

機関番号：37104

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790563

研究課題名（和文）内皮由来マイクロパーティクルと内皮傷害～血中バイオマーカーによる内皮機能評価法～

研究課題名（英文）Association between endothelium delived microparticle and endothelial dysfunction - evaluation method of the endothelial function with blood biomarker -

研究代表者

姉川 敬裕（ANEGAWA TAKAHIRO）

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：00511833

研究成果の概要（和文）：フローサイトメトリーを用いた特異度の高い内皮由来マイクロパーティクル（EMP）の測定法を確立した。また、EMP が内皮機能の特異的に反映するバイオマーカーであるという仮説に基づき、健康若年者の喫煙が内皮機能に与える影響に関して検討した。EMP を測定したが、喫煙者・非喫煙者間の EMP 数に有意差はなく、禁煙による EMP 数の減少は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：We established a high specificity method of measuring endothelium delived microparticles (EMP). We examined whether smoking by young health people associate with endothelial function. Number of EMP has not significant difference between smoker and non-smoker. Reduction of EMP by quit smoking was not recognized.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：血管内皮機能、内皮由来マイクロパーティクル、フローサイトメトリー、Flow mediated vasodilatation、予防医学

1. 研究開始当初の背景

血管内皮機能は、心血管病の重要な独立した予後規定因子である。血管内皮機能の評価することにより、今後、増加が予想される高血圧・動脈硬化・心不全発症のリスク層別化が可能となり、ひいては心血管病の予防・早期治療につながると考えられる。したがって、血管内皮機能を非侵襲的にかつ簡便に評価する方法を開発することは、生活習慣病を主体とした公衆衛生の観点からも極めて重要な意義をもつ。

Microparticle は、傷害された血管構成細胞（内皮細胞、平滑筋細胞、血球細胞）から循環血中に遊離・放出された細胞膜を主構成要素と

する微少粒子である。Endothelium-derived microparticle (EMP) は血管内皮細胞由来の microparticle で、血管内皮細胞の傷害のマーカーと考えられている。すなわち EMP は、酸化ストレスなどの障害因子による内皮細胞のアポトーシスや、炎症性サイトカイン刺激により血中に放出されると考えられている。

このように EMP は、これまで報告されている種々の内皮関連バイオマーカーと異なり、内皮傷害そのものを特異的に反映すると考えられる。しかし、現時点まで実際に、EMP と従来の血管内皮機能指標（FMD 等）との関係について直接比較検討されたことがない。

2. 研究の目的

われわれは、血中 EMP 数に加えて、EMP における酸化ストレス・炎症マーカー・アポトーシスマーカー発現を検討することで、生体内の血管に対する酸化ストレス、内皮炎症や血管内皮アポトーシス等、内皮障害の原因を定量評価することを目指した。

3. 研究の方法

EMP が血管内皮傷害に特異的なバイオマーカーであることのみならず、内皮傷害の原因のバイオマーカーとなりうることを明らかにする試みである。具体的には、以下のことを目指した。

- (1) 慢性喫煙による内皮傷害が、フローサイトメトリーで測定した末梢血中 EMP 数と血管エコー法で測定した FMD 値に及ぼす影響とを比較検討し、EMP が血管内皮機能低下の指標となることを明らかにする。
- (2) さらに、脂質酸化ストレスマーカーやアポトーシスマーカーを発現している EMP を測定することで、内皮傷害の原因を非侵襲的に直接明らかにする方法を開発する。
- (3) 頸部血管エコー上の動脈硬化所見と EMP との間に相関を見出し、EMP が脳血管障害・心血管イベント発症の指標となりうることを明らかにする。

