

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461038

研究課題名(和文)冠攣縮の日内変動におけるRhoキナーゼ活性の関与

研究課題名(英文) Circadian variation of Rho-kinase activity in circulating leukocytes of patients with vasospastic angina.

研究代表者

高橋 潤 (Takahashi, Jun)

東北大学・大学院・講師

研究者番号：00375081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は冠攣縮性狭心症(VSA)患者における日内変動のメカニズムを明らかにすることである。冠攣縮誘発試験を施行した連続49例において白血球Rho-kinase活性を1日3回(12時、21時、6時)測定した。VSA群のRho-kinase活性は6時に最高値を示し、対照群より有意に高値であり、両群間のRho-kinase活性変動パターンは異なっていた。さらにVSA群の白血球Rho-kinase活性は冠動脈basal tone、収縮反応と正相関し、交感神経活性とは負の相関を認めた。以上から、Rho-kinase活性はVSA発作の日内変動を生み出す機序に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In consecutive 31 VSA patients and 18 non-VSA patients, we measured Rho-kinase activity in circulating leukocytes at 6:00, 12:00 and 21:00. We also examined the relationship between the Rho-kinase activity and coronary vasomotor responses. Rho-kinase activity showed a significant circadian variation with a peak at 6:00 in VSA patients, whereas no such variation was noted in non-VSA patients. Importantly, Rho-kinase activity at spasm provocation test was significantly correlated with basal coronary tone defined by vasodilating responses to intracoronary nitrate and coronary vasoconstricting responses to acetylcholine in VSA patients. Furthermore, their Rho-kinase activity at 6:00 was positively correlated with nocturnal parasympathetic activity as evaluated by heart rate variability in Holter monitoring. These data suggest that Rho-kinase activity exhibits distinct circadian variation associated with alterations in coronary vasomotor responses and autonomic activity in VSA patients

研究分野：循環器内科

キーワード：冠攣縮性狭心症 日内変動 Rho-kinase活性

1. 研究開始当初の背景

(1) 冠攣縮と日内変動

冠攣縮とは心臓の表面を走行する比較的大い冠動脈が異常に収縮して心筋の虚血を来した場合 (supply ischemia/primary ischemia) と定義される病態で、我々アジア人に多いと言われており、異型狭心症のみならず急性心筋梗塞、心臓突然死など、虚血性心疾患全般の発症に深く関与している。冠攣縮性狭心症の特徴として、発作の出現時間に夜間から早朝にかけてピークを有する明らかな日内変動が認められることが挙げられる。さらに、その発作の約 7 割は自覚症状のない、いわゆる無症候性の心筋虚血発作であることが、ホルター心電図で異型狭心症における心筋虚血発作頻度を解析した報告において示されている。冠攣縮性狭心症患者では普段から冠動脈トーンが亢進しているが、夜間から早朝にかけての安静時にさらに冠動脈トーンが亢進するため冠攣縮が起こりやすくなり、一方で日中は冠動脈トーンが朝よりも低下するため冠攣縮が起こりにくくなると考えられる。この冠動脈のトーン日内変動は自律神経の活動や心筋代謝、その他の様々な体液性因子の日内変動と密接な関係を有することがこれまでの様々な検討で示されてきたが、分子機序のレベルで冠攣縮の日内変動が生み出されるかについてはいまだ十分に解明されていない。

(2) 冠攣縮における Rho キナーゼ経路の重要性

冠攣縮は冠動脈局所の収縮能亢進が原因であり、これには血管内皮機能不全と、血管平滑筋の過収縮の両方が関与していると考えられている。我々は細胞内 Ca^{2+} 濃度非依存的に血管平滑筋の収縮弛緩を制御する重要な分子スイッチである Rho-Rho キナーゼ経路に着目しこれまで研究を進めてきた。平滑筋細胞にアンジオテンシン やセロトニン、エンドセリンなどの収縮性血管作動物質のシグナルが入ると、低分子量 G 蛋白質である Rho が活性化され、その標的蛋白である Rho キナーゼが活性化される。我々は動物実験や臨床研究において、Rho キナーゼ阻害薬を冠動脈に投与の攣縮が抑制されることを確認し、さらに Rho キナーゼは、我々のこれまでの検討により、血管平滑筋の収縮に重要な役割を果たすだけでなく、炎症性細胞の浸潤・接着、血栓形成など心血管病進展に広く関与していることが明らかにした (Shimokawa et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1767-75)。

