

表 題 安定冠動脈疾患患者における S100A12 蛋白と
予後予測に関する研究

論文の区分 博士課程

著 者 名 齋藤 俊信

担当指導教員氏名 苅尾 七臣 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系
循環器・呼吸器疾患学
心血管病学

2014年1月10日申請の学位論文

目 次

1. はじめに	2
2. 背景	3
3. 基礎実験 ～ヒト培養白血球と S100A12 蛋白～	6
4. 先行研究 ～S100A12 蛋白のスタチンによる影響～	8
5. 本研究の目的	10
6. 対象と方法	10
7. 結果	12
8. 考察	22
9. 結論	26
10. 謝辞	27
11. 参考文献	28

1. はじめに

近年、冠動脈疾患に対する治療は各種薬物治療に加え、経皮的カテーテル治療やバイパス術などの普及により、目覚ましい進歩を遂げてきたが、未だ治療が奏功しない難治例や発症した時点で既に重症化している症例も存在しており、社会的・医学的に重要な問題として掲げられている。一方、冠動脈疾患の診断技術に関して現在まで発達してきているが、引き続き心血管イベントの発症予知に関しては今もなお十分とは言えないのが現状である。

安定冠動脈疾患に対する経皮的冠動脈形成術は従来型ステントから薬剤溶出しステントへ開発が進み、冠動脈病変の再狭窄は劇的に減少したが¹⁻⁴⁾、生命予後の改善は認めていない⁴⁻⁵⁾。そのため、安定冠動脈疾患患者の予後を判定する簡便な指標があれば臨床的に意義があると考えられる。

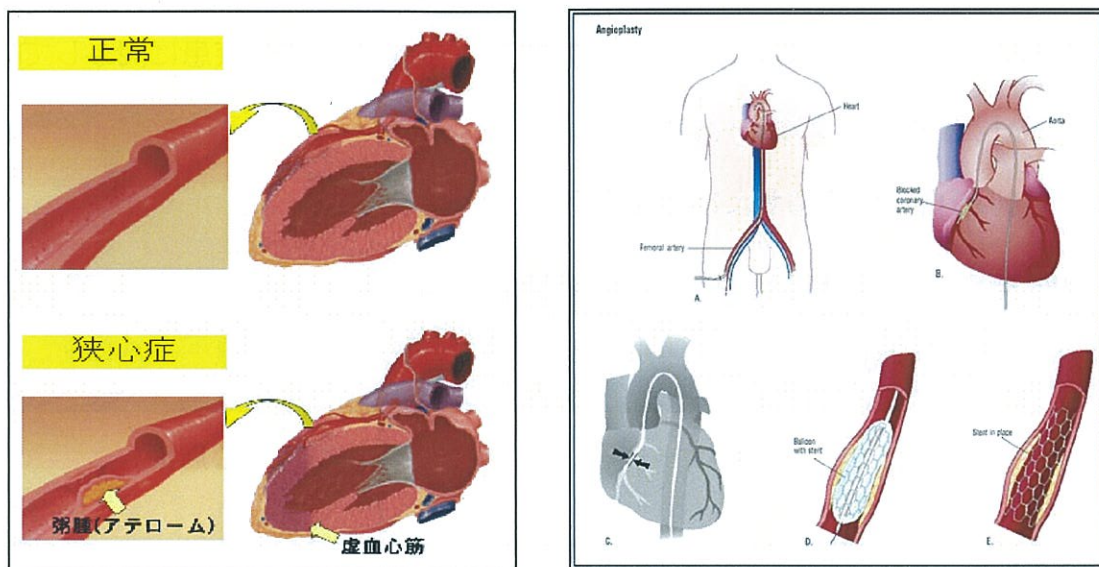
近年、様々な研究により冠動脈疾患患者を含む動脈硬化性疾患において、慢性炎症が病態の一因を成すとの報告が多数認められている。我々は新規の炎症マーカーである S100A12 蛋白に着目し、冠動脈疾患患者の予後推定に有用ではないかと考え、本研究を施行した。

今回我々の行なった研究が、慢性炎症に関わる心不全の発症や動脈硬化粥腫破綻に関わる脳卒中や心筋梗塞の発症など、致死的心血管疾患の発症予知に貢献できることを期待する。

