

E. 結論

以上の結果より、PDR 症例は、NPDR 症例より血中可溶性 LR11 が高く発現していることが示唆された。また糖尿病網膜症症例において HbA1c 値、LDL コレステロール値を反映していた。

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

表 1

Patient Background Factors in the Non-proliferative Diabetic Retinopathy and Proliferative Diabetic Retinopathy Groups			
	NPDR group	PDR group	p value
n	25	29	
Male (%)	68.2	69	0.95
Age (yrs)	66.0±8.6	62.4±9.7	0.15
eGFR (mL/minute/1.73m ²)	60.2±15.3	58.2±28.0	0.72
Body mass index (kg/m ²)	23.8±4.0	25.8±3.7	0.06
Hypertension (%)	63.6	58.6	0.72
Insulin therapy (%)	13.6	65.5	< 0.0001
(Medications)			
Administration of statin (%)	45.5	24.1	0.11
Administration of ACE-I or ARB (%)	54.5	41.4	0.13

Values are presented as mean standard deviation. *Unpaired t test.*

表 2

Results of Serum Profiling Evaluation in the Non-proliferative Diabetic Retinopathy and Proliferative Diabetic Retinopathy Groups			
	NPDR group	PDR group	p value
n	25	29	
sLRH (U)	3.7±1.2	5.8±1.3	< 0.0001
HbA1c (%)	6.5±0.8	7.0±1.4	0.10
Fasting Blood sugar (mg/dl)	124.6±33.1	132.1±38.2	0.63
Total cholesterol (mg/dl)	183.8±34.8	202.6±40.7	0.12
Triglyceride (mg/dl)	122.4±43.1	122.7±52.7	0.93
HDL-cholesterol (mg/dl)	47.7±16.4	49.4±10.6	0.58
LDL-cholesterol(mg/dl)	111.7±30.6	124.1±33.3	0.26

Values are presented as mean standard deviation. *Unpaired t test.*

表 3

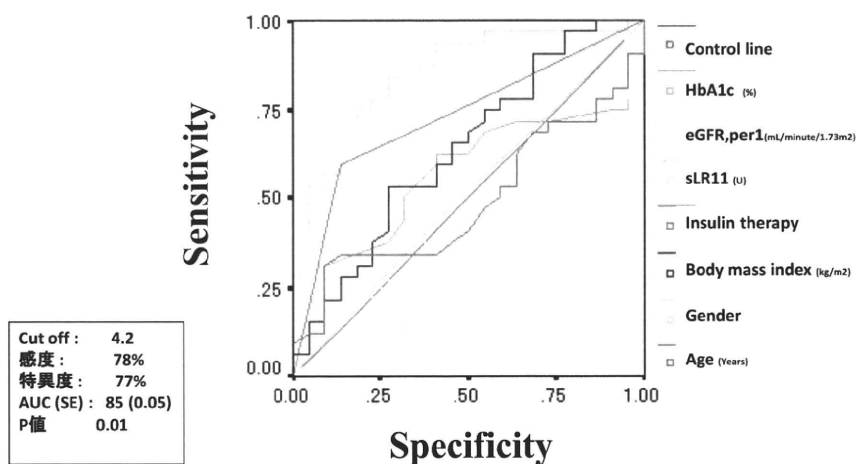
Correlation of Soluble Form of LR11 with Various Factors in all Subjects.

	Pearsons correlation coefficient	p values
Age	-0.07	0.63
male	0.15	0.29
Body mass index (kg/m2)	0.21	0.14
HbA1c (%)	0.32	<0.01
Fasting Blood sugar (mg/dl)	0.19	0.17
eGFR (mL/minute/1.73m2)	-0.19	0.17
Total cholesterol (mg/dl)	0.27	0.05
HDL-cholesterol (mg/dl)	-0.10	0.51
Triglyceride(mg/dl)	0.25	0.07
LDL-cholesterol(mg/dl)	0.31	<0.05

LR11発現要因の検討

図 1

The ROC area defined by sLR11 is the greatest among these 7 parameters.



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

研究分担者 代田浩之 順天堂大学循環器内科教授

研究要旨

冠硬化患者へのステント留置術後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値に関連性が認められた。

A. 研究目的

安定型狭心症に対するステント留置術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こと。

B. 研究方法

当院にて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の変化を検討する。

（倫理面への配慮）

当院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书面で得る。また被験者の人権擁護についてはヘルシキ宣言に従い試験を実施した。

C. 研究結果

2008年1月から2009年2月の間に当院で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。

D. 考察

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。

E. 結論

安定型冠硬化患者に対するステント留置術後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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
未発表
2. 学会発表
米国心臓病学会2010発表
冠動脈疾患血管形成術後再狭窄と血中LR11値が関連する

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

3. その他

なし

アルツハイマー病患者における髄液中可溶性LR11濃度の検討

研究分担者 三井田 孝 順天堂大学医学部教授

研究要旨

可溶性受容体LR11のアルツハイマー病における髄液濃度の測定意義およびその調節機序を検討した。アルツハイマー患者の髄液可溶性LR11濃度は高く、ApoEとの結合能を認めた。

A. 研究目的

LR11 遺伝子多型はアルツハイマー病（AD）の発症リスクと関連する。可溶性受容体 LR11 の髄液濃度を測定し、調節機序を解明することで、AD の新規診断法の確立を目指すことを目的とする。

B. 研究方法

AD 患者および健常人の髄液を研究分担施設（新潟大学）で採取した。可溶性 LR11 濃度を測定し、臨床背景および髄液脂質組成との関連を解析した。また、髄液中の可溶性 LR11 と ApoE との結合を検討した。

（倫理面への配慮）

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。

C. 研究結果

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。

D. 考察

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βの排泄障害と組織蓄積に関与する可能性が考えられた。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Increased levels of soluble LR11 in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. Dement Geriatr Cogn Disord Vol. 30 No. 1: 28-32, 2010

2. 学会発表

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

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

分担研究者： 中世古知昭

千葉大学大学院医学研究院 細胞治療内科学

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。そこで我々は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、培養上清中に可溶型 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 ± 93.5 ng/ml, AML, 26.8 ± 29.1 ng/ml, 正常コントロール, 9.2 ± 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 (≥ 20 ng/ml) と低値群 (< 20 ng/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。

A. 研究目的

近年、大量化学療法と同種造血幹細胞移植の導入により急性白血病の予後は著しく改善を認めている。しかしながら初回寛解導入不全や治療後再発の症例での治療成績はいまだ低く、これが長期生存率の低下に大きく影響しており、長期生存率を向上させるにはこれらの予後不良症例を早期に抽出し適切な治療戦略を立てる必要がある。そのためには診断時における有効な予後予測因子と微小残存病変マーカーの確立が必須であるが、これまで知られているもののなかで、簡便で感度がよく疾患特異的なマーカーはごく限られている。

LR11 は LDL 受容体ファミリーに属し、動脈硬化巢の未(脱)分化平滑筋細胞に特異的に発現する。可溶型受容体 LR11 (sLR11) は細胞膜ウロキナーゼ受容体 (uPAR) と結合し、細胞接着・遊走を亢進させ、LR11-/-マウスでは血管傷害後の内膜肥厚が著しく抑制される。我々は ELISA による血中および髄液中 sLR11 濃度測定技術の開発に成功し、冠動脈疾患、アルツハイマー病患者において血中

sLR11 が有意に高いことを明らかにした。さらに多国間共同研究により LR11 がゲノム疫学的にアルツハイマー病の病因遺伝子であることを明らかとした。

一方、LR11 はヒト骨髄 CD34+CD38-未分化造血幹細胞に高発現する遺伝子であることが2000年に報告されている。しかし造血細胞における LR11 の発現や造血器悪性腫瘍におけるその発現は明かではない。LR11 と結合する uPAR (CD87) は造血細胞に発現することが示されており、血清可溶型 uPAR は幹細胞の動員因子として働くこと、さらに白血病細胞でも発現することが示され、高発現例では組織浸潤性が増すことが報告されている。そこで我々は血液細胞における LR11 の発現、造血器腫瘍における発現を解析し、さらに血清 sLR11 の造血悪性腫瘍におけるバイオマーカーの意義について解析することを本研究の目的とした。

B. 研究方法 抗体及び細胞株

LR11 に対するモノクローナル抗体として, A2-2-3, M3, R14 を用い, M3 はフローサイトメトリーと ELISA, A2-2-3 はウェスタンブロッティングと免疫染色, R14 は ELISA 法に用いた. 白血病細胞株として, Daudi, MOLT-4, TALL-1, CCRF-SB, HL-60, ML-2, NB-4, RPMI, THP1, U937, K562 を ATCC から購入して使用した. 神経芽細胞腫である IMR32 をコントロールとして使用した.

対象患者

1999 年から 2010 年に千葉大学医学部附属病院及び関連施設において治療した造血器悪性腫瘍患者 139 人を対象とした. 内訳は AML 43 例, ALL 23 例などである. 本研究は千葉大学医学部及び関連施設の倫理委員会にて承認を得, 全ての患者から文書による研究の同意を得た. 急性白血病に対する治療は多くの場合日本成人白血病共同研究グループ (JALSG) の治療プロトコルに従って治療が行われた. 臨床情報をもとに統計学的解析を行った.

フローサイトメトリー

フローサイトメトリー解析は JSAN (Bay Bioscience) セルソーターにて行い, FlowJo ソフトウェア (Tree Star) にて解析した. LR11 の解析には FITC ラベルしあ抗 LR11 抗体 M3 を用い, さらに CD4, CD8, CD14, CD19, CD34, CD38, CD11b 抗体 (Becton Dickinson) を用いて解析を行った.

ELISA 法による sLR11 の測定

sLR11 は Matsuo らが開発した sandwich ELISA 法にて行った. 10・1 のサンプルをサンプルバッファーで希釈し, M3 抗体で捕捉させ, ビオチン化した R14 抗体にて測定した. 標準曲線は純化した LR11 タンパクを用いて作成した.

RT-PCR

全 RNA は RNeasy kit (Qiagen) を用いて抽出し, RT-PCR を行った. LR11 mRNA の定量は, STBR Green PCR master mix と LR11 mRNA に対する PCR プライマー (Hs00300475_s1, Applied Biosystems) を用いてリアルタイム PCR にて行った. mRNA 量は 18S ribosomal mRNA (Hs99999901_s1) を内部コントロールとして標準化した.

統計学的解析

患者と正常コントロールにおける血清 sLR11 の比較は Dunnett' s test によって行った. 診断時と寛解時の血清 sLR11 の比較は Wilcoxon' s signed-rank test によって行った. 診断時の血清 sLR11 値による層別化による完全寛解率の比較は Fisher' s exact test によって評価した. 全生存率に対する sLR11 の影響の解析は Kaplan-Meier 法と log-rank test によって行った. 統計学的解析は JMP (version 7.0.2, SAS Institute Inc.) と SAS (version 9.2, SAS Institute Inc.) ソフトウェアを使用した.

C. 研究結果

末梢血白血球, 白血病細胞における LR11 の発現

末梢血白血球表面における LR11 の発現をフローサイトメトリーで解析した所, CD14+ 単球で高発現を認めた. リンパ球 (T 細胞, B 細胞, NK 細胞), 顆粒球では細胞表面の発現を認めなかった. 白血病細胞株では, HL-60 (急性前骨髄球性), CCRF-SB (急性リンパ芽球性), U937 (急性単球性) 等で高発現を認めたが, K562 (慢性骨髄性急性転化) での発現は弱かった. さらにこれら白血病細胞株ペレット標本の免疫染色を行った所, LR11 は細胞表面に加え, 細胞質内に顆粒状に陽性に染色されることが判明した. 12 種類の白血病細胞株では LR11 mRNA 量と細胞内タンパク量は正の相関を示した. さらに細胞培養液中の sLR11 は ELISA にて測定可能であり, mRNA 量, 細胞内タンパク量と正の相関を示した.

患者急性白血病細胞における LR11 の発現

次に, 急性白血病患者の白血病細胞表面の LR11 の発現をフローサイトメトリーにて解析した. AML では 9 例中 9 例, ALL では 3 例中 2 例に LR11 の発現を認めた. FAB 分類 M0 症例の CD34+ 芽球は LR11 陽性であるが, CD38- 分画が有意であった. CD11b 陽性 AML M4 の症例では LR11 の発現レベルは非常に高かった. 以上から, LR11 は AML, ALL とともに細胞表面, 細胞質に特異的に発現する新たな分子であることが明らかとなった.

造血器悪性腫瘍患者診断時血清における sLR11

次に、造血器悪性腫瘍における血清中の sLR11 値を ELISA 法にて測定した。様々な造血器悪性腫瘍患者 139 名の初診時血清を用いた。急性白血病症例における sLR11 値は正常コントロールと比較して有意に高く [ALL, 73.5 ± 93.5 ng/ml (range, 5.7-407.0), $P < .0001$; AML, 26.8 ± 29.1 ng/ml (range, 5.0-157.5), $P < .0001$, 正常コントロール 9.2 ± 3.3 ng/ml]。慢性骨髄性白血病 (CML; 17.9 ± 11.1 ng/ml), 慢性リンパ性白血病 (CLL; 12.7 ± 11.6 ng/ml), 多発性骨髄腫 (10.5 ± 4.8 ng/ml), POEMS 症候群 (9.0 ± 2.7 ng/ml) では有意差は認めなかった。ALL では他の疾患に比べ、有意に sLR11 は高値であった。

AML と ALL においては、完全寛解が得られた症例では、全例血清 sLR11 は有意に 20ng/ml 以下まで低下した (図 1)。これらの所見は血清 sLR11 値が何らかの疾患の病態や活動性に関与していることを示唆する。AML, ALL において sLR11 値に影響を与える因子としては、末梢血中の芽球割合が独立した因子として抽出された。43 例の AML 患者では、末梢血芽球割合に応じて 3 分位に分けた所、最も高値である群 (>67.5% of WBC) では、2.44 倍と 3.05 倍それぞれ中位 (23.0-64.0% of WBC) と低値群 (<20.0% of WBC) と比較して有意に高値であった (図 2)。

急性白血病における寛解率と予後に対する sLR11 のバイオマーカーとしての役割

AML 症例において、診断時の血清 sLR11 値が寛解率や予後にどのように影響を及ぼすか解析した。評価可能 AML 41 例のうち、完全寛解は 33 例に得られ、寛解率は 80.5% であった。診断時血清 sLR11 を 20 ng/mL 以上と 20 ng/mL 未満の 2 群にわけて解析すると、低値群の 21 人のうち、20 人に完全寛解が得られ、寛解率は 95.2% であったのに対し、高値群では 65% であり、有意に低値群で寛解率が不良であった ($P=0.020$)。AML における 5 年の全生存率は診断時の sLR11 ≥ 20 ng/ml の高値群で有意に低値であった [36.8% vs 63.7% , $P=.04$; hazard ratio (HR): 2.74; 95% confidence interval (CI): 1.04-8.01] (図 3)。ALL は統計学的解析には症例数が少なく不十分であった。

D 考察

本研究において、末梢白血球では単球に LR11 が高発現していること、多くの白血病細胞株において細胞内、細胞表面に LR11 が発現し、培養液中に sLR11 が検出され、それらは正の相関がみられることを明らかにした。さらに臨床検体において、AML, ALL の芽球においても細胞表面、細胞内に LR11 が高発現することを明かとし、AML においては、M4 に特に発現が高いこと、また CD34+CD38-細胞群に陽性率が高いことを明らかにした。これらの知見は急性白血病において新たな診断的有用性を与えるものである。

初診時急性白血病患者の血清で sLR11 が有意に高値であり、寛解が得られた症例では速やかに正常域まで低下することは、sLR11 が治療効果に関連する腫瘍マーカー (バイオマーカー) としても有用であることを示唆している。sLR11 は uPAR/CD11b 複合体と結合すると考えられるが、この 3 者の結合により FAK/ERK/Rac1 カスケードを介して細胞の運動能が亢進することは平滑筋細胞における知見から示唆され、実際単球系細胞株を用いた検討では、sLR11 により遊走能が亢進する。この点において、Tjwa らは uPAR (CD87) トランスジェニックマウスを用い、細胞膜上の uPAR が造血幹細胞の増殖、生着、遊走に重要な役割を果たしていることを報告している。また、可溶性 uPAR は造血幹細胞の骨髄への生着や骨髄からの遊走に関わっているということも報告されている。以上から、sLR11 も造血幹細胞や白血病細胞の遊走、生着などに関与している可能性があり、急性白血病において末梢血芽球割合と sLR11 値が相関していることはその可能性を指示するものである。

LR11 の細胞表面発現と遊離のメカニズムは未だ不明である。血管平滑筋細胞においては、sLR11 は uPAR とインテグリン $\alpha_v\beta_3$ の細胞表面における会合を促進する働きを示されており、白血病細胞においても sLR11 は uPAR と会合し、細胞特異的なインテグリンとも会合して細胞運動性を制御している可能性が考えられる。

造血器悪性腫瘍においては、AML, ALL において有意に診断時 sLR11 が高値であり、末梢血細胞数が非常に多い CML や CLL では有意な上昇はみられなかった。また多発性骨髄腫でも全く上昇無く、血清 VEGF が著明高値であり、全身の血管新生が亢進する POEMS 症候群でも有意な上昇

がなかったことは、非常に興味深い。

AMLにおいては、診断時の血清 sLR11 高値症例では寛解率が有意に悪く、5年生存率も有意に不良であった。特筆すべきは、sLR11 値 20 ng/ml 未満の症例の寛解率が96%と極めて高値であったことであり、予後にも大きく影響する因子であることである。sLR11 低値群で寛解が得られた症例はその後の再発も少ないが、寛解後の死亡例の多くは同種移植後の合併症死亡例を含んでおり、それらの症例で果たして同種移植が必要であったかどうか疑問が残る。急性白血病患者においては現在核型異常等が主な予後因子として認知されているが、今後診断時の血清 sLR11 も予後因子として重要となってくるであろう。現在急性白血病患者における sLR11 の予後における意義を前向きに検討する多施設共同研究を開始している。

E 結論

本研究では、LR11 は末梢血単球のみならず急性白血病患者細胞で高発現し、血清中の sLR11 は急性白血病患者で有意に高値となり、AMLにおいて寛解率、生存率に影響を及ぼす重要なバイオマーカーであることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 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.
2. 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
3. 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
4. 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

5. 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

6. 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

7. 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

G. 論文発表

投稿準備中

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

図表

図1 急性白血病における血清 sLR11

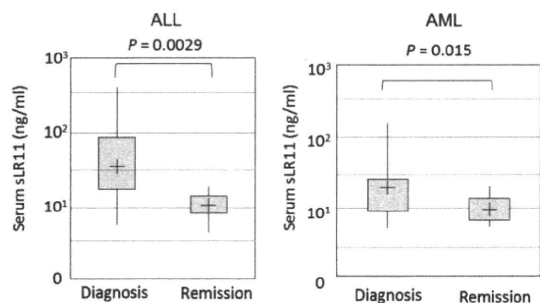


図2 AMLにおける末梢血芽球割合と sLR11

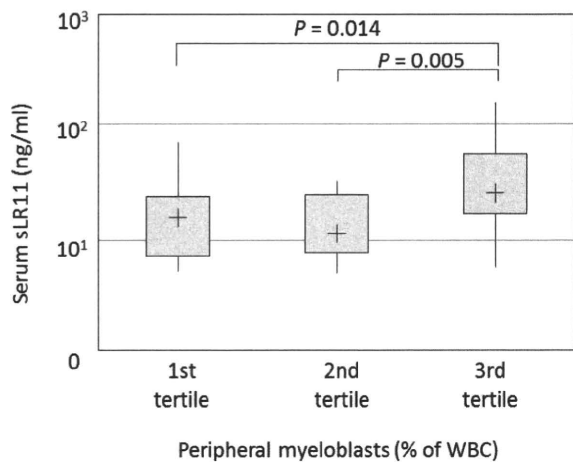
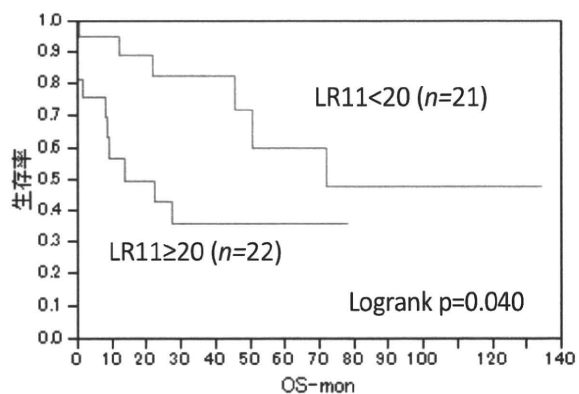


図3 AMLにおける全生存率



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による病的未分化神経細胞の新規診断と標的治療の開発に関する研究

研究分担者 池内 健 新潟大学脳研究所

研究趣旨

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。本研究では、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。AD 患者髄液中では、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、AD の有用なバイオマーカーとなる可能性が示された。

A. 研究目的

アルツハイマー型認知症（AD）は認知症の最大の原因疾患であるが、標準化された診断バイオマーカーは存在しない。ADの発症機序にLR11の関与が注目されている。本研究では、髄液中の可溶性LR11を測定し、その診断バイオマーカーとしての有用性を明らかにする。

B. 研究方法

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。

（倫理面への配慮）

本研究は新潟大学および千葉大学医学部倫理委員会の承認を得た上で行った。

C. 研究結果

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APOEε4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。

D. 考察

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

4保持者で可溶性LR11が上昇していた点は、APOEε4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、APOE4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。

E. 結論

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

F. 健康危険情報：該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表：①Ikeuchi T, et al. Dementia Geriatr Cogn Disord 30:28-32, 2010. ②池内健. The Lipid 21: 52-57, 2010

2. 学会発表：池内健他. 第29回日本認知症学会. 2010.

11. 名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況：該当なし

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

研究分担者 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
研究協力者 渡辺健一 新潟大学大学院医歯学総合研究科 小児科学分野 医員

研究要旨

【目的】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。我々の研究の目的は、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することである。【結果】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 は有意に对照群、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 は对照群、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。【結論】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。

A. 研究目的

川崎病は 1 歳前後の乳幼児に好発し、全経過が約 1 か月で陳旧化する全身性急性血管炎である。1967 年に初めて報告されてから 40 年以上が経過し、20 万人以上の川崎病既往者が存在する。そのうち約半数が成人期に達し年々増加しており、遠隔期の血管障害が問題となってきている。冠動脈の血管障害は川崎病遠隔期の予後を最も左右する。急性期に形成された冠動脈瘤は、血栓形成や狭窄病変へ進展し、若年発症の心筋梗塞や心臓突然死の原因となることも報告されている。また成人期に達する川崎病既往者が増加するに伴い、川崎病が全身血管の動脈硬化の危険因子になるかが大きな問題となっている。CAL 症例では遠隔期において、血清高感度 CRP が高値であることや正常部位にも血管内皮機能障害あることが報告され、CAL 症例の全身血

管の動脈硬化の進展が示唆されている。さらに CAL の有無に関わらず末梢動脈で血管内皮機能障害があることが報告され、従来予後良好とされてきた CAL のない症例でも、川崎病既往が全身血管の動脈硬化の危険因子となる可能性が危惧されている。しかし川崎病遠隔期での血管障害進展の機序解明やリスクの層化は十分になされていない。

川崎病急性期の問題点として難治性川崎病に対する治療法がある。IVIG が広く行われるようになり CAL は減少した。しかし IVIG の不応例が存在し、それらの CAL 発症の頻度が著しく高くなることが問題となっている。そこで IVIG 不応例や冠動脈後遺症例を治療前に予測し、より強力な初期治療をする有用性が検討されている。

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し、細胞外に放

出され可溶型となる。動脈硬化の成因においてこの脱分化した内膜平滑筋が重要な役割を果たしていることが知られている。近年、血中可溶型 LR11 高値例は動脈硬化リスクが高いことが明らかにされた。川崎病でも急性期血管炎で内膜に遊走した内膜平滑筋が遠隔期にも残存することが知られ、血中可溶型 LR11 が川崎病の病勢を反映する可能性が考えられる。

我々の研究の目的は、川崎病の急性期、遠隔期の血管障害と血中可溶型 LR11 との関係性を明らかにし、診断、治療マーカーとしての有用性を検討することである。川崎病急性期における血中可溶型 LR11 の動態と CAL 発症との関連を調査し、急性期バイオマーカーとしての有用性を検討すること、また、川崎病遠隔期において、冠動脈の形態的・機能的障害、動脈硬化性病変の進展と血中可溶型 LR11 との関連を調査し、予後予測あるいは治療マーカーとしての意義について検討することである。

B. 研究方法

1) 川崎病急性期

川崎病急性期患者 17 人を対象とした。厚生労働省川崎病研究班作成改定第 5 版に従い、3~7 病日に川崎病と診断した。全例診断日から初期治療として IVIG 療法 (2g/kg1 日、または 1g/kg2 日) とアスピリン内服 (30~50mg/kg) を行った。IVIG 療法後速やかに解熱したものを IVIG 奏効群 (12 人)、IVIG 療法後 24~48 時間後も発熱が続くものを IVIG 不応群 (5 人) とした。IVIG 不応に対する治療として、IVIG 追加投与、ステロイドパルス療法、ウリナスタチン療法を行った。CAL の有無については、心エコーで評価を行った。CAL の定義は、旧厚生省の診断基準から、5 歳以下で 3mm 以上、5 歳を超えると 4mm 以上あるいは近接の冠動脈の 1.5 倍以上の拡大性病変とした。川崎病診断時 (IVIG 前)、14 病日前後 (IVIG 後)、30 病日前後 (回復期) で通常の静脈採血時に、可溶型 LR11 測定のための検体も採取した。

2) 川崎病遠隔期

川崎病遠隔期患者 49 人を対象とした。心エコーや

心臓カテーテル検査による冠動脈評価から次の 3 群に分類した。急性期から冠動脈の異常を認めないもの (急性期に拡大を認めたが回復期までに正常化した一過性拡大を含む) : CAL (-) 群 (13 人)、後遺症として CAL を発症したがその後消失したもの : 退縮群 (7 人)、瘤、狭窄、閉塞等の病変が残存するもの : CAL (+) 群 (29 人)。主に CAL (-) 群は定期の外来受診時に静脈採血を行い検体を採取した。退縮群および CAL (+) 群は、心臓カテーテル検査入院時に通常の静脈採血時、あるいは心臓カテーテル検査時にシースまたはカテーテルから検体を採取した。CAL (+) 群のうち 5 人で上行大動脈、右房、冠静脈洞の 3 カ所から検体を採取し、可溶型 LR11 の採取部位別の差異を検討した。学校心臓病検診で不整脈疑いのため当院を受診し、精査に異常なく、川崎病既往もなかったものを対象群 (5 人) とした。

(倫理的側面への配慮)

本研究の目的、内容につき、別紙資料を用いて両親などの代諾者に平易に説明し、別紙文章で同意を得た。また、年齢に応じ可能な限り患者本人にも理解し了承を得た。対象者が 16 歳以上の場合には、代諾者とともに、被験者からの同意も得ることとした。

C. 研究結果

1) 川崎病急性期

可溶型 LR11 は全体では、IVIG 前 ($10.9 \pm 1.2 \text{ ng/ml}$) は対照群 ($7.7 \pm 2.3 \text{ ng/ml}$) と差がなかったが、IVIG 後 ($18.4 \pm 2.0 \text{ ng/ml}$, $p < 0.05$) 有意に上昇し、回復期 ($15.9 \pm 1.2 \text{ ng/ml}$) にも高値が持続した (図 1)。奏効群では、IVIG 後 / 回復期 ($14.5 \pm 9.2 / 14.3 \pm 5.8 \text{ ng/ml}$) とともに対照群より有意に高値であった ($p < 0.05$)。不応群の IVIG 前 ($15.7 \pm 8.0 \text{ ng/ml}$) は有意に対照群、奏効群より高値であった ($p < 0.05$) (図 2)。また不応群は、奏効群よりいずれの時期においても高値をとり有意な差を認めた (repeated ANOVA, $p < 0.05$)。冠動脈瘤形成例では、回復期 ($19.3 \pm 1.2 \text{ ng/ml}$) において奏効群より高い傾向があった ($p = 0.06$)。

2) 川崎病遠隔期

CAL(+)群の可溶型 LR11 ($10.0 \pm 2.8 \text{ ng/ml}$) は対照群 ($6.7 \pm 1.2 \text{ ng/ml}$)、CAL(-)群 ($7.7 \pm 1.7 \text{ ng/ml}$) より有意に高値であった (図 3)。CAL(+)群のうち 5 人で上行大動脈 ($10.3 \pm 2.0 \text{ ng/ml}$)、右房 ($10.4 \pm 2.0 \text{ ng/ml}$)、冠静脈洞 ($10.9 \pm 2.0 \text{ ng/ml}$) の 3 カ所で可溶型 LR11 を比較したが差を認めなかった。

D. 考察

急性期の血管炎は、6 病日頃に内・外膜から始まり、内・外弾性板を越えて中膜に達し、10 病日頃に汎血管炎に至る。12 病日頃には炎症により内弾性板や中膜平滑筋といった動脈壁の既存構築が破壊され動脈瘤が形成される。血管炎においては様々な炎症性サイトカインの関与があり、中膜平滑筋が内膜に遊走し内膜肥厚を生じる。今回の検討では、IVIG 前の血管炎の強くない発症早期には可溶型 LR11 の上昇は軽度であり対照と差がなかったが、血管炎が最も強くなる 10 病日過ぎ (IVIG 後) には有意に上昇した。よって川崎病急性期の可溶型 LR11 の変動は血管炎を反映するものと考えられた。IVIG 奏効例では、通常治療後速やかに解熱し、白血球数、CRP といった検査値も数日以内に正常化する。しかし、急性期に上昇した可溶型 LR11 は回復期早期にも高値が持続しており、臨床所見は改善しても少なくとも回復期早期には血管炎は持続している可能性が示唆された。さらに、IVIG 不応や CAL 発症といった重症例は、発症早期から回復期早期に至るまで可溶型 LR11 がより高値であり、非常に強い血管炎が存在することが示唆された。

川崎病急性期治療の目標は炎症を早期に終息させ CAL 発症を防ぐことである。IVIG 療法が広く行われるようになり、無治療では約 25%発症するとされる CAL が、近年は 5~8%にまで減少した。しかし、初回 IVIG 療法に反応しない不応例が約 15%存在し、不応例は CAL の発症頻度が著しく高くなることが問題となっている。そこで、IVIG 不応例を治療前に予測し、より強力な初期治療をする有用性が検討されている。今回のわれわれの検討では、IVIG 不応例は IVIG 前の可溶型 LR11 が

奏効群より有意に高値であり、可溶型 LR11 が川崎病急性期における IVIG 不応の予測マーカーとなる可能性が示唆された。

後遺症として残存した瘤の多くは 1~2 年以内に縮小傾向を示す。冠動脈造影で瘤が消失し造影所見が正常化した場合は、“退縮”と呼ばれ、頻度は 32~50%とされる。病理学的には、平滑筋の内膜への遊走と増殖と考えられている。CAL には、瘤のほか狭窄、閉塞病変などが含まれる。なかでも巨大瘤の場合は局所性狭窄に進展する可能性が高い。通常は瘤の流入部と流出部に局所性狭窄が生じるが、これはこの部位に遠隔期においても各種増殖因子の発現があり、活発な内膜平滑筋増殖による内膜肥厚が進行していることが示されている。今回の検討では、CAL を有する症例では CAL がない症例より有意に可溶型 LR11 が高値であった。これは急性期の結果と合わせると、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危険因子となることを支持するものと考えられた。しかし CAL を有する症例の可溶型 LR11 はばらつきが大きく、どのような症例が高値を示すのか現時点では明らかでない。LR11 が CAL における内膜平滑筋の活動度を表しているとするれば、狭窄進行の予知マーカーとなる可能性がある。またアンジオテンシン II-1 型受容体拮抗薬は LR11 の発現を抑制する薬物の一つであるが、CAL を有する症例に対する狭窄病変阻止効果があるとの報告があり、可溶型 LR11 が治療マーカーとなる可能性もある。これらの点は症例を増やし、今後検討すべき課題である。また CAL を有する症例の可溶型 LR11 高値は、採血部位による差異を認めなかったことから、必ずしも冠動脈のみの血管障害を表すものではなく、全身の血管障害が残存する可能性が示唆された。

E. 結論

可溶型 LR11 は、川崎病急性期において IVIG 不応あるいは CAL 発症の予測バイオマーカーとなりうる。遠隔期に CAL を有するような重症例では、可溶型 LR11 が高値となるが、これは全身の血管障害の存在を示唆し、動脈硬化の危険因子となる可能性がある。可溶型 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。

G. 研究発表

学会発表

1) 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

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
武城英明	内臓脂肪蓄積の病態と代謝異常発症メカニズム	門脇 孝	糖尿病ナビゲーター	メディカルレビュー社	東京	2010	186-187
武城英明	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	糖尿病学の進歩第44集	診断と治療社	東京	2010	306-309
武城英明	脂質異常症	中谷晴昭, 大橋京一 越前宏俊	臨床薬理学	朝倉書店	東京	2010	189-197
平山 哲, 三井田孝	小腸コレステロールトランスポーター阻害薬の薬物治療テクニック	吉田雅幸	脂質異常症薬物治療テクニック	南江堂	東京	2010	62-68
Takashi Miida, Satoshi Hirayama	The HDL Handbook—Biological Functions and Clinical Implications.	Tsugikazu Komoda	Pre β 1-HDL: A native lipid-poor HDL, and its potential as a new marker for HDL metabolism	Academic Press	London (UK)	2010	243-259

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takahashi M, Bujo H, Jiang M, Noike H, Saito Y, Shirai K	Enhanced circulating soluble LR11 in patients with coronary organic stenosis	Atheroscleros is	210	581-584	2010
Nakata Z., Nagae M., Yasui N., Bujo H., Nogi T. and Takagi, J.	Crystallization and preliminary crystallographic analysis of human LR11 Vps10p domain	Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun	67	129-32	2010
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	Exp Mol Med	In press		2011
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.	In press		2011
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	102	229-231	2011