

令和元年6月12日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09528

研究課題名(和文)血清抗体を用いた睡眠時無呼吸症候群の脳・心血管イベント発症予測マーカーの同定

研究課題名(英文) A potential biomarker with circulating auto-antibodies for cardiovascular disease in patients with obstructive sleep apnea

研究代表者

寺田 二郎 (Terada, Jiro)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20400898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、閉塞性無呼吸症候群(OSA)患者の血液検体を用いて動脈硬化疾患に関連した自己抗体の同定・解析を目的として研究を実施した。その中で、OSA患者の中で心血管疾患既往のある例に有意に上昇する2種の抗体を同定し英文誌に報告した。1つ目の抗体-抗COPE抗体に関しては、OSA患者の中で重症無呼吸、高血圧、肥満、心筋梗塞、脳梗塞既往のある例に高値を示すことを明らかにした。2つ目の抗体-抗NBL抗体に関しては、重症OSA患者及び心血管疾患既往(合併例)において、急性発症の急性冠症候群患者と同程度に抗体価が上昇していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で示したような、閉塞性無呼吸症候群(OSA)患者の血清で同定できる特異的な心血管疾患マーカーが明らかになれば、臨床に直接関連する動脈硬化を簡便に評価できる検査となることが期待される。特に、どのようなOSA患者が数年～数十年後に脳梗塞、心筋梗塞が発症するリスクがあるかを定量的に予測することが可能となれば、本疾患の治療アルゴリズムに寄与する可能性が考えられる。近年、数多くのバイオマーカーが実臨床で用いられているが、抗体マーカーは、抗原マーカーや酵素マーカーと比較すると非常に安定した測定結果が得られることが特徴であるため、将来臨床応用が可能な非侵襲的な検査となることが期待される。

研究成果の概要(英文)： In the present study, we identified two autoantibodies as potential novel biomarkers of atherosclerosis. In the first study, we discovered that COPE-Ab levels were significantly higher in patients with OSA, particularly those with moderate to severe OSA. Furthermore, patients with OSA and also CVD and/or stroke, hypertension, and a high BMI had elevated levels of COPE-Ab. Second, an elevated COPE-Ab level was the significant predictor of a history of CVD and/or stroke in a multivariate analysis of patients with OSA. The major finding of the second study was that neuroblastoma1(NBL1)-Ab level was significantly elevated in patients with both OSA and ACS compared with HVs. Subgroup analyses showed that NBL1-Ab level was significantly higher in patients with severe OSA and OSA patients with a past history of CAD. According to our results, COPE-Ab and NBL1-Ab might therefore be a biomarker of the risk of cardiovascular and cerebrovascular events in patients with OSA.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：睡眠呼吸障害 動脈硬化 自己抗体 バイオマーカー

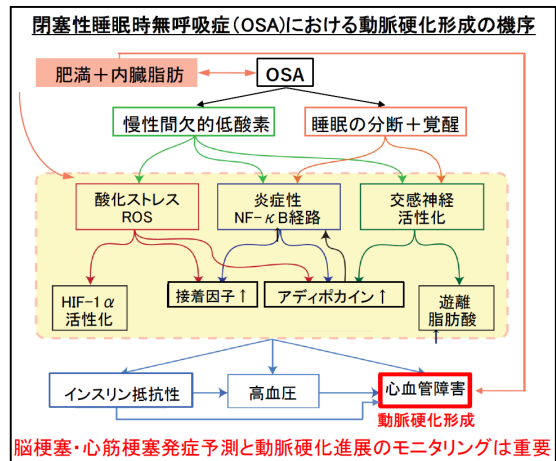
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

閉塞性睡眠時無呼吸症候群 (OSA) は、鼾や日中の眠気を主症状とする common disease であるが、脳梗塞や心筋梗塞など重篤な動脈硬化性疾患を合併することが知られている。欧州のOSA症例における10年間の大規模前向きコホート研究の解析では、健康正常人に比して未治療の重症OSAで致命的な心血管イベント、虚血性心疾患と脳卒中を含む非致死性心血管イベント発生が有意に増加していたことを報告している(オッズ比:2.9倍,3.2倍。Marin JM, et al. *Lancet* 2005)。そのためOSA診療では、鼾や眠気などの症状改善に加えて、動脈硬化疾患発症の制御が重要な課題と考えられているが、その発症を予測する有用な指標は未だない。

2. 研究の目的

OSAと動脈硬化形成のメカニズムに関しては、欧米を中心に基礎研究が行われその分子基盤が明らかにされつつある。OSAに伴う睡眠中の間欠的低酸素・再酸素化、睡眠の分断化などによる酸化ストレス、炎症、交感神経活動亢進、凝固亢進、虚血再灌流障害、代謝異常などの様々な機序を介在し、高血圧、糖尿病、肥満などの個々の併存する病態の修飾を受けて動脈硬化形成が促進すると考えられている(右図)。そのためOSA患者の動脈硬化の進展を予防するには、生活習慣病の改善とともに夜間の無呼吸を制御することが重要である。現在、重症OSA治療の第一選択はマスク型持続的気道陽圧換気(CPAP)療法であり、その治療継続は脳・心血管死亡及び心血管イベント発症を抑制する二次予防効果が報告されている。しかし、マスク装着や圧制御に対する不快感や生涯治療が必要であるという心理的負担などにより、継続治療が難しい患者が存在する(治療アドヒアランス55-80%)。そのため、日常生活や生命予後に大きな影響をあたえる心血管疾患合併リスクを簡便に評価できる検査法が期待されているが、それらは未だ存在しない。そのため本研究では、動脈硬化に関連する血清自己抗体に着目し、脳梗塞・心筋梗塞既往のあるOSA症例に特異的に発現する自己抗体マーカーを同定することを目的とした。



3. 研究の方法

我々の施設(遺伝子生化学講座)では、以前より血清抗体を用いた動脈硬化マーカーの同定に取り組んできた。これまで、一次スクリーニングとして動脈硬化関連疾患の患者血清を用いた発現クロニング法により約250種類を選出し、さらにプロゲインアレイ法により約400種類を同定した。二次スクリーニングとして、これらのうち約200種類について抗原の遺伝子を組み換え、大腸菌を用いて抗原タンパク質を発現させてアフィニティー精製し、それを抗原とする血清抗体レベルを比較した。その結果、脳梗塞、心筋梗塞、あるいは糖尿病などの動脈硬化関連疾患の患者血清において、健康人血清と比較して有意に高いレベルを示す抗体が約60種存在することを明らかにしていた。また2013~2015年にかけて、我々は予備実験として当院で診断されたOSAの10症例の血清に対して、網羅的に上記抗体の有無を検討してみたところ、数種類の血清抗体動脈硬化マーカーが陽性となった。中でもCoatmer protein complex, subunit epsilon (COPE)抗体は、OSA患者で優位に高値を示し(図2)、最適カットオフ値では良好な感度と特異度を示すことが判明し、本症における特異的な動脈硬化性

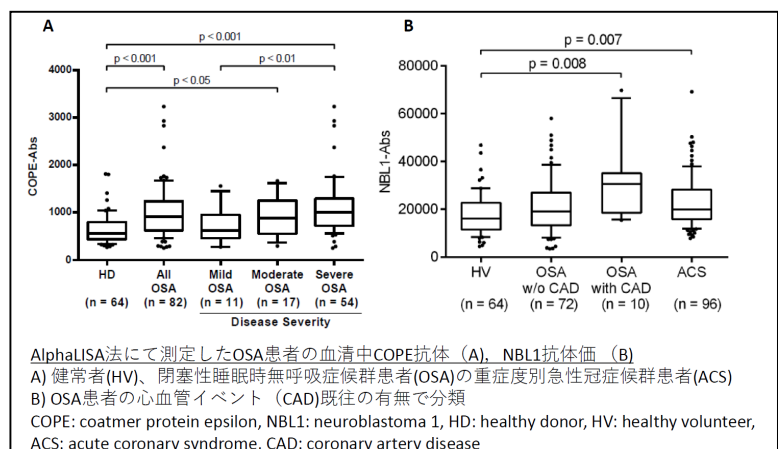
マーカーである可能性が考えられていた。しかしマーカー陽性患者が実際に血管イベントを発症するの否かについては不明であり、また脳梗塞や心筋梗塞患者で発現していた血清抗体のうちOSAで高値となる抗体は同定されていなかった。そこで、研究方法として

- 1) 当施設の予備実験で同定した数種類の動脈硬化マーカーのうち、OSAに疾患特異的に発現する血清抗体マーカーを同定する。
 - 2) 特にcoatmer protein complex, subunit epsilon (COPE) 抗体に関しては、さらに例数を増やしOSAS 重症度や併存症などを含めた臨床背景の特徴と動脈硬化疾患とマーカー抗体価の関連について解析する。
 - 3) 脳梗塞、心筋梗塞患者に特異的に発現した動脈硬化マーカーが、どのようなOSAS 抗体の測定に関しては、血清に対してglutathione-ドナービーズと抗ヒトIgG-アクセプタービーズを用いたAlphaLISA 法により抗体レベルを評価した。ビオチン化ペプチドの場合にはアビジンを固相化したプレートを用いてサンドイッチELISA 法で血清抗体レベルを測定した。GST-融合タンパク質の場合には、抗GST 抗体を固相化したプレートを用いた。
- 以上を行った。

4. 研究成果

申請者は、上述の研究を遂行し、心血管疾患を合併するOSA症例に高発現する2つの血清自己抗体を同定した(下図: Matsumura T, Terada J, et al. J Clin Sleep Med 2017. Matsumura T, Terada J, et al. PLOS one 2018 .抗COPE抗体: coatmer protein epsilon, 抗NBL1抗体: neuroblastoma 1 .いずれの抗体価上昇も共通してOSA重症度及び脳・心血管疾患既往との関連性が認められ、前者は脳梗塞と高血圧との相関が強く、後者は心筋梗塞との相関がより強いなど特徴の違いも確認された。最終年では、新たな自己抗体-抗

SNX-16 (Sorting nexin 16) 抗体について解析した。具体的には、OSA患者82名、急性冠症候群 (ACS) 患者96名、健常者 (HV) 64名を対象に、血清中の抗SNX16抗体値をamplified luminescence proximity homogeneous assay (AlphaLISA) 法により測定し、測定値と各種臨床データとの関連性を評価した。OSA患者は診断の睡眠ポリグラフ検査入院時、ACS患者はACS発症時に採取した血清を用いた。その結果、抗SNX16抗体値はOSA患者とACS患者において健常者よりも有意に高値であった。またOSA患者では重症OSA患者もしくはCVD既往のある患者において有意に高値であった。OSA患者における抗SNX16抗体値は、BMI、AHI、Arousal Index、Mean SpO2、CVD (心血管疾患) 既往との相関関係が確認された。また抗SNX16 抗体値の上昇は、OSA患者のCVD既往に対する有意な予測因子であった。本研究で報告した2つの抗体-COPE抗体、NBL-1抗体と学会発表したSNX-16抗体は、それらを組み合わせることでOSAS患者に合併する動脈硬化疾患のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。したがって、多様なOSA症例であっても、複数の自己抗体を組み合わせれば心血管疾患合併症リスクを評価できる可能性が示唆された。



SNX-16 (Sorting nexin 16) 抗体について解析した。具体的には、OSA患者82名、急性冠症候群 (ACS) 患者96名、健常者 (HV) 64名を対象に、血清中の抗SNX16抗体値をamplified luminescence proximity homogeneous assay (AlphaLISA) 法により測定し、測定値と各種臨床データとの関連性を評価した。OSA患者は診断の睡眠ポリグラフ検査入院時、ACS患者はACS発症時に採取した血清を用いた。その結果、抗SNX16抗体値はOSA患者とACS患者において健常者よりも有意に高値であった。またOSA患者では重症OSA患者もしくはCVD既往のある患者において有意に高値であった。OSA患者における抗SNX16抗体値は、BMI、AHI、Arousal Index、Mean SpO2、CVD (心血管疾患) 既往との相関関係が確認された。また抗SNX16 抗体値の上昇は、OSA患者のCVD既往に対する有意な予測因子であった。本研究で報告した2つの抗体-COPE抗体、NBL-1抗体と学会発表したSNX-16抗体は、それらを組み合わせることでOSAS患者に合併する動脈硬化疾患のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。したがって、多様なOSA症例であっても、複数の自己抗体を組み合わせれば心血管疾患合併症リスクを評価できる可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Matsumura T, **Terada J**, Kinoshita T, et al. Circulating autoantibodies against neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1 (NBL1): A potential biomarker for coronary artery disease in patients with obstructive sleep apnea. *PLoS One*. 2018;13:e0195015:1-13. (査読あり)
2. Matsumura T, **Terada J**, Kinoshita T, et al. Circulating anti-coatomer protein complex subunit epsilon (COPE) autoantibodies as a potential biomarker for cardio- and cerebro-vascular events in patients with obstructive sleep apnea. *J Clin Sleep Med* 2017;13:393-400. (査読あり)

〔学会発表〕(計4件)

1. 勝俣雄介, **寺田 二郎**, 他 . 閉塞性睡眠時無呼吸患者における心血管障害のバイオマーカーとしての抗SNX16抗体の可能性 . 日本呼吸器学会学術講演会 2019年4月 .
2. 松村 琢磨, **寺田 二郎**, 他 . 閉塞性睡眠時無呼吸症患者における心血管障害のバイオマーカーとしての抗NBL1抗体の可能性 睡眠呼吸障害研究会 2018年2月
3. Matsumura T, **Terada J**, et al. Autoantibody against NBL1 in obstructive sleep apnea patients with cardiovascular disease. European Respiratory Society Congress 2018 Sep.
4. **寺田二郎** 他 . 血清抗体を用いた閉塞性睡眠時無呼吸症候群の脳・心血管イベント発症予測マーカー . 日本臨床学会総会 2016年10月 .

〔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 特になし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：日和佐隆樹

ローマ字氏名：Hiwasa Takaki

所属研究機関名：千葉大学

部局名：医学部附属病院脳神経科学

職名：特任准教授

研究者番号 (8桁): 30260251

(2)研究協力者

研究協力者氏名：巽 浩一郎, 松村 琢磨

ローマ字氏名：Tatsumi Koichiro, Matsumura Takuma