

201114028A

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 23 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武城英明

平成 24 (2012) 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

武城英明

-----1

II. 分担研究報告

1. LR11 と血管機能に関する研究

東邦大学

白井 厚治

-----15

2. 急性冠症候群における可溶型LR11濃度の検討に関する研究

順天堂大学

代田浩之

-----20

3. アルツハイマー病患者における髄液中可溶型LR11代謝の検討

順天堂大学

三井田 孝

-----22

4. 悪性リンパ腫におけるLR11発現に関する研究

埼玉医科大学

田丸淳一

-----24

5. 脳脊髄液中および血液中可溶型LR11測定によるアルツハイマー型認知症の診断と病態解析

新潟大学

池内 健

-----28

6. 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

中世古知昭

-----30

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

鈴木 博

-----36

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

-----41

Ⅳ. 研究成果の刊行物・別冊

-----53

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

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性受容体 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。平成23年度に公表した主な研究成果を示す。1) LR11 結晶化解析に成功しそれに基づいて作成した抗原から候補抗体を獲得した、2) 産学連携し LR11 測定 ELISA 系の市販化に至った、3) 急性冠症候群の血中 LR11 値は安定型狭心症患者に比べて上昇する、4) 糖尿病細小血管症で血中 LR11 値が特異性、感受性ともに高く上昇する、5) 可溶性 LR11 は川崎病の冠動脈後遺症を反映する、6) 急性白血病、急性リンパ腫で血中 LR11 値が著しく上昇し治療予後を規定する、7) 腫瘍細胞の LR11 発現は急性リンパ腫の悪性転化の病態を表す、8) 髄液中 LR11 は ApoE と結合しその結合能の差異が AD 発症を制御する、9) AD 遺伝子多型、髄液中病因物質と血中 LR11 値が関連する、10) AD の血漿可溶性 LR11 は脳脊髄液濃度と異なり低値を示す。次年度の抗体療法開発研究に変更は無い。エビデンス構築研究は LR11 測定系を樹立し市場化したこと、国内外から多数の検体測定の申し込みがあることから、研究協力施設を変更し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）、田丸淳一（埼玉医科大学総合医療センター病理学教授）、池内 健（新潟大学超域研究機構准教授）中世古知昭（千葉大学大学院医学研究院細胞治療学講師）、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性受容体 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巢の未（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 (*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)。

このような背景から平成 22 年度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）とした。平成 23 年度目標は、測定系の市場化とともに、エビデンス研究において終了した測定結果を解析公表し、来年度の血中および髄液中 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構築の中間評価とした。さらに、新規抗体治療法を提案するために、特異抗原作成のため LR11 3 次元構造解析を行い、それを基盤として抗原作成し中和抗体のスクリーニングに着手する。

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 ELISA 系キットの樹立とその市場化

2. cDNA 直接免疫法による網羅的可溶型 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 1,000 例

9. アルツハイマー病 ミュンヘン工科大学 300 例

10. 血管病 ロッテルダム大学 100 例

(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. 可溶性 LR11 ELISA 測定キットの樹立と市場化

cDNA 直接免疫法により得られた複数の抗体から、M3 および R14 をもちいてサンドイッチ ELISA 法による血中および髄液中の LR11 測定法の試薬の適正化をおこないキットとして市場化した。この標準試薬を用いることで多数検体の一括測定が可能になった。現在、本試薬を用いて可溶性 LR11 を測定するにあたり、厳密な温度管理のもとで2日間にわたる操作が必要であることから、さらなる性能の向上と一連の操作の短縮化を行っている。

2. 網羅的可溶性 LR11 抗体の調整と LR11 機能に関わる中和作用の用量反応性試験

LR11 は、LDL 受容体リガンド結合領域、RGF 前駆体領域に加えて VPS10 ドメインをあわせて有することから、LDL 受容体ファミリーおよび VPS10 ファミリーとして知られている。これまでランダムに作成したペプチド抗体により免疫した結果では特異性の高い抗体を獲得できていない。上述の cDNA 免疫法により ELISA 測定のための抗体を得たが、LR11 の多機能から選択的抑制をおこなう中和抗体の理論的な作成と選択には、3次元

解析による構造解析と機能構造連関、さらにそれに基づいた抗原の選択が必要である。そこで、細胞外領域の結晶化解析をおこない、それにもとづき立体構造を考慮し、VPS10 ドメイン構造表面ペプチドを用いて抗体作成に着手した。LR11 発現浮遊系細胞を用いた FACS 解析の結果、血球細胞系の表面上に発現する LR11 を選択的に認識する抗体を約 100 種類同定した。この選択された抗体を用いて、LR11 機能のなかでとりわけ、細胞接着能、細胞遊走能を中和する抗体をスクリーニングしている。これらの機能抑制作用を有する抗体を用いて容量反応試験を行う。

【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. 血管病

動脈硬化巣の内膜平滑筋と不安定プラークが中心的な役割を果たす急性冠症候群において血中可溶性 LR11 濃度を検討した。急性冠症候群患者 50 例と年齢・性別をマッチングさせた安定型狭心症患者 50 例を対象に血中可溶性 LR11 濃度を比較検討するケースコントロールスタディを行った。急性冠症候群患者では安定狭心症患者に比し血中可溶性 LR11 濃度は有意に高く、特に ST 上昇型急性心筋梗塞で高値を示した。他のバイオマーカーとの相関を検討すると hsCRP、WBC 数、入院時血糖と有意な相関関係を認めた。多変量解析において血中可溶性 LR11 濃度は急性冠症候群の独立した関連因子であった。これまでの研究では冠動脈の有意狭窄例では正常冠動脈に比し血中可溶性 LR11 濃度が有意に上昇していることが報告されているが、今回の検討で急性冠症

候群において血中可溶性 LR11 濃度が有意に高いことを示した。急性冠症候群の病態は冠動脈の不安定プラークの薄い線維性被膜が破裂し、それに続く血栓形成により内腔が完全あるいは亜閉塞した状態である。薄い線維性被膜では平滑筋細胞は疎になっており、LR11 がその病態を反映している可能性がある。また ST 上昇型心筋梗塞において血中 LR11 濃度は高く、心筋梗塞におけるストレス下の炎症を反映している可能性がある。急性冠症候群では血中 LR11 濃度が有意に高く、急性冠症候群におけるバイオマーカーの役割を果たす可能性がある。

心臓足首血管指数 (CAVI; cardio ankle vascular index) は、体表面で測定され、大動脈心臓起始部から踝までの動脈の弾性を示す指標で、血圧と脈波伝播速度から求まる。今回、睡眠時無呼吸症の患者 58 名に対し、夜間在宅呼吸補助装置 (Continuous positive airway pressure; CPAP) をもちいて 3 年間治療を行い、1 年毎に頸動脈肥厚度と CAVI を測定し、その変化と LR11 濃度の関連について分析を行い、血管機能に対する LR11 の関与を明らかにする目的で前向きな検討を行った。LR11 濃度と頸動脈内中膜複合体厚の肥厚度進行との間に有意な正の相関が認められた ($r=0.23$ $p<0.05$)。また、sBP、dBP と CAVI の増加等の間に有意な正の相関が認められた ($r=0.33$ $p=0.01$ 、 $r=0.26$ $p<0.01$ 、 $r=0.16$ $p=0.16$)。今回の検討では LR11 高値症例で収縮期血圧、拡張期血圧が上昇を示したことより、LR11 が血管の機能を徐々に悪化させることが示され、冠動脈疾患で LR11 が高値を示す原因の一部を明らかにした。さらに、LR11 高値症例で CAVI が悪化を示すことより、血管のトーンも増悪させる可能性が示され、

LR11 と血管平滑筋の調節機構に関する以前の基礎研究の報告を支持する。

糖尿病性網膜症は糖尿病にともなう生活レベルの低下をきたす原因となる重大な血管合併症である。54 名の 2 型糖尿病患者の血中可溶性 LR11 を測定したところ、増殖性網膜症を有する糖尿病患者は、網膜症を有していない患者にくらべて有意に血中 LR11 濃度が高値だった。多変量解析から、血中 LR11 濃度は従来の網膜症と関連する因子とは独立してその進展に関わる因子であり、特異性、感受性を検討したところ、これらの因子と同等以上の特性を示した。LR11 とこれらの因子の間での関連を検討したところ、LR11 は HbA1c ともっとも高い相関を示した。これらの結果から、血中可溶性 LR11 は、大血管のみならず、細小血管障害でも増大しその病態を反映する可能性がある。

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。川崎病において LR11 が病態を反映する可能性がある。川崎病遠隔期において、血中可溶性 LR11 と他の様々なバイオマーカーとを比較し、血中可溶性 LR11 の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した。川崎病遠隔期患者 25 人を対象とし冠動脈評価から 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 : no CAL 群 (8 人)、後遺症として CAL を発症したものがその後消失したもの : 退縮 (以下 Reg) 群 (4 人)、瘤、狭窄、閉塞等の病変が残存するもの : CAL 群 (13 人)。対象群 (2 人)。発症時年齢、発症後年数は川崎病の 3 群間で差を認めなかった。体重、BMI、血圧、脂質マーカー (LDL-C, HDL-C) は 4 群間で差はなかった。

可溶性LR11は、4群間に有意差を認めた。(CAL群: 10.1 ± 0.3 ng/ml, Reg群: 7.6 ± 0.9 ng/ml, no CAL群: 8.5 ± 0.6 ng/ml, 対照: 7.7 ± 0.8 ng/ml, ANOVA, $p=0.003$)。可溶性LR11以外では、MCP-1/CCL2のみが4群間で有意差を認めた(CAL群: 87.1 ± 22 pg/ml, Reg群: 65.3 ± 18 pg/ml, no CAL群: 55.6 ± 6 pg/ml, 対照: 46.4 ± 8 pg/ml, ANOVA, $p=0.003$)が、可溶性LR11とMCP-1/CCL2との関連はなかった。可溶性LR11はsE-selectin/CD62Eと有意な正相関を認めた($r^2=0.21$, $p=0.003$)。可溶性LR11は他の血管障害関連バイオマーカーに比し良好に冠動脈後遺症を反映していた。しかしCALを有する症例の可溶性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明らかでない。

2. 神経病

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し、髄液中可溶性受容体LR11濃度は上昇する。その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。AD患者および健常人の髄液を新潟大学で採取した。髄液における可溶性LR11、ApoE、ApoAI、Amyloid β の蛋白間結合を免疫沈降法にて検討した。健常人およびAD患者の髄液を用いた免疫沈降法では、可溶性LR11とApoE、ApoAI、Amyloid β の結合能を認めた。これらの蛋白間の結合は、ApoEフェノタイプにより異なる結合能を示した。可溶性LR11は、髄液中でApoEに加えて、ApoAI及びAmyloid β との結合能を示すことから、髄液中の主要なリポ蛋白であるHDLとの結合を介し、Amyloid β の排泄障害と脳内組織蓄積に関与する可能性が考えられた。髄液中の可溶性LR11はApoEと結合し、ApoEフェノタイ

プによる結合能の差異がアルツハイマー病の発症に重要な役割を担うことが示唆された。

脳脊髄液および血液を採取し、脳脊髄液バイオマーカーとしての可溶性LR11の有用性の検討を行った。同時に、血漿中の可溶性LR11の定量を行い、血液バイオマーカーとしての有用性の検討を行った。さらに、同一患者由来の脳脊髄液と血漿中の可溶性LR11の定量により中枢神経系と体循環系における可溶性LR11の相関を検討した。44名のAD患者(検査時年齢 73 ± 11 歳、MMSE 18 ± 7 点、APOE $\epsilon 4$ 陽性率50%)、16名の軽度認知障害(MCI、検査時年齢 72 ± 8 歳、MMSE 26 ± 1 点、APOE $\epsilon 4$ 陽性率36%)、および22名の健常高齢者(NC、検査時年齢 70 ± 11 歳、MMSE 29 ± 1 点、APOE $\epsilon 4$ 陽性率33%)からEDTA 2Na付加真空採血管を用いて血液を採取した。15名のAD患者および16名の前頭側頭型認知症(FTLD)患者から腰椎穿刺を行い脳脊髄液を採取した。AD群では 19.9 ± 5.5 ng/mL、FTLD群で 15.3 ± 6.0 ng/mLとAD群で有意に高値を示した($p < 0.05$)。血漿中可溶性LR11の定量結果は、AD群 8.1 ± 2.5 ng/mL、MCI群 7.6 ± 2.1 ng/mL、NC群 10.2 ± 1.1 ng/mLであった。AD群、MCI群の血漿可溶性LR11は、対照群と比較して低値を示した。APOE $\epsilon 4$ 保因者と非保因者では、血漿中可溶性LR11に有意な差は認めなかった。同一患者の髄液中と血漿中の可溶性LR11を比較すると、髄液中可溶性LR11(17.9 ± 6.1 ng/mL)は血漿中(8.6 ± 2.9 ng/mL)より高値を示したが両者の間には有意な相関を認めなかった。可溶性LR11はADの有用なバイオマーカーの候補と考えられた。AD患者の血液中の可溶性LR11は低下する傾向を認めたが、多数例サンプルでの検討が必要である。同一患者由来の脳脊髄液中可溶性LR11と血液中可溶性LR11は有意な相関関係を示

さず、中枢神経系の可溶性LR11の調整は独立した機序で調整されていることが示唆された。

ドイツ人76名の検体におけるAD、MCI、FTLD患者の脳脊髄液中の可溶性LR11を定量解析した。AD患者、MCI群では、FTLD群と比較して可溶性LR11は脳脊髄液中で増加傾向にあるものの有意差は認めなかった。一方、髄液中可溶性LR11は、アミロイドβの前駆体タンパクAPPのβ切断断片と相関することが明らかになった。さらに、髄液中LR11濃度のAD発症に置ける病因としての意義を明らかにする目的で、LR11遺伝子多型と髄液濃度を調べた。105名のADおよびMCI症例のLR11遺伝子多型SNP8、SNP9、SNP10およびこれらのハプロタイプがMCI症例の髄液LR11濃度の高値と相関することが明らかになった。そこで、36名のMCI患者と55名のAD患者の髄液中LR11濃度とBACE1活性を調べたところ、AD症例でBACE1活性とLR11濃度に相関を認めた。以上の結果から、髄液中のLR11濃度は、遺伝的範囲により制御され、その濃度はADの病態を形成するアミロイド前駆体蛋白やその生成に重要なセクレターゼ活性と密接に関わることが明らかになった。

3. 血液病

近年、大量化学療法と同種造血幹細胞移植療法、分子標的療法の導入により急性白血病や悪性リンパ腫等の造血悪性腫瘍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。血液細胞におけるLR11の発現、造血器悪性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した。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ところ、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。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。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)と低位群(<20.0% of WBC)と比較して有意に高値であった。

543例の悪性リンパ腫症例において免疫組織学的に検索し臨床病理学的事項との関連を検討した。T細胞リンパ腫(3.2%; 2/62例)、ホジキンリンパ腫(0%; 0/25例)ではLR11の発現はほとんどみられなかったが、B細胞リンパ腫では検索症例の36%(142/394例)で発現が

みられた。B 細胞リンパ腫においては濾胞性リンパ腫(28.3%;19/67 例)、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫(61.2%;112/183 例)で発現率が高く、特に胚中心由来の免疫形質をもつ症例で有意に高かった。びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫では LR11 の細胞質内発現は病期や IPI、LDH、sIL2-R などの予後因子との相関は見られなかったが、LR11 陽性群は陰性群と比べて CHOP 療法下での生存予後が良好であった。LR11 はリンパ球系血液腫瘍、とくに B 細胞性リンパ腫で LR11 が発現していた。さらに特に発現が高かった濾胞性リンパ腫とびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫は、前者から後者に悪性転化することが知られており、この悪性転化に LR11 が何らかの役割を有する可能性が示唆される。このためこれらの LR11 がこれらの形質転換のマーカーおよび腫瘍マーカーとなる可能性が示唆された。

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) LR11 結晶化解析に成功しそれに基づいて作成した抗原から候補抗体を獲得した。
- 2) 産学連携し LR11 測定 ELISA 系の市販化に至った。
- 3) 急性冠症候群の血中 LR11 値は安定型狭心症患者に比べて上昇する。
- 4) 糖尿病細小血管症で血中 LR11 値が特異性、感受性ともに高く上昇する。
- 5) 可溶性 LR11 は川崎病の冠動脈後遺症を反映する。
- 6) 急性白血病、急性リンパ腫で血中 LR11 値が著しく上昇し治療予後を規定する。
- 7) 腫瘍細胞の LR11 発現は急性リンパ腫の悪性転化の病態を表す。

8) 髄液中 LR11 は ApoE と結合しその結合能の差異が AD 発症を制御する。

9) AD 遺伝子多型、髄液中病因物質と血中 LR11 値が関連する。

10) AD の血漿可溶性 LR11 は脳脊髄液濃度と異なり低値を示す。

今年度の研究成果から、血管病、神経病、血液病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解析結果として公表されるようになった。とりわけ、今年度は当初の計画に沿って、研究試薬のキット市場化、中和抗体作成のための LR11 立体構想解析に成功し、抗体作成とスクリーニングプロセスに入った。一方、臨床エビデンスの集積が進み、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。モデル解析による本分子の病態形成における役割解明から、これを標的とする治療技術の開発により、心筋梗塞、白血病、悪性リンパ腫、認知症の難治性疾患へ新たな治療法の標的となることが提示された。

これまでの研究成果から、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し、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を今後慎重に評価する。新規標的療法の開発を促し、従来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。

今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。エビデンス構築臨床研究は、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、来年度引き続き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 300 症例 千葉大学測定中
10. 血管病 ロッテルダム大学エラスムスメディカルセンター追加施設

金沢大学（血管病）、中国延辺大学（血管病）、ウィーン大学（白血病）

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakata Z, Nagae M, Yasui N, Bujo H, Nogi T, Takagi J: Crystallization and preliminary crystallographic analysis of human LR11 Vps10p domain. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 67:129-132, 2011

2. Asada A, 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
3. Aoyagi Y, Kuroda M, Asada S, 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* 243:161-167, 2011
4. 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 for enzyme replacement therapy of lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. *The Open Gene Ther J* 4:1-10, 2011
5. Asada S, Kuroda M, Aoyagi Y, Fukaya Y, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Aso M, Okamoto Y, Nakayama T, Saito Y, Bujo H: Ceiling culture-derived proliferative adipocytes retain high adipogenic potential suitable for use as a vehicle for gene transduction therapy. *Am J Physiol Cell Physiol* 301:C181-C185, 2011

6. Katayama A, Wada J, Usui-Kataoka H, Yamasaki H, Teshigawara S, Terami T, Inoue K, Kanzaki M, Murokami K, Nakatsuka A, Sugiyama H, Koide N, Bujo H, Makino H: Two novel mutations of LCAT gene and the influence of APOE genotypes on clinical manifestations. *NDT Plus* 4: 299-302, 2011
7. Aoyagi Y, Kuroda M, Asada S, Tanaka S, Konno S, Tanio T, Aso M, Okamoto Y, Nakayama T, Saito Y, Bujo H: Fibrin glue is a candidate scaffold for long-term therapeutic protein expression in spontaneously differentiated adipocytes in vitro. *Exp Cell Res* 318: 8-15, 2012
8. Kuroda M, Bujo H, Aso M, Saito Y: Adipocytes as a vehicle for ex vivo gene therapy: Novel replacement therapy for diabetes and other metabolic diseases. *J Diabet Invest* 2: 333-340, 2011
9. Alexopoulos P, Luo L-H, Tsolakidou A, Kratzer M, Grimmer T, Westerteicher C, Jiang M, Bujo H, Diehl-Schmid J, Kurz A, Pernecky R: Interrelations between CSF soluble APP, amyloid- β 1-42, SORL1, and tau levels in Alzheimer's disease *J Alzheimers Dis* 2011 ; 28(3) in press
10. Gotoda T, Shirai K, Ohta T, Kobayashi J, Yokoyama S, Oikawa S, Bujo H, Ishibashi S, Arai H, Yamashita S, Harada-Shiba M, Eto M, Hayashi T, Sone H, Suzuki H, Yamada N: Diagnosis and management of type I and type V hyperlipoproteinemia. *J Atheroscler Thromb.* 2011 Dec 1. [Epub ahead of print]
11. Arai H, Ishibashi S, Bujo H, Hayashi T, Yokoyama S, Oikawa S, Kobayashi J, Shirai K, Ota T, Yamashita S, Gotoda T, Harada-Shiba M, Sone H, Eto M, Suzuki H, Yamada N: Management of Type IIb Dyslipidemia. *J Atheroscler Thromb.* 2011 Dec 3. [Epub ahead of print]
12. Yokoyama S, Yamashita S, Ishibashi S, Sone H, Oikawa S, Shirai K, Ohta T, Bujo H, Kobayashi J, Arai H, Harada-Shiba M, Eto M, Hayashi T, Gotoda T, Suzuki H, Yamada N: Background to discuss guidelines for control of plasma HDL-cholesterol in Japan. *J Atheroscler Thromb.* 2012 Jan 12. [Epub ahead of print]
13. Fukaya Y, Kuroda M, Aoyagi Y, Asada S, Kubota Y, Okamoto Y, Nakayama T, Saito Y, Satoh Y, Bujo H: Platelet-rich plasma inhibits the apoptosis of highly adipogenic homogeneous preadipocytes in an in vitro culture system. *Exp Mol Med* 2012 in press
14. Guo L-H, Guo, Westerteicher C, Wang X-H, Kratzer M, Tsolakidou A, Jiang M, Grimmer T, Laws SM, Alexopoulos P, Bujo H, Kurz A, Pernecky R: SORL1 genetic variants and cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2012 in press
15. Tsolakidou A, Alexopoulos P, Guo L-H,

- Guo, Grimmer T, Westerteicher C, Kratzer M, Jiang M, Bujo H, Rosselli F, Leante MR, Livrea P, Kurz A, Perneczky R: BACE1 activity is related to CSF concentrations of SORL1, soluble amyloid precursor protein and tau. *Alzheimers Dement* 2012 in press
16. Takahashi M, Bujo H, Shiba T, Jiang M, Maeno T, Shirai K: Enhanced circulating soluble LR11 in patients with diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2012 in press
2. 学会発表等
1. 池内 健, 平山 哲, 三井田孝, 深町 勇, 矢島隆二, 徳武孝允, 春日健作, 金子博之, 田久保耕平, 海老沼宏幸, 武城英明, 齋藤 康, 西澤正豊: 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, 名古屋, 2011.11
2. 清水直美, 中世古知昭, 川口岳晴, 武藤朋也, 大橋絢香, 長谷川浩子, 山本浩子, 伊藤道博, 塚本祥吉, 酒井紫緒, 阿部大二郎, 大和田千桂子, 武内正博, 堺田恵美子, 井関 徹, 姜 美子, 武城英明: 末梢血幹細胞採取における動員効率と新規バイオマーカー血清可溶性 LR11. 第 59 回日本輸血・細胞療法学会, 東京, 2011.4
3. 池内 健, 平山 哲, 三井田孝, 深町 勇, 矢島隆二, 徳武孝允, 金子博之, 春日健作, 海老沼宏幸, 田久保耕平, 武城英明, 西澤正豊. アルツハイマー病患者・髄液中における可溶性 LR11 の増加. 第 52 回日本神経学会, 名古屋, 2011.5
4. 渡辺 健一, 鈴木 博, 小澤 淳一, 羽二生 尚訓, 長谷川 聡, 内山 聖, 武城英明川崎病急性期における血管障害バイオマーカーの可能性—可溶性 LR11—. 第 47 回日本小児循環器学会. 2011.7.5
5. Kenichi Watanabe, Hiroshi Suzuki, Hisanori Haniu, Fujito Numano, Akihiko Saitoh, Makoto Uchiyama, Hideaki Bujo. Soluble LR 11: a novel biomarker for vascular lesion development late after Kawasaki disease. The 10th International Kawasaki Disease Symposium. 2012.2.7
6. Kawaguchi T, Ohwada C, Sakai S, Takeda Y, Shimizu N, Takeuchi M, Sakaida E, Takubo K, Ebinuma H, Fukamachi I, Higashi M, Tamaru J, Yokote K, Bujo H, Nakaseko C: Serum soluble LR11 is a promising novel biomarker for malignant lymphoma. 第 73 回日本血液学会, 名古屋, 2011.10
7. Shimizu N, Nakaseko C, Sakai S, Tsukamoto S, Kawaguchi T, Takeda Y, Ohwada C, Takeuchi M, Sakaida E, Iseki T, Nishii K, Jiang M, Yokote K, Bujo H: Soluble LR11 is a novel chemotaxis factor and enhances G-CSF-mediated migration of HL-60 cells. 第 73 回日本血液学会, 名古屋, 2011.10
8. Tsukamoto S, Takeuchi M, Sugita Y, Yamazaki A, Kawaguchi T, Sakai S, Takeda Y, Ohwada C, Sakaida E, Shimizu N, Nishii K, Jiang M, Yokote K, Bujo H, Nakaseko C: Soluble LR11 activates THP-1 monocytes via interaction with

- CD87 and CD11b complex. 第73回日本血液学会, 名古屋, 2011.10
9. Shimizu N, Nakaseko C, Takeuchi M, Ohwada C, Nishii K, Jiang M, Fukamachi I, Bujo H: Soluble LR11, a modulator of G-CSF-mediated migration of HL-60 cells, is a potential circulating marker indicating the G-CSF-induced mobilization of hematopoietic stem cells. Keystone Symposia - Stem cells, cancer and metastasis- 2011, Keystone, USA, 2011.3
 10. Kuroda M, Asada S, Aoyagi Y, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Aso M, Saito Y, Bujo H: Proliferative Adipocytes as Therapeutic Gene Vehicle toward Sustained Protein Replacement Therapy American Society of Gene & Cell Therapy 14th annual meeting 2011, Seattle, USA, 2011.5
 11. Kawaguchi T, Ohwada C, Higashi M, Takeuchi M, Sakai S, Takeda Y, Shimizu N, Sakaida E, Takubo K, Ebinuma H, Fukamachi I, Tamaru J, Yokote K, Bujo H, Nakaseko C: Serum soluble LR11 as a novel biomarker for B cell lymphoma. The 53th American Society of Hematology, Poster session, San Diego, 2011.12
 12. Shimizu N, Nakaseko C, Takeuchi M, Ohwada C, Tsukamoto S, Kawaguchi T, Nishii K, Jiang M, Yokote K, Fukamachi I, Bujo H: Soluble LR11/SorLA, a potential circulating marker indicating the G-CSF-induced mobilization of hematopoietic stem cells, is a modulator of G-CSF-mediated migration of HL-60 cells. The 53th American Society of Hematology, Poster session, San Diego, 2011.12
 13. Ikeuchi T, Hirayama S, Miida T, Tokutake T, Yajima R, Jiang M, Bujo H, Nishizawa M: Quantification of soluble LR11/SorLA in CSF and plasma of patients with Alzheimer disease. Keystone Symposia - ApoE, Alzheimer's, and lipoprotein biology, Keystone, USA, 2012.2.
 14. Bujo H: Circulating soluble LR11 -a novel molecule representing pathological immature cells-, Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine symposium (Special lecture), Berlin Germany, 2011.6
 15. Bujo H: Circulating soluble LR11 -a novel molecule representing pathological immature cells-, Medical University of Vienna Biocenter Symposium (Special lecture), Vienna, Austria, 2011.6
 16. Bujo H: Circulating soluble LR11 and Alzheimer's disease, Harvard Medical School Brigham and Women's Hospital Neurology Symposium (Special lecture), Boston, USA, 2011.8
 17. Bujo H: Soluble LR11 and Alzheimer's disease, Washington University in St. Louis BJC Institute of Health Symposium (Special lecture), St Louis, USA, 2011.11
 18. Bujo H: Soluble LR11 and Alzheimer's

- | | |
|--|---|
| <p>disease, University of Toronto The
Tanz Centre for Research in
Neurodegenerative Diseases Lecture
(Special lecture), Toronto, Canada,
2011.11</p> <p>19. Bujo H: The significance of
circulating soluble LR11 in Vascular
diseases, 延辺大学招待講演 (Special
lecture), 延吉, China, 2012.2</p> | <p>なし</p> <p>2. 実用新案登録
なし</p> <p>3.その他
特になし</p> |
|--|---|

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許

II. 分担研究報告

平成23年度厚生労働科学研究研究費補助金

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

LR11と血管機能に関する研究

(血管病臨床エビデンス構築)

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

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は臨床的に有用な血管平滑筋マーカーであることを示すとするものである。高LR11の原因としては、脂質異常症や糖尿病の病態を反映することが最近の臨床、基礎実験の知見から得られているが、血管機能との因果関係は十分には明らかにされていない。今回、我々は睡眠時無呼吸症の58症例に対し、在宅夜間呼吸補助装置(Continuous-Positive airway pressure;CPAP)を用いて3年間治療を行い、1年毎に頸動脈肥厚度と血管機能(Cardio-ankle stiffness index;CAVI)を測定し、その変化とLR11濃度との関連について分析を行った。その結果、LR11濃度と頸動脈肥厚度進行との間に正の相関関係を認めた。また、LR11濃度が高くなるとともに、収縮期血圧($r=0.21$ $p<0.05$)、拡張期血圧と、血管弾性の指標であるCAVIは増加する傾向を示した($r=0.14$ $p=0.18$)。このことより、LR11が徐々に血管機能障害を惹起し、心血管疾患発症に関連している可能性が示唆され、これまでの報告を裏付ける証拠が得られた。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

LDL受容体ファミリーLR11はアポEをリガンドとし、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かわる。これらを制御する細胞として内膜と中膜の平滑筋細胞があげられる。中膜の平滑筋細胞は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、中膜の平滑筋細胞の遺伝子発現は変化し、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。LR11は、中膜の血管平滑筋の遊走と機能とを調節することが報告されていることから、血管機能のバイオマーカーとも考えられる。

心臓足首血管指数(CAVI; cardio ankle vascular index)は、体表面で測定され、大動脈心臓起始部から踝

までの動脈の弾性を示す指標で、血圧と脈波伝播速度から求まる。この指標の意味するところは、ある長さをもった血管の口径の伸びに必要な内圧変化と考えてよい。従って、測定時の血圧には左右されず、血管のもつ固有の弾性を示す初めての指標である。CAVIに関する知見は急速にあつまりつつあり、加齢とともに増加するほか、これまで動脈硬化危険因子と考えられてきた糖尿病をふくむ諸因子のほとんどはCAVIに増加的に作用し、一方、それらの改善は、CAVI減少をもたらすことが明らかになり、今後、一般臨床で動脈硬化性疾患を診てゆくうえで、有用性を発揮する検査法と思われる。

最近、血中可溶性LR11濃度が冠動脈疾患において高値を示すことが明らかになり、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が、LR11と血管機能との因果関係を明らかにするためには前向き調査が必要である。

今回、睡眠時無呼吸症の患者 58 名に対し、夜間在宅呼吸補助装置 (Continuous positive airway pressure; CPAP) をもちいて 3 年間治療を行い、1 年毎に頸動脈肥厚度と血管機能 (Cardio-ankle stiffness index ; CAVI) を測定し、その変化と LR11 濃度の関連について分析を行い、血管機能に対する LR11 の関与を明らかにする目的で前向きの検討を行った (図 1)。

B. 研究方法

対象者：睡眠時無呼吸症と診断された 58 症例 (年齢は 44~75 歳。男性 43 例、女性 12 例、平均年齢 64.7 ± 12.4 歳。) を用いた。

方法：

睡眠呼吸検査の診断

Fuji respirionics 社製 Alice V を用いて、睡眠中の脳波、 S_pO_2 、胸郭運動、鼻腔の気流モニターを終夜にわたり記録した。睡眠時無呼吸の重症度は、一時間あたりの無呼吸と低呼吸の合計を評価項目として、20 回/時間以上の異常呼吸を示す患者を治療適応として、本研究にエントリーした。

頸動脈超音波の診断

頸動脈超音波検査は日立 EUB-8500 を使用。

4~9.5MHz のリニヤ型プローブを用い、両側、内頸動脈 (ICA)、頸動脈分岐部 (Bu1)、総頸動脈 (CCA) を観察、Max-IMT は、総頸動脈の最も厚い部分 (max-IMT) とし、その前後 1cm の IMT を計測し、3 点の IMT の平均値を mean-IMT とした。また、血管内腔に突出した、変曲点を伴う 1.1mm 以上の限局性の隆起性病変をプラークとし、頸動脈をスライドのように 4 分割し、合計 4ヶ所でそれぞれプラークの厚さ計測し、左右頸動脈の合計をプラークスコアとした。

左右の頸動脈で、分岐部から末梢側の内頸動脈方向へ 15mm (S1) と分岐部より上流側すなわち、心臓側に 15mm ずつ 3ヶ所 (S2~4) 計 45mm の領域、合計 4ヶ所でプラークの厚さを計測し、左右頸動脈の合計を PS とした。

Cardio-ankle vascular index の検査法

1) CAVI の測定法

被検者は仰臥位にねてもらい、図 2 に示すように、心音計を胸骨上に設置、左右の上腕と足首に脈波測定カフを巻く。約 10 分の安静の後、まず、カフ圧を 40 mmHg で、脈波をとる。この時同時に、心音も記録する。ついで、血圧を測定する。そのあとに、大動脈弁口から足首動脈までの 2 点間の距離を測り、心臓から踝までの脈波伝播時間は、大動脈弁が開き始めた時間と踝まで脈が伝えられた時間差を、上腕動脈と踝動脈の脈伝播の時間差、さらに II 音と上腕までの時間差を合計した時間で求める。距離をこの時間で割り伝播速度が出る。これを、以下に述べる数式にあてはめると、CAVI 値が求まる。実際には、計器 (VaSera[®], フクダ電子) で自動的に測定、計算される。

2) 血管弾性 CAVI の算出式

CAVI は、stiffness parameter β に Bramwell-Hill の式から導き出される血管口径変化を代入して求められる (図 2))。

Bramwell-Hill の式は、脈波速度と血管容積変化率との関係を示す公式で、血管容積、血液密度、及び脈圧から構成される。血管容積変化率は大動脈が長軸方向には変化しない場合、容積変化率を血管口径の変化率に置き換えることが可能で Bramwell-Hill の変形式が導かれる。それを stiffness parameter β の式に代入すると CAVI が求まる。

$$CAVI = a \{ (2\rho / \Delta P) \times \ln(Ps/Pd) PWV^2 \} + b$$

Ps : 収縮期血圧、Pd : 拡張期血圧、PWV ; 脈波速度、 ΔP : Ps - Pd, ρ : 血液粘度、定数 a, b ; 圧補正された hfPWV と一致させるスケール変換。

3) CAVI の特性 : 血圧非依存性

測定再現性は、CV = 4 - 5 % で、臨床検査では、通常 5 % 以下で有用とされ、測定時の血圧には影響されない。

4) CAVI の測定条件

CAVI は、血行動態が安定する、臥床後約 10 分の安静後に測定した。(入眠で低下するため、覚醒時に施行した。)

また、CAVI は、激しい運動直後は低下する。日内変動は原則的にないが、経時的に観察する際、検査時刻などをなるべく一定の条件で行った。

血中可溶性 LR11 の測定

可溶性 LR11 は、免疫学的に SDS-PAGE の分離により、ヒト血清および脳脊髄液の 250-kDa のタンパク質として同定され、受容体関連蛋白質および抗 LR11 モノクローナル抗体 M3 を使用することによって血清から精製した。0.25 から 4.0 マイクログラム/L の範囲を持つ可溶性 LR11 は、LR11 の異なる部位に対するモノクローナル抗体 M3 と R14 の組み合わせを用いて、サンドイッチ ELISA 法における吸光度検出により定量化した。

C. 研究結果

1) 睡眠時無呼吸症候群に対する気道内圧持続陽圧療法 (CPAP) 後の各種血行動態パラメーターの変化 (図 3)

睡眠時無呼吸患者の CPAP 治療後 2 年間、体格指数は増加傾向を示したが、収縮期血圧 (sBP)、拡張期血圧 (dBP)、CAVI は有意に低下した (sBP: 前 141.1 ± 22.6 、1 年後 137.0 ± 19.9 、2 年後 135.7 ± 21.9 ; $p < 0.05$ 1 年後 vs 前、 $p < 0.05$ 2 年後 vs 前)、(dBP: 前 83.2 ± 12.2 、1 年後 79.6 ± 10.5 、2 年後 79.5 ± 11.3 ; $p < 0.01$ 1 年後 vs 前、 $p < 0.05$ 2 年後 vs 前)、(CAVI: 前 9.6 ± 1.1 、1 年後 9.3 ± 1.0 、2 年後 9.1 ± 0.9 ; $p < 0.01$ 1 年後 vs 前、 $p < 0.01$ 2 年後 vs 前)。また、頸動脈内中膜複合体厚の変化と、血圧および CAVI の低下との間に正の相関関係を認めた (sBP: $r = 0.22$ $p < 0.05$ 、dBP: $r = 0.17$ $p = 0.09$ 、CAVI: $r = 0.21$ $p < 0.05$)。

2) 頸動脈内中膜複合体厚および各血行動態パラメーターと血中可溶性 LR11 との関連 (図 4)

LR11 の濃度と頸動脈内中膜複合体厚の肥厚度進行

との間に有意な正の相関が認められた ($r = 0.23$ $p < 0.05$)。また、sBP、dBP と CAVI の増加等の間に有意な正の相関が認められた ($r = 0.33$ $p = 0.01$ 、 $r = 0.26$ $p < 0.01$ 、 $r = 0.16$ $p = 0.16$)。

D 考察

動脈硬化度を定量的に計測するために、血管弾性を利用しようという考えが、20 世紀当初からあった。1920 年ころから、脈波伝搬速度が動脈の硬さを反映する指標になるとされ、計測され始めた。動脈 2 点間で脈波が取れば、どこでも計測可能である。心臓—大腿動脈間脈波伝搬速度 (hfPWV) が 1960 年代にわが国で確立、多くの研究者が知見をえた。しかし、脈波速度は測定時血圧に依存するため、血圧の影響を除くため、拡張期圧 80 mmHg にあわせる補正値が求められ、理論的には血圧非依存性の PWV 長谷川法が生まれた。しかし、鼠蹊部での脈波感知が難しい人もおり測定誤差が大きく、また補正値がすべての人に当てはまるかの疑問が残されていた。

上腕—踝までの血管を対象に、簡便に測れる方法として baPWV が、2000 年ころ提示された。しかし、血圧依存性はそのまま内在していた。

直接、血管の弾性を反映する指標として、林らは、Stiffness parameter β 理論を提唱した。ある血管部位の口径を広げるのに必要な圧は、血管の固有の弾性を反映するというものである。この理論を、長さのある動脈に当てはめ、心臓と踝までの血管を一本の管と見立て、その PWV と収縮期、拡張期血圧から β がもたらまることを見いだされ、生みだされたのが心臓足首血管指数 (cardio-ankle vascular index: CAVI) である。測定器は VaSera VS-1000 [フクダ電子、東京] が開発された。CAVI は血圧の影響を受けず、測定再現性が高いため、現在、広く臨床の現場で用いられはじめ、多くの論文で結果が一致しており、糖尿病をはじめとする生活習慣病の大血管への影響を見る定量的指標として有用性が評価されつつある。CAVI の意味するものは、現在のところは、血管のトーンを示すのではないかと考えられている。コンプライアンスともいわれ、心臓から送り出された血流を受け止め、拡張期には末梢