

201207016A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

医薬品開発時の有効性評価に有用なサロゲート
バイオマーカーの開発
—虚血性心疾患イベントのサロゲートマーカーの実現—

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 鈴木 亨

平成25（2015）年 5月

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

医薬品開発時の有効性評価に有用なサロゲート
バイオマーカーの開発
－虚血性心疾患イベントのサロゲートマーカーの実現－

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 鈴木 亨

平成25（2013）年 5月

目 次

I. 総括研究終了報告

医薬品開発時の有効性評価に有用なサロゲートバイオマーカーの開発
—虚血性心疾患イベントのサロゲートマーカーの実現—

鈴木 亨 ----- 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 9

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 11

I. 総括研究終了報告

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総括研究年度終了報告書

医薬品開発時の有効性評価に有用なサロゲートバイオマーカーの開発
－虚血性心疾患イベントのサロゲートマーカーの実現－

研究代表者 鈴木 亨

東京大学大学院医学系研究科ユビキタス予防医学講座 特任准教授

研究要旨

本研究では虚血性心疾患イベントのサロゲートマーカーの開発を目指す。循環器疾患の臨床試験は近年の大規模臨床試験の時代を先導してきたが、代表的なイベントである虚血性心疾患は発症率が低いため、有意な結果を得るために必要な症例数並びに追跡期間が大規模化していることが問題となっている。このため、長期間に及ぶイベント発症の追跡調査に代わり短期間に容易に病態変化を反映するバイオマーカー、すなわちサロゲートマーカーの開発が喫緊の課題である。

我々は、虚血性心疾患の発症および悪化を反映する世界で初めてとなるバイオマーカーを最近開発し、特許も出願済である。血液試料から虚血性心疾患患者に特異的な心血管系特異的ペプチドの変化を質量分析計で分析する革新的なものである。既に初期検討にて、心臓カテーテル治療後に生じる再狭窄を感度100%で除外診断可能な性能を有することを検証済みであり、心臓カテーテル検査に代替する検査法として期待されている。重要なことは、現在の狭窄のみならず将来の狭窄を生じる可能性（予測）についても感度100%で除外診断可能な点である。現在、先進医療申請に向けて測定法の最適化（前処理、検出法等）を実施中である。

本研究では、本バイオマーカーを虚血性心疾患イベントのサロゲートマーカーとして応用すべく、その実現可能性を検討する。そのために、研究期間中に冠動脈疾患に対する3つの大規模臨床試験（[1]動脈硬化生理検査としての血流依存性血管拡張反応検査（FMD法）の有用性検討、[2]薬物介入としての脂質異常治療薬の有効性検討、[3]糖尿病治療薬の有効性検討）を利用する。研究初年度（平成24年度）は計画通り分析を行い、検体の収集が先行している[1]動脈効果生理検査の分析を行った（644例/目標600例）。また[2]脂質異常治療薬の有効性検討においては100例（目標100例）、[3]糖尿病治療薬の有効性検討においては9例（目標9例）、それぞれ計画通りの分析を行った。一方、本バイオマーカー検出の感度向上のための条件検討を行った。本研究により得られた成果は医薬品開発時の治験、臨床研究における有効性評価のためのサロゲートマーカー、薬剤内服時の効果判定として活用可能なコンパニオンバイオマーカー開発につながるものと考えられる

A. 研究目的

循環器疾患の臨床試験は近年の大規模臨床試験の時代を先導してきたが、その代表的なイベントである虚血性心疾患は発症率が低いため（0.16%程度）、有意な結果を得るために必要な症例数並びに追跡期間が大規模化している（例：5千人を5年間追跡で25億円規模）。長期間に及ぶイベント発症の追跡に代わり、短期間に容易に病態変化を反映するバイオマーカー、すなわちサロゲートマーカーの開発が喫緊の課題である。

我々は、虚血性心疾患の発症および悪化を反映する世界で初めてのバイオマーカーを最近開発し、特許も出願済である。心臓の慢性虚血時にみられる心血管系特異的ペプチドに着目し、心臓カテーテル治療後の再狭窄（約半年後に病変が再度進行ないし治療に対する反応として狭窄する現象）を示した、あるいは将来的に示す症例では、このペプチドが減少することを見いだした。本バイオマーカーの開発自体は別途、平成23-25年度厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）にて実施中であるが、これまでに、心臓カテーテル治療後に生じる再狭窄を感度100%により除外診断可能な性能（検出能ならびに予測能）を有することを検証した。心臓カテーテルに代替する血液検査として高い診断性能を有すのみならず、低侵襲・低コストの点でも優れていることを確認済みである。本研究に関連した重要なことは、現在の狭窄のみならず将来の狭窄を生じる可能性（予測）についても感度100%で除外診断可能な点である。

本研究では、我々が開発したバイオマーカーを応用し、虚血性心疾患イベントの発症を予測するサロゲートマーカーとしての臨床的有用性を確立するため、大規模臨床試験に乗せてその検証を

行う。具体的には、研究期間中に冠動脈疾患に対する3つの大規模臨床試験（[1]動脈硬化生理検査としての血流依存性血管拡張反応検査（FMD法）の有用性検討、[2]薬物介入としての脂質異常治療薬の有効性検討、[3]糖尿病治療薬の有効性検討）を利用することにより、冠動脈疾患ハイリスク患者の前向き研究とのカップリングで約2万年規模の大規模研究を実施する計画である。

本研究により得られた成果は医薬品開発時の治験、臨床研究における有効性評価のためのサロゲートマーカー、薬剤内服時の効果判定として活用可能なコンパニオンバイオマーカー開発につながるものと考えられる。

B. 研究方法

本研究では我々が開発した新しいバイオマーカーの虚血性心疾患イベントのサロゲートマーカーとしての診断的意義また臨床的有用性を確立する。その新しいバイオマーカーとは、心血管病態時に特異的に発現する蛋白質であるナトリウム利尿ペプチド（BNP）から、慢性虚血時に生じる特異なプロセッシング産物を質量分析計で測定することを測定原理とするものである。このバイオマーカーを研究期間3年間に前向きコホートにおいて経時的な解析を行い、病態変遷との関係を検討する。具体的な計画として、東京大学医学部附属病院で実施中の下記3つの冠動脈疾患に対する大規模臨床試験で解析予定である（図1）。いずれも前向きコホート研究に計画段階から参加することにより、サロゲートマーカーの検証に最適な大規模臨床試験とのカップリングを行うことが可能となっている。虚血性心疾患イベント等の病態との相関だけではなく、当該患者のさまざまな内服薬の処方履歴との相関も詳細に検討