2. 背景

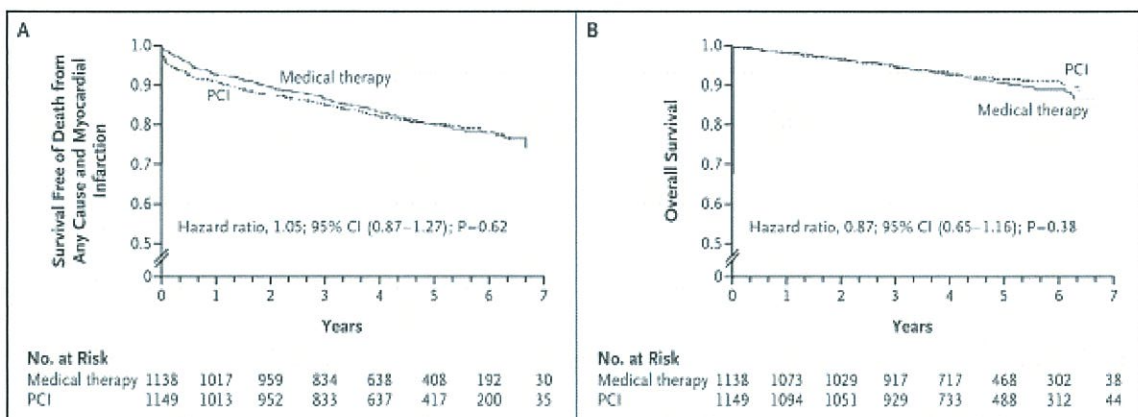
狭心症や心筋梗塞などの虚血性心疾患の主な原因には冠動脈の粥状硬化が重要であると考えられている。近年、冠動脈疾患の治療法には薬物療法に加え、カテーテルを用いた経皮的冠血行再建術 (PCI:percutaneous coronary intervention) が確立してきている (図 1)。

図 1：冠動脈疾患の病態 (左図) と経皮的冠血行再建術 (PCI：右図)



しかしながら、大規模臨床試験においては至適薬物療法のみを行なった群と薬物治療に PCI を追加した群の間で、イベント発生率に差が認められなかったとする報告がなされた (図 2)⁶⁾。

図 2:安定冠動脈疾患に対する PCI と予後



これらの結果より、単に冠動脈狭窄を解除するのみでは冠動脈疾患の予後の改善につながらず、基礎にある病態の改善が重要であることが示された。

近年、動脈硬化症を含む生活習慣病の発生に慢性炎症が関与している報告が多数成されている。そこで、慢性炎症のマーカーを測定することにより、病態の把握や予後推定が可能となることが考えられ、我々は近年同定された新規のマーカーである S100 蛋白に着目した。

S100 蛋白は現在 20 種類以上のサブファミリーが確認されており、それぞれ関連する疾患が確認されているが⁷⁾、その中でも心血管系炎症性疾患に関与している S100A12 蛋白に我々は着目した(表 1)。

