

平成 30 年 10 月 22 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461114

研究課題名(和文) 心筋梗塞後の冠血管プラークの不安定化の機序とその治療法

研究課題名(英文) Vulnerability Characteristics of Coronary Plaque

研究代表者

今西 敏雄(Toshio, Imanishi)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：00285389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は安定狭心症患者を対象に冠動脈CT(64-slice multidetector computed tomography (MDCT))を用いて両者の関連を検討した。65症例の安定狭心症患者を対象とした。CD14++CD16+単球は他の2つの単球サブセットに比し、有意にTLR-4の発現率が高値であった。不安定プラークを有する患者では、コントロールに比しCD14++CD16+単球上のTLR-4の発現は有意に高値であった。またCD14++CD16+上のTLR-4の発現率はremodeling indexと逆相関、CT attenuation valueと逆相関を示した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the relationship using 64-slice multidetector computed tomography (MDCT) in patients with stable angina pectoris (SAP). We enrolled 65 patients with SAP who underwent MDCT. Three monocyte subsets (CD14++CD16-, CD14++CD16+, and CD14+CD16+) and expression of TLR-4 were measured by flow cytometry. Intracoronary plaques were assessed by 64-slice MDCT. The circulating CD14++CD16+ monocytes more frequently expressed TLR-4 than CD14++CD16- and CD14+CD16+ monocytes ($P<0.001$). The relative proportion of the expression of TLR-4 on CD14++CD16+ monocytes was significantly greater in patients with vulnerable plaque compared with those without. In addition, the relative proportion of TLR-4 expression on CD14++CD16+ monocytes positively correlated with the remodeling index and negatively correlated with CT attenuation value. In conclusion, upregulation of TLR-4 on CD14++CD16+ monocytes might be associated with coronary plaque vulnerability in patients with SAP.

研究分野：循環器病学

キーワード：不安定プラーク

1. 研究開始当初の背景

末梢血単球は単一ではなく、多様性 (CD14^{high}CD16⁻および CD14^{low}CD16⁺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^{high}CD16⁻、CD14^{low}CD16⁺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^{high}CD16⁻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^{low}CD16⁺単球上の Toll-like receptor 4 (TLR-4) および P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) の増加は冠動脈不安定プラークの存在やプラーク破綻、血栓形成に密接に関連すること (Kashiwagi M, Imanishi T, et al. *Atherosclerosis*. 2010;212:171, Imanishi T, et al. *Atherosclerosis*. 2010;212:628) 等を報告した。これらの一連の研究を通して、急性心筋梗塞等の急性炎症と動脈硬化等の慢性炎症では病変の進展に関与する単球サブセットが異なることを明らかにしてきた。一方、我々は新規の冠血管イメージング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性状 (冠動脈プラーク破裂等) 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, Tanaka A, Imanishi T, et al. *Circulation*. 2008;118:2368.)。急性心筋梗塞の生存例は発症数週間から数ヵ月後に高率に心血管イベントを発症することが、大規模臨床研究で明らかにされている。マウス心筋梗塞モデルを用いた基礎研究により、冠動脈プラークの不安定化が心筋梗塞後に

加速度的に促進すると報告された (Odegaard JI et al. *Science*. 2013;339:172)。この機序として心筋梗塞に伴うストレス刺激を介する交感神経系の活性化が骨髄での炎症性単球の産生を促進し、冠動脈プラークの不安定化～破裂に至るという仮説が提唱された。しかしながら、この一連の過程において、単球の多様性が時間的・空間的にどのように関与するかについては不明である。

当初、急性心筋梗塞後の非冠血管病変部のプラーク量および病変形態 (thin-cap fibroatheroma (TCFA) 等) を冠血管イメージング (OCT) で評価 (急性期、6ヵ月後) し、他の虚血性心疾患 (不安定狭心症や安定狭心症) と比較し冠動脈プラーク病変の不安定化の程度と比較検討を予定していたが、適当な症例が少ないため当初の研究目的を変更した。

我々は以前の研究により CD14^{low}CD16⁺単球上の Toll-like receptor 4 (TLR-4) および P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) の増加は冠動脈不安定プラークの存在やプラークに関与していること (Kashiwagi M, Imanishi T, et al. *Atherosclerosis*. 2010;212:171, Imanishi T, et al. *Atherosclerosis*. 2010;212:628) を明らかにしている。Toll 様受容体 Toll-like receptor (TLR) などの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 P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) により血栓形成を促進することにより冠動脈プラークの不安定化に関与すると推察される。

これらの知見を踏まえて、今回の研究では安定狭心症患者を対象に、特定の単球サブセットは、持続的かつ過剰に循環血中に動員され、冠動脈プラーク病変の不安定化を促進するとの作業仮説を下に施行

した。

2. 研究の目的

当初、急性心筋梗塞後の非冠血管病変部のプラーク量および病変形態 (thin-cap fibroatheroma (TCFA)等)を冠血管イメージング (OCT) で評価 (急性期、6ヵ月後) し、他の虚血性心疾患 (不安定狭心症や安定狭心症) と比較し冠動脈プラーク病変の不安定化の程度と比較検討を予定していたが、適当な症例が少ないため当初の研究目的を変更した。

