

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07089

研究課題名(和文)末梢動脈疾患における新規動脈硬化マーカーの確立

研究課題名(英文)Development of a new strategy for diagnosing of peripheral artery disease

研究代表者

神田 大輔(KANDA, DAISUKE)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：00781361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、活性化マクロファージ(M ϕ)に特異的に発現する葉酸レセプター(FR β)に関連した血清可溶性FR β 濃度測定を、PADの重症度診断、合併症有病率の評価や予後予測因子として応用することを目的とし、可溶性FR β 血中濃度測定によるPAD重症度診断における臨床的意義の検討を行った。しかし、PAD患者より採取した血清と、PADを有さない対象群から得た血清各々において可溶性FR β を測定したところ、PAD群で高値の傾向を示したものの有意差を得られなかった。これは変動が大きく、また検体数が現時点において予定より少なかったことが影響したと考察している。

研究成果の概要(英文)：Recently, the number of peripheral artery disease (PAD) is increasing dramatically. Since PAD is characterized by severe and poor prognosis, it is crucial to develop a new simple strategy to diagnose PAD by using blood sample. Recently, we demonstrated that folic acid receptor be-ta (FR be-ta) is upregulated in the activated macrophage and is related to atherosclerosis. Therefore, we hypothesized that measurement of soluble FR be-ta is useful to diagnose PAD. We measured serum soluble FR be-ta concentration and compare tis level between patients with and without PAD. Unfortunately, due to the shortage of the number of cases, we cannot obtained the significant difference.

研究分野：動脈硬化

キーワード：動脈硬化 末梢動脈疾患 活性化マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

(1) 老化と末梢動脈疾患(PAD)について

加齢は動脈硬化の危険因子であり、加齢に伴い動脈硬化が進展し心血管疾患発症が増大する。間歇性跛行などの症状を呈する末梢動脈疾患(Peripheral Arterial Disease: PAD)は下肢の動脈硬化により下肢が虚血状態となる動脈硬化性疾患である。PAD患者数は加齢とともに増加しておし、高齢化が進む本邦では約100万人の症候性患者が存在し、さらに無症候性の潜在罹患患者は300万から400万人にも上ると言われている。

(2) PADや重症虚血肢(CLI)とその予後について

PAD患者の約40%以上に心・脳血管障害が合併しており(REACH Registry. Circ J. 71:995-1003)かつPAD患者の死因の60%以上を占め、PADの5年生存率は癌の場合に匹敵すると言われている(J Vasc Surg. 52:110-117. 2010)。それ故、PAD診療においては下肢病変のみならず心・脳血管の複数病変の潜在を念頭に合併症検索を進める必要がある。またPADがより重症化すると、重篤な血流障害により安静時の下肢疼痛や皮膚潰瘍・組織の壊死が引き起こされる重症虚血肢(Critical Limb Ischemia: CLI)となる。一度CLIとなると、カテーテル治療やバイパス手術による血行再建治療を行っても救済しえずに下肢切断を余儀なくされることや、下肢の潰瘍・壊死部から重篤な感染症を生じる。このようにPADは予後不良な加齢性動脈硬化性疾患であり、速やかに本疾患と合併症の存在を包括的に検出し早期治療介入を行っていく必要がある。

(3) PAD・CLIの検索手段について

PAD・CLIを臨床的に評価する手段として一般的には足関節上腕血圧比(Ankle brachial pressure index: ABI)が用いられ、0.9以下であるとPADの可能性があるとされている。しかし、人工透析患者では低値を呈しにくい場合がある。また、CLIはPADが進行・重症化した病態ではあるものの、間歇性跛行の自覚症状が先行することなく、安静時疼痛や皮膚潰瘍・壊死というCLIの状態になって初めてPAD疾患の存在が明らかとなる場合が少なくないことから、PAD・CLIの検出やCLI化の予測が包括的に行えるような手段を確立していく重要性が挙げられる。

(4) 葉酸レセプター(FR)と動脈硬化・不安定プラークについて

酸化型葉酸をリガンドとする葉酸レセプターには、 $\text{CD}147$ 、 $\text{CD}147$ 、 $\text{CD}147$ の4つが存在する。単球や生理的組織Mには発現しておらずTNF- α や活性酸素を産生する活性化マクロファージ(M ϕ)のみに発現している葉酸レセプター(FR)は、活性化M ϕ の新しいマーカーとして注目されている(Blood.