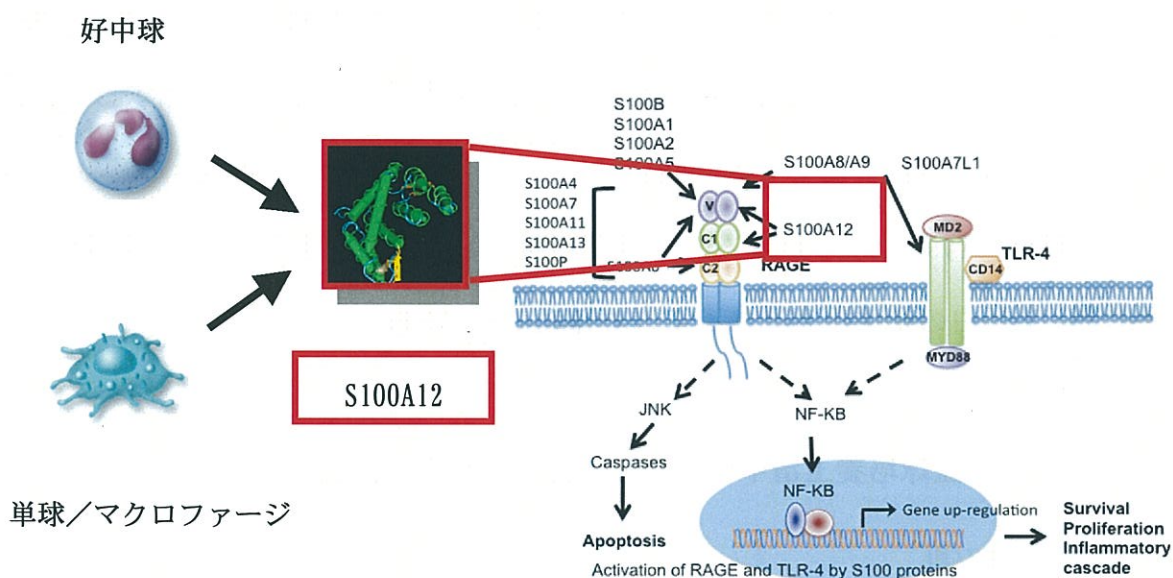
表 1:S100 蛋白質の種類および関連疾患

S100蛋白質の種類	関連疾患
S100A1	心筋症
S100A2, S100A3, S100A4, S100A5, S100A6, S100A10	悪性腫瘍
S100A7, S100A7L1/A15	乾癬
S100A8, S100A9, S100A12	炎症性疾患
S100B	神経変性

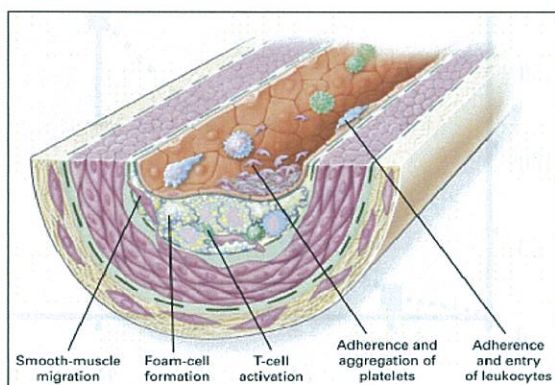
S100A12 蛋白は単球/マクロファージおよび好中球などの白血球から放出されるカルシウム結合蛋白で、炎症性疾患で上昇していることが明らかにされている⁸⁻¹⁰⁾。終末糖化産物受容体(RAGE:receptor for advanced

glycation-end products)と結合し、転写因子である NF- κ B(nuclear factor-kappa B)の発現亢進を介して⁷⁾、内皮細胞での ICAM(intercellular adhesion molecule)-1 や VCAM(vascular cell adhesion molecule)-1 の発現亢進を促し、白血球の接着や遊走を促すことにより、動脈硬化形成等に関与していると考えられている(図 3)。

図 3:S100A12 蛋白の役割



動脈硬化の形成



ICAM-1, VCAM-1 発現



白血球の接着・遊走



プラーク形成に関与

3. 基礎実験 ～ヒト培養白血球と S100A12 蛋白～

我々は健常ボランティアから採取したヒト白血球を用いて、In vitro で培養することにより、S100A12 蛋白の産生を確認した。

健常ボランティアより 20 mL 静脈採血を行い、Mono-Poly resolving medium を加え、30℃・3500 回転・20 分で遠心し、単核白血球および多形核白血球に分離し、目的とする白血球数を測量した後に培養を行なった。

結果、健常者から得られた白血球の培養上清中に S100A12 蛋白が検出されることを確認し、時間経過 (図 4) および細胞数の増加 (図 5) に伴い増加することを確認した。さらに、PMA (phorbol12-myristate13-acetate:10⁻⁷ M) および LPS (lipopolysaccharide:1 μg/mL) の刺激によりコントロールと比較して S100A12 蛋白の産生が亢進することも確認した (図 6)。