する。このことにより、サロゲートマーカーとしてのみならず、治療効果や創薬に役立つやコンパニオン診断薬への活用可能性も検討する。今回実施する臨床試験とのカップリング研究について、臨床試験自体の経費は各臨床試験の主催者の負担で行われるものである。先述したように、通常、イベント追跡のための臨床試験には膨大なコスト（数十億円程度）と長期間（3～5年程度）の観察が必要であり、研究経費と研究期間の限られた通常の学術研究単独では実施困難である。したがって、今研究のような、先行する臨床試験にカップリングすることが可能なタイミングと施設が整った研究環境は時宜を得ている。具体的な計画は下記の通りである（図1）。

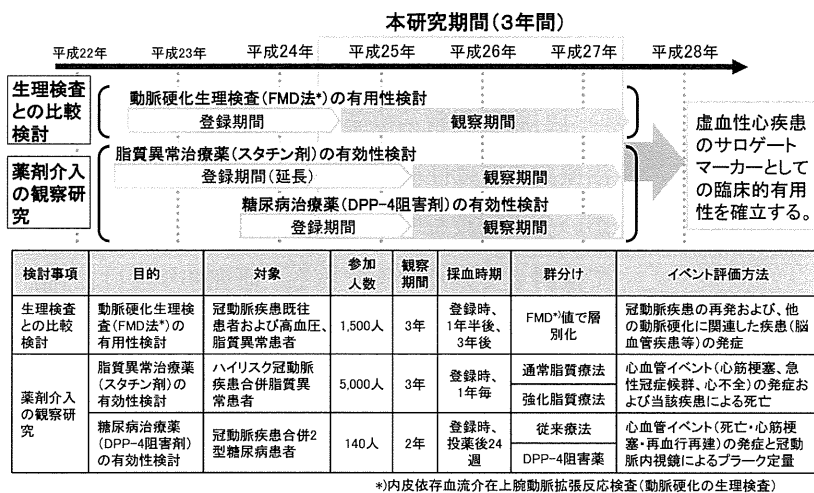


図1 3つの大規模臨床試験

(1) 動脈硬化生理検査 (FMD法) の有用性検討

多施設共同研究「FMD 共同研究グループ」により、新たな動脈硬化の生理検査法である血流依存性血管拡張反応検査(FMD)の動脈硬化性心血管疾患診療指標としての有用性が検討されている。我々も同グループの運営委員を務めており、その共同研究施設として計画段階より研究参加している。全国約12施設にて登録期間2年に合計1,500例で3年間、すなわち4千5百人年規模で試験前と経時

的な追跡（1年ごと）を実施する。イベント（外来通院中に冠動脈疾患の再発および、脳血管疾患等、他の動脈硬化に関連した疾患）発症の有無を追跡し、本バイオマーカーと虚血性心疾患イベント発症との関連性を検討する。

(2) 脂質異常治療薬（スタチン剤）の有効性検討
国内製薬会社による大規模臨床試験であり、糖尿病性網膜症合併高コレステロール血症患者を対象としたスタチンによる通常療法対強化療法の前向き比較研究である。約5,000人で約3年間、すなわち1.5万人年規模で心血管病の発症（冠動脈疾患、心血管疾患による死亡、入院など）を追跡する研究である。試験前と経時的な追跡（1年目、試験終了時等）を行い、本バイオマーカーと虚血性心疾患イベント発症との関連性を検討する。

(3) 糖尿病治療薬（DPP-4阻害剤）の有効性検討

医師主導の自主臨床試験であり、冠動脈疾患を発症した2型糖尿病患者における新規糖尿病治療薬ジペプチジルペプチターゼ4（DPP-4）阻害薬投与群および従来糖尿病療法群の冠動脈プラーク・血流への影響に関する前向き無作為比較試験である。約140例で約2年間、すなわち280人年規模で冠動脈超音波により冠動脈プラークの容積測定に加え、心血管イベント（死亡・心筋梗塞・再血行再建）の発症率を追跡する。試験前と試験終了時に追跡し、本バイオマーカーと虚血性心疾患イベント発症と関連性を検討する。

(倫理面への配慮)

本研究（東京大学医学部附属病院循環器内科に

循環器疾患で入院した症例および同院検診部を受検した健常例に対するプロテオーム解析による新規診断法の開発) はすでに当施設の倫理委員会の承認 (平成21年6月19日承認、承認番号448(2)) を得ており、当院の倫理規定に従って遂行した。

C. 研究結果

研究初年度 (平成24年度) は検体収集の先行している [1] 動脈硬化生理検査の有用性検討の臨床試験における検体の分析を行った (644例/目標600例)。分析を行った検体の臨床情報と質量分析計による検体の測定結果との相関を調べた。すなわちイベント有りの群とイベント無しの群の2群において本バイオマーカーの値とがどのように相関しているかを検討した。従来の測定手法による血液中のBNP量 (BNP値) との相関をまず検討したところ、イベントの有無との相関は認められなかった (図2)。次に、本バイオマーカーとイベ

