

厚生労働科学研究研究費補助金
長寿科学総合研究事業

心筋梗塞、脳梗塞の予知因子の同定と予知法の開発に関する研究

平成16年度総括・分担研究報告書

主任研究者 北 徹

平成17年3月

目次

I	研究者構成	3
II	総括研究報告書	7
III	分担研究報告書	13
	新規血管新生因子CXCL16に関する研究	15
	京都大学医学部附属病院探索医療臨床部	横出正之
	心筋梗塞、脳梗塞の予知因子の同定と予知法の開発に関する研究	17
	京都大学大学院医学研究科循環病態学	木村 剛
	急性冠症候群の早期診断マーカーとしての血中可溶性LOX-1濃度測定の意義	20
	京都大学大学院医学研究科循環病態学	久米典昭
	心筋梗塞、脳梗塞の予知因子としての血小板活性化の評価法に関する研究	22
	京都大学大学院医学研究科循環病態学	堀内久徳
	糖尿病性腎症進展の予知因子としてのSmad1に関する研究	25
	京都大学大学院医学研究科加齢医学	荒井秀典
	心筋梗塞、脳梗塞の予知因子の同定と予知法の開発	27
	京都大学医学部附属病院地域ネットワーク医療部	田中 誠
	虚血性大脳白質病変による脳血管性パーキンソニズム発症機序	
	・PETによる検討	29
	京都大学大学院医学研究科附属高次脳機能総合研究センター	福山秀直
	若年発症心筋梗塞の危険因子としてのホモシステイン遺伝子多型に関する研究	31
	鹿児島大学大学院循環器呼吸器代謝内科学	鄭 忠和
	心筋梗塞、脳梗塞の予知因子の同定と予知法の開発に関する研究	32
	長崎大学大学院歯薬学総合研究科	近藤宇史
	心筋細胞障害におけるストレスタンパク質発現の病態的意義の解析	35
	長崎大学大学院歯薬学総合研究科	井原義人

腹部大動脈瘤の破裂予測因子として sLOX-1 に関する研究	36
腹部大動脈瘤の破裂予測因子として sLOX-1 に関する研究	37
大動脈瘤の発生部位、形態、性状が sLOX-1 に及ぼす影響に関する研究	38
大動脈瘤手術時の中枢神経障害予測因子としての sLOX-1 に関する研究	39
鹿児島大学医学部第二外科	坂田隆造
急性心筋梗塞症に対する血栓吸引療法の有用性に関する研究	40
静岡県立総合病院 系統別診療部	土井修
急性心筋梗塞に対する再疎通療法に関する研究	42
社会保険小倉記念病院	野坂秀行
心筋梗塞、脳梗塞の予測因子の道程と予知法の開発に関する研究	43
倉敷中央病院循環器内科	光藤和明
ピオグリタゾンの冠動脈ステント留置後の再狭窄予防効果に関する研究	44
大阪赤十字病院循環器科	田中昌
心筋梗塞、脳梗塞の予測因子の同定と予知法の開発に関する研究	45
京都通信病院第二内科	吉岡秀幸
急性冠症候群における可溶性 LOX-1 の動態に関する研究	46
近畿大学医学部奈良病院循環器内科	服部隆一
大動脈拡大性病変の破裂予測因子としての sLOX-1 の検討	47
近畿大学医学部心臓血管外科学	佐賀俊彦
IV 研究成果の刊行に関する一覧表	49

I. 研究者構成

長寿科学総合研究事業

心筋梗塞、脳梗塞の予知因子の同定と予知法の開発に関する研究

区分	氏名	所属	職名
主任研究者	北 徹	京都大学大学院医学研究科 循環病態学	教授
分担研究者	横出正之	京都大学医学部附属病院 探索医療センター臨床部	教授
分担研究者	木村 剛	京都大学大学院医学研究科 循環病態学	助教授
分担研究者	久米典昭	京都大学大学院医学研究科 循環病態学	講師
分担研究者	堀内久徳	京都大学大学院医学研究科 循環病態学	助手
分担研究者	荒井秀典	京都大学大学院医学研究科 加齢医学	講師
分担研究者	田中 誠	京都大学医学部附属病院 地域ネットワーク医療部	助教授
分担研究者	福山秀直	京都大学大学院医学研究科附属附属 高次脳機能総合研究センター	教授
分担研究者	鄭 忠和	鹿児島大学医学部第一内科	教授
分担研究者	近藤宇史	長崎大学医学部附属 原爆後遺障害医療研究施設	教授
分担研究者	井原義人	長崎大学医学部附属 原爆後遺障害医療研究施設	助教授
分担研究者	坂田隆造	鹿児島大学医学部第二外科	教授
分担研究者	土井 修	静岡県立総合病院循環器科	部長
分担研究者	野坂秀行	社会保険小倉記念病院	主任部長
分担研究者	光藤和明	倉敷中央病院循環器内科	部長
分担研究者	田中 昌	大阪赤十字病院循環器科	部長
分担研究者	吉岡秀幸	京都通信病院内科	部長
分担研究者	服部隆一	近畿大学医学部奈良病院循環器内科	教授
分担研究者	佐賀俊彦	近畿大学医学部心臓外科学	教授

II. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
平成16年度総括研究報告書

心筋梗塞、脳梗塞の予知因子の同定と予知法の開発に関する研究

主任研究者、北 徹 京都大学大学院医学研究科循環器内科教授

研究要旨 心筋梗塞や脳梗塞は高齢者の生命予後・QOLを規定する疾患である。本研究はそれらの疾患の発症予知因子を開発し、臨床検査として確立することを目的として研究を進めた。そのような予知因子があり、発症を予測できると、強力な危険因子の管理などにより発症が回避できるであろう。近年血中CRP値等の上昇と急性冠症候群発症との間に相関が示されたが、どれとして臨床上広く用いられている指標はない。

我々の見いだした酸化LDL受容体LOX-1は動脈硬化巣に発現誘導され、可溶型が存在する。我々は血清LOX-1が予知因子になる可能性を考え研究を進めてきた。平成14年度、ELISA法による測定系を確立し、血清LOX-1値を測定した結果、血清LOX-1値は安定型狭心症での上昇はわずかであるが、急性冠症候群（急性心筋梗塞症・不安定狭心症）では著明に上昇していることを見いだした（Circulation in press, 2005）。血清LOX-1値は、これまでにいわれているどの指標よりも感度、特異度が高く、急性冠症候群の予知因子となる可能性がある。閉塞性動脈硬化症（ASO）患者において、血清LOX-1値および共同研究者、近藤らの開発した酸化ストレスマーカーであるthiol化蛋白質を測定したが、両者とも、ASO患者で上昇しており、また、血清LOX-1値はASOの重症度との相関が認められた。ASOにおいても、血清LOX-1値は有用な検査法と成る可能性がある。今後、多くの症例で血清LOX-1値を測定し、動脈硬化性疾患の臨床検査として確立していく計画である。

