

20121500/A

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 24 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武城 英明

平成 25 (2013) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告

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

千葉大学大学院医学研究院 武城英明 1

II. 分担研究報告

1. 心機能と血清 LR11 値の関係解明に関する研究

東邦大学 白井厚治 15

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

東邦大学 白井厚治 19

3. 糖尿病冠動脈疾患における可溶型 LR11 濃度の長期予後との関連性に関する研究

順天堂大学 代田浩之 22

4. アルツハイマー病患者における髄液中可溶型LR11濃度の検討

順天堂大学医学部 三井田 孝 24

5. 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 25

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 28

7. 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 35

8. 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

新潟大学

鈴木 博

37

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

43

IV. 研究成果の刊行物・別冊

51

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）分化細胞遺伝子の血中バイオマーカーとして血中濃度測定系の樹立に至った可溶性受容体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24年度に得た主な研究成果を示す。1）白血病病態および細胞モデルでLR11欠損および中和抗体が病態発症ならびに細胞機能を抑制的に作用した。2）糖尿病冠動脈疾患における可溶性LR11濃度は長期予後と関連した。3）糖尿病患者の可溶性LR11は網膜症の寄与因子であり血糖及び脂質コントロールを反映した。4）睡眠時無呼吸症候群の可溶性LR11濃度は皮下脂肪蓄積および心筋拡張障害と関連した。5）可溶性LR11濃度は川崎病急性期の重症度を反映し遠隔期の血管障害も反映した。6）髄液中可溶性LR11はApoE rich-HDLに結合した。7）髄液中可溶性LR11は認知機能低下が出現する以前のアルツハイマー病の病態変化を反映した。8）可溶性LR11濃度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だった。9）LR11発現はB細胞リンパ腫で高い発現率であり、LR11陽性群はCHOP療法の予後がよいこと、Rituximabを用いた抗体療法への反応性は悪かった。以上の研究成果から、可溶性受容体LR11を標的にした抗体療法の可能性が細胞および病態モデルで明らかとなり、一方、集積した臨床エビデンスから血管病、血液疾患、神経疾患を対象疾患とする臨床試験計画が可能であると考えられる。

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教授）、代田浩之（順天堂大学医学部教授）、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講師）、鈴木 博（新潟大学大学院医歯学総合研究科助教）

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巣の未(脱)分化平滑筋細胞に発現する。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、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、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。

このような背景から平成24年度研究は引き続き複数施設との協力体制のもとで実施し、対象疾患は主に、血中LR11高値の心臓病、白血病(リンパ腫)、アルツハイマー病(認知症)とした。平成23年度に測定系の市場化を行なったことから、この樹立された測定系を用いてエビデンス集積研究を進める。さらに、新規抗体療法を提案するために、すでにスクリーニングした特異抗体およびノックアウトマウスを用いて病態および細胞モデルにおける機能抑制による機能評価を行い、新規表的治療としての意義を明らかにする。

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. 可溶性LR11 ELISA測定キットの樹立と市場化
積水メディカルつくば研究所と共同研究。
2. 網羅的可溶型LR11抗体の調整と病態および細胞モデルを用いた用量反応性試験
興和東京研究所と共同研究。

【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 順天堂大学 150例
2. 血管病 新潟大学 80例
3. 血管病 東邦大学佐倉病院 400例
4. 血液病 千葉大学 400例
5. 血液病 埼玉医大 200例
6. アルツハイマー病 新潟大学、順天堂大学 150症例
7. アルツハイマー病 ワシントン大学セントルイス校 200例
8. アルツハイマー病 ミュンヘン工科大学 300例
9. 血管病 ロッテルダム大学 300例
10. 血管病 国際医療センター 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

平成23年度に 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 をもちいたサンドイッチ 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。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ったことから、さらなる性能の向上と一連の操作の短縮化を行い、一日で測定の終了する温度変化にも安定した測定システムを確立することに成功し改良試薬として市場化された（積水メディカルつくば研究所産学共同研究）。