我々は以前の研究により CD14^{low}CD16⁺単球上の Toll-like receptor 4 (TLR-4) および P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) の増加は冠動脈不安定プラークの存在やプラークに関与していること (Kashiwagi M, Imanishi T, et al. *Atherosclerosis*. 2010;212:171, Imanishi T, et al. *Atherosclerosis*. 2010;212:628) を明らかにしている。Toll 様受容体 Toll-like receptor (TLR) などの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 P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) により血栓形成を促進することにより冠動脈プラークの不安定化に関与すると推察される。これらの知見を踏まえて、今回の研究では安定狭心症患者を対象に、特定の単球サブセットは、持続的かつ過剰に循環血中に動員され、冠動脈プラーク病変の不安定化を促進するとの作業仮説を下に施行した。

本研究の目的は安定狭心症患者において、循環血中の特異な単球サブセット上の TLR-4 の発現の増強は冠動脈プラークの不安定化に関連するかを検討することである。

3. 研究の方法

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を予定している安定狭心症65症例を対象とした。腎機能障害、高度石灰化、患者本人の息止め不良等、MDCT施行が困難であると予測される症例は除外する。また単球のサブセットに影響を及ぼす膠原病疾患、感染症、悪性腫瘍を有する症例も除外する。MDCTにより不安定プラークの有無、分布と、ヒト末梢血単球サブセット上のTLR-4の発現の関連を検討した。

単球サブセットの測定

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する。

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3つのサブセット (CD14⁺⁺CD16⁻, CD14⁺⁺CD16⁺およびCD14⁺CD16⁺単球) に分類し、同時にTLR-4の発現をフローサイトメトリー法で測定した。測定法は既報論文 (J Clin Invest 2007;117:195) に準じて行う。

冠動脈プラークの評価

- 64列MDCTを用いて冠動脈CTの撮影を行う。
- 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、RIが1.05以上を陽性リモデリングとする。
- 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した。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。
- 冠動脈リモデリング、CT値の測定は以前に報告した方法に準じて行う (JACC Cardiovasc Imaging 2009;2:1412)。

MDCTによる不安定プラークの同定、末梢

血単球サブセットおよびTLR-4の発現を測定しどのような関連を認めるかを検討した。

入院時に血液を採取し、冠動脈プラークに不安定化に關与しているmatrix metal proteinase 9 (MMP-9)およびhigh-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP)をELISA法を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) CD14⁺⁺CD16⁺単球は CD14⁺CD16⁺ および CD16⁺⁺CD16⁻単球より高頻度に TLR-4 の発現を認めた。不安定プラークと TLR-4 の発現との関連を検討したところ、CD14⁺⁺CD16⁺単球上の TLR-4 の発現は不安定プラークを有する患者で高頻度に発現していた。

(2) 安定狭心症患者における不安定プラークに關与する因子を多変量解析で検討したところ、CD14⁺⁺CD16⁺単球上の TLR-4 の発現が独立した因子であった (P=0.023, odds ratio: 1.123, 95% confidence interval: 1.016-1.241)。

(3) CD14⁺⁺CD16⁺単球上の TLR-4 の発現は RI と正の相関、CT attenuation と負の相関を示した。一方、RI および CT attenuation は共に高感度 CRP 値と関連を認めなかった。

(4) 血漿 MMP-9 値は不安定プラークを有する患者で有意に高値であった。また血漿 MMP-9 値は CD14⁺⁺CD16⁺ 単球上の TLR-4 の発現と正相関していた。

(5) CD14⁺⁺CD16⁺単球上の TLR-4 の発現は冠動脈の不安定プラークを有する患者で増強していた。また CD14⁺⁺CD16⁺単球上の TLR-4 の発現レベルは冠動脈プラークの不安定化の指標と有意に関連していた。

(6) 以上より、CD14⁺⁺CD16⁺単球上の TLR-4 の発現レベルの増強は安定狭心症患者のプラークの不安定化に密接に關与している可能性が示唆された。

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)

1. Ozaki Y, Imanishi T, Hosokawa S, Nishiguchi T, Taruya A, Tanimoto T, Kuroi A, Yamano T, Matsuo Y, Ino Y, Kitabata H, Kubo T, Tanaka A, Akasaka T. Association of Toll-Like Receptor 4 on Human Monocyte Subsets and Vulnerability Characteristics of Coronary Plaque as Assessed by 64-Slice Multidetector Computed Tomography. *Circ J.* 2017;81(6):837-845.
2. Ozaki Y, Imanishi T, Akasaka T. Inflammatory Biomarkers in Peripheral Artery Disease: Diagnosis, Prognosis, and Therapeutic Challenges. *Curr Med Chem.* 2015;22(23):2744-2753.
3. Orii M, Imanishi T, Teraguchi I, Nishiguchi T, Shiono Y, Yamano T, Ino Y, Kitabata K, Kubo T, Tanaka A, Akasaka T. Circulating CD14⁺⁺CD16⁺ Monocyte Subsets as a Surrogate Marker of the Therapeutic Effect of Corticosteroid Therapy in Patients With Cardiac Sarcoidosis. *Circ J.* 2015;79(7):1585-1592.

〔雑誌論文〕(計 3 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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 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・博士研究員
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・博士研究員
研究者番号：00507999

(3) 連携研究者

樽谷 玲 (Taruya, Rei)
和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員
研究者番号：60612942