

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K09550

研究課題名(和文)重症下肢虚血におけるメタボローム解析を用いた病態および治療マーカーの解明

研究課題名(英文) Pathophysiological and Therapeutic Markers in Critical Limb Ischemia Using Metabolome Analysis

研究代表者

柳川 貴央 (Yanagawa, Takao)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：10625586

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)：平成29年度から令和元年度において、血管内治療を予定していた末梢動脈疾患患者のうち同意書の得られた計11例に対して、下肢動静脈血サンプリングを行った。平成30年には、法改正により対外増幅赤芽球移植(EVEETA)を用いた再生医療が終了し、令和2年以降は新型コロナウイルス感染症の拡大により待機的な血管内治療が可能な重症下肢虚血患者が減少し、症例リクルートに難渋した。一方で同時並行で行っていた心臓からのサンプリングにおいては、虚血性心疾患に伴う低心機能症例において、解糖系からTCAサイクルに至る経路に関わるアミノ酸が心筋により多く取り込まれている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究成果概要に記載の通り、重症下肢虚血の症例は少なく、解析データに明確な結論を得ることはできなかった。しかし、同時並行で行った虚血性心筋症のメタボローム解析においては、エネルギー代謝に関連した糖代謝関連した物質の取り込みが低下している一方で、一部のアミノ酸などTCAサイクルに関連する物質の取り込みが亢進していることが示唆された。虚血肢において、同様の現象が生じているかどうか実証することはできなかったが、重症下肢虚血の発症および治療効果を予測・評価するバイオマーカーの確立に向けて、足掛かりとなるデータを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：From 2017 to 2019, arteriovenous blood sampling of the lower extremity was performed on a total of 11 patients with peripheral arterial disease who were scheduled for endovascular treatment and have obtained written consent. From 2018, regenerative medicine using EVEETA will be terminated due to a change in the law, and from 2020, the number of patients with critical leg ischemia who can undergo standby endovascular treatment will decrease due to the spread of COVID-19 infection, making patient recruitment difficult. On the other hand, concurrent sampling from the heart suggested that amino acids involved in the pathway from the glycolytic system to the TCA cycle may be more highly uptake into the myocardium in cases of ischemic cardiomyopathy.

研究分野：循環器内科学

キーワード：重症下肢虚血 メタボローム解析

## 1. 研究開始当初の背景

CLIは慢性動脈閉塞により、安静時疼痛および潰瘍・壊死を生じる病態である。糖尿病や維持透析患者などでは、末梢の動脈から狭窄や閉塞が進行することが指摘されており、膝下の下腿病変や多区域枝病変が多い。神経障害などの合併があると虚血があっても自覚症状を感じにくく、わずかな傷を生じた後に難治性潰瘍・黒色壊死を生じて初めて発見されるケースが多い。一旦、難治性潰瘍・壊死が出現すると、寝たきり、さらには下肢切断になる症例も多く、そのような症例では、1年後の生命予後が50%以下であるとするデータもある。そのため、CLIのHigh risk症例においては、発症早期に発見し、増悪を低減するための明確な指標の確立が急務である。

従来の非侵襲的血管検査においては、 $ABPI \leq 0.4$  や足関節血圧 $\leq 50 \sim 70$ mmHgなどはPADの臨床的重症度と相関する(Lancet 2001; 358: 1257-1264)と言われているが、実際には体血圧の変動や維持透析患者における高度石灰化では不正確な場合もあり、ABPI測定時に得られる容積脈波記録(Pulse volume recording:PVR)から得られる%MAP(%Mean artery Pressure)やupstroke time(UT)などが補助的な指標として用いられている。その他、皮膚灌流圧(SPP)・経皮的酸素分圧(TcPO<sub>2</sub>)は創傷治癒レベルの評価としては広く用いられているが、早期介入の指標や末梢組織代謝との関連など不明な点が多い。

PADの病態では、血管内皮が障害されており、血管拡張因子である酸化窒素(nitric oxide:NO)、プロスタグランジン(prostaglandin:PG)、内皮細胞依存性過分極因子(endothelium-derived hyperpolarizing factor:EDHF)、血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor:VEGF)等が減少し、血管収縮因子であるアンギオテンシン(angiotensin-2:Ang II)、エンドセリン(endothelin-1:ET-1)などが増加していることは判明しているが、ACE阻害薬やプロスタグランジン製剤での予防・治療効果は明らかでない。以前我々は下肢虚血モデルマウスにおいて、Asialo-Erythropoietin(AEPO)が血球増多をきたすことなく、他のEPO製剤による治療や骨髓細胞移植を用いた血管新生治療に比較して、有意に下肢虚血を改善しうることを報告しているが(Cardiovasc Drugs Ther 2013; 27: 117-24)まだ臨床応用には至っていない。また、AEPOの強い血管新生作用においてIL-6を介していることが想定されるが、明らかな機序は不明である(Int J Cardiol. 2013; 168: 2941-3)。一方、我々は赤芽球が多くの血管新生因子を分泌していることを見だし、体外で増幅した赤芽球とEPO製剤を組み合わせた新規の血管新生治療(Ex-Vivo Expanded Erythroblast Transplantation(Autologous)(EVEETA study)の開発を行った。前臨床試験においてその有効性を確認した後、第I/II相臨床試験を開始した(J Mol Cell Cardiol 2010; 49: 347-53)。CLI症例で他に治療オプションのない患者を対象とした。治療を行った11症例では、いずれも痛みの軽減や難治性潰瘍の改善などの臨床効果がみられたが、本臨床研究を進めていく中で我々は、治療効果を客観的に評価するバイオマーカー、レスポンスの予測マーカー、虚血症状の増悪予測因子などの必要性を強く感じるに至った。そこで本研究では、IC症例やCLI症例の下肢動脈・下肢静脈において網羅的代謝物質解析技術(メタボロミクス)を行うことによって、CLIの病態生理に關与する代謝産物の同定、およびCLI発症を予測するバイオマーカーの確立、CLIの治療効果を予測・評価するバイオマーカーの確立、それらを標的とする新しい治療開発基盤の確立を目指す。

## 2. 研究の目的

CLIの病態や治療効果・予後予測のマーカーとなる代謝産物を同定し、それらを標的とした治療開発を目指すため、下記の研究テーマを進めていく。

- (1) 心肺血管疾患(特にPAD)を有する患者サンプルを用いたメタボローム解析により、PAD特異的代謝産物を同定する。
- (2) メタボローム解析と臨床データを合わせて検討することで、無症候性PAD患者におけるCLI発症を予測するバイオマーカー(代謝産物)を確立する。
- (3) CLI症例における血管内治療前後でのメタボローム解析と臨床データを合わせて検討することで、治療効果を予測・評価する(代謝産物)を確立する。

## 3. 研究の方法

### 【研究対象】

目標症例数: 50 症例(本研究は探索的研究であり、結果次第では症例数を追加する可能性あり)

適格基準:

- (1) 心血管疾患を有するもしくはその存在が疑われる患者
- (2) 2人以上の循環器専門医により待機的な心血管カテーテル検査の適応ありと判断された患者
- (3) 本研究計画について十分に理解し、本人もしくは親族による同意が可能な患者
- (4) 同意取得時における年齢が満20歳以上の患者

### 【研究方法】

上記適格基準に合致する患者に対して、説明文書に基づき説明を行い、本研究への参加について文書による同意を得る。

心血管カテーテル検査前に、症状、理学的所見を確認、一般的血液、尿検査、12誘導心電図、胸部レントゲン検査、経胸壁的心臓超音波検査、ABPI等を施行する。病状により、下肢動脈超音波検査や皮膚灌流圧も施行する。全例において心血管カテーテル検査前の薬物療法を確認する。

同意が得られた症例を登録し、心血管カテーテル検査を施行する。大腿動静脈へのアプローチを原則とする。局所麻酔の後、動脈および静脈ヘシースを挿入、未分画ヘパリンを3000から5000単位静注し、検査を開始する。4から7フレンチのカテーテルを用い、右心カテーテル、冠動脈造影、左室造影、下肢動脈造影を施行し、疾患に応じて、肺動脈・大動脈造影等の各種造影、心筋生検を追加施行する。心血管カテーテル検査を施行する際に計4カ所から血液検体(動脈: 大腿動脈血・大動脈血、静脈: 大腿静脈血・冠状静脈洞血)を採取する(各5mL、合計20mL)。得られた血液検体は、血漿と血清に分離し分注保存する。検査後、圧迫止血を行う。この後、原疾患に対しては必要に応じて治療介入を行い、治療後再度サンプリングする。

後日、これらの保存検体を用いてメタボロミクスによる代謝リモデリングの解析を行う(慶応義塾大学先端生命科学研究所、曽我朋義教授)。本研究では特に、PADの病態に焦点を当てて研究を進める。具体的には、大腿動静脈のメタボロミクスの結果を比較することで、血流が正常の下肢組織における代謝プロファイルを検討しつつ、それらの結果を下肢虚血のある症例と比較することによって、疾患特異的な代謝プロファイルを明らかにする。さらに、下肢虚血の重症度と相関する代謝産物の同定や血管内治療前後で変化する代謝産物の同定、サンプリング後の経過においてCLIに移行した症例で特徴的な代謝産物を同定することで、CLI予測のバイオマーカー候補を探索する。

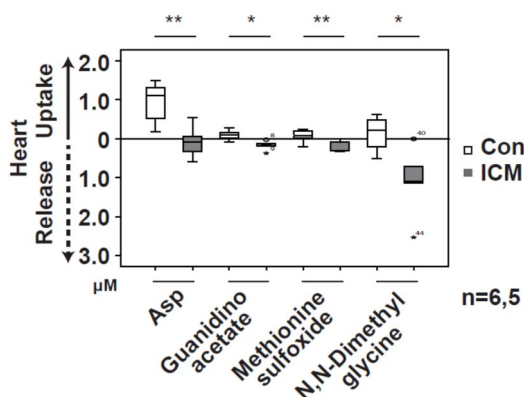
また心臓のメタボロミクスの結果に関しては、冠動脈疾患などその他の心血管疾患特異性、心臓超音波検査による心機能との相関、採血、胸部レントゲン等による病状との関連、心臓リモデリングや薬剤治療による病状変化、臨床的アウトカムへの影響なども検討する。6ヶ月および12ヶ月後に、理学的所見、各種検査を施行し、追跡調査を行う。データ解析にあたってはプライバシー保護のため匿名化を行って施行する。なお、追跡期間中に再度心血管カテーテル検査が必要と判断された患者は、初回と同様に血液検体を採取し、メタボロミクスによる代謝リモデリングの解析を再度行う。

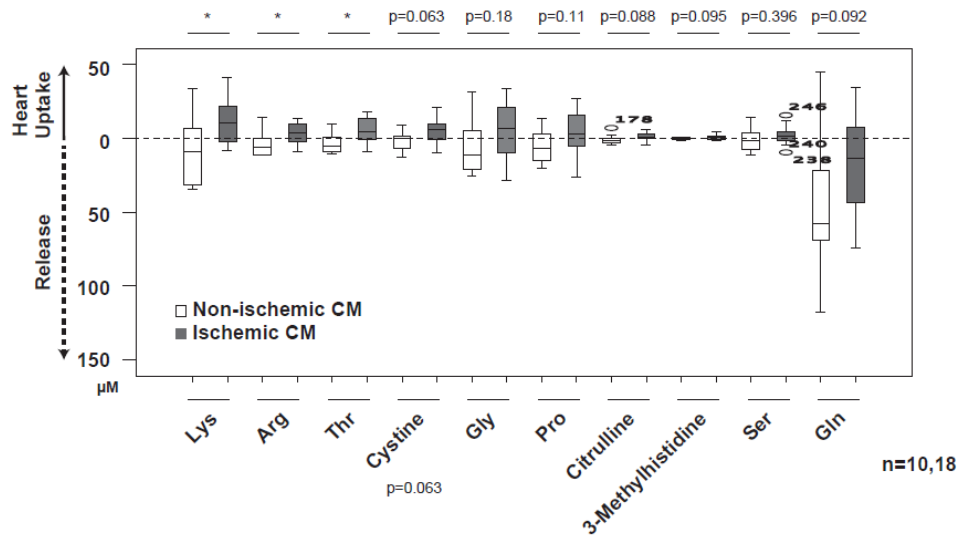
本研究の対象となった患者の追跡調査を計画通りに施行し、下肢虚血症状などの病状、ABPIや皮膚灌流圧、心機能の変化等の臨床的パラメーターの変化と相関のある代謝産物を同定する。再度、心血管カテーテル検査が必要と判断された患者は、メタボローム解析を再度施行する。特に、代謝産物が病態との関連や血管内治療介入との関連が認められた場合については、この時期に症例の追加を行い、候補となった代謝産物の病態との相関性を再検証するとともに、バイオマーカーとしての有用性を検証する。

#### 4. 研究成果

心疾患および末梢血管疾患など合わせて139例にてサンプルを得ることができた。そのうち末梢血管疾患の症例は計11例であり、全体の約8%を占めている。

虚血性心筋症(n=18)と正常心(n=23)の比較において、虚血性心疾患ではピルビン酸・乳酸の取り込みが低下しており、糖代謝障害が示唆された。一方で虚血性心筋症(n=18)と非虚血性心筋症(拡張型心筋症など)(n=10)の比較において、リジン・アルギニン・スレオニンの取り込みが亢進しており、糖の代わりにTCAの器質を取り込んでいる可能性が示唆された。





外れ値も全て除外せずに解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takano Toshiaki, Ozaki Kazuyuki, Hoyano Makoto, Yanagawa Takao, Ozawa Takuya, Minamino Tohru	4. 巻 20
2. 論文標題 Stent malapposition occurred 17 days following percutaneous coronary intervention for a severe calcified lesion in acute myocardial infarction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology Cases	6. 最初と最後の頁 4~7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jccase.2019.02.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takano Toshiaki, Tanaka Komei, Ozaki Kazuyuki, Sato Akinori, Iijima Kenichi, Yanagawa Takao, Izumi Daisuke, Ozawa Takuya, Fuse Koichi, Sato Masahito, Tanabe Naohito, Minamino Tohru	4. 巻 82
2. 論文標題 Clinical Predictors of Recurrent Ventricular Arrhythmias in Secondary Prevention Implantable Cardioverter Defibrillator Recipients With Coronary Artery Disease Lower Left Ventricular Ejection Fraction and Incomplete Revascularization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 3037~3043
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1253/circj.CJ-18-0646	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ozawa T, Yanagawa T, Minamino T, et al	4. 巻 59
2. 論文標題 Dual Antiplatelet Therapy Guided by CYP2C19 Polymorphisms after Implantation of Second-Generation Drug-Eluting Stents for Management of Acute Coronary Syndrome.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int Heart J.	6. 最初と最後の頁 21-26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1536/ihj.17-005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hoyano M, Kase M, Nishida K, Kubota N, Takano T, Okubo T, Kimura S, Yanagawa T, Ozawa T, Kashimura T, Ozaki K, Minamino T
2. 発表標題 Pd/Pa Fluctuation with Continuous ATP Administration Indicates Incomplete Hyperemia in the FFR Measurement
3. 学会等名 第83回日本循環器学会学術集会 横浜
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yanagawa T, Matsuo S, Ozaki K, Minamino T et al.
2. 発表標題 Difference of Optimal UFH Dose for Percutaneous Coronary Intervention for Patients on Warfarin or Direct Oral Anticoagulant
3. 学会等名 第27回日本心血管インターベンション治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takano T, Yanagawa T, Ozaki K, Minamino T et al.
2. 発表標題 Efficacy of PCSK9 Inhibitor Treatment for Repeated In-stent Restenosis with High Lipoprotein(a) Level
3. 学会等名 第27回日本心血管インターベンション治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hoyano M, Yanagawa T, Ozaki K, Minamino T et al.
2. 発表標題 The Fluctuation of Pd/Pa during Continuous ATP Administration Indicates Incomplete Hyperemia in the FFR Measurement
3. 学会等名 第27回日本心血管インターベンション治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 五十嵐聖、柳川貴央、南野徹 など
2. 発表標題 抗凝固薬内服の有無によるPCI時適正ヘパリン投与量の検討
3. 学会等名 第50回日本心血管インターベンション治療学会関東甲信越地方会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takano T, Yanagawa T, Minamino T et al.
2. 発表標題 Relationship between Achilles Tendon thickness and Clinical Characteristics in Patient with Coronary Heart Disease.
3. 学会等名 第26回日本心血管インターベンション治療学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	南野 徹  (Minamino Tohru)  (90328063)	順天堂大学・医歯学系・教授   (32620)	
研究分担者	小澤 拓也  (Ozawa Takuya)  (70467075)	新潟大学・医歯学系・客員研究員   (13101)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	清水 逸平  (Shimizu Ippei)		
研究協力者	保屋野 真  (Hoyano Makoto)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	須田 将吉  (Suda Masayosi)		
研究協力者	高野 俊樹  (Takao Toshiki)		
研究協力者	尾崎 和幸  (Ozaki Kazuyuki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関