2. 網羅的可溶性 LR11 抗体の調整と病態および細胞モデルを用いた用量反応性試験

LR11 部分構造を有する抗原ペプチドを用いて LR11 特異抗体を同定した。このなかから選択された抗体を用いて、LR11 機能を中和する抗体をスクリーニングした。これらの機能抑制作用を有する抗体を用いて病態モデルならびに細胞モデルを用いて容量反応試験を行った（興和東京研究所産学共同研究）。LR11 ノックアウトマウスにおける代謝学的細胞変容を解析し LR11 を標的とした新規細胞治療の可能性を明らかにした（ケンブリッジ大学代謝研究センター、国際医療センター研究所共同研究）

【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

臨床的に最も予後不良集団の一つである糖尿病冠動脈疾患において血清可溶性LR11濃度と長期予後の関連性を検討した。本研究は後ろ向き観察研究で、2003年2月から2004年8月に当院で経皮的冠動脈形成術を施行した糖尿病患者連続219例を対象にベースラインの血清可溶性LR11濃度を四分位で4群に分け、総死亡・非致死的心筋梗塞を評価項目とした長期予後を検討した。観察期間の中央値は1641日で、 Kaplan-Meier 曲線を用いた4群間の長期予後の比較はベースラインの可溶性LR11濃度が高いほど有意にイベント発生率が高く、多変量コックス比例ハザードモデルを用いた多変量解析ではLR11濃度が有意な予後関連因子であった（ハザード比1.60, 95%信頼区間1.07-2.38, $P < 0.05$ ）。これまでの冠動脈疾患を対象としたLR11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、急性冠症候群において血清可溶性LR11濃度が有意に高いことを横断研究にて示してきた。また糖尿病の細小血管合併症である増殖性糖尿病網膜症との関連も明らかにされている。今回臨床的に非常に予後不良な集団である糖尿病冠動脈疾患の長期予後との関連性が明らかとなり、その予後予測因子として重要なバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。今後は非糖尿病例における冠動脈疾患や急性冠症候群など他の集団における長期予後との関連性を検討していく必要がある。

日本において糖尿病網膜症は中途失明原因第二位となっており、今後さらに増加していくであろうとされている。糖尿病網膜症発症、進展の危険因子としてエビデンスが確立して

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

LR11 は、冠動脈疾患、増殖糖尿病網膜症で高値を示す。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。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、脂肪分布や心機能との関係は明らかにされていない。今回、睡眠時無呼吸症の 108 症例に対し、Computed

tomography (CT) 検査と心臓超音波検査を行った。その結果、LR11 濃度と皮下脂肪面積との間に正の相関関係を認めた。また、LR11 濃度が増加するとともに、心筋拡張障害の指標である e/E' は皮下脂肪の増加と独立して高値を示した ($r = 0.35$ $p < 0.01$)。この結果より、皮下脂肪が蓄積する病態で LR11 は増加し、LR11 による冠動脈血管平滑筋の脱分化が心筋変性を惹起する可能性と心機能にたいする後負荷を LR11 が調節している可能性が示唆され、新しい知見が得られた。その詳細について今後更なる検討が必要と思われた。

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に至るまで、その進展に重要な役割を果たす。LR11 は動脈硬化巣における内膜平滑筋を反映する活性物質であり、川崎病においても病態を反映する可能性がある。川崎病において血中可溶性 LR11 (sLR11) のバイオマーカーとしての有用性を検討した。対象は川崎病急性期患者 37 例 (γ グロブリン治療 (IVIG) 奏効群 30 例、IVIG 不応群 7 例) と川崎病遠隔期患者 88 例 (冠動脈病変 (CAL) のない no CAL 群 18 例、退縮群 12 例、CAL 群 58 例)。急性期では IVIG 前、IVIG 後、回復期の静脈採血にて、遠隔期では外来受診時あるいは心臓カテーテル検査時に検体を採取した。川崎病急性期において、不応群の IVIG 治療前 sLR11 は、対照、奏効群に比べて有意に高値であった (不応群, 19.7 ± 5.8 ng/ml; 奏効群, 11.6 ± 3.1 ng/ml, $p < 0.001$)。IVIG 不応群では回復期にも高値が持続した ($p < 0.0001$)。川崎病遠隔期において、CAL 群の sLR11 は、対照群、no CAL 群、退縮群と比べて有意に高値であった (対照群, 8.1 ± 2.1 ng/ml; no CAL 群, 8.3 ± 1.7 ng/ml; 退縮群, 8.8 ± 2.1 ng/ml; CAL 群, 10.3 ± 2.3 ng/ml)。

sLR11 は川崎病急性期の重症度を反映し、 γ グロブリン不応や冠動脈瘤形成の予測マーカーとなる可能性がある。また川崎病遠隔期の血管障害を反映するバイオマーカーとなる可能性がある。

