

令和元年5月24日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05297

研究課題名(和文) Neoatherosclerosisと退行性血管病変の本態解明と治療法開発

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms of neoatherosclerosis and degenerative vascular disease and development of novel therapeutic strategy

研究代表者

木村 剛 (Kimura, Takeshi)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：80359786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、ステント治療後の冠動脈病変と大動脈弁狭窄症の長期間に渡る経年的な観察、病理標本の解析、および動物モデルでの病態の解析と新規デバイスの開発を通じて、neoatherosclerosisと退行性血管病変の本態解明と新規治療法開発に向けた研究を行った。不安定プラークにおけるmicroRNA-33bの役割、Nardilysinの心筋梗塞マーカーとしての有用性、無症候大動脈弁狭窄症に対する早期介入の必要性などが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らは、これまでに動脈硬化に関し多くの基礎実験を重ね、また大規模臨床データを集積して、その治療法に関する提言を行ってきた。今回、大規模臨床データの集積と病理像の解析、さらに基礎的研究を有機的につなげて、ステント治療後の冠動脈病変と大動脈弁狭窄症における課題と治療法に関する研究を行った。不安定プラークにおけるmicroRNA-33bの役割、Nardilysinの心筋梗塞マーカーとしての有用性、大動脈弁狭窄症に対する治療法の改善が必要であることなどが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the mechanisms of neoatherosclerosis and pathogenesis of degenerative vessel diseases, we conducted large scale observation studies, histo-pathological examination of human samples, and research on animal models. We also trying to develop new devices for the treatment of cardiovascular diseases. Contribution of microRNA-33b in the development of unstable plaques and usefulness of measurement of serum nardilysin in the diagnosis of myocardial infarction were clarified. Moreover, it was revealed that asymptomatic patients with severe AS was dismal when managed conservatively in this real-world analysis and might be substantially improved by an initial AVR strategy.

研究分野：循環器内科学

キーワード：neoatherosclerosis 大動脈弁狭窄症 microRNA nardilysin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、これまでに動脈硬化に関し多くの基礎実験を重ね、また大規模臨床データを集積して、その治療法に関する提言を行ってきた (Kimura T et al. Circulation 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2014 など)。しかしながら、薬剤溶出性ステント (drug eluting stent; DES) 留置後一年以降に生じる超遅発性ステント血栓症 (very late stent thrombosis; VLST) と、遠隔期に生じるステント内再狭窄である 'late catch-up' 現象については、解決策がまだ無い。これまでに、VLST、'late catch-up' 現象の共通の原因として、neoatherosclerosis という概念が提唱され、注目を集めている。一方、退行性血管病変である大動脈弁狭窄症 (AS) も病因や至適な治療方針は不明であり、現在その解明が待たれる。我々は 2003 年から 2011 年に高度 AS と診断された症例を登録、臨床発現様式や治療法選択、長期イベントの発生を調査し、わが国の AS の現状把握と、至適な治療方針を探索することを目的とする、医師主導型全国多施設共同臨床研究 (CURRENT AS registry) を開始し、データを集積、解析を開始した (Kimura T et al. JACC 2015)。

2. 研究の目的

冠動脈疾患については DES 留置後一年以降に生じる VLST と、'late catch-up' 現象が、重大な問題として残されている。最近になりステント治療後の neoatherosclerosis がこれらの共通の原因となる病態として注目を集めている。

一方、退行性血管病変である大動脈弁狭窄症もデバイスの進歩があるが、病因や至適な治療方針は不明である。

本研究課題では、ステント治療後の冠動脈病変と大動脈弁狭窄症の長期間に渡る経年的な観察、病理標本の解析、および動物モデルでの病態の解析と新規デバイスの開発を通じて、neoatherosclerosis と退行性血管病変の本態解明と新規治療法開発に向けた貢献をすることが目的である。

3. 研究の方法

臨床研究、基礎研究からのアプローチを行って、neoatherosclerosis、退行性血管病変としての大動脈弁狭窄症の本態に迫り、その対策を講じる予定である。具体的項目は下記の通りである。

【I. Neoatherosclerosis に対する検討】

臨床的検討

多施設による冠動脈疾患血行再建術後の長期成績・予後調査 (CREDO-Kyoto cohort III)