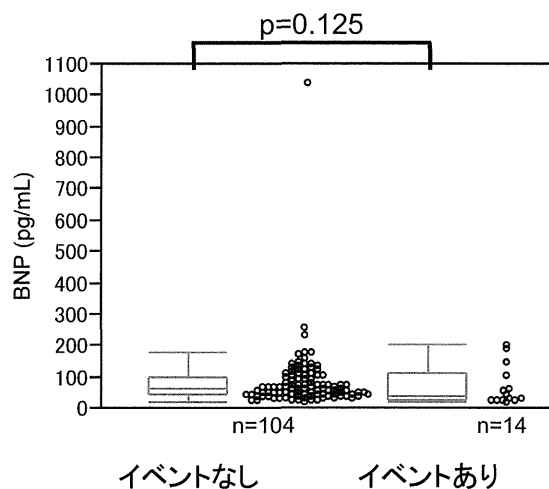


図2 BNP値とイベントとの相関

ントの有無との相関を検討した。その結果、統計的に有意ではないが、カットオフ値を決めることにより、このマーカーが「除外診断マーカー」と

して有用である可能性を示唆するデータを得た (図3)。今後、さらに検体分析を行い、分析数

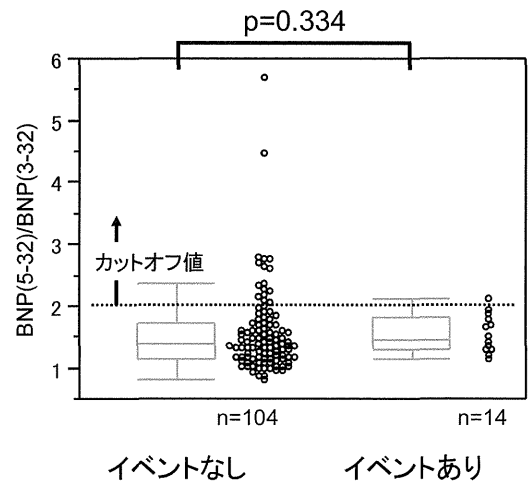


図3 本バイオマーカーとイベントとの相関

を増やすことで有用性の確立を目指す計画である。

[2] 脂質異常治療薬の有効性検討、[3] 糖尿病治療薬の有効性検討に関しても、今後計画にしたがい分析例数を増やし、臨床情報との相関について検討していく計画である。研究初年度は [2] 脂質異常治療薬の有効性検討においては100例 (目標100例)、[3] 糖尿病治療薬の有効性検討においては9例 (目標9例)、それぞれ計画通りの分析を行った。

現在、本バイオマーカーはBNP値で約30 pg/mL以上の検体において検出が可能となっている。临床上、18.3 pg/mLが正常値の上限となっており、この値以上は、何らかの心疾患疑いとなっている。この検出感度をさらに向上させることは、具体的な症状を呈していないものの動脈硬化の進展を検出する可能性があり、本研究にとって有意義である。そのため、最近、検出感度の向上が進み、さらに今後、測定の自動化が可能となる期待のある液体クロマトグラフ質量分析計を用いて、

分析条件の検討を行い、検出感度の向上をめざした。

この質量分析計は質量分析部が3つ直列につながった三連四重極型となっているものであり、測定する因子をアルゴンガスなどと衝突させ、その結果生じた断片を検出するというマルチプルリアクションモニタリング(MRM)法という高感度な検出法が可能となっている。

条件検討の結果、標品を用いた分析においては1 fmolという微量を検出することが可能となった。これ検体においては約15 pg/mLが検出する感度に相当し、検出感度の向上をはかることができた(図4)。症状を呈していない検体においては、15 pg/mL以下であることが多いため、今後、さらに検出感度の向上をめざす。

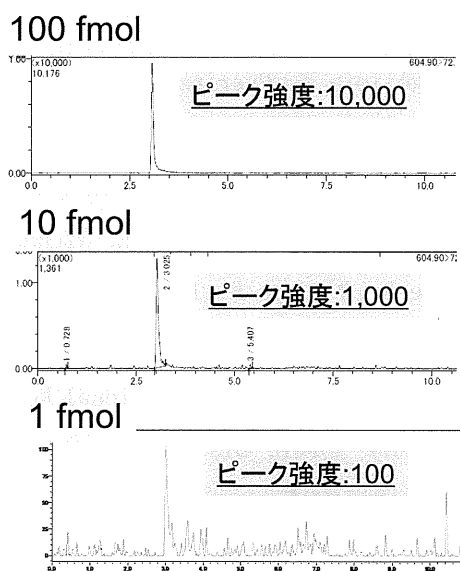


図4 検出感度の検討

本研究により得られた成果は医薬品開発時の治験、臨床研究における有効性評価のためのサロゲートマーカー、薬剤内服時の効果判定として活用可能なコンパニオンバイオマーカー開発につながるものと考えられる。

なお、医薬品の開発・製品化においては、製品化から市販に至るまでには数百億円以上のコストが必要とされており、第1~3各相の治験も含まれる。今回開発するサロゲートマーカーによりイベント予知が可能となれば試験期間の短縮により実施費用の削減が可能となる。本検査の費用を仮に1件5,000円と試算しても99%減となり、2万人年規模の検査費用は3,300万円に抑えられ、その差は実に19.6億円超となる。

昨今の新成長戦略や医療イノベーション会議等において、日本発の革新的医薬品の創出が求められている中、本研究はそれらの施策に資するものである。

本サロゲートマーカーはイベント予知のみならず、医薬品開発時の候補物質のスクリーニングや薬剤によるヒトにおける副作用発現予測などに活用可能と考えられる。分子標的薬のより効果的な使用を目的とした、その標的分子の発現等を診断するためのコンパニオン診断薬の創出に資する新規バイオマーカーの開発に関する研究であり、新薬開発も促進すると考えられる。

D. 健康危険情報

該当無し。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujimoto H, Suzuki T, Aizawa K, Sawaki D, Ishida J, Komuro I, Nagai R. Processed B-type natriuretic peptide is a biomarker of post-interventi restenosis in ischemic heart disease. *Clin Chem*, in press.
2. Enokoku K, Ikeda H, Kato R, Kume Y, Yoshida H, Ono T, Aizawa K, Suzuki T, Yamzaki T,

- Yatomi Y. Inverse correlations between serum ADAMTS13 levels and systolic blood pressure, pulse pressure, and serum C-reactive protein levels observed at a general health examination in a Japanese population: a cross-sectional study. *Clin. Chim. Acta*, 2013 in press.
3. Garrido-Martín EM, Blanco FJ, Roque M, Novensà L, Tarocchi M, Lee UE, Suzuki T, Friedman SL, Botella LM, Bernabeu C. Vascular injury triggers Krüppel-like factor 6 (KLF6) mobilization and cooperation with Spl to promote endothelial activation through upregulation of the Activin Receptor-Like Kinase 1 (ALK1) gene. *Circ Res*, 2013; 112:113-127.
 4. Sawaki D, Suzuki T. Targeting Transforming Growth Factor-beta signaling in aortopathies in Marfan Syndrome. *Circ J*, 2013; 77:898-899.
 5. Suzuki T, Bossone E, Sawaki D, Jánosi RA, Erbel R, Eagle K, Nagai R. Biomarkers of aortic diseases. *Am Heart J*, 2013; 165:15-25.
 6. Bossone E, Suzuki T, Eagle KA, Weinsaft JW. Diagnosis of Acute Aortic Syndromes - Imaging and Beyond. *Herz*, 2012; 38:269-276.
 7. Di Eusanio M, Trimarchi S, Patel HJ, Hutchison S, Suzuki T, Peterson MD, Di Bartolomeo R, Folesani G, Pyeritz RE, Braverman AC, Montgomery DG, Isselbacher EM, Nienaber CA, Eagle KA, Fattori R. Clinical presentation, management, and short-term outcome of patients with type A acute dissection complicated by mesenteric malperfusion: Observations from the International Registry of Acute Aortic Dissection. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2013; 145:385-390.
 8. Ishida J, Suzuki T, Aizawa K, Sawaki D, Nagai R. Comparison of Analytical Performance of Two Single-step Measurement Devices of B-type Natriuretic Peptide. *Int Heart J*, 2012; 53:320-3.
- ## 2. 学会発表
1. Evangelista A, Pyeritz R, Voehringer M, Myrmet T, Ehrlich M, Peterson M, Pape L, Suzuki T, Jondeau G, Ballotta A, Montgomery D, Isselbacher E, Nienaber C, Eagle K, O' Gara P: Influence of Family History on Acute Aortic Dissection: An Analysis from the International Registry of Acute Aortic Dissection (IRAD). The American College of Cardiology 62nd Annual Scientific Session (San Francisco, USA). 2013. 3. 9-11
 2. Zhan H, Suzuki T, Aizawa K, Sawaki D, Ishida J, Son BK, Miyagawa K, Komuro I, Nagai R: Ataxia telangiectasia mutated (ATM)-mediated DNA damage response in cardiac fibroblasts plays an important role in doxorubicin-induced

