

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2011

課題番号：20590840

研究課題名（和文） 新規血管炎症性マーカーPTX3の意義

研究課題名（英文）

Investigation of a novel a cardiovascular inflammation marker, Pentraxin 3

研究代表者

井上 健司（INOUE KENJI）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：80317388

研究成果の概要（和文）：

我が国のみならず心血管障害による死亡は先進諸国では最も多いことが知られております。そのため正しい診断、予後の測定、治療効果等を専門医以外でも可能にあることが期待されます。診断に汎用されております心電図や心臓超音波検査などを含めた生理学的検査結果は判読にはやはり専門能力を必要とされます。我々が開発した Pentraxin 3 は血液わずか 20 μ L で測定できるマーカーで血管の炎症状況を反映すると考えられています。本研究を投資急性冠症候群の予後判定、睡眠時無呼吸症候群での治療効果判定に有効など多くの知見が得られました。

研究成果の概要（英文）：

In Japan as well as industry countries, the mortality caused by cardiovascular disease is worst. General practitioners are expected to make a diagnosis of such disease although they are not cardiologist. ECG or UCG are useful tools to make a diagnosis for such disease, but still, they require specific technique to make a diagnosis. We established a novel cardiovascular marker, Pentraxin 3 (PTX3). Only 0.1mL blood sample reflect the status of the inflammation of vascular. In this study, we have reported that PTX3 was a useful marker to predict the prognosis for patients with acute coronary syndrome, or sleep apnea syndrome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：循環器内科学

キーワード：バイオマーカー、急性冠症候群

1. 研究開始当初の背景

①研究の学術的背景

(1) 炎症性疾患である動脈硬化

動脈硬化発生の際に、脂質沈着と同時に単球/マクロファージや T リンパ球の浸潤があることは以前から知られていましたが、

炎症が注目されたきっかけには、大きく 2 つありました。1 つは、臨床病理学的検討から心筋梗塞の起こった冠動脈病変の病理組織にはプラークの破綻があり、そこには炎症細胞が存在すること、もう 1 つは、スタチンを使ったコレステロール低下療法による臨床試験の結果から考えられました。これらの試験では、動脈硬化の退縮がわずかであったにも関わらず、動脈硬化性疾患である心血管イベントの発症が著明に減少するという結果が得られました。このことから、従来は、動脈硬化の量が増えて狭窄の程度が強くなったためにイベントが起こる、すなわち量の問題と考えられていた動脈硬化が、血管壁の質が重要であるという考え方に変わっていきました。

(2) hs-CRP

急性冠症候群の病態が炎症性疾患であることから炎症マーカー、高感度 CRP:hs-CRP が注目されるようになってきました。通常の CRP 測定値の下限は 1mg/L ですが、hs-CRP は 0.2mg/L まで測定が可能です。米国心臓病学会では動脈硬化病変を有する患者に hs-CRP の測定を推奨しており、心血管疾患リスク判定上の閾値については、1.0mg/dL 未満を「低リスク」、1.0～3.0mg/L を「中等リスク」、3.0mg/L を超える場合を「高リスク」と規定しています。高リスク者の冠動脈疾患 10 年発症率は低リスク者のおよそ 2 倍と見積もれます。

(3) hs-CRP の問題点

しかし英国の Packard らや、米国の Miller ら (Arch Intern Med. 2005;165:2063-2068) は、多変量解析でみると hs-CRP の心血管イベントの予測能力は高くない、たとえ心血管疾患リスクが存在していても、全例に hs-CRP を測定することの疑問であると 2004 年、2005 年に相次いで報告しました。

CRP は肝臓で生成される炎症非特異的マーカーで、軽微な全身性感染症の存在で有意に増加します (CRP の正常値は 0.3mg/dL 以下です。すなわち hs-CRP では 3mg/L 以下となり、「中等リスク」は正常範囲内に属していることとなります)。CRP 値の心血管疾患リスク判定上の閾値についてもわずか 3.0mg/dL 以内で 3 階級に分類しているため、軽微な炎症により冠動脈の重症度を見誤る可能性があります。また、加齢や肥満者、1 日 20 本以上の喫煙者などでは軽度上昇を示すことが知られており冠血管疾患の独立した危険因子とはいえません。前述の Packard らはコレステロール高値や喫煙歴といった因子のほうが、予後因子としてむしろ優れていると結論づけています。

(4) Pentraxin3 (PTX3)

