

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591026

研究課題名(和文)末梢血多核白血球 Rhoキナーゼ測定：冠攣縮性狭心症の新たなバイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Rho-kinase activity in circulating neutrophils as a useful biomarker for diagnosis and disease activity assessment of vasospastic angina

研究代表者

安田 聡 (YASUDA, Satoshi)

独立行政法人国立循環器病研究センター・病院・部門長

研究者番号：00431578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：末梢血多核白血球でのRhoキナーゼ活性測定が、冠攣縮性狭心症(およびその関連疾患)の診断や活動性評価に有用であるかについて検討した。アセチルコリン誘発試験陽性群では、陰性群に比し有意にRhoキナーゼ活性が上昇していた。また、Rhoキナーゼ活性はストレス(東日本大震災前後の比較、PTSDスコアとの比較)とよく相関し、かつ冠攣縮性狭心症に特徴的な日内変動も認められた。以上より末梢血好中球Rhoキナーゼ活性は疾患活動性を反映したバイオマーカーとして今後更なる研究が期待される。

研究成果の概要(英文)：We examined whether Rho-kinase activity is systemically enhanced in vasospastic angina (VSA) patients. The Rho-kinase activity was significantly higher in the VSA group than in the non-VSA group. We also found that Rho-kinase activity of VSA patients was transiently enhanced associated with disaster-related mental stress and that Rho-kinase activity exhibits distinct circadian variation associated with alterations in coronary vasomotor responses. These results indicate that Rho-kinase activity in circulating neutrophils may be a useful biomarker for diagnosis and disease activity assessment of the vasospastic disorder.

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：循環器内科学

キーワード：ストレス

末梢血多核白血球を用いた Rho キナーゼ活性測定：冠攣縮性狭心症及び関連疾患の新たな非侵襲的バイオマーカーの開発

1. 研究開始当初の背景

日本人において冠動脈攣縮は、虚血性心疾患全般の発症に関与していることが知られている。しかしながら、その診断には侵襲的な誘発試験が必要であることが多く、活動性・治療効果判定については症状にのみ依存しているのが現状である。

Rho-キナーゼは、低分子量 GTP 結合タンパク質 Rho の標的蛋白質として同定された細胞内セリンスレオニンリン酸酵素であり、冠動脈攣縮の病態にも重要な役割を果たしていることが知られている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、末梢血多核白血球での Rho キナーゼ活性を測定することにより、冠攣縮性狭心症(VSA)の新たな非侵襲的バイオマーカーの開発を目指すことである。

3. 研究の方法

末梢血多核白血球 Rho キナーゼ活性測定 (myosin binding subunit (MBS)リン酸化測定): 白血球はハンクス平衡塩溶液で懸濁し、60 分間静置する。懸濁液に TCA 溶液を加えタンパク質を沈殿させ、タンパク質溶液を得る。タンパク質溶液は、SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて、電気泳動を行い、その後 PVDF 膜に転写する。MBS, リン酸化スレオニン 696MBS をそれぞれに対する抗体を PVDF 膜に用いて検出する。Positive Control として、NIH3T3 細胞から抽出されたタンパク質溶液を用いる。MBS のリン酸化はリン酸化スレオニン 696MBS と MBS の比で表し、Positive Control の MBS のリン酸化の値で補正する。

4. 研究成果

(1) 冠攣縮性狭心症の診断法としての評価

対象は安静時胸痛の精査の目的に冠動脈攣縮誘発試験を受けた連続 53 名である。アセチルコリン負荷試験に対する血管反応性により、陰性=対照群 20 例、陽性=VSA 群 33 例の 2 群に分類し比較検討した。2 群間では年齢、性別、冠危険因子や高感度 C 反応蛋白といった患者背景に有意差を認められなかったもの、末梢血多核白血球中の Rho-kinase 活性は VSA 群で対照群に比し有意に上昇していた(対照群, 0.95 ± 0.22 vs. VSA 群, 1.33 ± 0.37 , $P < 0.001$)。しかしながら冠危険因子の集積数や喫煙歴とは相関は認められなかった。VSA 群内で臨床的に不安定ないし重症狭心症像を呈する 15 例では、安定狭心症像を呈する 18 例に比し Rho-kinawse 活性は高値であった。VSA 群全例で Ca 拮抗薬による薬物療法が行われ、うち 21 名では 3 ヶ月後に Rho-kinawse 活性が再検された。急性期に比し 3 ヶ月には Rho-kinase 活性は有意に低下

していた(急性期: 1.43 ± 0.36 vs. 3 ヶ月後 1.08 ± 0.31 $P < 0.001$)。また Rho-kinase 活性の%減少率は症状の改善度とよく相関していた。末梢多核白血球中 Rho-kinase 活性測定による VSA 診断可能性を ROC 解析で検討したところ、感度 83%、特異度 90%、AUC 0.85 であり有用であると考えられた。

(2) 末梢血好中球 Rho キナーゼ活性に基づくストレスと疾患活動性の検討

対象は、東日本大震災前にアセチルコリン誘発試験陽性で VSA と診断し、Rho キナーゼ活性測定例を有する 11 症例(年齢 62 ± 11 歳、男/女 8/3、左室駆出率 71%)、震災 6 ヶ月後、12 ヶ月後に採血し経時的な変化を評価した。全例でカルシウム拮抗薬の服用は震災前後で継続できていたにもかかわらず、Rho キナーゼ活性は、前: 0.99 ± 0.34 から 6 ヶ月後 1.71 ± 0.23 に有意に ($P < 0.001$) 上昇していた。12 ヶ月後は 0.90 ± 0.34 に減少 ($P < 0.001$ vs 6 ヶ月)、震災前の値にまで回復していた。震災後に症状が増悪した患者は、津波の被害を受けており、PTSD スコア及び Rho キナーゼ活性変化率が高値であった。PTSD スコアと Rho キナーゼ活性変化率の間には、正の相関関係を認めた。

(3) 末梢血好中球 Rho キナーゼ活性の日内変動に関する検討

対象はアセチルコリン誘発試験陽性にて VSA と診断した 31 例(男/女 23/8, 年齢 57 ± 13 [SD] 歳)、対照として非 VSA 患者 18 例(男/女 8/10, 年齢 57 ± 14 歳)を設定し、6:00、12:00、21:00 に採血を行った。Rho キナーゼ活性は、6 時の時点で VSA 群では非 VSA 群に比し、有意に高値を示した (1.17 ± 0.17 vs. 0.92 ± 0.22 , $P < 0.001$)、VSA 群では統計上有意な日内変動が認められたが (1.00 ± 0.15 at 21:00, 1.17 ± 0.17 at 6:00 and 1.12 ± 0.22 at 12:00, $P < 0.001$)、非 VSA 群では明らかではなかった (0.96 ± 0.20 at 21:00, 0.92 ± 0.22 at 6:00, and 1.03 ± 0.26 at 12:00, $P = 0.07$)。結論: 末梢血好中球 Rho キナーゼ活性は冠攣縮性狭心症の診断および活動性指標のバイオマーカーとして今後更なる展開が期待される。

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 5 件) 全て査読有

Nihei T, Takahashi J, Tsuburaya R, Ito Y, Shiroto T, Hao K, Takagi Y, Matsumoto Y, Nakayama M, Miyata S, Sakata Y, Ito K, Shimokawa H. Circadian Variation of Rho-Kinase Activity in Circulating Leukocytes of Patients With Vasospastic Angina. *Circ J*. 2014 Mar 27. [Epub ahead of print]

Kawarada O, Sakamoto S, Harada K,

Ishihara M, Yasuda S, Ogawa H. Contemporary crossing techniques for infrapopliteal chronic total occlusions. J Endovasc Ther. 2014 ;21:266-80.

Kaneyama J, Kawarada O, Sakamoto S, Harada K, Ishihara M, Yasuda S, Hisao O. Vasospastic limb ischemia presenting acute and chronic limb ischemia. Ann Vasc Dis 2014 in press

Nihei T, Takahashi J, Kikuchi Y, Takagi Y, Hao K, Tsuburaya R, Shiroto T, Ito Y, Matsumoto Y, Nakayama M, Ito K, Yasuda S, Shimokawa H. Enhanced Rho-kinase activity in patients with vasospastic angina after the Great East Japan Earthquake. Circ J. 2012;76:2892-4.

Kikuchi Y, Yasuda S, Aizawa K, Tsuburaya R, Ito Y, Takeda M, Nakayama M, Ito K, Takahashi J, Shimokawa H. Enhanced Rho-kinase activity in circulating neutrophils of patients with vasospastic angina: a possible biomarker for diagnosis and disease activity assessment. J Am Coll Cardiol. 2011 ;58:1231-7.

〔学会発表〕(計4件)

2013年8月31日～9月4日 European Society of Cardiology 2013 (Amsterdam, Netherlands)

31.Nihei T, Takahashi J, Kikuchi Y, Tsuburaya R, Shiroto T, Ito Y, Matsumoto Y, Nakayama Y, Ito K, Shimokawa H. Circadian variation of Rho-kinase activity associated with enhanced coronary reactivity in patients with vasospastic angina

第78回日本循環器学会学術集会(2014年3月21日～23日、東京)

11.(FRS13:Angina Pectoris (Clinical), Coronary Revascularization/PCI (Complex Lesions/DES/Restenosis/Others)) Taro Nihei, Jun Takahashi, Yoku Kikuchi, Kiyotaka Hao, Yusuke Takagi, Ryuji Tsuburaya, Takashi Shirato, Yoshitaka Itoh, Yasuharu Matsumoto, Masaharu Nakayama, Kenta Ito, Hiroaki Shimokawa Circadian Variation of Rho-kinase Activity in Circulating Leukocytes in Patients with Vasospastic Angina Circulation Journal 2014, 78(Suppl. 1) : I-597

2012年11月3～7日, American Heart Association (AHA) Scientific Sessions (Los Angeles, USA)

Nihei T, Takahashi J, Kikuchi Y, Hao K,

Takagi Y, Tsuburaya R, Shiroto T, Ito Y, Matsumoto Y, Nakayama M, Ito K, Yasuda S, Shimokawa H. Enhanced rho-kinase activity in circulating neutrophils of patients with vasospastic angina after the Great East Japan Earthquake. (#9574)

2012年8月25日～29日, European Society of Cardiology Congress 2012 (Munich, Germany)

Nihei T, Takahashi J, Kikuchi Y, Ito Y, Tsuburaya R, Takagi Y, Nakayama M, Ito K, Yasuda S, Shimokawa H. Increased Rho-kinase activity in patients with vasospastic angina after the Great East Japan Earthquake disaster.

〔図書〕(計1件)

Yasuda S, Shimokawa H. The Pathogenesis of Vasospastic Angina. In: Kaski JC, Eslick GD, Bairey Merz CN (eds.), Chest Pain with Normal Coronary Arteries, pp.91-99. Springer-Verlag, London, UK, 2013

〔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

安田聡(YASUDA, Satoshi)

国立循環器病研究センター・病院・部門長

研究者番号: 00431578

(2) 研究分担者

下川宏明(SHIMOKAWA, Hiroaki)

東北大学大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 00235681

高橋潤(TAKAHASHI, Jun)
東北大学大学院医学系研究科・講師

研究者番号：00375081