catheter Sheath Insertion into the Radial Artery on Vascular Endothelial Function Assessed by Reactive Hyperemia Peripheral Arterial Tonometry. *Int Heart J*. 2015;56(5):489-494. (査読あり)

[学会発表](計 6 件)

1. Koga S, Ikeda S, Akashi R, Yonekura T, Muroya T, Koide Y, Kawano H, Maemura K. Lower Serum Klotho Levels are Associated with Greater Calcified Components in Coronary Culprit Lesions Determined by

iMap-intravascular Ultrasound. 第 82 回日本循環器学会学術集会. 大阪市. 2018 年 3 月 25 日発表.

2. 古賀聖士、池田聡司、室屋隆弘、小出優史、河野浩章、前村浩二. 血清 α -Klotho 値と冠動脈プラークの組織性状の関連: 血管内超音波を用いた検討. 第 47 回日本心臓血管作動物質学会. 長崎市. 2018 年 2 月 9 日発表.
3. Koga S, Ikeda S, Nakata T, Katayama T, Koide Y, Kawano H, Maemura K. Lower serum Klotho levels are associated with increased calcified components in coronary culprit lesions determined by iMap-intravascular ultrasound. ESC congress 2016. Rome, Italy. 2016 年 8 月 30 日発表.
4. Koga S, Ikeda S, Nakata T, Katayama T, Koide Y, Kawano H, Maemura K. Prediction of periprocedural myocardial infarction following percutaneous coronary intervention by multimodal imaging of gray-scale, iMap-intravascular ultrasound, and optical coherence tomography. ESC congress 2016. Rome, Italy. 2016 年 8 月 28 日発表.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古賀 聖士 (KOGA, Seiji)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号: 00398158

(2) 研究分担者

前村 浩二 (MAEMURA, Koji)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号: 90282649

池田 聡司 (IKEDA, Satoshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師

研究者番号: 10336159