

図1 データ収集方法

FIGURE 1. Flow of participants

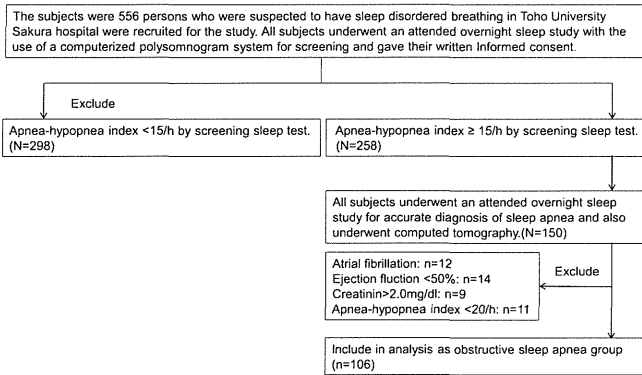


表1 脂肪分布と心血管危険因子との関連

	r	P	r	P
BMI(kg/m ²)	0.55	<.001	0.55	<.001
HbA1c (%)	0.21	<.01	0.18	<.05
HOMA-IR	0.13	n.s.	0.17	<.05
TC(mg/dl)	-0.02	n.s.	0.06	n.s.
LDL-C (mg/dl)	0.06	n.s.	0.06	n.s.
HDL-C (mg/dl)	-0.09	n.s.	-0.18	<.05
TG(mg/dl)	0.06	n.s.	0.26	<.01

皮下脂肪面積 内臓脂肪面積

	r	P
BMI(kg/m ²)	0.53	<.001
HbA1c (%)	0.10	n.s.
HOMA-IR	0.06	n.s.
TC(mg/dl)	0.06	n.s.
LDL-C (mg/dl)	0.17	<.05
HDL-C (mg/dl)	-0.17	<.05
TG(mg/dl)	0.16	<.05

心臓周囲脂肪体積

r, Pearsons correlation coefficient; p, p value;
 BMI, Body mass index;
 HbA1c, glycosylated hemoglobin;
 TC, Total cholesterol;
 LDL-C, low density lipoprotein-cholesterol;
 HDL-C, high density lipoprotein-cholesterol;
 TG, Triglyceride.

図2 脂肪分布とLR11との関連

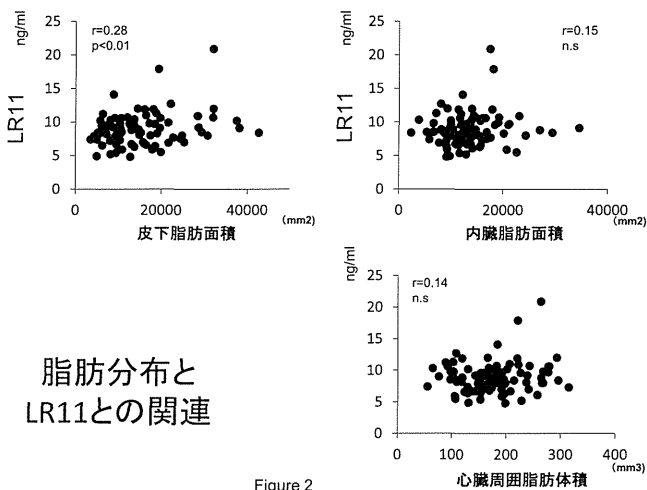


Figure 2

図3 心臓超音波検査と脂肪分布との関連

FIGURE 3. Co-relations of fat distribution and cardioecography

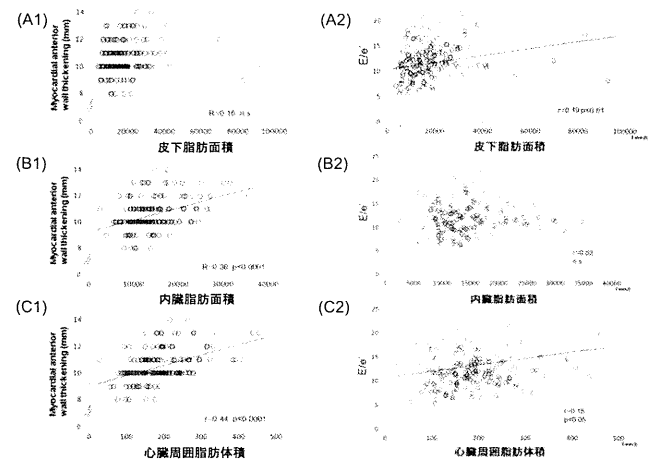


表3 心機能とLR11との関連

Table 3

心機能とLR11

	Pearsons correlation coefficient	P value
E F (%)	0.11	n.s.
前壁厚 (mm)	0.12	n.s.
E/e'	0.35	<.001