(3) 末梢血好中球 Rho キナーゼ活性と冠攣縮性狭心症の疾患活動度

我々は、最近、末梢血好中球の Rho キナーゼ活性が冠攣縮性狭心症 (VSA) の疾患活動性を反映することを報告した。すなわち、VSA

症例の末梢血好中球 Rho キナーゼ活性は胸痛症候群症例と比較し有意に活性が亢進しており、さらに 3 ヶ月間のカルシウム拮抗薬内服によりその活性は有意に抑制された (*J Am Coll Cardiol.* 2011;58:1231-7)。さらに東日本大震災を経験した症例の疾患活動度がどのように変化したかを同様に評価したところ、VSA 患者の Rho キナーゼ活性は震災 6 ヶ月後に一過性に有意に上昇し、12 ヶ月後に震災前と同程度まで戻っていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、冠攣縮性狭心症患者における狭心症発作の好発時間の変化と同様に、白血球 Rho キナーゼ活性が日内変動を示すか否かを明らかにし、さらに Rho キナーゼ活性日内変動を生み出す機序について、特に自律神経機能に着目して検討することである。

3. 研究の方法

(1) 対象患者と冠攣縮誘発試験

2011 年 12 月から 2013 年 6 月にかけて、東北大学病院循環器内科で胸痛または心電図異常の精査目的で心臓カテーテル検査を受けた 506 症例中、153 症例において冠動脈造影で 75%以上の器質的有意狭窄病変を認めず、アセチルコリンを用いた冠攣縮誘発試験を行った。このうち、原疾患が白血球 Rho キナーゼ活性に影響する可能性があると考えられる急性冠症候群、急性/慢性心不全、心筋症、心筋炎、慢性腎不全、膠原病、冠動脈ステント留置後の症例は除外し、さらに疾患活動性が高く、心臓カテーテル検査前にカルシウム拮抗薬や亜硝酸薬の投与を中断できなかった症例を除外し、かつ Rho キナーゼ活性を 6 時、12 時、21 時の連続 3 時点で測定し得た合計 54 症例を本研究の対象とした。アセチルコリンによる冠攣縮誘発試験が陽性だった症例を冠攣縮性狭心症群 (n=31)、陰性だった症例を対照群 (n=18) の 2 群に分類した。

冠攣縮誘発試験は全症例で 9 時から 12 時までの午前中に施行し、長時間作用型の硝酸薬、カルシウム拮抗薬などの冠拡張薬は心臓カテーテル検査前に最低 24 時間以上休薬した。誘発試験の陽性所見は 2008 年版日本循環器学会「冠攣縮性狭心症の診断と治療に関するガイドライン」に基づき、「狭心痛及び虚血性心電図変化の心筋虚血の徴候を伴う冠動脈の一過性の完全または亜完全閉塞 (>90%狭窄)」と定義した。アセチルコリン負荷試験はガイドラインの標準的負荷試験法に則り、1. 右室への一時的ペーシング電極の挿入、2. 左右の冠動脈のコントロール造影、3. 左冠動脈内アセチルコリン注入 (20、50、100 μ g)、4. 左冠動脈で有意な冠攣縮が誘発されない場合、もしくは誘発された冠攣縮が自然に寛解した場合に、右冠動脈内アセチルコリン注入 (20、50 μ g)、5. 冠攣縮が誘発された場合は二硝酸イソソルビド 2mg を冠動脈