2009;113:438-46)。一方、血管において活性化M ϕ は酸化LDLを取り込み泡沫化することで動脈硬化を形成する。この活性化M ϕ はTNF- α などのサイトカイン分泌から動脈硬化プラーク病変形成の促進やプラークの不安定化を来し、プラーク破綻に關与している。我々は、ヒト及びアポ蛋白E欠損マウスの動脈硬化病変において抗FR抗体で標識される活性化M ϕ が不安定プラークに存在することを明らかにした(J Am Heart Assoc. 2012;1:e003079)。また、スタンフォード大学との共同研究で、抗FRモノクローナル抗体蛍光による分子イメージングにより動脈硬化病変部位に蛍光発色が存在することを確認した。

FRはGPIアンカー蛋白であり、M ϕ の活性化に伴い可溶型が存在する。我々は抗FRモノクローナル抗体を用いサンドイッチELISA測定法にて血清の可溶性FR濃度を測定する方法を既に確立し、正常コントロールと比較し大動脈瘤患者でFR濃度が上昇していることを確認している。

(5) 作業仮説

以上のような学術的背景を踏まえ、PADの存在や重症度、そして併存する動脈硬化性合併症に伴い血清可溶性FR濃度が上昇する可能性を考え、ヒト血清可溶性FR濃度がPAD診療において、その重症度診断、合併症有病率の評価や予後予測因子という包括的に評価しえるマーカーとして有用なツールとなりえるのではないかという仮説を立てるに至った。

2. 研究の目的

上記仮説を立証し、活性化マクロファージ(M ϕ)に特異的に発現する葉酸レセプター(FR)に關連した血清可溶性FR濃度測定を、PADの重症度診断、合併症有病率の評価や予後予測因子として応用することである。

3. 研究の方法

(1) 可溶性FR血中濃度測定のパッド重症度診断における臨床的意義の検討

(A): 鹿児島大学病院を受診したPAD患者の診断および重症度を以下の方法にて評価する

・下肢動脈エコーおよび下肢動脈造影検査(カテーテルもしくは造影CT):

下肢動脈における狭窄病変の検出、狭窄や閉塞長の評価を行う。

・足関節上腕血圧比(Ankle brachial pressure index: ABI)値の測定による、PADの診断および重症度の評価を行う。

・皮膚還流圧(skin perfusion pressure: SPP)値の測定や、視診上皮膚潰瘍の有無を検索し、

PAD の診断、重症度の評価や重症虚血肢 (Critical Limb Ischemia : CLI) の有無を評価

(一般的に、CLI では ABI は 0.4 未満、足関節血圧は 50 ~ 70mmHg 以下、SPP は 30mmHg 以下とされる)

(B): 上記患者から採血にて血液サンプルを採取。血清分離したのち、抗 FR モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 測定法にて血清中の可溶性 FR 濃度を測定する。

(C):(A)で得られた PAD の有無・重症度と、(B)で得られた血清中の可溶性 FR 濃度との間における関連をロジスティック統計解析を用いて検討する。

(D):(B)で得られた血清サンプルを用いて、他の従来使用されてきた下記マーカーを、ELISA 方にて測定する。

[測定項目]

血清高感度 CRP : 血管炎症の評価。動脈硬化プラークの形成およびその不安定化には血管の炎症が関与することが報告されており、そのマーカーとして高感度 CRP が用いられている。

MDA-LDL : 酸化ストレスの評価。酸化ストレスは Low Density Lipoprotein (LDL)の酸化を来し、酸化された LDL は血管内皮細胞内にとりこまれ、活性化マクロファージ (M) に貪食されることで、プラークが形成される。

可溶性 LOX-1 : 酸化 LDL が血管内皮細胞内に取り込まれる際は、LOX-1 受容体を介して行われる。この LOX1 は可溶性成分が血中に存在しており、ELISA 法にて測定することができる。