- cardiotoxicity. Gordon Research Conferences; Mammalian DNA Repair (Ventura, CA, USA). 2013. 2.10-15.
3. Son BK, Suzuki T, Sawaki D, Aizawa K, Zhan H, Ishida J, Matsumura T, Nagai R: KLF6 Modulates Aortic Aneurysm Formation by Balancing Between Inflammatory and TGF β Signaling Pathways. American heart association scientific sessions 2012 (Los Angeles, USA). 2012. 11.3-7.
 4. Mizuno Y, Suzuki T, Kohro T, Iimuro S, Yamazaki T: B-type Natriuretic Peptide and Subclinical Atherosclerosis in Healthy Population. American heart association scientific sessions 2012 (Los Angeles, USA). 2012. 11.3-7.
 5. Sawaki D, Suzuki T, Aizawa K, Matsumura T, Munemasa Y, Ishida J, Friedman S, Nagai R: Cardiomyocyte Regulates Cardiac Fibrosis through Cell to Cell Interaction Mediated by KLF6. American heart association scientific sessions 2012 (Los Angeles, USA). 2012. 11.3-7.
 6. Bossone E, Harris KM, Suzuki T, Fattori R, Hutchison S, Ehrlich MP, Pyeritz RE, Steg PG, Greason K, Evangelista A, Voehringer M, Montgomery DG, Isselbacher EM, Nienaber CA, Eagle KA: Stroke and Outcomes in Patients with Acute Type A Aortic Dissection. American heart association scientific sessions 2012 (Los Angeles, USA). 2012. 11.3-7.
 7. Ishida J, Suzuki T, Aizawa K, Sawaki D, Matsumura T, Friedman SL, Nagai R: Krüppel-like Factor 6 Promotes Obesity and Glucose Intolerance Through Adipocyte Differentiation. American heart association scientific sessions 2012 (Los Angeles, USA). 2012. 11.3-7.
 8. Suzuki T, Isselbacher EM, Eagle KA, Nienaber CA, Sawaki D, Hagan LM, Montgomery DG, Froehlich JB: Effect of Medical Treatment for Aortic Dissection on In-Hospital Mortality and Follow-Up Aortic Expansion in Patients with and Without Marfan Syndrome; Observations from the International Registry of Acute Aortic Dissection. American heart association scientific sessions 2012 (Los Angeles, USA). 2012. 11.3-7.
 9. Bossone E, Korach A, Fattori R, Hughes GC, Tsai TT, Montgomery DG, Eagle KA, Nienaber CA, Isselbacher EM, Suzuki T: Racial differences in acute aortic dissection: insights from the International Registry of Acute Aortic. ESC CONGRESS 2012 (Munich, Germany). 2012. 8.25-29
 10. Suzuki T: Biomarkers of aortic disease. ESC CONGRESS 2012 (Munich, Germany). 2012. 8.25-29
 11. Sawaki D, Suzuki T: Cardiomyocyte regulates cardiac fibrosis through cell to cell interaction mediated by KLF6. FASEB Science Research Conferences (Colorado USA). 2012. 8.5-10

12. Suzuki T: KLF6 in cardiovascular and metabolic disease. 2012 FASEB Science Reserch Confernces (Colorado USA). 2012. 8. 5-10
13. Zhan H, Suzuki T, Aizawa K, Sawaki D, Ishida J, Son BK, Miyagawa K, Komuro I, Nagai R: Doxorubicin-induced Cardiotoxicity is Mediated by Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) in Cardiac Fibroblasts. 第77回日本循環器学会総会・学術集会 (横浜) 2013. 3. 15-17.
14. Aizawa K, Suzuki T, Zhan H, Sawaki D, Ishida J, Komuro I, Nagai R: Histone H2AX is Important in the Regulation of Cardiac Hypertrophy. 第77回日本循環器学会総会・学術集会 (横浜) 2013. 3. 15-17.
15. Son BK, Suzuki T, Sawaki D, Aizawa K, Matsumura T, Ishida J, Zhan H, Komuro I, Nagai R: KLF6 Modulates Aortic Aneurysm Formation by Regulating Both of Inflammatory and TGFbeta Signaling Pathways. 第77回日本循環器学会総会・学術集会 (横浜) 2013. 3. 15-17.
16. Ishida J, Suzuki T, Aizawa K, Sawaki D, Matsumura T, Nagai R, Komuro I: Kruppel-like Factor 6 (KLF6) Promotes Glucose Intolerance and Obesity. 第77回日本循環器学会総会・学術集会 (横浜) 2013. 3. 15-17.
17. Matsumura T, Nishimura S, Manabe I, Suzuki T, Ogawa S, Eto K, Komuro I, Nagai R: Platelet Surface Molecules Regulated by KLF5 are Critical to *in vivo* Thrombus Formation and Angiogenesis. 第77回日本

循環器学会総会・学術集会 (横浜)
2013. 3. 15-17.