内に注入し冠攣縮を解除、というプロトコルで行った。冠攣縮性狭心症の診断のために本研究で行った、心臓カテーテル検査時のアセチルコリン負荷試験の診断感度は90%、特異度は99%と報告されている。

(2)末梢血好中球 Rho キナーゼ活性の測定
被験者を30分以上症状安静を保たせ、早朝(6時-7時)、日中(11-12時)、夜間(20-21時)の3点で末梢静脈より採血(10ml)した。採決後、直ちに好中球単離処理を行い、好中球中の蛋白質を抽出した後、-80℃で凍結保存する。Rho キナーゼの基質であるミオシン脱リン酸化酵素のミオシン結合サブユニット(MBS)を Western blot 法で定量化し、MBSの総量に対するリン酸化MBS比を Rho キナーゼ活性と定義した。なお、Rho キナーゼ活性に影響する可能性のあるCa拮抗薬、硝酸薬は採血前24時間以上休薬した。また、好中球単離処理時に得られた血漿は凍結保存し、既に冠攣縮性狭心症との関連が指摘されているバイオマーカーを併せて解析した。

(3)冠動脈機能評価

被験者の冠血管機能は、冠攣縮誘発試験時の冠動脈トーンス、及びアセチルコリンに対する収縮反応性で評価した。冠動脈トーンスは薬剤投与前の血管径を基準として、二硝酸イソソルビド2mg冠注後の血管径拡大率にて算定し、アセチルコリンに対する収縮反応性は二硝酸イソソルビド2mg冠注後の血管径を基準として、アセチルコリン20μg冠注後の血管縮小率にて算定した。なお、冠血管径の測定は左冠動脈前下行枝の中間部(アメリカ心臓協会による冠動脈分類におけるSegment #7)で行い、血管径測定のための定量的冠動脈造影法(Quantitative coronary angiography, QCA)は、別途2名の測定者を設置し、盲検化して行った。

(4)心拍変動解析

被験者の自律神経機能は、当院入院中の24時間ホルタ心電図記録を用いて心拍変動解析を行い評価した。被験者49症例中、37症例においてホルタ心電図を施行し、そのうち心房細動症例や期外収縮が1日あたり1000回以上の症例を除外し、全31症例(冠攣縮性狭心症群19例、対照群12例)で解析を行った。解析はMemCalc system(MemCalc/Chiram3, Suwa Trust, Tokyo, Japan)を用いて行い、時間領域並びに周波数領域の分析をそれぞれ行った。時間領域分析から24時間RR間隔平均値(mean normal to normal interval; mean NN)、及び24時間RR間隔標準偏差(standard deviation of all normal to normal intervals; SDNN)を算出し、周波数領域分析から低周波数(0.04-0.15 Hz, Low frequency; LF)領域のパワー、高周波数(0.15-0.40 Hz, High frequency; HF)領域のパワーをそれぞれ算出した。HF成分

を心臓副交感神経活動の指標とし、LF成分とHF成分のパワーの比(LF/HF)を交感神経活動の指標として評価した。

(5)統計解析

全ての連続データは平均±標準偏差(mean ± standard deviation [SD])で表記した。患者背景やQCAにおける冠攣縮性狭心症群と対照群の比較に関しては、正規性に依りてunpaired student t test、又はMann-Whitney U testを用いた。カテゴリーデータにおける割合は、カイ2乗検定、又はFisher's exact testにより比較した。同一症例における3時点の計測項目を比較する際には反復測定一元配置分散分析法(Repeated one-way analysis of variance; Repeated one-way ANOVA)を用い、有意差を認める場合、各群間の相互関係をTukey's Honestly Significant Difference [HSD] testで評価した。Rho キナーゼ活性日内変動の冠攣縮性狭心症群と対照群との変動形態の比較に関しては反復測定二元配置分散分析法(Repeated two-way ANOVA)を用いた。2変量間の相関は変量の正規性に依りてPearson、又はSpearmanの相関係数を用いて評価した。P値0.05未満の場合に、統計学的有意差があると判断した。

