

201015040A

厚生労働科学研究費補助金  
医療技術実用化総合研究事業

バイオマーカー可溶型 LR11 による病的  
未分化細胞疾患の新規診断と標的治療  
の開発

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武城英明

平成 23 (2011) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告

バイオマーカー可溶型 LR11 による病的未分化細胞疾患の新規診断と標的治療の開発

千葉大学大学院医学研究院

武城英明

-----1

II. 分担研究報告

1. 冠動脈疾患における睡眠時無呼吸障害による LR11 の増加

東邦大学医療センター佐倉病院内科

白井厚治

-----11

2. バイオマーカー可溶型 LR11 による病的未分化細胞疾患の新規診断と標的治療の開発

東邦大学医療センター佐倉病院内科

白井厚治

-----15

3. 冠動脈疾患におけるステント留置後再狭窄と LR11 の関連性の検討に関する研究

順天堂大学循環器内科

代田浩之

-----20

4. アルツハイマー病患者における髄液中可溶型 LR11 濃度の検討

順天堂大学医学部

三井田 孝

-----22

5. 造血器悪性腫瘍における新たなバイオマーカー可溶型 LR11

千葉大学大学院医学研究院細胞治療内科学

中世古知昭

-----23

6. バイオマーカー可溶型 LR11 による病的未分化神経細胞の新規診断と標的治療の開発に関する研究

新潟大学脳研究所

池内 健

-----28

7. 川崎病の血管障害診断と予後予測における血中可溶型 LR11 の有用性に関する研究

新潟大学大学院医歯学総合研究科小児科学分野

鈴木 博

-----30

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

-----35

IV. 研究成果の刊行物・別冊

-----39

# I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）  
総括研究報告書

バイオマーカー可溶型 LR11 による病的未分化細胞疾患の  
新規診断と標的治療の開発

研究代表者 武城 英明（千葉大学大学院医学研究院 教授）

本研究目的は、研究申請者が病的未（脱）分化細胞遺伝子として世界で初めてクローニングし動脈硬化の血中バイオマーカーとして産学連携で血中濃度測定系の樹立に至った病的未分化細胞や脱分化細胞に特異的に発現する可溶型受容体 LR11 を標的にした新規抗体療法を開発し、あわせて、血管病、血液疾患、神経疾患を対象疾患とする臨床試験計画のためのエビデンス構築を行い、世界初の未（脱）分化細胞マーカー診断に基づく病的未（脱）分化細胞疾患に対する新規治療法を提示することである。研究期間内に、

1. 動物、培養細胞を用い用量試験、代謝試験により抗 LR11 中和抗体を選択する。
2. 複数の施設で独立した後ろ向き、横断、前向き試験の血中 LR11 値を測定し（平成 22-24 年度）、病的未（脱）分化細胞疾患の診断ならびに治療指針案を作成する（平成 24 年度）。初年度に公表した主な研究成果を示す。1）急性白血病で血中 LR11 値が約 50 倍へ上昇し治療予後を規定する、2）冠動脈狭窄例は血中 LR11 値が 3 倍増大する、3）冠動脈疾患血管形成術後再狭窄と血中 LR11 値が関連する、4）アルツハイマー病発症と血中 LR11 値が関連する。

次年度以降計画において抗体療法開発基礎研究に関わる変更は無い。エビデンス構築臨床研究は LR11 測定環境を整えることができたこと、国内外から多数の検体測定申し込みがあることから、研究協力施設数を増加させ地域的偏在を無くした信頼性の高いエビデンス構築に重点的に取り組みたい。

武城 英明（千葉大学大学院医学研究院教授）、白井 厚治（東邦大学医療センター佐倉病院内科学講座教授）、代田浩之（順天堂大学循環器内科教授）、三井田 孝（順天堂大学医学部教授）、中世古知昭（千葉大学大学院医学研究院細胞治療学講師）、池内 健（新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター神経内科学助教） 鈴木 博（新潟大学大学院医歯学総合研究科小児科学分野助教）

A. 研究目的

本研究目的は、研究申請者が病的未（脱）分化細胞遺伝子として世界で初めてクローニングし動脈硬化の血中バイオマーカーとして産学連携で血中濃度測定系の樹立に至った病的未分化細胞や脱分化細胞に特異的に発現する可溶型受容体 LR11 を標的にした新規抗体療法を開発し、あわせて、血管病、血液疾患、神経疾患を対象疾患とする臨床試験計画のためのエビデンス構築を行い、世界初の未（脱）分化細胞マーカー診断に

基づく病的未（脱）分化細胞疾患に対する新規治療法を提示することである。

LR11 は LDL 受容体ファミリー遺伝子であり動脈硬化巣の未（脱）分化平滑筋細胞に発現する (*Circulation* 2002, *Circ Res* 2004, *J Clin Invest* 2008)。我々はこの血中（および髄液中）濃度測定 ELISA 系技術を開発し (*Clin Chem* 2009)、冠動脈疾患患者、アルツハイマー病患者は血中 LR11 濃度が 3 倍、血液疾患は 50 倍となることを発見した。LR11 遺伝子発見と同年に同一遺伝子 SorLA がオランダ研究者により発表され (*Jacobsen J Biol Chem* 1996)、共同研究により LR11 がアルツハイマー病の病因遺伝子であることを発表した (*Nature Genet* 2006)。一方、米国研究者は独自に髄液 LR11 がアルツハイマー病の予知マーカーとなることを示した (*Ann Neurol* 2009)。

このような背景から本研究は複数施設との協力体制のもとで実施し、対象疾患は血中 LR11 高値の冠動脈狭窄、白血病（リンパ腫）、アルツハイマー病（認知症）を予定する。血中および髄液中 LR11 値により評価した未分化細胞疾患の世界標準診断、治療指針となる我が国のエビデンスを提示する。

## B. 研究方法

本研究は標的治療に関する基礎研究と診断・治療指針のための臨床研究からなる。

### 【基礎研究】

1. LR11 高発現細胞のスクリーニングと LR11 中和作用に関わる用量反応試験
2. cDNA 直接免疫法による網羅的可溶性 LR11 抗体の調整と用量反応性試験

【臨床研究 血中および髄液中 LR11 値と病的未（脱）分化細胞に関わる臨床エビデンスの構築】

1. 冠動脈疾患 順天堂大学 150 症例
2. 川崎病 新潟大学 80 症例
3. 血管病 東邦大学佐倉病院 400 症例
4. 白血病・悪性リンパ腫 千葉大学 400 症例
5. アルツハイマー病 新潟大学、順天堂大学 150 症例
6. 糖尿病 ケンブリッジ大学病院糖尿病センター 400 症例
7. アルツハイマー病 エモリー大学 1,000 例
8. アルツハイマー病 ハーバード大学
9. アルツハイマー病 カリフォルニア大学

### （倫理面への配慮）

遺伝子解析実験は、千葉大学大学院医学研究院の規定、国で定められている組換え DNA 実験指針に従い、千葉大学で開催される各委員会で実験許可を受けて実施する。臨床研究は、ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則、「臨床研究に関する倫理指針」に基づく第一種使用規程を遵守し千葉大学で開催される各委員会で実験許可を受けて実施する。臨床研究の実施に先立ち、臨床研究に関する計画書などは、千葉大学医学部附属病院臨床研究審査委員会において審議を受け、分担研究者は、それぞれの施設で委員会の承認を得て実施する。患者の臨床研究への参加にあたっては、事前に本臨床研究に関する概要（目的、方法、利益と不利益、倫理的事項、個人情報保護など）について説明を十分に行い、本人の臨床研究への参加同意を取得する。

## C & D（研究結果と考察）

## 【基礎研究】

### 1. LR11 高発現細胞のスクリーニングと LR11 中和作用に関わる用量反応試験

臨床エビデンス構築で得られた成績から、LR11 分子は、培養平滑筋細胞、樹立神経細胞種細胞に加えて、白血病細胞に発現することが明らかになった。そこで、12種類の樹立白血病株における LR11mRNA、膜蛋白、放出蛋白量を解析したところ、細胞株でそれぞれ異なった発現量を示すとともに、LR11mRNA 量、膜蛋白量、放出蛋白量間で高い正の相関を示すことが明らかになった。このことは、放出 LR11 量が発現細胞の LR11 量を表すことを示唆する。さらに他の細胞株を解析した結果、LR11 を最も高発現する細胞は白血病細胞株であることが示された。この結果から、今後の用量反応試験スクリーニングとして、LR11 中和作用を白血病細胞株の機能調節作用を解析することが最も適当であると考えられた。

### 2. cDNA 直接免疫法による網羅的可溶性 LR11 抗体の調整と用量反応性試験

これまでに、3種類の中和作用を検討する抗体候補 M3、R12、A2-2-3 を得た。それぞれの特異性を検討したところ、M3、R12 は ELISA 系で可溶性 LR11 を特異的に検出し、A2-2-3 抗体は組織細胞染色で細胞発現 LR11 を検出することが明らかになった。さらに、cDNA 直接免疫法により 8種類の抗体候補を得たことからその特性検討を行う。一方で、直接免疫法に用いた抗原 cDNA の構造解析に成功したことから、直接免疫法に用いる cDNA の調整方法を含めて網羅的抗体調整を進める。

## 【臨床研究 血中および髄液中 LR11 値と病

の未（脱）分化細胞に関わる臨床エビデンスの構築】

### 1. 血管病

狭心症の疑いにて冠動脈造影をおこなった正常者と安定狭心症を含む 92例の症例に終夜睡眠呼吸検査を行い、睡眠時無呼吸症候群 (Sleep apnea syndrome : SAS) の重症度を含めて LR11 について分析を行った。その結果、LR11 は安定狭心症群 (n=37) において正常冠動脈群 (n=55) に比し有意な高値を示した ( $3.5 \pm 1.6$  (U) vs  $4.2 \pm 2.7$  (U) )。また、LR11 値は体格指数とは明らかな関連を認めなかったが ( $r = 0.14$   $p = 0.18$ )、SAS の重症度指数 (3% oxygen desaturation index (times/hour)) が高くなるとともに増加する傾向を示した、( $r = 0.21$   $p < 0.05$ )。一方、重症 SAS では、高血圧症 (74%)、脂質異常症 (68%) の存在が高頻度で認められた。

増殖糖尿病網膜症 Proliferative diabetic retinopathy (PDR) 29 症例、非増殖糖尿病網膜症 Non proliferative diabetic retinopathy (NPDR) 25 症例に血中における可溶性 LR11 の発現を検索し、PDR における寄与因子となるか、また可溶性 LR11 の発現に関連する患者因子を検討した。結果は両群において血糖値、HbA1c 値、脂質データに有意差は認めなかった。一方、可溶性 LR11 は NPDR で  $3.7 \pm 1.2$  (U)、PDR で  $5.8 \pm 1.3$  (U) で有意に PDR 症例に高値であった ( $P < 0.0001$ )。ROC 曲線を作成したところ可溶性 LR11 は PDR の有意な寄与因子として選択された。また症例全体で可溶性 LR11 の発現に寄与する因子を検討したところ、HbA1c 値、LDL コレステロール値と有意な相関を認め可溶性 LR11 の発現は、血糖コントロール及び脂質コントロールをも反映していることが示唆された。

内膜平滑筋は、川崎病において急性期血管炎から遠隔期の狭窄病変の進展に至るまで重要な役割を果たす。また内膜平滑筋は動脈硬化においても鍵となる。LR11は動脈硬化巣において内膜平滑筋に特異的に発現し、細胞外に放出される活性物質である。川崎病においてもLR11が病態を反映する可能性がある。川崎病における急性期、遠隔期の血管障害と血中可溶性LR11との関係を明らかにし、診断、治療マーカーとしての有用性を検討した。川崎病急性期患者17人において、大量γグロブリン静注療法（以下IVIG）前、IVIG後、回復期の静脈採血にて検体を採取した。IVIG不応群のIVIG前の可溶性LR11は有意に対照群、IVIG奏効群のそれより高値であった。IVIG不応群の可溶性LR11は奏効群よりいずれの時期も高値をとり有意な差を認めた。川崎病遠隔期患者49人において、心臓カテーテル検査時あるいは外来受診時に検体を採取した。冠動脈病変（以下CAL）（+）群の可溶性LR11は対照群、CAL（-）群の可溶性LR11より有意に高値であった。CAL（+）群の5人で上行大動脈、右房、冠静脈洞の3カ所で可溶性LR11を比較したが差がなかった。川崎病急性期にはIVIG不応例で可溶性LR11が治療前から高値を示し、IVIG不応の予測マーカーとなる可能性が示唆された。冠動脈病変が遠隔期に残存する例で可溶性LR11が高値であった。急性期の結果と合わせ、急性期に生じた内膜平滑筋が遠隔期にも残存し動脈硬化の進行に関与している可能性が支持された。可溶性LR11は川崎病の急性期から遠隔期までの血管障害を反映するバイオマーカーとなりうる。

安定型狭心症に対するステント留置後再狭窄とその主因である血管平滑筋増殖のバイオマーカーである血清LR11との関連を検討する

目的でステント留置を施行した冠動脈疾患患者を対象に血中可溶性LR11の変化を検討した。倫理委員会承認のもと、患者へのインフォームドコンセントを書面で得る。また被験者の人権擁護についてはヘルシンキ宣言に従い試験を実施した。2008年1月から2009年2月の間にステント留置術を施行した安定型狭心症患者連続209例を対象にステント留置前と留置後6～8か月後の血中可溶性LR11の値を比較した。ステント再狭窄は30例で認められ、再狭窄症例のLR11値は非再狭窄例に比し有意に低下していた。冠動脈ステント留置後の再狭窄は血管平滑筋細胞の増殖を主体とした新生内膜肥厚が機序である。動物実験でもマウス血管傷害モデルにおいても新生内膜増殖組織でのLR11の発現が増加することが報告されている。今回の結果はステント留置後の再狭窄例において慢性期の血中LR11が有意に低下していた。この結果は当初の仮説とは反対に再狭窄、すなわち内膜増殖群でLR11低値というものであるが、最も増殖能が活発なステント留置後2週間から1か月後のLR11は測定されていない。したがって今後は血中LR11の経時的変化や薬剤の影響などを検討する必要がある。安定型冠硬化患者に対するステント留置再狭窄と血管平滑筋細胞増殖のバイオマーカーであるLR11の関連性が示唆された。

## 2. 神経病

アルツハイマー型認知症（AD）の発症機序にLR11の関与が注目されている。AD患者髄液中の可溶性LR11を測定し、診断バイオマーカーとしての有用性を検討した。インフォームドコンセントを得た29名のAD患者および27名のコントロール被験者から髄液を腰椎穿刺により採取した。髄液中の可溶性LR11は、2種類の特異抗体を用いたサンドイッチELISA



を用い測定した。AD 患者に対しては *APOE* タイピングを行った。AD 患者の髄液中可溶性 LR11 値は、年齢をマッチさせたコントロールと比較して有意に上昇していた。AD 患者の *APOE* $\epsilon$ 4 保持者では非保持者と比較して、可溶性 LR11 は有意に高値を示した。AD 患者の脳脊髄液中では可溶性 LR11 がコントロールと比較して有意に上昇しており、可溶性 LR11 が AD 診断のバイオマーカーになることが示唆された。特に、*APOE* $\epsilon$ 4 保持者で可溶性 LR11 が上昇していた点は、*APOE* $\epsilon$ 4 が AD 発症の普遍的な危険因子であることを考えると興味深い。*APOE* は LR11 のリガンドとしての作用を有していることを考えると、*APOE* $\epsilon$ 4 が LR11 を介して AD 病態に関与している可溶性が考えられる。

可溶性 LR11 は全長型 LR11 から細胞外シェディングにより産生されるが、神経細胞における可溶性 LR11 の産生調節や代謝経路は明らかにされていない。全長型 LR11 は AD 病態に保護的に作用することが報告されていることから、神経細胞における LR11 の切断調節機構を AD 病態と関連づけて理解することが重要と思われる。今後は縦断的な脊髄液中可溶性 LR11 の解析や血液中可溶性 LR11 と AD との相関について検討していく必要がある。脳脊髄液中の可溶性 LR11 は AD の有用なバイオマーカーであり、可溶性 LR11 の変化は AD 病態と関連している可能性がある。

髄液中の可溶性 LR11 と ApoE との結合を検討した。医の倫理委員会の承認後、匿名化した検体情報のみを用いた。AD 患者の可溶性 LR11 の髄液濃度は、健常人に比し、約 40% 上昇していた。健常人では可溶性 LR11 濃度と年齢およびリン脂質濃度が正相関した。健常人髄液を用いた免疫沈降法では、可溶性 LR11 と ApoE

の結合能を認めた。可溶性 LR11 の髄液濃度の測定は、AD の新規診断法として、AD 患者の早期発見に有用である可能性がある。また、ApoE との結合能を示すことから、髄液中の主なりポ蛋白である ApoE に富む HDL との結合を介し、アミロイド  $\beta$  の排泄障害と組織蓄積に関与する可能性が考えられた。アルツハイマー病患者の髄液中可溶性 LR11 濃度は上昇する。また、髄液中の可溶性 LR11 は ApoE と結合し、アルツハイマー病の発症機序に可溶性 LR11 と髄液 HDL が重要な役割を担うことが示唆された。

### 3. 血液病

LR11 は動脈硬化において重要な役割を果たしていることが報告されているが、造血細胞における発現は不明であり、唯一 CD34+CD38- 未分化骨髄幹細胞で LR11 遺伝子の発現が高いことが報告されている。そこで末梢白血球における細胞表面 LR11 の発現をフローサイトメトリーで解析した所、単球に高い発現を認めた。さらに種々の未分化白血病細胞株で細胞表面、細胞内に高発現を認め、培養上清中に可溶性 LR11 (sLR11) が検出された。急性骨髄性白血病 (AML)、急性リンパ性白血病 (ALL) 患者の白血病細胞では細胞表面に LR11 の発現を認め、さらに免疫染色にて細胞内にも高発現が認められた。そこで各種造血器悪性腫瘍患者の診断時血清にて sLR11 値を測定した所、AML, ALL, 悪性リンパ腫で有意に高値となることが判明した (ALL,  $73.5 \pm 93.5$  ng/ml, AML,  $26.8 \pm 29.1$  ng/ml, 正常コントロール,  $9.2 \pm 3.3$  ng/ml, 両者とも  $P < 0.001$ )。慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、多発性骨髄腫では有意な上昇は見られなかった。AML, ALL の寛解時の血清では全て sLR11 は正常域に低下した。AML 症例において、sLR11 高値群 ( $\geq 20$  ng/ml) と低値群 (<

20ng/ml)では有意に低値群が完全寛解率が高く、5年全生存率も有意に高値であった(36.8% vs 63.7%, P = 0.04)。以上から、LR11は急性白血病細胞で高発現し、血清 sLR11は新たな白血病バイオマーカーとして働くことが示された。

#### E. 結論

初年度研究で成果を得て公表した主な研究成果を示す。

- 1) 急性白血病で血中 LR11 値が約 50 倍へ上昇し治療予後を規定する。
- 2) 冠動脈狭窄例は血中 LR11 値が 3 倍増大する。
- 3) 冠動脈疾患血管形成術後再狭窄と血中 LR11 値が関連する。
- 4) アルツハイマー病発症と血中 LR11 値が関連する。
- 5) 白血病細胞樹立株が LR11 高発現細胞である。
- 6) 3 種類の特異的抗体に加え直接免疫法により複数の候補抗体を獲得した。
- 7) 直接免疫抗原の最適化のための LR11 部分高次構造が明らかになった。

今年度の研究成果から、血管病、悪性血液疾患、認知症の医療において世界的に期待されている新規バイオマーカーの可能性が確実となり、とりわけ、未(脱)分化細胞特異的分子 LR11 のアルツハイマー病と血管病医療における診断マーカーとしての有用性、血液疾患における治療マーカーとしての意義が明らかになった。これらの臨床エビデンスから明らかになった本分子の病態形成における役割から、これを標的とする臨床応用により、心筋梗塞、白血病、悪性

リンパ腫、認知症の難治性疾患に新たな治療法の開発できる可能性が提示された。

本研究により未分化細胞疾患という新たな細胞診断に基づく特異的治療法をオリジナル開発研究として提示することで、異なった病態で捉えられてきた血管病、悪性血液疾患、認知症の医療に共通の疾患概念を提示することになる。このことにより新規標的療法の開発を促し、従来の医薬品を未分化細胞の修復というスケールから再評価することが可能である。

初年度研究は研究計画にそって進行した。次年度以降の抗体療法開発基礎研究に関わる変更は無い。今年度、臨床研究のための千葉大学で測定技術体制を確立した。エビデンス構築臨床研究は、すでに千葉大学で LR11 測定環境を整えることができたこと、国内外から検体測定に関わる多数の共同研究の申し込みがあることから、国内外研究協力施設を見直して一部変更および追加し、対象数を増やし信頼性の高いエビデンス構築に取り組む予定である。これにともない本研究の解析予定検体を下記のように設定する。

1. 血管病 順天堂大学 600 症例
2. 小児、川崎病 新潟大学 500 症例
3. 血管病 東邦大学佐倉病院 400 症例
4. 白血病 千葉大学 400 症例
5. アルツハイマー病 新潟大学、順天堂大学 800 症例。
6. 糖尿病 ケンブリッジ大学病院 400 症例 倫理委員会審査中
7. アルツハイマー病試験 エモリー大学 1,000 例 倫理委員会審査中
8. アルツハイマー病試験 ハーバード大学 1,000 症例 千葉大学測定中
9. アルツハイマー病 ミュンヘン工科

大学 400 症例 千葉大学測定中

## 10. 追加施設

金沢大学 (血管病)、日本医科大学 (血管病)、アムステルダム大学 (血管病)、ホーチミンシティ医科大学 (血管病)、ウィーン大学 (白血病)

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ikeuchi T, Hirayama S, Miida T, Fukamachi I, Tokutake T, Ebinuma H, Takubo K, Kaneko H, Kasuga K, Kakita A, Takahashi H, Bujo H, Saito Y, Nishizawa M. Increased levels of soluble LR11 in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2010;30:28-32.
- 2) Takahashi M, Bujo H, Jiang M, Noike H, Saito Y, Shirai K. Enhanced circulating soluble LR11 in patients with coronary organic stenosis. *Atherosclerosis.* 2010;210:581-584.
- 3) Nakata, Z., Nagae, M., Yasui, N., Bujo, H., Nogi, T. and Takagi, J. (2010) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of human LR11 Vps10p domain. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 67:129-32.
- 4) Aoyagi Y, Asada S, Kuroda M, Bujo H, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Ishii I, Aso M, Saito Y. Fibrin glue increases the cell survival and the transduced gene product secretion of the ceiling culture-derived adipocytes transplanted in mice. 2011; in press.
- 5) Kuroda M, Aoyagi Y, Asada S, Bujo H, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Ishii I, Machida

K, Matsumoto F, Satoh K, Aso M, Saito Y. Ceiling culture-derived proliferative adipocytes are a possible delivery vehicle in enzyme replacement therapy in lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. *The Open Gene Ther. J.* 2011; in press.

- 6) Asada S, Kuroda M, Aoyagi Y, Bujo H, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Ishii I, Aso M, Saito Y. Disturbed apolipoprotein A-I-containing lipoproteins in fish-eye disease are improved by the lecithin:cholesterol acyltransferase produced by gene-transduced adipocytes in vitro. *Mol Genet Metab.* 2011;102:229-231
- 7) Unoki-Kubota H, Yamagishi S, Takeuchi M, Bujo H, Saito Y. Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation end product (AGE) formation ameliorates insulin resistance in obese, type 2 diabetic mice. *Protein Pept Lett.* 2010;17:1177-1181.

### 2. 学会発表等

- 1) 武城英明 (2010) 血管合併症の発症と病態形成 -平滑筋細胞の病的変化から探る-. 日本糖尿病学会第 44 回糖尿病学の進歩 シンポジウム.
- 2) Bujo, H. (2010) The LDL Receptor Family Member LR11 - from Lipoprotein Metabolism to Vascular Biology And Possibly a Circulating Atherosclerosis Marker -. The 74<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation. Topic symposium.
- 3) Bujo, H. (2010) LR11, a novel biomarker for cardiovascular diseases. Amsterdam University Academic Medical Center (AMC) Vascular Medicine Symposium. Special lecture.
- 4) Ogita, M., Miyauchi, K., Dohi, T., Miyazaki, T., Nakajima, N., Yokoyama, T.,

Kojima, T., Yokoyama, K., Kurata, T., Bujo, H. and Daida, H. Impact of Soluble LR11 on Target Lesion Revascularization After Coronary Intervention in Patients with Stable Coronary Artery Disease. American Heart Association Scientific Sessions 2010.

5) 渡辺健一、鈴木博、沼野藤人、長谷川聡、内山聖、武城英明. 川崎病遠隔期における血管障害の新たなバイオマーカー可溶性 LR11. 第46回日本小児循環器学会. 2010. 7. 9

6) 池内健他. アルツハイマー病患者・髄液中では可溶性LR11が増加する 第29回日本認知症学会. 2010. 11. 名古屋

7) ワークショップ1・アルツハイマー病と可溶性LR11. 第50回日本臨床化学会年次学術集会, 臨床化学第39巻:71-72, 2010

アルツハイマー病患者・髄液中では可溶性LR11が増加する. 第29回日本認知症学会学術集会, Dementia Japan 第4巻3号: 311, 2010

8) Naomi Shimizu, Chiaki Nakaseko, Masahiro Takeuchi, et al. Soluble LR11, an inhibitor of SDF-1-mediated attachment of HL-60 cells, is a potential circulating marker indicating the G-CSF-induced mobilization of hematopoietic stem cells. Cancer Stem Cell Symposia, Keystone, 2011.

9) Masahiro Takeuchi, Chikako Ohwada, Shio Sakai, et al. LR11 is a novel surface marker for normal leukocytes and leukemia cells. The 52th American Society of Hematology, Publication only, Orlando, 2010

10) Chikako Ohwada, Masahiro Takeuchi, Shio Sakai, et al. Prognostic Impact of a Novel Biomarker, Serum Soluble LR11 on Acute Leukemias. The 52th American Society

of Hematology, Poster session, Orlando, 2010

11) Chiaki Nakaseko, Shio Sakai, Masahiro Takeuchi, et al. Identification of a soluble molecule expressed in leukemic blasts as a novel biomarker for the treatment of acute leukemias. Japanese Society of Hematology International Symposium, Akita, 2010

12) Shio Sakai, Chiaki Nakaseko, Masahiro Takeuchi, et al. Soluble LR11 is a novel biomarker for acute leukemias. Oral session, The 72th Japanese Society of Hematology, Yokohama, 2010

13) Masahiro Takeuchi, Chiaki Nakaseko, Chikako Ohwada, et al. LR11 is a novel surface marker for normal leukocytes and leukemia cells. English oral session, The 72th Japanese Society of Hematology, Yokohama, 2010

14) Chikako Ohwada, Chiaki Nakaseko, Shio Sakai, et al. Prognostic impact of serum soluble LR11 on acute leukemias. English oral session, The 72th Japanese Society of Hematology, Yokohama, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

#### 1. 特許

新規な動脈硬化性疾患マーカー 出願番号

PCT/JP2008/001527 2008. 6. 13、国際公開番号

WO2008/155891 2008. 12. 24 未審査請求

出願人 積水メディカル 発明者 松尾正直、

海老沼宏幸、深町 勇、武城英明、齋藤 康

可溶性LR11の定量方法 出願番号

PCT/JP2009/001176 2009. 3. 17 国際公開番

号 W02009/116268 2009. 9. 24 登録 (日本): 特許第 4 4 5 9 2 9 9 号 2010. 2. 19 出願人 積水メディカル 発明者 松尾正直、海老沼宏幸、深町 勇、武城英明、齋藤 康  
悪性腫瘍の診断方法 出願番号 (国内優先) 特願 2009-285492、未公開、未審査請求 出願人 積水メディカル 発明者 松尾正直、海老沼宏幸、深町 勇、中世古知昭、武城英明、齋藤 康  
悪性腫瘍細胞の検出方法 出願番号 特願 2010-161037、未公開、未審査請求 出願人 積水メディカル 発明者 海老沼宏幸、深町 勇、中世古知昭 武城英明

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

## Ⅱ. 分担研究報告

## 冠動脈疾患における睡眠時無呼吸障害による LR11 の増加

### —LR11 発現に作用する諸因子—

分担研究者： 白井厚治

東邦大学医療センター佐倉病院、内科

研究協力者： 高橋真生

東邦大学医療センター佐倉病院、内科

#### 研究要旨

LR11 については、冠動脈疾患、および頸動脈肥厚群で高値を示すことが報告されている。その報告は、心・血管疾患発症者において LR11 は臨床的に有用なバイオマーカーであることを示すとするものであり、その予防という点からも LR11 発現に対する要因検索は必要である。高 LR11 の原因としては、脂質異常症、糖尿病の病態を反映することが最近の臨床、基礎実験から得られているが、睡眠時無呼吸障害との因果関係は明らかにされていない。

今回、我々は狭心症の疑いにて冠動脈造影をおこなった正常者と安定狭心症を含む 92 例の症例に終夜睡眠呼吸検査を行い、睡眠時無呼吸症候群（Sleep apnea syndrome : SAS）の重症度を含めて LR11 について分析を行った。その結果、LR11 は安定狭心症群 (n=37) において正常冠動脈群 (n=55) に比し有意な高値を示した ( $3.5 \pm 1.6$  (U) vs  $4.2 \pm 2.7$  (U) )。また、LR11 値は体格指数とは明らかな関連を認めなかったが ( $r = 0.14$   $p = 0.18$ )、SAS の重症度指数 (3% oxygen desaturation index (times/hour)) が高くなるとともに増加する傾向を示した、( $r = 0.21$   $p < 0.05$ )。一方、重症 SAS では、高血圧症 (74%)、脂質異常症 (68%) の存在が高頻度で認められた。このことより、SAS が高 LR11 を惹起し、心血管疾患発症に関連している可能性が示唆され、その詳細について今後更なる検討が必要と思われた。

#### A. 研究目的

睡眠時無呼吸症候群 (Sleep apnea syndrome : SAS) は、肥満者に合併しやすく、昼間の眠気による生産効率の低下、交通事故、災害の原因として社会的に注目されている。この SAS は、心血管疾患における有病率が驚くほど高いことや、心血管疾患の予後不良因子であることが明らかになった。そして、SAS で、心不全や脳梗塞が発症するメカニズムが、徐々に解明されつつある。SAS では、繰り返す呼吸停止と、過換気により、低酸素と再酸素化が惹起され、同時におこる交感神経の興奮、虚血再還流の病態を介した酸化ストレスの発生、凝固異常の出現等による血管傷害が、心血管病の発症に関与していることが判明している。

LDL 受容体ファミリー LR11 はアポ E をリガンドとし、

正常の血管壁では発現していないが、動脈硬化巣の内膜平滑筋細胞に特異的に発現する。動脈硬化巣の肥厚内膜の構成要素にはさまざまな細胞が存在することに加えて、脂質の蓄積細胞外マトリックスなどが加わる。これらを制御する細胞として平滑筋細胞があげられる。動脈硬化の進展とともに、内皮細胞、マクロファージなどの浸潤細胞から刺激を受け内膜に遊走、増殖する。その過程で、平滑筋細胞の遺伝子発現は変化し、中膜平滑筋細胞で認められた筋細胞としての機能（収縮型）を喪失し、新たな機能（合成型）を獲得する。動脈硬化形成における平滑筋細胞の機能変化は一樣ではなく、内膜に存在する平滑筋細胞は多様な機能を有し、この多様性が動脈硬化巣の進展に影響する。

LR11 遺伝子を発生工学的により欠損させると、カブ

傷害後の内膜肥厚は劇的に抑制される。LR11遺伝子欠損細胞は、PDGF-BBやAngiotension-11による細胞骨格の再構築能接着能が減弱し、遊走能が減弱する。このように、血管傷害後の中膜平滑筋細胞の内膜への遊走にLR11遺伝子発現が重要な役割を果たす。最近、冠動脈疾患患者で血中可溶型LR11濃度が高値であることが明らかになり、LR11は、冠動脈疾患発症にたいする血管平滑筋マーカーとしての有用性が報告された。しかし、その予防という点からもLR11発現に対する要因検索は必要である。

今回、狭心症の疑いにて冠動脈造影をおこなった正常者と安定狭心症を含む92症例について終夜睡眠呼吸検査を同時に行い、SASのLR11への関与を明らかにする目的で検討を行った。

## B. 研究方法

**対象者：**当院で狭心症の疑いにて冠動脈造影をおこなった正常者と安定狭心症を含む92症例（年齢は44～75歳。男性70例、女性22例、平均年齢64.7±12.4歳。）（表1）を用いた。

なお除外例は、急性心筋梗塞、慢性心不全（EF<50%）、慢性腎不全（Cr 2.0mg/dl）とした。

**方法：**

### 睡眠呼吸検査の検査法

Fuji respironics 社製 STARDUST II を用い、睡眠中のSpO<sub>2</sub>、胸郭運動、鼻腔の気流モニターを終夜にわたり記録した。評価項目として、一時間あたりのSpO<sub>2</sub> 3%以上の低下の回数を3% oxygen desaturation index (3% ODI times/hour) として測定して睡眠呼吸障害の重症度として用いた。

### 血中可溶型LR11の測定

血清50μLをRAP (39kDa Receptor Associated Protein) アフィニティカラム精製後、抗LR11単クローン抗体により免疫学的に蛋白同定し検出蛋白を標準血清(1IU)と比較し定量化した。

## C. 研究結果

### 1) 冠動脈造影所見における血中可溶型LR11と体格指数

### および睡眠時無呼吸障害の患者背景

正常冠動脈群に比し、安定狭心症群のLR11値は、有意な高値を示した。(3.5±1.6 vs 4.2±2.7 p<0.05.) 一方、冠動脈疾患における体格指数および睡眠呼吸障害の比較を行ったところ、体格指数において(Body Mass Index: BMI)正常冠動脈群に比し、安定狭心症群で高値を示したが、統計学的有意差は認めなかった。また、睡眠呼吸障害の重症度においては、両群間に差を認めなかった。(図1、2)

### 体格指数と睡眠呼吸障害との関連と血中可溶型LR11との関連

睡眠呼吸障害の重症度と体格指数との間に有意な正の相関が認められた(r=0.39 p<0.001)。また、可溶型LR11と体格指数と相関を認めなかったが(r=0.14 p=0.18)睡眠呼吸障害の重症度においては有意な正の相関を認めた(r=0.21 p<0.05)。

## D. 考察

近年問題とされているメタボリックシンドロームは、肥満(特に内臓肥満)がもとで、高血圧、脂質異常症、糖尿病を合併する病態で、これらは、脂肪細胞の肥大化に伴い種々サイトカインの分泌亢進と、酵素の合成低下などで引き起こされ、インスリン抵抗性の獲得があり、それらは相まって動脈硬化、心血管系疾患の重要なリスクになりうるとされている。LR11について、以前に、我々が行った検討においても、他施設の検討においても、LR11はインスリン抵抗性の病態を反映していた。今回の検討結果では、SASの重症度とLR11値は正の相関を認めていた。しかし、内臓脂肪蓄積とSASの重症度との相関が報告されており、この病態がLR11の増加と睡眠時無呼吸障害との関連を修飾した可能性は否定できない。この関係については、SAS患者に対し持続気道陽圧療法(continuous positive airway pressure: CPAP)の治療を行い、SAS自体がLR11発現を促進させている可能性を今後検討する必要がある。また、インスリン抵抗性との関わりでは、指標であるHOMA-IRとSASの重症度とはBMIと独立して



相関することが報告されている。したがって、SAS自体がインスリン抵抗性をもたらし、その病態の中で、LR11が発現している可能性も考えられる。さらに血圧に対する影響についてみると、SASは夜間血圧低下をみとめない血圧変動型(Non-dipper type)を高率にみとめるとの報告がありおそらく、夜間の覚醒およびカテコールアミン分泌亢進が原因となり、高血圧をもたらしている可能性が考えられる。これらのことより、SASはメタボリックシンドロームの一症状だけではなく、メタボリックシンドロームを直接増悪させている可能性が示唆されており、LR11発現に対しては、日内変動や血中マーカーとの関連を詳細に検討する必要がある。さらに、重症SASは心血管疾患の罹患率が高く、それらの疾患による死亡率も有意に高いことが報告されている。このような、動脈硬化の促進に、SAS自体が直接関与している可能性も指摘される。その機序として、夜間無呼吸時の二酸化炭素の貯留に伴う血管拡張と、その後の脳波上の覚醒を伴う過換気による二酸化炭素の低下による血管収縮、同時に起こる無呼吸時の低酸素血症と過換気における低酸素血症からの回復を頻回に繰り返すことにより、再還流障害によって酸化反応亢進などを介して臓器障害をもたらしている可能性も考えられる。これらの病態による、LR11の発現に対し、今後さらに検討する必要がある。

## ● 治療

SASに対する治療には①減量、② CPAP、③手術療法、④ 口腔内装置が試みられている。

### 1 減量

肥満の治療は、低エネルギー食と運動であり、高度肥満においては低エネルギー療法、場合により超低エネルギー療法(600 kca/日)を行うこともある。それは、蛋白(動物性)とビタミン、ミネラル、繊維を十分量とり、エネルギー成分の糖、脂質を極力減らしたものであり、通常フォーミュラー食を用いる。また一部フォーミュラー食を用いる方法もある。減量とともに、明らかにSASは改善を示す。

### 2 持続気道陽圧療法

わが国では1998年よりSASに対するCPAP治療は保険適応となった。CPAP治療のメリットとして、臨床症状に

ついては日中の眠気の消失、生産効率の上昇、いびきの消失、朝の頭痛の改善、夜間頻尿の改善、EDの改善等の報告がある。また、高血圧に対する改善効果も報告されている。SAS患者を10年間観察した結果、重症SASの心血管疾患の罹患率、それらの疾患による死亡率は有意に高く、CPAP治療により有意に改善することが報告されている。CPAPの治療継続についての問題点は次の2点である。まず装置自体の問題点として、圧迫感、空気のリーク、作動音、冬季には寒冷増悪などがある。これらが睡眠環境に悪影響を与え、夜間の覚醒を惹起する。次に患者背景の要因としては、鼻疾患を有する患者、臨床症状がほとんどない患者、高齢者において継続率が低くコンプライアンスの点では問題が残る。現在、われわれの施設では、循環器疾患に対するOSAHSのさまざまな悪影響を考慮し重症例にはCPAP導入を行っているが、日中の臨床症状をもたない患者が多くコンプライアンスはきわめて低い状況である。

### 3 手術療法

以前は、気管切開術が行われていたが、現在は他の方法で改善が見込めない重症SAS患者にのみ適応とされる。現在の外科的治療は、閉塞部位の正確な診断とその所見に対し治療方法の選択がなされるようになりつつあり、耳鼻咽喉科を中心に適応を絞ったSAS治療への取り組みが試みられている。

### 4 口腔内装置

顎顔面の形態的相違がOSAHSの発症にかかわっているとされており、下顎を前突させる口腔内装置の使用によりOSAHSの臨床症状と検査所見の改善が報告されている。CPAPが許容できないOSAHS患者や比較的軽症例に用いられている。

## ● まとめ

SASは、内臓脂肪蓄積、高血圧、耐糖能障害、脂質代謝異常を合併する頻度が高く、全身的疾患として病態関与の可能性を考慮しなければならない。SASの最も非侵襲的かつ、効率的な治療法は生活習慣に対する介入を中心にした適切な指導下での減量であることは疑う余地はないが、診療、加療については治療効果を把握可能な、患者の治療コンプライアンスを高める診断マーカー確立の必要性があり、LR11とSASとの因果関

係については今後さらなる詳細な検討が必要である。

### E. 結論

以上の結果より、冠動脈狭窄症例におけるLR11発現要因についてSASについて検討したところ、SASは、LR11発現に対する要因の1つと考えられた。その因果の解明には、SASの治療とLR11に関する、心血管系疾患の予後などについて、更なる検討が必要と思われた。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

準備中

### H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

図1 冠動脈疾患における血清可溶性LR11値

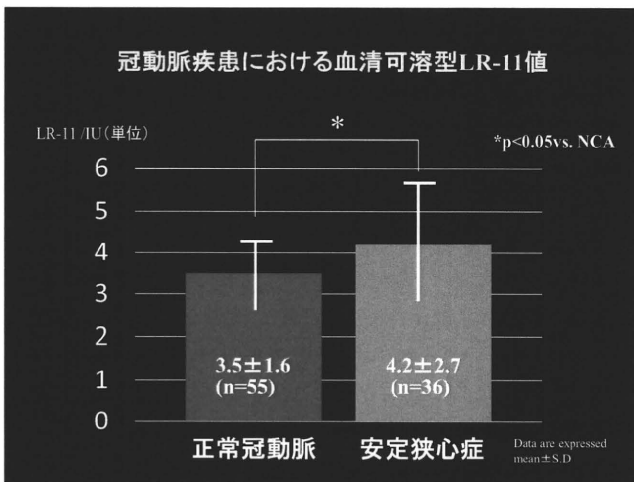


図2 冠動脈疾患における体格指数及び睡眠呼吸障害の比較

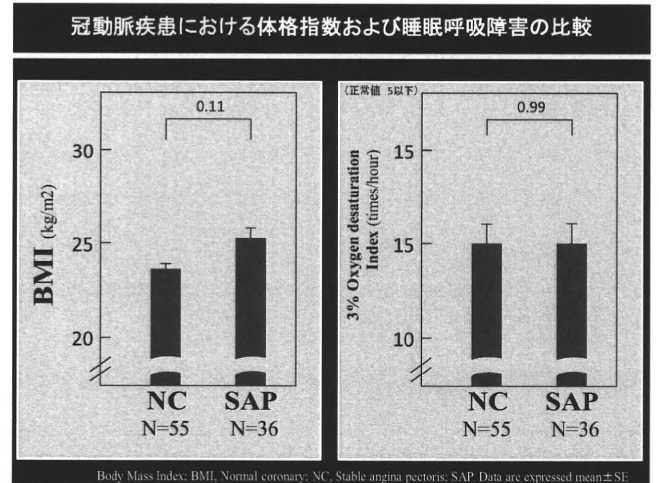


図3 睡眠呼吸障害と体格指数との関連

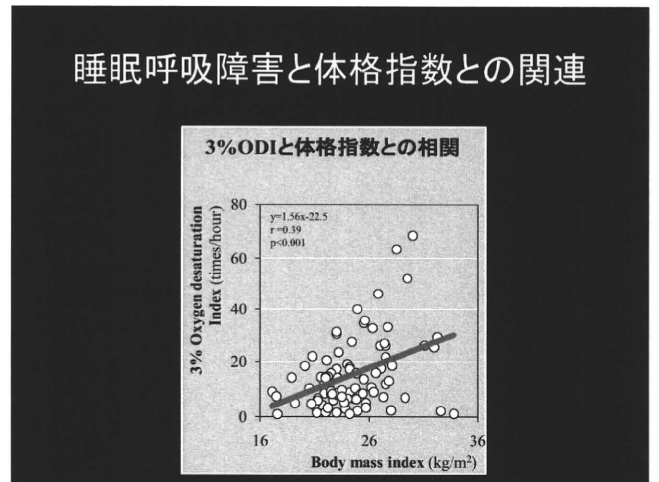
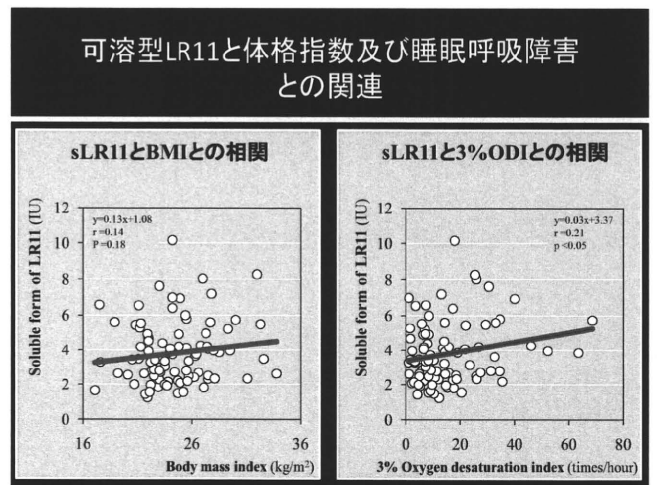


図4 可溶性LR11と体格指数及び睡眠呼吸障害との関連



厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）  
分担研究報告書

バイオマーカー可溶性 LR11 による病的未分化細胞疾患の新規診断と標的治療の開発

分担研究者： 白井 厚治 東邦大学医療センター佐倉病院、内科  
研究協力者： 柴 友明 同 眼科講座  
高橋 真生 同 内科

### 研究要旨

現在、日本において糖尿病網膜症は中途失明原因第二位となっており、今後さらに増加していくであろうとされている。糖尿病網膜症発症、進展の危険因子としてエビデンスが確立しているものには血糖コントロールがあげられている。しかしながら、血糖コントロールがされていても実際の臨床において網膜症が進行する症例に遭遇する。故に血糖値の指標となる HbA1c の他に糖尿病網膜症進展のバイオマーカーの検索が必要であると考えられる。今回我々は、増殖糖尿病網膜症 Proliferative diabetic retinopathy (PDR) 29 症例、非増殖糖尿病網膜症 Non proliferative diabetic retinopathy (NPDR) 25 症例に血中における可溶性 LR11 の発現を検索し、PDR における寄与因子となるか、また可溶性 LR11 の発現に関連する患者因子を検討した。結果は両群において血糖値、HbA1c 値、脂質データに有意差は認めなかった。一方、可溶性 LR11 は NPDR で  $3.7 \pm 1.2$  (U)、PDR で  $5.8 \pm 1.3$  (U) で有意に PDR 症例に高値であった ( $P < 0.0001$ )。ROC 曲線を作成したところ可溶性 LR11 は PDR の有意な寄与因子として選択された。また症例全体で可溶性 LR11 の発現に寄与する因子を検討したところ、HbA1c 値、LDL コレステロール値と有意な相関を認め可溶性 LR11 の発現は、血糖コントロール及び脂質コントロールをも反映していることが示唆された。今後はより詳細に検討するため眼内（硝子体、網膜上増殖組織）での可溶性 LR11 の発現を調査する必要があると思われた。

### A. 研究目的

現在、日本において糖尿病網膜症は中途失明原因第二位となっており年間 3000~4000 人が失明している。そして現在日本では約 1100 万人の糖尿病患者及び 170 万人の網膜症患者が存在するといわれており今後さらに増加していくであろうとされている。糖尿病網膜症発症、進展の危険因子としてエビデンスが確立しているものには血糖コントロールがあげられる。しかしながら実際の臨床において、血糖コントロールの指標である HbA1c がコントロールされている症例においても糖尿病網膜症が進行していることに遭遇する。また、網膜症発症、進展の病態は動脈硬化の病態と類似していることが種々の研究により報告されている。

一方、LR11 は LDL 受容体ファミリーとして内膜平滑筋細胞に特異的に発現する遺伝子として同定され、細胞外へ放出される活性物質である。また可溶性であり、

血中で存在することから、内膜平滑筋細胞のバイオマーカーとして動脈硬化疾患における新しい指標として注目されている。同研究協力者である、高橋、白井らは冠動脈疾患症例において血中可溶性 LR11 が高値であることを報告した。

今回我々は、糖尿病網膜症症例 54 症例で血中可溶性 LR11 を測定し、網膜症重症度での検討を行った。

### B. 研究方法

#### 対象者：

当科では、糖尿病網膜症発症、進展の危険因子として睡眠呼吸障害に注目し研究を行ってきた。今回の対象は眼科手術目的で入院した糖尿病網膜症を有する 2 型糖尿病症例のうち、睡眠呼吸障害にて循環器センターを受診した 54 症例である。内訳は糖尿病網膜症最重症例である増殖糖尿病網膜症 Proliferative diabetic retinopathy (PDR) 29 例（男性 20 例、女性 9 例 平

均年齢 62.4±9.7 歳)、網膜血管新生を伴わない非増殖糖尿病網膜症 Non proliferative diabetic retinopathy (NPDR) 25 例 (男性 17 例、女性 8 例 平均年齢 66.0±8.6 歳) である。

#### 方法：

PDR 群、NPDR 群で患者背景因子として (年齢、性別、推定 GFR 値、肥満指数 Body mass index BMI、高血圧の合併、インシュリン治療の有無)、薬剤治療歴としてスタチン、ACE 阻害薬、ARB の内服の有無、血液生化学的検査として (血中可溶性 LR11 (U)、HbA1c 値、空腹時血糖、総コレステロール値、トリグリセライド、HDL コレステロール値、LDL コレステロール値) を両群で統計学的に比較した。また本検討の有用性を検討するため両群で有意差、または傾向を認めた項目で ROC 曲線を作成し、感度、特異度を算出した。最後に全症例で、可溶性 LR11 の発現に関連する因子を単回帰分析にて検討した。

### C. 研究結果

#### 1) PDR、NPDR 群における患者背景因子、治療歴

男女比、年齢、推定 GFR、高血圧の合併、スタチン、ACE 阻害薬、ARB の治療歴共に両群間に有意差を認めなかった。インシュリン治療は PDR 群で有意に頻度が高く (PDR 65.5%、NPDR 13.6%  $P<0.0001$ )、BMI は高値である傾向にあった (PDR  $25.8\pm 3.7$ 、NPDR  $23.8\pm 4.0$   $P=0.06$ )。 (表 1)

#### 2) PDR、NPDR 群における血液、生化学的検査

血中可溶性 LR11 は PDR 群で  $5.8\pm 1.3$  (U)、NPDR 群で  $3.7\pm 1.2$  (U) で有意に PDR 群に高値であった ( $P<0.0001$ )。HbA1c 値 (PDR  $7.0\pm 1.4$ 、NPDR  $6.5\pm 0.8$   $P=0.1$ )、総コレステロール (PDR  $202.6\pm 40.7$ 、NPDR  $183.8\pm 34.8$   $P=0.12$ ) で PDR 群に高値である傾向を認めた。トリグリセライド、HDL コレステロール、LDL コレステロールは両群間に差がなかった。 (表 2)

#### 3) ROC 曲線 (Receiver Operatorating Characteristic curve)

本研究における PDR に対する可溶性 LR11 の感度、特異度を検討するため ROC 曲線を作成した。(図 1) 可溶性 LR11 の PDR に対する感度は 78%、特異度 77%、でカットオフ値は 4.2 (U) であった。

#### 4) 可溶性 LR11 発現に関連する因子の検討

可溶性 LR11 の発現に関連する因子として HbA1c 値 (Pearsons correlation coefficient 0.32、 $P<0.01$ )、LDL コレステロール (Pearsons correlation coefficient 0.31、 $P<0.05$ ) (表 3)

### D. 考察

可溶性 LR11 とアルツハイマー病、心血管疾患との関連は報告されているが、眼科領域における線維血管増殖性疾患との関連は現在報告されていない。そこで今回我々は糖尿病網膜症と可溶性 LR11 の関連を検討した。Preliminary な結果であるが、糖尿病網膜症の最重症例である PDR において血中可溶性 LR11 は有意に高値に発現しており、ROC 曲線における検討でも PDR と有意な相関を認めた。糖尿病網膜症の病態が動脈硬化の病態と類似していることから、血中可溶性 LR11 は大血管における動脈硬化の指標であると共に、毛細血管レベルにおける血管障害の指標となり得る可能性が推測された。また可溶性 LR11 の発現に関する因子を検討したところ、HbA1c 値、LDL コレステロール値と有意な相関を認めた。Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes (FIELD) study では、フィブラート製剤投与により網膜光凝固術のイベントが 31% と有意に抑制できたと報告されており、糖尿病網膜症進展には脂質コントロールも関与していると考えられる。以上より血中可溶性 LR11 は糖尿病網膜症例では、血糖コントロール、脂質コントロールをも反映しており、あらたな糖尿病網膜症発症、進展のバイオマーカーになり得る可能性が示唆された。しかしながら本検討は症例が少数であり、今後より多数例での検討が必要である。また今後は可溶性 LR11 の眼局所での発現を検討し、可溶性 LR11 が糖尿病網膜症に対し直接的に作用しているか、また代替指標であるのかを見極めていく必要がある。