表4 心筋拡張障害に寄与する各種マーカー

Table 4

心筋拡張障害指標 (E/e')と各種マーカーとの相関

	Simple linear regression analysis		Multivariate regression analysis		
	Pearsons correlation coefficient	p values	(b)	t-value	p value
Age	0.15	.07	0.04	1.06	.44
male	-0.12	.45			
Subcutaneous fat area (mm ²)	0.19	<.01	0.00	1.02	.38
Visceral fat area (mm ²)	0.03	0.69			
Epicardial adipose (mm ³)	0.16	<.05			
Total cholesterol (mg/dl)	0.01	.92			
HDL-cholesterol (mg/dl)	-0.02	.78			
Triglyceride(mg/dl)	0.05	.52			
LDL-cholesterol(mg/dl)	0.02	.78			
Fasting Blood sugar (mg/dl)	0.15	.06			
Insulin(μU/dl)	0.07	<.05			
HOMA-IR	0.13	0.11	0.12	1.33	.19
HbA1c (%)	0.18	<.05	0.51	0.66	.51
LR11	0.36	<0.001	0.14	2.8	<.01

*Multivariate regression analysis. coefficient (R)=0.44 F value=4.0 p < 0.01, (n=92)

HDL-cholesterol, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; HbA1c, glycosylated hemoglobin.

平成24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

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： 柴 友明 同 眼科講座
高橋 真生 同 内科

現在、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。今回我々は、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と思われた。

A. 研究目的

現在、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年間 3000~4000 人が失明している。そして現在日本では約 1100 万人の糖尿病患者及び 170 万人の網膜症患者が存在するといわれ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る。しかしながら実際の臨床において、血糖コントロールの指標である HbA1c がコントロールされている症例においても糖尿病網膜症が進行していることに遭遇する。また、網膜症発症、進展の病態は動脈硬化の病態と類似していることが種々の研究により報告されている。

一方、LR11 は LDL 受容体ファミリーとして内膜平滑筋細胞に特異的に発現する遺伝子として同定され、細胞外へ放出される活性物質である。また可溶性であり、血中で存在することから、内膜平滑筋細胞のバイ

オマーカーとして動脈硬化疾患における新しい指標として注目されている。同研究協力者である、高橋、白井らは冠動脈疾患症例において血中可溶性 LR11 が高値であることを報告した。

今回我々は、糖尿病網膜症症例 54 症例で血中可溶性 LR11 を測定し、網膜症重症度での検討を行った。

B. 研究方法

対象者：

当科では、糖尿病網膜症発症、進展の危険因子として睡眠呼吸障害に注目し研究を行ってきた。今回の対象は眼科手術目的で入院した糖尿病網膜症を有する 2 型糖尿病症例のうち、睡眠呼吸障害にて循環器センターを受診した 54 症例である。内訳は糖尿病網膜症最重症例である増殖糖尿病網膜症 Proliferative diabetic retinopathy (PDR) 29 例 (男性 20 例、女性 9 例 平均年齢 62.4 ± 9.7 歳)、網膜血管新生を伴わない非増殖糖尿病網膜症 Non proliferative diabetic

retinopathy (NPDR) 25 例 (男性 17 例、女性 8 例 平均年齢 66.0 ± 8.6 歳) である。

方法：

PDR 群、NPDR 群で患者背景因子として (年齢、性別、推定 GFR 値、肥満指数 Body mass index BMI、高血圧の合併、インシュリン治療の有無)、薬剤治療歴としてスタチン、ACE 阻害薬、ARB の内服の有無、血液生化学的検査として (血中可溶性 LR11 (U)、HbA1c 値、空腹時血糖、総コレステロール値、トリグリセライド、HDL コレステロール値、LDL コレステロール値) を両群で統計学的に比較した。また本検討の有用性を検討するため両群で有意差、または傾向を認めた項目で ROC 曲線を作成し、感度、特異度を算出した。最後に全症例で、可溶性 LR11 の発現に関連する因子を単回帰分析にて検討した。