図 4: ヒト白血球培養上清中の S100A12 産生は時間依存性に増加

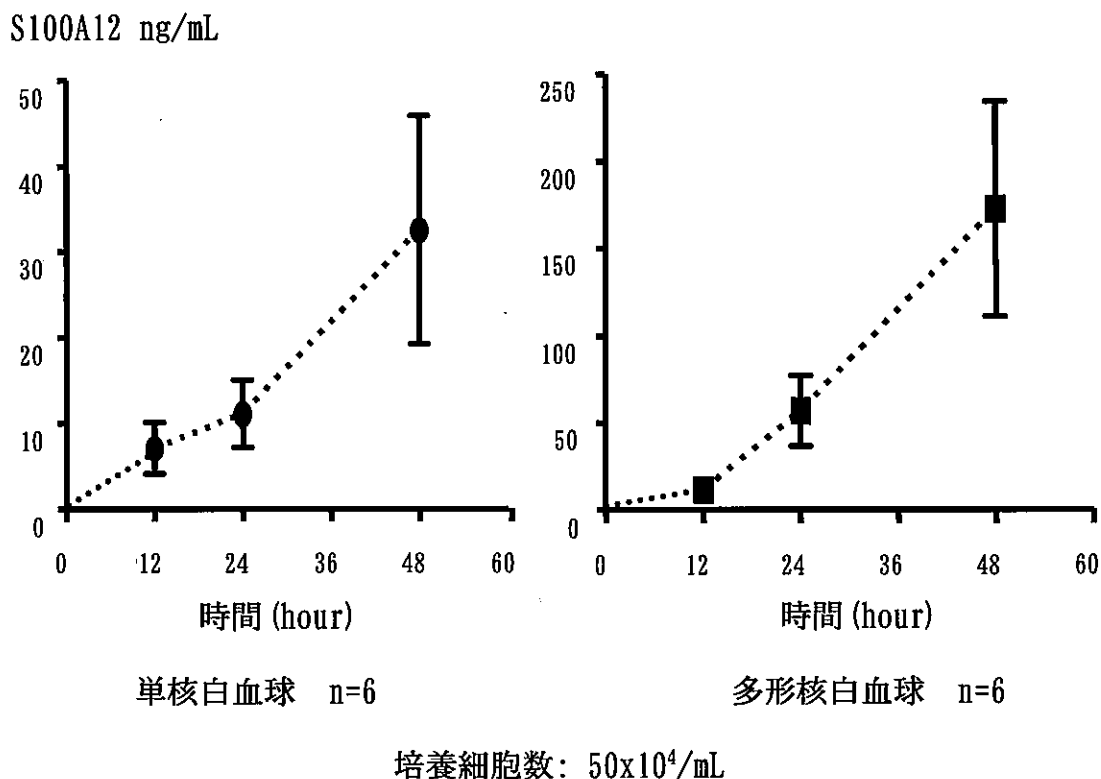


図 5: ヒト白血球培養上清中の