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 鈴木亨、日本電気株式会社 宮崎賢司 他、積水メディカル株式会社：心疾患診断マーカー 特許出願2011-175982 (出願日2011年8月11日) 出願人：東京大学、NEC、積水メディカル
2. 鈴木亨、藤本宏隆：血液試料を用いて心筋虚血状態を評価する方法 国際出願PCT/JP2008/65444 (2008年8月28日) 出願人：国立大学法人東京大学、株式会社島津製作所

2. 実用新案登録

該当無し。

3. その他

該当無し。

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Fujimoto H, Suzuki T, Aizawa K, Sawaki D, Ishida J, Komuro I, Nagai R	Processed B-type natriuretic peptide is a biomarker of post-interventi restenosis in ischemic heart disease.	Clin Chem	未定	未定	2013(in press)
相澤 健一, 鈴木 亨	新しい動脈硬化のバイオマーカー開発：新しいプロテオーム技術を用いて(3. 動脈硬化のバイオマーカーの臨床的意義, <特集>第76回日本循環器学会学術集会)	循環器専門医 : 日本循環器学会専門医誌	20(2)	237-244	2012
相澤 健一, 鈴木 亨	バイオマーカーの探索・発見・同定の試(5. 今後のバイオマーカーの展望, 特集: 循環器病のバイオマーカー企画・構成/井上晃男)	Heart View	16(12)	306-310	2012

III. 研究成果の刊行物・別刷

Processed B-Type Natriuretic Peptide Is a Biomarker of Postinterventional Restenosis in Ischemic Heart Disease

Hiroataka Fujimoto,^{1,2} Toru Suzuki,^{1,3*} Kenichi Aizawa,¹ Daigo Sawaki,^{1,3} Junichi Ishida,¹ Jiro Ando,¹ Hideo Fujita,¹ Issei Komuro,¹ and Ryoza Nagai¹

BACKGROUND: Restenosis, a condition in which the lesion vessel renarrows after a coronary intervention procedure, remains a limitation in management. A surrogate biomarker for risk stratification of restenosis would be welcome. B-type natriuretic peptide (BNP) is secreted in response to pathologic stress from the heart. Its use as a biomarker of heart failure is well known; however, its diagnostic potential in ischemic heart disease is less explored. Recently, it has been reported that processed forms of BNP exist in the circulation. We hypothesized that circulating processed forms of BNP might be a biomarker of ischemic heart disease.

METHODS: We characterized processed forms of BNP by a newly developed mass spectrometry–based detection method combined with immunocapture using commercial anti-BNP antibodies.

RESULTS: Measurements of processed forms of BNP by this assay were found to be strongly associated with presence of restenosis. Reduced concentrations of the amino-terminal processed peptide BNP(5–32) relative to BNP(3–32) [as the index parameter BNP(5–32)/BNP(3–32) ratio] were seen in patients with restenosis [median (interquartile range) 1.19 (1.11–1.34), $n = 22$] vs without restenosis [1.43 (1.22–1.61), $n = 83$; $P < 0.001$] in a cross-sectional study of 105 patients undergoing follow-up coronary angiography. A sensitivity of 100% to rule out the presence of restenosis was attained at a ratio of 1.52.

CONCLUSIONS: Processed forms of BNP may serve as viable potential biomarkers to rule out restenosis.

© 2013 American Association for Clinical Chemistry

Percutaneous coronary intervention (PCI)⁴ procedures are widely used today to treat coronary artery

disease (1, 2). Even with use of drug-eluting stents, restenosis (as defined as renarrowing of the treated lesion at approximately 3–6 months after the procedure, which often requires another intervention procedure to treat) still remains a limitation and occurs in >10% of patients. The pathology underlying restenosis is complex, involving a multitude of processes (inflammatory response to endothelial denudation and subintimal hemorrhage triggered by angioplasty followed by vascular smooth muscle cell proliferation and migration, extracellular matrix formation, and vascular remodeling) (3). The mechanisms of restenosis are not yet fully understood, and, therefore, targeted medical intervention and biomarkers reflective of the process have yet to be developed to improve management of the condition and risk stratification. Clinical algorithms for the identification of patients at risk for this condition have not proven reliable, making clinical assessment of the condition difficult (4–6). Owing to a compliant medical care system, patients undergoing an intervention procedure in Japan are generally given a follow-up angiogram at approximately 6 months to examine for presence of restenosis, but in most countries a follow-up angiogram is still limited to symptomatic patients. A surrogate biomarker that could help identify patients at risk for restenosis would therefore be welcome.

B-type natriuretic peptide (BNP) is a bioactive peptide that counteracts hemodynamic stress induced by various pathologic conditions through actions such as natriuresis and vasodilation (7, 8). BNP is released into the circulation in large amounts during heart failure, allowing its measured circulating concentrations to be used in diagnosis of this condition (7–10). BNP concentrations are also moderately increased in ischemic heart disease, but their diagnostic potential in this condition is less well explored (11, 12). BNP is synthesized as a propeptide, preproBNP(1–134), that under-

¹ Department of Cardiovascular Medicine and ³ Department of Ubiquitous Preventive Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan; ² Life Science Research Center, Technology Research Laboratory, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan.

* Address correspondence to this author at: Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan. Fax +81-3-5800-9847; e-mail: torusuzu-ky@umin.ac.jp.

H. Fujimoto, T. Suzuki, and K. Aizawa contributed equally to this work. Received January 16, 2013; accepted April 22, 2013.

Previously published online at DOI: 10.1373/clinchem.2013.203406

⁴ Nonstandard abbreviations: PCI, percutaneous coronary intervention; BNP, B-type natriuretic peptide; A β , amyloid β ; DPP-IV, dipeptidyl-peptidase IV; CAG, coronary angiography; MS-IA, mass spectrometry–based immunoassay; IQR, interquartile range; CRP, C-reactive protein; OR, odds ratio.

goes rapid removal of a 26-amino acid (26-aa) signal peptide, resulting in the formation of a 108-aa prohormone, proBNP(1–108). Subsequently, proBNP(1–108) is cleaved by proteolytic enzymes furin and corin to release 2 processed peptides, the biologically inert 76-aa amino-terminal portion NT-proBNP(1–76) and the biologically active 32-aa molecule BNP(1–32) [see (13) for review]. Recently, other processed (proteolytic) forms of BNP [e.g., BNP(3–32), BNP(4–32), and BNP(5–32)] have been shown to exist in the circulation, but the clinical implications of these BNP peptides remain poorly understood (14–16).

Protein processing via proteases is central to the metabolism of many peptides. In the heart, myofilament proteins such as troponin have been shown to be processed under ischemic conditions, which may lead to myocardial contractile dysfunction through effects on calcium-dependent muscle contraction responses (17). Measurement of processed troponin peptides released into the circulation from damaged and/or necrotic cardiomyocytes has been suggested to be of potential use in risk stratification of patients with coronary syndromes (18). There are other clinical situations in which processed proteins/peptides serve as diagnostic biomarkers, such as the use of amyloid β ($A\beta$) peptides in Alzheimer disease. The $A\beta$ peptides generated through sequential proteolytic processing of the amyloid precursor protein by 2 enzymes, β -secretase and γ -secretase, have been shown to be reflective of Alzheimer disease pathophysiology [see (19) for review], with lower concentrations of $A\beta_{42}$ (as a ratio to $A\beta_{40}$) being associated with cognitive decline (20). Protein processing is also the target of therapeutic interventions such as use of dipeptidyl-peptidase IV (DPP-IV) inhibitors, which inhibit protease processing of glucagon-like peptide 1 and glucose-dependent insulinotropic peptide in treatment of diabetes (21–23). In the present study, we hypothesized that processing of BNP might have value as a diagnostic biomarker for ischemic heart disease and found that it is associated with restenosis.

