

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591058

研究課題名(和文)冠動脈プラーク破裂後の血栓形成における単球サブセットの関与と治療法の確立

研究課題名(英文)Pathophysiological effect of circulating monocyte subsets on thrombus formation following by 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：急性冠症候群(acute coronary syndrome:ACS)における末梢血および責任冠動脈血の単球上のP-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)の発現と冠動脈内血栓の関係について血管内光干渉断層法(OCT)を用いて検討した。OCT所見とPSGL-1の発現について検討した結果、ACSでは冠動脈内に血栓およびプラーク破裂を認めた群では認めなかった群と比較してCD14++CD16+単球上のPSGL-1の発現頻度が有意な上昇を認めた。CD14++CD16+単球上のPSGL-1の発現増強がプラーク破裂後の冠動脈内血栓形成に関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Although monocytes appear to be actively involved in the onset of acute coronary syndrome (ACS), they are heterogenous in human peripheral blood. We therefore investigated the relationship between the expression of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) on monocyte subsets and thrombus formation using frequency-domain optical coherence tomography (FD-OCT) in patients with ACS. We enrolled patients with acute myocardial infarction (AMI, n=25), unstable angina pectoris (UAP, n=20), or stable angina pectoris (n=35), and control subjects (n=20). The expression of PSGL-1 on circulating peripheral CD14++CD16+ monocytes was significantly elevated in patients with AMI compared with the other 3 groups. The expression levels of PSGL-1 on CD14++CD16+ monocytes were significantly higher in patients with plaque rupture or intracoronary thrombus assessed by FD-OCT. We concluded that up-regulation of PSGL-1 on CD14++CD16+ monocytes may be a crucial role in plaque rupture and thrombus formation.

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：血栓 単球サブセット 急性冠症候群 冠血管イメージング

### 1. 研究開始当初の背景

急性心筋梗塞(AMI)の発症機序をさらに解明することは、循環器診療の発展のために重要である。AMIの多くは、軽度狭窄(25~50%程度)病変のプラーク破裂に伴う血栓形成により発症するが、一方、破綻したプラークの多くは無症候性に経過する。従って、どのような因子が、プラーク破綻後のAMI発症に関与しているかを解明することは臨床的に重要である。循環血中単球は候補因子の一つである。すなわち、単球は、自然免疫反応の際に中心的な働く Toll 様受容体 Toll-like receptor (TLR)などのパターン認識受容体の細胞表面上の発現を増強することにより、病変局所の炎症および血小板との相互作用(P-selectin とその受容体である P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1))により、血栓形成を促進することが明らかにされている(*Eur Heart J.* 2010;31:1457)。

末梢血単球は単一ではなく、多様性(CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup>および CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>の二つのサブセット)を有することが明らかにされている(*J Clin Invest* 2007;117:195)。我々は、単球の多様性は心筋梗塞後の心筋救済の程度および冠動脈プラークの不安定化と関連することを世界に先んじて明らかにしてきた。すなわち、冠動脈形成術による再灌流に成功したAMI症例において、循環血中CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup>、CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>レベルは各々AMI発症3,5日後にピークとなり、ピークのCD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup>値は心筋救済率(%)と有意に逆相関すること(Tsujioka H, Imanishi T, et al. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54:130-8), CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>単球数の増加は冠動脈不安定プラークの存在(冠動脈 multi-detector computed tomography (MDCT)で評価)に密接に関連すること(Kashiwagi M, Imanishi T, et al. *Atherosclerosis.* 2010;212:171), 線維性被膜厚の変化(%) (optical coherence tomography(OCT)で評価)は CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>単

球数の変化と有意な負の相関を認めること(Imanishi T, et al. *Atherosclerosis.* 2010;212:628))等を報告した。一方、冠動脈プラーク破裂後の血栓形成過程における単球サブセットの病態的意義は不明である。

我々はまた、最近、臨床応用が可能となったモダリティである光干渉断層撮影装置(OCT)は、責任冠血管病変部の形状(冠動脈プラーク破裂、血栓等)を詳細に評価できることを世界に先んじて報告してきた(Kubo T, Imanishi T, et al, *J Am Coll Cardiol.* 2007;50:933-39, Tanaka A, Imanishi T, et al. *Circulation.* 2008;118:2368-73.)。