S100A12 産生は容量依存性に増加

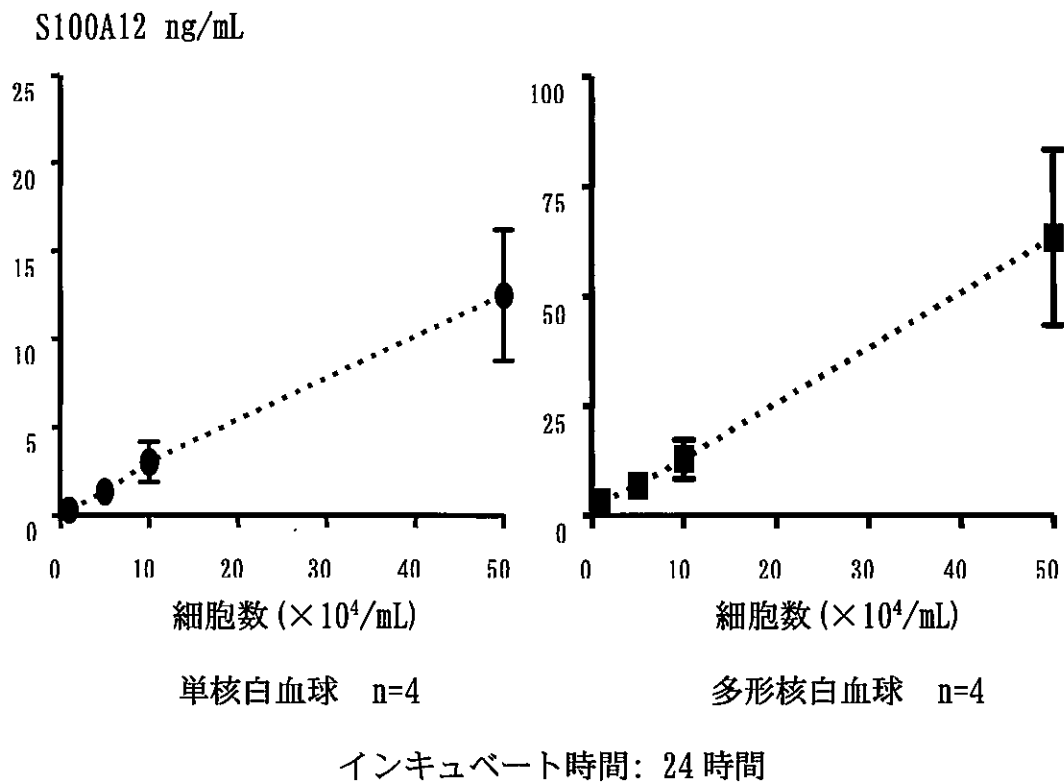
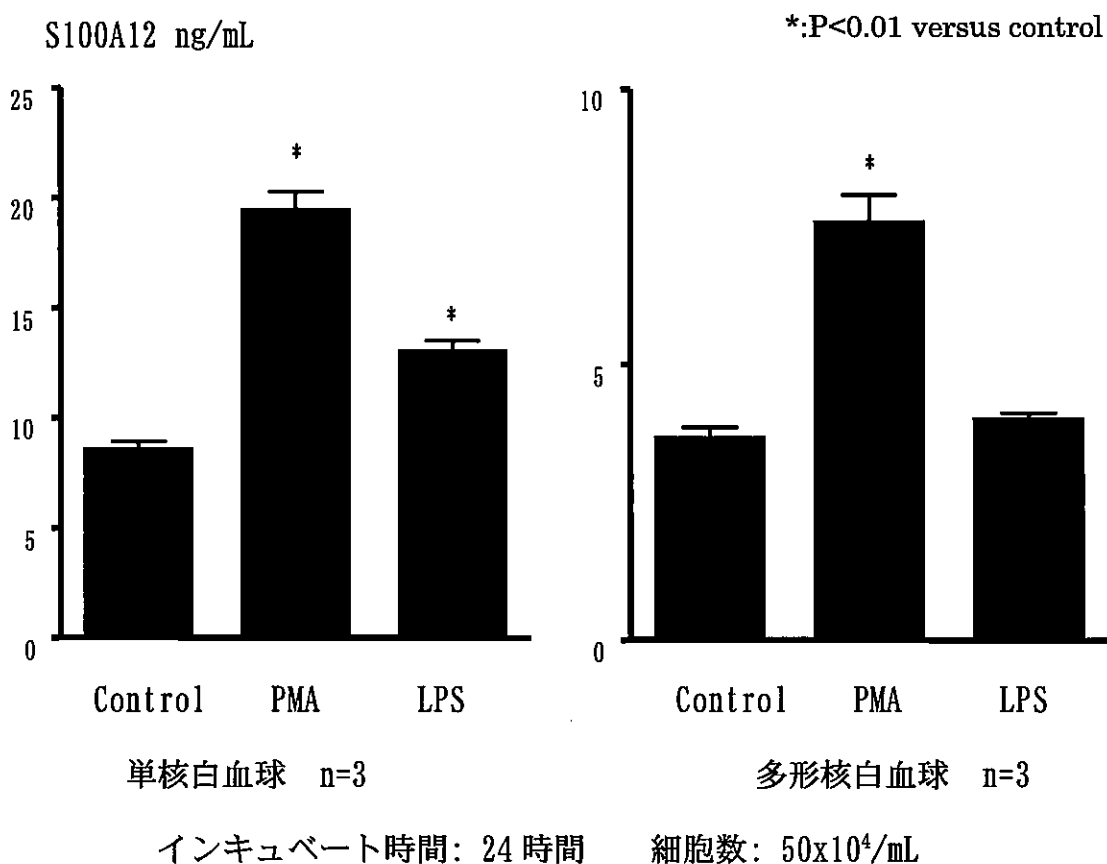