Methods

PATIENTS AND PROTOCOLS

Between June 2007 and November 2011, we examined a total of 105 consecutive consenting patients with mildly increased BNP concentrations who underwent PCI with follow-up coronary angiography (CAG) approximately 6 months after the procedure. Patients were excluded if they had acute myocardial infarction, unstable angina pectoris, congestive heart failure, or chronic renal failure [serum creatinine >2.0 mg/dL (>176.8 $\mu\text{mol/L}$)], because of confounding effects on BNP concentrations. Patients with BNP concentrations >200 pg/mL were excluded because of possible

confounding heart failure and other heart disease as described. Coronary angiograms were assessed by 2 experienced angiographers who were unaware of the results of analysis of BNP forms as described herein. Significant stenosis was defined as $>50\%$ narrowing of the coronary artery as determined by quantitative coronary angiography according to American Heart Association guidelines (24).

Blood samples were obtained at time of follow-up CAG after PCI. Samples were transferred immediately into tubes containing EDTAate-2Na and aprotinin (Neotube NP-EA0305, Nipro Corp.) and kept at 4 °C until plasma was separated by centrifugation within 6 h, and then stored at -80 °C until analysis. We measured plasma total BNP concentrations using a conventional enzyme immunoassay (Rapidpia, Sekisui Medical) (25).

Nonstenotic concentrations of BNP(5–32)/BNP(3–32) ratio and BNP in this study were measured using blood samples from consenting patients diagnosed to not have coronary stenosis on diagnostic CAG ($n = 66$).

This study was approved by the ethics committee of the Graduate School of Medicine, the University of Tokyo, and written informed consent was obtained from each patient.

DETECTION OF BNP FORMS

We developed a mass spectrometry-based immunoassay (MS-IA) procedure (as described in detail in Supplemental Text, which accompanies the online version of this article at <http://www.clinchem.org/content/vol59/issue9>) to measure circulating BNP peptides. Briefly, after capturing BNP peptides with an antibody raised against the ring region of BNP(1–32) (an antibody routinely used in a commercial BNP assay available from Shionogi) (26) bound to magnetic beads, captured BNP peptides were eluted and then detected by MALDI-TOF mass spectrometry (Axima CFR Plus and Axima Confidence, Shimadzu Corp.). Results of coronary angiograms were not made available at time of measurement. The analytical measurement range of the assay was approximately 20–3000 pg/mL. Within-run reproducibility as a measure of analytic precision showed a CV between 7.4% and 8.8% (see online Supplemental Table 1).

STATISTICAL ANALYSIS

We analyzed continuous data, expressed as median with interquartile ranges, by the Wilcoxon rank-sum test to compare medians of values and discrete variables with the Fisher exact test. We used multivariate logistic regression analysis to determine variables associated with restenosis. For multivariable models, a stepwise variable selection was performed starting with

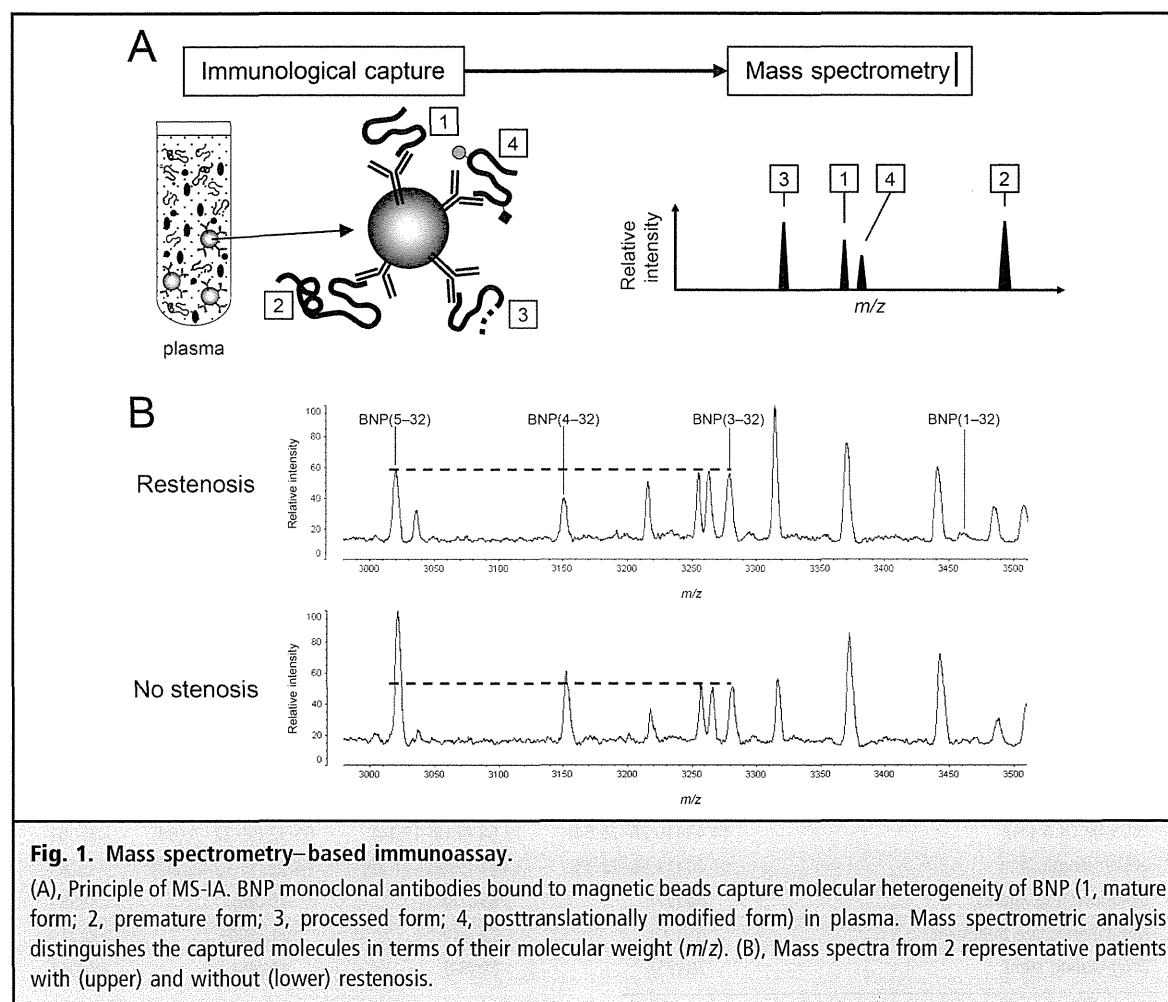


Fig. 1. Mass spectrometry-based immunoassay.