2. 神経病

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 の発症病態に関与することが知られている。昨年までに、脳脊髄液中の可溶性 LR11 が AD 患者の有用なバイオマーカーになる可能性について報告してきた。本年度は、新たな脳脊髄液サンプルを収集し、認知機能障害の重症度を clinical dementia rating (CDR)により、CDR=0 (認知機能正常)、CDR=0.5 (軽度認知障害)、CDR<1 (中等度以上の認知障害) の3群に分け、髄液中可溶性 LR11、アミロイド β 42 (A β 42)、総タウ、リン酸化タウを測定した。CDR=0 群において、髄液中可溶性 LR11 は、A β 42、総タウ、リン酸化タウと有意な相関を示した。CDR=0.5 群、CDR<1 群でのこれらの相関を認めなかった。このように、認知障害の重症度により3群に分類し可溶性 LR11 の測定を行ったところ、3群間において可溶性 LR11 値に有意な差は認めなかった。一方、髄液中総タウ、リン酸化タウ、A β 42 は、CDR=0.5 (軽度認知障害) および CDR<1 (中等度以上の認知障害) において、CDR=0 (認知機能正常) と既報の通り有意な差を認めた。今回の結果で興味深い点は、CDR=0 (認知機能正常) 群において、髄液中可溶性 LR11 が総タウ、リン酸化タウ、A β 42 と有意な正の相関を示した点である。このような相関は、認知機能が障害され始めた CDR=0.5 の状態では見られなくなり、極めて

病初期のアルツハイマー病の病態変化を髄液中可溶性 LR11 が捉えている可能性がある。最近の画像解析の結果から、認知障害が出現する10年前から脳内ではアルツハイマー病の病理が始まっていることが明らかにされており、可溶性 LR11 はその早期病態を反映しているのかもしれない。これらの知見を別のコホートにおいても確認する必要があり、共同研究により validation study を進めている。

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 および ApoE の分布を非変性二次元電気泳動 (N-2DG) 法にて検討した。健常人および AD 患者の髄液を用いた。N-2DG 法では、可溶性 LR11 は ApoE rich-HDL に分布した。可溶性 LR11 は、髄液中で ApoE を介し、主要なリポ蛋白である HDL と結合する。このため、Amyloid β (A β) のクリアランスに関わり、A 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。

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LR1濃度のAD発症にお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濃度と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

LR11は動脈硬化において重要な役割を果たしているが、血液細胞においては単球表面に高発現し、さらにCD34+CD38-未分化骨髄幹細胞で高発現している。これまでに種々の未分化白血病細胞株でLR11が細胞表面、細胞内に高発現し、培養上清中に可溶性LR11(sLR11)が検出されることを見出し、急性骨髄性白血病(AML)、急性リンパ性白血病(ALL)患者診断時血清にてsLR11値が有意に高値となることを見出した(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、 $p < 0.001$)。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%, $P = 0.04$)。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。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20ng/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。以上から、LR11は急性白血病、悪性リンパ腫細胞で高発現し、血清sLR11はこれらの疾患に対し新たなバイオマーカーとして働くことが示された。

これまでの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。この発現が悪性リンパ腫の腫瘍細胞から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蛋白の発現と臨床病理学的事項との関連を検討した。LR11の発現は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、1)LR11 陽性群では CHOP 療法下での予後がよいこと、2)Rituximab を用いた抗体療法への反応性が悪いことが示された。2)の結果について培養細胞を用いてこの作用機序を検討したところ、LR11 ノックダウン細胞はコントロールに比して Rituximab による補体依存性細胞障害が増強されることが見出された。これらの結果から LR11 は悪性リンパ腫において新たな分子標的治療のターゲットとなりうる可能性が示唆された。