図 6: ヒト白血球培養上清中の S100A12 産生は PMA および LPS 刺激で増加



4. 先行研究 ～S100A12 蛋白のスタチンによる影響～

次に我々は抗炎症作用や抗動脈硬化作用を有するスタチンに着目し、炎症マーカーである S100A12 蛋白を減少させるか否かを検討した。

対象は未治療の脂質異常症患者 15 名で、急性冠症候群、炎症性疾患、膠原病、悪性腫瘍は除外した。方法はアトルバスタチン 1 日 5～10 mg を 4～12 週間投与し、その前後で S100A12 蛋白および高感度 CRP (C-reactive protein) を測定した。患者背景は平均年齢 61.4±11.4 歳、男性 5 例 (33%) であった。アトルバスタチンは 1 日平均 8 mg 投与、平均投与期間は 42 日であった (表 2)。

表 2: ベースライン時の患者背景

年齢 (平均±標準偏差)	61.4±11.4
男性, n (%)	5 (33)
Body mass index (kg/m ²)	23.6±2.4
アトルバスタチン投与量 (mg)	7.9±2.6
アトルバスタチン治療期間 (日)	42±17
高血圧, n (%)	9 (60)
糖尿病, n (%)	1 (7)
喫煙者, n (%)	3 (20)

アトルバスタチンの治療前後で、HDL (high-density lipoprotein) コレステロールに変化は認めなかったが、総コレステロール、LDL (low-density lipoprotein) コレステロールおよび中性脂肪は有意に低下を認めた (表 3)。

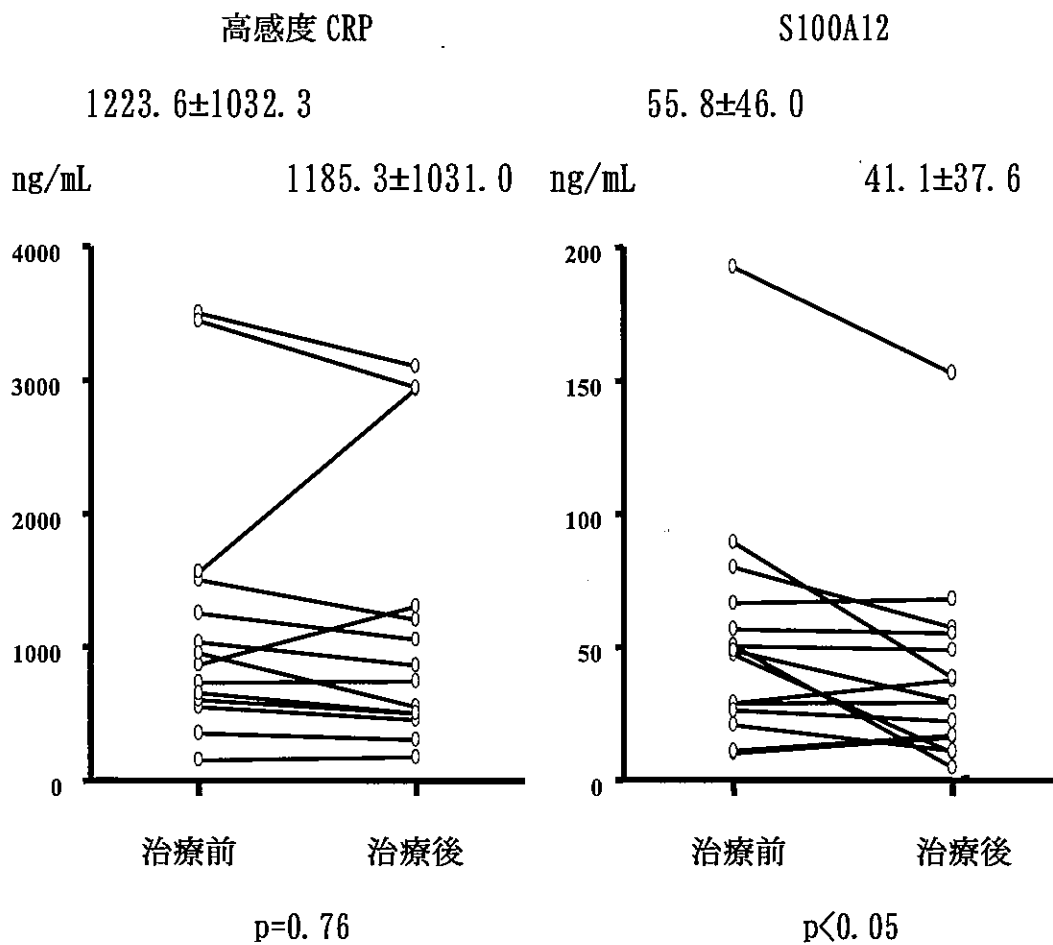
表 3:アトルバスタチン治療による脂質代謝系への影響

	治療前	治療後
総コレステロール (mg/dL)	267.2±18.6	190.8±30.8 *
中性脂肪 (mg/dL)	211.7±160.4	141.3±108.9 *
HDL コレステロール (mg/dL)	60.7±14.4	60.8±13.2
LDL コレステロール (mg/dL)	164.2±29.6	101.8±29.9 *

LDL: low-density lipoprotein, HDL: high-density lipoprotein, *: p<0.01

さらにアトルバスタチンの治療により高感度 CRP では有意な変化を認めなかったが、S100A12 蛋白はアトルバスタチンの治療後に有意な低下を認めた (図 6)。

図 6:アトルバスタチン治療による血中の高感度 CRP と S100A12 の変化



以上の結果より短期間 (4~12 週間) のスタチン治療は血液中の S100A12 蛋白を有意に減少させ、S100A12 蛋白は高感度 CRP よりもスタチン治療時における慢性炎症の変化を鋭敏に反映するマーカーとなり得る可能性が示された。

5. 本研究の目的

S100A12 蛋白は炎症性疾患や悪性腫瘍の発生などに関与することが報告されているが¹¹⁻¹³⁾、循環器領域においては、川崎病¹⁴⁾やベーチェット病¹⁵⁾などの炎症性心血管疾患において血中 S100A12 蛋白の上昇が見られる、動脈硬化での石灰化に関与している¹⁶⁾、大動脈瘤の血管平滑筋細胞で S100A12 蛋白発現が増加している¹⁷⁾といった報告が成されている。

実際に冠動脈疾患患者でコントロールと比較して血中 S100A12 蛋白が上昇しており、冠動脈プラーク破裂によって冠静脈洞の S100A12 蛋白濃度が上昇する、動脈硬化病変で S100A12 蛋白の発現が増加していたとする報告¹⁸⁾も認められている。これらのことから S100A12 蛋白は心血管疾患の炎症マーカーである可能性が示されている。

そこで今回、我々は血中の S100A12 蛋白濃度が冠動脈硬化の病態に関与し、経皮的冠動脈形成術に成功した安定冠動脈疾患患者の主要心血管イベントの予後を推定する因子として有用かどうかを検討するため本研究を施行した。

6. 対象と方法

2002 年 11 月~2010 年 8 月本学付属病院循環器内科に入院した安定冠動脈疾患患者に対し、冠動脈血行再建に成功した連続 652 人を対象とした (平均年齢 64.1±9.6 歳、男/女=533/119)。急性冠症候群、急性腎不全、感染症、膠原

病、血液疾患、悪性腫瘍、免疫抑制薬使用患者は除外した（本研究は当院臨床研究倫理審査委員会で承認された）。

冠動脈血行再建を行なう際に末梢動脈内（橈骨動脈もしくは大腿動脈）に挿入したシース (5-6Fr) から動脈血液 10 mL を採取した。その後、3,000 rpm、4°C、15 分で遠心分離した後、-80°C で保存した。後日 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キット (Cyclex, Nagano, Japan) を用いて、S100A12 蛋白濃度を測定した。S100A12 蛋白の測定下限は 78 pg/mL であり、S100A8 や S100A9 などの他の S100 蛋白は検出しなかった。高感度 CRP は latex nephelometry 法を用いて測定した¹⁹⁾。診療録から既往症、血液検査、心臓超音波検査、心臓カテーテル検査データなどの各種臨床項目を抽出し、S100A12 蛋白との関係を検討した。高血圧・脂質異常症・糖尿病の診断はそれぞれのガイドラインに従った²⁰⁻²²⁾。

