

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20590846

研究課題名（和文）

血中S100A12タンパク質の動脈硬化および心血管イベントへの関与に関する研究

研究課題名（英文）

Association of plasma S100A12 level with cardiovascular diseases.

研究代表者

小崎 篤志 (KOSAKI ATSUSHI)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：40330188

研究成果の概要（和文）：

我々は本研究により慢性腎不全による維持透析患者において、(1)血液中の S100A12 という名前のタンパク質の濃度が明らかに上昇し、それが頸動脈の動脈硬化指数への増悪因子である事、(2)脳梗塞、心筋梗塞、狭心症、手足の閉塞性動脈硬化症などの血管障害を起こした事のある患者において、この血中 S100A12 タンパク質濃度が上昇している事を発見いたしました。この結果より、血液中の S100A12 を測定する事で各種の血管疾患の発症を予測する事が出来るのではないかと考えます。

研究成果の概要（英文）：

In end stage renal disease (ESRD) patients, we found that mean plasma S100A12 level was 2.3-fold higher than that in control subjects and that this level was an independent factor associated with the prevalence of atherosclerotic cardiovascular diseases (CVD) such as ischemic heart disease including myocardial infarction and angina pectoris, symptomatic stroke and symptomatic peripheral vascular disease. Therefore, we anticipate an important role for S100A12 as a novel biomarker to predict CVD in patients with ESRD. Prospective and interventional studies are currently ongoing to further elucidate the relationship between plasma S100A12 level and CVD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：動脈硬化、心血管イベント、慢性腎臓病、S100A12

1. 研究開始当初の背景

糖化タンパク受容体 RAGE (receptor for advanced glycation endproducts) は、そのリガンドである糖化タンパク AGE (advanced glycation

endproducts) により活性化され血管内皮細胞において VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) などの接着因子を誘導し、血管平滑筋細胞において増殖促進的に作用する。ま

た AGE は糖尿病患者血中において増加することより AGE-RAGE 系の活性化は糖尿病性細小血管および大血管障害の進展機序において最も重要な因子のひとつあると考えられている。1999 年に RAGE への新規リガンドとして S100 タンパク質が報告された。S100 タンパク質は 2 個の EF-hand をもつ分子量約 10kDa のカルシウム結合蛋白として現在 16 種以上のサブタイプが確認されている。各サブタイプにより発現組織に特異性がみられ、その機能もシグナル伝達、細胞周期や細胞分化の調節など多岐にわたっている。これらのサブタイプの内 S100A12 は AGE と同様に RAGE を受容体して血管内皮細胞において VCAM-1 などの接着因子を誘導し、血管平滑筋細胞において NF- κ B を活性化し、また単球の遊走能を亢進させる。最近血中 S100A12 濃度が関節リウマチなどの慢性炎症疾患で高値となること (Rheumatology 42 : 1383-1389, 2003) や全身の血管炎性疾患である川崎病で増加していることが報告され (Lancet 361:1270-1272, 2003) その細小血管および大血管障害への関連が注目されている。これまで基礎研究として、我々はヒト THP-1 細胞より分化誘導したマクロファージを用いた実験において、IL-6 で有意な S100A12 mRNA の発現増加を認めた。また、その培養上清中の S100A12 タンパク質も IL-6 添加により有意に増加した。一方、PPAR γ のリガンドであるピオグリタゾン添加によりマクロファージの S100A12 mRNA は 24 時間後には 30% 以下に減少し、IL-6 による S100A12 mRNA の増加もピオグリタゾンを前ふ置することにより完全に阻害されることを発見し報告した (Atherosclerosis 171:211-218, 2003)。また我々はヒト血中 S100A12 タンパク質濃度の測定を ELISA 法にて確立し、糖尿病患者においてその有意な上昇を認め報告した (J Clin Endocrinol Metab 89:5423-5428, 2004)。これらの事より S100A12 タンパク質が RAGE の内因性のリガンドであり糖尿病を含む血管障害に関与している可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

(1) RAGE のリガンドである S100A12 タンパク質の糖尿病や慢性腎臓病等による血管障害への関与を明らかにする。

各種の血管障害を認める糖尿病および慢性腎臓病症例等における血中 S100A12 タンパク質濃度を測定し臨床的パラメーターとともにデータベースを作成し、横断的研究 (cross-sectional

study)、後向き研究 (retrospective study) および前向き研究 (prospective study) をそれぞれ行い、S100A12 タンパク質の動脈硬化および心血管イベントへの関与の有無を明らかにする。

(2) 血管障害の治療標的としての S100A12-RAGE 系の可能性を検討する。

上記の S100A12 タンパク質の血中濃度と動脈硬化および心血管イベントへの因果関係が明らかとなった場合、その転写、発現の抑制因子となりうる薬剤、または S100A12 タンパク質と RAGE 結合を阻止する薬剤などの投与により血中 S100A12 タンパク質濃度ひいては各種血管障害イベントが抑制されるかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 各種の血管障害を発症しやすい糖尿病および慢性腎臓病症例各 100 名程度における血中 S100A12 タンパク質濃度を測定し臨床パラメーターとともにデータベースを作成し、まず横断的研究 (cross-sectional study) と後ろ向き研究 (retrospective study) を行い S100A12 タンパク質の血管障害への関与の有無を明らかにする。申請者はすでに慢性腎不全による維持透析症例で血漿 S100A12 タンパク質濃度の 2 倍以上の上昇を認め、その中でも糖尿病性腎症症例においてさらに高値を示すことを報告している (Kosaki A, Diabetes, 53 (Suppl. 2):A201, 2004)。

この結果をふまえて、まず糖尿病性を含む慢性腎臓病の透析期症例において動脈硬化の指標である頸動脈内膜中膜複合体肥厚度 (IMT: intima-media thickness of carotid artery) や脈波伝播速度 (PWV: pulse wave velocity) 等を測定して血漿 S100A12 タンパク質濃度との関連性を明らかにするために、横断的研究 (cross-sectional study) および後向き研究 (retrospective study) を初年度に行う。

初年度の研究で統計学的に血中 S100A12 タンパク質濃度と頸動脈内膜中膜複合体肥厚度 (IMT) の間に因果関係を認めた場合には、引き続き血中 S100A12 タンパク質濃度が血管障害イベントに実際に寄与しているかを検証するために横断的研究 (cross-sectional study) および前向き研究 (prospective study) を中規模症例にて行う。具体的には糖尿病性腎症透析期を含む維持透析症例の血中 S100A12 タンパク質濃度を 500-600 名規模で測定し、その臨床データベースを作成する。その後に血管障害イベント

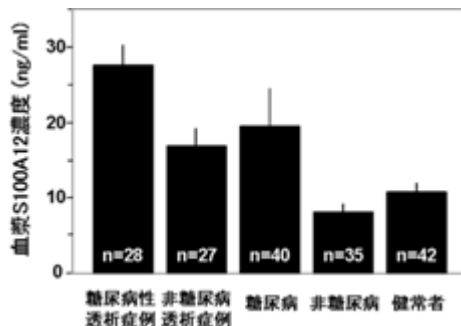
(脳血管障害、心血管障害、四肢虚血疾患などの)の既往との関連性を横断的研究(cross-sectional study)にて行う。

この横断的研究(cross-sectional study)にて S100A12 タンパク質濃度と血管障害イベントの関連性が示唆されたら、新たな血管障害イベントの発生および死亡をエンドポイントとして前向きコホート研究を最低3年間行うこととする。収集されたデータベースと事象発生数より Kaplan-Meier 法、ロジスティック回帰分析や Cox 比例ハザードモデルを用いて解析する。

(2)前述の S100A12 タンパク質の血中濃度と血管障害の因果関係が明らかとなった場合、その転写、発現の抑制因子となりうる薬剤、または S100A12 タンパク質と RAGE 結合を阻止する薬剤などの投与により血中 S100A12 タンパク質濃度ひいては各種血管障害が抑制されるかを検討するための中規模のケースコントロール研究を開始する。その具体的な候補としては、これまでに我々が報告した S100A12 遺伝子発現に抑制的に作用するピオグリタゾン(Hasegawa T, Atherosclerosis 171:211-218, 2003)やベザフィブラートなどの PPAR リガンド類、ビッグアナイド系、スタチン系やアンジオテンシン受容体拮抗薬などを予定し、内服の前後で血中 S100A12 タンパク質濃度を測定しその有効性を検討する。

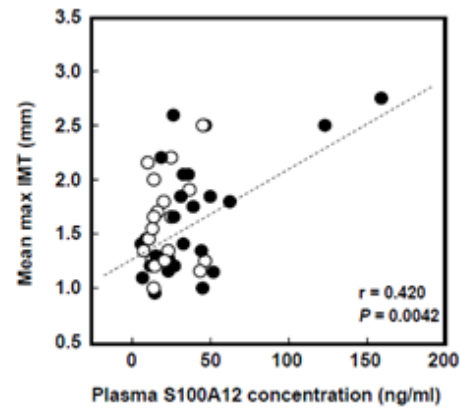
4. 研究成果

(1)我々は平成20年度までに慢性腎不全による維持透析症例で血漿 S100A12 タンパク質濃度が2倍以上の上昇を認め、その中でも糖尿病性腎症症例においてさらに高値を示すことを発見しました。(下図)



また糖尿病性腎症透析期(●)を含む維持血液透析施行症例においては血漿 S100A12 タンパク質濃度と頸動脈内中膜複合体肥厚度(IMT: intima-media thickness of carotid artery)

の間に有意な正の相関を認め(下図)、



IMTの増悪寄与因子としての血漿 S100A12 タンパク質の役割を新たに発見し報告いたしました。(Mori Y 等 Am J Nephrol 29:18-24, 2009) (下図)

Stepwise multiple regression analysis of clinical parameters with mean of max IMT in 46 patients with ESRD

	β value	p value
Age	0.249	0.117
BMI	-0.144	0.370
Mean BP	-0.169	0.290
Urea nitrogen	0.190	0.235
Serum creatinine	0.154	0.337
Total cholesterol	-0.026	0.872
Triglyceride	-0.191	0.232
Glucose	-0.039	0.807
HbA1c	0.051	0.751
Serum albumin	-0.014	0.930
White blood cells	-0.054	0.737
Hematocrit	0.138	0.390
Intact PTH	0.153	0.339
Phosphate	0.124	0.440
Adjusted Ca	0.296	0.040*
Plasma S100A12	0.357	0.014*

BMI = Body mass index; BP = blood pressure; HbA1c = hemoglobin A1c; PTH = parathyroid hormone. R² = 0.267; p = 0.002.
* Significant independent determinants.

この結果をふまえて、冠動脈・脳・四肢末梢などの血管障害を合併しやすい慢性腎臓病(CKD)症例における血中 S100A12 タンパク質濃度を測定し、血管合併症との関係をまず横断的研究(cross-sectional study)、後ろ向き研究(retrospective study)で検討し、次に冠動脈症候群などの心血管障害イベント発生への前向き研究(prospective study)を行い、血中 S100A12 タンパク質の血管障害イベントへの関与の有無を明らかにする事を目的に臨床パラメーターとともにデータベース作成を行い、平成22年度までに目標の800例以上に達し終了いたしました。

また、この内平成21年度登録までの550症例において横断的解析を行い、血管障害イベント合併の独立寄与因子をロジスティック回帰分析で検討すると、血中 S100A12 濃度の上昇とともに、年齢、透析期間、糖尿病の合併、高感度

CRP の上昇、が有意な独立寄与因子であることを明らかとし、(下図)

Multivariate logistic regression analysis of clinical parameters and CVD			
	OR	95% CI	P
Age (years)	1.04	1.02 to 1.06	<0.001*
Men	1.51	0.95 to 2.42	0.084
Current smoker	1.25	0.67 to 2.34	0.485
Duration of HD (years)	1.04	1.01 to 1.06	0.007*
Systolic BP (mmHg)	1.01	0.99 to 1.01	0.277
Hemoglobin (g/dl)	1.07	0.88 to 1.30	0.493
White blood cells (/mm ³)	1.00	1.00 to 1.00	0.594
Platelet (10 ⁴ /μl)	1.03	0.99 to 1.07	0.169
hs-CRP (mg/L)	1.02	1.00 to 1.05	0.046*
Creatinine (mg/dl)	0.91	0.81 to 1.01	0.066
Albumin (g/dl)	1.77	0.91 to 3.43	0.092
Sodium (mEq/L)	0.94	0.87 to 1.01	0.066
Potassium (mEq/L)	1.11	0.81 to 1.51	0.522
Calcium (mg/dl) × phosphate (mg/dl)	1.02	0.99 to 1.04	0.185
Total cholesterol (mg/dl)	1.02	0.98 to 1.07	0.340
Diabetic nephropathy	2.81	1.79 to 4.41	<0.001*
Plasma S100A12 (10 ng/ml)	1.28	1.13 to 1.44	<0.001*

*Significant independent determinants.

また、非糖尿病患者群 348 名においても血中 S100A12 濃度の上昇は血管障害イベント合併の有意な独立寄与因子であった。(下図)

Multivariate logistic regression analysis of clinical parameters and CVD in HD patients with non-DN (n = 348)			
	OR	95% CI	P
Age (years)	1.05	1.02 to 1.08	0.003*
Men	1.85	0.97 to 3.53	0.063
Current smoker	1.38	0.62 to 3.11	0.433
Duration of HD (years)	1.03	0.99 to 1.06	0.098
Systolic BP (mmHg)	1.00	0.99 to 1.01	0.977
Hemoglobin (g/dl)	1.06	0.82 to 1.38	0.648
White blood cells (/mm ³)	1.00	1.00 to 1.00	0.687
Platelet (10 ⁴ /μl)	1.03	0.97 to 1.08	0.344
hs-CRP (mg/L)	1.01	0.98 to 1.04	0.675
Creatinine (mg/dl)	0.90	0.77 to 1.04	0.159
Albumin (g/dl)	1.56	0.67 to 3.67	0.307
Sodium (mEq/L)	0.92	0.84 to 1.02	0.108
Potassium (mEq/L)	1.03	0.68 to 1.57	0.891
Calcium (mg/dl) × phosphate (mg/dl)	1.02	0.99 to 1.05	0.269
Total cholesterol (mg/dl)	0.99	0.93 to 1.05	0.680
Plasma S100A12 (10 ng/ml)	1.30	1.09 to 1.54	0.004*

*Significant independent determinants.

以上より維持透析症例において血中 S100A12 が血管障害イベントの危険因子である事が示唆され報告いたしました。(Shiotsu 等 Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 6:718-723, 2011)

また、四肢閉塞性動脈硬化症 (PAD) の単独発症に関しても血中 S100A12 が独立した危険因子である事を明らかにし報告いたしました。(Nephron Extra 1 242-250, 2011)(次図)

Multivariate logistic regression analysis of clinical parameters and PAD			
	OR	95% CI	p value
Age, years	1.01	0.95-1.07	0.905
hs-CRP, /log mg/l	1.74	0.63-4.82	0.288
DN	1.98	0.65-5.97	0.238
ABI, 0.1 unit	0.54	0.40-0.74	<0.001*
Plasma S100A12, /log ng/ml	5.71	1.29-25.3	0.022*

PAD = Peripheral arterial disease; OR = odds ratio; 95% CI = 95% confidence interval; hs-CRP = high-sensitivity C-reactive protein; DN = diabetic nephropathy; ABI = ankle-brachial index. * Significant independent factors.

次に経過を追えた登録症例に関して2年間の前向き研究を行い、血漿 S100A12 タンパク質が血管障害イベントの新たな発症の危険因子となるかどうかをロジスティック回帰分析で検討しました。結果は血管障害新規発症の独立寄与因子として現時点では血漿 S100A12 濃度の上昇は有意ではありませんでした。

(2) これまでに我々が報告した S100A12 遺伝子発現に抑制的に作用する PPARリガンドであるピオグリタゾン (Hasegawa T, Atherosclerosis 171:211-218, 2003) 内服の前後で血中 S100A12 タンパク質濃度測定を糖尿病患者約 30 症例にパイロットスタディーをおこなったが、有意な増減は認めませんでした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) Shiotsu Y, Mori Y, Hatta T, Maki N, Iida K, Matsuoka E, Kado H, Ishida R, Kishimoto N, Tamagaki K, Nishimura M, Iwamoto N, Ono T, Matsubara H, Kosaki A. Plasma S100A12 levels and peripheral arterial disease in end-stage renal disease. Nephron Extra 1:242-250, 2011. 査読有

(2) Shiotsu Y, Mori Y, Nishimura M, Sakoda C, Tokoro T, Hatta T, Maki N, Iida K, Iwamoto N, Ono T, Matsuoka E, Kishimoto N, Tamagaki K, Matsubara H, Kosaki A. Plasma S100A12 level is associated with cardiovascular disease in hemodialysis patients. Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 6:718-723, 2011. 査読有

(3) Mori Y, Kosaki A, Kishimoto N, Kimura T, Iida K, Fukui M, Nakajima F, Nagahara M, Urakami M, Iwasaka T, Matsubara H. Increased plasma S100A12 (EN-RAGE) levels in hemodialysis patients with

atherosclerosis.

Am. J. Nephrol. 29:18-24, 2009. 査読有

[学会発表] (計4件)

(1) Mori Y, Shiotsu Y, Matsuoka E, Kosaki A.

Plasma S100A12 levels and peripheral arterial disease in end-stage renal disease.

ASN's Annual Renal Week Meeting 2011

2011年11月10日 Philadelphia, PA. USA

(2) Mori Y, Shiotsu Y, Kosaki A.

Increased plasma S100A12 level is associated with cardiovascular diseases in non-diabetic hemodialysis patients.

ASN's Annual Renal Week Meeting 2010

2010年11月19日 Denver, Co. USA

(3) 小崎篤志、森泰清

血中S100A12タンパク質の動脈硬化性血管障害イベントへの関与に関する研究

第53回日本糖尿病学会年次学術集会

2010年5月29日 岡山コンベンションセンター

(4) Mori Y, Shiotsu Y, Nishimura M, Hatta T, Maki N, Iida K, Matsubara H, Kosaki A.

Increased plasma S100A12 level is associated with cardiovascular diseases in hemodialysis patients.

ASN's Annual Renal Week Meeting 2009

2009年10月30日 San Diego, CA. USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小崎 篤志 (KOSAKI ATSUSHI)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：40330188

(2) 研究分担者

森 泰清 (MORI YASUKIYO)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：40268371

(3) 連携研究者

なし