心筋梗塞や脳梗塞発症時に血小板は活性化するとされているが、血小板活性化指標の測定は採血後に影響を受けやすく、煩雑かつ熟練を要するので、臨床的に広く用いられていない。我々は全血および濃厚血小板血漿を用いた凝集計により、安定して血小板被活性化を解析できる条件を整えた。本指標を用いて、心血管疾患のリスクが高いことが示されている睡眠時無呼吸症候群（SAS）患者の血小板被凝集性が亢進していることを見いだした。さらに、SASではCPAP（持続性陽圧気道内圧法）が有効な治療法であるが、CPAP療法直後は、さらに凝集性が亢進し、3ヶ月後に前値より改善することを見いだした（投稿準備中）。今後、このシステムを用いて血小板活性化指標が心筋梗塞・脳梗塞の予知因子になるか、さらに、抗血小板療法は広く施行されているにもかかわらずその効果判定のためのシステムはないので用量調節性の抗血小板療法が可能かどうか検討するため、前向き研究を開始した。

分担研究者：

横出正之（京都大学大学院医学研究科探索医療部、教授）
木村剛（京都大学大学院医学研究科循環病態学助教授）
久米典昭（京都大学大学院医学研究科循環病態学講師）
堀内久徳（京都大学大学院医学研究科循環病態学助手）
荒井秀典（京都大学大学院医学研究科老年内科学講師）
田中誠（京都大学付属病院地域ネットワーク医療部助教授）
福山秀直（京都大学大学院医学研究科脳病態生理学教授）
鄭忠和（鹿児島大学医学部第一内科教授）
近藤宇史（長崎大学医学部附属原爆後障害医療研究施設分子情報制御研究分野教授）
井原義人（長崎大学医学部附属原爆後障害医療研究施設分子情報制御研究分野助教授）、
坂田隆造（鹿児島大学医学部第二外科）
土井修（静岡県立総合病院循環器科部長）
野坂秀行（社会保険小倉記念病院循環器内科部長）
光藤和明（倉敷中央病院循環器科部長）
田中昌（大阪赤十字病院循環器科部長）
吉岡秀幸（京都通信病院内科部長）
服部隆一（近畿大学医学部奈良病院循環器内科教授）
佐賀俊彦（近畿大学医学部心臓外科学教授）

A. 研究目的

本研究の目的は心筋梗塞と脳梗塞の臨床応用可能な予知法の開発である。日本人の死因は、心疾患15%、脳血管障害15%であり、高齢になるに従い増加する。これらの疾患は高齢者の生命予後を規定するとともに、回復後も後遺症を残すため高齢者のQOLを損なう。もし、その発症が予知できれば、バイパス手術やカテーテル治療等の侵襲的治療法や、強力な抗血小板療法、脂質低下療法等の内科的治療によりその発症は回避可能であろう。そのため、国民医療・高齢者医療の向上のためには、心筋梗塞・脳梗塞発症予知法の確立は急務である。心筋梗塞発症は粥腫の破裂に引き続く血栓形成が原因とされる。心筋梗塞は必ずしも冠動脈の高度狭窄部位で発症するものではなく、狭窄度の低い部位からの発症が多いとされている。動脈硬化を基盤に発症するのではあるが、一般に、冠動脈造影では予知は困難であると考えられている。特に危険因子が重複する高齢者などでは、心筋梗塞や脳梗塞を予知できる指標があれば定期的に測定することで、治療のタイミングや治療強度を決定することが可能となる。脳梗塞は、その発症メカニズムについていまだ不明な点が多いが、脳梗塞予知法が開発されれば、より質の高い医療を実施することが可能となるであろう。

なお、抗血小板療法の心筋梗塞・脳梗塞予防に対する有効性が確立され、多くの患者が治療されているが、同時に副作用として脳出血などの出血性合併症の頻度を増加させる。現在、広く臨床の場で用いられている効果モニター法がないが、もし、そのような方法が確立できれば、効果をモニターしながらより有効かつ安全な抗血小板療法を施行できるであろう。本研究で確立しようとしている血小板活性化指標は予知因子としてばかりでなく、抗血小板療法の効果モニターに広く応用される可能性がある。

B. 研究方法

北は分担研究者、久米等とともに見いだした酸化LDL受容体LOX-1、SR-PSOXに、両者とも動脈硬化巣に発現し、可溶型があることを見出した。ELISA法を用いて、LOX-1の血中濃度測定系を確立できたので、急性冠症候群を中心に多くの症例において測定した。また、LOX-1、SR-PSOXの細胞生物学的な機能解析を行った。さらに、分担研究者、近藤らは、酸化ストレスのマーカーとして、thiol化蛋白質の定量測定系を確立し、多くの血管疾患をもつ症例で測定した。血小板活性化指標がない理由のひとつは、血小板活性化機構に不明な点が多いためである。分担研究者、堀内等とともに独自の、形質膜を透過型にした血小板を用いた血小板顆粒放出および凝集解析系を確立し、血小板活性化の分子機構の解明に取り組んだ。また、予知因子としての可能性および、抗血小板療法の効果モニターのため、血小板凝集能測定システムを確立した。本年度

は健常者のコントロールを解析し、また、睡眠時無呼吸症候群患者で測定し解析している。さらに、抗血小板療法の効果と心血管イベント発症との関係を明らかにすべく、大規模前向き研究を計画した。

C. 研究結果

動脈硬化発症には酸化低比重リポ蛋白質(LDL)が重要な働きをしているが、我々は2つの酸化LDL受容体、LOX-1(Sawamura et al., Nature, 1997)およびSR-PSOX(Shimaoka et al., JBC, 2000)を見出している。LOX-1は可溶型が存在し、測定法を確立し得た。ヒト血清において測定可能なことを確認し、急性心筋梗塞等を含む急性冠症候群の患者では高値となることを見出した(Hayashida et al., Circulation in press, 2005)。CRP等の炎症マーカーや心筋障害マーカーとも異なる動きをいした。すなわち、トロポニンTなどの心筋障害マーカーは発症後2-3時間で上昇してくるが、LOX-1は発症時にはすでに最高値に達しているという結果であった。かLOX-1は現在のところ、最良の急性冠症候群の予知因子である可能性が高い(Circulation in press, 2005)。さらに多くの症例を重ね、時間経過の詳細、さらに、安定型および不安定狭心症での位置づけ等まで踏み込み、心筋梗塞、脳梗塞予知因子として確立していく計画である。種々の疾患において、多くの症例で可溶型LOX-1値を測定し、今後、血清診断法としての位置づけを確立していく計画である。また、LOX-1に関しては、PPAR γ (Hayashida et al, BBRC, 2004)および、HB-EGF(Mukai et al., Atherosclerosis, 2004)がLOX-1を発現誘導することを見出した。

近藤らは、酸化ストレスのマーカーとして、thiol化蛋白質の定量法を確立した。その方法を用い、多くの症例で、可溶型LOX-1値とともにその指標を測定した。多くの閉塞性動脈硬化症でも測定したが、thiol化タンパク量および可溶型LOX-1値ともに、コントロールに比べ明らかに閉塞性動脈硬化症症例で上昇しており。可溶型LOX-1は重症度に従って上昇していることを見いだした(投稿準備中)。興味深いことに、両者の間には相関は認められなかったが、それは、両者の上昇もメカニズムの違いによるものであらうと考えられる。