ステント留置後の剖検症例、冠動脈血栓の収集と病理像の評価

血清 miR-33a/b、nordilysin (NRDc) 値のバイオマーカーとしての意義の検討

基礎的検討

薄い線維性皮膜とネクローティックコアにおける miR-33b の関与

血管内皮細胞を早期に増殖、障害血管の再内皮化をはかるデバイスの開発

miR-33b の抑制による不安定プラークに対する治療法の開発

【II. 退行性血管病変に対する検討】

臨床的検討

CURRENT AS registry の解析

大動脈弁狭窄症の病理評価

順行性経皮的な大動脈弁置換術の開発

基礎的検討

変性大動脈弁における網羅的解析

miR-33a/b、NRDc の働きの検討

4. 研究成果

【I. Neoatherosclerosis に対する検討】

臨床的検討

多施設による冠動脈疾患血行再建術後の長期成績・予後調査 (CREDO-Kyoto cohort III)

当科においては、日本における経皮的冠動脈インターベンション (PCI) および冠動脈バイパス手術 (CABG) のレジストリーである、多施設による冠動脈疾患血行再建術後の長期成績・予後調査 (CREDO-Kyoto) を行っている。薬剤溶出性ステントと用いた PCI と CABG の成績を明らかにするために行われたコホート II 研究に引き続き、Cypher が製造販売中止となり、ほぼ第 2 世代の DES に移行した 3 年間のデータを集積するコホート III 研究において症例の固定が終了し、解析を開始した。また、DES の長期追跡結果を評価する RESET 試験 7 年が終了し、エベロリムス溶出ステントとシロリムス溶出ステントの効果に差がないことを報告した (*J Am Heart Assoc.* 2018;7. pii: e008718.)。

ステント留置後の剖検症例、冠動脈血栓の収集と病理像の評価

DES は、内膜増殖を抑制し劇的に再狭窄を減少させたが、一方で内膜被覆化の遅延、血管壁の炎症や過剰反応のために、PCI 後 1 年以降の VLST の発症率が、Bare metal stent (BMS) より DES で高値であると報告されている。また、この現象はいわゆる第 2 世代の DES でも生じるため、その対策が急がれる。最近になり neoatherosclerosis がこれらの共通の原因となる病態と

して注目を集めている。申請者らの吸引血栓を用いた検討においても、BMS 留置後の VLST において、neoatherosclerosis を示す泡沫化マクロファージ、コレステロールクリスタル、菲薄した内膜の存在を認めている。一方、右冠動脈に留置した BMS が閉塞し、バイパスグラフト術を施行した患者の冠動脈を検討したところ、その血管は著明な線維化とコラーゲンに富む組織によって閉塞しており、好酸球を伴う炎症細胞浸潤も認められた。患者はクロミウムに対するアレルギーがあることが分かり、これが VLST の一つの原因である可能性が考えられた (*J Cardiol Cases* 2016;14:161-163)。さらに症例を追加し解析を続けている。

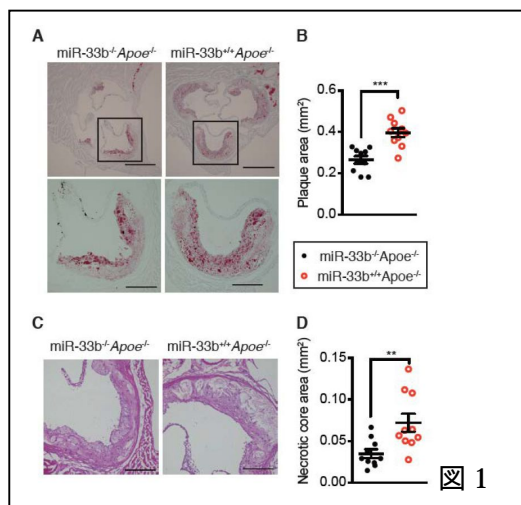
血清 miR-33a/b、nardilysin (NRDc) 値のバイオマーカーとしての意義の検討

これまでに miR-33a が HDL-C の量と質に影響を与えており、この miR-33a の欠損マウスにおいて動脈硬化が減少することを示した。さらにヒトに存在する miR-33b が HDL-C を減少させ、マクロファージの炎症と動脈硬化巣の不安定化を起こすことを示した。さらに血中 miR-33a/b のレベルと neoatherosclerosis、退行性血管病変との関係の解析を続けている。一方、ACS の疑いにて京都大学医学部附属病院循環器内科に入院し、緊急冠動脈造影にて ACS と確定診断された連続症例 (43 例、うち心筋梗塞 35 例、不安定狭心症 8 例) にて、入院時および入院後 6 時間おきの血清を採取し、NRDc 濃度を測定した。その結果、血清 NRDc は入院時にすでにピークに達しており、従来の心筋壊死マーカー (CK-MB, トロポニン T) よりも早期に上昇していることが明らかになった。さらに NRDc の特長として、心筋壊死マーカーが陰性の不安定狭心症症例でも上昇していることが挙げられた。以上の結果は、血清 NRDc が心筋虚血マーカーとして、ACS の超早期診断、不安定狭心症の診断、に有用である可能性を強く示唆した (*Int J Cardiol.* 2017;243:1-8)。

基礎的検討

薄い線維性皮膜とネクローティックコアにおける miR-33b の関与

まずヒト内頸動脈狭窄症に対して内頸動脈内膜剥離術を施行したサンプルを用いて miR-33a/b の発現量解析を行った。すると、miR-33a/b とともにヒト動脈硬化巣における発現が確認された。つぎに、miR-33b^{+/+}マウスを動脈硬化モデル *ApoE*^{-/-}マウスと交配し、動脈硬化巣の形成・進展について検討した。その結果、miR-33b^{+/+}*ApoE*^{-/-}マウスにおいて miR-33b^{-/-}*ApoE*^{-/-}マウスと比べて、動脈硬化巣の形成が増悪した。さらに、プラーク内の炎症細胞浸潤の増加とアポトーシスの増加、それによる壊死性コアの増大を認め、プラークの質的悪化 (不安定化) が生じていることを認めた (図 4)。従って、miR-33b が動脈硬化形成のみならず、心血管イベント発症と相関する不安定プラークの形成に関わる可能性が示唆された。次に、動脈硬化巣での炎症細胞浸潤の増加から、その主役であるマクロファージについて検討した。miR-33b は標的遺伝子 ABCA1/G1 の抑制を介して余剰コレステロールの細胞外排出能を抑制していること、また余剰コレステロールの増加による脂質ラフトの増加が炎症性シグナルを増強することを明らかとなった。さらに骨髓移植実験の結果から、血清脂質プロファイルに関わらず、マクロファージの miR-33b が動脈硬化形成を悪化させることを示した (図 1) (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38:2460-2473.)。



血管内皮細胞を早期に増殖、障害血管の再内皮化をはかるデバイスの開発

PLGA (Poly lactic-co-Glycolic Acid、乳酸-グリコール酸共重合体) ナノ粒子に miR-126 を含有させたものを薬剤溶出性バルーン (Drug Eluting Balloon: DEB) を用いて局所に投与・徐放させる。neoatherosclerosis を抑制し、遅発性ステント血栓症のリスクを低減するデバイスの開発に繋げる。まず、ウサギ腸動脈に DES を留置するモデルを用いて効果を検討したところ、有意にバルーン障害による再狭窄を抑制した (*PLoS One.* 2017;12:e0172798.)。

miR-33b の抑制による不安定プラークに対する治療法の開発

miR-33a および miR-33b に結合する核酸医薬についてはその効果を検討中である。

【II. 退行性血管病変に対する検討】

臨床的検討

CURRENT AS registry の解析

2003 年から 2011 年に高度大動脈弁狭窄症と診断された症例を登録、臨床発現様式や治療法選択、長期イベントの発生を調査し、わが国の大動脈弁狭窄症の現状把握と、至適な治療方針を

探索することを目的とする、医師主導型全国多施設共同臨床研究として開始した。その結果、無症状重症 AS と診断され保存的加療した場合、5 年で約 50% の患者が AVR を受けている。また、無症状重症 AS に早期介入した場合、保存的治療に比べ全死亡、心不全入院が少ないこと、一方、無症状であったが、経過中に重症心不全で入院した場合、AVR が施行されない例が多いことが明らかになった。また、重症 AS 患者において、無症状のうちに AVR で介入した方が、有症状で介入する場合に比べ、周術期死亡が少なく、長期予後が良好であり、無症状重症 AS 患者でもリスク層別化（リスク層別化因子：LVEF、LVMI、Vmax、BNP）を基に早期介入の必要な症例が多いことも示された。また、透析患者は突然死が多く、Surgical AVR を施行すると、大動脈弁手技関連死が極端に多いことも明らかとなった(*Sci Rep.* 2019;9:1924. *J Am Heart Assoc.* 2019;8:e010198. *Heart.* 2018; heartjnl-2018-313746. *Circ J.* 2018;83:198-208. *Heart Vessels.* 2019;34:669-677. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care.* 2018 ;2048872618799993. *Circ J.* 2018 ;82:2663-2671. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2019 ;20:353-360. *Sci Rep.* 2018;8(1):10080. *J Am Heart Assoc.* 2018 ;7. *Eur Heart J Qual Care Clin Outcomes.* 2018 ;4:180-188. *JACC Cardiovasc Interv.* 2018 ;11:145-157. *Sci Rep.* 2017 ;7:14723. *Circ J.* 2018;82(3):874-885. *J Am Heart Assoc.* 2017 ;6. pii: e005524. *J Am Heart Assoc.* 2017 ;6. pii: e004961. *Circ J.* 2017 ;81:485-494. *Int J Cardiol.* 2017 ;228:244-252.)

大動脈弁狭窄症の病理評価

大動脈弁狭窄症の手術、剖検例の病理標本、データの蓄積をはかる。これまでに大動脈弁通過後の乱流が、ずり応力（シアストレス）の変化を生じ、弁を覆う内皮細胞や弁輪部の myofibroblast の炎症性変化と石灰化を引き起こすとされている。我々は IKK β を血管平滑筋および筋線維芽細胞において欠損したマウスが著明な血管の石灰化を起こすことを見出した(図 2)。また、炎症や線維化に関わるペリオスチンを欠損したマウスでは大動脈弁肥厚が起きないことも見出した(未発表)。また、エコーガイド下にガイドワイヤーで大動脈弁に機械的刺激を加えるモデル(AS モデル)を確立した。これらの知見をもとにヒトのサンプルにおいて解析を続けている。

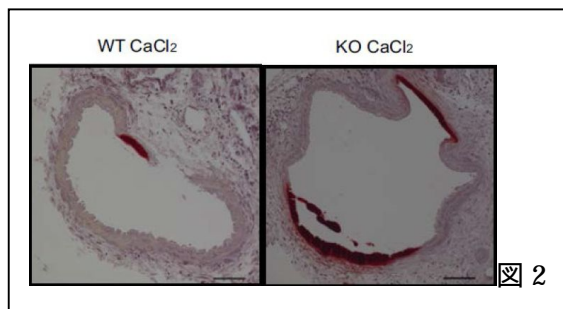


図 2

順行性経皮的な大動脈弁置換術の開発

基礎的検討

経皮的な大動脈弁置換術が広く行われるようになってきたが、心尖部/大動脈アプローチは侵襲性も大きく胸水貯留、術後感染のリスクが報告されている。これらの欠点を改良するため順行性の経皮的な大動脈弁置換術の開発を進めている。本方法では静脈から人工弁カテーテルを挿入、心房中隔穿刺を行いスタイレットを用いて左房内でループを形成しそのまま左室、大動脈と弁及びバルーンを進める(Kimura T et al. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2013, Kimura T et al. *Heart and Vessels.* 2014)。さらに臨床応用へ向けて、デバイスの改良を続けている。

変性大動脈弁における網羅的解析

C57BL/6 マウスにおいて高脂肪食負荷により、大動脈弁に退行性変化が生じ、初期の AS モデルとして利用できることが示されている。実際、このモデルにより図 3 のような病変を作成することが可能である。現在このモデルにつき関連因子を網羅的に解析中である。

miR-33a/b、NRDc の働きの検討

これまでの研究から、microRNA (miR)-33a/b はコレステロール代謝に重要であることが明らかにされてきた。我々はヒトにおける miR-33a/b の新たな標的遺伝子を明らかにする目的で、これらのノックアウトヒト iPS 細胞を作成した。遺伝子発現プロファイルと 3'UTR 解析の結果、SPASTIN という微小管切断活性を示す蛋白をコードする SPAST 遺伝子が新たな標的と確認された。この SPAST は遺伝性痙性対麻痺 (Hereditary Spastic Paraplegia; HSP) の原因遺伝子として知られており (SPG4 と分類) この遺伝子異常で SPAST の発現が減ると疾患が発症する。SPG4 疾患患者より得られた iPS 細胞において、miR-33a をノックダウンすると SPAST の発現が増え、神経突起の長さが長くなるという表現型の改善が認められた。このことにより、miR-33a が SPG4 の治療標的になることが疾患特異的 iPS 細胞を利用して初めて証明された(*Clin Sci* (Lond).

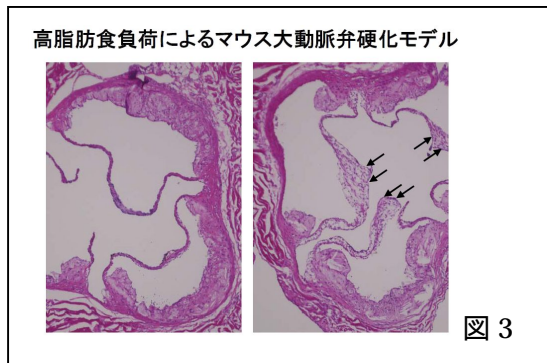


図 3

2019;133:583-595.)。

また、骨髄や血管内において発生する物理的な乱流が血小板生成の鍵であるが、必要な乱流条件を設定可能な縦型培養装置を開発したところ、同定した物理パラメータを調整することによって、8L スケール装置から大量に高品質の血小板（1 千億個以上）を作製することができた。さらに、乱流に伴い巨核球から NRDC などの可溶性因子が放出され、血小板生成を促進していることが明らかとなった(*Cell*. 2018;174:636-648.e18.)。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 55 件)

1. Shiomu H, Hibi K, Kimura T et al. (24 名中 24 番目) (査読あり); RESET Investigators. 7-Year Outcomes of a Randomized Trial Comparing the First-Generation Sirolimus-Eluting Stent Versus the New-Generation Everolimus-Eluting Stent: The RESET Trial. *JACC Cardiovasc Interv*. 2019 Apr 8;12(7):637-647. doi: 10.1016/j.jcin.2019.01.234.
2. Nakazeki F, Kimura T, Ono K et al. (25 名中 23 番目) (査読あり). MiR-33a is a therapeutic target in SPG4-related hereditary spastic paraplegia human neurons. *Clin Sci (Lond)*. 2019 Feb 22;133(4):583-595. doi: 10.1042/CS20180980.
3. Kanamori N, Aoyama T, Kimura T et al. (39 名中 39 番目) (査読あり); CURRENT AS Registry Investigators. Prognostic Impact of Aortic Valve Area in Conservatively Managed Patients With Asymptomatic Severe Aortic Stenosis With Preserved Ejection Fraction. *J Am Heart Assoc*. 2019 Feb 5;8(3):e010198. doi: 10.1161/JAHA.118.010198.
4. Nakazeki F, Kimura T, Ono K et al. (19 名中 18 番目) (査読あり). Loss of periostin ameliorates adipose tissue inflammation and fibrosis in vivo. *Sci Rep*. 2018 Jun 4;8(1):8553. doi:10.1038/s41598-018-27009-9.
5. Minamino-Muta E, Minatoya K, Kimura T et al. (32 名中 32 番目) (査読あり); CURRENT AS registry Investigators. Malignant disease as a comorbidity in patients with severe aortic stenosis: clinical presentation, outcomes, and management. *Eur Heart J Qual Care Clin Outcomes*. 2018 Jul 1;4(3):180-188. doi: 10.1093/ehjqcco/qcy010.
6. Kanamori N, Taniguchi T, Kimura T et al. (38 名中 38 番目) (査読あり); CURRENT AS registry Investigators. Asymptomatic versus Symptomatic Patients with Severe Aortic Stenosis. *Sci Rep*. 2018 Jul 4;8(1):10080. doi: 10.1038/s41598-018-28162-x.
7. Watanabe H, Fujii K, Kimura T et al. (21 名中 21 番目) (査読あり); RESET and NEXT Investigators. Impact of Angiographic Residual Stenosis on Clinical Outcomes After New-Generation Drug-Eluting Stents Implantation: Insights From a Pooled Analysis of the RESET and NEXT Trials. *J Am Heart Assoc*. 2018 Jun 30;7(13). pii: e008718. doi: 10.1161/JAHA.118.008718.
8. Nishino T, Kimura T, Ono K et al. (22 名中 21 番目) (査読あり). SREBF1/MicroRNA-33b Axis Exhibits Potent Effect on Unstable Atherosclerotic Plaque Formation In Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018 Oct;38(10):2460-2473. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311409.
9. Nishiga M, Kimura T, Ono K et al. (22 名中 21 番目) (査読あり). MicroRNA-33 Controls Adaptive Fibrotic Response in the Remodeling Heart by Preserving Lipid Raft Cholesterol. *Circ Res*. 2017 Mar 3;120(5):835-847. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309528.
10. Izuhara M, Kimura T, Ono K et al. (16 名中 15 番目) (査読あり). Prevention of neointimal formation using miRNA-126-containing nanoparticle-conjugated stents in a rabbit model. *PLoS One*. 2017 Mar 2;12(3):e0172798. doi: 10.1371/journal.pone.0172798.
11. Nakao T, Kimura T, Ono K et al. (21 名中 20 番目) (査読あり). Genetic Ablation of MicroRNA-33 Attenuates Inflammation and Abdominal Aortic Aneurysm Formation via Several Anti-Inflammatory Pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017 Nov;37(11):2161-2170. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309768.
12. Taniguchi T, Minatoya K, Kimura T et al. (20 名中 20 番目) (査読あり); CURRENT AS Registry Investigators. Prognostic Impact of Left Ventricular Ejection Fraction in Patients With Severe Aortic Stenosis. *JACC Cardiovasc Interv*. 2018 Jan 22;11(2):145-157. doi: 10.1016/j.jcin.2017.08.036.
13. Minamino-Muta E, Minatoya K, Kimura T et al. (41 名中 41 番目) (査読あり). Causes of Death in Patients with Severe Aortic Stenosis: An Observational study. *Sci Rep*. 2017 Nov 7;7(1):14723. doi: 10.1038/s41598-017-15316-6.
14. Imai M, Kimura T, Inoue K et al. (6 名中 5 番目) (査読あり). Pathological analysis of a case with peri-stent contrast staining after BMS implantation. *J Cardiol Cases*. 2016 Sep 9;14(6):161-163. doi: 10.1016/j.jccase.2016.07.006.

[学会発表] (計 50 件)

1. Takeshi Kimura, High-intensity pitavastatin therapy further improves clinical outcomes in Japanese patients with stable coronary artery disease. 86th EAS CONGRESS. May 5-8, 2018, Lisbon,

Portugal.

2. Takeshi Kimura. Optimal Lipid Lowering Therapy in Japanese Patients: REAL-CAD and Beyond. Asian Pacific Society of Cardiology (APSC) Congress. May 17-20, 2018, Taipei, Taiwan.
3. Takeshi Kimura. Optimal antithrombotic treatment beyond the first year post PCI for ACS. ESC Congress 2018. August 25–29, Munich, Germany.
4. 木村 剛. Complementary Role of Randomized Trials and Registry. 第 82 回 日本循環器学会学術集会. 2018 年 3 月 23 日-25 日, 大阪.
5. 木村 剛. 日本最大の大規模臨床試験 REAL-CAD の報告. 第 82 回 日本循環器学会学術集会. 2018 年 3 月 23 日-25 日, 大阪.

〔その他〕

ホームページ等

<http://kyoto-u-cardio.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：尾野 亘

ローマ字氏名：Koh Ono

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：00359275

研究分担者氏名：芦田 昇

ローマ字氏名：Noboru Ashida

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学研究科

職名：講師

研究者番号（8桁）：00538978

研究分担者氏名：齋藤 成達

ローマ字氏名：Naritatsu Saito

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学研究科

職名：講師

研究者番号（8桁）：20467484

研究分担者氏名：西 英一郎

ローマ字氏名：Eiichiro Nishi

所属研究機関名：滋賀医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：30362528

研究分担者氏名：森本 剛

ローマ字氏名：Takeshi Morimoto

所属研究機関名：兵庫医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：30378640

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。