

令和 2 年 6 月 20 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09491

研究課題名(和文)エクソーム解析を用いた冠攣縮性狭心症における疾患感受性遺伝子の網羅的解析

研究課題名(英文) Disease susceptibility gene analysis of patients with coronary vasospasm

研究代表者

中村 貴光 (NAKAMURA, Takamitsu)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：60377512

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)：冠攣縮陽性164例において約1割(19例)に冠動脈疾患家族歴を認め、家族歴を有する群では、ApoCIII/CII高値を認めた。また、冠攣縮例(20例)と非冠攣縮例(30例)の光干渉断層像での血管構造の比較を行なった。その結果、冠動脈攣縮反応は中膜の増大とともに増大するが、内膜については一定量を超えると減少する結果となった。このように攣縮の出現メカニズムに関しては、冠動脈中膜の増殖が重要であることが明らかになった。しかしながら、本研究では中膜増殖に関する遺伝的因子については明らかなものは認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

冠動脈の攣縮は、冠攣縮性狭心症のみならず種々の虚血性心疾患の病態悪化に影響を及ぼすことが知られている。しかしながら、冠攣縮を引き起こす原因については未だはっきりしていないところが多い。本研究では、冠攣縮の家族歴を有する症例では、他の冠動脈疾患のような動脈硬化危険因子は認めなかった。また、光干渉断層像(OCT)を用いた評価では、冠攣縮の病態悪化に冠動脈血管の中膜の増大が関与している可能性が示唆された。中膜増大に関与する臨床因子や遺伝因子については明らかな差は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：Of 164 patients with coronary artery spasm, family history of coronary artery disease was observed in 19 (11.9%) patients. Patients with family history had higher levels of ApoCIII/CII ratio, suggesting genetic factors related to dyslipidemia may contribute to susceptibility of coronary spasm. Moreover, the optical coherence tomography(OCT) and the vasomotor response to ACh were assessed in patients with previous myocardial infarction. The coronary contractile response to ACh had a positive linear relationship with medial area. The contractile response increased as the intimal layer thickened up to the inflection point; thereafter, the contractile response declined. However, there were no significant differences in risk factors and genes variable between patients with and without increased.

研究分野：循環器内科

キーワード：冠攣縮性狭心症 中膜 内膜 遺伝子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 冠攣縮性狭心症は、発作時に房室ブロックなどの徐脈性不整脈、心室頻拍、心室細動などの致死的不整脈および心筋梗塞の病因となっているために、適確な診断と適切なリスク管理が求められている。冠攣縮性狭心症の頻度は日本人に多い疾患で、極めて稀であるが家族内集積もみられ、原因に遺伝的背景が関与していることが以前より指摘されてきたが、家族内集積は極めて稀である。これまで冠攣縮性狭心症の疾患感受性遺伝子の変異の解析研究により、一酸化窒素合成酵素 (eNOS) 遺伝子多型 (Glu298ASP、-786T/C)、ホスホリパーゼ C-1 蛋白の遺伝子変異、aldehyde dehydrogenase 2 遺伝子変異などが冠攣縮の疾患感受性遺伝子として報告されている。しかしながら、これまで報告されてきた疾患感受性遺伝子の変異の個々のオッズ比は高々2.0 倍程度であり、遺伝的要素が冠攣縮の病態にどれくらい影響を与えているのかについては不明な点が多い。

(2) 動脈硬化病変は、内皮依存性の血管拡張反応を低下させ、血管平滑筋の反応性を増強することが知られている。このことは、結果的に様々な血管アゴニストに対する過収縮性の血管反応の増加に繋がる。したがって、動脈硬化は冠攣縮を促進すると考えられるが、過去の報告によれば冠攣縮は冠動脈が正常またはほぼ正常の部分で起きやすいとされている。この乖離について未だわかっていない部分が多く、遺伝的背景を含めた通常の動脈硬化プロセスとは異なる因子が影響している可能性がある。

