

様式 C-19

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24年5月22日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790723

研究課題名（和文） 不安定プラークと単球の関連性

研究課題名（英文） Association of monocyte subsets with vulnerability characteristics of coronary plaque

研究代表者

柏木 学（KASHIWAGI MANABU）

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教

研究者番号：70453181

研究成果の概要（和文）：末梢血単球は単一ではなく、多様性を有する（炎症性及び非炎症性単球の二つのサブセット）ことが明らかにされている。我々は、冠動脈CTを用いることで、不安定プラークとヒト末梢血単球の関連性について検討を行い、CD14+CD16+単球（非炎症性単球）が冠動脈リモデリング、CT値と相関する結果が得られた。またこれら非炎症性単球が、急性心筋梗塞患者において、炎症性単球と比較し、高頻度にToll-like receptor 4を発現していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Monocytes play an active role in coronary artery disease. Monocytes in human peripheral blood are heterogeneous. Differential expression of CD14 and CD16 enables monocytes to be divided into two subsets: CD14+CD16- monocytes and CD14+CD16+ monocytes, called as “inflammatory” and “pro-inflammatory”. We examined the relation between monocyte subsets and vulnerability characteristics of coronary plaques by using multidetector computed tomography. In our results, the relative proportion of CD14+CD16+ monocytes was positively correlated with remodeling index and negatively correlated with CT attenuation value. Furthermore, we investigated the involvement of Toll-like receptor 4 (TLR4) expression on two monocyte subsets in the pathologic processes related to acute coronary syndrome. The expression levels of TLR4 on CD14+CD16+ monocytes were significantly elevated in patients with AMI. Moreover, the up-regulation of TLR4 on admission was remarkably decreased at the chronic phase after AMI. TLR overexpression on CD14+CD16+ monocytes in AMI might be associated with the pathogenesis of AMI. In conclusion, CD14+CD16+ monocytes show a potential for a surrogate marker of vulnerable plaques and acute coronary syndrome.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

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：臨床心血管病態学

1. 研究開始当初の背景

ヒト末梢血単球は、冠動脈疾患や左室のリモデリングに関与することが報告されている。末梢血単球は単一ではなく、多様性を有する（炎症性及び非炎症性単球の二つのサブセット）こと（が明らかにされている。また、最近の研究では、冠動脈疾患を有する患者において、正常人と比較し、非炎症性単球が高値を示すことが報告されており、冠動脈プラークの形成と非炎症性単球の関連が示唆されている。冠動脈疾患の有無のみでなく、プラークの不安定性に関しても非炎症性単球が関連すると推測された。急性心筋梗塞は急性冠症候群の一病型として太い冠動脈の粥腫が破綻しそこに血栓が形成され冠脈が閉塞することにより発症する。急性心筋梗塞に対する再灌流療法（血栓溶解療法、カテーテルインターベンション）は、血行動態を安定させ、心筋壊死量を減らし、心筋梗塞の死亡率を5-10%と再灌流以前と比較し劇的に減少させた。しかしながら、急性冠症候群の多くは冠動脈造影において狭窄度が50%未満の病変から発症することから、その発症を事前に予測することは困難である。急性冠症候群の責任病変となりうる不安定プラークは薄い線維性被膜に被覆された炎症性変化に富む脂質コアを伴うプラーク（Thin-cap fibroatheroma, TCFA）と認識されている。単に、安定狭心症を生じうる冠動脈プラークより、実際に急性冠症候群に発展しうる不安定プラークの評価が重要となってきている。しかしながら以前は、非侵襲的に、プラークの不安定性を評価することが困難であった。近年、冠動脈マルチディテクターCT（multidetector-row computed tomography; MDCT）の普及により安定型狭心症の非観血的診断は比較的容易となり、急性冠症候群（acute coronary syndrome: ACS）の診断においても期待されている。また最近では、ACSを発症した患者の責任病変のプラークのCT値が安定狭心症の狭窄部より低値であることが報告されている。また、プラーク形成によって内腔狭小化を防ぐために、冠動脈が代償性に拡張し、内腔を確保する陽性リモデリングが起こり、見かけ上の狭窄度は軽く見えるが、プラークの容積はむしろ増大され、さらなるプラークの破綻の危険に曝される。陽性リモデリングの存在は脆弱性プラークの形態学的特徴の一つと言われている。その他、部分石灰化を伴うソフトプラークが心筋梗塞に関与していると言われている。実際に、低いCT値と陽性リモデリングのプラークを有する患者において、有意にACSを発症したと報告されておりまた光干渉断層法（OCT）により同定した、TCFAをMDCTにて観察した我々の報告においても同様に低いCT値と陽性リモデリングを呈しており、不安定プラークの特徴は低CT値、陽性リモデリングであると考えられる。以上から不安定プラークを非侵襲的に評価また、その経過の観察を行うことが可能となっている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、冠動脈疾患を有する患者におい