4. 研究成果

(1)患者背景

冠攣縮性狭心症群では対照群と比較して男性の割合が有意に高く、脂質異常症を有し、スタチン(HMG-CoA還元酵素阻害薬)を内服中の症例が多い傾向であった。平均冠危険因子数は両群間で有意差を認めなかった(対照群 1.4 ± 1.0 vs. 冠攣縮性狭心症群 1.7 ± 1.2 , $P=0.49$)。平均左室駆出率は両群ともに良好に保たれており、有意差は認めなかった(対照群 $71.5 \pm 4.4\%$ vs. 冠攣縮性狭心症群 $70.7 \pm 6.8\%$, $P=0.64$)。

(2)白血球 Rho キナーゼ活性の日内変動

冠攣縮性狭心症群においては深夜から早朝にかけて胸痛を自覚する症例が多く、一方、対照群では日中に胸痛を自覚する症例が多かった。白血球 Rho キナーゼ活性は冠攣縮性狭心症群において対照群と比較し、早朝6時の時点で有意に高かった(対照群 0.92 ± 0.22 vs. 冠攣縮性狭心症群 1.17 ± 0.17 , $P<0.001$)。さらに、冠攣縮性狭心症群では Rho キナーゼ活性値は早朝6時をピークとする有意な日内変動がみられたが(21時 1.00 ± 0.15 , 6時 1.17 ± 0.17 , 12時 1.12 ± 0.22 , One-way ANOVA $P<0.001$)、対照群では有意な日内変動は認めず(21時 0.96 ± 0.20 , 6時 0.92 ± 0.22 , 12時 1.03 ± 0.26 , One-way ANOVA $P=0.07$)、両群間の Rho キナーゼ活性の変動パターンは有意に異なっていた(Two-way ANOVA, $P<0.01$)。また、高感度CRP、血漿ノルアドレナリン値には有意な日内変

動を認めなかった。さらに冠攣縮性狭心症患者では3時点における白血球 Rho キナーゼ活性と高感度 CRP、及び血漿ノルアドレナリン値との間に有意な相関関係は認めなかった。

(3) 白血球 Rho キナーゼ活性と冠動脈トーンス及び冠動脈収縮反応

左冠動脈前下行枝中間部において、QCA により評価した血管径と冠動脈トーンス、及びアセチルコリンに対する収縮反応性を評価したが、薬剤投与前と二硝酸イソソルピド 2 mg 冠注後の血管径は両群間で有意差を認めなかった。冠動脈トーンスは冠攣縮性狭心症群で高い傾向にあり、アセチルコリン 20 µg に対する収縮反応性は冠攣縮性狭心症群で有意に高かった。冠攣縮誘発試験直前の白血球 Rho キナーゼ活性は冠攣縮性狭心症群で有意に高かった (対照群 0.98 ± 0.24 vs. 冠攣縮性狭心症群 1.19 ± 0.13 , $P < 0.001$)。冠動脈の攣縮形態や攣縮枝数別に白血球 Rho キナーゼ活性を比較すると、攣縮形態間での有意差は認めなかった (びまん性冠攣縮群 1.16 ± 0.14 vs. 局所的冠攣縮群 1.22 ± 0.14 vs. 複合型冠攣縮群 1.23 ± 0.15 , $P = 0.52$) が、多枝攣縮症例では Rho キナーゼ活性が高い傾向がみられた (1 枝攣縮群 1.15 ± 0.13 vs. 多枝攣縮群 1.22 ± 0.14 , $P = 0.13$)。冠攣縮性狭心症群では白血球 Rho キナーゼ活性は冠動脈トーンス、アセチルコリン 20 µg に対する収縮反応性と有意な正の相関を認めた。一方、対照群では Rho キナーゼ活性と冠動脈トーンス、収縮反応性との間に有意な相関は認めなかった。また、高感度 CRP に対しても同様に冠動脈トーンスと収縮反応性との相関を検討したが、いずれも有意な相関は認めなかった。

