

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	太田 久宣
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Association between Microalbuminuria Predicting In-stent Restenosis after Myocardial Infarction and Cellular Senescence of Endothelial Progenitor Cells</p> <p>(心筋梗塞後のステント内再狭窄を予測する微量アルブミン尿と 血管内皮前駆細胞の老化との関連性に関する研究)</p> <p>共 著 者 名 : 竹原有史, 青沼達也, 鹿原真樹, 松木孝樹, 山内敦司, 竹内利治, 川辺淳一, 長谷部直幸</p> <p>PLOS ONE, Vol. 10 (4), e0123733 平成27年</p> <p>研 究 目 的</p> <p>微量アルブミン尿は心血管イベントの確立した危険因子であり、血管内皮機能の指標としての意義も指摘されている。これまで冠動脈インターベンション(PCI)患者におけるステント内再狭窄や急性心筋梗塞(AMI)例の長期予後との関連が指摘されてきたが、AMI患者の微量アルブミン尿が、血管内皮修復の障害を背景とした冠動脈病変の進行と関連するか否かについては不明な点が多い。血管内皮前駆細胞(EPC)は特にPCI後の再内皮化における血管内皮修復で重要な役割を果たすが、EPCの病態生理学上の役割については一定の見解が得られておらず、その機能異常と心血管イベントとの関連についても論議がある。</p> <p>本研究は、AMI急性期の微量アルブミン尿の病態生理学的な役割を、EPC機能との関わりから検討することを目的とした。</p>			

材 料 ・ 方 法

1. 対象と定義

本研究は2010年1月から2011年12月に旭川医科大学病院において、全ての患者からインフォームドコンセントを得て行われた。

AMIの診断から24時間以内に緊急冠動脈造影を施行した50例を対象とした。1)80歳以上、2)推算糸球体濾過率 (eGFR) が $30\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{per}1.73\text{m}^2$ 未満の症例を除外した。造影後、24時間蓄尿を行い尿中アルブミン排泄 (UAE) により正常群 (30mg/日未満) と微量アルブミン尿群 (30mg/日以上) の2群に分割した。各患者につき入院時臨床的背景と、亜急性期の血漿脳性ナトリウムペプチド (BNP) 値、心エコーを評価した。ベアメタルステントを用いた症例は6ヶ月後の再評価まで追跡された。本研究のプロトコールは旭川医科大学の学内倫理委員会によって承認された。

2. 冠動脈評価

血管造影所見はTCS Acquisitionワークステーション (Medcon Ltd.) にて定量的に解析され、標的病変の再血行再建率、ステント内再狭窄 (late lumen loss、50%以上の狭窄で定義される再狭窄率など) を評価した。

3. 循環血管内皮前駆細胞の定量

末梢血サンプルは入院後2日目と7日目に採取した。末梢血単核球細胞 (PBMC) は密度勾配遠心法を用いて濃縮しフローサイトメトリー法にて、CD34とkinase insert domain receptor (KDR) の二重陽性の細胞を循環EPCと同定した。

4. 血管内皮前駆細胞の培養

PBMCはフィブロネクチンコートされた培養皿で内皮細胞増殖培地MV2に10%胎児ウシ血清等を加え7日間培養された。培養EPCを確認するためUlex europeaus agglutinin-1 (UAE-1) の染色とDiI-labeled acetylated low-density lipoprotein (acLDL) の取り込みを観察した。培養皿に接着したこれら二重陽性細胞数を倒立蛍光顕微鏡で無作為に5視野計測し、接着能の評価のため接着EPC数を始めに播種したPBMC数と比較した。

5. 定量的reverse-transcription PCR (RT-PCR)

7日間の培養後の培養EPCよりtRNAを抽出し各サンプルからcDNAを生成した。ヒトsirtuin-1に対するTaq-Man Gene Expression Primerを用いた定量的RT-PCRを行った。sirtuin-1 mRNAの発現量について年齢をあわせた健康ボランティアに対する相対的な変化量を二群間で比較した。

6. Senescence-associated beta-galactosidase (SA- β -gal) assay

培養EPCの形質的な老化性変化を評価するために SA- β -galで染色を行い、SA- β -gal染色細胞数を光学顕微鏡で計測した。

成 績

1. 患者背景

3人が80歳以上、2人がeGFR30未満で除外され45人が研究対象となり24人が正常群、21人が微量アルブミン尿群に割り付けられた。二群間で患者背景、血漿BNP値、心エコー所見について有意差はみられなかった。

2. 微量アルブミン尿と冠動脈所見の関連性

6ヶ月後の再評価において15人が除外されたため（6人離脱、4人ステントなし、4人薬剤溶出性ステント、1人早期死亡）、30人のベアメタルステント患者の冠動脈所見が評価された。二群間でステントサイズに差はなかった。微量アルブミン尿群で2名に標的病変の再血行再建を行ったが、標的病変再血行再建率は二群間で有意差に至らなかった。しかしステント内再狭窄の指標であるlate lumen lossは有意に微量アルブミン尿群で高かった（微量アルブミン尿群 1.18 ± 0.57 mm、正常群 0.76 ± 0.34 mm; $p < 0.05$ ）。微量アルブミン尿群では再狭窄の程度や頻度が多い傾向がみられた。

3. EPCの動員と機能

循環EPC数はベースライン時には差がなかったが、7日目には正常群 2921 ± 1765 cells/mLに比べ微量アルブミン尿群で 5580 ± 4941 cells/mLと有意に増加していた（ $p < 0.05$ ）。ベースライン時から7日目のEPCの接着細胞数の変化量は、正常群 $+3.1 \pm 8.3\%$ に対し微量アルブミン尿群 $-1.3 \pm 4.4\%$ と正常群の方が有意に増加していた（ $p < 0.05$ ）。培養EPCにおけるsirtuin-1 mRNAの発現はベースライン時には二群間で有意差はなかったが、7日目由来の培養EPCでは正常群で増強していたのに比し微量アルブミン尿群では減弱していた（微量アルブミン尿群 2.5 ± 3.7 倍、正常群 7.1 ± 8.9 倍; $p < 0.05$ ）。

4. 微量アルブミン尿とEPC機能の相関

微量アルブミン尿のEPC機能への関与を調べるため、UAEと培養EPCの接着能及びsirtuin-1 mRNA発現量の相関を評価した。接着能との間には有意な相関はみられなかったが、UAEとsirtuin-1 mRNA発現との間には有意な負の相関がみられた（ $r_s = -0.31$; $p < 0.05$ ）。さらに、sirtuin-1 mRNA発現についてUAE、年齢、性別、喫煙、Killipレベル、造影剤腎症を説明変数として多変量ロジスティック回帰分析を行うと、UAEだけが有意に独立した説明変数となった（オッズ比0.167、95%信頼区間0.031-0.886; $p < 0.05$ ）。

5. 培養EPCの老化

培養EPCにおける細胞老化を評価するために10人のAMI患者でSA- β -galアッセイを用いて追加の検討を行った。6人（平均年齢 60.3 ± 12.6 歳）の正常群と4人（ 72.3 ± 10.0 歳）の微量アルブミン尿群で、平均年齢に有意差はなかった。SA- β -gal染色陽性細胞数はベースライン時には差はなかったが、7日目には正常群 $32.0 \pm 11.8\%$ に対し微量アルブミン尿群 $63.5 \pm 17.5\%$ と老化細胞は微量アルブミン尿群で有意に多かった（ $p < 0.05$ ）。

考 案

本研究によりAMI患者において、微量アルブミン尿陽性群では、1)PCI 6ヶ月後のlate lumen lossが有意に増加したが、その背景として、2)急性期に接着能の低下した循環EPCが増加しており、3)培養EPC中のsirtuin-1 mRNA発現が低下することが示された。

冠動脈疾患患者において循環EPCが重要な役割を果たしているにも関わらず、心臓血管リスクを有する患者で動員されるEPC動態の詳細は明らかではない。過去の報告では、AMI患者では発症後7日目でEPCの動員が最大となるが、併存する心血管リスクにより、その変動が不明確になるとされている。微量アルブミン尿に注目した本研究では、微量アルブミン尿群で7日目の循環EPC数の増加がみられ、微量アルブミン尿がAMI患者におけるEPC動員を左右する重要な因子のひとつであることが示唆された。

AMI患者におけるEPCの劣化には、動員数のみならず接着能や老化などの機能異常も関与している。Pacshalakiらは最近喫煙者や慢性閉塞性肺疾患の患者でDNA損傷によるEPC機能低下とsirtuin-1の発現に負の相関を示す細胞老化を認め、機能低下したEPCによりマウスの血管新生モデルで血流の回復がみられなかったと報告した。本研究では微量アルブミン尿群においてEPC動員が増加したにも関わらず、EPCの接着能やsirtuin-1 mRNA発現が低下しており、EPCの機能的な劣化の存在が示された。微量アルブミン尿を呈する病的な状態下では、急性心筋虚血により、潜在するEPC機能低下が顕在化し、結果として、活性の高い良好なEPCよりむしろ後天的に機能老化したEPCがより多く血管修復に動員される機序が考えられた。

結 論

AMI患者における微量アルブミン尿は冠動脈病変の予後不良の予測因子となるとともにEPC機能異常と関連する可能性が示唆された。その病態生理学的背景として微量アルブミン尿とEPCの老化が関連する可能性が考えられた。

引用文献

1. Berton G, Cordiano R, Mazzuco S, Katz E, et al. Albumin excretion in acute myocardial infarction: a guide for long-term prognosis. *Am Heart J.* 2008; 156: 760-768.
2. Padfield GJ, Newby DE, Mills NL. Understanding the role of endothelial progenitor cells in percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol.* 2010; 55: 1553-1565.
3. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997; 275: 964-966.

参考文献

1. Ota H, Takeuchi T, Sato N, Hasebe N. Dipstick proteinuria as a surrogate marker of long-term mortality after acute myocardial infarction. *J Cardiol.* 2013; 62: 277-282.
2. 太田久宣、石井良直、大蔵美奈子、杉山英太郎、他. 急性心筋梗塞に対する再灌流療法の変遷と臨床効果の検討 - 先行血栓溶解と血栓吸引療法の影響. *日本心臓病学会誌*, 2008; 1: 17-23.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	太田 久宣
<p>審査委員長 <u>紙谷 寛之</u> (印)</p> <p>審査委員 <u>平谷 文隆</u> (印)</p> <p>審査委員 <u>長谷部 直幸</u> (印)</p>			
<p>学位論文題目</p> <p>Association between Microalbuminuria Predicting In-stent Restenosis after Myocardial Infarction and Cellular Senescence of Endothelial Progenitor Cells (心筋梗塞後のステント内再狭窄を予測する微量アルブミン尿と血管内皮前駆細胞の老化との関連性に関する研究)</p>			
<p>急性心筋梗塞患者の梗塞責任冠動脈に対する再還流療法の予後は、ステント治療により飛躍的に改善したが、血管形成術後のステント再狭窄の問題は依然として残されている。また、微量アルブミン尿は、全身の血管内皮機能障害を反映するものとされるが、血管形成術後の血管予後との関係は明らかではない。</p>			

申請者らは急性心筋梗塞再灌流療法後急性期の微量アルブミン尿の病態生理学的な意義を血管内皮前駆細胞の機能的側面から検討し、形成術後血管の予後との関連を明らかにするために本研究を行った。2010年1月から2011年12月にかけて旭川医科大学病院に入院した急性心筋梗塞患者45人を対象とし緊急冠動脈造影後で血管形成術後、24時間蓄尿による尿中アルブミン排泄量から正常群(30mg/日未満、n=24)と微量アルブミン尿群(30mg/日以上、n=21)の2群に分けた。末梢血を第2病日と第7病日に採取し、末梢血中の単核球細胞からフローサイトメトリーにてCD34+KDR+の二重陽性細胞を循環EPCと定義し計測した。また、同細胞を培養し、レクチン染色とacLDLの取り込みを観察し、培養EPCの接着能を評価した。また培養EPCよりtRNAを抽出し、Sirtuin-1 mRNAの発現量を定量的RT-PCR法にて定量した。さらにSA-β gal染色を行って、培養EPCの細胞老化を評価した。6ヶ月後に再冠動脈造影を行い、ステント部の再狭窄について詳細な検討を行った。

結果として、微量アルブミン尿群では正常群に比して、高感度CRPが有意に高値であり、ステント再狭窄の指標であるlate lumen lossが有意に増加していた。末梢血中の循環EPC数は微量アルブミン尿群で有意に増加したが、培養EPCの機能解析では、接着能の有意な低下が認められ、Sirtuin-1 mRNAの発現量が有意に低下していた。またSA-β gal陽性細胞数が微量アルブミン尿群で有意に増加しており、EPCの細胞老化を伴うことも確認された。

本研究は、急性心筋梗塞患者における急性期の微量アルブミン尿が冠動脈ステント留置後の再狭窄発生と関連するとともに、EPC機能異常を反映する可能性を示した。また、その病態生理学的背景としてEPCの老化が関連する可能性を初めて明らかにし、微量アルブミン尿が全身の血管内皮機能障害のみならず、EPC機能異常のサロゲートマーカーとなりうることも示した。急性心筋梗塞患者の微量アルブミン尿がステント内再狭窄と関連することを示した報告は過去になく、またEPC機能障害を細胞老化と関連づけて示し、ステント内再狭窄の新たなメカニズムを示唆した臨床的意義は大きく、優れた臨床研究であると言える。

本論文は、PLoS One 2015に掲載されているものである。申請者に対して論文・関連領域に関する諮問を行ったが、いずれも的確な回答がなされ、この領域において十分な見識と経験を有することが確認された。

以上より、本論文は学位授与に値するものと結論した。