

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591078

研究課題名(和文) 動脈硬化性血管障害へのS100A12タンパク質の関与とその機序の解明

研究課題名(英文) High circulating S100A12 is a predictor for cardiovascular mortality in ESRD patients.

研究代表者

小崎 篤志 (KOSAKI, Atsushi)

摂南大学・看護学部・教授

研究者番号：40330188

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：維持透析患者847症例で血管障害イベント(脳血管障害、心血管障害、四肢虚血疾患)の新規発生および死亡をエンドポイントとして、血中S100A12タンパク質濃度とその寄与因子となるかを前向き観察した。観察2年目終了時点において新規血管障害による死亡群の血中S100A12タンパク質濃度は非死亡群より有意に高値であること、血中S100A12タンパク質濃度の中央値で症例を2分割すると、濃度高値群において低値群より血管障害による死亡数が有意に多く、生存率が低い事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Background and Design: S100A12 is an endogenous receptor ligand for advanced glycation end products. Cardiovascular disease remains a major cause of morbidity and mortality in patients with chronic kidney disease. In this study, we report two-year prospective study on 847 hemodialysis patients and assess the relationship between plasma S100A12 level and cardiovascular disease. We investigated the onset or death of cardiovascular disease as an endpoint. Results: During the follow-up, 35 cardiovascular deaths were occurred. S100A12 level, measured at baseline, was significantly elevated in dead patients compared with survived patients. Cumulative incidence of cardiovascular death by Kaplan-Meier estimation was significantly higher in the higher half of plasma S100A12 than in the lower half. Conclusions: Plasma S100A12 is elevated in the cardiovascular dead, and high circulating S100A12 is a predictor for cardiovascular mortality in ESRD patients.

研究分野：腎臓学

キーワード：S100A12 心血管障害 末期腎臓病 動脈硬化

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 を受容体として、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) や全身の血管炎症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 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 (J Clin Endocrinol Metab 89:5423-5428, 2004) 平成 20 ~ 23 年度基盤研究 C に採択されました「血中 S100A12 タンパク質の動脈硬化および心血管イベントの関与に関する研究」において、慢性腎不全による維持透析症例で血中 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。また、これら維持血液透析施行症例においては血中 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、動脈硬化の増悪寄与因子としての血中 S100A12 タンパク質の役割を新たに発見し報告いたしました (Am J Nephrol 29:18-24, 2009)。

さらに同研究において、冠動脈・脳・四肢末梢などの血管障害を併ししやすい糖尿病および慢性腎臓病 (CKD) 症例における血中 S100A12 タンパク質濃度と血管合併症との関係をまず横断的研究 (cross-sectional study) 後向き研究 (retrospective study) で検討し、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共にデータベース作成を行い、平成 22 年度までに約 800 症例に達しております。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ロジスティック回帰分析で行ったところ、血中 S100A12 濃度の上昇が心血管イベント合併の有意な独立寄与因子の一つであることが明らかとなり報告いたしました (Clin J Am Soc Nephrol. 6: 718-723, 2011)。

また、非糖尿病患者群 348 名においても血中 S100A12 濃度の上昇は心血管イベント合併の有意な独立寄与因子であり、これらの事より RAGE の内因性のリガンドである S100A12 タンパク質が糖尿病や慢性腎臓病 (CKD) 症例において血管障害に関与している可能性が示唆されました。

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さらに明らかにする。

これまでに申請者の実施した横断的研究により慢性腎臓病症例において血中 S100A12 タンパク質が心血管障害イベントの危険因子である可能性が明らかとなったため、同症例に数百例の新規症例を追加して血中 S100A12 タンパク質濃度を含む各種臨床的パラメーターのデータベースを作成し、大規模の前向き研究 (prospective study) を行い、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をさらに明らかにする。

(2) 動脈硬化性血管障害の機序の一つと考えられている慢性炎症への S100A12 タンパク質の関与を検討し、治療標的と成り得るかを明らかにする。

上記のように 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示唆されつつある。そこで、動脈硬化性血管障害の機序の一つと考えられている低レベルでの慢性炎症への各血球系の S100A12 タンパク質の関与を検討する。また S100A12 タンパク質の転写、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) これまでの申請者の横断的研究により慢性腎臓病症例において血中 S100A12 タンパク質濃度が血管障害イベントに寄与している可能性が明らかとなったため、同症例に数百例の新規症例を追加して血中 S100A12 タンパク質濃度を含む各種臨床的パラメータのデータベースを作成し、大規模の前向き研究(prospective study)を行い、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をさらに明らかにするために、これまで作成した 500-600 症例に数百例の新規症例を追加して、新たな臨床データベースを作成する。症例登録後の新規血管障害イベント(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 3~5 年間行うこととする。集約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危険因子を解析する。

(2) 動脈硬化性血管障害の機序の一つと考えられている微少な慢性炎症への S100A12 タンパク質の関与を検討する第一段階として、ヒトの白血球のフローサイトメトリー解析を確立し、S100A12 の発現の増減を、まず慢性炎症疾患である膠原病症例等のサンプルで継時的観察を行い、臨床的検出限界を明らかとし、検出可能であれば糖尿病や慢性腎臓病症例へ拡大する。実際には、ヒト白血球の S100A12 フローサイトメトリー解析は、市販の抗ヒト CD14 または Cd11b 抗体と我々の作成した抗ヒト S100A12 マウスモノクローナル抗体(hCF1-13)を用いて標識し、FACS 装置により 2 次元解析しサイトグラム上で S100A12 陽性細胞の領域をゲーティングし、その中の細胞群の定量・同定を試みる。

4. 研究成果

(1) まず、これまでに登録された 550 症例において、血中 S100A12 タンパク質濃度の心血管イベントへの関与をさらに明らかにするために、症例登録後の総死亡と新規血管障害イベント(脳血管障害、心血管障害、四肢虚血疾患)の発生および死亡をエンドポイントとして、前向き観察研究(prospective study)を 2 年間行った。

2 年間に 50 症例(9%)が死亡した。死因は心血管イベント 19 例、感染症 10 例、悪性疾患 8 例、消化管出血などその他の疾患 13 例であった。死亡群の血中 S100A12 タンパク質濃度は非死亡群より有意に高値を示した(25.1 vs 17.9ng/ml, $p<0.001$)。血中 S100A12 タンパク質濃度の中央値(18.79ng/dl)にて 2 分割して Kaplan-Meier 法にて生存率を解析すると、S100A12 濃度高値群において有意に生存率が低かった($p=0.001$)。しかし、血管障害の発生および死亡数には有意差は認めなかった。

総死亡の危険因子を Cox 比例ハザードモデルにて解析すると、血中 S100A12 濃度高値(

18.79ng/dl, HR=2.267)・年齢(65 歳, HR=1.961)・血中アルブミン濃度低値(<3.5 g/dl, HR=2.198)・心血管疾患の既往(有, HR=2.068)が有意な危険因子であった。またこれら 4 因子の累積点数化を行い、新たに登録した 303 症例において、累積点数別の総死亡率を検討し、この新規症例群においても累積点数の増加に伴って総死亡率は有意に増加し、予後の推定に有用である事を発見した。次に、これらの疫学的結果をふまえ、その後新規観察終了した 297 症例を追加して計 847 症例で血管障害イベント(脳血管障害、心血管障害、四肢虚血疾患)の新規発生および死亡をエンドポイントとして、血中 S100A12 タンパク質濃度がその寄与因子となるかを再検討した。結果は前向き観察 2 年目終了時点において新規血管障害による死亡群($n=35$)の血中 S100A12 タンパク質濃度は非死亡群より有意に高値であること(36.3 vs 25.6 ng/ml; $p<0.01$)。血中 S100A12 タンパク質濃度の中央値にて 2 分割して解析すると、S100A12 濃度高値群において低値群より血管障害による死亡数が有意に多く(濃度高値群:10/424 症例 vs 濃度低値群:25/423 症例)生存率が低い(LR test: $p=0.0001$)事が Kaplan-Meier 生存分析法で明らかとなった。

最後に、同 847 症例のうち最終的に 6 年間前向き観察できた 393 例において再検討した。結果は観察終了時点において新規または再発血管障害発症群($n=80$)の血中 S100A12 タンパク質濃度は非発症群と有意な差は認めず(29.4 vs 25.6 ng/ml; $p=0.0834$)。登録時の血中 S100A12 タンパク質濃度の中央値にて 2 分割して生存率を Kaplan-Meier 生存分析法を用いて解析しても、S100A12 濃度高値群と低値群の間に生存率の差は認めなかった(LR test: $p>0.05$)。また血管障害イベントによる死亡群($n=16$)での同様の比較でも血中 S100A12 タンパク質濃度および 2 分割生存率ともに差は認めなかった。

これらの結果より、登録時の血中 S100A12 タンパク質濃度がその後の血管障害イベントへの寄与因子となるのは、2 年後程度まででそれ以降は寄与の度合いは少なくなっていく事が明らかとなった。おそらく、血中 S100A12 タンパク質濃度も変動が認められるために登録時の測定濃度が反映される期間は限られるためではないかと考えた。

(2) フローサイトメトリー解析にてヒト白血球の S100A12 タンパク質発現の定量化を試みたが、抗体のバックグラウンド高値を改善できず実験を中止した。

他の検証方法として S100A12 タンパク質の過剰発現トランスジェニックマウスの作製を終了した。

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)

Shiotsu Y, Mori Y, Nishimura M, Hatta T, Imada N, Maki N, Iida K, Iwamoto N, Matsuoka E, Tamagaki K, Kosaki A.
Prognostic utility of plasma S100A12 levels to establish a novel scoring system for predicting mortality in maintenance hemodialysis patients: a two-year prospective observational study in Japan. BMC Nephrol. 査読有 16, 2013, 1-9
DOI: 10.1186/1471-2369-14-16

[学会発表](計2件)

Matsuoka E, Mori Y, Kosaki A.
S100A12 protein induces the proliferation and calcification of smooth muscle cells.
欧州動脈硬化学会 (EAS 2013)
Lyon, France

Shiotsu Y, Mori Y, Matsuoka E, Tamagaki K, Kosaki A.
Prognostic Utility of Plasma S100A12 Levels in Maintenance Hemodialysis Patients.: A Novel Score System for Predicting Mortality.
米国腎臓学会 (ASN Kidney Week 2012)
San Diego, CA, USA

[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

小崎 篤志 (KOSAKI, Atsushi)
摂南大学・看護学部・教授
研究者番号：40330188

(2) 研究分担者(平成25年度まで)

森 泰清 (MORI, Yasukiyo)
京都府立医科大学・医学研究科
研究者番号：40268371

(3) 連携研究者

なし