動脈硬化の最終段階は血栓形成による動脈の閉塞である。血小板活性化の分子機構は多くのことが不明であるが、核のない血小板で分子生物学的手法を用いることが困難であることが大きな原因である。我々は透過型血小板を用いた凝集(Nishioka et al., BBRC, 2001)・顆粒放出(Shirakawa et al., JBC, 2000)解析系を確立することで、その障壁を克服し、血小板活性化の分子機構を解析している。その系を用い、small GTPase Rab27が濃染顆粒放出を制御していること血小板細胞質中のRab27の標的タンパ

ク質を Munc13-4 と同定し、両者が血小板濃染顆粒放出を制御していることを見いだした (Shirakawa et al., JBC, 2004)。フランスのグループより、Munc13-4 が家族性血球貪食症候群 (FHL3) の原因であることが報告されたが、NK 細胞や細胞障害性 T 細胞での perforin 等を含む顆粒放出が障害されているためである。我々は、我が国における遺伝性血球貪食症候群を解析し、Munc13-4 の異常によるものは、perforin の non-sense mutation よりは症状が軽いことを明らかにした (Ishii et al., Blood, 2005)。Perforin の場合、'殺し屋' そのものであるが、Munc13-4 は顆粒放出の調節因子という違いが臨床症状に強弱をつけた可能性が考えられる。血小板凝集では、アダプター蛋白質 ShcA が重要な働きをしていることも明らかにした (Higashi et al., BBRC, 2004)。我々の確立した系を用いて研究をすすめ、血小板活性化の分子メカニズムを明らかにし、血栓性疾患の予防、治療に貢献していきたいと考えている。

平成 15 年度には、安定かつ信頼性の高い血小板凝集指標の測定法を確立した。京都大学医の倫理委員会の承認を得て平成 16 年度には、約 50 名の健常人での基礎データを採取した。さらに、呼吸器内科との共同研究で 60 名の睡眠時無呼吸症候群患者およびコントロール 60 名の血小板機能を測定し、睡眠時無呼吸症候群患者で血小板凝集性が亢進していることを明らかにした (Sumi et al., 投稿準備中)。現在、抗血小板療法を受けているハイリスク患者 1,000 例規模の血小板機能や LOX-1 値を測定し、前向きに 3 年間追跡するという APTTEST Trial をまさに始めようとしている。

D. 考察

動脈硬化巣には、コレステロールを蓄えたマクロファージ由来の泡沫細胞の集簇が認められる。コレステロールは血清中を LDL の形で運ばれるが、マクロファージは、その酸化産物である酸化 LDL の形で、コレステロールを貪食する。酸化 LDL 受容体は既にいくつか同定されたが、我々も LOX-1 および SR-PSOX の 2 分子を同定した。LOX-1 は、血管内皮細胞や、平滑筋細胞に発現しており、種々の炎症刺激で発現誘導される。さらに、動脈硬化巣に強く発現していることも確認している。SR-PSOX は、ケモカイン CXCL16 と同一分子であり、リンパ球に発現していることから免疫学的側面から興味を持たれている。

LOX-1 は動脈硬化巣で強く発現しており、予備実験では、血栓形成とともに可溶型が増加する。その両者の効果が相乗的に作用し、急性冠症候群で増加しているのであろう。LOX-1 は、hsCRP より感度、特異度とも大きく優れていた。さらに、急性冠症候群時、トロポニン T は発症 2-3 時間で上昇するが、血清可溶型 LOX-1 値は、急性冠症候群発症時、すでにピークと成っていた。すなわち、血清可溶型 LOX-1 値は、現在の、最も優れた急性冠症候群予知因子の可能性が。さらに、急性冠

症候群時、臨床の現場ではトロポニン T 値がしばしば測定されるが、血清可溶型 LOX-1 値を組み合わせることで、さらに診断能力が上昇する可能性がある。

血小板は、動脈血栓のトリIGGERである。抗血小板療法の心血管イベントに対する予防効果が証明されており、その重要性が広く認識されている。血小板の指標としては、血小板特異的因子である β TG や PF4 などの血清値の測定による血小板の活性化の指標があり、また、血小板等を体外に取り出し、刺激に応じた血小板凝集の解析から得られるような血小板被活性化の指標がある。両者はある程度の相関が予想されるが、同一のものではない。また、糖尿病などで、血清 β TG 値の上昇などが明らかにされているが、予後との関連を明らかにしたような前向き研究はほとんどない。

我々は、血小板被活性化を精密に測定する方法を確立し、多くの症例で測定した。そして、本研究中に睡眠時無呼吸症候群患者で血小板被活性化可能が増進していることを見いだした。また、CPAP 治療により 3 ヶ月まではさらに活性化していることを見いだしている、今後、睡眠時無呼吸症候群患者および、CPAP 導入より 3 ヶ月以内の睡眠時無呼吸症候群患者には、抗血小板療法を施すべきかもしれない。

最近、アスピリンの抗血小板作用には個人差があり、アスピリンに不応性の血小板を持つ症例が含まれていることが明らかになった。さらに、アスピリン不応性の患者に心血管イベント発症の頻度が高いことも示されている。我々の構築した血小板被活性化能を解析するシステムは、アスピリン不応性の解析に有用である。我々は、本システムを利用して、大規模前向き研究を計画したが、その研究により、日本人におけるアスピリン不応性の頻度等を明らかにし、さらに前向きに追跡することにより、その予後との相関も明らかにできよう。

E. 結論

本研究を通じ、血清可溶型 LOX-1 値が、現在では、最も信頼のおける心筋梗塞予知因子に成る可能性を示せた。さらに、多くの疾患、症例で検討を進め、可溶型 LOX-1 値の診断学的意義を確立する。また、血小板活性化指標を確立できた、本指標が予知因子と成るか、さらに、抗血小板療法効果判定指標と成るか、今後、検証していく。

F. 研究業績

- (o) Shimaoka T, Nakayama T, Fukumoto N, Kume N, Takahashi S, Yamaguchi J, Minami M, Hayashida K, Kita I, Ohsumi J, Yoshie O, Yonehara S. Cell surface-anchored SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates firm adhesion of CXC chemokine receptor 6-expressing cells. *J Leukoc Biol.* 75(2):267-74. 2004. [Epub 2003.]
- (o) Shirakawa R, Higashi T, Tabuchi A, Nishioka H,

Fukuda M, Kita T, Horiuchi H. Munc13-4 is a GTP-Rab27 binding protein regulating dense-core granule secretion in platelets. *J Biol Chem*. 279(11):10730-10737, 2004

3) Ohashi S, Abe H, Takahashi T, Yamamoto Y, Takeuchi M, Arai H, Nagata K, Kita T, Okamoto H, Yamamoto H, Doi T. Advanced Glycation End Products Increase Collagen-specific Chaperone Protein in Mouse Diabetic Nephropathy. *J. Biol. Chem*. 279(19): 19826-19823, 2004

4) (o) Fukumoto N, Shimaoka T, Fujimura H, Sakoda S, Tanaka M, Kita T, Yonehara Shin. Critical Roles of CXC Chemokine Ligand 16/Scavenger Receptor that Binds Phosphatidylserine and Oxidized Lipoprotein in the Pathogenesis of Both Acute and Adoptive Transfer Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol*. 173: 1620-1627, 2004