て、循環血中単球のサブセットと冠動脈プラークの脆弱性の関連性について検討を行った。具体的には、冠動脈CTにより評価された不安定プラークと単球の多様性（炎症性及び非炎症性）との関連の検討、プラークの多発性と単球の多様性（炎症性及び非炎症性）との関連を明らかにすることを目的とした。また急性心筋梗塞患者を中心に、冠動脈不安定病変と関連があると推察されているToll-like receptor 4 (TLR4)と単球サブセットの関連性についての検討も行った。

3. 研究の方法

① 本研究において書面にて同意を得ることができた、冠動脈CTを予定している陳旧性心筋梗塞、狭心症症例を対象とした。末梢血を採取し、直ちにフローサイトメトリー法を施行し、全単球数、単球サブセットを測定した。単球サブセットはCD14抗体、CD16抗体を用いた2重染色より、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陽性CD16陽性単球（炎症性単球）、CD14陽性CD16陰性単球（非炎症性単球）に分類した。冠動脈プラークの評価に関しては、64列MDCTを用いて冠動脈CTの撮影を行い、冠動脈リモデリングは、対照部の平均と病変部の血管径の比をリモデリングインデックス(Remodeling index; RI)とし、CT値は、一断面につきプラーク内を5箇所測定し、少なくとも3断面測定しその平均とする。石灰化の影響を除外するために、石灰化は測定領域から除外した。以上から冠動脈CTにより評価された不安定プラークと単球の多様性（炎症性及び非炎症性）との関連性や、プラークの多発性と単球の多様性（炎症性及び非炎症性）との関連を検討した。

② 後述の通り、上記研究①の結果より、炎症性単球と冠動脈プラークの不安定性との関連が示唆されたため、次に経皮的冠動脈拡張術を予定されている冠動脈疾患を有する患者を対象に、急性期に採血を行い、同様にフローサイトメトリーを行い、単球サブセット、TLR4の発現の有無に関して測定を行った。健常者、安定狭心症、不安定狭心症、急性心筋梗塞を対象とし、急性心筋梗塞患者においては、血栓吸引カテーテルを用いて冠動脈内からもサンプル採取を行い、また慢性期（12日目）においても同様に検査を施行した。以上から、単球サブセットとTLR4の関連性についての検討も行った。

4. 研究成果

① 非炎症性単球である、CD14陽性C

CD16陽性単球の割合が、冠動脈CTにて評価した、冠動脈リモデリングインデックスと相関を示し、また同様に冠動脈プラークの不安定性の指標であるCT値とは逆相関を示した(図1)。それによりCD14陽性CD16陽性単球細胞が冠動脈のプラークの不安定性に関与することが示唆された、またより多くの不安定プラークを有する患者では、より高いCD14陽性CD16陽性単球の割合を示す結果を得た(図2)。現在不安定プラークの指標とされている、CRPやミエロペロキシダーゼに関しては、本研究の対象である安定狭心症患者に関しては、不安定性の指標との関連はえられなかった。本研究の意義は、これまで同定することが困難であった、急性冠症候群に発展しうる、不安定な患者を非侵襲的に検出できる可能性が示唆された。