4. 研究成果

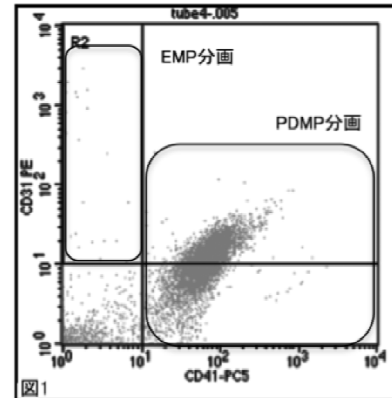
(1) 特異度の高い EMP 高感度定量計測法

EMP の計測は従来、末梢血より多血小板分画(platelet-rich plasma: PRP)さらには無血小板分画(platelet-poor plasma: PPP)を精製し、それぞれ血小板と内皮細胞の特異的表面抗原を用いたフローサイトメトリー法により行われている。これまで、各種疾患患者における EMP や PDMP の変化が報告されているが、MP のサイズは $10\mu\text{m}$ 以下であり従来型のフローサイトメーター (Becton Dickinson 社 BD FACSCalibur など) を用いた方法では測定限度以下であるという批判もある。そこで我々は、最近、市販された高感度フローサイトメーター BD FACS CANTO II (Becton Dickinson 社) を用いて、EMP を高特異度かつ高感度で定量化する測定法を開発することとした。

(2) 試料精製法の確立

従来型フローサイトメーター、FACSCalibur を用いて MP 試料精製法を検討した。既報に基づき PRP、PPP を用いたが PPP については超遠心の時間、回転数の数種類の組み合わせにつき検討した。その結果、末梢血全血を $500\text{g} \times 15$ 分間遠心分離し PRP を作成。上清を採取し $9,500\text{g} \times 5$ 分間遠心分離し PPP を作成。引き続き上清を採取し、 $20,500\text{g} \times 30$ 分間の超遠心分離を 2 回繰り返

返し、MP ペレットを採取。これを測定 buffer に再浮遊することが最も高い特異度で microparticles を分離できることを確認した (図1)。



EMP の検出に関しては 2-color 法フローサイトメトリー法を行い、抗 CD31 抗体陽性、抗 CD41 抗体陰性のものを EMP と判定した。また、MP ペレットは -80°C 凍結保存が可能であることも確認した。

(3) BD FACSCalibur と BD FACS CANTO II の比較

① 測定 buffer の適正化

従来型 FACSCalibur で適正化した試料、抗体測定条件で、同一サンプルを FACS CANTO II で測定した (図 2)。

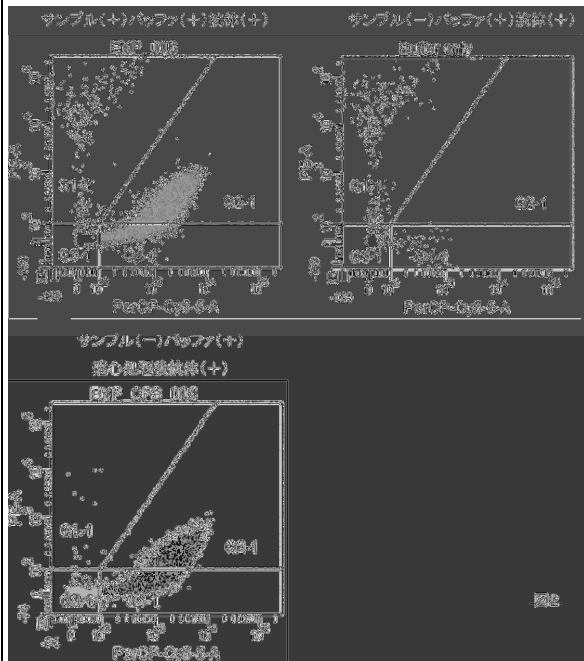


図2左に示すように FACS CANTO II により FACSCalibur で得られた EMP 数より遙かに多数のシグナルが得られた。図2中央に示すように MP ペレットを含まない測定 buffer と抗体のみで計測しても図2左とほぼ同等なシグナルが得られた。すなわち、従来型フローサイトメーターで得られたシグナルのほとんどが何らかのノイズであった可能性が示唆

された。そこで、抗体を混合直前に遠心分離し上清だけを用いる、buffer を純水ではなく超純水で希釈するなどトラブルシューティングを行った結果、図2右のように適正なEMPシグナルを得ることに成功した。

② カウントビーズの適正化

定量測定のための内部コントロールとして定法に従いカウントビーズ (BECKMAN COULTER 社:FLOW-COUNT) を添加してFACS CANTO II によりした。すると、カウントビーズ投与により著明な分画パターンの変化が見られた(図3中央)。これはカウントビーズまたはその希釈液(界面活性剤)がMPシグナルになんらかの悪影響を与えることが示唆された。そこで、カウントビーズ入りチューブ (BD Trucount; Becton Dickinson 社) を用いたところ、カウントビーズ混入なしと同様のシグナルパターンが得られた(図3右)。

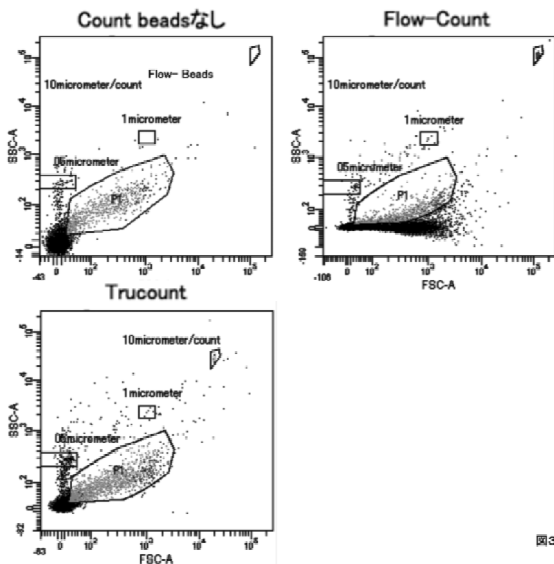


図3

(4) EMP測定法の検証

① 特異性の確認

EMP分画の特異性を確認するために、培養ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)の上清サンプルを測定し、そのEMP分画パターンと患者末梢血サンプルのパターンを比較検討した(図4)。HUVEC由来EMP分画(図4右)と末梢血由来EMP分画(図4左)が全く一致しており、本法は高感度でかつ特異度も極めて高いことが示された。

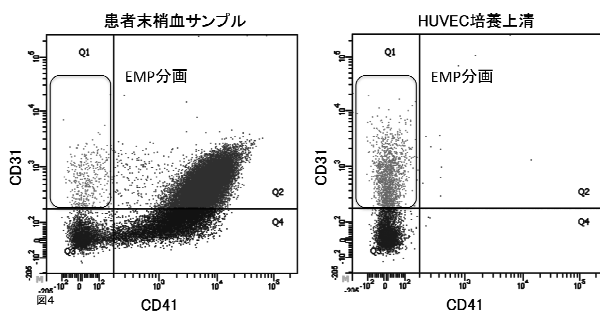
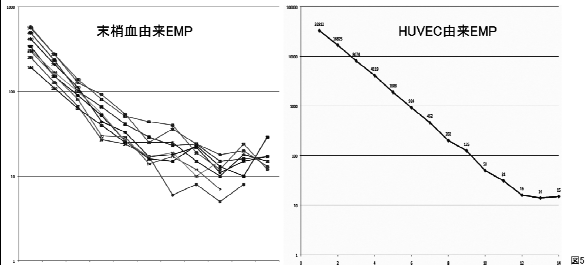


図4

② 定量性の確認

末梢血由来MPサンプルおよびHUVEC培養上清をそれぞれ倍数希釈したサンプルを測定した(図5)。いずれのサンプルにおいても倍数希釈によるEMP数の変化を本法により検出できた。その測定下限域は30-50 particle/ μ Lであった。



