

学生診療における新しいバイオマーカーの開発

佐藤公雄^{1)*}, 下川宏明²⁾, 三井栄子¹⁾, 長谷川洋子¹⁾, 太田美智¹⁾,
伊藤めぐみ¹⁾, 佐藤洋美¹⁾, 滝口純子¹⁾, 佐藤康子¹⁾, 木内喜孝¹⁾

1) 東北大学高度教養教育・学生支援機構 臨床医学開発室, 2) 東北大学大学院循環器内科学

1. 背景と目的

我が国では、生活の欧米化により動脈硬化性疾患が増加しており、特に心筋梗塞の患者数が年々増加している。また、その予備軍とも言えるメタボリック症候群の患者数が激増しており、経済的・効率的にそうした患者を早期発見・重症度評価する方法の開発が待ち望まれている。また、心血管疾患の発症年齢の若年化が著しい。特に、冠動脈の動脈硬化により発症する狭心症や心筋梗塞の発症年齢の若年化が問題になっている。動脈硬化の原因として、高血圧・糖尿病・脂質異常症・喫煙・肥満・加齢などのリスクファクターがあげられる。

東北大学保健管理センターにおいて毎年行われる学生健康診断において、上記の動脈硬化リスクファクターを有する学生の比率が著しく増加してきている。そこで、我々がこれまで行ってきた、以下に述べるサイクロフィリンA (CyPA) に関する基礎および臨床研究における成果を進展させ、心血管疾患、特に冠動脈疾患(狭心症や心筋梗塞)を発症しうるハイリスク学生の早期診断用検査試薬を開発するための予備調査を行うこととした。

2. 期待される成果

心血管病の患者数は増加の一途を辿り、発症前診断は依然として困難であり、突然死の原因としても大きな社会的問題になっている。また、その発症年齢の若年化による社会的な問題も持ち上がってきている。動脈硬化は10年、20年の長い年月をかけて進行すること

が知られており、心筋梗塞発症年齢の若年化の原因を解明するためには、若年者におけるリスク要因の正確な評価が必要と考えられる。背景の項で述べたように、我々は心血管疾患モデル動物を用いた基礎研究を進展させ、臨床応用研究を進め、ヒト血漿中CyPA濃度の測定法開発に成功し、特許出願(特願2012-239615)を行った。冠動脈狭窄・大動脈瘤・肺高血圧・心肥大・心不全を有する心血管病患者の血漿中CyPA濃度測定を1200症例で行い、臨床的意義を検討した。

我々が開発した血漿中CyPAに着目することにより、将来的な心筋梗塞発症のハイリスク学生の診断法開発が可能であるのみならず、早期治療介入(高血圧や脂質異常症、肥満等)することによって、全く新しい心血管疾患の予防法が開発できる。本研究予備調査により、学生等の若年者の動脈硬化リスク評価と早期治療介入の必要性の評価が可能になる。この簡単・安全な診断薬の開発により、全く新しい切り口の心血管病の早期診断薬や治療介入基準の判定法開発が期待される。

3. 基礎研究

心血管病発症には、低酸素ストレスや酸化ストレスが強力な促進因子として働いている。我々は、ストレス刺激で血管平滑筋細胞より分泌される新規蛋白サイクロフィリンA (CyPA) を同定した¹⁾。また、分泌された細胞外CyPAが酸化ストレスを誘導することから、酸化ストレス増幅作用を有することを発見した²⁾。さらに、酸化ストレスによるCyPAの分泌はRhoキ

*) 連絡先: 〒980-8576 宮城県仙台市青葉区川内41 東北大学高度教養教育・学生支援機構 satoh-k@cardio.med.tohoku.ac.jp

Satoh K, et al. *Nature Med.* 2009.

Satoh K, et al. *ATVB.* 2011.

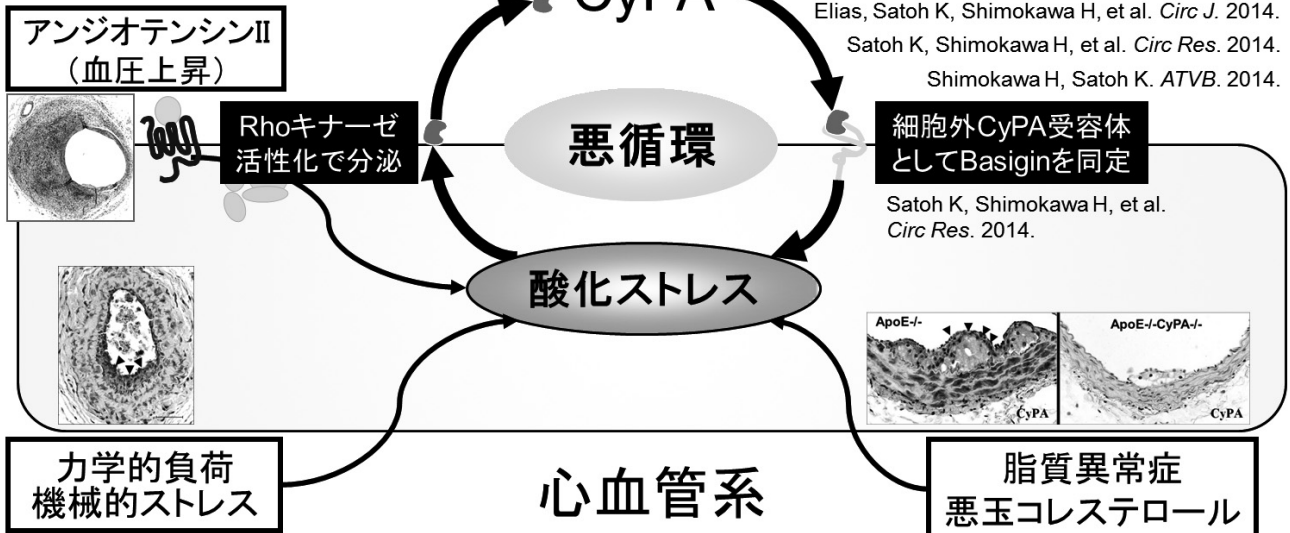
Satoh K, Shimokawa H. *Eur Heart J.* 2014.

Ikeda S, Satoh K, Shimokawa H, et al. *ATVB.* 2014.

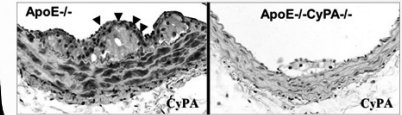
Elias, Satoh K, Shimokawa H, et al. *Circ J.* 2014.

Satoh K, Shimokawa H, et al. *Circ Res.* 2014.

Shimokawa H, Satoh K. *ATVB.* 2014.



Satoh K, Shimokawa H, et al. *Circ Res.* 2014.



Satoh K, et al. *Circulation* 2008.

Satoh K, et al. *Antioxidants & Redox signaling* 2010.

Satoh K, Shimokawa H, et al. *Am J Physiol.* 2011.

Nigro P, Satoh K, et al. *J Exp Med.* 2011.

Satoh K, Shimokawa H, et al. *Circ J.* 2010.

Satoh K, Shimokawa H, et al. *Circ J.* 2013.

図1 サイクロフィリンAによる心血管促進機構

ナーゼ依存性であり、両者が密接に絡み合って相加・相乗効果を形成することを発見した。さらに、この細胞外CyPAが動脈硬化・大動脈瘤・心肥大・肺高血圧症発症の重要蛋白であることを報告した^{1,5}。これまで不明であった血管平滑筋細胞の細胞外CyPA受容体としてBasiginを同定し、その遺伝子欠損マウスを用いて肺高血圧症発症における重要性を証明した⁵。また、細胞外CyPAはBasiginに作用して、多くのサイトカインや増殖因子の分泌および血管平滑筋細胞の増殖・遊走を促進することを証明した(図1)。

4. 臨床研究

心血管疾患モデルを用いた基礎研究成果を進展させ、心血管疾患の発症前診断技術の実用化を目指した研究を開始している。これまで、ヒト血漿中CyPA濃度の測定法開発に成功し、特許出願(特願2012-239615)を行った。さらに、心血管疾患における血漿CyPA濃度の網羅的解析を行い、冠動脈狭窄・大動脈瘤・肺高血圧・心肥大・心不全を呈する心血管疾患患者の血漿中CyPA濃度測定を1200症例で行い、臨床的意義を検討した。特に、冠動脈疾患や肺高血圧症を有する患者では、健常者に比して著しい血漿中CyPAの

上昇を認め重症度と相関すること、高血圧や糖尿病、脂質異常症、喫煙、加齢などの動脈硬化の危険因子を有する患者では血漿中CyPA濃度が有意に上昇していること、薬剤による加療によって血漿中CyPA濃度が低下することを証明した(図2)^{6,7}。さらに、血漿中CyPA濃度により、肺高血圧症患者の予後予測が可能であることを発表した⁵。

東北大学病院で行われるカテーテル検査結果(冠動脈有意狭窄の有無)と血漿CyPA濃度

対象: 冠動脈狭窄が疑われ、冠動脈造影検査を施行された患者(連続320例)

方法: 冠動脈造影検査を施行された患者の血漿中サイクロフィリンA濃度をELISA法で測定し、冠動脈狭窄の有無および重症度との関係を調べた。

結果: 分泌蛋白であるサイクロフィリンAはヒト末梢血中で測定可能であることを世界で初めて確認した(図2)。冠動脈に有意狭窄を有する患者では、血漿中サイクロフィリンA濃度が著明に上昇していることが確認された。また、多くの冠動脈狭窄を有するほど、血漿中サイクロフィリンA濃度は高い値を示した。

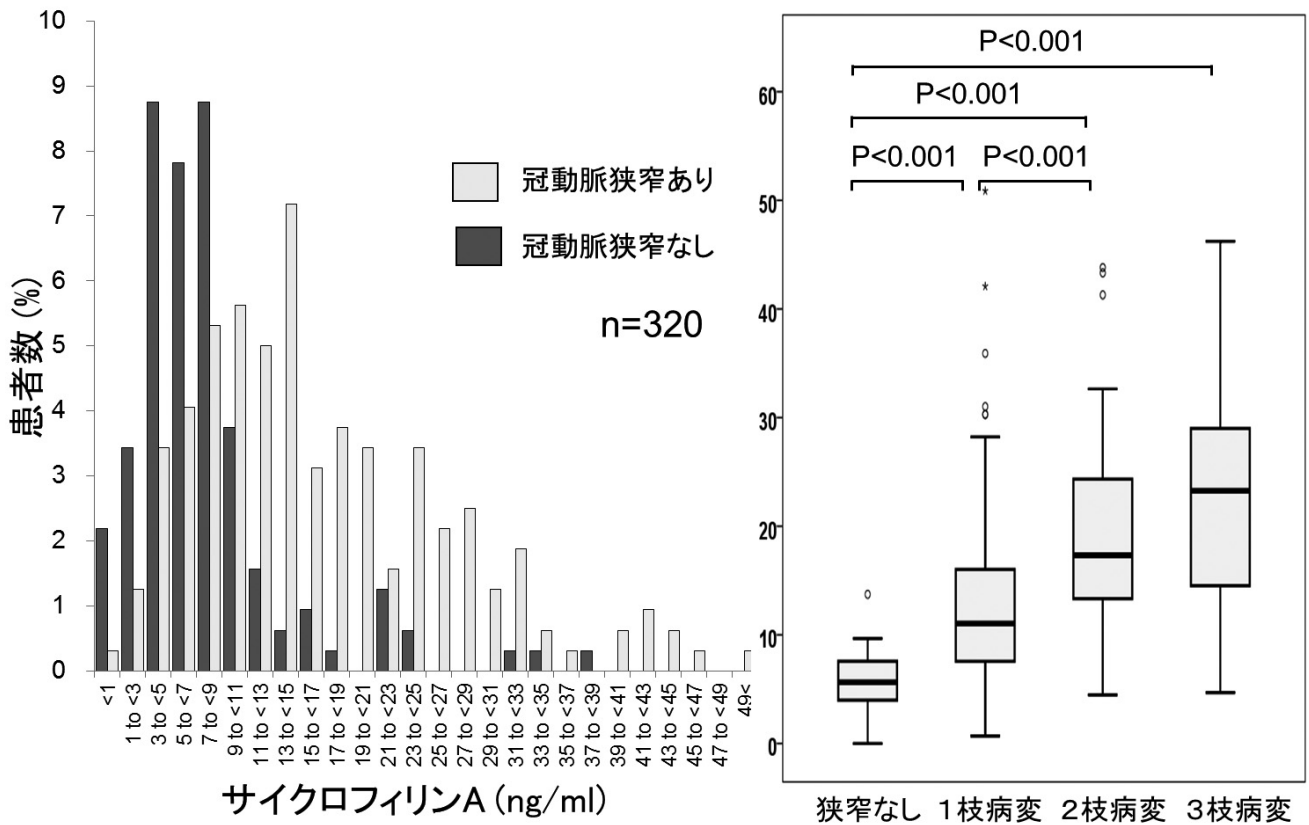


図2 血漿中サイクロフィリンAは冠動脈疾患で上昇

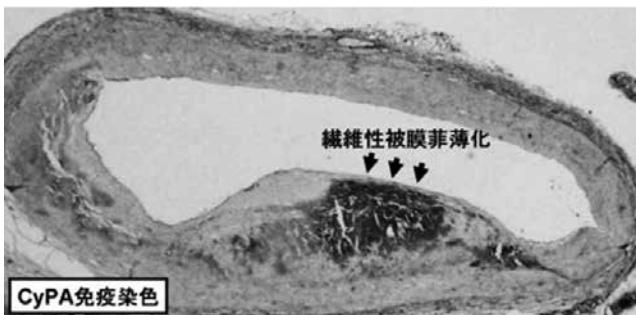


図3 動脈硬化不安定プラークにおけるCyPAの発現

ヒト心筋梗塞冠動脈標本を用いた組織学的検討

対象：冠動脈（動脈硬化性プラーク）

方法：虚血性心疾患患者における冠動脈切片におけるサイクロフィリンAの発現を免疫組織学的に評価した。

結果：サイクロフィリンAは動脈硬化不安定プラークに強く発現していることを確認した（図3）。

若年者血漿中CyPA濃度測定（予備調査）

対象：50歳以下の比較的若年症例

方法：これまでの研究データ解析から、虚血性心疾患

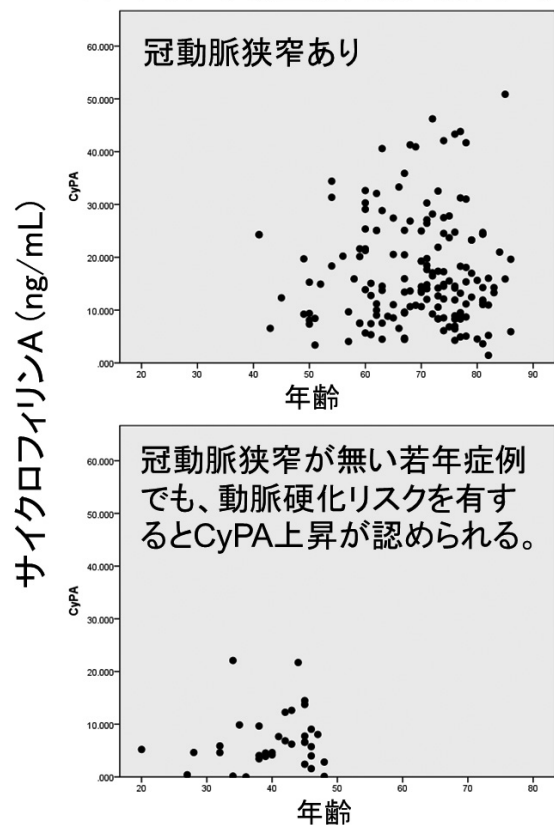


図4 血漿中CyPAは動脈硬化リスクを持つ若年者でも上昇傾向を示す

疑いで冠動脈造影を行った症例のうち、有意狭窄を有する患者は50歳から急速に増えることが分かった(図4)。そこで、50歳以下の比較的若い症例のうち、冠動脈に器質的な狭窄病変を認めなかったものの、高血圧や脂質異常症、糖尿病等のリスクを有する、健常者群とは異なる集団の血漿中CyPAを測定することとした。

結果：CyPAは冠動脈有意狭窄を示す前の50歳以下の比較的若年症例にても、既に上昇が始まっており、動脈硬化リスクファクターを有する症例で特に高い傾向を示すことが分かった(図4)。

5. 考察

虚血性心疾患症例を対象とした臨床研究において、血漿サイクロフィリンA濃度測定が早期発見や重症度評価に有効であることが確認された。冠動脈有意狭窄症例における血漿サイクロフィリンA濃度については、その早期診断や重症度評価に有効なバイオマーカーとなりうる可能性があり、また、心筋梗塞の発症前マーカーとしての可能性も期待される。今後は治療介入後の評価を加え治療効果判定や再発予測における血漿サイクロフィリンA濃度測定の有効性についても検討を予定している。心筋梗塞や脳梗塞等の動脈硬化性疾患の患者数が年々増加しており、その予備軍とも言えるメタボリック症候群の患者数は激増している。そうした患者を早期発見・重症度評価でき、早期に内科的治療介入する方法の開発は、医療経済的にも待ち望まれている。さらに今後、幅広い心血管疾患への応用を目指したい。安全で負担のない検査法の実現は、患者の肉体的・精神的負担の軽減や医療費の大幅な削減、我が国の活力のある社会の実現に大きく貢献することが期待できる。

また、本研究で得られた基礎研究結果を進展させることにより、サイクロフィリンAに着目した画期的な動脈硬化の新規治療法の実現が可能である。酸化ストレスの心血管作用を直接担う蛋白の発見は世界初であり、創薬への期待が高まる。酸化ストレスによって分泌された細胞外サイクロフィリンAは、血管平滑筋MMP活性化や血管内皮障害を促し血管壁を不安定化すると同時に、血小板活性化・炎症細胞遊走・線維

性被膜菲薄化を促進し、不安定プラーク破綻を引き起こしているものと考えられる。従って、サイクロフィリンAの分泌抑制による線維性被膜の増強から、新しい動脈硬化プラーク安定化治療薬の開発が期待できる。

本研究により、血漿中サイクロフィリンA濃度は冠動脈有意狭窄を示す以前の50歳以下の比較的若年症例にても、既に上昇が始まっており、動脈硬化リスクファクターを有する症例で特に高い傾向を示すことが分かった。従って、将来、冠動脈疾患(狭心症や心筋梗塞)を発症しうるハイリスク患者の早期診断に血漿中サイクロフィリンA濃度は有用なバイオマーカーになる可能性が示された。今後も本研究を進展させ、高く険しい障壁を乗り越えて臨床的な有用性を証明し、冠動脈疾患の検診レベルでのリスク評価の為にスクリーニングに利用可能な真のバイオマーカーになるよう開発研究を継続していきたい。

6. 引用文献

1. Satoh K, Matoba T, Suzuki J, O'Dell MR, Nigro P, Cui Z, Mohan A, Pan S, Li L, Jin ZG, Yan C, Abe J, Berk BC. Cyclophilin A mediates vascular remodeling by promoting inflammation and vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation*. 2008; 117: 3088-3098.
2. Satoh K, Nigro P, Matoba T, O'Dell MR, Cui Z, Shi X, Mohan A, Yan C, Abe J, Illig KA, Berk BC. Cyclophilin A enhances vascular oxidative stress and the development of angiotensin II-induced aortic aneurysms. *Nat Med*. 2009; 15:649-656.
3. Nigro P, Satoh K, O'Dell MR, Soe NN, Cui Z, Mohan A, Abe J, Alexis JD, Sparks JD, Berk BC. Cyclophilin A is an inflammatory mediator that promotes atherosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice. *J Exp Med*. 2011;208:53-66.
4. Satoh K, Nigro P, Zeidan A, Soe NN, Jaffre F, Oikawa M, O'Dell MR, Cui Z, Menon P, Lu Y, Mohan A, Yan C, Blaxall BC, Berk BC. Cyclophilin A promotes cardiac hypertrophy in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.

2011; 31: 1116-1123.

5. Satoh K, Satoh T, Kikuchi N, Omura J, Kurosawa R, Suzuki K, Sugimura K, Aoki T, Nochioka K, Tatebe S, Miyamichi-Yamamoto S, Miura M, Shimizu T, Ikeda S, Yaoita N, Fukumoto Y, Minami T, Miyata S, Nakamura K, Ito H, Kadomatsu K, Shimokawa H. Basigin mediates pulmonary hypertension by promoting inflammation and vascular smooth muscle cell proliferation. *Circ Res.* 2014; 115:738-750.
6. Satoh K, Fukumoto Y, Sugimura K, Miura Y, Aoki T, Nochioka K, Tatebe S, Miyamichi-Yamamoto S, Shimizu T, Osaki S, Takagi Y, Tsuburaya R, Ito Y, Matsumoto Y, Nakayama M, Takeda M, Takahashi J, Ito K, Yasuda S, Shimokawa H. Plasma Cyclophilin A is a novel biomarker for coronary artery disease. *Circ J.* 2013;77:447-455.
7. Satoh K, Shimokawa H. High-sensitivity c-reactive protein: Still need for next-generation biomarkers for remote future cardiovascular events. *Eur Heart J.* 2014;35:1776-1778.

7. 助成期間の研究発表

論文発表 15件

- 1) Satoh K, Satoh T, Kikuchi N, Omura J, Kurosawa R, Suzuki K, Sugimura K, Aoki T, Nochioka K, Tatebe S, Yamamoto S, Miura M, Shimizu T, Ikeda S, Yaoita N, Fukumoto Y, Minami T, Miyata S, Nakamura K, Ito H, Kadomatsu K, Shimokawa H. Basigin mediates pulmonary hypertension by promoting inflammation and vascular smooth muscle cell proliferation. *Circ Res.* 115: 738-750, 2014.
- 2) Satoh K, Shimokawa H. High-sensitivity C-reactive protein: still need for next-generation biomarkers for remote future cardiovascular events. *Eur Heart J.* 35: 1776-1778, 2014.
- 3) Satoh K, Godo S, Saito H, Enkhjargal B, Shimokawa H. Dual roles of vascular-derived reactive oxygen species -With a special reference to hydrogen peroxide and cyclophilin A - *J Mol Cell Cardiol.* 73: 50-56, 2014.
- 4) Satoh K. Globotriaosylceramide induces endothelial dysfunction in Fabry disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 34:2-4, 2014.
- 5) Ikeda S, Satoh K, Kikuchi N, Miyata S, Suzuki K, Omura J, Shimizu T, Kobayashi K, Kobayashi K, Fukumoto Y, Sakata Y, Shimokawa H. Crucial role of Rho-kinase in pressure-overload-induced right ventricular hypertrophy and dysfunction in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 34:1260-1271, 2014.
- 6) Shimokawa H, Satoh K. Vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 34:2359-2362, 2014.
- 7) Shimokawa H, Satoh K. Light and dark of reactive oxygen species for vascular function. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2014 (in press).
- 8) Elias-Al-Mamun M, Satoh K, Tanaka S, Shimizu T, Nergui S, Miyata S, Fukumoto Y, Shimokawa H. Combination therapy with fasudil and sildenafil ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and survival in rats. *Circ J.* 78:967-76, 2014.
- 9) Enkhjargal B, Godo S, Sawada A, Nergui S, Saito H, Noda K, Satoh K, Shimokawa H. Endothelial AMPK regulates blood pressure and coronary flow responses through hyperpolarization mechanism in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 34:1505-1513, 2014.
- 10) Yaoita N, Shirakawa R, Fukumoto Y, Sugimura K, Miyata S, Miura Y, Nochioka K, Miura M, Tatebe S, Aoki T, Miyamichi-Yamamoto S, Satoh K, Kimura T, Shimokawa H, Horiuchi H. Platelets are highly activated in patients of chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 34:2486-2494, 2014.
- 11) Tatebe S, Fukumoto Y, Oikawa-Wakayama M, Sugimura K, Satoh K, Miura Y, Aoki T, Nochioka K, Miura M, Yamamoto S, Tashiro M, Kagaya Y, Shimokawa H. Enhanced 18F-fluorodeoxyglucose accumulation in the right ventricular free wall predicts long-term prognosis of patients with pulmonary hypertension: a preliminary observational

- study. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 15:666-672, 2014.
- 12) Dai Z, Fukumoto Y, Tatebe S, Sugimura K, Miura Y, Nochioka K, Aoki T, Miyamichi-Yamamoto S, Yaoita N, Satoh K, Shimokawa H. OCT imaging for the management of pulmonary hypertension. *JACC-Cardiovasc Imaging*. 7:843-845, 2014.
- 13) Dai Z, Sugimura K, Fukumoto Y, Tatebe S, Miura Y, Nochioka K, Aoki T, Miyamichi-Yamamoto S, Yaoita N, Satoh K, Shimokawa H. Visualization of Complete Regression of Pulmonary Arterial Remodeling on Optical Coherence Tomography in a Patient With Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ J*. 2014 (in press).
- 14) Abe Y, Ito K, Hao K, Shindo T, Ogata T, Kagaya Y, Kurosawa R, Nishimiya K, Satoh K, Miyata S, Kawakami K, Shimokawa H. Extracorporeal low-energy shock wave therapy exerts anti-inflammatory effects in acute myocardial infarction in rats in vivo. *Circ J*. 2014 (in press).
- 15) 佐藤 公雄, 下川 宏明. 診断と治療社『酸化ストレスの医学 改訂第2版』(2014年8月) 心疾患と酸化ストレス