5) (o) Sato Y, Kita T, Takatsu Y, Kimura T. Biochemical makers of myocyte injury in heart failure. *Heart*. 90: 1110-1113, 2004

6) Horiuchi H, Matsuzawa Yuji, Mabuchi H, Itakura H, Sasaki J, Yokoyama M, Ishikawa Y, Yokoyama S, Mori S, Ohru T, Akisita M, Hayashi T, Yamane K, Egusa G, and Kita T. Strategy for treating elderly Japanese with hypercholesterolemia. *Geriatric. Gerontol Int*. 4:151-156, 2004

7) (o) Kobayashi T, Tahara Y, Matsumoto M, Iguchi M, Sano H, Maruyama T, Arai H, Oida H, Yurugi-Kobayashi T, Yamashita J K., Katagiri H, Majima M, Yokode M, Kita T, Narumiya S. Roles of thromboxane A₂ and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J. Clin. Invest*. 114: 784-794, 2004

8) (o) Taniguchi R, Sato Y, Yamada T, Ooba M, Higuchi H, Matsumori A, Kimura T, Kita T. Combined Measurements of Cardiac Troponin T and N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide in Patients With Heart Failure. *Circ J*. 68: 1160-1164, 2004

9) (o) Kume N, Kita T: Apoptosis of vascular cells by oxidized LDL: involvement of caspases and LOX-1, and its implication in atherosclerotic plaque rupture. *Circ. Res*. 94: 269-270, 2004

10) (o) Horiuchi H, Kita T, Mabuchi H, Matsuzaki M, Matsuzawa Y, Nakaya N, Oikawa S, Saito Y, Sasaki J, Shimamoto K, Itakura H, and the J-LIT Study Group. Primary cardiovascular events and serum lipid levels in elderly Japanese with hypercholesterolemia undergoing 6-Year simvastatin treatment : A subanalysis of the Japan Lipid Intervention Trial. *J. Am. Geriatrics. Soc*. 52: 1981-1987, 2004

11) (o) Xu Y, Arai H, Zhuge X, Sano H, Murayama T, Yoshimoto M, Heike T, Nakahata T, Nishikawa SI, Kita T, Yokode M. Role of Bone Marrow-Derived Progenitor Cells in Cuff-Induced Vascular Injury in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 24:477-482 2004.

12) Saito N, Kimura T, Toma M, Teragaki M, Minaminimura H, Kita T, Inoue K. Successful endovascular repair of an aneurysm of the ductus diverticulum with a branched stent graft: case report and review of literature. *J Vasc Surg*. 2004;40:1228-1233.

13) (o) Hayashida K, Kume N, Minami M, Inui- Hayashida A, Mukai E, Toyohara M, Kita T:

Peroxisome proliferator-activated receptor alpha ligands activate transcription of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 gene through GC box motif. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 323: 1116-1123, 2004

14) (o) Mukai E, Kume N, Hayashida K, Minami M, Yamada Y, Seino Y, Kita T: Heparin-binding EGF-like growth factor induces expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 176: 289-296, 2004

15) (o) Higashi T, Yoshioka A, Shirakawa R, Tabuchi A, Nishioka H, Kita T, Horiuchi H. Direct demonstration of involvement of the adaptor protein ShcA in the regulation of Ca(2+)-induced platelet aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 322: 700-704, 2004

16) Abe H, Matsubara T, Iehara N, Nagai K, Takahashi T, Arai H, Kita T, Doi T. Type IV Collagen Is Transcriptionally Regulated by Smad 1 under Advanced Glycation End Product (AGE) Stimulation. *J. Biol. Chem*. 279(14): 14201 -14206, 2004

17) Togi K, Kawamoto T, Yamauchi R, Yoshida Y, Kita T and Tanaka M Role of HAND1/eHAND in the Dorso-Ventral Patterning and Interventricular Septum Formation in the Embryonic Heart. *Mol. Cell. Biol*. 24(11): 4627-4635, 2004

18) Yamada T, Inoue K, Hamasaki N, Nakagawa Y, Iwabuchi M, Yokoi H, Kimura T, Nosaka H, Nobuyoshi M Late restenosis of the balloon-dilated site: serial angiographic observations beyond 7 years. *Circ J*. 2005;69:380-385.

19) Yamamoto M, Tadamura E, Kubo S, Toyoda H, Nishina T, Ohba M, Hosokawa R, Kimura T, Tamaki N, Komeda M, Kita T, Konishi J. Cardiac functional analysis with multi-detector row CT and segmental reconstruction algorithm: comparison with echocardiography, SPECT, and MR imaging. *Radiology*. 2005;234:38-390.

20) Hosokawa R, Nohara R, Hirai T, Fujibayashi Y, Fujita M, Kambara N, Ohba M, Tadamura E, Kimura T, Kita T. Myocardial metabolism of 123I-BMIPP under low-dose dobutamine infusion: implications for clinical SPECT imaging of ischemic heart disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2005;32:75-83

21) Saito N, Kimura T, Odashiro K, Toma M, Nobuyoshi M, Ueno K, Kita T, Inoue K. Feasibility of the Inoue single-branched stent-graft implantation for thoracic aortic aneurysm or dissection involving the left subclavian artery: short- to medium-term results in 17 patients. *J Vasc Surg*. 2005;41:206-212; discussion.

22) (o) K. Hayashida, N. Kume, T. Murase, M. Minami, D. Nakagawa, T. Inada, M. Tanaka, A. Ueda, G. Kominami, H. Kambara, T. Kimura, T. Kita Serum soluble lectin-like oxidized LDL receptor-1 (soluble LOX-1) levels are elevated in acute coronary syndrome—a novel marker for early diagnosis *Circulation* 2005 in press

III. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
（分担）研究報告書

新規血管新生因子 CXCL16 に関する研究

（分担）研究者 横出正之 京都大学病院医学研究科探索医療臨床部教授

研究要旨 CXCL16は、マクロファージにおいてフォスファチジルセリンと酸化LDLの受容体として機能する特異なケモカインであり、粥腫形成過程では細胞内コレステロールの蓄積に関与している。本研究で我々は、CXCL16がヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）に対して新規血管新生因子として作用することを検証するため、一連の実験を行い、以下の成果を得た。すなわち、CXCL16は用量依存性にHUVECの増殖とケモタキシスを刺激し、マトリジェルにおける管腔形成を惹起した。さらに、CXCL16は用量・時間依存性にERKを活性化するが、この反応はMEK阻害剤により完全に抑制された。また、CXCL16によるHUVECの増殖作用と管腔形成作用はMEK阻害剤により抑制された。以上より、CXCL16はHUVECの新規血管新生因子であり、その多彩な作用の一部にはERKが関与していることが証明された。

A. 研究目的

近年、腫瘍増殖・心血管疾患・慢性炎症・創傷治癒などの過程における血管新生と白血球浸潤の関係について、強い関心が寄せられてきた。血管新生と炎症は、血管内皮細胞と白血球がケモカインなどの共通の刺激に反応して起きる共働反応である。CXCL16は、粥腫形成過程で細胞内コレステロール蓄積に関わる独特なケモカインであるが、これまでにこのCXCL16が感染性心内膜炎・リウマチ性および動脈硬化性弁膜症の患者の心臓弁およびその新生毛細血管内皮に強く発現していることが報告されている。本研究では、CXCL16が実際に新規血管新生因子として機能して、直接血管新生過程に関与しているかどうかを検証した。

B. 研究方法と研究結果

まず、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を用いた *in vitro* 実験により、血管新生因子としてのCXCL16の機能を評価した。WST-1法による細胞増殖能検定では、CXCL16存在下で48時間培養すると、HUVECは量依存的に増殖し、1nMの濃度で細胞数は対照群より35%増えることが示された。また、ポイデンチャンパー法による走化性（ケモタキシス）試験では、CXCL16は用量依存的にHUVECの走化能を増加させ、1nMの濃度で4時間刺激する

と対照群よりケモタキシスは40%増えた。さらにMatrigelアッセイでHUVECの管腔形成能を調べると、1nMのCXCL16の投与により、管腔長の総和は対照群より1.5倍増加した。

（2）次に、これまでの研究から、さまざまな血管新生因子により惹起される内皮細胞の増殖、遊走、形態形成にはERKの活性化が深く関わっていることが示されているので、CXCL16を介する情報伝達におけるERKの活性化について研究を行った。

HUVECをCXCL16で刺激すると、時間（10分後に最大）および用量（1nMで最大）依存的にERKが活性化された。CXCL16刺激の30分前にMEKを阻害するPD98059化合物で前処置しておく、このERK活性化は完全に阻止された。

（3）最後に、HUVECにおけるCXCL16の血管新生作用に、ERKの活性化が必要かどうかを検証した。PD98059で前処置しておく、CXCL16による細胞増殖と管腔形成は阻止されたが、ケモタキシスはその影響を受けなかった。このことから、CXCL16により惹起されるHUVECの細胞増殖と管腔形成にはERKが関与しているが、走化能には関わらないことが明らかになった。

C. 考察

以上の結果から、CXCL16は新規血管新生因子として血管新生に直接関与して、血管壁の炎症反応にも何らかの役割を果たしているのではないかと推察される。本研究は虚血性心疾患や末梢血管閉塞症などに対する予知因子や治療法を開発する上で有意義な知見と考えられる。

D. 結論

HUVEC に対してケモカイン CXCL16 は用量・時間依存的に血管新生因子として機能し、その作用の一部には ERK が関与している。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kobayashi T, Tahara Y, Matsumoto M, Iguchi M, Sano H, Murayama T, Arai H, Oida H, Yurugi-Kobayashi T, Yamashita JK, Katagiri H, Majima M, Yokode M, Kita T, Narumiya S. Roles of thromboxane A2 and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Clin Invest* 114: 784-794, 2004

2) Zhuge X, Kataoka H, Tanaka M, Murayama T, Kawamoto T, Sano H, Togi K, Yamauchi R, Ueda Y, Xu Y, Nishikawa S-I., Kita T, Yokode M. Expression of the novel *Snai*-related zinc-finger transcription factor gene *Smuc* during mouse development. *Int J Mol Med* in press, 2005

3) Zhuge X*, Murayama T*, Arai H, Yamauchi R, Tanaka M, Shimaoka T, Yonehara S, Kume N, Yokode M, Kita T.

CXCL16 is a novel angiogenic factor for human umbilical vein endothelial cells.

Biochem Biophys Res Commun in press, 2005

2. 学会発表

1) Zhuge X, Arai H, Xu Y, Murayama T, Kobayashi T, Narumiya S, Kita T, Yokode M. Thromboxane A2 receptor in monocyte/macrophages does not affect atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. 5th Annual Conference on Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. San Francisco, May 6-8, 2004

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
（分担）研究報告書

心筋梗塞、脳硬塞の予知因子の同定と予知法の開発に関する研究

（分担）研究者 木村 剛 京都大学大学院医学研究科循環病態学助教授

研究要旨 わが国における虚血性心疾患の冠血行再建術の現状と冠血行再建術後の長期成績・予後の大規模調査を引き続き行なっている。その結果から、虚血性心疾患の冠血行再建術後の長期成績・予後の予知因子となる臨床指標に関して重要な情報が得られるものと考えられる。また、倫理委員会による急性心筋梗塞に対する再生治療としての自己骨髄単核球冠動脈内投与の第 I、II 相臨床試験の実施承認が得られた。これらの研究成果から、今後、心筋梗塞をはじめとする虚血性心疾患の治療成績・予後の予知因子の同定を試みる。

A. 研究目的

心筋梗塞の予知因子の同定と予知法の開発のために、心筋梗塞を含む虚血性心疾患の臨床像や診断・治療法を評価し、現行の標準的診断・治療法の問題点を明らかにする。以前、われわれは分担研究者の延吉正清らと共同で、虚血性心疾患の治療に広く用いられているステント留置による経皮的冠動脈形成術を受けた患者の 3 年間の重大冠動脈イベント（心筋梗塞、バイパス手術、当該病変での再血管形成術、その他の病変に対する経皮的冠動脈形成術）非発生率と施行部での血管内径の変化を追跡した。その結果、同術施行部では再狭窄は術後 6 ヶ月の間に完了し、1 年後までは内径の変化見られず、3 年には逆に内径が拡大し狭窄度は改善するとの結果が得られた。ステント留置部に対する再血管形成術を含む重大冠動脈イベントも比較的早期の 1 年以内に多く、その後、発生頻度が減少することがわかった。

今回、われわれは、わが国における虚血性心疾患患者の臨床像を掌握し、その治療法の現状、治療効果の評価を行なって、虚血性心疾患の病態とその現在の標準治療法を評価することを試みた。すなわち、虚血性心疾患に対する血行再建術である経皮的冠動脈インターベンション（PCI）と冠動脈バイパス手術（CABG）施行後の長期成績・予後に関する調査を行うことで、虚血性心疾患の血行再建術後の長期成績・予後の予知因子となる臨床

指標を同定することが、本研究の主な目的である。

B. 研究方法

最終的に 31 施設が参加した多施設共同の PCI/CABG に関するレジストリー研究の症例登録および追跡を行った。本研究は、2000 年から 2002 年の 3 年間に初回 PCI または CABG を行った症例を登録・追跡する大規模アウトカム研究であり、施行時の基礎データ収集と最終的に施行 5 年後までの追跡結果に基づいた予後・治療成績調査を行ない、わが国の虚血性心疾患の長期予後、低左心機能例や糖尿病合併例など重症例での PCI と CABG の治療成績・長期予後の違い、PCI 及び CABG 後の薬物治療の実際、施設環境による治療成績・長期予後の違いなどを調査・検討するものである。評価項目には、全死亡、心血管死、再血行再建術などが含まれる。

また、急性心筋梗塞に対する再生治療としての自己骨髄単核球冠動脈内投与の第 I、II 相臨床試験の実施を当院の倫理委員会に再申請した。この研究は、急性心筋梗塞発症早期（3～7 日）に冠動脈内に自己骨髄単核球を投与し、非投与群と慢性期の左室機能改善の有無等を比較するもので、同時に患者血清中の血管新生促進因子などの測定を行い、治療効果を予測する因子の検索も行う。

C. 研究結果

初回 PCI/CABG 施行症例に関するレジストリー研究では、平成 16 年度末までに 26 施設で症例登録および血行再建術施行 1 年後までの追跡データ入力を開始しており、既に約 4,000 例のデータ入力を終えている。このうち、平成 16 年 11 月までに 1 年後までの追跡データ入力を終えた 2,600 症例を対象に中間解析を行い、その結果をもとに、各施設事情により極端に欠損値の多い項目は削除するなど、データ入力項目の再検討を行った。また、薬剤放出性ステントがわが国で広く使用可能となった後の PCI、CABG の選択の変化や治療成績・予後の変化を調べるための、平成 17 年～平成 19 年の間の初回 PCI/CABG 施行症例についての同様の調査研究を行う予定とし、倫理委員会の承認を得た。

そのほか、急性心筋梗塞に対する再生治療としての自己骨髄単核球冠動脈内投与の第 I、II 相臨床試験の実施が、当院の倫理委員会により承認され、試験実施期間に入った。

D. 考察

わが国の冠血行再建術を取り巻く環境は欧米とは大きく異なる。わが国では、人口に比し経皮的冠動脈インターベンション (PCI) の施行施設は非常に多く、個々の施設の実施数では少ない施設も多い。冠動脈バイパス手術 (CABG) の施行症例数との比率でいえば、わが国は欧米の 2～5 倍であるといわれている。その背景には、生活習慣や人種の違いなどから欧米のほうが重症の冠動脈疾患が多い可能性や医療保険制度の相違など、さまざまな要因が考えられる。しかしながら現状では、このように欧米と大きく異なる背景を持つわが国の虚血性心疾患の診療方針に、欧米での大規模臨床試験の結果が参考にされている。したがって、わが国固有の臨床データで虚血性心疾患の診療方針決定のためのエビデンスとなるデータの蓄積が必要である。エビデンスとして強いのは、大規模 RCT (さらに、それらのメタ解析) であるが、わが国には大きな

規模での虚血性疾患診療のレジストリーも無い現状であったため、まずはレジストリーの構築を行い、実際に行われている医療を認識することが最優先であると考えた。平成 16 年度末までに約 4,000 例の症例登録を終えているが、今後も症例登録を進め、最終的には約 10,000 例の症例が解析の対象となる見通しである。この長期成績・予後調査において、評価項目イベントの発生を予測する臨床指標の検討を行う。

また、われわれは、薬剤放出性ステント導入後のコホートを対象に同様の解析を行うことにより、薬剤放出性ステント導入が PCI の成績や PCI と CABG との間での冠血行再建術の選択に与える影響、薬剤放出性ステント導入により解決された bare metal stent 時代の PCI の問題点と薬剤放出性ステント時代となっても残された問題点などを明らかにするとともに、薬剤放出性ステント時代の冠血行再建術後の長期成績・予後の予測因子となる臨床指標についての検討を行う。こうした検討により、日本人における虚血性心疾患の冠血行再建術後の長期成績の予測因子となる臨床指標が同定されるものと考えている。

さらに、急性心筋梗塞に対する自己骨髄単核球冠動脈内投与の第 I、II 相臨床試験の倫理委員会での実施承認が得られ、同臨床試験の実施期間に入った。この研究成果は、急性心筋梗塞の新たな治療法の安全性と効果の評価を行うとともに、同時に行う血中マーカーの解析は、心筋梗塞後の予後の予知因子の検索に大きな情報を与えるものと考えている。

E. 結論

虚血性心疾患の 2 つの冠血行再建法である経皮的冠動脈インターベンションと冠動脈バイパス手術の長期成績・予後調査を継続中である。また、急性心筋梗塞に対する自己骨髄単核球冠動脈内投与の第 I、II 相臨床試験の倫理委員会での実施承認を得て、同臨床試験の実施期間に入った。これらの研究成果は、わが国における

虚血性心疾患治療の現状認識と冠血行再建術後や急性心筋梗塞後の治療成績・予後の予測法の開発に大きく貢献するものと思われる。

F. 健康危険情報：なし

G. 平成16年度成果：論文

1. Yamada T, Inoue K, Hamasaki N, Nakagawa Y, Iwabuchi M, Yokoi H, Kimura T, Nosaka H, Nobuyoshi M. Late restenosis of the balloon-dilated site: serial angiographic observations beyond 7 years. *Circ J*. 2005;69:380-385.
2. Saito N, Kimura T, Odashiro K, Toma M, Nobuyoshi M, Ueno K, Kita T, Inoue K. Feasibility of the Inoue single-branched stent-graft implantation for thoracic aortic aneurysm or dissection involving the left subclavian artery: short- to medium-term results in 17 patients. *J Vasc Surg*. 2005;41:206-212; discussion 212.
3. Yamamuro M, Tadamura E, Kubo S, Toyoda H, Nishina T, Ohba M, Hosokawa R, Kimura T, Tamaki N, Komeda M, Kita T, Konishi J. Cardiac functional analysis with multi-detector row CT and segmental reconstruction algorithm: comparison with echocardiography, SPECT, and MR imaging. *Radiology*. 2005;234:381-390.
4. Hosokawa R, Nohara R, Hirai T, Fujibayashi Y, Fujita M, Kambara N, Ohba M, Tadamura E, Kimura T, Kita T. Myocardial metabolism of ¹²³I-BMIPP under low-dose dobutamine infusion: implications for clinical SPECT imaging of ischemic heart disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2005;32:75-83.
5. Saito N, Kimura T, Toma M, Teragaki M, Minaminimura H, Kita T, Inoue K. Successful endovascular repair of an aneurysm of the ductus diverticulum with a branched stent graft: case report and review of literature.

J Vasc Surg. 2004;40:1228-1233.

6. Sakai K, Nakagawa Y, Kimura T, Ando K, Yokoi H, Iwabuchi M, Inoue K, Nosaka H, Nobuyoshi M. Primary angioplasty of unprotected left main coronary artery for acute anterolateral myocardial infarction. *J Invasive Cardiol*. 2004;16:621-625.
7. Taniguchi R, Sato Y, Yamada T, Ooba M, Higuchi H, Matsumori A, Kimura T, Kita T. Combined measurements of cardiac troponin T and N-terminal pro-brain natriuretic peptide in patients with heart failure. *Circ J*. 2004;68:1160-1164.
8. Nishiyama K, Okino S, Andou J, Nakagawa Y, Kimura T, Nobuyoshi M. Coronary angioplasty reduces free wall rupture and improves mortality and morbidity of acute myocardial infarction. *J Invasive Cardiol*. 2004;16:554-558.
9. Sato Y, Kita T, Takatsu Y, Kimura T. Biochemical markers of myocyte injury in heart failure. *Heart*. 2004;90:1110-3. Review.

H. 知的財産権の出願・登録状況：なし

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

（分担）研究報告書

急性冠症候群の早期診断マーカーとしての血中可溶性 LOX-1 濃度測定の意義

（分担）久米 典昭 京都大学大学院医学研究科内科学講座循環器内科学講師

研究要旨 「目的」 LOX-1 は虚血性心疾患の発症の成因となる酸化 LDL の受容体であるが、その一部が細胞表面から切断されて血中に放出される。可溶性 LOX-1 の血中濃度が急性冠症候群の急性期に有意に高い値をとることが示されている。そこで、すでに臨床の現場で用いられているトロポニン T(TnT)や心臓型脂肪酸結合蛋白(H-FABP)と比較して可溶性 LOX-1 が感度・特異度のよい急性冠症候群のマーカーとなるか否かを検討した。「方法」冠動脈造影検査を受けた連続症例を対象に、新たに開発した ELISA 法でヒト可溶性 LOX-1 の血中濃度を測定し、従来からの方法で TnT と H-FABP を測定した。「結果」急性冠症候群の急性期の診断マーカーとして可溶性 LOX-1 は TnT や H-FABP よりも優れていた。「総括」虚血性心疾患における血中可溶性 LOX-1 濃度測定の意義が明らかになった。

A. 研究目的

急性心筋梗塞をはじめとする虚血性心疾患は近年わが国でも増加の一途をたどっており、その危険を予知し、適切な予防法を確立することは急務である。高脂血症、糖尿病、高血圧、喫煙などは虚血性心疾患の危険因子となるが、一方で炎症反応の程度を反映する high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP)などの血液マーカーが虚血性心疾患のリスクを反映することが報告されている。LOX-1 は虚血性心疾患の発症の成因となる酸化 LDL の受容体であるが、その発現は催炎症性の刺激により誘導されるとともに、その一部が細胞表面から切断されて血中に放出されることが示されている。可溶性 LOX-1 の血中濃度が急性冠症候群の急性期に上昇することをすでに示したが、今年度はその診断感度・特異度を従来からのマーカーであるトロポニン T(TnT)および心臓型脂肪酸結合蛋白(H-FABP)と比較して検討した。

B. 研究方法

血中可溶性 LOX-1 濃度を測定するために、2種類の特異的な抗体を開発し ELISA 法を確立した。ELISA 法での測定が信頼できるものであることは、高値がみられた症例の血清にて、抗 LOX-1 抗体を用いた免疫沈降とウエスタンブロットにより、その分子量から確かに可溶性 LOX-1 であることからす

に確認されている。冠動脈造影検査を受けた症例中でインフォームドコンセントの得られた急性冠症候群（急性心筋梗塞あるいは不安定狭心症）急性期 18 例、非急性冠症候群（安定狭心症および正常冠動脈症例）90 例を対象に、冠動脈造影検査時に末梢血を採取し血清を分離し、ヒト可溶性 LOX-1、TnT、H-FABP の血中濃度を測定した。

（倫理面への配慮）

文書を用いて患者に説明し、インフォームドコンセントの得られた症例のみを対象とした。

C. 研究結果

可溶性 LOX-1 では急性冠症候群の診断感度・特異度いずれも 80%を上回ったが、特異度を 80%に保つと、診断感度は TnT では 50%、H-FABP では 60%前後であった。

D. 考察

急性冠症候群の急性期の診断マーカーとして、可溶性 LOX-1 は TnT や H-FABP よりも診断感度・特異度の優れたマーカーとなることが示された。

E. 結論

急性冠症候群の急性期診断マーカーとして、可溶性 LOX-1 が従来のマーカーより有用であることが

示された。さらに、前向き試験による検討により、可溶性 LOX-1 値の変動が、急性冠症候群の発症リスクなるか、発症を予知しうるマーカーとなるかが検討される。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kume N, Kita T: Apoptosis of vascular cells by oxidized LDL: involvement of caspases and LOX-1, and its implication in atherosclerotic plaque rupture. *Circ. Res.* 94: 269-270, 2004

2) Mukai E, Kume N, Hayashida K, Minami M, Yamada Y, Seino Y, Kita T: Heparin-binding EGF-like growth factor induces expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 176: 289-296, 2004

3) Hayashida K, Kume N, Minami M, Inui-Hayashida A, Mukai E, Toyohara M, Kita T: Peroxisome proliferator-activated receptor alpha ligands activate transcription of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 gene through GC box motif. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323: 1116-1123, 2004

2. 学会発表,

1) Noriaki Kume, Kazutaka Hayashida, Toru Kita: Oxidized LDL receptors in atherosclerotic vascular diseases. 第 68 回日本循環器学会シンポジウム、Molecular mechanism of atherosclerosis. 2004 年 3 月 28 日、東京

2) Noriaki Kume, Toru Kita: Oxidized LDL receptors and atherogenesis. 13th International Vascular Biology Meeting, Workshop. 2004 年 6 月 1 日、トロント、カナダ

3) 久米典昭、北 徹: 酸化 LDL 受容体 LOX-1 と粥状動脈硬化、第 46 回日本脂質生化学会、シンポジウム、2004 年 6 月 19 日、熊本

4) Noriaki Kume, Toru Kita: Pathophysiology of LOX-1 and its relation to atherosclerotic plaque rupture. 第 36

回日本動脈硬化学会、Forum 2, Plaque instability: From molecular mechanisms to clinical applications. 2004 年 7 月 24 日、福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
特記すべきことなし。

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
（分担）研究報告書

心筋梗塞、脳梗塞の予知因子としての血小板活性化の評価法に関する研究

（分担）研究者 堀内 久徳 京都大学大学院医学研究科循環器内科助手

研究要旨 血小板活性化は動脈血栓症の引き金であり、血小板活性化指標が予知因子となる可能性はあるが、測定法が不安定なため広く臨床応用されていない。さらに、現在、抗血小板療法は心筋梗塞・脳梗塞の有効な予防法として証明され、非常に多くの患者が抗血小板療法を受けている。抗血小板療法は同時に脳出血や消化管出血などの出血性副作用の頻度を増加させる。ワーファリンを用いた抗凝固療法では、その効果はプロトロンビン時間 (PT) をモニターすることによりモニターされ、適度な効果が得られ、過剰効果による出血性合併症を避けられるように容量が調節される。しかしながら、現在、抗血小板療法では、その効果を判定・モニターする適切な検査法がないので、十分な効果が得られているのか、あるいは、効きすぎて安全域を越えているのか、判断できない。平成15年度には、安定かつ信頼性の高い血小板活性化指標の測定法を開発した。平成16年度は本測定系を用い、健常ボランティア約50名が14日間アスピリンを服用し、前後での血小板凝集指標を測定し、5-10%の症例では、健常人で認められる程度にしか効果が現れなかった（論文執筆中）。最近、アスピリンの効果が減弱しており、そのような症例に心血管イベントが多発する傾向があることが明らかにされ、アスピリン抵抗性として注目されている。日本人にも上記の比率でアスピリン抵抗性症例が含まれている可能性がある。また、睡眠時無呼吸症候群は、心血管イベントの危険因子であるが、その原因は特定されていない。同疾患症例約60例で血小板凝集性を測定し、健常人に比べ、血小板凝集性が更新していることを見いだした（論文執筆中）。今後は、多くの症例、特に急性冠症候群や脳梗塞で本血小板指標を測定し、心血管イベントの予知因子となるかどうか検証する。さらに、抗血小板療法の効果モニター法として有用かどうか検証していく計画である。