### 2. 研究の目的

冠動脈プラーク破綻から血栓性閉塞に至る急性冠症候群発症の一連の過程において、循環血中単球の関与が指摘されている。最近の研究により、末梢血単球の不均一性が主とそのエフェクター機能を決定づけるという概念に注目が集まっている(Annu. Rev. Immunol. 2009;29:669)。本研究の目的は、プラーク破裂後の血栓内容物に含まれる末梢血単球サブセットを同定し、その特定単球サブセットの血栓形成における病態的意義を明らかにし、治療法の確立をめざすことである。

### 3. 研究の方法

急性心筋梗塞(非ST上昇型およびST上昇型)患者でPCIの際に冠動脈血栓の採取可能な100名を対象とする。対照(コントロール)は安定狭心症患者50名とする。

#### (1) 冠動脈血栓内の単球サブセットの測定

・冠動脈内血栓の採取: 緊急PCIの際に、血栓吸引デバイス(Thrombuster II)を用いて、冠動脈血栓を採取する。血栓は既報の方法(*Eur Heart J.* 2010;31:1457)に準じて精製する。

・単球サブセットの測定: 単球サブセットは二重染色により、CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup>単球、CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>単球に分類する。測定法は我々の既報の論文(Tsujioka T, Imanishi T, et al. *J*

Am Coll Cardiol. 2009;54:130-8).に準じる。

・ 単球サブセットの Toll 様受容体等の測定 :

二つの異なる単球サブセット上の TLR4 あるいは P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)の発現強度をフローサイトメトリー法により測定する。

・ バイオマーカーの測定 : 責任冠血管病変遠位部および近位部の血液を採取し、各種バイオマーカー ( matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), tissue necrotizing factor- (TNF- ), 可溶性 CD40 リガンド, heart shock protein (HSP)60、高感度 CRP 等 ) を ELISA 法により測定する。

(2) OCT による冠動脈プラーク性状の評価

・ OCT 画像の取得および記録法は、我々の既報論文に準じる (Kubo T, Imanishi T, et al. J Am Coll Cardiol. 2007;50:933; Tanaka A, Imanishi T, et al. Circulation. 2008;118:2368)。

・ 上記 OCT 画像で得られた 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、thin-cap fibroatheroma (線維性被膜径 <65 μm) の有無とする。

4 . 研究成果

循環血中の単球は、自然免疫反応の際に中心的に働く Toll-like receptor (TLR)などのパターン認識受容体の細胞表面上の発現を増強することにより、病変局所の炎症および血小板との相互作用により、血栓形成を促進することが明らかにされている。本研究では冠動脈プラーク破裂後の血栓形成過程における単球サブセットの病態的意義を明らかにすることを目的とする。最初に循環血中および責任冠動脈血栓形成病変部位における単球サブセットと TLR-4 の発現頻度との関連を明らかにする臨床研究を施行した (プロトコール 1 )。次に TLR-4 の発現増強効果におり、病変局所の炎症および血小板との相互作用 ( P-selectin, P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)により、血栓形成を促進するとの作業仮説の下、責任冠動脈血の単球上の PSGL-1

の発現と冠動脈内血栓の関係について検討した (プロトコール 2 )

プロトコール 1 : 研究対象は 65 名の虚血性心疾患患者 (急性心筋梗塞 (22 名) 不安定狭心症 (16 名) 安定狭心症 (27 名)) および 15 名の健常人 (対照群) であった。急性心筋梗塞患者において、CD14+CD16+単球上の TLR-4 の発現は循環血中の CD14+CD16 単球に比し、有意に大であった。CD14+CD16+単球上の TLR-4 の発現は、急性心筋梗塞患者において他の 3 群に比し有意に大であった。急性心筋梗塞患者群においては、血栓吸引術により冠動脈血栓を検体として用いた。その結果、CD14+CD16+単球上の TLR-4 の発現は循環血中に比し、責任冠動脈病変部において有意に上昇していた。また急性心筋梗塞患者の入院時における CD14+CD16+単球上の TLR-4 の発現増強効果は心筋梗塞発症 12 日後の著明に低下していた。更に、急性心筋梗塞患者において、血中の tumor necrosis factor- は循環血中単球の TLR-4 の発現レベルと有意な正の相関関係を認めた。