PTX3 は申請者の前勤務先であった東京大学先端化学技術研究センターの児玉龍彦教授らが cDNA マイクロアレイを用いて見出したヒト臍帯静脈内皮細胞で最もピタバスタチンに抑制された遺伝子です (Morikawa S, J. Athero Thromb, 2004)。本実験はスタチンの多面的作用の標的遺伝子を同定するために行われましたが、驚くべきことに PTX3 は CRP と同じ pentraxin ファミリーに属する急性炎症性反応タンパクでした。さらに PTX3 は血管内皮細胞やマクロファージといった動脈硬化病変に存在する細胞で特異的に発現しており、いわば“血管 CRP”といえます。そこで申請者は PTX3 測定 ELISA システムを開発しました。イタリアのグループより、PTX3 は急性心筋梗塞患者で上昇することや (Peri G, Circulation 2004)、予後規定因子であることがすでに報告されておりましたが、われわれが開発したものは彼らの開発した PTX3 測定系より感度で約 7 倍優れていま

した。またこれまでの申請者による 700 名超の検討より正常者の PTX3 値が平均 2 ng/mL であること、不安定狭心症では 5-7ng/mL、心筋梗塞患者では 10-20ng/mL と上昇すること、古典的冠血管因子とは独立した因子であることがわかってきました (Inoue K et al, ATVB, 2007)。また 140 名に及ぶ急性冠症候群の詳細な結果から 1) PTX3 は破裂したプラーク周辺から採取された採血検体に高値を示すこと、2) 冠動脈内から回収された血栓や脆弱プラーク内に浸潤した好中球に多くの発現をみることから、PTX3 は炎症箇所に集簇する好中球が主な発生源であることを突き止めました (Inoue K et al, ISRN Vascular Medicine, 2012)。

2. 研究の目的

上記の如く、PTX3 は新規急性冠症候群予測マーカーとして成り立つ可能性が極めて高いと考えます。また同疾患で上昇する機構は血栓と好中球が重要であることがわかりました。我々が開発した高感度ヒト PTX3 測定キットは感度が非常に優れわずか 20 µl の血漿から測定できます。そしてキットの最大の特徴のひとつは安定性です。すなわち血漿分離後-20 度保存であれば少なくとも 1 年間は安定的に PTX3 を測定できます。この点を最大限にいかし、PTX3 測定の意義を以下の 5 つの研究を通して説明することを目的としました。

- 1) 正常値 (カットオフ値) の設定 :
- 2) 冠動脈 CT 検査施行症例でのスクリーニングマーカーとしての意義
- 3) 急性冠症候群での予後判定マーカーとしての意義
- 4) 胸痛患者における新規鑑別診断マーカーとしての意義
- 5) 睡眠時無呼吸症候群患者に対する

CPAP 療法の効果判定

3. 研究の方法

(1):正常値 (カットオフ値) の設定。

2007 年に発表した論文 (Inoue K et al ATVB 2007) では 56 人の健常者より正常値を 1.98ng/mL (95% CI:1.68-2.28) と規定しましたが、年代別、性別の正常値を規定するために検体数を増やしました。長崎県上五島の集団健診受診者、2514 名 (平均年齢 60.3 歳、男性 47%) を対象に PTX3 値を測定しました。

(2):冠動脈 CT 検査施行症例でのスクリーニングマーカーとしての意義

順天堂大学医学部附属練馬病院には 64 列冠動脈 CT 装置 (MDCT) が常備され年間 650 例の検査をこなしています。一般に MDCT の感度は 95%、特異度 90~95% 程度であり (Mollet, Circulation 2005), 陰性的中率のすぐれた検査であることが知られています (98-99%)。しかし陽性的中率は 75-90% と低いことが問題とされています。原因には石灰化病変の存在があげられます。そこで ZIO Station: ZIOSOFT.INC 石灰化スコアリングソフト ver1.1 を用いて、石灰化ボリュームを数値化し、Agaston score を元に石灰化病変を分類し、石灰化スコアで 200 以下のケースで、血漿 PTX3 値が MDCT の疑陽性をどこまで減らせるかを検討します。MDCT 検査に際、造影剤点滴を刺入するが、その際検体を採血します。PTX3 が MDCT の疑陽性を減らすマーカーになるかどうかを検討します

(3):急性冠症候群での予後判定マーカーとしての意義

2006年当初より、我々は積極的に急性冠症候群症例の血漿PTX3値を測定しております。20例 (男性16名、平均年齢69.8歳)

の先行検討で、4例が重症心不全に陥りましたが、そのような例ではいずれもPTX3はPCI後24時間通して高値を持続するのに対し(重症例：24.2 ng/mL vs. 軽症例：10.2ng/mL, $p<0.05$)、Myeloperoxidase (MPO)は予後のよい症例ですら、PCI治療開始時の採血が最高値で以後低下していくのみでした(重症例：255.8 pM vs. 軽症例；245.4pM, $p=0.24$)。このことから血漿PTX3値は急性心筋梗塞の予後マーカーとしてMPOより優れている可能性があると考えました。今後症例を増やし検討していく予定としました。

(4)：胸痛疾患の鑑別診断としての意義
救急室に胸痛を主訴として来院した患者において緊急性のある鑑別すべき疾患として、1) 急性心筋梗塞 (AMI)、2) 不安定狭心症 (UAP)、3) 異型狭心症 (VAP)、4) 気胸、5) 大動脈解離、6) 肺塞栓があげられます。2007年6月より順天堂大学医学部附属練馬病院救急室に胸痛で来院した患者より同意取得後、血漿PTX3値を測定していました。先行検討として集めた94例の症例の内訳は72人が男性で年齢層は40-90歳でした。結果はAMIが40.2%に、UAPは12.6%、異型狭心症は3.4%、同様に大動脈解離は3.4%、非典型胸痛は20.7%でした。血漿PTX3値はAMI、UAPで有意に上昇していましたが、VAP、大動脈解離では正常範囲内でした。この理由としてVAPは同じ狭心症でもプラークの関与の少ないからであり、また大動脈解離では通常、出血傾向が多く、血小板消費も著しい、ということが知られており、血栓形成は急性期ではされずPTX3は正常範囲内だったと考察しました。そこで救急患者が多く、かつ心臓血管外科を有する順天堂大学医学部附属静岡病院と共同で、検体測定しPTX3が急性冠症候群に対してどの程

度の診断効率で、かつ鑑別診断に有効かを調べることを計画しました。

(5)；睡眠時無呼吸症候群患者(OSA)に対するCPAP療法の効果判定

睡眠時無呼吸症候群は、近年心血管障害をもたらす病態として知られております。しかしその関連性は十分明らかになっておりません。血管の炎症の程度との関連を調べるために50人のOSAと25人の正常の方を対象にPTX3値を調べることにしました。動脈硬化の程度を心一踵血管比(CAVI)を用いて同時に測定しました。また治療であるCPAPの効果を1か月後に判定、PTX3値の推移を調べました。

4. 研究成果

(1) 正常値 (カットオフ値) の設定。
長崎県上五島の集団健診受診者、2619名の受診者から、除外項目に該当した症例を除き、最終的には1749名(平均年齢59.6歳、男性46.8%)を対象に解析いたしました。PTX3は男性1.87 ng/mLに対し、女性は2.12 ng/mLで有意に女性で高いことがわかりました($P<0.0001$)。また高齢者ほど、その値は高くなります。しかし中性脂肪や肥満度には逆に減少傾向になります。そのため、それらを診断基準の要素とするメタボリック症候群では有意に低い値をとることがわかりました(非メタボリック症候群：1.82 ng/mL、メタボリック症候群2.11 ng/mL ($P=0.021$))。以上の内容は昨年末にClinical Chemistry Laboratory and Medicineに投稿、採択されました(Yamasaki K, Inoue K et al, CCLM 2009)。
(2) 冠動脈CT検査施行症例でのスクリーニングマーカーとしての意義
434連続症例(37歳—90歳、男性60.6%)を解析しました。29.6%に冠動脈疾患が疑われ、冠動脈造影検査を全例施行されまし

た。そのうち約 37%には有意狭窄を認めず、いわゆる疑陽性に分類されました。一方残り 63%は冠動脈治療を必要とした群（インターベンション群）になります。これらの PTX3 値を調べますと、インターベンション群：2.17 ng/mL, 疑陽性群 1.74ng/mL と優位で疑陽性群で PTX3 値は低く、そのオッズ比は 3.42 倍でした。以上より冠動脈 CT に血漿 PTX3 値を考慮すると約 3.4 倍の疑陽性群を減らすことができるという結論になります。本研究は、2009 年の日本循環器学会において **Featured Research Session**（英語口述発表：採択演題 2500 演題中約 100 演題が選ばれるセッションで）に採択され発表いたしました（Okai I, Inoue K et al, JCS 2009 FRS）

(3) 急性冠症候群での予後判定マーカーとしての意義

胸部不快感を主訴に救急車要請し、来院した計 524 名に対して、PTX3 を含む、各種バイオマーカーを採血、比較検討いたしました。対象バイオマーカーには hsCRP, NT-proBNP, MPO, CPK, WBC を取りました。エンドポイントには 1) 入院中死亡、2) 心原性ショック（IABP, PCPS 挿入を必要とした症例）、3) 重症肺水腫（気管内挿管し人工呼吸管理を必要とした症例）を取りました。多変量解析をした結果、もっとも重症患者を入院時採血で予測したマーカーは PTX3 でした。Receiving Operating Character 曲線よりカットオフ値を算出し、入院中の生存曲線を描くとカットオフ値以上の PTX3 値を示す症例群では有意に死亡率が増加することがわかりました。本内容はヨーロッパ心臓病学会で口頭発表(Inoue K et al, 2009 ESC meeting) した。

(4) 胸痛患者における新規鑑別診断マーカーとしての意義

また 3 と同じ対象群に対し急性冠症候群 (ACS) をどのくらいの確からしきで測定できるか、追加項目として高感度トロポニン T (hs-TnT), ヒト心臓脂肪酸結合タンパク (H-FABP) を加えて後解析を行いました。患者背景は以下の通りでした。ST 上昇型心筋梗塞 (STEMI) 52%, 非 ST 上昇型心筋梗塞 (NSTEMI) 9.0%, 不安定狭心症 (UA) 8.8%。非典型的胸痛 (non-ACS) に異型狭心症 (VAP) 4.9%。冠動脈疾患以外の胸痛は 7.1%で、たこ壺型心筋症 3.4%、原因不明 19%でした。

ACS の診断精度は hs-TnT, H-FABP が PTX3 より、感度・特異度でより優れていました。次に、胸痛発症後の診断効率を経時的に調べました。hsTnT の感度は発症 3 時間後で最も高いですが、全体の感度は最も低く、一方 H-FABP の陽性尤度比と予測値は 3 時間以降では優れていました。hsTnT、H-FABP、PTX3 の AUC は、時間によって徐々に増加しましたが H-FABP は hsTnT より優れていました。以上より hs-TnT は ACS ルールアウトの診断検査として最も優れているが、感度が高いため、偽陽性になりやすいのではないかと考察しました。診断能力としては H-FABP に類似しており、また MPO と H-FABP の組み合わせが ACS の早期診断の改善に最適と考えました。本報告は Circulation Journal に掲載されました (Inoue K, et al, Circ J 2011)

(5) 睡眠時無呼吸症候群(OSA)患者における新規鑑別診断マーカーとしての意義

OSA は炎症を引き起こし、血管障害から動脈硬化を引き起こすことが知られております。50 人の OSA と 25 人の正常群の PTX3 を測定、これまで動脈硬化マーカーとして使用されている CRP 値と比較いたしました。PTX3 は中等度以上の OSA で有意に上昇し(2.36 ng/mL vs 1.53 ng/mL)、脈波と非独立性に有意に相関しておりました。OSA の治療法であ

ります CPAP 療法で PTX3 値も有意に改善することが示されました。以上より PTX3 は OSA による動脈硬化の程度を反映し、治療効果マーカーになることを見出しました。その結果を American Journal of Hypertension に報告しています(Kasai T, Inoue K et al AJH 2011)。

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] (英文計 7 件, 和文計 13 件)

- 1) Human pentraxin 3 (PTX3) as a novel biomarker for the diagnosis of pulmonary arterial hypertension. Tamura Y, **Inoue K**, Fukuda K et al. PLoS One. 2012;7(9):e45834. doi: 10.137
- 2) The proteomic profile of circulating pentraxin 3 (PTX3) complex in sepsis demonstrates the interaction with azurocidin 1 and other components of neutrophil extracellular traps. Daigo K, **Inoue K**, Hamakubo T. et al Mol Cell Proteomics. 2012 Jun;11(6):M111.015073
- 3) Pentraxin 3 (PTX 3) Released from Neutrophils Increases Plasma PTX3 levels in Patients with Acute Coronary Syndrome **Inoue K**, S Daida H 2012 ISRN Vascular Medicine
- 4) Pentraxin 3: A Novel Biomarker for Inflammatory Cardiovascular Disease **Inoue K**, Kodama T Daida H et al Int J Vasc Med.2012:657025.
- 5) Heart Fatty Acid-Binding Protein Offers Similar Diagnostic Performance to High-Sensitivity Troponin T in Emergency Room Patients Presenting With Chest Pain. **Inoue K**, Daida H. et al Circ J. 2011; 75(12):2813-20

- 6) Plasma Pentraxin3 and Arterial Stiffness in Men With Obstructive Sleep Apnea. Kasai T, **Inoue K**, Narui K. et al Am J Hypertens. 2011 24(4):401-7
- 7) Determination of physiological plasma pentraxin 3 (PTX3) levels in healthy populations. Yamasaki K, Kurimura M, Kasai T, **Inoue K** ****corresponding author** Clin Chem Lab Med. 2009;47(4):471-7.

[学会発表] (計 6 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 全身性炎症反応症候群の治療又は予防剤

発明者: 浜窪 隆雄, 津本 浩平, 太期 健二, 井上 健司, 山口 尚敬, 水内 素晶

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 2012-141380

出願年月日: 2012/06/22

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 件)

名称: 心血管イベント発症リスクの診断方法

発明者: 井上健司、代田浩之、濱田里子、向井濟、相良三奈

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2008-144235 (P 2008-144235)

取得年月日: 平成 20 年 6 月 2 日 (2008. 6. 2)

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 健司 (KENJI INOUE)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 80317738

(2) 研究分担者

諏訪 哲 (SATORU SUWA)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号: 90226643