E. 結論

今年度研究で成果を得て公表した主な研究成果を示す。

1) 白血病病態および細胞モデルでLR11欠損および中和抗体が病態発症ならびに細胞機能を抑制的に作用した。

2) 糖尿病冠動脈疾患における可溶型LR11濃度は長期予後と関連した。

3) 糖尿病患者の可溶型LR11は網膜症の寄与因子であり血糖及び脂質コントロールを反映した。

4) 睡眠時無呼吸症候群の可溶型LR11濃度は皮下脂肪蓄積および心筋拡張障害と関連した。

5) 可溶型LR11濃度は川崎病急性期の重症度を反映し遠隔期の血管障害も反映した。

6) 髄液中可溶型LR11はApoE rich-HDLに結合した。

7) 髄液中可溶型LR11は認知機能低下が出現する以前のアルツハイマー病の病態変化を反映した。

8) 可溶型LR11濃度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だった。

9) LR11発現はB細胞リンパ腫で高い発現率であり、LR11陽性群はCHOP療法の予後がよいこと、Rituximabを用いた抗体療法への反応性は悪かった。

今年度研究は研究計画にそって進行した。その研究成果から、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広く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、改良された研究試薬のキット市場化、中和抗体作成のスクリーニングを終了し、病態および細胞モデルで中和抗体によるLR11機能抑制による細胞機能修飾が明らかになった。

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。ノックアウトモデル解析による本分子の病態形成における役割解明と合わせ、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。

今年度の研究成果から、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することが可能となり、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が提示された。新規標的療法の開発を引き続き継続するとともに、従来の医薬品を未分化細胞の修復というスケールから再評価することが可能となった。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsolakidou, A., Alexopoulos, P., Guo, L.H., Grimmer, T., Westerteicher, C., Kratzer, M., Jiang, M., Bujo, H., Roselli, F., Leante, M.R., Livrea, P., Kurz, A. and Perneczky R. β -Site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 activity is related to cerebrospinal fluid concentrations of sortilin-related receptor with A-type repeats, soluble amyloid precursor protein, and tau. *Alzheimers Dement.* 2013 In press.
2. Ogita M, Miyauchi K, Dohi T, Tsuboi S, Miyazaki T, Yokoyama T, Yokoyama K, Shimada K, Kurata T, Jiang M, Bujo H, Daida H. Increased circulating soluble LR11 in patients with acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta.* 2013 415:191-4
3. Sakai S, Nakaseko C, Takeuchi M, Ohwada C, Shimizu N, Tsukamoto S, Kawaguchi T, Jiang M, Sato Y, Ebinuma H, Yokote K, Iwama A, Fukamachi I, Schneider WJ, Saito Y, Bujo H. Circulating soluble LR11/SorLA levels are highly increased and ameliorated by chemotherapy in acute leukemias. *Clin Chim Acta.* 2012 413:1542-8
4. Takahashi M, Bujo H, Shiba T, Jiang M, Maeno T, Shirai K: Circulating Soluble LR11 in Patients with Diabetic Retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2012 154:187-92
5. 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 44:330-9
6. 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, Perneczky R: SORL1 genetic variants and cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer' s disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2012 262:529-34
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. Alexopoulos P, Luo L-H, Tsolakidou A, Kratzer M, Grimmer T, Westerteicher C, Jiang M, Bujo H, Diehl-Schmid J, Kurz A, Perneczky R: Interrelations between CSF soluble APP, amyloid-b 1-42, SORL1, and tau levels in Alzheimer' s disease *J Alzheimers Dis* 28: 543-52, 2012
9. Shiba T, Bujo H, Takahashi M, et al