以上より、急性心筋梗塞患者における CD14+CD16+単球上の TLR-4 の発現増強効果は、循環血中および冠動脈血栓形成病変部位の両者でみられることを明らかにした。従って、特定の単球サブセット上の自然免疫反応の増強効果は急性心筋梗塞の発症機転に関与する可能性が推察され、我々の作業仮説を支持した。

プロトコール 2 : 急性冠症候群における末梢血および責任冠動脈血の単球上の PSGL-1 の発現と冠動脈内血栓の関係について optical coherence tomography (OCT)を用いて検討した。急性心筋梗塞 25 症例、不安定狭心症 20 症例、安定狭心症 35 症例、コントロール 20 症例の計 100 症例を対象とした。入院時に末梢血を採取し、急性心筋梗塞症例ではカテーテルインターベンション施行時

に血栓吸引カテーテルを用いて責任冠動脈血を採取し、単球上のPSGL-1の発現を測定した。カテーテルインターベンション治療の施行前にOCTイメージングを施行し、責任病変のプラーク破裂、冠動脈内血栓の有無を評価した。結果を示す。CD14+CD16+単球上のPSGL-1の発現頻度は急性心筋梗塞群において不安定狭心症群、安定狭心症群、コントロール群と比較して有意に上昇していた。さらに急性心筋梗塞群においてCD14+CD16+単球上のPSGL-1の発現は責任冠動脈内血で末梢血と比較して有意な上昇がみられた。

以上より単球上のPSGL-1のup-regulationがプラーク破裂後の冠動脈内血栓形成に重要な役割を担っていることが示唆された。

#### 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12件)

1. Teraguchi I, Imanishi T, Ozaki Y, Tanimoto T, Ueyama M, Orii M, Shiono Y, Shimamura K, Yamano T, Ino Y, Yamaguchi T, Hirata K, Kubo T, Sanke T, Akasaka T. Impact of Glucose Fluctuation and Monocyte Subsets on Coronary Plaque Rupture" has been accepted for publication in Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases 2014;24(3):309-314. (査読有)
2. Ozaki Y, Imanishi T, Teraguchi I, Nishiguchi T, Orii M, Shiono Y, Shimamura K, Ishibashi K, Tanimoto T, Yamano T, Ino Y, Yamaguchi T, Kubo T, Akasaka T. Association between P-selectin Glycoprotein and Pathogenesis in Acute Coronary Syndrome Assessed by Optical Coherence Tomography. Atherosclerosis. 2014;233(2):697-703.
3. Ozaki Y, Imanishi T, Tanimoto T, Teraguchi I, Nishiguchi T, Orii M, Shiono Y, Shimamura K, Yamano T, Ino Y, Yamaguchi T, Kubo T, Akasaka T. Effect of Direct Renin Inhibitor on Left Ventricular Remodeling in Patients With Primary Acute Myocardial Infarction. Int Heart J. 2014;55(1):17-21.
4. Teraguchi I, Imanishi T, Ozaki Y, et al. Acute phase glucose fluctuation was negatively correlated with myocardial salvage after acute myocardial infarction -Involvement of monocyte subsets-. Circ J 2013;78(1):170-179. (査読有)
5. Imanishi T and Akasaka T. Novel strategies targeting inflammatory process in atherosclerosis. Current Pharmacological Design 2013;19:1616-1625. (査読有)
6. Imanishi T and Akasaka T. microRNAs in peripheral artery disease. Curr Top Med Chem. 2013;13:1589-1595. (査読有)
7. 今西敏雄 特集「循環器病のバイオマーカー」: モノサイトサブセット. Heart View 16:196-200, 2012
8. Teraguchi I, Imanishi T, Ozaki Y, Tanimoto T, Kitabata H, Ino Y, Ishibashi K, Komukai K, Hirata K, Akasaka T. Impact of stress hyperglycemia on myocardial salvage following successfully recanalized primary acute myocardial infarction. Circ J 2012;76(11):2690-2696. (査読有)
9. Ozaki Y, Imanishi T, Kashiwagi M, Masuno T, Shiono Y, Komukai K, Tanimoto T, Kitabata H, Akasaka T. Circulating CD14+CD16+ monocyte subsets as biomarkers for severity of coronary artery disease in patients with stable angina pectoris. Circ J 2012;76(10):2412-2418. (査読有)
10. Ozaki Y, Imanishi T, Kashiwagi M, Tsuboi H, Sougawa H, Orii M, Shiono Y, Shimamura K, Ishibashi K, Komukai K, Ino T, Kitabata H and Akasaka T. Effect of the direct renin inhibitor aliskiren on

