

令和元年6月11日現在

機関番号：32309

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08932

研究課題名(和文) 動脈硬化病変におけるS100A13の発現機序と動脈硬化スクリーニング検査の構築

研究課題名(英文) Construction of arteriosclerosis screening test of S100A13 and expression mechanism in arteriosclerotic lesion

研究代表者

長田 誠 (Makoto, Osada)

群馬パーズ大学・保健科学部・教授

研究者番号：20569628

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)：本研究では、血中S100A13濃度が動脈硬化マーカーとなりうるか探るとともに、アテローム性動脈硬化病変の平滑筋細胞表面にS100A13が発現する機序について検討した。ヒト血中S100A13濃度は、健常者群に比べ動脈硬化症群で有意に高値となることから、動脈硬化のマーカーとなり得ることが示唆された。また、健常者群に比べ腎機能低下群で有意に高値となることから、腎機能低下のマーカーとしての有用性も示唆された。

血管平滑筋細胞におけるS100A13の発現機序に関しての検討が十分ではなかったが、S100A13の新規臨床項目としての応用が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動脈硬化によるプラークが破裂すると、血小板が活性化して血栓を形成し、心筋梗塞、脳梗塞等の動脈血栓症となる。癌に次ぐ日本人の死因である動脈血栓症の治療・予防は重要な課題である。血液検査により動脈硬化を客観的に測定する指標は存在しない。早期動脈硬化病変の血管平滑筋細胞にS100A13が発現しており、血小板のCLEC-2が結合することで血栓形成が促進される。この際血管平滑筋表面のS100A13が血中に遊離するため、血中S100A13が動脈硬化の指標となり得ると考えた。ヒト血中S100A13濃度は、動脈硬化症群で有意に高値となったため、動脈硬化の客観的な指標となると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated whether S100A13 in serum could be an atherosclerotic marker and also tried to clarify the mechanism of S100A13 expression on the surface of smooth muscle cell at atherosclerotic lesion. The serum concentration of S100A13 obtained from atherosclerotic patients was significantly higher than that from healthy volunteers. This result indicates that serum S100A13 can be a marker for atherosclerosis. In addition, serum S100A13 is significantly increased in patients with renal impairment compared with that in normal subjects, suggesting that the measurement of serum S100A13 may be useful for the estimation of the renal function.

Although the mechanism of S100A13 expression in vascular smooth muscle cells has not been studied sufficiently, serum S100A13 may be a useful and novel marker in the patients with vascular diseases.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：S100A13 CLEC-2 血管平滑筋 動脈硬化 血小板活性化 ELISA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

動脈硬化によるアテローム性プラークが破裂すると、露出した内皮下組織のコラーゲンに粘着した血小板が活性化して血栓を形成し、心筋梗塞、脳梗塞等の動脈血栓症となる。癌に次ぐ日本人の死因である動脈血栓症の治療・予防は重要な課題である。動脈硬化の指標となる検査項目は、頸動脈エコーによる内膜中膜複合体厚や ABI 検査 (足関節上腕血圧比) があるが、血液検査による血管プラークや動脈硬化を客観的に測定する指標は存在しない。我々は、早期アテローム性動脈硬化病変の血管平滑筋細胞に血小板受容体 C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2) が結合することを見いだした。また、このリガンドは Protein Array の結果、2 つの EF-hand を持つカルシウム結合タンパク質の S100A13 であることを見いだした (Plos One 2015)。

S100A13 は、アテローム性動脈硬化症の内腔面の血管平滑筋細胞表面に発現しており、マウスのアテローム性動脈硬化病変の免疫染色において CLEC-2 リコンビナント抗原と S100A13 は同一部位に染色された。このことから血管平滑筋を主体とする動脈硬化病変であるプラークびらんやステント留置後に血管平滑筋が血流に晒される場合、細胞表面の S100A13 と CLEC-2 の結合により血小板が活性化され、血栓形成が促進されると考えられる。また、この際血管平滑筋表面の S100A13 が血中に遊離すること考えられることから、動脈硬化病変患者の血中 S100A13 を測定することで、動脈硬化の状態を客観的に検査することが出来ると考えられる。

生体内での S100A13 は、正常な動脈血管平滑筋細胞表面には発現していないが、アテローム性動脈硬化病変の平滑筋細胞表面には発現している。S100A13 の細胞表面への発現は酸化ストレス等で発現するがその機序は明らかではない。血管平滑筋細胞にいろいろな刺激を行い、その時の S100A13 の mRNA 発現量と免疫組織染色による細胞内の S100A13 の分布を検索し、S100A13 の発現機序を検討する。また、活性化血小板上清が血管平滑筋細胞、血管内皮細胞に与える影響を検討し、動脈硬化が促進する変化を確認する。

### 2. 研究の目的

我々は血小板活性化受容体 CLEC-2 を同定し、その生体内リガンドがポドプラニンという膜蛋白であると報告した。癌細胞に発現するポドプラニンは CLEC-2 と結合して血行性転移を促進するが、正常な血管壁には発現しない。最近我々は、平滑筋細胞質に発現する S100A13 が CLEC-2 リガンドであると報告した。動脈硬化病変では、血管内腔に露出した血管平滑筋細胞表面に S100A13 が発現する。これより CLEC-2 と S100A13 の結合が、血流に血管平滑筋細胞が晒されるプラークびらんやステント血栓症を促進すると考えられた。動脈硬化を直接評価できる検査は頸動脈エコーのみであるが、術者の技量に依存し、再現性に乏しい。S100A13 は動脈硬化巣で血流に接する部分に露出し、細胞にストレスを加えると培養上清中に放出されることから、動脈硬化マーカーになりうると思った。本課題で血中 S100A13 が、簡便で、再現性の高い動脈硬化マーカーとなるか検討する。また、S100A13 の平滑筋細胞表面への発現機序と血小板が活性化することによる血管平滑筋細胞、血管内皮細胞の変化を検討する。

### 3. 研究の方法

正常マウスと ApoE<sup>-/-</sup>マウスの血清中の S100A13 を市販の ELISA 法にて検出し、血中 S100A13 が動脈硬化のスクリーニング検査として用いることができるか確認する。また、心筋梗塞、脳梗塞患者、糖尿病患者の血清を用いて血中ヒト S100A13 を市販の ELISA 法にて測定し、動脈硬化患者のスクリーニング検査としての有用性を検討する

#### (1) S100A13 の平滑筋細胞表面への発現機序

S100A13 は、正常な平滑筋細胞の細胞質に存在し、細胞表面には発現していない。細胞表面

への発現は、過酸化水素などの種々の刺激を行い、S100A13 の mRNA 発現を検討すると共に、発現機序について検討する。

#### (2) 血小板の活性化による血管平滑筋細胞、血管内皮細胞の変化

コラーゲンにて刺激した血小板を高速遠心し、活性化血小板上清を作製する。血管平滑筋細胞や血管内皮細胞と共存させ、それぞれの細胞に与える影響を検討する。マイクロアレイにて mRNA の発現を検討すると共に、それぞれの細胞の遊走、増殖の変化を検討する。

#### 4. 研究成果

R&D社とPikokine社のS100A13測定キットを用いて、通常食野生型マウス、高脂肪食ApoE欠損マウス（動脈硬化モデルマウス）の血清S100A13濃度を測定した。しかしながら正常マウスと比べて著明なS100A13濃度の上昇は認められなかった。血清の希釈系列の測定やS100A13のスタンダード用リコンビナントを使ったスパイク試験を行った結果、マウス血清S100A13の測定は困難であるとの結論に達した。

ヒト血中S100A13測定を行うにあたり、EDTA血漿と血清を用いて検討したところ、血清検体が適切であり、EDTA血漿は不適であった。また、冷蔵保管の期間が長いほどS100A13値が高値になることが認められたため、検体を数日以内に回収し、-80℃で保存した。

動脈硬化進展のマーカーとして S100A13 が有用か検討するために、健常者（20 名）、動脈硬化症群（頸動脈エコー検査で頸動脈血管壁 1mm 以上 64 名）、高脂血症群（30 名）の血中 S100A13 濃度（R&D 社）を測定した。その結果、それぞれの平均値は健常者群：74.7 pg/mL、動脈硬化症群：129.4 pg/mL、高脂血症群：122.0 pg/mL であった。統計解析により、健常者群 - 動脈硬化症群、健常者群 - 高脂血症群の p 値はそれぞれ 0.014、0.080 であり、S100A13 濃度が健常者群に比べ動脈硬化症群で有意に高値となった。

動脈硬化の他にも血中 S100A13 濃度が上昇する疾患がないかスクリーニングを行った。S100A13 は正常組織では子宮や甲状腺に強い発現が認められることが知られていることから、子宮頸がん、子宮体がん、子宮内膜症等の婦人科疾患と甲状腺がん、バセドウ病、橋本病等の甲状腺疾患の血中 S100A13 濃度が上昇するのではないかと考え S100A13 濃度を測定したが、健常者との明らかな差は認められなかった。

腎機能低下群（CRE 5.0 mg/dL 以上、BUN 50 mg/dL 以上）の患者 11 名の S100A13 濃度を測定した結果、平均値は 418 pg/mL となり健常者群に比べ S100A13 濃度の有意な上昇（ $p = 0.0001$ ）が認められた。

血管平滑筋細胞表面への S100A13 の発現機序に関して、酸化ストレスである過酸化水素刺激による、ヒト血管平滑筋細胞の S100A13 の mRNA 発現を定量的に測定したが、有意な相関は認められなかった。

血小板活性化上清による血管平滑筋細胞、血管内皮細胞の変化は、血管平滑筋細胞表面への S100A13 の発現機検討で有意な相関が認められなかったことから検討することができなかった。

当初の計画を達成できなかったが、ヒト血中 S100A13 濃度が、簡便で再現性の高い動脈硬化マーカーであることが確認できた。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：井上 修  
ローマ字氏名：Osamu, Inoue  
所属研究機関名：山梨大学  
部局名：総合研究部  
職名：准教授  
研究者番号(8桁)：00432154

### (2)研究分担者

研究分担者氏名：井上 克枝  
ローマ字氏名：Katsue, Suzuki-Inoue  
所属研究機関名：山梨大学  
部局名：総合研究部  
職名：教授  
研究者番号(8桁)：10324211

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。