血小板活性化の分子メカニズムは、不明な点が多い。それは、血小板に蛋白合成能がないために分子生物学をこの分野に用いることができなく、主として、薬理学的研究に留まっていたことが大きな理由である。本年度までに、形質膜透過型血小板を用いた極めて安定な顆粒放出アッセイ系、凝集アッセイ系を確立することができ、血小板活性化の分子機構を解析している。我々は、small GTPase Rab27がその標的分子Munc13-4を介して濃染顆粒放出を制御していること（JBC, 2004）を報告したが、本年度は、Munc13-4が原因と成って生じる遺伝性疾患、家族性血球貪食症候群（FHL3）は、perforinの遺伝子異常（nonsense mutation）で生じるFHL2より症状が軽いことを見いだした（Blood in press, 2005）。さらに本年度は、ShcAが血小板凝集を制御していること（BBRC, 2004）を証明した。

A. 研究目的

動脈硬化を基盤にして生じた動脈血栓により、心筋梗塞症や脳梗塞症等の心血管障害が発症し、高齢者の生命予後やQOLに深く関与する。動脈血栓形成の引き金は、血小板の活性化にあることが判明しているが、血小板活性化の評価法は、これまでのところ、臨床の場で広く使われているものはない。さらに、現在、抗血小板療法は心筋梗塞・

脳梗塞の有効な予防法として証明され、非常に多くの患者が抗血小板療法を受けている。抗血小板療法は同時に脳出血や消化管出血などの出血性副作用の頻度を増加させる。ワーファリンを用いた抗凝固療法では、その効果はプロトロンビン時間 (PT) をモニターすることによりモニターされ、適度な効果が得られ、過剰による出血性合併症を避けられるように容量が調節される。しかしながら、

現在、抗血小板療法では、その効果を判定・モニターする適切な検査法がないので、十分な効果が得られているのか、あるいは、効きすぎて安全域を越えているのか、判断できない。血小板活性化の指標としては、血小板特異的分子である β TG等の血清濃度が報告されてはいるが、測定値が非常に不安定なこともあり、これまでのところ広く臨床の場で用いられてはいない。そこで、われわれは、本研究では臨床の場で広く用いられるような血小板活性化の指標の確立・抗血小板療法の効果モニター法の開発を目的とした。

また、血小板には核がなく、分子生物学を応用することが困難であったことより、活性化の分子メカニズムの研究は困難であった。我々は下記の透過型血小板を用いた凝集および顆粒放出のアッセイ系を確立することができ、研究を続けている。本研究では、血小板活性化メカニズムの解明も目的とした。

B. 研究方法

1. 血小板活性化評価法の開発：平成15年度には、安定かつ信頼性の高い血小板活性化指標の測定法の開発することができた。それを用いて、現在、多くの症例で本血小板指標を測定し、予知因子となりうるか、また、抗血小板療法の効果判定法となりうるか、検証している。

2. 透過型血小板を用いた血小板活性化メカニズムの解析：Streptolysin O (SLO)は細胞膜に径約30nmの様な穴をあける。蛋白質などは自由にその穴を行き来できるが、細胞内顆粒を含め細胞内小器官は通過できない大きさである。SLOは孔を開けずに4℃で形質膜に結合できる。そのため、SLOを血小板に4℃で結合させ、血小板を洗浄することによって結合していないSLOを除いた後に、温度を上昇させることにより形質膜のみを透過型にできる。

(1) 顆粒放出解析系：顆粒放出反応については、放出された α 顆粒は von Willebrand 因子 (vWF) をウェスタンブロット法にて、放出された濃染顆粒はあらかじめ血小板に取り込ませた ^{3}H セロトニンのカウントを測定することにより解析している。顆粒放出反応の引き金は細胞内Caイオンの上昇であるが本アッセイでは透過型細胞を用いているため細胞内外のCaイオンが等しくなるので、顆粒放出刺激はCa塩としている。この系では、外部よりATPと細胞質を補充しなければいずれの放出も起きず、両顆粒の放出には、エネルギーと細胞質因子の存在が必須であることが示唆された。

(2) 凝集解析系：同様の、形質膜を透過型血小板を用い、従来よりの光透過度測定による凝集アッセイ系を確立しえた。外部より細胞質を加えないと刺激をしても凝集が起こらない(細胞質依存性)ので、細胞質中の必須分子の存在が示唆された。

C. 研究結果

平成15年度には、安定かつ信頼性の高い血小板活性化指標の測定法を開発しえた。平成16年度は本測定系を用い、健常ボランティア約50名が14日間アスピリンを服用し、前後での血小板凝集指標を測定し、5-10%の症例では、健常人で認められる程度にしか効果が現れなかった(論文執筆中)。最近、アスピリンの効果が減弱しており、そのような症例に心血管イベントが多発する傾向があることが明らかにされ、アスピリン抵抗性として注目されている。日本人にも上記の比率でアスピリン抵抗性症例が含まれている可能性がある。また、睡眠時無呼吸症候群は、心血管イベントの危険因子であるが、その原因は特定されていない。同疾患症例約60例で血小板凝集性を測定し、健常人に比べ、血小板凝集性が更新していることを見いだした(論文執筆中)。今後は、多くの症例、特に急性冠症候群や脳梗塞で本血小板指標を測定し、心血管イベントの予知因子となるかどうか検証する。さらに、抗血小板療法の効果モニター法として有用かどうか検証するべく、抗血小板療法効果判定指標確立のための前向き研究(APTEST Trial)を計画し、2005年4月より開始する予定である。

動脈硬化の最終段階は血栓形成による動脈の閉塞であるが、透過型血小板を用いた凝集(BBRC, 2001)・顆粒放出(JBC, 2000)解析系を確立し、血小板活性化の分子機構を解析している。本年度は、small GTPase Rab27がその標的タンパク質Munc13-4を介し、濃染顆粒放出を制御していること(JBC, 2004)を見いだした。我々は、small GTPase Rab27がその標的分子Munc13-4を介して濃染顆粒放出を制御していること(JBC, 2004)を報告したが、本年度は、Munc13-4が原因と成って生じる遺伝性疾患、家族性血球貪食症候群(FHL3)は、perforinの遺伝子異常(nonsense mutation)で生じるFHL2より症状が軽いことを見いだした(Blood in press, 2005)。さらに本年度は、ShcAが血小板凝集を制御していること(BBRC, 2004)を証明した。

D. 考察

血小板活性化指標としては、血小板特異的タンパク質である血清 β TG等が用いられているが、その値は採血法の影響を強く受けるため、広く臨床の場で用いられているとはいい難い。しかし、脳梗塞等では、血小板活性化との相関を示すデータが蓄積されつつある。本年度に我々が確立した血小板活性化の測定法では、採血の影響はほとんど受けない。そのため、上昇している患者において、心血管イベントの発症率が高いと、臨床の場で広く使われる予知因子となる可能性が高い。

アスピリンを中心とする抗血小板療法は、心血管イベントに対する予防効果が明らかにされ