(5) 学生のEMPを測定

平成21年9月から久留米大学において、学生を対象とした試験を行った。

対象:健康な若年成人(喫煙者60名、非喫煙者20名)

常習喫煙者60名を20名ごと、ランダムに3群に割り当てる。

A群:喫煙継続群:4週間、通常通り喫煙

B群:中途禁煙群:2週間禁煙→2週間喫煙

C群:Vit.C内服群:4週間、通常通り喫煙

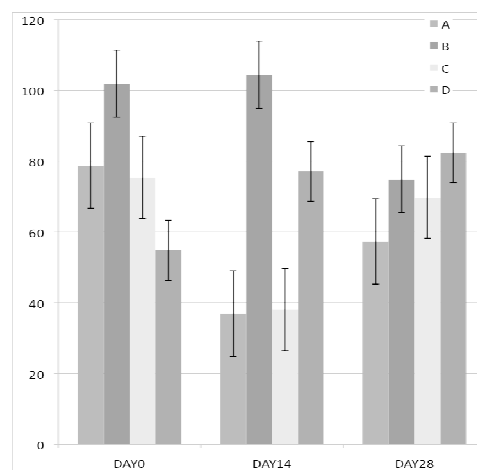
ただし、始め2週間はVit.C 3g/日内服
非喫煙健康ボランティア

D群:コントロール群、間接喫煙も避ける

方法:試験中、4週間は上記のごとく行動する。Day 0, 14, 28に採血で、EMPのカウントを評価する。

結果

- ・グラフのように、EMP数に関して、喫煙者、非喫煙者において差は認められなかった。
- ・A-D、4群間でEMP数に差は見られなかった。



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 3 件)

- ① Mori T, Anegawa T, ほか9名8番目, (査読有り)Enhanced cardiac inflammation and fibrosis in ovariectomized hypertensive rats -a possible mechanism of diastolic dysfunction in postmenopausal women-. Hypertens Res., 34, 2011, 496-502
- ② Takayama N, Anegawa T, ほか8名5番目, (査読有り) Simvastatin prevents large blood pressure variability-induced aggravation of cardiac hypertrophy in hypertensive rats by inhibiting RhoA/Ras-ERK pathways., Hypertens Res., 34, 2010, 341-347
- ③ 姉川敬裕, ほか5名1番目, (査読有り)非弁膜性心房細動に伴う脳梗塞の重症度・転帰とCHADS2スコアとの関連に関する研究, 脳卒中, 32, 2010, 129-132

[学会発表] (計 4 件)

- ① 姉川敬裕, 脳梗塞超急性期におけるリモートデスクトップサービス(Logmein®)を介した early CT signs 評価の信頼性, 第 13 回日本栓子検出と治療学会, 2010 年 11 月 19 日, 福岡
- ② 姉川敬裕, 高血圧性脳症の臨床症状に伴い穿通枝領域の可逆的浮腫を認めた症例, 第 33 回日本高血圧学会総会, 2010 年 10 月 17 日, 福岡
- ③ 姉川敬裕, 脳梗塞超急性期におけるリモートデスクトップサービス(Logmein®)を介した early CT signs 評価の信頼性, 第 33 回日本高血圧学会総会, 2010 年 10 月 17 日, 福岡
- ④ 姉川敬裕, リモートデスクトップサービス(Logmein®)を介した ASPECTS 評価の信頼性, 第 35 回日本脳卒中学会総会, 2010 年 4 月 17 日, 盛岡

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 画像診断における二次元の診断画像の理解を助ける方法及び装置

発明者: 姉川敬裕

権利者: 学校法人久留米大学

種類: 特許

番号: 2011-007155

出願年月日: 平成 23 年 1 月 17 日

国内外の別: 国内

○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:

6. 研究組織

(1) 研究代表者

姉川 敬裕 (ANEGAWA TAKAHIRO)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号: 00511833

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: