

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 5月23日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590565

研究課題名（和文）一般健常集団における心血管リスクとしての血小板・内皮マイクロパーティクル

研究課題名（英文）Are platelet-derived / endothelial cell-derived microparticles risks for cardiovascular events in general population?

研究代表者

安岡 逸 (YASUOKA SUGURU)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：10461435

研究成果の概要（和文）：

一般健常人における血小板由来および内皮由来マイクロパーティクル（PDMP および EMP）の意義を、田主丸健診において、検討を試みた。既報（旧式フローサイトメトリー[FCM]測定装置を使用）のFCM法に従い、高感度の最新式BD社製FacsCantoIIで用いてPDMP・EMP定量測定を行ったが、測定値の再現性に欠けていた。そこで、種々の実験条件適正化を試み、PDMPについては比較的再現性のある定量測定が可能となった。一方、EMPは現時点のFCM法では測定限界以下であることが示唆された。従来法によるマイクロパーティクル分画が非特異的ノイズを高めていた。

研究成果の概要（英文）：

We sought to investigate the clinical significance of platelet-derived MP (PDMP) and endothelium-derived MP (EMP) in healthy general subjects who were registered in the Tanushimaru study. PDMP-/EMP-rich fraction was obtained and kept frozen in 2,100 subjects. We performed PDMP/EMP sampling and flow-cytometry using new flow cytometric machine with high sensitivity and specificity, according to the widely used method which was done using old-type of flow cytometric machine. However, the PDMP and EMP measurements were lack in the reproducibility. Thus, we tried to optimized the flow cytometric procedure. After optimization, acceptable reproducibility of quantitative PDMP measurement was obtained, but we have not yet optimized the procedure of quantitative EMP measurement.

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	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
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：社会医学・衛生学

キーワード：予防医学、動脈硬化、血圧脈波、心血管リスク

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究に関する国内・国外の研究動向及び位置づけ

①血管傷害は、喫煙や生活習慣病により引き起こされ、高血圧・動脈硬化・心不全の発症進展に関与する。これらの心血管病はわが国における死亡原因の約3分の1を占める。マイクロパーティクル(MP)は、活性化された血球(血小板など)や傷害された血管構成細胞(内皮細胞、平滑筋細胞など)から循環血中に遊離・放出された細胞膜を主構成要素とする微小粒子である。血小板由来MP(platelet-derived MP; PDMP)は、血栓性亢進に関与するのみならず、接着因子発現を介して動脈硬化の発症・進展に関与する可能性が示唆されている。末梢血中PDMPは急性冠症候群などの急性血栓性疾患で増加するが、近年、末梢動脈疾患においても増加していることが報告されている。一方、内皮由来MP(endothelium-derived MP; EMP)は血管内皮細胞の傷害のマーカーと考えられている。メタボリックシンドロームや冠動脈疾患において末梢血中EMPが増加することが知られている。

②このようにPDMPとEMPは、血管傷害を反映する可能性が示唆されているが、これまで一般健常人における①末梢血PDMP数およびEMP数(いわゆる標準値)、②末梢血PDMPとEMPの規定因子、特にその他の既知の心血管危険因子との関係、③頸動脈エコー内膜中膜複合体厚(IMT)などの心血管疾患サロゲートマーカーとの関係、ひいては④将来における心血管疾患発症との予測因子となりうるか、についてこれまで、国内外において検討されたことはない。

(2) これまでの研究成果および着想に至った経緯

①我々は、1958年以来、世界7か国共同疫学研究の日本におけるコホートとして、福岡県田主丸町(現・久留米市田主丸町)にて50年以上、一般住民を対象とした疫学研究を継続している。田主丸研究は、ほぼ10年間隔で3000人以上の大規模疫学検診ならびに栄養調査を行っており、悉皆性が極めて高いことで評価されている。これまでに、安静時心拍数と心血管事故の相関、血中asymmetric dimethylarginine (ADMA), hepatic growth factor, dehydroepiandrosteroneと生命予後の相関、homocysteine, 長鎖N-3脂肪酸と動脈硬化、血中インスリンなど、新たな心血管危険因子を報告し循環器予防医学に貢献してきた。

②平成21年、分担研究者の足達を中心に田主丸一般住民検診の10年毎の大検診を5月より行った。一般検診・採血に加え、栄養聞き取り調査。心血管事故サロゲートマーカー

として10年前からは心エコー、頸動脈エコーIMT測定、今回からは血圧脈波検査AI(Augmentation Index)値も計測した。

③申請者は、マクロファージ・リンパ球を中心とした炎症細胞をターゲットとした高血圧・動脈硬化の新規治療法・診断法の臨床的・基礎的研究を展開している。

④以上のことから、悉皆性が高く、心血管危険因子や栄養調査に関する詳細なデータを有し、横断的研究のみならず50年におよぶ縦断的研究の実績を有する田主丸研究コホートにおいて、末梢血中PDMPおよびEMPを測定することにより、一般健常人におけるPDMPおよびEMPの意義を明らかに出来るのではないかと考えた。

2. 研究の目的

血管障害の直接的指標であるPDMPとEMP測定による一般健常人における心血管疾患発症リスクの層別化が可能とすることである。具体的には、田主丸検診における一般健常人集団において、末梢血中PDMP数およびEMP数を測定し、

(1) 末梢血PDMP数およびEMP数の標準値

(2) 末梢血PDMP数とEMP数の規定因子、特に既知の心血管危険因子との関係

(3) 心血管疾患サロゲートマーカー(頸動脈エコーIMTや血圧脈波検査AI)との関係

(4) 3年次に予後追跡調査を行い、縦断的研究により心血管疾患発症・死亡との関係を解明することであった。

3. 研究の方法

(1) 研究対象:

久留米市田主丸地区において平成21年5月~11月に10年間隔に定期施行された大健診を受診した一般住民約2,100名。

(2) 健診項目:

①一般検診: 問診、身体測定(身長、体重、腹囲)、血圧測定

②一般採血検査: 下記参照

③特殊検査用採血: 下記参照

④検尿・微量アルブミン尿、タンパク尿など

⑤栄養聞き取り調査

⑥心電図、心エコー図、頸動脈エコー(IMT、プラークインデックス)、血圧脈波検査

(3) PDMP・EMP測定:

①末梢静脈血クエン酸採血より

Platelet-free plasma 調製し-80℃冷凍保存

②BD社製FacsCantoIIを用いたフローサイトメトリー法にてPDMP(CD31陰性/CD42b陽性分画)とEMP(CD31陽性/CD42b陰性分画)を定量。

(4) 血液サンプル測定

①一般採血検査: 血算・血液生化学検査

②特殊採血検査: NT-proBNP、血中インスリン、ホモシスチン、カテコラミン、ホルモン

系など ELISA 法にて測定

(5)横断的研究：

①一般健常者における PDMP 数・EMP 数の標準値を算出。

②単変量解析さらには多変量解析により、PDMP 数および EMP 数について規定因子を解明する。特に既知の心血管危険因子との関連、炎症マーカー・血中サイトカイン・酸化ストレス・神経液性因子との関連を検討する。

③心血管イベントのサロゲートマーカー（左室肥大、頸動脈 IMT、血圧脈波検査 AI など）との相関を検討。それに基づき PDMP および EMP の心血管リスクとしての意義を解明。

(6)縦断的研究：

本研究は長期にわたり、総死亡、心事故、脳血管事故、血管事故などの追跡調査を定期的実施して、PDMP および EMP の心血管疾患の予後規定因子としての意義を確立し、一般健常人における心血管リスク層別化を可能にする。今回の申請では 3 年次（平成 24 年度）に第 1 回の予後追跡調査を行い、その結果を中間解析。

4. 研究成果

(1)田主丸健診：

平成 21 年 5 月～11 月に大健診を 10 年間隔で定期施行した。一般住民健診に参加した約 2,100 名の一般健診、採血、栄養聞き取り調査、心電図、心エコー図、頸動脈エコー図、血圧脈波測定 augmentation index などのデータを整理、入力し健診データベースを構築した。

(2)EMP・PDMP 測定法の確立：

①田主丸健診サンプルの作成と保存：既報に基づき、末梢血より多血小板分画（platelet-rich plasma）さらに無血小板分画（platelet-poor plasma）を遠心分離法により精製。超遠心を 2 回行施行後、ペレットを冷凍保存した。

②高感度・高特異性 PDMP・EMP 定量測定法の確立：既報に基づき従来法による BD 社製 FacsCantoII を用いた EMP・PDMP のフローサイトメトリー法による測定法を行った。しかしながら、感度が不十分で測定値の再現性に欠けたが、そこで、従来法の感度、特異性、定量性を確認した。具体的には、これまで血中 EMP・PDMP 数の増加が報告されている急性心筋梗塞患者のサンプルの倍数希釈系列を作成し、本法の定量性、測定限界を検討した。電子顕微鏡を用いて形態学的にマイクロパーティクルを確認。しかしながら、計測値の再現性に欠き、非特異的シグナルが多いことが明らかとなった。

そこで、AMI サンプルを用いて種々の条件適正化を試み、PDMP については比較的再現性のある定量測定が可能となった。一方、EMP に関しては最終的にシグナル/ノイズ比の改

善が得られず現時点のフローサイトメトリー法では測定限界以下である可能性が示唆された。さらに従来法によるマイクロパーティクル分画が非特異的ノイズを高めている可能性を見出した。

(3)考察および今後の展望

従来法に基づいた予備実験においては一定の結果が得られたが、それは旧式フローサイトメトリー測定装置を用いた実験であり、ノイズ（特にマイクロバブルなど）を拾っていた可能性がある。フローサイトメトリー法の進歩によって測定限界下限が広がったことで、それがノイズであった可能性が示唆された。今後、さらに分画採取法、フローサイトメトリー法の適正化を行い、既報の確認実験を行い、PDMP および EMP の真の意義を明らかにしたい。