(A), Principle of MS-IA. BNP monoclonal antibodies bound to magnetic beads capture molecular heterogeneity of BNP (1, mature form; 2, premature form; 3, processed form; 4, posttranslationally modified form) in plasma. Mass spectrometric analysis distinguishes the captured molecules in terms of their molecular weight (m/z). (B), Mass spectra from 2 representative patients with (upper) and without (lower) restenosis.

all of the variables from the univariate model that had a P value of <0.2 . The final model was generated with backward stepwise logistic regression (P to leave: 0.05) (note that a forward stepwise model gave the same results). The final model included only variables that had a P value of <0.05 . We determined ROC curves, standard diagnostic sensitivity and specificity, likelihood ratios, and predictive value to evaluate diagnostic performance. All statistical analyses were performed with JMP version 8.0.2 (SAS Institute) and MedCalc version 12.3 (MedCalc Software). A 2-tailed $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

MASS SPECTROMETRY IMMUNOASSAY FOR DETECTION OF CIRCULATING PROCESSED FORMS OF BNP

Because currently available conventional immunoassays cannot discriminate individual processed BNP peptides, we developed a mass spectrometry-based de-

tection method combined with immunocapture by commercial anti-BNP antibodies to detect processed forms of BNP in the circulation, as shown in Fig. 1A. The assay consisted of 2 steps: the first involved immunocapture in which all forms of circulating BNP were captured by anti-BNP monoclonal antibody bound to magnetic beads; the second step involved analysis by mass spectrometry in which captured BNP was eluted from the magnetic beads and analyzed with MALDI-TOF mass spectrometry (further details on the methodology can be found in online Supplemental Text 1).

By use of this method, we detected 3 major forms of BNP: BNP(3-32), BNP(4-32), and BNP(5-32), numbered as amino acids from the amino-terminal end of the 32-amino acid BNP (Fig. 1B). Of the 3 forms, BNP(5-32) was pursued further, as initial measurements showed reduced concentrations of this peptide in patients with restenosis (Fig. 1B). An index peptide to serve as an internal control to quantify concentra-

Table 1. Patient characteristics and demographics. ^a				
	Factors associated with restenosis (cross-sectional study)			P ^b
	Total	No-stenosis	Restenosis	
n	105	83	22	
Age, years	70 (63–76)	71 (63–77)	69 (66–72)	0.41
Male sex	66 (63)	55 (66)	11 (50)	0.21
Coexisting conditions				
Hypertension	90 (86)	73 (88)	17 (77)	0.30
Diabetes mellitus	65 (62)	52 (63)	13 (59)	0.81
Smoking	71 (68)	56 (67)	15 (68)	1.00
Laboratory values				
Total BNP, pg/mL	51.9 (37.5–83.7)	54.0 (37.5–90.8)	48.1 (31.1–71.3)	0.29
Creatinine, mg/dL	0.83 (0.70–0.94)	0.84 (0.71–0.96)	0.78 (0.65–0.89)	0.15
CRP, mg/L	0.5 (0.3–1.2)	0.5 (0.3–1.2)	0.6 (0.3–1.2)	0.50
Ratio of total cholesterol to HDL cholesterol	3.1 (2.6–3.9)	3.1 (2.5–3.9)	3.1 (2.8–3.8)	0.34
Total cholesterol, mg/dL	170.5 (152.5–190.5)	169.0 (153.9–189.3)	176.0 (149.0–197.0)	0.82
HDL cholesterol, mg/dL	53.2 (44.5–68.6)	53.3 (44.5–68.9)	50.5 (41.5–65.0)	0.63
Triglycerides, mg/dL	134.0 (85.5–184.8)	135.0 (89.0–189.0)	117.0 (77.0–178.5)	0.39
LDL cholesterol, mg/dL	88.5 (78.3–103.5)	87.0 (76.0–102.0)	96.0 (84.0–107.5)	0.09
Systolic blood pressure, mmHg	128.0 (115.0–140.0)	128.0 (112.8–140.0)	128.0 (116.0–142.0)	0.90
Diastolic blood pressure, mmHg	68.0 (60.0–78.5)	68.0 (60.0–78.0)	66.0 (58.0–80.0)	0.58
BNP(5–32)/BNP(3–32)	1.35 (1.19–1.55)	1.43 (1.22–1.61)	1.19 (1.11–1.34)	<0.001
%DS by QCA (%) ^c	14.43 (10.26–25.54)	12.68 (9.18–17.14)	65.52 (59.22–70.54)	<0.001
Lesion length, mm	17.20 (12.58–22.45)	17.47 (13.42–21.89)	14.02 (11.12–24.83)	0.28
Lipid-lowering agents	84 (77)	65 (78)	19 (86)	0.55
Antihypertensive treatment	93 (90)	72 (88)	21 (100)	0.21
Drug-eluting stent	79 (75)	69 (83)	10 (45)	<0.001

^a Data are median (IQR) or n (%).

^b P values were determined by the Fisher exact test for discrete variables and the Wilcoxon rank-sum test for continuous variables.

^c %DS, percent diameter stenosis; QCA, quantitative coronary angiography.

