

令和元年5月31日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09647

研究課題名(和文) 正コレステロール血症の閉塞性動脈硬化症へのLDL吸着先進医療と受容体結合因子

研究課題名(英文) LDL cholesterol apheresis treatment for arteriosclerosis without hypercholesterolemia

研究代表者

大澤 正人(Masato, Ohsawa)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：60733433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：厚生労働省の定める先進医療Bとして実施する「正コレステロール血症を呈する従来治療抵抗性閉塞性動脈硬化症に対するLDLアフェレンス療法」についての、有効性および安全性について多施設共同前向き試験にて症例登録を行い、同療法の分子的作用機序の解明を目指して動脈硬化増悪因子受容体への直接結合因子(ATRAP)に着目した検討を行った。動脈硬化性疾患に罹患した患者の臨床評価指標および血球成分検体を用いて、ヒトATRAP遺伝子の発現解析の検討もあわせて行い、動脈硬化性疾患指標とATRAP遺伝子の発現レベルとの関連性について重要な知見を明らかにし、論文発表した(Atherosclerosis. 2018)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「正コレステロール血症を呈する従来治療抵抗性閉塞性動脈硬化症に対するデキストラン硫酸カラムを用いたLDLアフェレンス療法」についての、有効性の有無および安全性について多施設共同前向き試験にて症例登録を行い、本療法を受ける患者の血球成分(単球・白血球)検体を用いて検討し、正コレステロール血症を呈する従来治療抵抗性閉塞性動脈硬化症の病態、および本療法の臨床的治療効果とATRAPの関連等について重要な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Low-density lipoprotein (LDL) apheresis is a potential therapy for conventional therapy resistant peripheral artery disease. We examined the effects of LDL apheresis on clinical parameters in patients who had the complication of peripheral artery disease without hypercholesterolemia in vivo and in vitro and investigate the association the angiotensin receptor-binding molecule and atherosclerosis. Our study showed that leukocyte ATRAP is an emerging marker capable of reflecting the systemic and leukocyte inflammatory profile, and plays a role as an anti-inflammatory factor in the pathophysiology of non-communicable diseases, including hypertension, atherosclerosis and chronic kidney disease (Atherosclerosis. 269:236-244, 2018).

研究分野：動脈硬化

キーワード：動脈硬化 閉塞性動脈硬化症 脂質異常症 アフェレシス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病、糖尿病等を合併した動脈硬化症患者では、動脈壁を含め組織局所での炎症や酸化ストレスの持続的な亢進状態が生じるために、高コレステロール血症を認めないにもかかわらず(正コレステロール血症)、治療抵抗性の重症閉塞性動脈硬化症が多く、薬物療法が無効、血管内治療や血管外科的治療も困難で、下肢切断術を施行せざるを得なくなり患者のQOLと予後が著しく阻害されることが少なくない。現在高コレステロール血症を呈する治療抵抗性の重症閉塞性動脈硬化症に対してはLDLアフェレシスの保険適応が認められているが、正コレステロール血症の治療抵抗性閉塞性動脈硬化症ではLDLアフェレシスの保険適応は認められていない。

しかし、正コレステロール血症の治療抵抗性閉塞性動脈硬化症に対してLDLアフェレシスを施行した場合の治療効果に関しては複数の小規模臨床研究にて有効性が報告され、また、臨床的にもLDLアフェレシスが試験的に施行されてきた。このような状況において、我々は、臨床的有効性と作用機序の科学的検討目的にて臨床研究を開始し、まず、維持血液透析患者の治療抵抗性閉塞性動脈硬化症に対するLDLアフェレシスの効果が治療開始前の血中LDLコレステロール値に依存せず、正コレステロール血症の場合においてもLDLアフェレシスが維持血液透析患者の治療抵抗性閉塞性動脈硬化症に対して長期的治療効果(歩行距離、ABIの改善)をもたらすことを明らかにした(Tsurumi-Ikeya Y, Tamura K, et al. Jpn J Apheresis 27: 231-235, 2008)。さらに、LDLアフェレシス治療前後の患者血清を用いたヒト血管内皮細胞培養系での検討を行い、血管内皮特異的NO合成酵素の活性化を介した血管内皮細胞機能の改善が重要であることを明らかにし、作用機序に関しても当療法の有効性を報告してきた(Tsurumi-Ikeya Y, Tamura K, et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol 30: 1058-1065, 2010; Tamura K, et al. Ther Apher Dial 17: 185-192, 2013)。