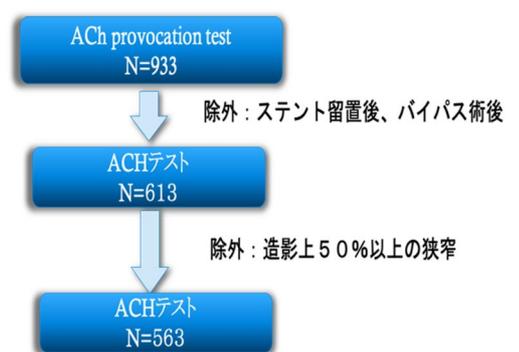
### 2. 研究の目的

冠攣縮は、冠攣縮性狭心症だけでなく、あらゆる虚血性心疾患の病態や増悪に深く関与しているが、そのメカニズムについては未だ不明な点が多い。よって、本研究の目的は、

- (1) 冠攣縮性狭心症に関する臨床危険因子について明らかにする。
  - (2) 冠攣縮性狭心症関患者における冠動脈疾患家族歴の有無での臨床的特徴の比較。
  - (3) 冠攣縮性狭心症における攣縮病変の画像診断的特徴。
  - (4) 冠攣縮病変の特徴と臨床因子、遺伝子解析による比較。
- (1) ~ (4) を明らかにすることで、冠攣縮の病態について検討を行う。

### 3. 研究の方法

安静時胸部痛をきたし冠攣縮性狭心症が疑われた 933 例に対してアセチルコリン負荷試験を行なった。左冠動脈入口部にアセチルコリン 5, 10, 50, and 100  $\mu\text{g}/\text{min}$  を投与する。冠攣縮陽性基準は、冠動脈の完全閉塞もしくは造影遅延を伴う 99% 狭窄とした。冠動脈病変の反応性により、(A) 陽性、(B) 75%-99%、(C) 50-75%、(D) 50% 以下 (陰性) の 4 群に分類を行なった。除外基準として、1) スtent治療や冠動脈バイパス術の既往を持つ症例、2) 50% 以上の冠動脈狭窄病変を有する症例を用いて、563 例の症例についての検討を行なった (図 1)



(図 1) 試験の流れ。

#### (1) 冠攣縮の程度と臨床因子の関連の検討。

上記 4 群について、年齢、性別、糖尿病、脂質異常、家族歴、喫煙、肥満、典型的胸部痛の有無についての検討を行う。

(2) 4 群のうち、(A) 陽性と (D) 50% 以下 (陰性) の症例で、年齢、性別、糖尿病、脂質異常、家族歴、喫煙、肥満、典型的胸部痛の有無の比較、脂質パラメーター (ApoA1, ApoAII, ApoB, ApoB/AI, ApoCII, ApoCIII, ApoCIII/CII, ApoE, Lp(-), TC, LDL-C, TG, HDL-C) を比較する。

(3) 心筋梗塞後 6 ヶ月目の患者を対象にアセチルコリン負荷試験と光干渉断層像 (OCT) を用

いた冠動脈病変について観察する。外弾性板面積(EEM)、内弾性板面積(IEM)、内腔面積(CSA)を測定する。冠動脈の攣縮の程度とOCTにおける血管断面のパラメーターとの関連を比較する。  
 (4) 上記で得られた冠攣縮に特徴的な血管パラメーターと臨床因子、遺伝子解析の結果との関連について比較検討を行う。

#### 4. 研究成果

安静時胸部症状を認め、冠攣縮性狭心症の診断目的にアセチルコリン負荷試験を行なった563例を冠攣縮の程度により分類すると164例が陽性、64例が陰性であった。

##### (1) 冠攣縮の程度と臨床因子の関連の検討。

冠危険因子のうち、陽性例では年齢が高年齢、喫煙者が多い、典型的胸痛をきたす結果であったが、糖尿病、脂質異常、高血圧などの古典的な危険因子については攣縮の重症度との関連は認めなかった(図3)。

