201315069A

厚生労働科学研究費補助金

循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業

血中自己抗体検出と新規炎症マーカーを用いた急性冠症候群予知因子および治療標的の探索

課題番号：H25－循環器等（生習）－一般－026

平成25年度　総括・分担研究報告書

研究代表者　西　英一郎

平成26（2014）年 5月

厚生労働科学研究費補助金

循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業

血中自己抗体検出と新規炎症マーカーを用いた急性冠症候群予知因子および治療標的の探索

課題番号：H25－循環器等（生習）－一般－026

平成25年度　総括・分担研究報告書

研究代表者　西　英一郎

平成26（2014）年 5月

目　　次

Ⅰ．総括研究報告
血中自己抗体検出と新規炎症マーカーを用いた急性冠症候群予知因子および治療標的の探索

西　英一郎 -------------------------------- 1

II. 分担研究報告
１．梗塞前狭心症の有無に注目した急性心筋梗塞患者の臨床的背景、予後の調査

木村　剛 -------------------------------- 7

２．動脈硬化関連疾患自己抗体マーカーのACS症例における定量評価

日和佐　隆樹 -------------------------------- 13

３．急性冠症候群バイオマーカーとしてのマイクロRNAの可能性について

尾野　亘 -------------------------------- 16

４．NASHにおけるNRDcの病態生理学的意義の検討

妹尾　浩 -------------------------------- 21

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -------------------------------- 25

IV. 研究成果の刊行物･別刷 -------------------------------- 25

I. 総 括 研 究 報 告

Ｉ．総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業）
総括研究報告書

血中自己抗体検出と新規炎症マーカーを用いた急性冠症候群予知因子および治療標的の探索

研究代表者：西　英一郎（京都大学大学院医学研究科 循環器内科学 特定准教授）

研究要旨
ACS による死亡の約半数を占める発症早期の院外死をいかに抑制するかは喫緊の課題である。我々は、1）ACS 発症の予知が可能で、かつ 2）病因論的にも重要で治療標的になり得る新たな ACS マーカーの同定を目指す。ACS 発症後早期に上昇している自己抗体は発症前から出現していること、我々が見出した新規炎症マーカー：ナルディライジン（NRDc）が慢性炎症の病態をよく反映していることから、予知マーカーの探索に関して、血中自己抗体検出および血清 NRDc 濃度に注目した。本研究では、1）ACS 患者血清の自己抗体発現パターンの解析、2）NRDc 濃度の解析、を行い ACS 予知マーカーの同定を行う。さらに NRDc の炎症における役割、マーカー、治療標的としての有用性を明らかにするため、遺伝子改変マウスを用いて 3）ACS や非アルコール性脂肪性肝炎などにおける NRDc の役割の解明を行い、将来的には治療薬の開発を目指す。

Ａ．研究目的

本研究の目的は、急性冠症候群発症（ACS）の予知を可能にするバイオマーカーを開発すること、そして ACS による死亡の約半数を占める、突然死をふくむ院外死を抑制することにある。将来的に治療薬の開発につながるよう、病因論的にも重要で、病態の本質を反映するマーカーの同定を目指す。

予知マーカー探索にあたり、我々は血中自己抗体検出に注目した。その理由は、1) 抗体産生には２週間以上かかることから、ACS 発症後早期に上昇している自己抗体は発症前から出現していること、2) 生活習慣病の共通基盤である慢性炎症に自己抗体が関与している可能性が高いこと、である。

一方我々はメタロプロテアーゼ、ナルディライジン（NRDc）を、HB-EGF 結合タンパク質として同定し、1) NRDc が HB-EGF や TNF-αの細胞外ドメインシェディングを活性化すること、2) NRDc 欠損マウスが、メタボリックシンドロームや NASH モデルにおいて顕著な炎症抵抗性を呈すこと、3) ACS 症例において血清 NRDc が上昇すること、を明らかにした。これらの結果は、NRDc 濃度が慢性炎症を基盤として発症する ACS の病態をよく反映している可能性を示唆した。

本研究では、ACS 患者血清の①自己抗体発現パターンの解析、②血清 NRDc の解析を並行して行う。①では、タンパク質アレイを用いて ACS で特異的に上昇する自己抗体のスクリーニングを行い、候補自己抗体の測定系構築および、ACS 多症例での測定を行う。さらに当科入院症例の保存血清を用いた後ろ向きコホート研究にて、その後のイベント発生などとの関連を検討し、最も有効に ACS 発症を予知し得るマーカー、あるいはその組み合わせを同定する。

患者血清の解析とともに、NRDc を標的とする治療薬の開発を実現するため、マウスを用いた基礎研究も行う。特に NRDc の阻害が炎症抑制につ

ながるかどうかを、NRDc 遺伝子改変マウスとACS、NASH モデルを用いて検討する。

B．研究方法

1) ACS 患者血清の自己抗体発現パターンの解析：プロテインアレイを用いた自己抗体スクリーニング： ACS 患者血清（発症 6 時間以内)、コントロール血清それぞれ 6 例分を用いて、血清中の自己抗体出現パターンを解析し、ACS 症例で特異的上昇を呈する抗原候補タンパク質を抽出する。一方、すでに施行した脳梗塞症例のスクリーニングで同定し、測定系（AlphaLISA）を確立できた約 100 種類の抗原候補タンパク質に対する自己抗体価を、ACS 症例血清を用いて検討する。

2) ACS 患者血清 NRDc 濃度の解析：独自に開発したヒト血清 NRDc 高感度 ELISA を（測定感度 50pg/ml）を用いて、ACS 入院症例の血清 NRDc を測定する。ACS 発症後時間採血により血清 NRDc 値の時間経過の検討も行う。

3) ACS・NASH における NRDc の病態生理学的意義の解明：野生型と NRDc 欠損マウスを、1) 冠動脈結紮による ACS モデル、2) コリン欠乏食による NASH モデルに供し、NRDc の疾患における役割を検討する。全身性 NRDc-KO マウスでは神経、内分泌系表現型による影響が除外できないため、心筋細胞、肝細胞特異的 NRDc-KO マウスを作製する。さらに、NRDc の酵素活性の疾患における意義を明らかにするため、非活性型 NRDc ノックイン（KI）マウスを作製する。

（倫理面への配慮）

本研究は、京都大学医学部・医学研究科医の倫理委員会および千葉大学大学院医学研究科倫理委員会で審査を受け承認されたものである。本研究は、疫学研究に関する倫理指針に基づいて実施する。また、個人情報の保護に関する(平成 15 年法律第 57 号)の規定を遵守し、個人データの安全管理のための必要かつ適切な処置、個人情報の取り扱いに関する苦情の処理その他の個人情報の適正な取り扱いを確保するために必要な措置を講じ、かつ、当該措置の内容を公表するよう努める。動物実験計画は全て、京都大学動物実験委員会での審査を経て承認されたものである。京都大学の動物実験に関する指針に従い、動物に対する苦痛負荷は極力抑え、倫理的に問題のない状態で行う。本研究計画は、組み替え DNA 実験を含む研究計画であり、京都大学において『組み替え DNA 実験申請』の承認を受けている。

C．研究結果

1) ACS 患者血清の自己抗体発現パターンの解析：プロテインアレイによる血中自己抗体のスクリーニング（ACS 患者および健常ボランティア）の結果、ACS 症例で有意に上昇している自己抗体（抗原タンパク質）を約 30 種類抽出した。一方、同様の手法ですでに同定した脳梗塞マーカーを ACS および対照症例で検討したところ、115 種類のマーカーのうち 76 種類ものマーカーが ACS で有意に上昇していた。引き続き行う２次スクリーニングでは、より多くの ACS 症例血清が必要になるため、大阪赤十字病院など関連施設で保存している ACS 症例血清を本課題にて使用できるよう、本課題に沿った申請書を京都大学および他院の倫理委員会に提出し承認された。

2) ACS 患者血清 NRDc 濃度の解析：当院入院の ACS 症例について、引き続き血清 NRDc の測定を行っている。安定労作性狭心症患者では血清 NRDc の有意な上昇を認めないが、心筋壊死に至らない不安定狭心症群では高値を認めたことから、NRDc が心筋壊死量だけを反映しているのではないことが示唆された。

3) ACS・NASH における NRDc の病態生理学的意義の解明：マウス ACS モデル（冠動脈結紮）における免疫染色法を用いた検討から、虚血にさらされた心筋は壊死に至る前の非常に早い段階から NRDc を細胞外に放出することが明らかになった。この現象は、初代培養ラット心筋細胞をカルシウムイオノフォアや過酸化水素で刺激する実験にお

いても再現できた。一方マウスNASHモデル（コリン欠乏食、高脂肪食）において、NRDc欠損マウスは野生型と比較して、脂肪肝、肝機能障害、肝線維化の程度は軽度であることが明らかになった。

D．考察

経皮的冠動脈インターベンション（PCI）の進歩、普及により、ACSの治療成績は飛躍的に向上し、院内死亡率は5％前後にまで低下した。一方、ACSによる死亡の約半数を占める発症早期の院外死をいかに抑制するかは喫緊の課題である。今のところ、発症前に症状のない無症候性心筋虚血、あるいは有意狭窄のない冠動脈プラーク破裂による発症を簡便に予知する方法はない。

現在ACS診断に用いられているバイオマーカーは虚血による心筋障害の結果漏出するものである。本申請で我々は、1) ACS発症の予知が可能で、かつ 2) 病因論的にも重要で治療標的になり得る新たなACSマーカーの同定を目指す。予知マーカーの探索に関して、我々は血中自己抗体検出に注目した。抗体産生には2週間以上かかることから、ACS発症後早期に上昇している自己抗体は、発症前から出現していたはずであり、自己抗体をスクリーニングすれば予知マーカー探索が可能になると考えられた。

今回新たに施行したプロテインアレイによるスクリーニングで、ACSで特異的に上昇している約30種類のマーカー候補タンパク質を同定した。一方、同様の手法ですでに同定した脳梗塞マーカーをACSおよび対照症例で検討したところ、多くのマーカーがACSでも有意に上昇していた。動脈硬化という共通の病態基盤の存在によると考えられるが、興味深いことに、今回新たに抽出したACSマーカー候補タンパク質のうち、脳梗塞マーカーとして同定されていたタンパク質はわずか1種類にとどまった。これらの中に理想のACS予知マーカーが含まれているかどうか今後さらに多症例での検証を続け、感度、特異度とも優れた予知マーカーの同定を目指す。

今年度得られた重要な結果は、1) 血清 NRDcが心筋壊死に至らない不安定狭心症群でも高値を認めたこと、さらに 2) マウス ACS モデルにて、虚血心筋は壊死に至る前の非常に早い段階からNRDcを細胞外に放出したこと、である。これらの結果は、血清NRDcが心筋壊死量だけを反映しているのではないことを明確に示しており、虚血マーカー、ACS予知マーカーとして期待できることが示唆された。

E．結論

本研究の目的は、1）ACS 発症の予知が可能で、かつ 2）病因論的にも重要で治療標的になり得る新たなACSマーカーの同定を目指すことにあるが、平成 25 年度に得られた臨床および基礎研究の結果は、NRDcが有効なACS予知マーカーとしての可能性を有することを示唆した。新たなACS予知マーカーの網羅的スクリーニングでは、約30種類の候補タンパク質同定に成功した。

F．健康危険情報

該当なし

G．研究発表

1．論文発表

1. Ohno M, Hiraoka Y, Lichtenthaler S, Nishi K, Saijo S, Matsuoka T, Tomimoto H, Araki W, Takahashi R, Kita T, Kimura T and Nishi E*. Nardilysin prevents amyloid plaque formation by enhancing α-secretase activity in an Alzheimer's disease mouse model. **Neurobiol Aging** 35: 213-22, 2014. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.07.014.
2. Hiraoka Y, Matsuoka T, Ohno M, Nakamura K, Saijo S, Matsumura S, Nishi K, Sakamoto J, Chen Po-Min, Inoue K, Fushiki T, Kita T, Kimura T and Nishi E*. Critical roles of nardilysin in the maintenance of body temperature homeostasis. **Nat. Commun.** 5: 3224, 2014.

doi: 10.1038/ncomms4224

2. 学会発表

1. Nishi K, Sato Y, Ohno M, Hiraoka Y, Saijyo S, Sakamoto J, Chen P, Kita T, Inagaki N, Kimura T, Nishi E. Nardilysin is a critical regulator of insulin secretion and glucose metabolism. American Heart Association scientific sessions 2013. Nov 18 (15-19), 2013, Dallas, USA.
2. Hiraoka Y, T. Matsuoka, M. Ohno, K. Nishi, K. Nakamura, K, Kita, T. Kimura and E. Nishi. Critical roles of a metalloendopeptidase nardilysin in cold-induced adaptive thermogenesis ASCB (American Society for Cell Biology), Dec 14-18, 2013, New Orleans, USA
3. Ohno M, Watanabe S, Hiraoka Y, Nishi K, Saijo S, Sakamoto J, Chen PM, Kita T, Nishi E, Kimura T. Nardilysin, an Activator of Ectodomain Shedding, is a Novel and Potent Biomarker for Acute Coronary Syndrome (English session 最優秀賞) 第 115 回日本循環器学会近畿地方会 (2013 年 6 月 15 日、京都)
4. 大野美紀子、平岡義範、松浦博、西清人、西城さやか、坂本二郎、陳博敏、牧山武、北徹、木村剛、西英一郎. ナルディライジンによる心拍数制御機構(学会奨励賞受賞) 第 18 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 (2013 年 8 月 16-17 日、大阪)
5. 西城さやか,平岡 義範,松岡 龍彦,大野 美紀子,中村 和弘,松村 成暢,西 清人,坂本 二郎,陳 博敏,北 徹,木村 剛,西 英一郎. 体温恒常性維持におけるナルディライジンの役割. 平成 25 年度 温熱生理研究会 (2013 年 9 月 5-6 日、岡崎)
6. 西城さやか,平岡 義範,松岡 龍彦,大野 美紀子,中村 和弘,松村 成暢,西 清人,坂本 二郎,陳 博敏,北 徹,木村 剛,西 英一郎. ナルディライジンは PGC-1 α を制御することで体温恒常性維持機構と適応熱産生を調節する. 第 36 回日本分子生物学会年会 (2013 年 12 月 3-6 日、神戸)
7. 西 清人,佐藤 雄一,大野 美紀子,平岡 義範,西城 さやか,坂本 二郎,陳 博敏,松岡 龍彦,北 徹,稲垣 暢也,木村 剛,西 英一郎. ナルディラインジンはグルコース応答性インスリン分泌を制御する. 第 36 回日本分子生物学会年会 (2013 年 12 月 3-6 日、神戸)
8. 大野 美紀子,平岡 義範,Lichtenthaler Stefan F,富本 秀和,荒木 亙,高橋 良輔,坂本二郎,陳 博敏,北 徹,木村 剛,西 英一郎. アルツハイマー病におけるナルディライジンの意義. 第 36 回日本分子生物学会年会 (2013 年 12 月 3-6 日、神戸)
9. Nishi K, Sato Y, Ohno M, Hiraoka Y, Saijyo S, Sakamoto J, Chen P, Kita T, Inagaki N, Kimura T, Nishi E. Nardylisin controls glucose metabolism through the regulation of insulin secretion. 第 78 回日本循環器学会学術集会 (2014 年 3 月 21 日、東京)
10. Saijo S, Hiraoka Y, Matsuoka T, Ohno M, Nakamura K, Matsumura S, Nishi K, Sakamoto J, Chen P, Kita T, Kimura T, Nishi E. Nardilysin Regulates Adaptive Thermogenesis and Body Temperature Homeostasis through Modulation of PGC-1α. 第 78 回日本循環器学会総会 (2014 年 3 月 23 日、東京)
11. Sakamoto J, Chen PM, Saijo S, Nishi K, Ohno M, Kita T, Kimura T, Nishi E. Nardilysin is Involved in Pressure Overload-induced Dysfunction and Fibrosis of Left Ventricle. 第 78 回日本循環器学会学術集会 (2014 年 3 月 21 日、東京)

Ｈ．知的所有権の取得状況

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

II. 分　担　研　究　報　告

Ⅱ．分担研究報告書

1．梗塞前狭心症の有無に注目した急性心筋梗塞患者の臨床的背景、予後の調査

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業）
分担研究報告書

血中自己抗体検出と新規炎症マーカーを用いた急性冠症候群予知因子および治療標的の探索

―梗塞前狭心症の有無に注目した急性心筋梗塞患者の臨床的背景、予後の調査―

研究分担者：木村　剛（京都大学大学院医学研究科　循環器内科学　教授）

研究要旨

急性冠症候群予知因子を探索するにあたり、どのような疾患背景を有する患者群で予知因子の有用性が高いかを理解することは重要である。今回我々は大規模コホート研究 The CREDO-Kyoto AMI Registry の登録症例を対象として梗塞前狭心症の有無に注目した急性心筋梗塞患者の臨床的背景、予後の調査を行った。病院到着前 48 時間以内に 30 分以内の胸痛を梗塞前狭心症と定義した。梗塞前狭心症がある心筋梗塞患者の梗塞サイズは有意に減少し、長期予後は総虚血時間に比例せず、良好であった。しかし、梗塞前狭心症がない患者では総虚血時間に比例して長期予後が悪化していた。

以上の結果は、前駆症状である狭心症状を呈さなかった患者群における発症予知が可能になれば、その意義は極めて大きいことを示唆している。

A．研究目的

急性冠症候群予知因子を探索するにあたり、どのような疾患背景を有する患者群で、特に予知因子の有用性が高いかについて充分な情報が得られているとは言えない。

本研究は、緊急冠動脈インターベンション治療を行っている急性期病院で治療を受けた急性心筋梗塞患者の、発症前の前駆狭心症状に注目し、診療実態や予後を調査することを目的とした。

B．研究方法

The CREDO-Kyoto AMI Registry に登録された症例のうち、発症から 24 時間以内にカテーテルによる緊急冠血行再建術を受け、梗塞前狭心症の有無について情報収集できた 3476 例の急性心筋梗塞（STEMI）患者を対象に、梗塞前狭心症の有無について注目し、その臨床的背景、治療成績、予後の調査を行った。

（倫理面への配慮）

「心血管疾患患者における血中バイオマーカーおよびRNA発現レベルと病態との関連の検討（ヒト遺伝子解析承認番号 G-322）」は倫理委員会にて承認ずみであり、倫理面で問題のないように進める。

C．研究結果

緊急冠血行再建術を受けた The CREDO-Kyoto AMI Registry 登録症例での検討では、平均年齢：梗塞前狭心症あり群 66.1±11.7 歳、梗塞前狭心症なし群 67.5±12.4 歳と、梗塞前狭心症あり群のほうが約 1.4 歳若年であった。発症-治療時間（平均（四分位範囲））が梗塞前狭心症なし群 4.1（2.8-6.9）時間に対して梗塞前狭心症あり群 4.9

（3.1-9.1）時間と梗塞前狭心症あり群で有意に長い（p<0.001）一方で、病院到着-治療時間は梗塞前狭心症あり群 90（60-132）分、梗塞前狭心症なし群 90（60-132）分と差がないため、発症から治療までの時間の差は、発症からカテーテル治療を行う医療機関に到着するまでの時間の差によると考えられた。患者背景の比較では梗塞前狭心症あり群のほうで心不全既往が少なく（0.6% 対 1.9%, p=0.02）、心房細動が少なく（5.9% 対 9.9%, p=0.001）、血管造影時の完全閉塞所見が少なかった（54% 対 60%, p=0.006）。

急性期の比較では、CPK 最大値にて評価した梗塞サイズ（平均（四分位範囲））は梗塞前狭心症あり群 2141（965-3867）IU/L、梗塞前狭心症なし群 2462（1257-4495）IU/L と、梗塞前狭心症あり群で有意に低く（p<0.001）、5 年間での累積死亡率は梗塞前狭心症あり群 12.4%、梗塞前狭心症なし群 20.7%と梗塞前狭心症あり群で低く、年齢その他の臨床的背景の違いを補正しても差は有意であった(図 3、図 4)。総虚血時間（発症-治療時間）別で見ると、梗塞前狭心症なし群では、総虚血時間が長くなるほど 5 年死亡率は上昇するが、梗塞前狭心症あり群では総虚血時間に影響されなかった。また、梗塞前狭心症あり群かつ総虚血時間 3-24 時間の死亡率は、梗塞前狭心症なし群かつ総虚血時間 3 時間未満の死亡率と同等であったことから、梗塞前狭心症は梗塞進展に影響を及ぼしていることが示唆された（図 5）。総虚血時間、TIMI flow grade、心原性ショックの有無、心不全の有無、梗塞部位、DM の有無で感受性解析を行ったが、5 年死亡率はいずれの解析でも梗塞前狭心症あり群で良好な結果であった。

D．考察

The CREDO-Kyoto AMI Registry 登録症例全体での解析結果から、梗塞前狭心症あり群では、梗塞サイズの減少ならびに、長期予後も良好であることが示された。梗塞前狭心症があると、梗塞進展に影響を及ぼす影響があり、心保護効果があると思われた。従来総虚血時間が短くすることが予後改善につながるとされ、総虚血時間の短縮に注力されてきたが、総虚血時間に影響されない患者群がいるのは興味深い。

一方で、梗塞前狭心症がない群では、総虚血時間に比例して 5 年死亡率が上昇していることから、急性心筋梗塞に対する治療のさらなる改善を目指すためには、梗塞前狭心症がない患者におけるより早期の治療開始が解決すべき重要な問題であることを示している。

梗塞前狭心症は医療介入できないものであるが、昨今 Ischemic Conditioning 領域では、Remote Ischemic Post-conditioning(RIPC)という概念が注目を集めている。STEMI 患者の救急搬送中に上腕圧迫で心筋梗塞サイズが減少するという RCT が発表された（参考文献 Crimi G, et al. Remote ischemic post-conditioning of the lower limb during primary percutaneous coronary intervention safely reduces enzymatic infarct size in anterior myocardial infarction: a randomized controlled trial. JACC Cardiovasc Interv. 2013;6(10):1055-63.）。これは、ST 上昇かつ前壁梗塞の心筋梗塞患者 100 人を対象に、PCI+RIPC か PCI のみかの 2 群に割り付けし、CPK area under curve による梗塞サイズを比較したものである。RIPC の具体的な方法は、下肢の圧迫/解放を 5 分/5 分で 3 サイクル行うものである。結果は、PCI＋RIPC 群で PCI のみ群に比較して 12%の梗塞サイズ減少であった。予後に及ぼす影響までは検討されていないが、もし予後改善効果が期待できるのであれば、心筋梗塞発症後であっても介入できること、救急搬送中より開始できることは大変興味深い。胸痛患者を搬送する救急車内で心電図を記録、データを医師に転送し、心筋梗塞と判定したならば、血行再建可能な病院に搬送する段階から、下肢圧迫を施行しながら搬送し、PCI を迅速に行うというシステム構築は、急性心筋梗塞患者の予後を改善させる可能性があると考える。

E．結論

今回の解析結果から、前駆狭心症状を呈さなかった患者群の予後が悪いことが明らかになった。したがって、これら前駆症状を呈さない症例における発症予知が可能になれば、その意義は極めて大きい。

F．研究発表

1．論文発表

1. Ruwald MH, Okumura K, Kimura T, Aonuma K, Shoda M, Kutyifa V, Ruwald A-H, McNitt S, Zareba W, Moss AJ. Syncope in High-Risk Cardiomyopathy Patients with Implantable Defibrillators: Frequency, Risk Factors, Mechanisms, and Association with Mortality: Results from the Multicenter Automatic Defibrillator Implantation Trial-Reduce Inappropriate Therapy (MADIT-RIT) Study, *Circulation* 2014;129:545-552.
2. Oi M, Toyofuku M, Matsumura Y, Motohashi Y, Takahashi K, Kawase Y, Ko E, Tanaka M, Kitada M, Yuzuki Y, Tamura T, Tanaka N, Kimura T. Utility of nicorandil for the measurement of coronary fractional flow reserve, *Cardiovasc Intervention Ther* 2014;29:24-30.
3. Bourantas CV, Papafaklis MI, Lakkas L, Sakellarios A, Onuma Y, Zhang Y-, Muramatsu T, Diletti R, Bizopoulos P, Kalatzis F, Naka KK, Fotiadis DI, Wang J, Garcia Garcia HM, Kimura T, Michalis LK, Serruys PW. Fusion of optical coherence tomographic and angiographic data for more accurate evaluation of the endothelial shear stress patterns and neointimal distribution after bioresorbable scaffold implantation: comparison with intravascular ultrasound-derived reconstructions, *Int J Card Imaging* 2014.
4. Saito N, Matsuo H, Kawase Y, Watanabe S, Bao B, Yamamoto E, Watanabe H, Nakatsuma K, Ueno K, Kimura T. In vitro assessment of mathematically-derived fractional flow reserve in coronary lesions with more than two sequential stenoses, *J Invasive Cardiol* 2013;25:642-649.
5. Ruwald MH, Okumura K, Kimura T, Aonuma K, Shoda M, Kutyifa V, Ruwald A-, McNitt S, Zareba W, Moss AJ. Syncope in high-risk cardiomyopathy patients with implantable defibrillators: Frequency, risk factors, mechanisms and association with mortality: Results from the MADIT-RIT study, *Circulation* 2013.
6. Imai M, Kimura T, Tazaki J, Yamamoto E, Inoue K. Pathological analyses of very long-term sirolimus-eluting stent implantation in human coronary artery, *J Cardiol Cases* 2013;8:145-147.
7. Watanabe S, Saito N, Bao B, Tokushige A, Watanabe H, Yamamoto E, Kawase Y, Kimura T. Microcatheter-facilitated reverse wire technique for side branch wiring in bifurcated vessels: An in vitro evaluation, *EuroIntervention* 2013;9:870-877.
8. Kozuma K, Kimura T, Suzuki N, Miyazawa A, Waseda K, Honda Y, Morimoto T, Aizawa T, Mitsudo K, Miyazaki S, Yamaguchi T, Isshiki T. Peri-stent contrast staining and very late stent thrombosis after sirolimus-eluting stent implantation: An observation from the RESTART (REgistry of Stent Thrombosis for review and Re-evaluaTion) angiographic substudy, *EuroIntervention* 2013;9:831-840.
9. Kamakura T, Kawata H, Nakajima I, Yamada Y, Miyamoto K, Okamura H, Noda T, Satomi K, Aiba T, Takaki H, Aihara N, Kamakura S, Kimura T, Shimizu W. Significance of non-type 1 anterior early repolarization in patients with inferolateral early repolarization syndrome, *J Am Coll Cardiol* 2013;62:1610-1618.

10. Yamaji K, Kimura T, Morimoto T, Nakagawa Y, Inoue K, Nobuyoshi M, Mitsudo K. Percutaneous coronary intervention in patients with previous coronary artery bypass grafting (from the j-Cypher Registry), *Am J Cardiol* 2013;112:1110-1119.
11. Kitai Y, Ozasa N, Morimoto T, Bao B, Furukawa Y, Nakagawa Y, Kadota K, Yanagita M, Shizuta S, Kimura T. Prognostic implications of anemia with or without chronic kidney disease in patients undergoing elective percutaneous coronary intervention, *Int J Cardiol* 2013;168:5221-5228.
12. Kozuma K, Kimura T, Kadota K, Suwa S, Kimura K, Iwabuchi M, Kawai K, Miyazawa A, Kawamura M, Nakao K, Asano R, Yamamoto T, Suzuki N, Aoki J, Kyono H, Nakazawa G, Tanabe K, Morino Y, Igarashi K. Angiographic findings of everolimus-eluting as compared to sirolimus-eluting stents: Angiographic sub-study from the Randomized Evaluation of Sirolimus-eluting versus Everolimus-eluting stent Trial (RESET), *Cardiovasc Intervention Ther* 2013;28:344-351.
13. Marui A, Okabayashi H, Komiya T, Tanaka S, Furukawa Y, Kita T, Kimura T, Sakata R. Impact of occult renal impairment on early and late outcomes following coronary artery bypass grafting, *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2013;17:638-643.
14. Bao B, Saito N, Watanabe S, Tokushige A, Yamamoto E, Kawase Y, Kimura T, Inoue K. A novel device for antegrade percutaneous balloon aortic valvuloplasty: Feasibility of the looped inoue balloon technique in swine model, *Catheter Cardiovasc Interventions* 2013;82:E564-E568.
15. Ozasa N, Morimoto T, Bao B, Furukawa Y, Nakagawa Y, Kadota K, Iwabuchi M, Shizuta S, Shiomi H, Tazaki J, Natsuaki M, Kimura T. β-blocker use in patients after percutaneous coronary interventions: One size fits all? Worse outcomes in patients without myocardial infarction or heart failure, *Int J Cardiol* 2013;168:774-779.
16. Stefanini GG, Baber U, Windecker S, Morice M-, Sartori S, Leon MB, Stone GW, Serruys PW, Wijns W, Weisz G, Camenzind E, Steg PG, Smits PC, Kandzari D, Von Birgelen C, Galatius S, Jeger RV, Kimura T, Mikhail GW, Itchhaporia D, Mehta L, Ortega R, Kim H-, Valgimigli M, Kastrati A, Chieffo A, Mehran R. Safety and effi cacy of drug-eluting stents in women: A patient-level pooled analysis of randomised trials, *Lancet* 2013;382:1879-1888.
17. Nishida K, Kimura T, Kawai K, Miyano I, Nakaoka Y, Yamamoto S, Kaname N, Seki S, Kubokawa S, Fukatani M, Hamashige N, Morimoto T, Mitsudo K. Comparison of outcomes using the sirolimus-eluting stent in calcified versus non-calcified native coronary lesions in patients on-versus not on-chronic hemodialysis (from the j-Cypher Registry), *Am J Cardiol* 2013;112:647-655.
18. Habara S, Iwabuchi M, Inoue N, Nakamura S, Asano R, Nanto S, Hayashi Y, Shiode N, Saito S, Ikari Y, Kimura T, Hosokawa J, Nakamura M, Kotani J-, Kozuma K, Mitsudo K. A multicenter randomized comparison of paclitaxel-coated balloon catheter with conventional balloon angioplasty in patients with bare-metal stent restenosis and drug-eluting stent restenosis, *Am Heart J* 2013;166:527-533.e2.
19. Hamatani Y, Saito N, Tazaki J, Natsuaki M, Nakai K, Makiyama T, Sasaki Y, Imai M, Watanabe S, Shioi T, Kimura T, Inoue K. Percutaneous balloon valvuloplasty for bioprosthetic mitral valve stenosis, *Heart Vessels* 2013;28:667-671.
20. Tomita M, Asada M, Asada N, Nakamura J, Oguchi A, Higashi AY, Endo S, Robertson E,

Kimura T, Kita T, Economides AN, Kreidberg J, Yanagita M. Bmp7 Maintains Undifferentiated Kidney Progenitor Population and Determines Nephron Numbers at Birth, *PLoS ONE* 2013;8.

21. Okuda J, Niizuma S, Shioi T, Kato T, Inuzuka Y, Kawashima T, Tamaki Y, Kawamoto A, Tanada Y, Iwanaga Y, Narazaki M, Matsuda T, Adachi S, Soga T, Takemura G, Kondoh H, Kita T, Kimura T. Persistent Overexpression of Phosphoglycerate Mutase, a Glycolytic Enzyme, Modifies Energy Metabolism and Reduces Stress Resistance of Heart in Mice, *PLoS ONE* 2013;8.
22. Tazaki J, Shiomi H, Morimoto T, Imai M, Yamaji K, Sakata R, Okabayashi H, Hanyu M, Shimamoto M, Nishiwaki N, Komiya T, Kimura T. Three-year outcome after percutaneous coronary intervention and coronary artery bypass grafting in patients with triple-vessel coronary artery disease: Observations from the CREDO-Kyoto PCI/CABG registry cohort-2, *EuroIntervention* 2013;9:437-445.
23. Natsuaki M, Kozuma K, Morimoto T, Kadota K, Muramatsu T, Nakagawa Y, Akasaka T, Igarashi K, Tanabe K, Morino Y, Ishikawa T, Nishikawa H, Awata M, Abe M, Okada H, Takatsu Y, Ogata N, Kimura K, Urasawa K, Tarutani Y, Shiode N, Kimura T. Biodegradable polymer biolimus-eluting stent versus durable polymer everolimus-eluting stent: A randomized, controlled, noninferiority trial, *J Am Coll Cardiol* 2013;62:181-190.
24. Toyofuku M, Kimura T, Morimoto T, Hayashi Y, Shiode N, Nishikawa H, Nakao K, Shirota K, Kawai K, Hiasa Y, Kadota K, Nozaki Y, Isshiki T, Sone T, Mitsudo K. Comparison of 5-year outcomes in patients with and without unprotected left main coronary artery disease after treatment with sirolimus-eluting stents: Insights from the j-Cypher registry, *JACC Cardiovasc Interventions* 2013;6:654-663.
25. Toyota T, Furukawa Y, Ehara N, Funakoshi S, Morimoto T, Kaji S, Nakagawa Y, Kadota K, Iwabuchi M, Shiomi H, Yamamuro A, Kinoshita M, Kitai T, Kim K, Tani T, Kobori A, Kita T, Sakata R, Kimura T. Sex-based differences in clinical practice and outcomes for Japanese patients with acute myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention, *Circ J* 2013;77:1508-1517.
26. Kamakura T, Makiyama T, Sasaki K, Yoshida Y, Wuriyanghai Y, Chen J, Hattori T, Ohno S, Kita T, Horie M, Yamanaka S, Kimura T. Ultrastructural maturation of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in a long-term culture, *Circ J* 2013;77:1307-1314.
27. Nishino T, Furukawa Y, Kaji S, Ehara N, Shiomi H, Kim K, Kitai T, Kinoshita M, Morimoto T, Sakata R, Kimura T. Distinct survival benefits of angiotensin-converting enzyme inhibitors/angiotensin II receptor blockers in revascularized coronary artery disease patients according to history of myocardial infarction, *Circ J* 2013;77:1242-1252.
28. Nakamura M, Yamagishi M, Ueno T, Hara K, Ishiwata S, Itoh T, Hamanaka I, Wakatsuki T, Sugano T, Kawai K, Kimura T. Current antiplatelet therapy for Japanese patients with ST elevation acute myocardial infarction: J-AMI registry, *Cardiovasc Intervention Ther* 2013;28:162-169.
29. Bao B, Ozasa N, Morimoto T, Furukawa Y, Nakagawa Y, Kadota K, Iwabuchi M, Shizuta S, Shiomi H, Tada T, Tazaki J, Kato Y, Hayano M, Natsuaki M, Fujiwara H, Mitsudo K, Nobuyoshi M, Kita T, Kimura T. β-Blocker therapy and cardiovascular outcomes in patients who have undergone percutaneous coronary intervention after ST-elevation myocardial infarction,

Cardiovasc Intervention Ther 2013;28:139-147.

30. Daida H, Miyauchi K, Ogawa H, Yokoi H, Matsumoto M, Kitakaze M, Kimura T, Matsubara T, Ikari Y, Kimura K, Tsukahara K, Origasa H, Morino Y, Tsutsui H, Kobayashi M, Isshiki T. Management and two-year long-term clinical outcome of acute coronary syndrome in Japan - Prevention of atherothrombotic incidents following ischemic coronary attack (PACIFIC) registry -, *Circ J* 2013;77:934-943.
31. Nakamura M, Yamagishi M, Ueno T, Hara K, Ishiwata S, Itoh T, Hamanaka I, Wakatsuki T, Sugano T, Kawai K, Kimura T. Current treatment of ST elevation acute myocardial infarction in Japan: Door-to-balloon time and total ischemic time from the J-AMI registry, *Cardiovasc Intervention Ther* 2013;28:30-36.
32. Saito R, Shirakawa R, Nishiyama H, Kobayashi T, Kawato M, Kanno T, Nishizawa K, Matsui Y, Ohbayashi T, Horiguchi M, Nakamura T, Ikeda T, Yamane K, Nakayama E, Nakamura E, Toda Y, Kimura T, Kita T, Ogawa O, Horiuchi H. Downregulation of Ral GTPase-activating protein promotes tumor invasion and metastasis of bladder cancer, *Oncogene* 2013;32:894-902.
33. Fukushima Y, Daida H, Morimoto T, Kasai T, Miyauchi K, Yamagishi S-, Takeuchi M, Hiro T, Kimura T, Nakagawa Y, Yamagishi M, Ozaki Y, Matsuzaki M. Relationship between Advanced Glycation End Products and Plaque Progression in Patients with Acute Coronary Syndrome: The JAPAN-ACS Sub-study, *Cardiovasc Diabetol* 2013;12.
34. Ogita M, Miyauchi K, Morimoto T, Daida H, Kimura T, Hiro T, Nakagawa Y, Yamagishi M, Ozaki Y, Matsuzaki M. Association between circulating matrix metalloproteinase levels and coronary plaque regression after acute coronary syndrome - Subanalysis of the JAPAN-ACS study, *Atherosclerosis* 2013;226:275-280.

G．知的所有権の取得状況

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

２．動脈硬化関連疾患自己抗体マーカーのACS症例における定量評価

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業）
分担研究報告書

血中自己抗体検出と新規炎症マーカーを用いた急性冠症候群予知因子および治療標的の探索
―動脈硬化関連疾患自己抗体マーカーのACS症例における定量評価―

研究分担者：日和佐 隆樹（千葉大学大学院医学研究院 遺伝子生化学 准教授）

研究要旨

急性冠症候群（ACS）は動脈硬化に密接に関係していると考えられている。我々は動脈硬化に関係する血清自己抗体マーカーを発現クローニング法、及びプロテインアレイ法による一次スクリーニングを行ない、約650種類の候補マーカーを同定した。これらのうち、二次スクリーニングで選別された115種類の抗原について、ACSの患者血清と健常者血清の抗体レベルをAlphaLISA法により測定し比較した。その結果、タンパク質抗原ではAP3D1、ZRF等、また、ペプチド抗原ではXRCC4、RPA2、CLDND1等に対する抗体レベルが健常者に比べACS患者検体において有意に高かった。ACSに関わる自己抗体の存在が確認できたことから、これらの自己抗体レベルを測定することにより発症を予測できる可能性が示唆された。

A．研究目的

ACSは発症前に予知することが最も重要である。しかしながら、発症前の患者検体を入手することは極めて困難であり、発症後の検体を調べてもそのほとんどは結果を見ているに過ぎない。その意味において、発症直後に特異的に出現する抗体は、発症が原因となって出現したとは考えられず、発症前から存在していたと推定される。即ち、そのような抗体は発症予測マーカーとなり得る。そこで、ACSの発症直後の検体に特異的に出現する抗体を同定し、予知マーカーとなり得るかどうかを検証する。

初年度の研究において、当教室において既に同定し、選別された動脈硬化／脳梗塞の自己抗体マーカー115種類についてACSに関連したマーカーが含まれているかどうかを調べた。

B．研究方法

ACSの患者血清は京都大学附属病院、愛知学院大学、及び千葉大学附属病院からそれぞれ93検体、91検体、67検体を収集し、100倍に希釈して用いた。健常者血清は千葉大学職員、及び下志津病院職員の検体を128検体用いた。抗原は動脈硬化／脳梗塞の候補マーカーとして一次スクリーニングで選別された約650種類のうち、二次スクリーニングで選別されたタンパク質抗原とペプチド抗原をそれぞれ77種類と38種類準備した。タンパク質抗原は10 μg/mlに希釈し、glutathione-ドナービーズと抗ヒトIgG-アクセプタービーズを用いたAlpha (Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay) LISA法により血清抗体レベルを解析した。ペプチド抗原は400 ng/mlに希釈し、Avidin-ドナービーズと抗ヒトIgG-アクセプタービーズを用いた。

（倫理面への配慮）

急性冠症候群、及びその関連疾患の患者血清を用いる研究については、「動脈硬化関連疾患のバ

イオマーカーの開発」(実施責任者：日和佐隆樹)の課題名で千葉大学大学院医学研究院倫理委員会に申請し、平成22年3月30日に承認を受け、さらにその修正版が平成23年10月17日付けで承認されている(承認番号：千大医総第44号)。その申請書の記載に従って使用している。協力病院はそれぞれの倫理審査委員会の承認を得ている。検体はインフォームドコンセントを得て採取している。

C．研究結果

既知候補自己抗体マーカーの定量評価：AlphaLISA法により各抗原に対する血清抗体レベルを調べた。ACS患者検体と健常者検体の数値を有意差検定した結果、P値が最も低かったのは、タンパク質抗原ではAP3D1とZRFでそれぞれ0.00002と0.00012であった。健常者の平均値＋2SDをカットオフ値とした時の陽性率が最も高かったのはAP3D1とPACRGで、ともに15.1%であった。77種類中、53種類について健常者とACS患者検体で有意差が認められた。

一方、ペプチド抗原ではXRCC4とRPA2とCLDND1でに対する抗体レベルの有意差検定のP値は10^{-6}以下であり、陽性率はそれぞれ29%、38%、42%であった。38種類中、23種類について健常者と患者検体で有意差が認められた。

D．考察

AlphaLISA法による血清抗体レベルの測定はプレートの洗浄の必要がなく、ELISAに代わる方法として近年注目されている。しかし一方で、AlphaLISA法は光、温度、空気中の酸素等の影響を受け、エッジ効果等の誤差を生じやすい。我々は多くの試行実験により本方法を習得し、再現性よくデータを出すことに成功した。

この方法により血清抗体レベルを調べた結果、多くの動脈硬化マーカーはACSの検体においても有意に高いレベルを示すことがわかった。ACSに関わる血清抗体マーカーを同定したのは本研究が初めてである。

タンパク質抗原と比べて、ペプチド抗原を用いた時には非特異的反応が減少し、バックグラウンドが安定するので患者検体の陽性率が高くなり、有意差検定のP値が低くなる傾向が見られた。

ペプチド抗原で高い陽性数と低いP値が認められたXRCC4とRPA2はともにDNA二重鎖切断の修復に関わるタンパク質である。虚血によりDNA二重鎖切断が誘導されると報告されていることから、虚血後にこれらのタンパク質が高発現することが自己抗体の産生につながると推定された。

その他のAP3D1、ZRF、PACRG、CLDND1は患者データとの関係を調べたところ、いずれもプラークスコアと相関していることが判明した。即ち、これらのマーカーは動脈硬化性の冠動脈疾患を検出していると推定された。

E．結論

血清自己抗体はACS発症の直後に出現するわけではなく、発症前から存在していたと推定される。即ち、発症直後に特異的に検出される自己抗体マーカーを同定することにより発症を予測することが可能になると考えられた。

F．研究発表

1．論文発表

1. Iwase, K., Ishihara, A., Yoshimura, S., Andoh, Y., Kato, M., Seki, N., Matsumoto, E., Hiwasa, T., Muller, D., Fukunaga, K. and Takiguchi, M. The secretogranin II gene Is a coincidence detector of glutamate and dopamine inputs. J. Neurochem. 128, 233-245, 2014.

2. 学会発表

1. 日和佐隆樹、張暁萌、瀧口正樹、峯清一郎、岩立康男、佐伯直勝、森雅裕、桑原聡、竹本稔、小林一貴、河村治清、横手幸太郎、上司

郁男、和田猛、青墳章代、町田利生、島田英昭、工藤孝、土居洋文、中村利華、冨吉郷、新免奈津子、黒田英行、糖尿病性脳梗塞の診断に有用な血清抗体マーカーTUBB2Cの同定. 第86回日本生化学会（2013年9月11日-13日、横浜）

2. 日和佐隆樹、島田英昭、岩立康男、松谷智郎、星野敢、松原久裕、野村文夫、食道癌またはグリオーマの患者血清における SEREX 抗原 CENPF に対する血清抗体レベルの上昇. 第72回日本癌学会（2013年10月3日-5日、横浜）
3. 日和佐隆樹、張暁萌、瀧口正樹、峯清一郎、岩立康男、佐伯直勝、森雅裕、武藤真弓、鵜沢顕之、桑原聡、町田利生、工藤孝、土居洋文、中村利華、冨吉郷、新免奈津子、黒田英行、脳梗塞の進行に対応する血清抗体マーカーの同定. 第86回日本分子生物学会（2013年12月3日-6日、神戸）

G．知的所有権の取得状況

１．特許取得

「脳梗塞の診断マーカー及び診断キット」平成26年1月6日出願、発明者：後藤憲一郎、日和佐隆樹、松村竜太郎、杉山隆夫；出願者：千葉大学及びヒューマンサイエンス振興財団、出願番号：特願２０１４－ ０００４１７号

２．実用新案登録

該当なし

３．その他

該当なし

３．急性冠症候群バイオマーカーとしてのマイクロ RNA の可能性について

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業）
分担研究報告書

血中自己抗体検出と新規炎症マーカーを用いた急性冠症候群予知因子および治療標的の探索
—急性冠症候群バイオマーカーとしてのマイクロ RNA の可能性について—

研究分担者：尾野　亘（京都大学大学院医学研究科　循環器内科学　講師）

研究要旨
細胞の中だけでなく、血液を含む体液中にもマイクロ RNA が脂質膜に包まれて存在している。我々は心血管疾患の患者血清中のマイクロ RNA について検討した。その結果、急性冠症候群において、胸痛発症後トロポニンＴよりも早期に末梢血に miR-133 が上昇し、これがトロポニンＴとよく相関することを見出した。さらに、この血中マイクロＲＮＡが臓器間において情報を伝達する可能性についても明らかにした(Kuwabara Y et al. ***Circulation: Cardiovascular Genetics.*** 2011;4:446-454.)。さらに心血管疾患症例において血中および体液中の診断マーカー、情報伝達について検討をつづけている。

Ａ．研究目的

我々は、研究代表者と共同で、急性冠症候群患者血清における自己抗体発現パターンの解析、血清ナルディライジンの解析を行っている。一方で、心血管病における病態生理学的意義がまだ充分解明されていない核酸、特にマイクロ RNA の疾患バイオマーカー、あるいは予知マーカーとしての可能性を追求している。

マイクロ RNA は 22 塩基程度のタンパクをコードしない RNA であり、標的メッセンジャーRNA の翻訳を抑制する作用がある。心血管疾患の発症や進展にも深く関与していることが知られている。最近、筋肉特異的マイクロ RNA が急性心筋梗塞患者の血中において上昇する、という報告がなされているが、その上昇の意義や由来については完全には解明されていない。今回、急性心筋梗塞を含む種々の心血管疾患において、血中マイクロ RNA の診断における意義を解明することを目標とする。

Ｂ．研究方法

京都大学循環器内科に入院した症例において、血清を保存し、症例ごとに特異的な血中プロファイルを持つマイクロ RNA を探索する。具体的には代表的な症例を 5 例ずつプールし、マイクロアレイにて特異的な変動を示した候補マイクロ RNA について定量的 PCR 法により集積した検体において測定を行う。さらに培養細胞を用いて、その機能、意義について検討を行う。

（倫理面への配慮）

「心血管疾患患者における血中バイオマーカーおよび RNA 発現レベルと病態との関連の検討（ヒト遺伝子解析承認番号 G-322）」は倫理委員会にて承認ずみであり、倫理面で問題のないように進める。

Ｃ．研究結果

血清中マイクロ RNA-1 と-133a が、急性冠症候群に対するバイオマーカーとして有用かどうかを Receiver Operating Characteristic 曲線にて評価