

## 様式 C-19

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 3 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007 年度～2008 年度
課題番号：19590575
研究課題名（和文） マクロファージの活性化を指標とした 動脈硬化症における不安定プラーク検出法の開発
研究課題名（英文） Measurement of soluble FcγRIIIa <sup>Mφ</sup> in plasma as a novel marker for unstable plaques in atherosclerosis
研究代表者 榊田 緑 (MASUDA MIDORI) 関西医科大学・医学部・講師 研究者番号：50173753

### 研究成果の概要：

動脈硬化症を来たすプロセスでは、特に酸化変性 LDL が Mφ に際限なく取り込まれて動脈硬化の初期病変である泡沫細胞の集積をもたらし、ついには多量の脂質を含む不安定なプラークとなる。本研究は、申請者が開発した Mφ 型 sFcγRIIIa<sup>Mφ</sup> 測定法の不安定プラーク検出法への応用を目的とするものである。すなわち、不安定プラークでは多量の脂質と共に活性化した Mφ が観察されることから、生体内における Mφ 活性の測定が不安定プラークの検出に有用と考えられる。血漿 sFcγRIIIa<sup>M</sup> は、健常者では加齢とともに増加した。成人病検診症例では動脈硬化症のリスクファクターが増すに従い増加し、頸動脈エコー検査の IMT とよく相関した。虚血性心疾患症例では明らかな高値を示し、冠動脈の有意狭窄数が増すに従い増加した。頸動脈エコー検査施行患者では低エコープラーク群で最も高く、プラークの最大径と正の相関を示し、sFcγRIIIa<sup>M</sup> 測定が新しい不安定プラーク検出法になる可能性が示唆された。

### 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
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：境界医学・病態検査学

キーワード：動脈硬化、Fcγレセプター-IIIa、CD16、ELISA

## 1. 研究開始当初の背景

社会の高齢化や食生活の欧米化による飽和脂肪酸の摂取量増加に伴って、動脈硬化性合併症が多発し、重要な社会問題となっている。すなわち、健康寿命と死亡との間で苦しむ期間の大半は脳卒中、心筋梗塞、網脈疾患による視力低下、閉塞性動脈硬化症、などの脈管疾患であり、生活の質（QOL）を低下させて生きることになる。動脈硬化症の発生メカニズムが徐々に解明され、従来から知られていた糖尿病、高血圧、高脂血症などの危険因子の重要性が再認識され、それぞれに対するEBMに基づいた治療法が開発され、明確な成果を挙げている。しかし、ある時点での動脈硬化を明確に評価する指標があれば、それに応じた治療法を適応することでテイラーメイド医療が実現できる。

一方、IgG レセプターIII (FcγRIII: CD16) には、NK 細胞とマクロファージ (Mφ) に発現している IIIa 型と、好中球に発現している IIIb 型があり、両者とも細胞表面から放出され、可溶性 (sFcγRIII) として血漿中に存在している。血漿中には好中球からプロテアーゼによって放出された sFcγRIIIb が高濃度に含まれており、この濃度と好中球減少症患者の易感染性との相関、HIV 患者における重症度との相関が報告されている。また、NK 細胞を活性化するとか肺胞 Mφ を *in vitro* で培養するとメタロプロテアーゼによって上清中に sFcγRIIIa が放出されること、FcγRIIIB 欠損患者の血漿および関節リウマチ (RA) 患者の関節液、血漿中の sFcγRIIIa の存在が報告されている。申請者は、NA2-FcγRIIIb と FcγRIIIa を認識するモノクロナル抗体 (mAb) GRM1 を用いて、NA11 タイプの RA 患者血漿中の sFcγRIIIa が sFcγRIIIb と同様に増加していること、sFcγRIIIa の Mφ

型と NK 細胞型の比率が個々の患者によって異なっていることを認めた。これは、血漿中の sFcγRIIIa を初めて定量し、さらに血漿中の sFcγRIIIa<sup>Mφ</sup> の存在を始めて明らかにしたものである。

次に、培養単球の溶解液から FcγRIIIa を精製し、これを抗原として Mφ 型 FcγRIIIa に特異的な mAb (MKGR 14: mIgM) を得た。本 mAb を用いて血漿中 sFcγRIIIa<sup>Mφ</sup> 測定法を構築した。sFcγRIIIa<sup>Mφ</sup> も RA 患者血漿中では増加しており、ステージが進むに従い異常高値の患者が増すこと、3 種の sFcγRIII はともに Lansbury 指数と相関したが sFcγRIIIa が最も良く相関した事、sFcγRIIIa<sup>Mφ</sup> のみが血清免疫グロブリン濃度と相関しなかったことを認めた。これは、血漿中の sFcγRIIIa<sup>Mφ</sup> を初めて定量したものである。また、血漿 sFcγRIIIa<sup>Mφ</sup> が健常者では加齢とともに増加すること、成人病検診症例では動脈硬化症のリスクファクターが増すに従い増加し、頸動脈エコー検査の結果と有意に相関すること、虚血性心疾患 (CAD) 症例では明らかな高値を示し、冠動脈の有意狭窄数が増すに従い増加することを認めている。

さらに、すべての患者での sFcγRIIIa の測定を目的として、FcγRIIIA の細胞外ドメインを CHO 細胞にトランスフェクトし、培養上清より精製したリコンビナント sFcγRIIIa を抗原として FcγRIIIa に特異的な mAb (MKGR 155: mIgG1) を得た。本 mAb を用いて血漿中 sFcγRIIIa 測定法を構築した。本法は、CD16 GRM1 を用いた NA11 用 sFcγRIIIa 測定法とは異なり、すべての患者に適用出来るとともに、NK 細胞型の sFcγRIIIa への特異性が高く、総 sFcγRIII (sFcγRIIIa + sFcγRIIIb) および

sFcγRIIIa<sup>Mφ</sup>測定法との組合せにより、NK 細胞、好中球、Mφの活性化の解析がより容易になった。さらに、化学発光系を利用して、約 80 倍の高感度化に成功した。3 種の sFcγRIIIa 測定系の感度差より、正常プール血漿に含まれる sFcγRIIIa は大部分が NK 細胞由来、総 sFcγRIII は大部分が好中球由来であった。本法を用いて抗 TNFα抗体療法時の若年性関節リウマチ患者での可溶性 FcγRIIIa の経時的变化を測定したところ、病態をよく反映していた。

## 2. 研究の目的

本研究は、申請者が開発した Mφ型可溶性 FcγRIIIa<sup>Mφ</sup>測定法の不安定プラーク検出法への応用を目的とするものである。すなわち、不安定プラークでは多量の脂質と共に活性化した Mφが観察されることから、生体内における Mφ活性の測定が不安定プラークの検出に有用と考えられる。

不安定プラークの破裂またはびらんは血管の閉塞や内腔の狭窄を引き起こし、遂には臓器の機能障害に至る。重要な臓器ほど症状が現われ易く、脳、心臓、腎臓等が代表的な臓器である。厚生労働省患者調査概要によると、急性心筋梗塞を発症する患者数は年間に 11 万人（男性 7.9 万人、女性 3.1 万人）、その他の虚血性心疾患は年間 80.4 万人（男性 37.5 万人、女性 42.9 万人）で、毎年増加している。食生活の高カロリー化による飽和脂肪酸の摂取量増加、自動車の普及による運動量の減少などは動脈硬化性疾患の増加を予言させ、さらに、これらを反映して増加し続けている糖尿病は冠動脈疾患に最も影響力のある危険因子である。このような背景から日本人でも、冠動脈疾患が、将来、欧米人と同様のレベルにまで増加することが予測されている。このような疾病のリスクを減少させるためには、医療分野における簡便で感度

の高い動脈硬化症、特に不安定プラークを検出する検査手法の確立が急務であり、本研究の成果がこの目的に大いに貢献するものと期待している。

## 3. 研究の方法

本研究は、申請者が開発した Mφ型可溶性 FcγRIIIa<sup>Mφ</sup>測定法の不安定プラーク検出法への応用を目的とするものである。すなわち、不安定プラークでは多量の脂質と共に活性化した Mφが観察されることから、虚血性心疾患や脳梗塞疑いで頸動脈エコー検査受診の患者血漿中の 3 種の sFcγRIII 量を測定し、エコー検査の結果と比較検討することにより、sFcγRIIIa<sup>Mφ</sup>測定の不安定プラーク検出における有効性を検討する。

虚血性冠動脈疾患 (CAD) の診断ならびに治療のため、心臓カテーテル検査受診の患者血漿中の sFcγRIIIa<sup>Mφ</sup>量を測定したところ、糖尿病併発例では正常血糖群と比して低値のものがあつた。sFcγRIII 測定値への糖化の影響を調べる為、プール血漿にグルコースを加え、4 日間インキュベートして、3 種の sFcγRIII 量を測定した。

血漿 sFcγRIIIa<sup>Mφ</sup>量は、FcγRIIIa<sup>Mφ</sup>に特異的な mAb MKGR 14 とビオチン化 CD16 GRM1 を用いた高感度化学発光 ELISA で、FcγRIIIa 量 (FcγRIIIa<sup>NK</sup> + sFcγRIIIa<sup>Mφ</sup>) は FcγRIIIa に特異的な mAb MKGR155 とビオチン化 CD16 GRM1 を用いた ELISA で、総 sFcγRIII 量 (sFcγRIIIa + sFcγRIIIb) は CD16 CLBFcRgrnI とビオチン化ウサギ抗ヒト FcγRIII pAb を用いた ELISA で測定した。

## 4. 研究成果

IgG レセプターIII (FcγRIII: CD16) には、NK 細胞とマクロファージ (Mφ) に発

現している IIIa 型と、好中球に発現している IIIb 型があり、両者とも細胞表面から放出され、可溶型 (sFc $\gamma$ RIIIa) として血漿中に存在している。すなわち、これら可溶型を個々に測定することにより、生体内での好中球、NK 細胞あるいは M $\phi$  の活性化を知ることができる。そこで IIIa 型および M $\phi$  由来の IIIa M $\phi$  型に特異的なモノクロナル抗体を作成し、血漿中の sFc $\gamma$ RIIIa および sFc $\gamma$ RIIIa M $\phi$  測定法を構築した。

動脈硬化症を来たすプロセスでは、特に酸化変性 LDL が M $\phi$  に際限なく取り込まれて動脈硬化の初期病変である泡沫細胞の集積をもたらす、ついには多量の脂質を含む不安定なプラークとなる。sFc $\gamma$ RIIIa M $\phi$  測定が生体内における M $\phi$  活性を表すことに着目し、血漿 sFc $\gamma$ RIIIa M $\phi$  を測定したところ、健常者では加齢とともに増加した。成人病検診症例では動脈硬化症のリスクファクターが増すに従い増加し、頸動脈エコー検査の IMT とよく相関した。虚血性心疾患症例では明らかな高値を示し、冠動脈の有意狭窄数が増すに従い増加した。しかし、糖尿病併発例では正常血糖群と比して極めて低値のものがあつた。In vitro での糖化の影響は、総 sFc $\gamma$ RIIIa 値では認められなかったが、sFc $\gamma$ RIIIa 値、sFc $\gamma$ RIIIa M $\phi$  値はグルコースの濃度に比例して低下した。血中グルコース濃度に寄る補正により、糖尿病併発例での低値は改善されたが、排泄の亢進等の影響があるものと考えられた。

頸動脈エコー検査施行患者では総 sFc $\gamma$ RIIIa 量、sFc $\gamma$ RIIIa 量に明らかな増加は認められなかったが、sFc $\gamma$ RIIIa M $\phi$  量は健常者と比して高値を示した。低エコープラーク群が最も高値を示し、石灰化の進んだ高エコープラーク群は、両プラーク混合型、プラーク無し、異常所見無しの群よりも低値を示し

た。成人病検診症例で認められた IMT との相関は、頸動脈エコー検査施行患者では認められなかったが、プラークの最大径と正の相関を示した。この相関は低エコープラーク群でより明確であつた。さらに、糖尿病併発例の血中グルコース濃度に寄る補正により、低エコープラーク群でのプラーク最大径との相関がより強まった。不安定プラークでは脂質とともに多くの M $\phi$  が観察されることから、sFc $\gamma$ RIIIa M $\phi$  測定が新しい不安定プラーク検出法になる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Soluble Fc $\gamma$ RIIIa M $\phi$  levels in plasma correlate with carotid maximum intima-media thickness (IMT) in subjects with annual medical checkup. Midori Masuda, Katsuya Amano, Shi Yan Hong, Noriko Nishimura, Masayoshi Fukui, Masamichi Yoshika, Yutaka Komiyama, Hiroya Masaki, Toshiji Iwasaka and Hakuo Takahashi. Mol. Med.: 14 (7-8), 436-442, 2008. 査読有

[学会発表] (計 11 件)

1. 頸動脈エコー検査施行患者における可溶性 Fc $\gamma$ RIIIa M $\phi$  の増加. 榎田緑, 横井豊彦, 正木浩哉, 高橋伯夫. 第 57 回日本臨床検査医学会学術集会, 2010, 9, 9-12. (東京)
2. Measurement of soluble Fc $\gamma$ RIIIa and soluble Fc $\gamma$ RIIIa M $\phi$  in urine from patients with proteinuria. Midori

- Masuda, Satoshi Morimoto, Shi Yan Hong, Tatsuyoshi Morita, Noriko Nishimura, Nobuyuki Takahashi, Hiroya Masaki, Keiko Kouno, Toyohiko Yokoi, Masamichi Yoshika, Yutaka Komiyama, Toshiji Iwasaka, and Hakuo Takahashi. 14th International Congress of Immunology, (Kobe, Japan), 2010, 8, 22-27.
3. Increase of soluble FcγRIII<sub>s</sub> levels in urine from patients with nephritis. Midori MASUDA and Hakuo TAKAHASHI. 第39回日本免疫学会総会・学術集会, 2009, 12, 2-4. (大阪)
  4. 腎生検施行患者における3種の尿中可溶性 FcγRIII<sub>s</sub> の増加. 榎田緑, 正木浩哉, 高橋伯夫. 第56回日本臨床検査医学会学術集会, 2009, 8, 26-29. (札幌)
  5. 本学付属病院における下肢動脈エコー検査の症例検討. 横井豊彦、正木浩哉、清水俊宏、岡本恵、吉賀正亨、榎田緑、小宮山豊、高橋伯夫. 第56回日本臨床検査医学会学術集会, 2009, 8, 26-29. (北海道)
  6. Measurement of soluble FcγRIII<sub>a</sub> and soluble FcγRIII<sub>a</sub><sup>Mφ</sup> in urine. Midori MASUDA and Hakuo TAKAHASHI. 第38回日本免疫学会総会・学術集会, 2008, 12, 1-3. (京都)
  7. 尿中可溶性 FcγRIII<sub>a</sub> および可溶性 FcγRIII<sub>a</sub><sup>Mφ</sup> の測定. 榎田緑, 正木浩哉, 高橋伯夫. 第55回日本臨床検査医学会学術集会, 2008, 11, 28-30. (名古屋)
  8. 関節リウマチ患者の NKT 細胞における FcγRIII<sub>a</sub> 発現量の変化. 榎田緑, 吉賀正亨, 小宮山豊, 高橋伯夫. 第54回日本臨床検査医学会学術集会, 2007, 11, 22-25. (大阪)
  9. Expression of FcγRIII<sub>a</sub> on NKT cell from RA patients. Midori MASUDA and Hakuo TAKAHASHI. 第37回日本免疫学会総会・学術集会, 2007, 11, 20-22. (東京)
  10. Soluble Fcγ receptor type III<sub>a</sub> derived from NK cells in plasma as a novel marker for the inflammatory activity in rheumatoid arthritis. Midori Masuda, Shigeo Miyashima, Shi Yan Hong, Noriko Nishimura, Masamichi Yoshika, Yutaka Komiyama, Hirokazu Iida, Hakuo Takahashi. 13th International Congress of Immunology, (Rio de Janeiro, Brazil), 2007, 8, 21-25.
  11. Fractalkine と CD16 陽性細胞 Stevens-Johnson 症候群 TEN における新たな表皮障害機構. 藤山幹子、井上有紀子、白方裕司、丸山美鈴、榎田緑、高橋伯夫、佐山浩二、橋本公二. 第32回日本研究皮膚科学会年次学術大会・総会, 2007, 4, 18-20. (横浜)
- [図書] (計 1 件)
1. Soluble Fcγ receptor type III<sub>a</sub> in plasma as a novel marker for the inflammatory activity in rheumatoid arthritis. Midori Masuda, Shigeo Miyashima, Shi Yan Hong, Noriko Nishimura, Masamichi Yoshika, Yutaka Komiyama, Hirokazu Iida, and Hakuo Takahashi. 13th

International Congress of Immunology,  
(Jorge Kalil, Edecio Cunha-Neto, Luiz  
Vicente Rizzo, eds.), Medimond S.r.l.,  
Italy, pp225-228, 2007. 査読無

〔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

榊田 緑 (MASUDA MIDORI)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：50173753

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者