- Vitreous Fluid and Circulating Levels of Soluble LR11, a Novel Marker for Progression of Diabetic Retinopathy Journal: RETINA The Journal of Retinal and Vitreous Diseases under submitting
10. Sobajima J, Kumamoto K, Haga N, Tamaru J, Takahashi T, Miyazaki T, Ishida H. Early evaluation of the apoptotic index ratio is useful in predicting the efficacy of chemoradiotherapy in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2012. 3(2):287-292.
 11. Kojima M, Noro M, Nakazato Y, Akikusa B, Tamaru J, Masawa N, Kashimura M. Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoma of the spleen resembling infectious mononucleosis morphologically. *Leuk Lymphoma.* 2012 53(12):2504-6.
 12. Kanemitsu N, Isobe Y, Masuda A, Momose S, Higashi M, Tamaru J, Sugimoto K, Komatsu N. Expression of Epstein-Barr virus-encoded proteins in extranodal NK/T-cell Lymphoma, nasal type (ENKL): differences in biologic and clinical behaviors of LMP1-positive and -negative ENKL. *Clin Cancer Res.* 2012. 15;18(8):2164-72.
 13. Tokuhira M, Watanabe R, Nemoto T, Sagawa M, Tomikawa T, Tamaru J, 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.* 2012. 53(4):616-23.
 14. Ito S, Ishii G, Hoshino A, Hashimoto H, Neri S, Kuwata T, Higashi M, Nagai K, Ochiai A. Tumor promoting effect of podoplanin-positive fibroblasts is mediated by enhanced RhoA activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 25;422(1):194-9.
 15. 丸田 淳一 ホジキンリンパ腫の病理診断 臨床血液53巻10号 Page1608-1614
 16. 田丸 淳一【ホジキンリンパ腫の研究と診療-Update in 2011-】 わが国のホジキンリンパ腫の特徴と他疾患との鑑別ポイント 血液内科 64巻3号 Page227-232
 17. Kawaguchi T, Ohwada C, Takeuchi M et al. LR11: a novel biomarker identified in follicular lymphoma. *Haematologica* 投稿中
 18. 中世古知昭. 特集リポ蛋白受容体—正常細胞と病的細胞における役割—細胞機能から新たな病態解明へ～白血病幹細胞と可溶型受容体. *The Lipid* 2012; 23(4): 93-100
2. 学会発表等
 1. Quantification of soluble LR11/SorLA in CSF and plasma of patients with Alzheimer disease. Keystone Symposia on Molecular and Cellul

- ar Biology, 2012.02.26-03.02
2. 東 守洋, 得平 道英, 川口 岳晴, 武内 正博, 大和田 千佳子, 中世古 知昭, 渡邊 俊樹, 武城 英明, 木崎 昌弘, 田丸 淳一. 悪性リンパ腫におけるLR11発現とその意義. 第52回日本リンパ網内系学会総会 2012.06 福島
 3. 東 守洋, 得平 道英, 川口 岳晴, 武内 正博, 大和田 千佳子, 中世古 知昭, 渡邊 俊樹, 武城 英明, 木崎 昌弘, 田丸 淳一. 悪性リンパ腫におけるLR11発現. 第101回日本病理学会総会 2012.03 東京
 4. Morihiro Higashi, Michihide Tokuhira, Takeharu Kawaguchi, Masahiro Takeuchi, Chikako Ohwada, Chiaki Nakaseko, Toshiki Watanabe, Hideaki Bujo, Masahiro Kizaki, Jun-ichi Tmaru. LR11 Expression in Malignant Lymphoma. 3rd International JSH symposium. 2012.05 Saitama, Japan.
 5. Kawaguchi T, Ohwada C, Shimizu N, et al. Serum Soluble LR11 Can Predict High FLIPI-2 Score in Follicular Lymphoma. The 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, Dec 8-11, 2012
 6. Ohwada C, Kawaguchi T, Shimizu N, et al. Serum Soluble LR11, a Novel Biomarker for Intravascular Large B-cell Lymphoma. The 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, Dec 8-11, 2012
 7. Nishii K, Nakaseko C, Takeuchi M, et al. LR11 plays a critical role in leukemogenesis of acute myeloid leukemia by regulating adhesion and homing ability to bone marrow. The 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, Dec 8-11, 2012
 8. Shimizu N, Nakaseko C, Takeuchi M, et al. Soluble LR11, a novel acute leukemia marker, drastically induces WT1 mRNA expression together with synergic activation of GATAs, and the migration activity. The 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, Dec 8-11, 2012
 9. Nishii K, Jiang M, Shimizu N, et al. LR11 regulates hypoxia-induced hematopoietic immature cell adhesion. The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Kyoto, 2012/10/19-21
 10. Tsukamoto S, Takeuchi M, Yamazaki A, et al. Tetraspanin CD9 regulates ADAM17-mediated LR11 shedding in leukemia cells. The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Kyoto, 2012/10/19-21.
 11. Shimizu N, Bujo H, Sakai S, et al. Soluble form of LR11 is highly expressed on myeloid cells after G-CSF treatment. The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Kyoto, 2012/10/19-21
 12. Kawaguchi T, Ohwada C, Higashi M, et al. Serum soluble LR11 is a promising