(4) 白血球 Rho キナーゼ活性日内変動と自律神経活性

両群間で心拍変動の指標には有意差を認めなかった。また、副交感神経活性の指標として用いた HF、及び交感神経活性指標の指標として用いた LF/HF 比はいずれも1日を通して両群間で有意差は認めなかった。1日を8時間毎に3分割し、それぞれの時間帯における自律神経活性指標の平均値と、その時間帯内で測定された Rho キナーゼ活性との相関を検討したところ、冠攣縮性狭心症群では深夜から早朝にかけての副交感神経活性指標と、早朝6時に測定した白血球 Rho キナーゼ活性が正の相関を認め、同時時間帯で交感神経活性指標と Rho キナーゼ活性との間には負の相関を認めた。対照群ではいずれの時間帯においても Rho キナーゼ活性と副交感活性指標、交感活性指標との相関は認めなかった

(5) 本研究で得られた知見

本研究における結果から初めて得られた知見は、以下の3点である。

(1) 冠攣縮性狭心症患者における、白血球

Rho キナーゼ活性には狭心症症状の好発時間と一致して早朝6時をピークとする有意な日内変動が存在する。

(2) 冠攣縮性狭心症患者における白血球 Rho キナーゼ活性は、冠動脈トーンスや冠動脈収縮刺激に対する収縮反応性と関連する。

(3) 冠攣縮性狭心症患者における早朝の白血球 Rho キナーゼ活性は、深夜から早朝にかけての副交感神経活性と関連する。

以上より、冠攣縮性狭心症患者における Rho キナーゼ活性の日内変動は、血管作動因子に対する冠動脈の反応性や、自律神経活性と関連し、狭心症発作の日内変動に關与すると考えられた。

(6) 結論

冠攣縮性狭心症患者において、白血球 Rho キナーゼ活性に日内変動が存在し、Rho キナーゼ活性は冠動脈の収縮反応性を反映するとともに、深夜から早朝にかけての副交感神経活性と関連する。本研究は、Rho キナーゼ活性化が冠攣縮性狭心症患者の狭心症発作の日内変動に關与する可能性を示した。

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1件)

1. Nihei T, Takahashi J, Tsuburaya R, Ito Y, Shioto T, Hao K, Takagi Y, Matsumoto Y, Nakayama M, Miyata S, Sakata Y, Ito K, Shimokawa H. Circadian variation of Rho-kinase activity in circulating leukocytes of patients with vasospastic angina. *Circ J*. 2014;78(5):1183-90. <http://doi.org/10.1253/circj.CJ-13-1458> 査読あり。

[学会発表](計2件)

1. Nihei T, Takahashi J, Tsuburaya R, Ito Y, Shioto T, Hao K, Takagi Y, Matsumoto Y, Nakayama M, Miyata S, Sakata Y, Ito K, Shimokawa H. Circadian variation of Rho-kinase activity Associated with Enhanced Coronary Reactivity in patients with vasospastic angina. 第78回日本循環器学会学術集会 2014年3月21日~3月23日 東京国際フォーラム(東京)

2. Nihei T, Takahashi J, Tsuburaya R, Ito Y, Shioto T, Hao K, Takagi Y, Matsumoto Y, Nakayama M, Miyata S, Sakata Y, Ito K, Shimokawa H. Circadian variation of Rho-kinase activity Associated with Enhanced Coronary Reactivity in patients with vasospastic angina. ESC2013 2013年8月31日~9月4日 Amsterdam-Netherlands

〔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
なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 潤 (TAKAHASHI, JUN)
東北大学・大学病院・講師
研究者番号：00375081

(2) 研究分担者

下川 宏明 (SHIMOKAWA, HIROAKI)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号：00235681