

に送る第2のポンプの役目をはたしているその指標でもある。

血管のトーンスは、血管のマトリックス成分(エラスチン、コラーゲン、ヒアルロン酸)に加え、平滑筋細胞の収縮性からなる。LR11は、血管平滑筋細胞の形質変換を制御する。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、血管のトーンスを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結果となった。

頸動脈超音波検査においては、LR11高値症例で頸動脈内中膜複合体厚の肥厚度進展が認められたことは非常に興味深く、以前に我々が報告した頸動脈肥厚度と、LR11との関連に対する横断研究の報告を前向き研究で裏付ける結果となった。

### ● まとめ

臨床研究からは、CAVIは年齢、男、糖尿病、高血圧、脂質異常、喫煙、精神的ストレス、肥満で、増加し、一方、降圧治療、血糖コントロール、禁煙で改善することが示された。特に、糖尿病では、高血糖状態で上昇、長期フォローで、体重増加とともに血糖が上がるとCAVIは、一過性にあがり、改善で低下する。我々は血管平滑筋細胞のマーカーであるLR11の高血糖状態での発現亢進を報告しており、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。

### E 結論

睡眠時無呼吸症候群治療後の症例における血管機能に関するLR11の関与について検討したところ、LR11は血管機能悪化に対する臨床的血管平滑筋バイオマーカーの1つと考えられた。その臨床的有用性に関してはLR11に関する、心血管系疾患の予後などについて、血管平滑筋機能を含めた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 データ収集方法

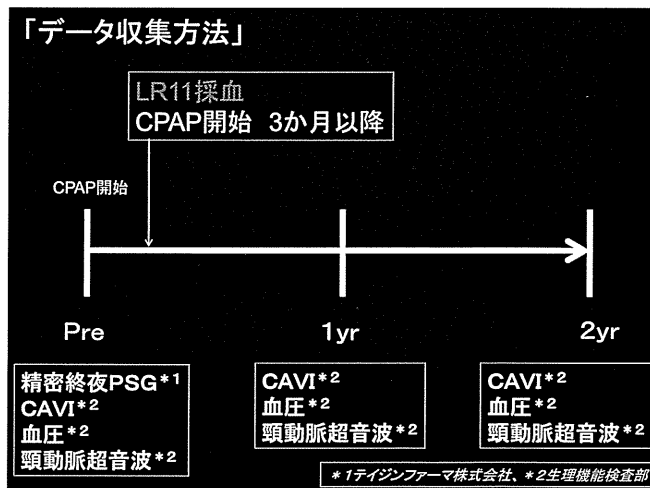


図2 Cardio-ankle stiffness index の測定と算定方法

図1 CAVIの測定と算定法

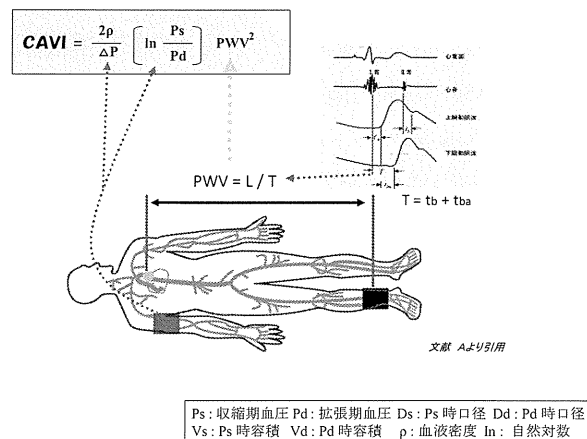


図3 各種パラメーターの変化

## 各種パラメーターの変化

	Baseline	1 year	2 years	3 years	P value
<i>n</i>	58	53	50	48	
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	26.7±3.4	26.9±3.3	26.8±3.4	26.8±3.2	NS
PR(times/min)	67.2±13.2	68.8±13.0	68.0±12.7	69.0±13.7	NS
sBP(mmHg)	141.1±22.6	137.0±19.9	135.7±21.9	136.8±26.1	*p<0.05, † p<0.05
dBp(mmHg)	83.2±12.2	79.6±10.5	79.5±11.3	80.4±17.2	*p<0.01, † p<0.05
<b>Cervical ultrasound</b>					
Rt mean intima-media thickness(mm)	0.87±0.16	0.85±0.17	0.85±0.23	0.88±0.18	*p<0.05,
Max intima-media thickness(mm)	1.98±1.1	1.94±1.0	2.04±1.0	2.17±1.1	NS
Plaque score	3.89±4.2	4.43±4.5	5.60±4.8	6.73±5.5	*p<0.01, † p<0.01 ‡ p<0.01
CAVI	9.64±1.13	9.32±0.98	9.10±0.93	9.40±0.85	*p<0.01, † p<0.01

BMI: Body mass index, PR: Pulse rate, sBP: Systolic blood pressure, dBp: Diastolic blood pressure  
\*p<0.05, \*p<0.01;1yr vs pre, †p<0.05, †p<0.01;2yrs, \*p<0.05, \*p<0.01;3yrs vs pre.  
Values are presented as mean ± SD. paired *t* test.

図4 LR11 値と各動脈硬化指標の変動との単相関  
( 2years )

LR11値と各動脈硬化指標の変動との単相関 ( 2years )		
	r	P value
<b>ΔMax IMT(mm)</b>	<b>0.23</b>	<b>*p&lt;0.05</b>
<b>ΔsBP(mmHg)</b>	<b>0.33</b>	<b>*p&lt;0.01</b>
<b>ΔdBp(mmHg)</b>	<b>0.26</b>	<b>*p&lt;0.01</b>
<b>ΔCAVI</b>	<b>0.16</b>	<b>0.14</b>

(N=48)

IMT: Intima-media thickness, sBP: Systolic blood pressure, dBp: Diastolic blood pressure,  
CAVI: cardio-ankle vascular index, Pearson's correlation coefficient.

厚生労働科学研究費補助金（バイオマーカー可溶性LR11研究事業）  
分担研究報告書

急性冠症候群における可溶性LR11濃度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**

急性冠症候群における可溶性LR11濃度が安定型狭心症患者に比し有意な上昇が認められ、LR11の急性冠症候群のバイオマーカーとしての可能性が示唆された。

**A. 研究目的**

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濃度を検討する。

**B. 研究方法**

2008年11月から2009年12月の間に当院で緊急カテーテル検査を行っ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。

（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書面で得る。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**

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。ま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

析においても血中可溶性LR11濃度は急性冠症候群の独立した関連因子であった。

**D. 考察**

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、今回の我々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。

**E. 結論**

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。

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

2012年日本循環器学会にて発表予定

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

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

アルツハイマー病患者における髄液中可溶性LR11代謝の検討

研究分担者 三井田 孝 順天堂大学医学部教授

**研究趣旨**

アルツハイマー病(AD)における髄液中可溶性受容体LR11の調節機序を検討した。

AD患者の髄液可溶性LR11はApoE, ApoAI及びAmyloid  $\beta$  と結合し、ApoEフェノタイプによる異なる結合能を示した。

**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。

**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。髄液における可溶性LR11, ApoE, ApoAI, Amyloid  $\beta$  の蛋白間結合を免疫沈降法にて検討した。

(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**

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  $\beta$  の結合能を認めた。これらの蛋白間の結合は、ApoEフ

フェノタイプにより異なる結合能を示した

**D. 考察**

可溶性LR11は、髄液中でApoEに加えて、ApoAI及びAmyloid  $\beta$  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  $\beta$  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。

**E. 結論**

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。

**F. 健康危険情報**

特になし

**G. 研究発表**

1. 論文発表

原著 なし 総説 アルツハイマー病と可溶性  
LR11. 臨床化学40巻3号, p216-23

2. 学会発表

Quantification of soluble LR11/SorLA in CSF  
and plasma of patients with Alzheimer disease.  
Keystone Symposia on Molecular and Cellular  
Biology, 2012.02.26-03.02

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    |    |

悪性リンパ腫におけるLR11発現に関する研究

研究分担者 田丸淳一 埼玉医科大学 教授

研究要旨

これまでの本事業研究の知見から血液系腫瘍の血清中に可溶性 LR11 濃度が増大することが見出されている。この発現が腫瘍細胞からの産生されるものかどうか 543 例の悪性リンパ腫症例における LR11 蛋白の発現を免疫組織学的に検索した。また併せて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)ではその発現はほとんどみられなかったが B 細胞リンパ腫において 36%(142/394 例)と高い発現率であった。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高かった。またびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫においては、CHOP 療法下で発現例では予後がよいことが示された。これらの結果から B 細胞リンパ腫においては腫瘍細胞が LR11 を発現し、その腫瘍進展に関連している可能性が示された。

A. 研究目的

これまでの本事業研究の知見から血液系腫瘍の血清中に可溶性 LR11 濃度が増大することが見出されている。しかしながら実際に腫瘍細胞が LR11 を発現しているかどうかの研究は未だない。そこで腫瘍細胞が LR11 を発現しているかどうかについて、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。

B. 研究方法

生検で採取された 543 例の悪性リンパ腫症例における LR11 蛋白の発現を免疫組織学的に検索した。また LR11 発現と臨床病理学的事項との関連を検討した。

検討した悪性リンパ腫症例は WHO 分類に基づく組織亜型別での発現の有無も検討した。

(倫理面への配慮)

厚生労働省臨床研究指針に基づき研究を行った。なお埼玉医科大学総合医療センター倫理委員会の承認を得ている(承認番号 416)。

C. 研究結果

T 細胞リンパ腫(3.2%;2/62 例)、ホジキンリンパ腫(0%;0/25 例)では発現が 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。

#### D. 考察

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

B細胞リンパ腫においては組織内でLR11蛋白が発現していることが見出された。このことは、B細胞リンパ腫症例の血清中の可溶性LR11上昇は腫瘍細胞から産生されているというこれまでの結果を裏付けるものであり、細胞質内LR11の発現および血清中可溶性LR11の検索が腫瘍マーカーとなりうることを示している。しかしながら、細胞質内LR11の

発現と血清中可溶性LR11の相関や、腫瘍細胞におけるLR11発現のメカニズムおよび役割は未知な点が多く、今後これらについての検討が必要である。

#### F. 健康危険情報

。(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Inoue S, Odaka A, Hashimoto D, Hoshi R, Kurishima C, Kunikata T, Sobajima H, Tamura M, Tamaru J. Rare case of disseminated neonatal zygomycosis mimicking necrotizing enterocolitis with necrotizing fasciitis. *J Pediatr Surg.* 2011, 46(10):E29-32.

Niitsu N, Hayama M, Yoshino T, Nakamura S, Tamaru J, Nakamine H, Okamoto M. Multicentre phase II study of the CycloBEAP regimen for patients with peripheral T-cell lymphoma with analysis of biomarkers. *Br J Haematol.* 2011. 153(5):582-8.

Niitsu N, Tamaru J, Yoshino T, Nakamura N, Nakamura S, Ohshima K, Nakamine H, Okamoto M. A study on nm23-H1 expression in diffuse large B-cell lymphoma that was treated with CycloBEAP plus rituximab therapy.



Ann Hematol. 2011, 90(2):185-92.

Tokuhira M, Watanabe R, Nemoto T, Sagawa M, Tomikawa T, Tamaru JI, Itoyama S, Nagasawa H, Amano K, Kameda H, Takeuchi T, Mori S, Kizaki M. Clinicopathological analyses in patients with other iatrogenic immunodeficiency-associated lymphoproliferative diseases and rheumatoid arthritis., Leuk Lymphoma, Epub 2011 Nov. 1.

Asano N, Kinoshita T, Tamaru J, Ohshima K, Yoshino T, Niitsu N, Tsukamoto N, Hirabayashi K, Izutsu K, Taniwaki M, Morishima Y, Nakamura S. Cytotoxic molecule-positive classical Hodgkin's lymphoma: a clinicopathological comparison with cytotoxic molecule-positive peripheral T-cell lymphoma of not otherwise specified type. Haematologica 96(11):1136-1143, 2011

Miyazaki K, Yamaguchi M, Suzuki R, Kobayashi Y, Maeshima AM, Niitsu N, Ennishi D, Tamaru JI, Ishizawa K, Kashimura M, Kagami Y, Sunami K, Yamane H, Nishikori M, Kosugi H, Yujiri T, Hyo R, Katayama N, Kinoshita T, Nakamura S. CD5-positive diffuse large B-cell lymphoma: a retrospective study in 337 patients treated by chemotherapy with or without rituximab. Ann Oncol. 2011. 22(7):1601-7.

## 2. 学会発表

リンパ節病変で発症した芽球型形質細胞

様樹状細胞の1例 . 岸宏久、小豆畑康児、松浦康弘、青墳信之、脇田久、田丸淳一、三方一澤. 第51回日本リンパ網内系学会福岡. 日本リンパ網内系学会誌 p 90, P2-2

結節性リンパ球優位型 Hodgkin リンパ腫との鑑別を要した T-cell/histiocyte-rich 大細胞 B 細胞リンパ腫 . 萩原由貴、田苗健、郡美佳、羽山弥亨、高橋直樹、田丸淳一、新津望 . 第51回日本リンパ網内系学会 福岡. "日本リンパ網内系学会誌 p106, P8-1

Expression of LR11 in malignant lymphoma. Higashi M, Tokuhira M, Kawaguchi T, Takeuchi M, Ohwada C, Nakaseko C, Bujo H, Kizaki M, Tamaru JI. 第73回日本血液学会、名古屋 . 日本血液学会誌 p253 (OS-1-129)

A novel activated lymphocyte marker TFL is highly expressed in follicular lymphoma but less in DLBCL. Minagawa K, Wakahashi K, Kawano H, Kawano Y, Sato M, Sada, Katayama Y, Tamaru JI, Kizaki M, Matsui T. 第73回日本血液学会、名古屋. 日本血液学会誌 p254 (OS-1-130)

Serum soluble LR11 is a promising novel biomarker for malignant lymphoma. Kawaguchi T, Ohwada C, Sakai S, Takeda Y, Shimizu N, Takeuchi M, Sakaida M, Takubo K, Ebinuma H, Fukamachi I, Higashi M, Tamaru JI, Yokote K, Bujo, Nakaseko C." . 第73回日本血液学会、名古屋 . 日本血液学会誌 p254 (OS-1-131)

Marked improvement of refractory

lymphoplasmacytic lymphoma patient mediated by bortezomib. Ozawa K, Nemoto T, Tokuhira M, Tomikawa T, Sagawa M, Watanabe M, Mori S, Higashi M, Tamaru JI, Kizaki M. 第 73 回日本血液学会、名古屋. 日本血液学会誌 p443 (PS-1-157)

Proposal for blood defense system (BDS) and lymphomas originating from BDS. Kashimura M, Noro M, Akikusa B, Hosoda S, Kojima M, Tamaru JI." . 第 73 回日本血液学会、名古屋 . 日本血液学会誌 p515 (PS-2-78)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

脳脊髄液中および血液中可溶性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

研究分担者 池内 健 新潟大学超域研究機構准教授

研究趣旨

LR11は中枢神経に強く発現しており、アルツハイマー型認知症（AD）の発症病態に関与することが知られている。昨年我々は、脳脊髄液中の可溶性LR11がAD患者で有意に増加していることを報告した。本年度は、新たな脳脊髄液サンプルを収集し、AD患者髄液中の可溶性LR11の定量を行った。その結果、AD群では対照群と比較して、脳脊髄液中の可溶性LR11が有意に増加しており、昨年度の結果を裏付けるデータが得られた。さらに、血液中の可溶性LR11の定量解析を行ったところ、AD群、軽度認知症群で対照群と比較して軽度低下していた。同一患者由来の脳脊髄液中と血液中の可溶性LR11を比較したところ、髄液中可溶性LR11は血液中可溶性LR11より高値を示したが、両者の間に有意な相関関係は認めなかった。中枢神経系における可溶性LR11は、体循環系とは独立した調整メカニズムを受けている可能性が示唆された。

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が関与するという知見に基づき、我々は、脳脊髄液中の可溶性LR11の定量を行い、AD患者では対照群と比較して有意に可溶性LR11が増加していることを報告した。

本年度では、新たに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の有用性の再検討を行った。また同時に、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。

B.研究方法

同意を得た44名のAD患者（検査時年齢73±11歳、MMSE 18±7点、APOE ε4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 ε4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 ε4陽性率33%）からEDTA 2 Na付加真空採血管を用いて血液を採取した。1500g、15分室温で遠心分離を行い、上清を回収した。また、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。血漿中および脳脊髄液中の可溶性LR11の定量は、Matsuoらが報告したサンドイッチELISAを用いた（Matsuo et al. Clin Chem, 2009）。

（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。被験者の本研究への参加においては、研究についての説明を行った上で、本人の研究参加の同意を取得する。

C.研究結果

今年度採取した脳脊髄液を用いて可溶性LR11の定量解析を行ったところ、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。APOEε4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。

#### D. 考察

昨年、AD患者の脳脊髄液中では可溶性LR11が対照群と比較して有意に上昇していることを報告した。本年は、新たに同意を得た患者から脳脊髄液を採取し、昨年と同様にAD患者で脳脊髄液中の可溶性LR11が増加していることを明らかにした。最近、Alexopoulosらはドイツ人、AD、MCI、FTLD患者の脳脊髄液中の可溶性LR11の定量解析の結果を報告した (Alexopoulos et al. J Alzheim Dis 2011)。彼らは、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、有意差は見いだせなかったと報告している。また髄液中可溶性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を明らかにしている。今後はさらに多施設、多人種における脳脊髄液中の可溶性LR11の解析が望まれる。

次に、今年度は血液中の可溶性LR11の定量解析を行った。AD患者、MCI群では、対照群と比較して、血漿中の可溶性LR11が軽度低下していた。AD患者において、可溶性LR11は脳脊髄液中で上昇し、血液中で低下する機序は今のところ明らかでない。

#### 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今後必要である。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。

**F. 健康危険情報：** 該当なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表：論文発表準備中

2. 学会発表

- 1) 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 2011. 5. 20 名古屋
- 2) T. Ikeuchi, S. Hirayama, T. Miida, T. Tokutake, R. Yajima, M. Jiang, H. Bujo, M. Nishizawa  
Quantification of soluble LR11/SorLA in CSF and plasma of patients with Alzheimer disease. Keystone Symposia. ApoE, Alzheimer's, and lipoprotein biology, 2012.2.27. Keystone, USA

**H. 知的財産権の出願・登録状況：** 該当なし

## 造血器悪性腫瘍における新たなバイオマーカー可溶性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。我々は末梢血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( $< 20$  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。さらに、悪性リンパ腫では、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫、ろ胞性リンパ腫で有意に高値であり、初発時高値群では予後が有意に不良であり、独立した予後因子となることが示された。

### 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。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。可溶性受容体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、血清可溶性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、RPMI8226、THP-1、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

#### 1. 後方視的解析

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) の治療プロトコー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。

#### 2. 前方視的解析

千葉大学医学部附属病院及び関連施設における急性白血病、悪性リンパ腫患者を同意を得た後に連続的に登録し、前方視的に診断時および治療後の血清 LR11 値を測定した。

### 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 ラベルした抗 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  $\mu$ l 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、 $73.5 \pm 93.5$  ng/ml (range, 5.7-407.0)、 $P < .0001$ ; AML、 $26.8 \pm 29.1$  ng/ml (range, 5.0-157.5)、 $P < .0001$ 、正常コントロール  $9.2 \pm 3.3$  ng/ml]。慢性骨髄性白血病 (CML;  $17.9 \pm 11.1$  ng/ml)、慢性リンパ性白血病 (CLL;  $12.7 \pm 11.6$  ng/ml)、多発性骨髄腫 ( $10.5 \pm 4.8$  ng/ml)、POEMS 症候群 ( $9.0 \pm 2.7$  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。

### 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 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) と低位群 (<20.0% of WBC) と比較して有意に高値であった (図 2)。

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  $\geq 20$  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。

### 悪性リンパ腫における血清 sLR11 の意義

悪性リンパ腫の中で頻度の高いびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (DLBCL) とろ胞性リンパ腫 (FL) について、抗 LR11 抗体を用いて生検組織の免疫染色を行った所、リンパ腫細胞で高率に LR11 が陽性に染色され、悪性リンパ腫細胞で LR11 が高発現していることが明らかとなった (図 4)。次に、血清 sLR11 値を測定した所、 $17.4 \pm 14.5$  ng/ml、 $22.2 \pm 25.2$  ng/ml であり、有意に高値であった。初診時高値例では治療後寛解時に正常化した。単変量解析による他の因子との相関では、DLBCL では、骨髄浸潤、LDH、b2-MG、FL では骨髄浸潤、LDH、sIL-2R が有意に sLR11 値と相関する因子であった。また現在臨床にて使用されている予後予測モデルである、DLBCL における International Prognostic Index (IPI)、FL における Follicular Lymphoma IPI (FLIPI) との相関を見ると、多変量解析においても有意に sLR11 と相関することが示された (表 1)。初診時の sLR11 値が 16ng/ml 以上、未満の 2 群にわけて PFS を解析すると、DLBCL、FL とともに有意に sLR11 高値群が予後不良であった。

## D 考察

本研究において、末梢血白血球では単球に 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することが示されており、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、悪性リンパ腫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細胞で高発現し、血清中の sLR11 は急性白血病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。さらに、悪性リンパ腫においては、DLBCL、FL とともに初発時有意に sLR11 が高値であり、予後を規定する独立した因子となりうることを示された。

## F. 研究発表

1. Kawaguchi T, Ohwada C, Higashi M, et al. Serum soluble LR11 is a promising novel biomarker for B cell lymphoma. Poster session, The 53rd American Society of Hematology, San Diego, Dec 10-13, 2011
2. Shimizu N, Nakaseko C, Takeuchi M, et al. Soluble LR11, 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. Poster session, The 53rd American Society



of Hematology, San Diego, Dec 10-13, 2011

3. Shimizu N, Nakaseko C, Takeuchi M, 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, March, 2011.

4. Takeuchi M, Ohwada C, Sakai S, et al. LR11 is a novel surface marker for normal leukocytes and leukemia cells. The 52th American Society of Hematology, Publication only, Orlando, Dec 2010

5. Ohwada C, Takeuchi M, Sakai S, et al. Prognostic Impact of a Novel Biomarker, Serum Soluble LR11 on Acute Leukemias. The 52th American Society of Hematology, Poster session, Orlando, Dec 2010

6. Nakaseko C, Sakai S, Takeuchi M, 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

7. Sakai S, Nakaseko C, Takeuchi M, et al. Soluble LR11 is a novel biomarker for acute leukemias. Oral session, The 72th Japanese Society of Hematology, Yokohama, 2010

8. Takeuchi M, Nakaseko C, Ohwada C, 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

9. Ohwada C, Nakaseko C, Sakai S, 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

1. Sakai S, Nakaseko C, Takeuchi M et al. Circulating soluble LR11/SorLA levels are highly increased and ameliorated by chemotherapy in acute leukemias. Clinica Chimica Acta in press

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

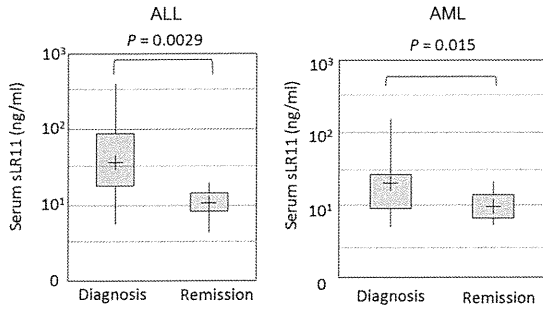


図4 急性白血病における血清 sLR11

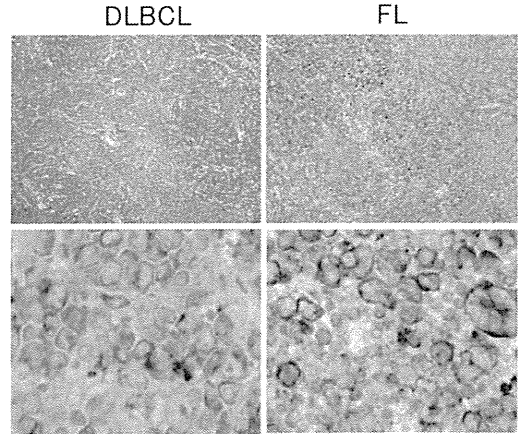


図2 AMLにおける末梢血芽球割合と sLR11

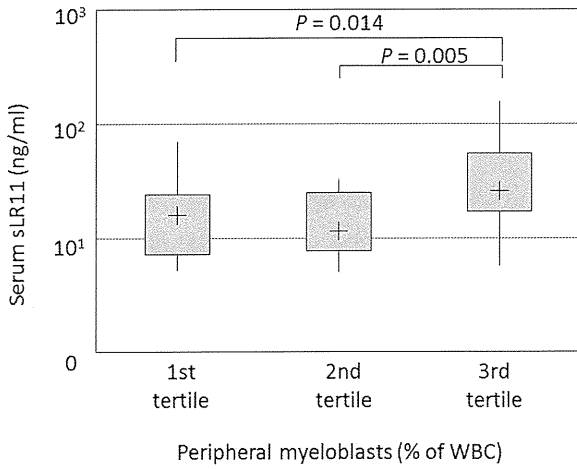


図5 初診時 sLR11 値は DLBCL, FL の予後を規定する

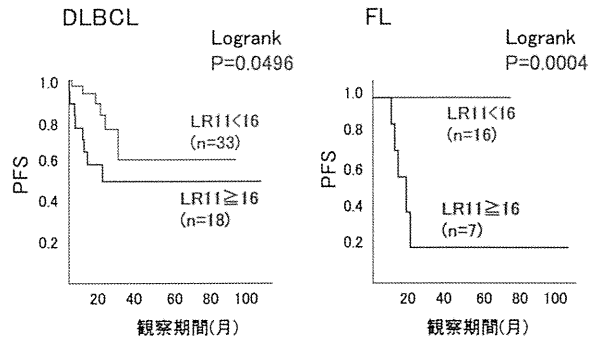


図3 AMLにおける全生存率

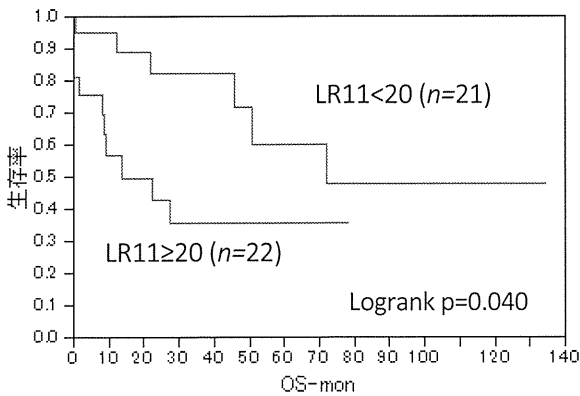


表1 DLBCL, FL と IPI, FLIPI の相関 (多変量解析)

DLBCL			
DLBCL		HR (95% CI)	P 値
IPI	High vs. high-int vs. low-int vs. low	2.26 (1.20-4.26)	0.012
血清sLR11値 (ng/ml)	≥ 16 vs. < 16	1.35 (0.43-4.26)	0.61
FL			
FLIPI		HR (95% CI)	P 値
FLIPI	High vs. int vs. low	1.52 (0.16-14.9)	0.93
血清sLR11値 (ng/ml)	≥ 16 vs. < 16	2.86 × 10E8 (NA)	0.001

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】川崎病遠隔期において、血中可溶性 LR11 と他の様々な血管障害関連バイオマーカーとを比較し、可溶性 LR11 のバイオマーカーとしての有用性を検討する。【方法】川崎病遠隔期患者 25 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。

【結果】可溶性 LR11 は冠動脈病変（以下 CAL）群が no CAL 対照群より有意に高値であり、sE-selectin と有意な正相関があった。【結論】可溶性 LR11 は川崎病後遺症の血管障害を反映し、血管内皮障害との関連が示唆された。

A. 研究目的

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。昨年度我々は、可溶性 LR11 が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ことを示した。今回さらに、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。

B. 研究方法

川崎病遠隔期患者 25 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）：no CAL 群（8 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（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）。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（2 人）とした。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。血中濃度を測定した血管障害関連バイオマーカーは、可溶性 LR11 と MCP-1、TNF alpha、MMP-9、PAI-1、IL-6、PDGF-BB、ICAM-1、sE-selectin であった。可溶性 LR11 以外は、蛍光マイクロビーズアレイ法により測定した。

(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

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。また体重、BMI、血圧、脂質マーカー(LDL-C, HDL-C)は4群間で差はなかった。可溶型LR11は、4群間に有意差を認めた。(CAL群:  $10.1 \pm 0.3$  ng/ml, Reg群:  $7.6 \pm 0.9$  ng/ml, no CAL群:  $8.5 \pm 0.6$  ng/ml, 対照:  $7.7 \pm 0.8$  ng/ml, ANOVA,  $p=0.003$ )。また可溶型LR11以外では、MCP-1/CCL2のみが4群間で有意差を認めた(CAL群:  $87.1 \pm 22$  pg/ml, Reg群:  $65.3 \pm 18$  pg/ml, no CAL群:  $55.6 \pm 6$  pg/ml, 対照:  $46.4 \pm 8$  pg/ml, ANOVA,  $p=0.003$ )が、可溶型LR11とMCP-1/CCL2との関連はなかった。可溶型LR11はsE-selectin/CD62Eと有意な正相関を認めた( $r^2=0.21$ ,  $p=0.003$ )。

### D. 考察

可溶型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。今後、前向き研究を継続し、この点について

検討する予定である。またsE-selectinと有意な正相関があり、血管内皮障害との関連が示唆された。

### E. 結論

可溶型LR11が川崎病後遺症の血管障害を反映し、血管内皮障害との関連が示唆された。

### G. 研究発表

学会発表

- 1) 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
- 2) 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 10<sup>th</sup> International Kawasaki Disease Symposium. 2012.2.7

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