- novel biomarker for B cell lymphoma. The 53rd American Society of Hematology, San Diego, Dec 10-13, 2011
13. 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. The 53rd American Society of Hematology, San Diego, Dec 10-13, 2011
 14. 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.
 15. 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, Orlando, Dec 2010
 16. 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, Orlando, Dec 2010
 17. 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
 18. Sakai S, Nakaseko C, Takeuchi M, et al. Soluble LR11 is a novel biomarker for acute leukemias. The 72th Japanese Society of Hematology, Yokohama, 2010
 19. Takeuchi M, Nakaseko C, Ohwada C, et al. LR11 is a novel surface marker for normal leukocytes and leukemia cells. The 72th Japanese Society of Hematology, Yokohama, 2010
 20. Ohwada C, Nakaseko C, Sakai S, et al. Prognostic impact of serum soluble LR11 on acute leukemias. The 72th Japanese Society of Hematology, Yokohama, 2010
 21. 矢島隆二, 池内 健, 徳武孝允, 西澤正豊. リポタンパク受容体 LR11 によるアミロイドβ代謝産物調整機構の解析. 第53回日本神経学会 2012.5. 東京
 22. 矢島隆二, 西野香織, 徳武孝允, 手塚敏之, 西澤正豊, 池内 健. リポタンパク受容体 LR11 による ApoE 産生代謝調節機構の解析. 第31回日本認知症学会 ポスター発表 2012.10.26. つくば市
 23. 西野香織, 矢島隆二, 徳武孝允, 手塚敏之, 西澤正豊, 池内 健. リポタンパク受容体 LR11 によるアポリポタンパク E (ApoE) アイソフォーム依存性の調節機構. 分子生物学会. 2012.12.14. 福岡
 24. Watanabe K, Suzuki H, Hasegawa S, Numano F, Uchiyama M, Bujo H: Soluble LR11 is a new biomarker for vascular lesions late after Kawasaki disease.

第 46 回日本小児循環器学会総会・学術
集会, 東京, 2010.7

25. Watanabe K, Suzuki H, Ozawa J, Haniu
H, Hasegawa S, Uchiyama M, Bujo H: A
novel biomarker in acute phase of
Kawasaki disease: Soluble LR11. 第
47 回日本小児循環器学会総会・学術集
会, 福岡, 2011.7
26. Watanabe K, Suzuki H, Haniu H, Numano
F, Saitoh A, Bujo H: A Novel Biomarker
for Late Vascular Lesions in Patients
with Kawasaki Disease: Soluble LR11.
10th International Kawasaki Disease
Symposium, Kyoto, 2012.2
27. Watanabe K, Suzuki H, Haniu H, Numano
F, Saitoh A, Bujo H: Relation between
soluble LR11 and other biomarkers for
atherosclerosis late after Kawasaki
disease. 第 46 回日本小児循環器学会

総会・学術集会, 京都, 2012.7

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を
含む。)

1. 特許

なし

2. 実用新案登録

なし

3.その他

特になし

II. 分担研究報告

心機能と血清LR11値の関係解明に関する研究

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は、冠動脈疾患、増殖糖尿病網膜症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、脂肪分布や心機能との関係は明らかにされていない。今回、我々は睡眠時無呼吸症の108症例に対し、Computed tomography (CT) 検査と心臓超音波検査を行った。その結果、LR11濃度と皮下脂肪面積との間に正の相関関係を認めた。また、LR11濃度が増加するとともに、心筋拡張障害の指標である e/E' は皮下脂肪の増加と独立して高値を示した($r=0.35$ $p<0.01$)。この結果より、皮下脂肪が蓄積する病態でLR11は増加し、LR11による冠動脈血管平滑筋の脱分化が心筋変性を惹起する可能性と心機能にたいする後負荷をLR11が調節している可能性が示唆され、新しい知見が得られた。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