	Total (N=549)	Negative (N=64)	50-75% (N=109)	75-99% (N=212)	Positive (N=164)	P-value
Age (years)	66±11	63±13	64±13	67±11	66±11	0.01
Gender, male (%)	270 (49.2)	18 (28.1)	56 (51.4)	105 (49.5)	91 (55.5)	0.003
Diabetes (%)	187 (34.1)	22 (34.4)	37 (33.9)	76 (35.9)	52 (31.7)	0.87
Hypertension (%)	284 (51.7)	35 (54.7)	53 (48.6)	116 (54.7)	80 (48.8)	0.58
Dyslipidemia (%)	359 (65.4)	42 (65.6)	65 (59.6)	147 (69.3)	105 (64.0)	0.36
Family history	60 (9.8)	9 (12.2)	12 (8.5)	20 (9.0)	19 (10.8)	0.78
CAD (%)	66 (12.0)	6 (9.4)	14 (12.8)	29 (13.7)	17 (10.4)	0.69
CVD (%)	99 (18.0)	11 (17.2)	26 (23.9)	38 (17.9)	24 (14.6)	0.28
CHD (%)	125 (22.8)	12 (18.8)	25 (22.9)	52 (25.5)	36 (22.0)	0.79
Smoking (%)	246 (44.8)	23 (35.9)	56 (51.4)	83 (39.2)	84 (51.2)	0.02
Obesity (%)	196 (35.7)	30 (46.9)	35 (32.1)	81 (38.2)	50 (30.5)	0.09
Typical chest pain (%)	98 (17.9)	8 (12.5)	11 (10.1)	46 (21.7)	33 (20.1)	0.04

(図3) 冠動脈硬化危険因子の比較 (血管反応性の違いで分類)

##### (2) 脂質パラメータの比較

陽性例と陰性例の脂質パラメーターの比較を行なった。アポ蛋白を含めた各種脂質パラメーターにおいても、冠攣縮陽性例と陰性例では有意な差は認めなかった(図4)。しかしながら、冠攣縮陽性例について脂質パラメーターを家族歴の有無で比較検討を行うと、家族歴陽性例にお

	Negative (N=74)	Positive (N=176)	P-value
ApoA1, mg/dL	139±21	137±26	0.53
ApoA2, mg/dL	28±4.8	27±5.9	0.46
ApoB, mg/dL	97±23	97±22	0.95
ApoB/A1	0.7±0.2	0.73±0.2	0.41
ApoC2, mg/dL	4.3±1.6	4.6±2.0	0.17
ApoC3, mg/dL	9.3±2.5	9.5±3.1	0.65
ApoC3/C2	2.4±0.9	2.4±2.5	0.93
ApoE, mg/dL	4.8±1.3	4.6±1.4	0.23
Lp(a), mg/dL	20±16	22±25	0.64
TC, mg/dL	199±40	192±35	0.15
LDL, mg/dL	121±35	118±30	0.61
TG, mg/dL	123±71	127±65	0.74
HDL, mg/dL	55±14	53±14	0.04

(図4) 脂質パラメータの比較

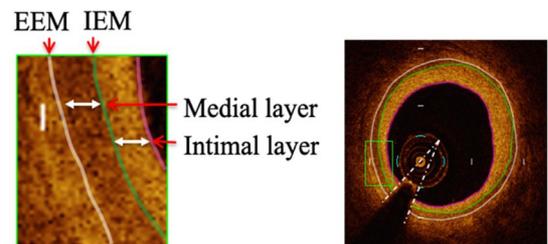
	Positive (N=164)		
	Family history(-)	Family history(+)	P-value
ApoA1, mg/dL	138±25	135±30	0.67
ApoA2, mg/dL	27±6.0	25.9±6.1	0.33
ApoB, mg/dL	97±23	89±17	0.18
ApoB/A1	0.73±0.22	0.7±0.18	0.48
ApoC2, mg/dL	4.7±1.9	3.8±1.7	0.08
ApoC3, mg/dL	9.0±3.0	9.6±3.4	0.23
ApoC3/C2	2.2±0.6	4.1±6.9	0.002
ApoE, mg/dL	4.6±1.4	4.3±1.0	0.33
Lp(a), mg/dL	21±25	24±15	0.55
TC, mg/dL	193±35	182±33	0.24
LDL, mg/dL	119±31	111±24	0.30
TG, mg/dL	116 (91, 153)	88 (56, 122)	0.01
HDL, mg/dL	50±13	52±17	0.58

(図5) 家族歴の有無による脂質パラメーターの比較

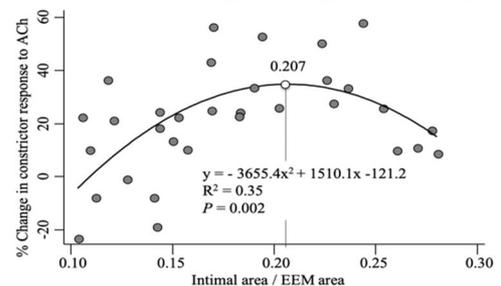
いては、ApoC3/C2が有意に高い結果となった。冠攣縮陰性例での冠動脈疾患家族歴の有無では、差は認めなかった。また、冠攣縮を有する一卵性双生児と非発症の血縁者の比較では、明確な差は認めなかった。

##### (3) OCTによる冠攣縮病変の観察。

心筋梗塞既往のある32例に対して、左冠動脈前下行枝へのアセチルコリン投与とそれに引き続くOCTでの病変観察を行なった(図6)。血管断面の内膜、中膜についての定量的評価の結果、血管攣縮の程度と中膜は正の相関を認めた(図6)。一方、内膜増殖との関連については、逆U字の関係を認め、二次曲線に近似する結果となった(図7)。また、中膜と内膜の関連も逆U字の関係を認め、内膜増殖とともに中膜量も増大するが、変曲点を超えると中膜量は減少する結果となった。これらの結果より、動脈硬化進行に伴い冠動脈中膜は減少する傾向になり、冠動脈の収縮反応は低下する可能性が示唆された。



(図6) OCTを用いた血管断面の定量化。



(図7) 内膜と血管反応の関係。

(4) 上記で得られた冠攣縮に特徴的な血管パラメーターと各種因子との関連について比較検討。

内膜増殖の大きさにより2群の分類(Intimal area/EEM:0.198で分ける)を行うと、内膜増殖に関する臨床的な因子に有意な差は認めなかった。中膜についても内膜増殖での2群の比較では有意な差は認めなかった。また、遺伝的要素の関連についても比較検討を行うが、明らかなものは認めなかった。

	Intimal area / EEM area		P-value
	< 0.198 (n = 21)	≥ 0.198 (n = 11)	
Age (years)	63 (51, 70)	69 (64, 72)	0.09
Male gender, n (%)	17 (81.0)	11 (100)	0.12
Current smoking, n (%)	4 (19.1)	1 (9.1)	0.46
Diabetes mellitus, n (%)	3 (14.3)	2 (18.2)	0.77
Hypertension, n (%)	14 (66.7)	6 (54.6)	0.50
Creatinine (mg/dL)	0.9 (0.8, 1.0)	0.93 (0.9, 1.1)	0.15
HbA1c (%)	5.9 (5.8, 6.2)	6.2 (5.8, 6.5)	0.43
LDL cholesterol (mg/dL)	79 (65, 100)	85 (72, 107)	0.46
HDL cholesterol (mg/dL)	44 (38, 52)	42 (35, 47)	0.51
Baseline diameter of the LAD (mm)	2.3 ± 0.41	2.2 ± 0.35	0.30
BMS, n (%)	2 (9.5)	2 (18.2)	0.48
2 <sup>nd</sup> generation DES, n (%)	18 (85.7)	9 (81.8)	0.77
3 <sup>rd</sup> generation DES, n (%)	1 (4.8)	0 (0.0)	0.46
Intima area / EEM	0.19 ± 0.03	0.25 ± 0.03	<0.001
Medial area / EEM	0.19 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.67
Medication, n (%)			
Beta-blocker	11 (52.4)	5 (45.5)	0.71
ACE-I/ARB	15 (71.4)	9 (81.8)	0.52
Calcium antagonist	16 (76.2)	9 (81.8)	0.72
Aspirin	21 (100)	11 (100)	—
Diuretics	1 (4.8)	2 (18.2)	0.22

