

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25年 6月28日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590541

研究課題名（和文） 不安定プラーク検出法の確立

研究課題名（英文） A novel marker for unstable plaques in atherosclerosis

研究代表者

梶田 緑 (MASUDA MIDORI)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：50173753

研究成果の概要（和文）：動脈硬化症を来たすプロセスでは、特に酸化変性 LDL が Mφ に際限なく取り込まれて動脈硬化の初期病変である泡沫細胞の集積をもたらし、ついには多量の脂質を含む不安定なプラークとなる。すなわち、不安定プラークでは多量の脂質と共に活性化した Mφ が観察されることから、生体内における Mφ 活性の測定が不安定プラークの検出に有用と考えられる。血漿 sFcγRIIIa^{Mφ} は、頸動脈エコー検査施行患者では低エコープラーク群で最も高く、sFcγRIIIa^{Mφ} 測定が新しい不安定プラーク検出法になる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Macrophages play a major role in the development of vascular lesions in atherogenesis. We had measured soluble FcγRIIIa^{Mφ} derived from macrophages in plasma with anti-FcγRIIIa^{Mφ} monoclonal antibodies and found patients with echogenic/echolucent plaques had the highest sFcγRIIIa^{Mφ} levels, but patients with only calcificated plaques had levels similar to patients with no plaque or intact carotid artery. Because unstable plaques contain a lot of lipids and macrophages inside, the sFcγRIIIa^{Mφ} may serve as a novel risk biomarker for unstable angina or myocardial infarction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：動脈硬化、Fcγレセプター-IIIa、CD16、ELISA

1. 研究開始当初の背景

社会の高齢化や食生活の欧米化による飽和脂肪酸の摂取量増加に伴って、動脈硬化性合併症が多発し、重要な社会問題となっている。すなわち、健康寿命と死亡との間で苦し

む期間の大半は脳卒中、心筋梗塞、網脈疾患による視力低下、閉塞性動脈硬化症、などの脈管疾患であり、生活の質（QOL）を低下させて生きることになる。動脈硬化症の発生メカニズムが徐々に解明され、従来から知られ

ていた糖尿病、高血圧、高脂血症などの危険因子の重要性が再認識され、それぞれに対する EBM に基づいた治療法が開発され、明確な成果を挙げている。しかし、ある時点での動脈硬化を明確に評価する指標があれば、それに応じた治療法を適応することでテーラーメイド医療が実現できる。

一方、IgG レセプター III (FcγRIII: CD16) には、NK 細胞とマクロファージ (Mφ) に発現している IIIa 型と、好中球に発現している IIIb 型があり、両者とも細胞表面から放出され、可溶性 (sFcγRIII) として血漿中に存在している。血漿中には好中球からプロテアーゼによって放出された sFcγRIIIb が高濃度に含まれており、この濃度と好中球減少症患者の易感染性との相関、HIV 患者における重症度との相関が報告されている。また、NK 細胞を活性化するとか肺胞 Mφ を *in vitro* で培養するとメタロプロテアーゼによって上清中に sFcγRIIIa が放出されること、FcγRIIIB 欠損患者の血漿および関節リウマチ (RA) 患者の関節液、血漿中の sFcγRIIIa の存在が報告されている。申請者は、NA2-FcγRIIIb と FcγRIIIa を認識するモノクロナル抗体 (mAb) GRM1 を用いて、NA11 タイプの RA 患者血漿中の sFcγRIIIa が sFcγRIIIb と同様に増加していること、sFcγRIIIa の Mφ 型と NK 細胞型の比率が個々の患者によって異なっていることを認めた。これは、血漿中の sFcγRIIIa を初めて定量し、さらに血漿中の sFcγRIIIa^{Mφ} の存在を始めて明らかにしたものである。

次に、培養単球の溶解液から FcγRIIIa を精製し、これを抗原として Mφ 型 FcγRIIIa に特異的な mAb (MKGR 14: mIgM) を得た。本 mAb を用いて血漿中 sFcγRIIIa^{Mφ} 測定法を構築した。sFcγRIIIa^{Mφ} も RA 患者血漿中では増加しており、ステージが進むに従い異常高値

の患者が増すこと、3 種の sFcγRIII はともに Lansbury 指数と相関したが sFcγRIIIa が最も良く相関した事、sFcγRIIIa^{Mφ} のみが血清免疫グロブリン濃度と相関しなかったことを認めた。これは、血漿中の sFcγRIIIa^{Mφ} を初めて定量したものである。また、血漿 sFcγRIIIa^{Mφ} が健常者では加齢とともに増加すること、成人病検診症例では動脈硬化症のリスクファクターが増すに従い増加し、頸動脈エコー検査の結果と有意に相関すること、虚血性心疾患 (CAD) 症例では明らかな高値を示し、冠動脈の有意狭窄数が増すに従い増加することを認めている。

さらに、すべての患者での sFcγRIIIa の測定を目的として、FcγRIIIA の細胞外ドメインを CHO 細胞にトランスフェクトし、培養上清より精製したリコンビナント sFcγRIIIa を抗原として FcγRIIIa に特異的な mAb (MKGR 155: mIgG1) を得た。本 mAb を用いて血漿中 sFcγRIIIa 測定法を構築した。本法は、CD16 GRM1 を用いた NA11 用 sFcγRIIIa 測定法とは異なり、すべての患者に適用出来るとともに、NK 細胞型の sFcγRIIIa への特異性が高く、総 sFcγRIII (sFcγRIIIa + sFcγRIIIb) および sFcγRIIIa^{Mφ} 測定法との組合せにより、NK 細胞、好中球、Mφ の活性化の解析がより容易になった。さらに、化学発光系を利用して、約 80 倍の高感度化に成功した。3 種の sFcγRIIIs 測定系の感度差より、正常プール血漿に含まれる sFcγRIIIa は大部分が NK 細胞由来、総 sFcγRIII は大部分が好中球由来であった。本法を用いて抗 TNFα 抗体療法時の若年性関節リウマチ患者での可溶性 FcγRIIIa の経時の変化を測定したところ、病態をよく反映していた。

2. 研究の目的

本研究は、申請者が開発した Mφ 型可溶性

FcγRIIIa^{Mφ}測定法の不安定プラーク検出法への応用を目的とするものである。すなわち、不安定プラークでは多量の脂質と共に活性化した Mφが観察されることから、生体内における Mφ活性の測定が不安定プラークの検出に有用と考えられる。

不安定プラークの破裂またはびらんは血管の閉塞や内腔の狭窄を引き起こし、遂には臓器の機能障害に至る。重要な臓器ほど症状が現われ易く、脳、心臓、腎臓等が代表的な臓器である。厚生労働省患者調査概要によると、急性心筋梗塞を発症する患者数は年間に11万人（男性7.9万人、女性3.1万人）、その他の虚血性心疾患は年間80.4万人（男性37.5万人、女性42.9万人）で、毎年増加している。食生活の高カロリー化による飽和脂肪酸の摂取量増加、自動車の普及による運動量の減少などは動脈硬化性疾患の増加を予想させ、さらに、これらを反映して増加し続けている糖尿病は冠動脈疾患に最も影響力のある危険因子である。このような背景から日本人でも、冠動脈疾患が、将来、欧米人と同様のレベルにまで増加することが予測されている。このような疾病のリスクを減少させるためには、医療分野における簡便で感度の高い動脈硬化症、特に不安定プラークを検出する検査手法の確立が急務であり、本研究の成果がこの目的に大いに貢献するものと期待している。

3. 研究の方法

本研究は、申請者が開発した Mφ型可溶性 FcγRIIIa^{Mφ}測定法の不安定プラーク検出法への応用を目的とするものである。すなわち、不安定プラークでは多量の脂質と共に活性化した Mφが観察されることから、虚血性心疾患や脳梗塞疑いで頸動脈エコー検査受診の患者血漿中の3種の sFcγRIII 量を測定し、

エコー検査の結果と比較検討することにより、sFcγRIIIa^{Mφ}測定法の不安定プラーク検出における有効性を検討する。

虚血性冠動脈疾患（CAD）の診断ならびに治療のため、心臓カテーテル検査受診の患者血漿中の sFcγRIIIa^{Mφ}量を測定したところ、糖尿病併発例では正常血糖群と比して低値のものがあつた。sFcγRIII 測定値への糖化の影響を調べる為、プール血漿にグルコースを加え、4日間インキュベートして、3種の sFcγRIII 量を測定した。

血漿 sFcγRIIIa^{Mφ}量は、FcγRIIIa^{Mφ}に特異的な mAb MKGR 14 とビオチン化 CD16 GRM1 を用いた高感度化学発光 ELISA で、FcγRIIIa 量 (FcγRIIIa^{NK} + sFcγRIIIa^M) は FcγRIIIa に特異的な mAb MKGR155 とビオチン化 CD16 GRM1 を用いた ELISA で、総 sFcγRIII 量 (sFcγRIIIa + sFcγRIIIb) は CD16 CLBFcRgrnI とビオチン化ウサギ抗ヒト FcγRIII pAb を用いた ELISA で測定した。

4. 研究成果

IgG レセプターIII (FcγRIII: CD16) には、NK 細胞とマクロファージ (Mφ) に発現している IIIa 型と、好中球に発現している IIIb 型があり、両者とも細胞表面から放出され、可溶型 (sFcγRIII) として血漿中に存在している。すなわち、これら可溶型を個々に測定することにより、生体内での好中球、NK 細胞あるいは Mφの活性化を知ることができる。そこで IIIa 型および Mφ 由来の IIIa^{Mφ} 型に特異的なモノクロナル抗体を作成し、血漿中の sFcγRIIIa および sFcγRIIIa^M測定法を構築した。

動脈硬化症を来たすプロセスでは、特に酸化変性 LDL が Mφに際限なく取り込まれて動脈硬化の初期病変である泡沫細胞の集積を

もたらし、ついには多量の脂質を含む不安定なプラークとなる。sFcγRIIIa^M測定が生体内における Mφ活性を表すことに着目し、血漿 sFcγRIIIa^Mを測定したところ、健常者では加齢とともに増加した。成人病検診症例では動脈硬化症のリスクファクターが増すに従い増加し、頸動脈エコー検査の IMT とよく相関した。虚血性心疾患症例では明らかな高値を示し、冠動脈の有意狭窄数が増すに従い増加した。しかし、糖尿病併発例では正常血糖群と比して極めて低値のものがあつた。In vitroでの糖化の影響は、総 sFc③RIII 値では認められなかったが、sFcγRIIIa 値、sFcγRIIIa^M値はグルコースの濃度に比例して低下した。血中グルコース濃度に寄る補正により、糖尿病併発例での低値は改善されたが、排泄の亢進等の影響があるものと考えられた。

頸動脈エコー検査施行患者では総 sFc③RIII 量、sFc③RIIIa 量に明らかな増加は認められなかったが、sFcγRIIIa^M量は健常者と比して高値を示した。低エコープラーク群が最も高値を示し、石灰化の進んだ高エコープラーク群は、両プラーク混合型、プラーク無し、異常所見無しの群よりも低値を示した。成人病検診症例で認められた IMT との相関は、頸動脈エコー検査施行患者では認められなかったが、プラークの最大径と正の相関を示した。この相関は低エコープラーク群でより明確であつた。さらに、糖尿病併発例の血中グルコース濃度に寄る補正により、低エコープラーク群でのプラーク最大径との相関がより強まった。不安定プラークでは脂質とともに多くの Mφが観察されることから、sFcγRIIIa^M測定が新しい不安定プラーク検出法になる可能性が示唆された。

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 1 件)

1. NK 細胞およびマクロファージの機能測定法. 榎田緑, 高橋伯夫. 臨床病理 59 (1), 50-54, 2011/01. 査読無

[学会発表] (計 17 件)

1. Increase of soluble FcγRIIIa derived from macrophages in plasma from patients examined with brachial-ankle pulse wave velocity. Midori MASUDA and Hakuo TAKAHASHI. 第 41 回日本免疫学会総会・学術集会, 2012, 12, 5-7 (神戸、神戸国際会議場)

2. Soluble FcγRIIIa^{Mφ} levels in plasma correlate with maximum plaque diameter in patients examined with carotid arterial echography. Midori Masuda, Keiko Kouno, Noriko Nishimura, Hiroya Masaki, Toyohiko Yokoi, Masamichi Yoshika, Yutaka Komiyama, Toshiji Iwasaka, and Hakuo Takahashi. 12th Asian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine, (国立京都国際会館, Kyoto, Japan), 2012, 11, 29-12, 1.

3. 血圧脈波検査施行患者における可溶性 FcγRIIIa^{Mφ}の増加. 榎田緑, 横井豊彦, 正木浩哉, 高橋伯夫. 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会, 2012, 11, 29-12, 2 (京都、国立京都国際会館)

4. 頸動脈エコー検査施行患者における可溶性 FcγRIIIa^{Mφ}の増加. 榎田緑, 高橋伯夫. 第 40 回日本臨床免疫学会総会, 2012, 9, 27-29. (東京、京王プラザホテル)

5. Effects of blood sugar on the value of soluble FcγRIIIa^M in plasma. Midori MASUDA and Hakuo TAKAHASHI 第 44 回日

- 本動脈硬化学会総会・学術集会, 2012, 7, 19-20 (福岡、ヒルトン福岡シーホーク)
6. Increase of soluble $Fc\gamma RIIIa^{M1}$ in plasma from patients examined with carotid artery echography Midori MASUDA and Hakuo TAKAHASHI. 第40回日本免疫学会総会・学術集会, 2011, 11, 27-29 (千葉、幕張メッセ)
7. 腎生検施行患者における尿中可溶性 $Fc\gamma RIIIa$ の増加. 梶田緑, 高橋伯夫. 第15回日本心血管内分泌代謝学会学術総会, 2011, 11, 25-26 (大阪、千里ライフサイエンスセンター)
8. 頸動脈エコー検査施行患者における可溶性 $Fc\gamma RIIIa^{M\phi}$ の増加. 梶田緑, 高橋伯夫. 第15回日本心血管内分泌代謝学会学術総会, 2011, 11, 25-26 (大阪、千里ライフサイエンスセンター)
9. 腎症における尿中可溶性 $Fc\gamma RIIIa$ の増加. 梶田緑, 正木浩哉, 高橋伯夫. 第58回日本臨床検査医学会学術集会, 2011, 11, 18-20 (岡山、岡山コンベンションセンター)
10. 可溶性 $Fc\gamma RIIIa$ 測定値に及ぼす血糖の影響. 梶田緑, 高橋伯夫. 第54回日本臨床検査医学会近畿支部総会, 2011, 10, 29. (大津、ピアザ淡海)
11. Increase of soluble $Fc\gamma RIIIa^{M1}$ in plasma from patients examined with carotid artery echography. Midori MASUDA and Hakuo TAKAHASHI. 第43回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2011, 7, 15-16 (札幌、ロイトン札幌).
12. 血球細胞除去用浄化器アダカラム適用による可溶性 $Fc\gamma RIIIa$ の減少. 梶田緑, 高橋伯夫. 第53回日本臨床検査医学会近畿支部総会, 2010, 12, 11-12. (奈良、奈良文化会館)
13. 頸動脈エコー検査施行患者における可溶性 $Fc\gamma RIIIa^{M\phi}$ の増加. 梶田緑, 横井豊彦, 正木浩哉, 高橋伯夫. 第57回日本臨床検査医学会学術集会, 2010, 9, 9-12. (東京、京王プラザホテル)
14. NK細胞およびマクロファージの機能測定法. 梶田緑, 高橋伯夫. 第57回日本臨床検査医学会学術集会, 2010, 9, 9-12. (東京、京王プラザホテル)
15. Measurement of soluble $Fc\gamma RIIIa$ and soluble $Fc\gamma RIIIa^{M\phi}$ in urine from patients with proteinuria. Midori Masuda, Satoshi Morimoto, Shi Yan Hong, Tatsuyoshi Morita, Noriko Nishimura, Nobuyuki Takahashi, Hiroya Masaki, Keiko Kouno, Toyohiko Yokoi, Masamichi Yoshika, Yutaka Komiyama, Toshiji Iwasaka, and Hakuo Takahashi. 14th International Congress of Immunology, (神戸ポートピアホテル、神戸国際展示場、Kobe, Japan), 2010, 8, 22-27.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶田 緑 (MASUDA MIDORI)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号：50173753