C. 研究結果

1) PDR、NPDR 群における患者背景因子、治療歴

男女比、年齢、推定 GFR、高血圧の合併、スタチン、ACE 阻害薬、ARB の治療歴共に両群間に有意差を認めなかった。インシュリン治療は PDR 群で有意に頻度が高く (PDR 65.5%、NPDR 13.6% $P < 0.0001$)、BMI は高値である傾向にあった (PDR 25.8 ± 3.7 、NPDR 23.8 ± 4.0 $P = 0.06$)。 (表 1)

2) PDR、NPDR 群における血液、生化学的検査

血中可溶性 LR11 は PDR 群で 5.8 ± 1.3 (U)、NPDR 群で 3.7 ± 1.2 (U) で有意に PDR 群に高値であった ($P < 0.0001$)。HbA1c 値 (PDR 7.0 ± 1.4 、NPDR 6.5 ± 0.8 $P = 0.1$)、総コレステロール (PDR 202.6 ± 40.7 、NPDR 183.8 ± 34.8 $P = 0.12$) で PDR 群に高値である傾向を認めた。トリグリセライド、HDL コレステロール、LDL コレステロールは両群間に差がなかった。 (表 2)

3) ROC 曲線 (Receiver Operatorating Characteristic curve)

本研究における PDR に対する可溶性 LR11 の感度、特異度を検討するため ROC 曲線を作成した。(図 1) 可溶性

LR11 の PDR に対する感度は 78%、特異度 77%、でカットオフ値は 4.2 (U) であった。

4) 可溶性 LR11 発現に関連する因子の検討

可溶性 LR11 の発現に関連する因子として HbA1c 値 (Pearsons correlation coefficient 0.32、 $P < 0.01$)、LDL コレステロール (Pearsons correlation coefficient 0.31、 $P < 0.05$) (表 3)

D. 考察

可溶性 LR11 とアルツハイマー病、心血管疾患との関連は報告されているが、眼科領域における線維血管増殖性疾患との関連は現在報告されていない。そこで今回我々は糖尿病網膜症と可溶性 LR11 の関連を検討した。Preliminary な結果であるが、糖尿病網膜症の最重症例である PDR において血中可溶性 LR11 は有意に高値に発現しており、ROC 曲線における検討でも PDR と有意な相関を認めた。糖尿病網膜症の病態が動脈硬化の病態と類似していることから、血中可溶性 LR11 は大血管における動脈硬化の指標であると共に、毛細血管レベルにおける血管障害の指標となり得る可能性が推測された。また可溶性 LR11 の発現に関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た。Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes (FIELD) study では、フィブラート製剤投与により網膜光凝固術のイベントが 31% と有意に抑制できたと報告されており、糖尿病網膜症進展には脂質コントロールも関与していると考えられる。以上より血中可溶性 LR11 は糖尿病網膜症例では、血糖コントロール、脂質コントロールをも反映しており、あらたな糖尿病網膜症発症、進展のバイオマーカーになり得る可能性が示唆された。しかしながら本検討は症例が少数であり、今後より多数例での検討が必要である。また今後は可溶性 LR11 の眼局所での発現を検討し、可溶性 LR11 が糖尿病網膜症に対し直接的に作用しているか、また代替指標であるのかを見極めていく必要がある。

E 結論

以上の結果より、PDR 症例は、NPDR 症例より血中可溶

型 LR11 が高く発現していることが示唆された。また糖尿病網膜症症例において HbA1c 値、LDL コレステロール値を反映していた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

Takahashi M, Bujo H, Shiba T, et al Enhanced circulating soluble lr11 in patients with diabetic retinopathy. Am J Ophthalmol 2012; 154:187-19

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

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

糖尿病冠動脈疾患における可溶性LR11濃度の長期予後との関連性に関する研究

研究代表者又は研究分担者 代田浩之 順天堂大学循環器内科教授

研究要旨

糖尿病冠動脈疾患における可溶性LR11濃度とその長期予後と有意に関連することが明らかとなり、LR11の予後予測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

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する。

B. 研究方法

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。（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