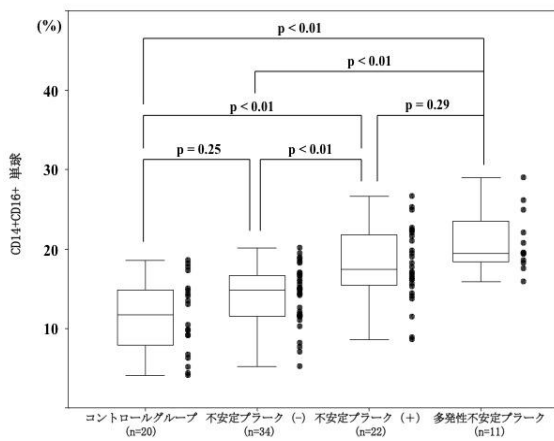


図1 CD14陽性CD16陽性単球と不安定プラークの関連性

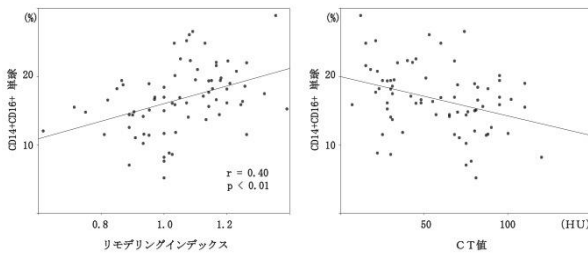


図2. 単球サブセット、リモデリングインデックス、CT値の関連性

② 急性心筋梗塞患者のCD14陽性CD16陽性単球において、高頻度にTLR4陽性を認めた(図3)。またその発現は、冠動脈内からの血液中において、より高い発現を認めた(図4)。慢性期において、TLR4の発現は、正常値付近まで低下していた。急性心筋梗塞患者において、TLR4の発現頻度とTNF-αの血中濃度は正の相関を示した(図5)。以上から、CD14陽性CD16陽性単球が、TLR4を介して急性冠症候群発症への関与が示唆された。将来的には、治療のターゲットとして利用できる可能性を秘めており、今後の循環器領域において重要な役割を担うと考えられる。

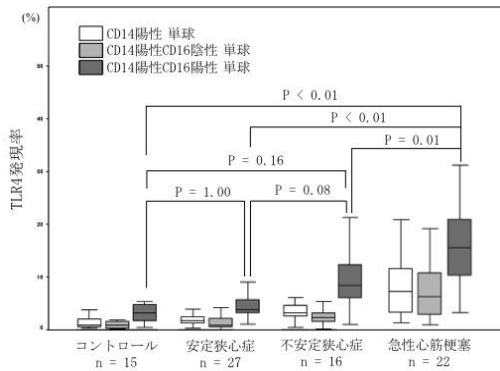


図3 TLR4発現率と単球サブセットの関連性

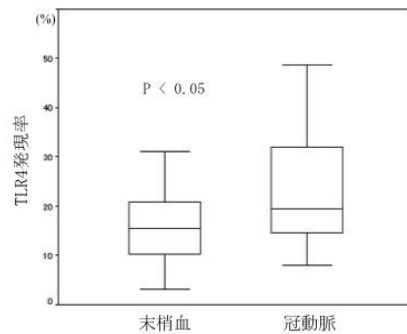


図4 末梢血と冠動脈血におけるTLR4発現率

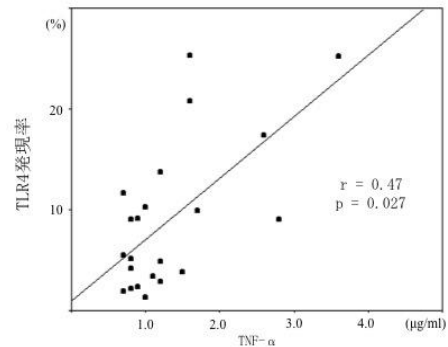


図5 TLR4とTNF-αの関連性

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2件)

- ① Kashiwagi M, Imanishi T, Ozaki Y, Satogami K, Masuno T, Wada T, Nakatani Y, Ishibashi K, Komukai K, Tanimoto T, Ino Y, Kitabata H, Akasaka T. Differential expression of Toll-like receptor 4 and human monocyte subsets in acute myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2012;221:249-53. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.12.030

② Kashiwagi M, Imanishi T, Tsujioka H, Ikejima H, Kuroi A, Ozaki Y, Ishibashi K, Komukai K, Tanimoto T, Ino Y, Kitabata H, Hirata K, Akasaka T. Association of monocyte subsets with vulnerability characteristics of coronary plaques as assessed by 64-slice multidetector computed tomography in patients with stable angina pectoris. *Atherosclerosis*. 2010;212:171-6. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.05.004

[学会発表] (計1件)

① 柏木学 「ヒト末梢血単球と冠動脈CTを用いて評価した冠動脈プラークの不安定性の関連性の検討」 第58回日本心臓病学会学術集会 2010年9月17日 東京

[図書] (計0件)

[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

柏木 学 (KASHIWAGI MANABU)
和歌山県立医科大学・医学部・学内助教
研究者番号：70453181

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：