心不全による入院や死亡のうち、心臓収縮機能が保たれているにもかかわらず、心室拡張障害が原因となる患者が半数以上存在すると考えられている。しかし、心室拡張障害の病態を診断するバイオマーカーは少なく、効果的な治療法はなく、他の心不全の予後が改善しているなかで、心室拡張障害による心不全の予後は改善していない。心室拡張障害による心不全死に至る心病変としては心肥大、心拡大、および心筋繊維化が指摘されている。これらの心機能の非侵襲的計測装置としては、心臓超音波がもちいられ、心血管病や動脈硬化進展を診断する有用性が確立されている。

肥満は、高血圧、脂質異常症、糖尿病やメタボリックシンドロームの原因として知られ、脂肪分布の沈着部位の違いにより様々な心血管系の危険因子が出現する。内臓脂肪の蓄積は、代謝障害を引き起こし、動脈硬化の進展と心血管病の発症に重要な役割をもつ。最近の報告では、心臓周囲脂肪が冠動脈の動脈硬化を反

映し、心血管系のさまざまな危険因子と関連すると報告されている。

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、心筋変性と血管機能のバイオマーカーとも考えられる。

本研究の目的は、睡眠時無呼吸患者における心機能と内臓脂肪、皮下脂肪、心臓周囲脂肪の分布について、

LR11との関連を含めて横断的検討することとした。

B. 研究方法

対象者

睡眠時無呼吸症候群 106 症例（男性 76 例、女性 30 例、平均年齢 64.5 ± 10.0 歳。）

方法：

睡眠呼吸検査の診断

症例のエントリー方法を図 1 に示す。はじめに、556 名の睡眠時無呼吸症候群を疑われた患者に対し、携帯型モニター（Fuji respironics 社製 Stardust2）にて睡眠中の脳波、 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、スクリーニング検査をおこなった。次に、スクリーニング検査にて無呼吸低呼吸指数（Apnea-hypopnea index: AHI） $15 >$ 回/時間以上の睡眠呼吸障害を疑われた患者 256 名のなかで入院精密検査の同意を得た 150 名に対し Fuji respironics 社製 AliceV を用いて、精密終夜睡眠呼吸テストを行った。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、20 回/時間以上の異常呼吸を認めたものを睡眠時無呼吸症候群とした。

脂肪蓄積量の診断

脂肪分布量の評価は computed tomography (CT)；（東芝スキャナ Aquilion tex-101A）を用いて、皮下脂肪面積、内臓脂肪面積、心臓周囲脂肪体積を計測した。心臓周囲脂肪体積は心筋外部の脂肪蓄積総量を計測した。皮下脂肪面積と内臓脂肪面積は臍レベルの横断画像に対するは CT 値の閾値より算定した。腹膜の内部と外部との識別はスキャン画像に対して腹膜の輪郭をトレースすることによって定義した。

心機能の診断

左心系の壁厚と距離の診断は心臓超音波検査法にて行った。超音波診断機器は GE 社製 Vingmed Ultrasound N-3190 を用いて 2D 画像と M-mode および 血流について評価した。検討項目は左心室の前壁厚と拡張障害の指標である e/e' とした。

血中可溶型 LR11 の測定

可溶型 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 の範囲を持つ可溶型 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) 脂肪分布と血清バイオマーカーとの関連（表 1）

睡眠時無呼吸患者の脂肪分布と血清バイオマーカーとの関連を表 1 に示す。体格指数と、皮下脂肪面積、内臓脂肪面積、心臓周囲脂肪体積はそれぞれ正の相関を認めた ($r=0.55$ $p<0.01$, $r=0.55$ $p<0.01$, $r=0.53$ $p<0.01$)。皮下脂肪面積は、糖尿病の指標である HbA1c の増加と正の相関を認めたが ($r=0.21$ $p<0.01$)、その他の心血管系危険因子とは関連を認めなかった。内臓脂肪面積は、HbA1c の増加にくわえて、インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR と中性脂肪値と正の相関を認め ($r=0.18$ $p<0.05$, $r=0.17$ $p<0.05$, $r=0.23$ $p<0.01$)、HDL コレステロール値と負の相関を認めた ($r=-0.17$ $p<0.05$)。一方、心臓周囲脂肪面積は、LDL コレステロール、中性脂肪値と正の相関を認め ($r=0.17$ $p<0.05$, $r=0.16$ $p<0.05$)、HDL コレステロール値と負の相関を認めた ($r=-0.17$ $p<0.05$)。

2) 脂肪分布と血中可溶型 LR11 との関連（図 2）

睡眠時無呼吸患者の脂肪分布と血中可溶型 LR11 との関連を図 2 に示す。血中可溶型 LR11 は、皮下脂肪面積と正の相関を認めたが ($r=0.28$ $p<0.01$)、内臓脂肪面積、心臓周囲脂肪体積とは関連を認めなかった。

3) 脂肪分布と心臓機能との関連（図 3）

睡眠時無呼吸患者の心機能と脂肪分布との関連を図 2 に示す。心筋前壁厚は内臓脂肪面積と心臓周囲脂肪体積の増加と正の相関を示したが、皮下脂肪面積とは有意な関連を認めなかった ($r=0.38$ $p<0.01$, $r=0.44$ $p<0.01$, $r=0.18$ n.s.)。一方、左室拡張障害の指標で

ある e/e' は、皮下脂肪面積と心臓周囲脂肪体積増加と正の相関を示したが、内臓脂肪面積とは有意な関連を認めなかった ($r=0.19$ $p<0.01$, $r=0.16$ $p<0.05$, $r=0.03$ n.s)。

4) 心機能と血中可溶性 LR11 との関連 (表 3)

睡眠時無呼吸患者の心機能と血中可溶性 LR11 との関連を表 3 に示す。LR11 と心筋収縮機能の指標である駆出率 (Ejection Fraction; EF) や、心肥大の指標である心筋壁厚との関連は認めなかったが、心筋拡張障害の指標である E/E' と正の相関を認めた ($r=0.35$ $p<0.01$)。

5) 心筋拡張障害指数と血中可溶性 LR11 および他の指標との単相関と重回帰分析 (表 4)

睡眠時無呼吸患者の心機能と血中可溶性 LR11 および他の指標との単相関と重回帰分析を表 4 に示す。心室拡張障害指数である E/E' との単相関については、年齢、皮下脂肪面積、心臓周囲脂肪体積、インスリン値、HbA1c、LR11 値がそれぞれ正の相関を示したが、重回帰分析の結果 LR11 値のみが独立した寄与因子として選択された。

D. 考察

この研究で判明した重要な結果は、LR11 濃度が高い患者において、心室拡張障害が高度になることである。LR11 は LDL 受容体ファミリーの一つで、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。我々は、LR11 は angiotensin II の刺激により uPAR 受容体を介して血管のリモデリングに関与する事を報告しており、高 LR11 血症は心筋細胞変性の引き金になる可能性がある。今回の我々のデータはその基礎的研究を臨床的に裏付け、同時に LR11 の高値が心室拡張障害の存在を診断する臨床的に有用なバイオマーカーである事をさすと思われる。

脂肪分布については、LR11 濃度は内臓脂肪面積、心臓周囲脂肪体積との関連は認めなかったが、皮下脂肪面積と正の相関を認めた。皮下脂肪面積は、心室拡張障害指数と正の相関を認めており、このことから、LR11 による冠動脈の血管平滑筋の脱分化が心筋繊維化を惹起する可能性、および心機能にたいする後負荷を LR11

が調節している可能性が示唆され 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。

● まとめ

LR11 は、冠動脈疾患、増殖糖尿病網膜症で高値を示すことより、LR11 は臨床的に有用な血管平滑筋マーカーとして認知されつつある。今回の結果より、脂肪分布においては皮下脂肪増加に伴い LR11 が増加することが判明した。さらに、心室拡張障害をきたすメカニズムの一部に高 LR11 血症の病態が関与している可能性がうかがわれ、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と思われる。

E. 結論

睡眠時無呼吸症候群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、血中 LR11 は皮下脂肪増加により増加し、心筋拡張障害のマーカーとなる可能性がうかがわれた。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て検証する必要があると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
準備中
2. 研究発表
準備中

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし