

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 4 月 23 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590895

研究課題名（和文）臨床・基礎融合研究により動脈硬化不安定粥腫ないしその破綻の新規診断法の開発

研究課題名（英文）Development of diagnostic methods to detect unstable atherosclerotic plaques with combination of clinical and basic research.

研究代表者

志手 淳也（SHITE JUNYA）

神戸大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：40362793

研究成果の概要（和文）：急性冠症候群の原因となる動脈硬化不安定粥腫の診断法と治療法の開発研究を進めてきた。臨床研究においては、光干渉断層映像法(OCT)を用いての冠動脈ステントの経時的観察や、ステント内血栓に関する研究、そして動脈硬化プラークの薬剤使用による安定化の研究を行った。基礎研究では、抗炎症免疫療法の成果をマウス動脈硬化モデルにおいて証明し、新規治療法の開発研究を行い論文に報告した。これらの研究を、融合させることで、将来臨床で使用できる新たな診断法や治療法の開発につながる研究を進めた。

粥腫破綻検出のためのバイオマーカーの検索に関しては、現状では実際のマーカーとして有用な物質を特定するまでには至っていない。

研究成果の概要（英文）：We investigated the diagnostic and therapeutic methods for atherosclerotic plaque rupture in clinics. We had already reported the observational research results; coronary arterial lesions and thrombus following sirolimus-eluting stent implantation assessed by optical coherence tomography, Effect of some drugs on the stability of coronary atherosclerotic plaques. Moreover, we developed some of the new anti-inflammatory therapies against atherosclerosis in basic experiments using mouse. We united the clinical and basical research results and discovered the drug's beneficial mechanism that the drug regressed atherosclerotic lesions or stabilized the lesions in clinical research. We could not discover the new marker for predicting the atherosclerotic plaque rupture, so far.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：循環器内科学

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 虚血性心疾患

1. 研究開始当初の背景

急性冠症候群(急性心筋梗塞、不安定狭心症)の発症後の治療法は確立され、緊急心臓カ

テーテル検査と治療にて死亡率の低下と予後の改善が得られているが、依然として院外死(急性冠症候群が起因となり病院搬送まで

に死亡する症例を含めた突然死、不整脈死)が数多く存在する。これらを予防するためには、急性冠症候群の発症基盤となる動脈硬化巣不安定粥腫破綻(プラークラプチャー)を破綻前に診断して、対策をたてるような予防的措置が必要である。

我々は、循環器内科医として上記のような緊急患者に対応しながら、主に虚血性心疾患に関連した臨床研究を進めて来た。しかし、臨床医学のみの研究的アプローチの限界も感じており、基礎的研究手法の臨床への応用、様々な基礎的研究成果の臨床への還元の可能性を強く認識している。臨床研究と基礎研究の統合を行い、虚血性心疾患の根本的病態生理にせまる研究を進めて、現状で解決できていない問題を解決することを目指す。

2. 研究の目的

この研究の目的は、急性冠症候群や心臓突然死の原因となる動脈硬化不安定粥腫の診断に関する臨床研究に基礎的研究手法を導入し、より多角的にその病態にせまり、臨床にて実施可能な新規不安定粥腫検出法を開発することである。

そして、不安定粥腫を持つ患者を早期発見し、予防的措置を行うことで急性冠症候群と突然死を予防し、社会に貢献することである。

3. 研究の方法

1. 画像診断による新規の不安定粥腫検出法の開発;我々は、虚血性心疾患患者の心臓カテーテル検査時(侵襲的)に、血管内超音波撮影法(IVUS)や光干渉断層撮影法(OCT)を用いて、動脈硬化血管の内腔径や壁の性状を観察し実際の治療に役立つのみならず、粥腫の性状診断に関連する研究を進めてきた。最近、非侵襲的検査法としてCTやMRIでも冠動脈内動脈硬化粥腫の診断を行う試みはあるが、未だ臨床で汎用できるレベルではない。すなわち、現状では非侵襲的に不安定粥腫の有無を検出できるシステムは存在しない。そこで、研究分担者の山下らが開発中の位相差X線撮影法を臨床応用することを目指して、共同で研究を進める。この撮影法は、一般レントゲン撮影で使用するX線吸収像ではなく、X線の波としての性質を利用して、物体通過時の波長のズレを画像化する特殊撮影法である。写真は、マウスの動脈硬化巣を(結晶法)位相差CTにて撮影した画像である。白色矢頭の部分は、薄い線維性被膜に覆われた脂質が豊

富な不安定粥腫である。脂質はCT値で低く(黒く)、平滑筋や線維成分は高く(白く)映ってくることで不安定化の鑑別が可能であり、理論的に普通のCTで判定不能な軟部組織の密度の差異を検出できる。臨床応用できれば、非侵襲的な検査で粥腫性状のスクリーニングができるわけで、不安定粥腫診断法として期待できる。

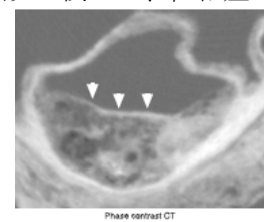
2. 粥腫破綻検出のための新規血液検査方法の開発;前記の画像診断による病態へのアプローチと同時に、血液検査からの病態解析も進めていく。我々は、臨床で測定可能な血液マーカーと病態・画像診断との関連を研究し報告してきた。一方、山下らは基礎研究を進める中で、臨床にも応用できる内皮機能・酸化ストレスに関連するバイオマーカー測定法、病態と関連をもつ可能性のある自己抗体測定法などを確立している。これらを画像診断データのある患者血液で測定し、統合的にバイオマーカーとの関連を解析する。必ずや新たな診断法や治療のターゲットの候補が発見できるものと確信している。山下らは既に、我々が緊急で治療した急性冠症候群(不安定粥腫破綻の起きた)患者血液サンプルを使用して、研究計画の中で示す方法にて粥腫破綻検出のための自己抗体バイオマーカーの候補選定を行っている。これらの研究で臨床症状のない粥腫破綻(サイレントラプチャー)検出のための血液検査方法の開発を進めていく。

以上のように、今回の申請課題は大きく2つの研究群からなり、**画像診断での不安定粥腫検出法の研究と、血液検査での粥腫破綻検出法の研究**から構成されている。信頼できる画像診断と臨床データのある患者血液を用いて、様々なバイオマーカー測定と解析を行い、融合させることで新しい診断法を創出する。

4. 研究成果

1. 画像診断による新規の不安定粥腫検出法の開発

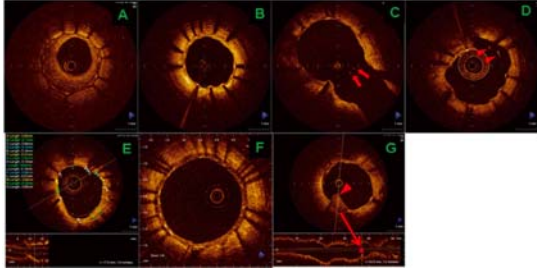
安定粥腫診断法の開発に関して、位相差X線CTにて摘出したマウス動脈硬化巣の評価実験を実施した。二次元CT画像上で、動脈硬化巣内のCT値に分布が認められ、質的診断ができる可能性を示唆する結果であつ



Phase contrast CT

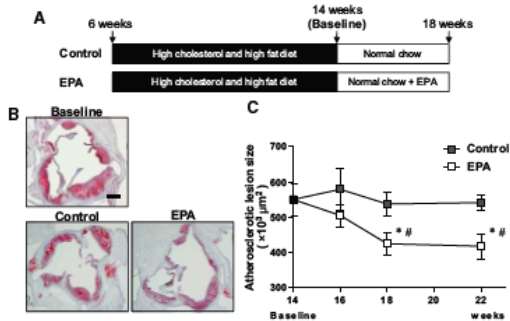
た。
動脈硬化巢の CT 値に分布が認められ、10 μ m の精度で 3 次元 CT 画像を構築でき、組織の質的診断ができる可能性が十分に示された。

臨床研究に於いては、OCT での病変の観察研究を進め、ステント治療後部位の経時的観察を行うなど、新たな知見を学会や論文で報告した。

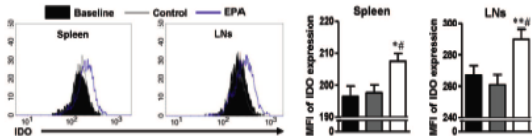


診療を行うなかで、EPA という薬剤で、動脈硬化の粥腫がどのように変化をするのかを観察し、粥腫の安定化に寄与することをみだしている。

同じ薬剤を使用した、基礎研究（マウス動脈硬化モデル）において、山下らは動脈硬化の退縮作用を証明しており、一部は免疫機能に影響を与え、樹状細胞の分化と機能の修飾とさらには T リンパ球の数を減らすことも証明している。

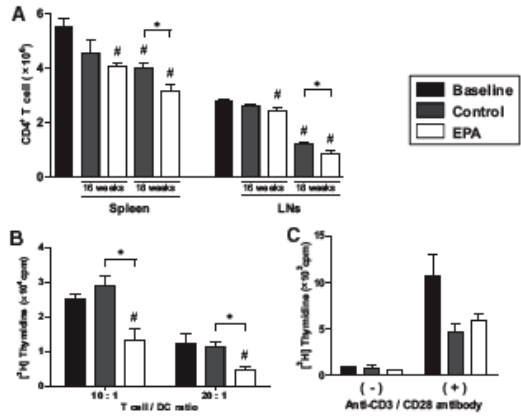


EPA は、樹状細胞の IDO(indoleamine 2,3-dioxygenase) というトリプトファン代謝酵素の発現を増加させ、結果として T リンパ球の増殖を抑制することが分かった。



臨床においても、このような機序が上記の粥腫に与える良い作用に結びついているのではないかと仮説を検証する研究につながっている。

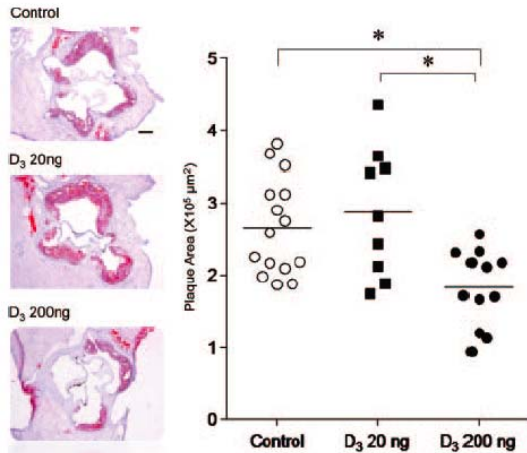
結果として、臨床研究の作用機序を、基礎



的動物実験によって証明したことになり、まさに基礎と臨床の融合研究となった。

主に臨床研究にて、不安定粥腫の観察研究を遂行したが、期間の問題もあって、その経時的なフォローを行う研究結果までは得られていない。継続して、不安定粥腫に対しての治療的介入試験、その粥腫の経時的観察を行い、新たな診断法や治療法に結びつく研究につなげていきたい。

その他にも、基礎研究がメインではあるが、抗 CD 3 抗体や活性化ビタミン D 3 の経口投与による、全く新しい動脈硬化予防法を開発し、論文に報告している。



この研究にて「腸管免疫修飾により動脈硬化が予防できる」という新しい概念を確立した。その成果が認められ、共同研究者の山下は、アメリカ心臓協会から 2011 Daniel Steinberg New Investigator Award という学会賞を受賞するに至った。

新たな、動脈硬化予防のための治療ターゲットを見つけたこととことであり、将来の臨床応用も視野にいたる研究を進めている。

2. 粥腫破綻検出のための新規血液検査方法の開発

動脈硬化の不安定化もしくは粥腫破綻の予測ができるような血液マーカーを見つけるための研究を進めた。

臨床での信頼できる画像診断での不安定粥腫の存在を手がかりに、その患者さんの血液を使用した網羅的解析を行ったのだが、方法論的な問題にも直面し、結果として研究期間内に成果は得られていない。

しかし、この研究を遂行する上で、様々な臨床上のデータベースが出来上がる結果となり、今後のイベント発生などをエンドポイントとするような臨床研究につなげていけると考えている。

是非、前向き臨床研究のプロトコルを立て、倫理委員会で審査の後に研究を継続していきたいと考えている。

この研究においても、臨床での所見と、基礎研究に於ける様々な研究手法を用いて、融合した研究を進めることができた。結果として、臨床研究を進める医師も、基礎的な機序まで考えることができるようになり、基礎的な研究を中心に行う研究者も、臨床での問題点を意識できるようになった。せっかく確立できたこの研究組織についても、継続して共同研究を進めて、よりレベルの高い、実用性のある研究が遂行できる環境は維持していきたい。

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] (計 13 件)

1. Nakagawa-M, Shite J et al. Ability of optical coherence tomography to visualize the entry port of spontaneous coronary artery dissection. *Circ J.* 2011; 75: 2505-2507.
2. Sawada T, Shinke T Shite J et al. Impact of cytochrome P450 2C19*2 polymorphism on intra-stent thrombus after drug-eluting stent implantation in Japanese patients receiving clopidogrel. *Circ J.* 2011; 75: 99-105.
3. Inoue T, Shite J et al. Optical coherence evaluation of everolimus-eluting stents 8 months after implantation. *Heart.* 2011; 92: 1379-1384.
4. Miyoshi N, Shite J et al. Comparison by optical coherence tomography of paclitaxel-eluting stents with sirolimus-eluting stents implanted in one

coronary artery in one procedure. - 6-month follow-up -. *Circ J.* 2010; 74: 903-908.

5. Kozuki A, Shite J et al. STELLIUM 1: First-in-man follow-up evaluation of bioabsorbable polymer-coated paclitaxel-eluting stent. *Circ J.* 2010; 74: 2089-96.

6. Kawamori H, Shite J et al. The ability of optical coherence tomography to monitor percutaneous coronary intervention: detailed comparison with intravascular ultrasound. *J Invasive Cardiol.* 2010; 22: 541-545.

7. Sawada T, Shinke T Shite J et al. Impact of cytochrome P450 2C19*2 polymorphism on intra-stent thrombus after drug-eluting stent implantation in Japanese patients receiving clopidogrel. *Circ J.* 2010; 75: 99-105.

8. Takeda M, Yamashita T et al. Oral administration of an active vitamin D3 (calcitriol) decreases atherosclerosis in mice via inducing regulatory T cells and immature dendritic cells with tolerogenic function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30: 2495-2503.

9. Nakajima-K Yamashita T et al. Orally administered eicosapentaenoic acid induces rapid regression of atherosclerosis via modulating the phenotype of dendritic cells in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 31: 1963-1972.

10. Ogasawara D, Shite J, et al. Pioglitazone reduces the necrotic-core component in coronary plaque in association with enhanced plasma adiponectin in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circ J.* 2009; 73: 343-351.

11. Otake H, Shite J, et al. Local determinants of thrombus formation following sirolimus-eluting stent implantation assessed by optical coherence tomography. *JACC intervention.* 2009; 2: 459-466.

12. Katoh H, Shite J, et al. Delayed neointimalization on sirolimus-eluting

stents - 6-month and 12-month follow-up by optical coherence tomography. *Circ J.* 2009; 73: 1841-1847.

13. Sasaki N, Yamashita T, et al. Oral anti-CD3 antibody treatment induces regulatory T cells and inhibits the development of atherosclerosis in mice. 2009; 120: 1996-2005.

[学会発表] (計 26 件)

1. 志手淳也 冠動脈疾患の診断、治療の最近の進歩 第 111 回日本循環器学会近畿地方会 2011/8/3.

2. 志手淳也 FFR および OCT を用いた虚血イベント予防へのアプローチ 第 20 回日本心血管インターベンション治療学会 2011/7/23.

3. 志手淳也 OCT による不安定プラークの同定、急性冠症候群発症のリスク評価は可能か 第 20 回日本心血管インターベンション治療学会 2011/7/23.

4. 志手淳也 Element ~New Technology DES Platform~ 第 20 回日本心血管インターベンション治療学会 2011/7/23.

5. Tsuyoshi Osue, Shite J, et al. The comparison between frequency domain optical coherence tomography and intravascular ultrasound after stent implantation. 第 20 回日本心血管インターベンション治療学会 2011/7/23.

6. Hiranuma N, Shite J, et al. Assessment of debulking effect of rotational atherectomy using frequency domain type optical coherence tomography (C7-OCT). 第 20 回日本心血管インターベンション治療学会 2011/7/23.

7. Tomoya Yamashita Anti-atherogenic immune therapy via modulation of the intestinal immune system. -The intestines as new therapeutic targets for preventing atherosclerosis-第 43 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2011/7/14.

8. Masafumi Takeda, Tomoya Yamashita et al. Oral Administration of an Active Form of Vitamin D3 (Calcitriol) Decreases Atherosclerosis in Mice by Inducing Regulatory T Cells and Immature Dendritic

Cells With Tolerogenic Functions. 第 43 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2011/7/14.

9. Tomoya Yamashita Oral administration of an active form vitamin D3 (calcitriol) decreases atherosclerosis in mice via inducing regulatory T cells and immature dendritic cells with tolerogenic functions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2011/4/29.

10. Hirotooshi Hariki, Junya Shite, et al. Potential Benefit of Final Kissing Inflation after Single Stenting to Bifurcation Lesions: Difference of Optical Coherence Tomography Findings in Sirolimus and Paclitaxel-Eluting Stents. *American College of Cardiology* 2011/4/3.

11. Kawamori H, Shite J, et al. Natural Consequence of Stent Malaposition Assessed by Optical Coherence Tomography. *American College of Cardiology* 2011/4/3.

12. Kozuki A, Shite J et al. A Novel Radiofrequency Signal Analysis for Coronary Plaque Characterization at Culprit Lesion Using ImapTM: How Can We Use the New Parameter: Confidence Level? *American College of Cardiology* 2011/4/3.

13. Kozuki A, Shite J et al. Delayed Arterial Healing After Sirolimus Eluting Stents Implantation Into the Dominant Necrotic Core Lesions in Patients With Stable Coronary Artery Disease. *American Heart Association* 2010/11/13

14. Shinke T, Shite J et al. Difference of Optical Properties of Neointimal Tissue Between Restenosis After Drug-Eluting and Bare Metal Coronary Stent. *American Heart Association* 2010/11/13

15. Nakajima K, Yamashita T et al. Orally Administered Eicosapentaenoic Acid Induce Rapid Regression of Atherosclerosis via Modulating the Phenotype of Dendritic Cells in LDL Receptor-deficient Mice. *American Heart Association* 2010/11/13

16. Kozuki A, Shite J et al. Factor analysis of neointimal coverage after siro

limus-eluting stents implantation in patients with stable coronary artery disease. European Society of Cardiology 2010/24

17. Hariki H, Shite J et al. Potential benefit of final-kissing inflation after single stenting for the treatment of bifurcation lesions: Insight from OCT observations. European Society of Cardiology 2010/24

18. Inoue T, Shite J et al. Assessment of yellow neointima and mural thrombi after 1st generation sirolimus-eluting stents using angioscope and optical coherence tomography. European Society of Cardiology 2010/24

19. Sawada T, Shite J et al. Impact of cytochrome P450 2C 19*2 polymorphism on thrombus after drug-eluting stent implantation in Japanese patients on antiplatelet therapy with clopidogrel 日本心血管インターベンション治療学会 2010/8/23

20. Kawamori H, Shite J et al. Natural consequence of post-intervention stent malapposition, tissue prolapse, thrombus, and dissection assessed by optical coherence tomography. 日本心血管インターベンション治療学会 2010/8/23

21. Shinke T, Shite J et al. Role of IVUS radiofrequency analysis and OCT in coronary intervention and secondary prevention in the era of DES. 日本心血管インターベンション治療学会 2010/8/23

22. 山下智也 動脈硬化予防のための抗炎症免疫療法. 日本動脈硬化学会 2010/7/15

23. 志手淳也 Feature of New Tissue Characterization Program. (パネルディスカッション) 第57回日本心臓病学会 2009/09/18

24. 志手淳也 Assessment of DES neointimalization by optical coherence tomography (OCT). (シンポジウム) 第18回日本心血管インターベンション治療学会 2009/06/26

25. Ogasawara D, Shite J, et al. Heterogeneity of neointimal distribution pattern of various stents analyzed by

optical coherence tomography: comparison between Cypher, Taxus, and bare-metal stent. 18回日本心血管インターベンション治療学会 2009/06/26

26. 志手淳也 Clinical application of optical coherence tomography (OCT) and future directions. (パネルディスカッション) 第18回日本心血管インターベンション治療学会 2009/06/25

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/iml/doctor/activity/clinical/acti-01.html>

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/iml/doctor/activity/basic/acti-02.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

志手 淳也 (JYUNYA SHITE)

神戸大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：40362793

(2) 研究分担者

山下 智也 (YAMASHITA TOMOYA)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：90437468