(図8) 内膜増殖に関する因子。

冠攣縮の重症度は従来の古典的危険因子とは関連しないこと

が明らかになった。また、冠攣縮における家族歴の有無は、重症度との関連は認めないが脂質パラメータである ApoCIII/CII 比との関連が示唆された。TG に富んだりポ蛋白の一部である ApoCIII は、従来より血管内皮機能低下につながる事が知られている。また、ApoCII については、LPL 活性を促す作用が知られており、TG に富んだりポ蛋白の異化を促す。ゆえに、家族歴ありでの冠攣縮陽性例で ApoCIII/CII が高値を示したことは、脂質異常症に関連する遺伝的背景が冠攣縮に影響を与えた可能性が示唆された。

OCT を用いた冠攣縮病変の評価では、冠動脈中膜の増大が血管収縮反応に関与することが明らかになった。以前より nitric oxide synthase (NOS) の遺伝子変異とそれとともに血管内皮での NO 活性の低下が冠攣縮症例では低下していることを報告している。このような NO 活性の低下が増大した中膜による収縮能をさらに増大させている可能性が示唆された。また、内膜増殖が増大することにより中膜量は徐々に低下し、血管収縮反応が低下すると考えられた。正常血管やほぼ正常血管で冠攣縮が起きやすい一つの理由になり得ると思われる。慢性的な血管炎症は中膜細胞のアポトーシスを誘導することがわかっている。したがって、古典的な危険因子が少なく動脈硬化病変が少ないことが、中膜が温存する理由と考えられた。しかしながら、中膜増大に関与する因子について、遺伝的要素は明確なものは認めなかった。これは、動脈硬化に関連する様々な因子が複雑に絡むことが原因であると考えられた。今後は、本研究で得られたデータをもとに冠動脈中膜の増大や減少に関わる因子についてさらに検討を行い、冠攣縮の病態解明をより進めていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakamura T, Uematsu M, Deyama J, Watanabe Y, Nakamura K, Kobayashi T, Saito Y, Fujioka D, Kawabata KI, Obata JE, Kugiyama K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Pulmonary Vascular Resistance Is Associated With Brachial-Ankle Pulse-Wave Velocity and Adverse Clinical Outcomes in Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Card Fail.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cardfail.2019.02.019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujihara Y, Nakamura T, Horikoshi T, Obata JE, Fujioka D, Watanabe Y, Watanabe K, Kugiyama K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Remnant Lipoproteins Are Residual Risk Factor for Future Cardiovascular Events in Patients With Stable Coronary Artery Disease and On-Statins Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels <70 mg/dL.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circ J.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1253/circj.CJ-19-0047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Uematsu M, Nakamura T, Yoshizaki T, Watanabe Y, Deyama J, Watanabe K, Kobayashi T, Fujioka D, Saito Y, Nakamura K, Kawabata K, Obata JE, Kugiyama K.	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 High levels of stromal cell-derived factor-1 predict short-term progression of renal dysfunction in patients with coronary artery disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Exp Nephrol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10157-019-01722-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Horikoshi T, Obata JE, Nakamura T, Fujioka D, Watanabe Y, Nakamura K, Watanabe K, Saito Y, Kugiyama K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Persistent Dysfunction of Coronary Endothelial Vasomotor Responses is Related to Atheroma Plaque Progression in the Infarct-Related Coronary Artery of AMI Survivors.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Atheroscler Thromb.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5551/jat.48249.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Deyama J, Nakamura T, Saito Y, Obata JE, Fujioka D, Nakamura K, Watanabe K, Kugiyama K.	4. 巻 257
2. 論文標題 Effect of coronary artery spasm on long-term outcomes in survivors of acute myocardial infarction.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Cardiol.	6. 最初と最後の頁 7-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijcard.2017.08.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Nakamura T, Uematsu M, Deyama J, Watanabe Y, Nakamura K, Kobayashi T, Saito Y, Fujioka D, Kawabata KI, Obata JE, Kugiyama K.
2. 発表標題 Pulmonary Vascular Resistance Is Associated With Brachial-Ankle Pulse-Wave Velocity and Adverse Clinical Outcomes in Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction.
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Session 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山梨大学第2内科ホームページ <a href="http://yamanashi-2nai.com">http://yamanashi-2nai.com</a> 山梨大学第2内科ホームページ <a href="http://yamanashi-2nai.com">http://yamanashi-2nai.com</a>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考