これら、従来動脈硬化における採血マーカーとして活用されている 3 項目においても、上記 (A) との関連をロジスティック統計解析を用いて検討する。さらに、FR における検討 (C) 結果と比較し、FR が他の採血項目 (高感度 CRP、MDA-LDL および可溶性 LOX-1) より鋭敏に PAD の診断・重症度を反映することを、多変量解析による検討にて明らかにする。

(2) 可溶性 FR 血中濃度測定のパッド患者における心・脳血管疾患合併症評価としての臨床的意義の検討

(E): 上記 (A) で診察・検査を行った鹿児島大学病院を受診した PAD 患者において、下記の方法にて心・脳血管疾患合併症の評価を行う

・冠動脈造影検査 (カテーテルによる冠動脈造影もしくは冠動脈造影 CT) による、冠動脈動脈硬化病変の有無の評価を行う。

・頭部 MRA を用いて脳血管病変の有無の評価を行う。

(F):(E)で得られた PAD の心・脳血管合併症の有無と、(B)で得られた血清中の可溶性 FR 濃度との間における関連をロジスティック統計解析を用いて検討する。

(3) 可溶性 FR 血中濃度測定のパッドにおける予後予測因子としての臨床的意義の検討

(G) 本研究の対象患者を、初診時から 3 か月後、6 か月後、12 か月後、18 か月後、24 か月後の 5 ポイントにおいて下記を評価する

・下肢動脈エコーによる、動脈内狭窄病変の評価、再狭窄や新規病変出現の有無の評価を行う。

・ABI 値の測定による、PAD の経過 (悪化の有無) 評価を行う。

・皮膚還流圧 (SPP) 値の測定と視診による皮膚潰瘍の出現の有無検索による、PAD の経過評価 (悪化の有無) および CLI 化の評価を行う。

・再入院の有無や、生存の有無、およびこれらイベントの原因疾患を把握し、予後評価する。

・これら、PAD の経過および予後と、初診時血中 FR 濃度との関連を検討し、FR が PAD の予後推定因子となることを明らかにする。

4 . 研究の成果

(1) 可溶性 FR 血中濃度測定のパッド重症度診断における臨床的意義の検討。

PAD 患者より採取した血清と、PAD を有さない対象群から得た血清各々において可溶性 FR を測定したところ、PAD 群で高値の傾向を示したものの有意差を得られなかった。これは変動が大きく、また検体数が現時点において予定より少なかったことが影響したと考察している。今後引き続き症例を集め、さらなる検討、解析を行っていく予定である。

(2) 可溶性 FR 血中濃度測定のパッド患者における心・脳血管疾患合併症評価としての臨床的意義の検討。

PAD のみ有している患者数が少なく、多くの PAD 症例が心・脳血管疾患合併を有していたことから、合併症あり・なしの両群間比較検討が施行できなかった。

(3) 可溶性 FR 血中濃度測定のパッドにおける予後予測因子としての臨床的意義の検討。

この件に関しては、2 年間の研究期間では十分な症例数を得るまでには至らなかったが、現在でも PAD 症例を継続的に集めているところであり、平行して本検討も継続している。

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〕なし

〔学会発表〕(計5件)

- (1) **神田大輔**. 第9回日本下肢救済・足病学会学術集会. 2017年5月, 会場名 福岡県福岡市, 重症虚血肢膝下動脈病変に対する薬剤溶出性冠動脈ステント留置が長期的に有効であった高齢者1症例.
- (2) **神田大輔**. 第81回日本循環器学会学術集会. 2017年3月, 会場名 石川県金沢市, ACE inhibitor, not ARB, has preventive effect on worsening renal function in late phase after PCI in patient with statin.
- (3) **神田大輔**. 第81回日本循環器学会学術集会. 2017年3月, 会場名 石川県金沢市, The association between the level of low-density lipoprotein cholesterol at baseline and cardiovascular events after percutaneous coronary intervention.
- (4) **神田大輔**. 第25回日本心血管インターベンション治療学会学術集会, 2015年4月 2017年7月, 会場名 京都府京都市, スタチン服用下にPCIを施行した2型糖尿病患者におけるNon HDLコレステロールが再血行再建に及ぼす影響.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神田 大輔 (KANDA DAISUKE)

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

特任助教

研究者番号: 00781361