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 7 件）

1. Yasuoka S, Kai H, Kajimoto H, Ane-gawa T (他 8 名) Blood pressure variability activates cardiac mineralocorticoid receptor and induces cardiac remodeling in hypertensive rats. *Circ J* [Advance Publication] Released: March 07, 2013. doi: 10.1253/circj.CJ-12-1253. 査読有
2. 姉川敬裕, 甲斐久史, 梶本英美, 安岡逸 (他 8 名) マイクロコンベックス型探触子を用いた経口腔頸部血管超音波検査法(modified TOCU). *脳卒中* 35 (1):1-4, 2013. 査読有
3. Ikeda A, Kai H, Kajimoto H, Yasuoka S (他 2 名) Selective gene expression analysis of muscular and vascular components in hearts using laser microdissection method. *Int J Vasc Med* 2012, Article ID 863410, 5 pages, 2012. doi:10.1155/2012/863410. 査読有
4. Kajimoto H, Kai H, Yasuoka S, Ane-gawa T (他 5 名) Inhibition of eNOS phosphorylation mediates endothelial dysfunction in renal failure: new effect of asymmetric dimethylarginine. *Kidney Int* 81:762-768, 2012. 1 February 2012 [epub ahead of print] doi: 10.1038/ki.2011.476. 査読有
5. Ane-gawa T, Kai H, Kajimoto H, Yasuoka S (他 9 名) High-sensitive troponin T is associated with atrial fibrillation in a general population.

- Int J Cardiol 156:98-100, 2012. 2012, Jan 20 [epub ahead of print] doi:10.1016/j.ijcard.2011.12.117. 査読有
6. Mori T, Kai H, Kajimoto H, Yasuoka S, Ane-gawa T (他 6 名) Enhanced cardiac inflammation and fibrosis in ovariectomized hypertensive rats -A possible mechanism of diastolic dysfunction in postmenopausal women- Hypertens Res 34:496-502, 2011. 2011, Jan 20 [Epub ahead of print] DOI: HR.2010.261. 査読有
 7. Takayama N, Kai H, Yasuoka S, Ane-gawa T, Kajimoto H (他 4 名) Simvastatin prevents large blood pressure variability-induced aggravation of cardiac hypertrophy in hypertensive rats by inhibiting RhoA/Ras-ERK pathways. Hypertens Res 34:341-347, 2011. 2010, Dec 2 [Epub ahead of print] DOI: HR.2010.229. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. 甲斐久史、安岡 逸、梶本英美 (他 7 名) 血圧変動増大はPAK-MR系を介して高血圧性臓器障害を助長する. 第 49 回日本臨床分子医学会学術集会(2012 年 4 月 12-13 日、京都)
2. Yasuoka S, Kai H, Kajimoto H, Ane-gawa T (他 6 名) p21-Activated Kinase-Mineralocorticoid Receptor Pathway Aggravates Cardiac Inflammation and Remodeling in Hypertensive Rats with Large Blood Pressure Variability. American Heart Association Scientific Meeting 2011 (2011.11.12-16, Orlando, FL, USA)
3. Ane-gawa T, Kai H, Kajimoto H, Yasuoka S (他 9 名) Cardiac Troponin T Detectable with a Highly Sensitive Assay is Associated with Atrial Fibrillation in the General Population. 第 15 回日本心不全学会 (2011 年 10 月 7-10 月 9 日、東京)
4. Yasuoka S, Kai H, Kajimoto H, Ane-gawa T (他 3 名) Inhibition of Mineralocorticoid Receptor Prevented the Large Blood Pressure Variability-Induced Aggravation of Perivascular Inflammation and Cardiac Remodeling in Spontaneously Hypertensive Rats. 第 75 回日本循環器学会学術集会 (2011 年 8 月 3-4 日、横浜)
5. 安岡逸、甲斐久史、梶本英美、姉川敬裕 (他 3 名) エプレレノン自然高血圧発

症高血圧ラットにおいて血圧変動の増大により引き起こされる高血圧性心リモデリングを抑制する. 第 33 回日本高血圧学会総会 (2010 年 10 月 15-17 日、福岡)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安岡 逸 (YASUOKA SUGURU)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号 : 10461435

(2) 研究分担者

姉川 敬裕 (ANEGAWA TAKAHIRO)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号 : 00511833

足達 寿 (ADACHI HISASHI)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号 : 4021251

梶本 英美 (KAJIMOTO HIDE MI)
久留米大学・循環器病研究所・助教
研究者番号 : 50349700

甲斐 久史 (KAI HISASHI)
久留米大学・医学部・准教授
研究者番号 : 60281531

(3) 連携研究者
なし