peripheral blood monocyte subsets and myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. Circ J 2012;76(6):1461-1468. (査読有)

11. Kashiwagi M, Imanishi T, Ozaki Y, Satogami K, Masuno T, Wada T, Nakatani Y, Ishibashi K, Komukai K, Tanimoto T, Ino Y, Kitabata H and Akasaka T. Differential expression of Toll-like receptor 4 and human monocyte subsets in acute myocardial infarction. Atherosclerosis 2012;221(1):249-253. (査読有)
12. Imanishi T and Akasaka T. Biomarkers associated with vulnerable atheromatous plaque. Current Medicinal Chemistry 2012;19:2588-2596. (査読有)

[学会発表](計6件)

1. 寺口郁子, 今西敏雄, 尾崎雄一, 折居 誠, 塩野泰紹, 谷本貴志, 山野貴司, 山口智由, 平田久美子, 久保隆史, 今西敏雄, 久保隆史, 赤阪隆史 : 急性期の平均血糖変動幅(MAGE)は急性心筋梗塞(AMI)患者における心筋救済の因子である. 第61回日本心臓病学会学術集会, 2013.9, 熊本県熊本市
2. 寺口郁子, 今西敏雄, 尾崎雄一, 折居 誠, 塩野泰紹, 谷本貴志, 山野貴司, 山口智由, 平田久美子, 久保隆史, 赤阪隆史 : 平均血糖変動幅(MAGE)は冠動脈プラーク破裂に影響を与える. 第61回日本心臓病学会学術集会, 2013.9, 熊本県熊本市
3. Teraguchi I, Imanishi T, Ozaki Y, Tanimoto T, Yamano T, Ino Y, Yamaguchi T, Hirata K, Kubo T, Akasaka T: Impact of glucose fluctuation and monocyte subsets on coronary plaque rupture. European Society Cardiology Congress 2013,

2013.8, Amsterdam, Netherlands

4. Ozaki Y, Imanishi T, Teraguchi I, Tanimoto T, Yamano T, Ino Y, Yamaguchi T, Hirata K, Kubo T, Akasaka T : Association of P-selectin glycoprotein ligand-1 and pathogenesis of acute coronary syndrome assessed by optical coherence tomography. European Society Cardiology Congress 2013, 2013.8, Amsterdam, Netherlands
5. Ozaki Y, Imanishi T, Aoki H, Orii M, Shiono Y, Shimamura K, Ishibashi K, Tanimoto T, Yamano T, Ino Y, Yamaguchi T, Kubo T and Akasaka T: Circulating CD14+CD16+ Monocyte Subsets as Biomarkers for Severity of Coronary Artery Disease in Patients With Stable Angina Pectoris. American Heart Association Scientific Sessions 2012, 2012.11, Los Angeles, USA]
6. 今西敏雄, 赤阪隆史 : 冠動脈イベント予測における冠血管イメージングとバイオマーカーの可能性. 第26回日本冠疾患学術集会. 内科パネルディスカッション「冠動脈イベントを予測できるか?」, 東京, 2012

[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

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

尾崎 雄一 (Ozaki Yuichi)  
和歌山県立医科大学・医学部・学内助教  
研究者番号：00507999

(3)連携研究者

( )

研究者番号：