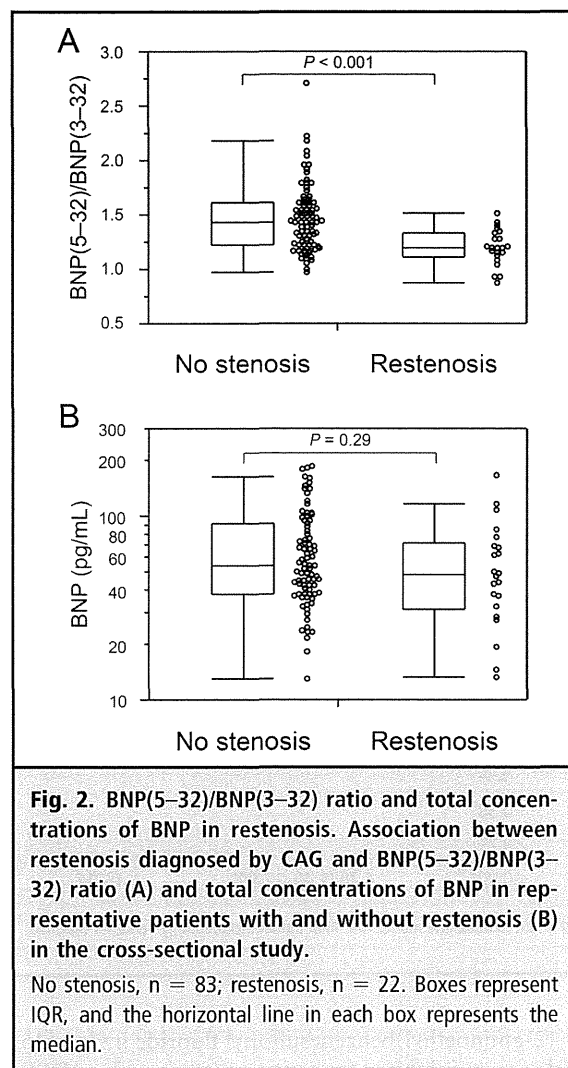
tions of BNP(5–32) was needed, but because the full-length peptide, BNP(1–32), was detected in only minute amounts in contrast to BNP(3–32), which was present at higher stable concentrations, an arbitrary index of the ratio of BNP(5–32) to BNP(3–32) was used for further analytical purposes.

DIAGNOSTIC IMPLICATIONS OF PROCESSED FORMS OF BNP

Of the 105 patients enrolled (Table 1 and online Supplemental Table 2), 63% were male (n = 66) and the median age was 70 years [interquartile range (IQR) 63–76]. Comorbid coronary risk factors included hypertension in 90 cases (86%), diabetes mellitus in 65 cases (62%), and smoking in 71 cases (68%). Serum creatinine was 0.83 mg/dL (IQR 0.70–0.94) [73.4 μmol/L (IQR 61.4–83.1)]; C-reactive protein (CRP) was 0.5 mg/L (IQR 0.3–1.2); HDL cholesterol was 53.2 mg/dL

(IQR 44.5–68.6) [1.4 mmol/L (IQR 1.2–1.8)]; LDL cholesterol was 88.5 mg/dL (IQR 78.3–103.5) [2.3 mmol/L (IQR 2.0–2.7)]; and BNP was 51.9 pg/mL (IQR 37.5–83.7). 75% of patients (79 cases) were treated with drug-eluting stents, and angiographic outcome at follow-up CAG showed 22 cases of defined restenosis (21% overall, 13% for drug-eluting stents).

The BNP(5–32)/BNP(3–32) ratio was significantly lower in patients with restenosis at time of follow-up CAG (restenosis 1.19, IQR 1.11–1.34, n = 22, vs without restenosis 1.43, IQR 1.22–1.61, n = 83; P < 0.001) (Table 1 and Fig. 2A). Notably, total BNP concentrations as measured with a standard commercial immunoassay did not show association with restenosis (Table 1 and Fig. 2B). Reference median concentrations of BNP and BNP(5–32)/BNP(3–32) ratio in



the present study were 57.5 pg/mL (IQR 39.5–94.2, n = 66) and 1.43 (IQR 1.28–1.72, n = 66), respectively.

ROC analysis of the diagnostic accuracy of the BNP(5–32)/BNP(3–32) ratio for those with presence of restenosis showed an area under the curve of 0.775 (95% CI 0.683–0.851), and the optimal cutoff value for discrimination of stenosis was 1.41 (sensitivity, specificity, positive likelihood ratio, and negative likelihood ratio were 91%, 54%, 1.99, and 0.17, respectively) (see online Supplemental Table 3 and Supplemental Fig. 1). Sensitivity and specificity as well as negative and positive likelihood ratios in addition to positive and negative predictive values are shown in online Supplemental Table S3. Of interest, a negative likelihood ratio of < 0.1 allowing for reliable rule-out (27) was attained at a ratio of 1.52, with both sensitivity and negative predictive value of 100%. Thus, measuring BNP processed

forms as the BNP(5–32)/BNP(3–32) ratio had diagnostic value for ruling out restenosis.

We used univariate and multivariate analyses to examine the association of the BNP(5–32)/BNP(3–32) ratio with restenosis, taking into account the measured concentrations of other laboratory blood tests (total BNP, serum creatinine, CRP, ratio of total cholesterol to HDL cholesterol, total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, and LDL cholesterol), risk factors (age, sex, hypertension, diabetes mellitus, smoking, use of lipid-lowering agents, and antihypertensive treatment), systolic and diastolic blood pressure, lesion length, and drug-eluting stent use for PCI. The BNP(5–32)/BNP(3–32) ratio [odds ratio (OR) 0.63; 95% CI 0.45–0.83; $P < 0.001$] and failure to use a drug-eluting stent (OR 4.20; 95% CI 1.40–12.99; $P = 0.011$) were significantly and independently associated with restenosis (Table 2). OR analysis showed that there was a 1.59-fold reduction in likelihood for restenosis with each 0.1 U increase in the BNP(5–32)/BNP(3–32) ratio.

Discussion

Peptide processing has become increasingly recognized as important not only in metabolism of peptides but also in regulation of various pathologies, particularly since peptide processing has become the target of therapeutic intervention with pharmaceutical development of protease inhibitors in treatment of disease [e.g., DPP-IV inhibitors (22, 23)]. Recent studies have also focused on the possible exploitation of peptide processing in diagnosis of Alzheimer disease (20) and a potential role in ischemic heart disease (17, 18). In the present study, we focused on the bioactive cardiac hormone BNP, whose circulating concentrations are reflective of pathogenic activity and have been clinically used for diagnostic purposes, and showed that its processed forms are strongly associated with the condition of restenosis in ischemic heart disease. Methods to measure these peptide forms were developed using mass spectrometry-based detection combined with immunocapture, because conventional immunoassay methods are not able to discriminate the different forms. Our initial experience shows that measurement of BNP processing with this method is of potential use to diagnose restenosis.

We found that 3 major processed forms of circulating BNP—BNP(3–32), BNP(4–32), and BNP(5–32)—in addition to minute amounts of full-length BNP(1–32), were those primarily detected in the circulation in ischemic heart disease. Markedly lower concentrations of BNP(5–32) were seen in patients with restenosis at time of follow-up CAG. OR analysis showed that there was a 1.59-fold reduction in likeli-