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, $P < 0.05$ ）。

D. 考察

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。

E. 結論

可溶性LR11は糖尿病冠動脈疾患における長期予後予測因子となりうる。

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年欧州心臓病学会にて発表予定

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

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

研究代表者又は研究分担者 三井田 孝 順天堂大学医学部教授

研究要旨

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患者および正常対照の髄液を用いた非変性二次元電気泳動法において可溶性LR11はApoE rich-HDLに結合した。

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。

(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N-2DG法では、可溶性LR11はApoE rich-HDLに分布した。

D. 考察

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 ($A\beta$)のクリアランスに関わり、 $A\beta$ 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、アルツハイマー病の発症に重要なAmyloid β の調節に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 なし

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 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

悪性リンパに腫おける 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。

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、543 例の悪性リンパ腫症例において LR11 タンパクの発現を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。またリンパ腫治療における LR11 の機能について培養細胞を用いた *in vitro* の検討を行った。

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、WHO 分類に基づく組織亜型別での発現の有無を検討した。また、臨床病理学的事項との関連もを検討した。*in vitro* の研究においては B 細胞株である Raji 細胞における LR11 の発現を、short hairpin DNA により抑制し、この細胞株で Rituximab による補体依存性細胞障害への影響を検討した。（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）。遺伝子組み換えを伴う *in vitro* の研究は、カルタヘナ法を遵守し行った。なお埼玉医科大学遺伝

子組換え DNA 実験安全委員会の承認を得ている(承認番号 1001 号)。

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。また LR11 陰性群においては CHOP 療法下にくらべ Rituximab 併用療法下で予後改善がみられたが、LR11 陽性群ではこの予後改善が見られなかった。LR11 陽性群における Rituximab 併用療法下で予後改善がみられなかったことについて、LR11 の発現が Rituximab の作用を抑制しているという作業仮説をたて、リンパ腫細胞株を用いて Rituximab による細胞障害について検討した。この結果、LR11 の発現を short hairpin DNA により LR11 の発現を抑制した細胞では対照細胞に比して Rituximab による補体依存性細胞障害が亢進していた。

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 が何らかの役割を果たしている可能性がある。このためこれらの LR11 がこれらの形

質転換のマーカールおよび腫瘍マーカールとなる可能性が示唆された。びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫では LR11 陰性群は CHOP 単独療法に比して Rituximab 併用療法で予後改善がみられたものの、LR11 陽性群ではこの予後改善がみられなかった。また in vitro の検討では、LR11 発現細胞は LR11 発現抑制細胞に比して Rituximab による補体依存性細胞障害が抑制されており、LR11 により Rituximab の細胞障害作用が抑制されている可能性が考えられる。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。

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ルとなりうることを示している。さらに LR11 は Rituximab による細胞障害の調節分子である可能性が考えられた。

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

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.

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.

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.

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.

Tumor promoting effect of podoplanin-positive fibroblasts is mediated by enhanced RhoA activity. Ito S, Ishii G, Hoshino A, Hashimoto H, Neri S, Kuwata T, Higashi M, Nagai K, Ochiai A. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 25;422(1):194-9.

田丸 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

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

1. 学会発表

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

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

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.

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

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。我々は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。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。

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の造血器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 μ 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 (Hs9999901_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24例中22例、ALLでは8例中7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。

造血器悪性腫瘍患者診断時血清におけるsLR11

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

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AML41例のうち、完全寛解は33例に得られ、寛解率

は80.5%であった。診断時血清sLR11を20 ng/ml以上と20 ng/ml未満の2群にわけて解析すると、低値群の21人のうち、20人に完全寛解が得られ、寛解率は95.2%であったのに対し、高値群では65%であり、有意に低値群で寛解率が不良であった(P=0.020)。AMLにおける5年の全生存率は診断時のsLR11≥20 ng/mlの高値群で有意に低値であった[36.8% vs 63.7%、P=.04; hazard ratio (HR): 2.74; 95% confidence interval (CI): 1.04-8.01] (図3)。ALLは統計学的解析には症例数が少なく不十分であった。

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±14.5 ng/ml、22.2±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と報告している。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が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 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
2. 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
3. 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

4. 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

5. 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

6. 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.

7. 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

8. 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

9. 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

10. 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.

11. 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

12. 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

13. 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

14. 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

15. 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

16. 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

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* 2012; 413(19-20):1542-1548. PMID: 22750733

2. Kawaguchi T, Ohwada C, Takeuchi M et al. LR11: a novel biomarker identified in follicular lymphoma. *Haematologica* 投稿中

3. 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性受容体. *The Lipid* 2012; 23(4): 93-100

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

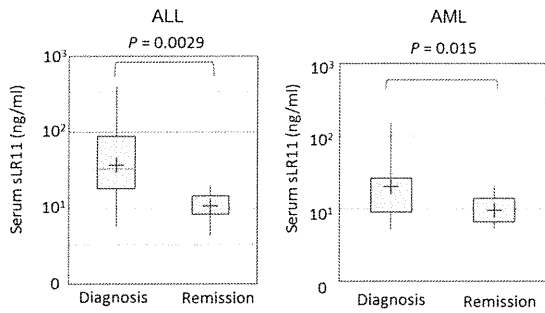


図4 悪性リンパ腫における LR11 の発現

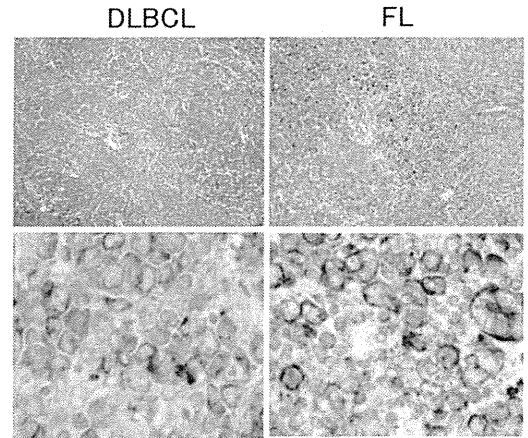


図2 AMLにおける末梢血芽球割合と sLR11

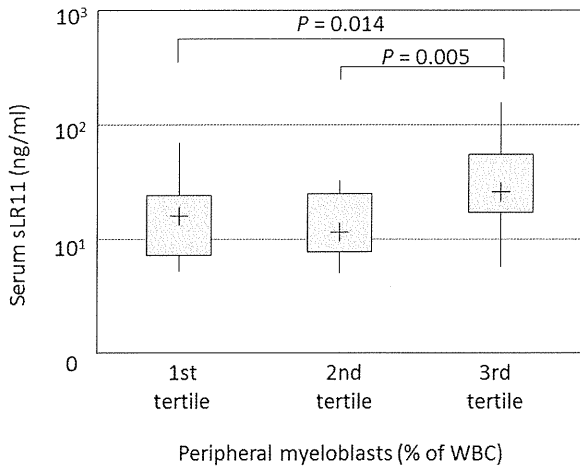


図5 初診時 sLR11 値は DLBCL, FL の予後を規定する

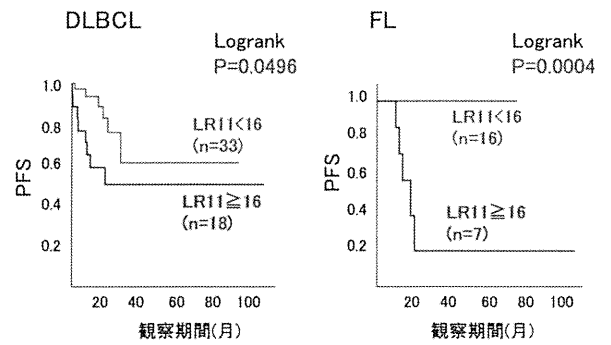


図3 AMLにおける全生存率

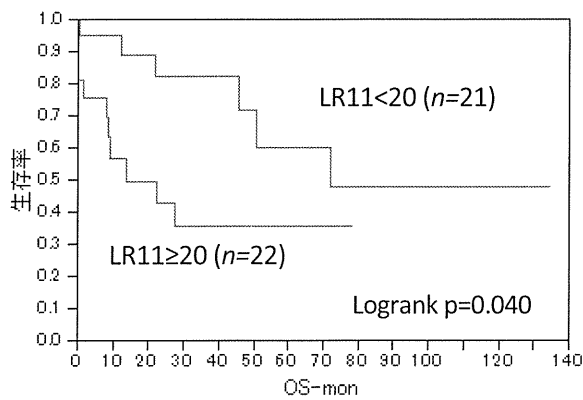


表1 DLBCL, FL と IPI, FLIPI の相関 (多変量解析)

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			
	FL	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 x 10E8 (NA)	0.001

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。昨年までに我々は、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β42 (Aβ42)、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、Aβ42、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。これらの所見から、髄液中可溶性 LR11 は、認知機能低下が出現する以前の脳内アルツハイマー病の病態変化を反映し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、認知機能障害の重症度により被験者を階層化し、髄液中の可溶性LR11、総タウ、リン酸化タウ、アミロイドβ42 (Aβ) の測定を行なった。

B.研究方法

71名の被験者を、clinical dementia rating (CDR)に基づいて、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群に分類した。書面による同意を得た後に、腰椎穿刺を行い脳脊髄液を採取した。髄液中可溶性LR11はELISA法（積水メディカル）を用いて測定し、髄液中Aβ42、総タウ、リン酸化タウは

xMAP technology (Inogenetics) を用いて測定を行った。（倫理面への配慮）

本研究は新潟大学および千葉大学医学部倫理委員会の承認を得た上で行った。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

髄液中の可溶性LR11は、CDR=0群で 12.6 ± 5.0 ng/mL、CDR=0.5群： 11.0 ± 3.7 ng/mL、CDR<1群： 12.9 ± 4.0 ng/mLであり、3群間で有意な差は認めなかった。髄液中総タウは、CDR=0群で 74.1 ± 38.0 ng/mL、CDR=0.5群： 118.9 ± 69.2 ng/mL、CDR<1群： 129.1 ± 76.4 ng/mLであり、CDR=0群と比較しCDR=0.5群とCDR<1群で有意に高値を示した。リン酸化タウは、CDR=0群で 33.7 ± 12.0 ng/mL、CDR=0.5群： 33.9 ± 11.7 ng/mL、CDR<1群： 44.3 ± 24.5 ng/mLであり、3群間で有意な差は認めなかった。髄液中 Aβ42は、CDR=0群で 339.3 ± 113.7 ng/mL、CDR=0.5群： 172.5 ± 62.4 ng/mL、CDR<1群： 125.3 ± 49.6 ng/mLであり、CDR=0群と比較しCDR=0.5群とCDR<1群で有意に低

値を示した。

CDR=0群において、髄液中可溶性LR11は総タウ ($r=0.379$, $P=0.027$)、リン酸化タウ ($r=0.264$, $P=0.132$)、A β 42 ($r=0.524$, $P<0.001$) と有意な相関を示した。CDR=0.5群、CDR<1群では、このような有意な相関は認めなかった。全ての群をまとめて解析すると、髄液中可溶性LR11は、総タウ ($r=0.298$, $P=0.012$)、リン酸化タウ ($r=0.284$, $P=0.016$)、A β 42 ($r=0.276$, $P=0.02$) といずれも有意な相関を示した。

D. 考察

今回我々は、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。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る、共同研究によりvalidation studyを進めている。

E. 結論

脳脊髄液中の可溶性LR11はADの有用なバイオマーカーの候補と考えられた。髄液中可溶性LR11は、認知機能が出現する以前のAD病態を反映している可能性がある。

F.健康危険情報：該当なし

G. 研究発表

1.論文発表：論文発表準備中

2.学会発表

1) 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

2) 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

3) 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

H.知的財産権の出願・登録状況：該当なし

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

川崎病の急性期と遠隔期におけるバイオマーカーとしての血中可溶性 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する。【方法】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。【結果】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)。【結論】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。

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。

川崎病急性期の問題点として IVIG 治療に反応しない不応例で CAL 発症の頻度が著しく高いことが挙げられ、IVIG 不応例を治療前に予測するバイオマーカーが期待されている。遠隔期においては、急性期血管炎の内膜平滑筋が遠隔期にも残存し狭窄病変

や若年での動脈硬化発症の危険因子となることが懸念されている。

川崎病急性期における sLR11 の動態とバイオマーカーとしての有用性を検討した。また、川崎病遠隔期において sLR11 と CAL の関連、血管障害バイオマーカーとしての有用性を検討した。

B. 研究方法

1) 川崎病急性期

川崎病急性期患者 37 例を対象とした。初回あるいは 2 回目の γグロブリン治療 (IVIG) に奏効したもの：奏効群 30 例、2 回