

機関番号：24701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590835

研究課題名（和文） 冠動脈プラーク不安定化における単球及び血管内皮前駆細胞の関与と治療法の確立

研究課題名（英文） Effect of circulating monocyte subsets and endothelial progenitor cells on coronary plaque rupture

研究代表者

今西 敏雄 (IMANISHI TOSHIO)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00285389

研究成果の概要（和文）：

血中の2つの異なる単球サブセット（ $CD14^{high}CD16^{-}CCR2^{+}$ 単球と $CD14^{+}CD16^{+}CX3CR1^{+}$ 単球）の心血管病変の形成に及ぼす影響について、OCT, あるいはMRI検査を組み合わせ検討した。ヒト心筋梗塞において、 $CD14^{high}CD16^{-}CCR2^{+}$ 単球の過剰な増加は、MRI検査で評価した心筋梗塞後の心筋救済の低下、左室リモデリングの進行に関与することを明らかにしました。また、末梢血単球サブセットの $CD14^{low}CD16^{+}CX3CR1^{+}$ の相対的増加はMDCT検査により同定された不安定プラーク（プラークCT値の低下および／または陽性リモデリングを満たすもの）の存在と有意に関連すること、およびoptical coherence tomography (OCT)検査より評価した線維性被膜厚と有意に逆相関すること等を明らかにしました。

研究成果の概要（英文）：

Monocytes represent a heterogenous circulating population of cells. We showed that dynamic changes occur in 2 distinct monocyte subset levels ( $CD14^{+}CD16^{-}CCR2^{+}$  and  $CD14^{+}CD16^{+}CX3CR1^{+}$ ) in patients with acute myocardial infarction, and that stochastic profiling of this monocyte system may have hold clinical utility with respect to cardiovascular diseases (*J Am Coll Cardiol.* 2009). Early diagnosis and risk stratification of patients with stable angina pectoris (SAP), or acute coronary syndrome is of utmost importance. We examined the impact of circulating monocyte subset levels on the burden of coronary vulnerable plaque. First, we investigated the relationship between monocyte subsets and coronary plaque vulnerability, such as positive remodeling (remodeling index >1.05) and/or low CT attenuation (< 35 HU), assessed by multi-detector computed tomography (MDCT) in 80 patients with SAP. The distinct monocyte subsets were measured by flow cytometry. The

relative proportions of CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup> monocytes were significantly higher in patients with coronary vulnerable plaque than in patients without it. These monocyte subpopulations positively correlated with remodeling index, and negatively with CT attenuation value (*Atherosclerosis*. 2010). Next, we examined the association of monocyte subset counts with coronary fibrous cap thickness (FCT) in 40 patients with unstable angina pectoris. The changes in the non-culprit FCT were assessed by optical coherence tomography (OCT) at baseline and after 9 months. The percent changes in FCT showed significantly negative correlation with the percent changes in CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup> monocytes, but not CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes (*Atherosclerosis*. 2010). In conclusion, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> CX3CR1<sup>+</sup> monocytes may serve as a novel biomarker for coronary plaque vulnerability.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：冠動脈プラーク、急性冠症候群、単球、血管内皮前駆細胞、OCT

#### 1. 研究開始当初の背景

冠動脈プラーク不安定化における単球および血管内皮前駆細胞の関与についての研究開始当初の背景を示す。病理組織学的研究により、冠動脈プラークの表面を覆う線維性被膜の脆弱化が急性冠症候群の発症基盤として重要であることが明らかにされている。我々は、この線維性被膜の変化に活性化単球による血管平滑筋細胞へのアポトーシス誘導が関与するという作業仮設の下に、(1)血管平滑筋細胞のアポトーシスはヒト冠動脈粥状硬化巣の進展に関与していること(Imanishi T, et al. *Am J Pathol*. 2000;156:125)、(2)活性化単球は血管平滑筋細胞に Fas 誘導アポトーシスを惹起すること(Imanishi T, et al. *Atherosclerosis*. 2002;161:143)を示した。更に、他のグループにより、(1)末梢血単球の増加は虚血性心疾患の独立した危険因子

であること(*J Am Coll Cardiol*. 2006;47:1559)、(2)末梢血単球は単一ではなく、多様性を有する(炎症性および非炎症性)ことが明らかにされた。これらの知見より、単球の質的・量的変化は冠動脈プラークの不安定化の一因となるという着想を得た。一方、血管内皮不全は急性冠症候群の発症に密接に関与している。我々は、血管内皮機能における最も重要な制御因子である一酸化窒素(NO)に着目し、動脈硬化惹起因子の一つである angiotensin II (Ang II)は生体内における NO bioavailability を低下させることを明らかにした(Imanishi T, et al. *Hypertension*. 2006;48:1058)。また、他のグループにより、血管内皮機能障害の修復に際し、重要な役割を果たす血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cells: EPCs)数の減少は急性冠症候群の心血管イベントの発症に関連すること

が明らかにされている(N Engl J Med. 2005;353:999)。我々は、心血管危険因子とEPCの機能面との関連について、特にEPCの細胞老化に着目し、(1)実験高血圧ラットおよび本態性高血圧患者において、EPCの老化が進行していること(Imanishi T, et al. J Hypertension. 2005;23:1831), (2) Ang II や酸化LDLはEPCの老化を促進し、抗酸化剤はEPCの老化を抑制すること(Imanishi T, et al. J Hypertension. 2005;23:97, 他)を明らかにした。これらの知見より、骨髄由来の血管内皮前駆細胞の質的・量的変化は冠動脈プラークの不安定化の一因となるという着想を得た。以上の背景を下に、防御因子(EPC)と攻撃因子(炎症性単球)の量的・質的变化が冠動脈プラークの不安定化に関与するという作業仮説を構築した。

## 2. 研究の目的

急性冠症候群患者において、循環血中単球、および血管内皮前駆細胞の量的・質的变化は、冠動脈プラークの不安定化に関連するかを検討する。

## 3. 研究の方法

冠動脈プラーク性状と単球の多様性およびEPCの量的・質的差異との関連を検討する。冠動脈形成術(PCI)施行患者を対象に冠血管イメージングであるoptical coherence tomography (OCT)による冠動脈プラーク性状の評価を行う。OCT画像の取得および記録は、我々の既報論文(J Am Coll Cardiol. 2007; 50:933)と同様の方法で施行し、冠動脈プラークの性状解析を行う。解析項目はプラーク破裂、びらん、血栓、thin-cap fibroatheroma (線維性被膜径 $< 65\mu\text{m}$ )の有無とする。PCI施行直前の末梢血および責任冠血管病変前後の血液を採取し、直ちにフローサイトメトリ法を施行し、全単球数、単球サブセットを測定する。急性冠症候群の場合のみ、経時的(来院時、PCI施行直後、発症1, 2, 3, 4, 5, 7, 12日後)に末梢血採血を施行し、測定を行う。単球サブセットは、CD14抗体、CD16抗体を用いた2重染色により、CD14とCD16の発現様式の差異により2つのサブセット、すなわちCD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup>単球(炎症単純球)、CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>単球(非炎症性単球)に分類する。同様にEPCの同定はFITC-conjugated CD34<sup>+</sup>, PE-conjugated KDR<sup>+</sup>, ADR-conjugated annexin V<sup>+</sup>を用いた三重染色による。また、EPCの培養・機能評価等に関しては、我々の既報の論文に準じて施行する。

## 4. 研究成果

平成20年度~21年度の研究において、末梢血単球のサブセット(CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup>CCR2<sup>+</sup>, CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>)は、急性冠症候群(ACS)

の病態形成、および冠動脈プラーク破裂にどのように関与するかを検討した。【方法および結果】急性心筋梗塞(AMI)、不安定狭心症(uAP)、安定狭心症、健常人の4群を対象とした。AMI患者においてCD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup>CCR2<sup>+</sup>の割合は他の3群に比し、有意に高値であった。一方、uAP患者では、単球サブセットの分布に多様性(CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup>CCR2<sup>+</sup>優位型とCD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>優位型の2タイプ)を認めた。この多様性の原因を解明するため、uAP患者46名を対象に、単球サブセットの多様性と冠動脈プラーク性状との関連をみた。冠動脈プラークの性状評価にはOCTを用いた。プラーク破裂群と非破裂群に分類したところ、プラーク破裂群は27名(59%)、非破裂群は19名(41%)にみられた。冠動脈プラーク破裂のバイオマーカーとして有用であることが証明されている高感度CRPとの関連をみた結果、プラーク破裂群は非破裂群に比し、有意に高値であった。単球サブセットとの関連をみた結果、プラーク破裂群は非破裂群に比し、有意にCD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>単球数が高値であった。一方、CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup>CCR2<sup>+</sup>単球数はプラーク破裂の有無と有意な関連を認めなかった。また、CX3CR1ケモカインのレセプターであるfractalkineに関して、その血中濃度を比較したところ、プラーク破裂群は非破裂群に比し、有意に高値であった。【結論】末梢血単球の質的差異は、ACSの病態に関与している可能性が示唆された。

平成22年度においては、(1)安定狭心症患者における不安定プラーク同定と末梢血単球サブセットとの関連、(2)スタチン系薬剤投与による末梢血単球サブセットおよび冠動脈の線維性被膜厚に及ぼす効果について検討した。【方法および結果】(1)61安定狭心症患者を対象に、末梢血単球サブセットの分布様式とmulti-detector computed tomography (MDCT)検査により同定された不安定プラークの関連を検討した。その結果、CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>単球の相対的増加は安定狭心症患者における冠動脈プラークの不安定化に関与することを明らかにした。(2)不安定狭心症患者で急性期に冠動脈形成術(PCI)を施行し、再灌流に成功した40症例を対象に、スタチン系薬剤投与による末梢血単球サブセットおよび冠動脈の線維性被膜厚に及ぼす効果を検討した。その結果、スタチン系薬剤の投与はCD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>単球を有意に低下させた。また、線維性被膜厚の変化はCD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>単球と有意な負の相関関係を認めた。【結論】末梢血単球サブセットは、急性冠症候群発症前の不安定プラークの同定および薬物治療の効果判定に関して、優れたバイオマーカーになり得る可能性が示唆された。

## 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 18 件)

1. Imanishi T\*, Ikejima H, Tsujika H, (10 人中 1 番目). Impact of Monocyte Subsets on Fibrous cap Thickness in Patients with Unstable Angina Pectoris. **Atherosclerosis**. 2010;212::628-635. (\*corresponding author) (査読有り)
2. Kashiwagi M, Imanishi T\*, Tsujioka H, (13 人中 2 番目). Association of monocyte subsets with vulnerable characteristics of coronary plaques assessed by 64-slice computed tomographic angiography. **Atherosclerosis**. 2010;212:171-176. (\*corresponding author) (査読有り)
3. Takarada S, Imanishi T\*, Goto M, (9 人中 2 番目). First-in-human experience of real-time measurement of nitric oxide in coronary circulation. **Eur Heart J**. 2010;31:2862-2870. (\*corresponding author) (査読有り)
4. Tanimoto T, Imanishi T, Kitabata H, (15 人中 2 番目). Prevalence and clinical significance of papillary muscle infarction detected by late-gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. **Circulation**. 2010;120:2281-2287. (査読有り)
5. Liu Y, Imanishi T\*, Ikejima H. (12 人中 2 番目). Association Between Circulating Monocyte Subsets and In-Stent Restenosis After Coronary Stent Implantation in Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction. **Circ J**. 2010;74:2585-2591. (\*corresponding author) (査読有り)
6. Kuroi A, Imanishi T\*, Suzuki H, (7 人中 2 番目). Clinical characteristics of Patients With Kawasaki Disease and Levels of Peripheral Endothelial Progenitor Cells and Blood Monocyte Subpopulations. **Circ J**. 2010;74:2720-2725. (\*corresponding author) (査読有り)
7. Mizukoshi M, Imanishi T, Tanaka A (11 人中 2 番目). Clinical classification and plaque morphology determined by optical coherence tomography in unstable angina pectoris. **Am J Cardiol**. 2010;106:323-328. (査読有り)
8. Takarada S, Imanishi T, Ishibashi K (12 人中 2 番目). The effect of lipid and inflammatory profiles on the morphological changes of lipid-rich plaques in patients with non-ST elevated acute coronary syndrome: follow-up study by optical coherence tomography and intra-vascular ultrasound. **JACC Cardiovasc Interv**. 2010;3:766-772. (査読有り)
9. Tsujioka H, Imanishi T\*, Ikejima H (12 人中 2 番目). Post-reperfusion enhancement of CD14(+)CD16(-) monocytes and microvascular obstruction in ST-segment elevation acute myocardial infarction. **Circ J**. 2010;74:1175-1182. (\*corresponding author) (査読有り)
10. Kubo T, Imanishi T, Kashiwagi M (15 人中 2 番目). Multiple coronary lesion instability in patients with acute myocardial infarction as determined by optical coherence tomography. **Am J Cardiol**. 2010;105:318-322. (査読有り)
11. Ikejima H, Imanishi T, Tsujioka H (8 人中 2 番目). Effect of human peripheral monocyte subsets on coronary flow reserve in infarct-related artery in patients with primary anterior acute myocardial infarction. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 2010;37:453-459. (査読有り)
12. Takarada S, Imanishi T, Liu Y (17 人中 2 番目). Advantage of next-generation frequency-domain optical coherence tomography compared with conventional time-domain system in the assessment of coronary lesion. **Catheter Cardiovasc Interv**. 2010;75:202-206. (査読有り)
13. Ikejima H, Imanishi T\*, Tsujioka H (11 人中 2 番目). Upregulation of fractalkine and its receptor, CX3CR1, is associated with coronary plaque rupture in patients with unstable angina pectoris. **Circ J**. 2010;74:337-345.

(\*corresponding author) (査読有り)

14. Tanimoto T, Imanishi T, Tanaka A (11人中2番目)  
Bedside assessment of myocardial viability using  
transmural strain profile in patients with ST-elevation  
myocardial infarction: comparison with cardiac  
magnetic resonance imaging. **J Am Soc Echocardiog.**  
2009;22::1015-1021. (査読有り)
15. Tsujioka H, Imanishi T\*, Ikejima H (16人中2番目)  
Impact of heterogeneity of human peripheral blood  
monocyte subsets on myocardial salvage in patients  
with primary acute myocardial infarction. **J Am Coll  
Cardiol.** 2009;54:130138. (\*corresponding author) (査  
読有り)
16. Tanaka A, Imanishi T, Kitabata G (20人中2番目)  
Lipid-rich plaque and myocardial perfusion after  
successful stenting in patients with non-ST-segment  
elevation acute coronary syndrome: an optical  
coherence tomography study. **Eur Heart J.**  
2009;30:1348-1355. (査読有り)
17. Kitabata H, Imanishi T, Kubo T (20人中2番目)  
Coronary microvascular resistance index immediately  
after primary percutaneous coronary intervention as a  
predictor of the transmural extent of infarction in  
patients with ST-segment elevation anterior acute  
myocardial infarction. **JACC Cardiovasc  
Imaging.**2009;2:263-272. (査読有り)
18. Takarada S, Imanishi T, Kubo T (9人中2番目) Effect  
of statin therapy on coronary fibrous-cap thickness in  
patients with acute coronary syndrome: assessment by  
optical coherence tomography study. **Atherosclerosis.**  
2009;202:491-497. (査読有り)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

今西 敏雄 (IMANISHI TOSHIO)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：00285389

### (2) 研究分担者

赤坂 隆史 (AKASAKA TAKASHI)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：70322584

財田 滋穂(TAKARADA SHIGEHO)  
和歌山県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：10405417

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：