一方、慢性的な病的刺激の持続は、組織レニン-アンジオテンシン系(R-A系)の1型アンジオテンシンII(Ang II)受容体(AT1受容体)の過剰活性化をもたらし、組織での酸化ストレス・炎症・線維化亢進、インスリン抵抗性、心肥大・血管障害促進、腎尿細管Na<sup>+</sup>再吸収channel活性化の継続的な亢進を介して高血圧・慢性腎臓病の発症・増悪、および心腎連関機序による動脈硬化症増悪の病態生理に深く関与していることが知られている。したがって、動脈硬化症の発症・進展において、『AT1受容体=動脈硬化症の増悪受容体』として捉えることができる。これまでに、我々は、AT1受容体への直接結合因子として、同受容体のC末端に特異的に結合する低分子蛋白(AT1 receptor-associated protein; ATRAP/Agtrap, 以下ATRAP)の単離・同定に成功し、『慢性的な病的刺激の持続によるAT1受容体系の過剰活性化に対する機能選択的な受容体情報伝達系の内在性抑制的調節機序を担う新規受容体結合分子』として機能している可能性を報告してきた(Daviet L, Tamura K, et al. J Biol Chem 274: 17058-17062, 1999; Tamura K, et al. Curr Hypertens Rep 9: 121-127, 2007; Tamura K, Ohsawa M, et al. Curr Pharm Des 19: 3043-3048, 2013; Tamura K, et al. Curr Med Chem 22: 3210-3216, 2015)。

### 2. 研究の目的

本研究においては、Fontaine分類B度以上の下肢虚血症状を有し、膝窩動脈以下の閉塞又は広範な閉塞部位を有する等、血管内治療や血管外科的治療が困難で、かつ従来の薬物療法では十分な効果を得られない治療抵抗性閉塞性動脈硬化症の患者のうち、現在保険適応が認められていない正コレステロール血症の患者に限定して、デキストラン硫酸カラム吸着法によるLDLアフェレシスによる治療を行い、厚生労働省の定める新規先進医療Bとして、臨床的治療効果[主要評価項目:足関節上腕血圧比(ABI)の変化、VascuQOL(閉塞性動脈硬化症QOL指標)の変化]の検討を行う。また、分子的作用機序について、申請者らがすでに研究を展開している動脈硬化増悪因子受容体への直接結合因子(ATRAP)に着目した検討を行い、治療抵抗性重症動脈硬化症に対する多面的治療戦略におけるLDLアフェレシスの治療的意義の確立と分子的作用機序の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

(1)先進医療Bとして実施する「正コレステロール血症を呈する従来治療抵抗性閉塞性動脈硬化症に対するデキストラン硫酸カラムを用いたLDLアフェレシス療法」についての、有効性・安全性の検討。

新規先進医療B「正コレステロール血症を呈する従来治療抵抗性閉塞性動脈硬化症に対するデキストラン硫酸カラムを用いたLDLアフェレシス療法」の概要: 閉塞性動脈硬化症の患者(20~80歳)のうち、対象を正コレステロール血症を呈する従来治療抵抗性閉塞性動脈硬化症に限定した上で、デキストラン硫酸カラムを用いたLDLアフェレシス療法を以下の条件をすべて満たす場合に施行する。[対象患者: 1. 年齢20歳以上80歳未満の者、2. Fontaine分類IIB度以上(跛行出現距離200m以下)を呈しかつ足関節上腕血圧比(ABI, ankle brachial pressure index)値0.7未満の患肢を認める者、3. 血中総コレステロール値220mg/dL以下、かつLDLコレステロール値140mg/dL以下の正コレステロール血症の者、4. 膝窩動脈以下の閉塞又は広範な閉塞部位を有する等、経皮的血管形成術(percutaneous transluminal angioplasty: PTA)による血管内治療(endovascular therapy: EVT)、あるいは、バイパス術や血栓内膜摘除術などの血管外科的治療が困難で、かつ従来の薬物療法では十分な効果を得られない者、5. 1ヶ月以上にわたる、薬物治療を含むリスクファクターの是正(禁煙、糖尿病治療、降圧薬による血圧

管理，スタチンなどの脂質異常症治療薬投与，抗血小板薬投与）では十分な効果を得られない者]．なお，当該療法の実施回数は，一連につき3ヶ月間に限って10回を限度として行う（初回施行時のみ要入院治療）．

主要評価項目（プライマリーエンドポイント）

足関節上腕血圧比（ABI，ankle brachial pressure index）の変化

VascuQOL（Vascular Quality of Life Questionnaire：閉塞性動脈硬化症 QOL 指標）の変化とともに，（LDL アフェレシス療法 10 回目終了 1 ヶ月後（±7 日）の測定値）－（LDL アフェレシス療法 1 回目施行前 2 ヶ月以内の測定値）．なお，プロトコル治療期間（10 回 1 クール）終了 3 ヶ月後の測定値の変化は副次的評価項目として評価する．

副次評価項目（セカンダリーエンドポイント）

臨床的検査

(A) 他覚的臨床症状：(a) 跛行出現距離，最大歩行距離，(b) 潰瘍（Fontaine IV 度）．

(B) 自覚的臨床症状：

(a) VascuQOL：VascuQOL 質問票にて評価．

(b) 安静時疼痛（Fontaine III 度，IV 度）：Visual analogue scale（VAS）にて測定．

(C) 血液検査：

(a) 脂質代謝系：LDL-コレステロール，HDL-コレステロール，総コレステロール，中性脂肪．

(b) 血液凝固・炎症系：フィブリノゲン，高感度 CRP．

(c) 酸化ストレス，抗酸化力：酸化 LDL（MDA-LDL），ペントシジン，derivatives of reactive oxidative metabolites（d-ROMs），biological anti-oxidative potential（BAP）．

理学的検査

(A) 血管機能関連検査：

(a) 足関節上腕血圧比（ABI，ankle brachial pressure index），脈波伝播速度測定（PWV）．

(b) 心臓足首血管指数（CAVI）．(c) 血管内皮機能（FMD，Endo-PAT）．(d) 中心血圧（HEM-9000AI）．

(B) 局所血流関連検査：(a) 皮膚灌流圧測定（PAD3000）．

(C) 血管画像検査：(a) MRA（CT），下肢動脈造影，DSA（Digital Subtraction Angiography）．

その他

(A) Fontaine 分類の変化，(B) 下肢・足趾切断術の有無，(C) 心血管病の複合観察項目．

安全性の評価項目

有害事象，副作用の発現例数，発現件数．

(2) 先進医療 B として実施する「正コレステロール血症を呈する従来治療抵抗性閉塞性動脈硬化症に対するデキストラン硫酸カラムを用いた LDL アフェレシス療法」の分子的作用機序についての『動脈硬化増悪因子受容体への直接結合性機能制御因子（ATRAP）』に着目した基礎的検討．

本療法を受ける患者の血球成分（単球・白血球）検体を用いて，Real-time RT-PCR 法によるヒト ATRAP 遺伝子の発現解析の検討もあわせて行い，正コレステロール血症を呈する従来治療抵抗性閉塞性動脈硬化症の病態，および本療法の臨床的治療効果と ATRAP 遺伝子の発現レベルとの関連性について検討する．そして，ヒト血球の内在性 ATRAP 発現レベルと正コレステロール血症を呈する従来治療抵抗性閉塞性動脈硬化症の重症度との関連性の検討，リスク層別化，さらには本療法の分子的作用機序における血球系 ATRAP 発現の意義の検討も行う．

#### 4．研究成果

厚生労働省の定める先進医療 B として実施する「正コレステロール血症を呈する従来治療抵抗性閉塞性動脈硬化症に対するデキストラン硫酸カラムを用いた LDL アフェレシス療法」についての，有効性の有無および安全性について多施設共同前向き試験にて症例登録を行い，同療法の分子的作用機序の解明を目指してすでに研究を展開している動脈硬化増悪因子受容体への直接結合因子（ATRAP）に着目した検討を行った．具体的には本療法を受ける患者の血球成分（単球・白血球）検体を用いて検討し，正コレステロール血症を呈する従来治療抵抗性閉塞性動脈硬化症の病態，および本療法の臨床的治療効果と ATRAP 遺伝子の発現レベルとの関連性等について解析した．

まず基礎的検討として，現在のところ既に効果が認められ保険適応とされている脂質異常症を有する従来治療抵抗性閉塞性動脈硬化症に対するデキストラン硫酸カラムを用いた LDL アフェレシス療法における分子的作用機序を検討することを目的とし，ATRAP が病的刺激の持続による AT1 受容体下流の臓器障害と関連した情報伝達系の過剰活性化に対して選択的な抑制作用を発揮することに着目した．我々は，全身性 ATRAP 欠損マウスでは野生型マウスと比較して，高脂肪食負荷により糖代謝および脂質代謝異常をきたすことを報告している．加えて疾患モデルマウスとして Cre/loxP システムを用いて ATRAP の組織特異的発現抑制マウスの作製するため，まず ATRAP-floxed マウスを，アデイポネクチンプロモーター Cre 発現マウスと交配し，Adipoq-Cre +/- : ATRAP-floxed マウスを作製した．その後高度な動脈硬化をきたす病的刺激条件下における検討を行い，成果を論文発表している（Int J Mol Sci. 21;18(3), 2017）．また動脈硬化性疾患に罹患した患者の臨床評価指標および血球成分（白血球）検体を用いて，Real-time RT-PCR 法によるヒト ATRAP 遺伝子の発現解析の検討もあわせて行い，動脈硬化性疾患指標と ATRAP 遺伝子の発現レベルとの関連性について重要な知見を明らかにし，論文発表した

(Atherosclerosis. 269:236-244, 2018)。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

- (1) Haruhara K, Wakui H, Azushima K, Kurotaki D, Kawase W, Uneda K, Haku S, Kobayashi R, Ohki K, Kinguchi S, Ohsawa M, Minegishi S, Ishigami T, Matsuda M, Yamashita A, Nakajima H, Tamura T, Tsuboi N, Yokoo T, Tamura K.; Angiotensin receptor-binding molecule in leukocytes in association with the systemic and leukocyte inflammatory profile. Atherosclerosis. 269:236-244, 2018. (査読有)
- (2) Kobayashi R, Wakui H, Azushima K, Uneda K, Haku S, Ohki K, Haruhara K, Kinguchi S, Matsuda M, Ohsawa M, Toya Y, Nishiyama A, Yamashita A, Tanabe K, Maeshima Y, Umemura S, Tamura K.; An angiotensin II type 1 receptor binding molecule has a critical role in hypertension in a chronic kidney disease model. Kidney Int. 91(5):1115-1125, 2017. (査読有)
- (3) Ohki K, Wakui H, Azushima K, Uneda K, Haku S, Kobayashi R, Haruhara K, Kinguchi S, Matsuda M, Ohsawa M, Maeda A, Minegishi S, Ishigami T, Toya Y, Yamashita A, Umemura S, Tamura K.; ATRAP Expression in Brown Adipose Tissue Does Not Influence the Development of Diet-Induced Metabolic Disorders in Mice. Int J Mol Sci. 21;18(3), 2017. (査読有)
- (4) Wakui H, Sumida K, Fujita M, Ohtomo Y, Ohsawa M, Kobayashi R, Uneda K, Azushima K, Haruhara K, Yatsu K, Hirawa N, Minegishi S, Ishigami T, Umemura S, Tamura K.; Enhancement of intrarenal plasma membrane calcium pump isoform 1 expression in chronic angiotensin II-infused mice. Physiol Rep. 5(11), 2017. (査読有)
- (5) Uneda K, Wakui H, Maeda A, Azushima K, Kobayashi R, Haku S, Ohki K, Haruhara K, Kinguchi S, Matsuda M, Ohsawa M, Minegishi S, Ishigami T, Toya Y, Atobe Y, Yamashita A, Umemura S, Tamura K.; Angiotensin II Type 1 Receptor-Associated Protein Regulates Kidney Aging and Lifespan Independent of Angiotensin. J Am Heart Assoc. 27;6(8), 2017. (査読有)
- (6) 田村功一, 植田瑛子, 大澤正人, 菅野晃靖, 戸谷義幸. : 特集/わが国の心血管病に対する先進医療. 5). 閉塞性動脈硬化症に対する LDL 吸着療法: 正コレステロール血症を呈する従来治療抵抗性閉塞性動脈硬化症に対するデキストラン硫酸カラムを用いた LDL アフェリシス療法(先進医療 B: LETS-PAD 研究). 循環器内科, 第 80 巻第 4 号, 270-274, 2016. (査読無)

〔学会発表〕(計5件)

- (1) 大城 光二, 涌井 広道, 大澤 正人, 小豆島 健護, 白 善雅, 畝田 一司, 小林 竜, 春原 浩太郎, 金口 翔, 山田 貴之, 山地 孝弘, 岸尾 望, 田村 功一  
アディポネクチンプロモーター制御下 1 型アンジオテンシン II 受容体結合因子(ATRAP)高発現マウスにおける慢性アンジオテンシン II 刺激によるインスリン抵抗性の検討  
第 40 回日本高血圧学会総会, 松山, 2017 年 10 月
- (2)大城光二, 涌井広道, 小豆島健護, 白善雅, 畝田一司, 小林竜, 春原浩太郎, 金口翔, 大澤正人, 前田晃延, 梅村敏, 田村功一.  
脂肪組織における 1 型アンジオテンシン II 受容体結合因子(ATRAP/Agt rap)の機能的意義の検討  
第 39 回日本高血圧学会総会, 仙台, 2016 年 10 月

(3)春原浩太郎, 田村功一, 涌井広道, 大澤正人, 小豆島健護, 白善雅, 小林竜, 大城光二, 金口翔, 松田みゆき, 山下暁朗, 坪井伸夫, 横尾隆, 梅村敏.

AT1 受容体直接結合因子 ATRAP のヒト末梢血白血球における遺伝子発現と臨床指標との関連  
第 39 回日本高血圧学会総会, 仙台, 2016 年 10 月

(4)岸尾望, 涌井広道, 大澤正人, 小豆島健護, 白善雅, 畝田一司, 小林竜, 大城光二, 金口翔, 前田晃延, 梅村敏, 田村功一.

C57BL/6 野生型マウスにおけるアンジオテンシン II 刺激によるインスリン抵抗性の検討および  
1 型アンジオテンシン II 受容体結合因子(ATRAP)の脂肪組織特異的高発現マウスの作成  
第 39 回日本高血圧学会総会, 仙台, 2016 年 10 月

(5)春原浩太郎, 田村功一, 涌井広道, 大澤正人, 小豆島健護, 畝田一司, 小林竜, 大城光二, 金口翔, 坪井伸夫, 横尾隆, 梅村敏.

AT1 受容体直接結合因子 ATRAP のヒト白血球における発現と臨床指標との関連  
第 59 回日本腎臓学会学術総会, 横浜, 2016 年 6 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名: 田村 功一

ローマ字氏名: TAMURA, kouichi

所属研究機関名: 横浜市立大学

部局名: 医学研究科

職名: 教授

研究者番号(8桁): 40285143

研究分担者氏名: 戸谷 義幸

ローマ字氏名: TOYA, yoshiyuki

所属研究機関名: 横浜市立大学

部局名: 附属病院

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 30237143

研究分担者氏名: 涌井 広道

ローマ字氏名: WAKUI, hiromichi

所属研究機関名: 横浜市立大学

部局名: 医学部

職名: 講師

研究者番号(8桁): 10587330

## (2)研究協力者

なし

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。