主要心血管イベントは入院治療を要する心不全、狭心症再発に対する冠動脈再血行再建、急性心筋梗塞、脳卒中、致死性不整脈、末梢動脈血行再建、心臓突然死の複合エンドポイントと定義した。退院後、当院外来に通院している患者に関しては、診療録から患者の予後状況を調査し、他院へ転院している際には手紙郵送または電話連絡にて予後の状況を確認した。

統計解析は SPSS ソフトウェア (SPSS version 16.0, Chicago, IL, USA) を用いて行った。各種臨床指標と S100A12 蛋白との相関関係の検定および重回帰分析を行った。また、S100A12 蛋白値により対象を 4 分位に分け、Kaplan-Meier カーブ解析を用いて 4 分位間で予後の差を検討した。さらに Cox 比例ハザードモデル解析を用いて、患者の予後に影響を与えている因子を検討した。

7. 結果

ベースライン時の患者背景を表 4 に示す。心臓カテーテルによる治療は合計 997 病変 (1.53 病変/患者) に対し行なった。右冠動脈病変は 286 病変 (28%)、左前下行枝病変は 436 病変 (43.7%)、左回旋枝病変は 228 病変 (22.9%)、左主幹部病変は 33 (3.3%) であり、14 病変 (14%) は静脈グラフト病変であった。ステント留置術は 945 病変 (94.8%) に対して施行した。その内、712 病変 (75.3%) は薬剤溶出性ステントであり、233 病変 (24.7%) は従来型ステントを使用した。30 病変はバルーン形成術のみで終了し、カッティングバルーンを使用した病変が 1 病変に認めた。4 病変に方向性冠動脈粥腫切除術を施行し、17 病変に高速回転性粥腫切除術を施行した。

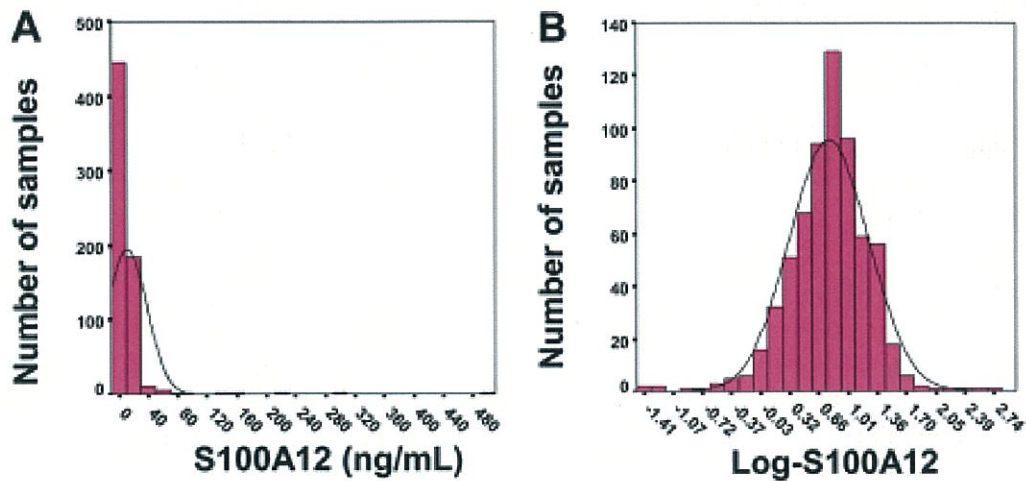
本研究における血液中の S100A12 蛋白濃度の分布を示す (図 7)。S100A12 蛋白濃度は平均値 11.1 ng/mL、中央値 6.50 ng/mL であり、標準偏差は 26.6 ng/mL、標準誤差は 1.04 ng/mL であった。最小および最大 S100A12 蛋白濃度はそれぞれ 0.039 および 498.4 ng/mL であった。S100A12 蛋白濃度は正規分布を示さなかったため、対数変換を行なうことにより正規分布を示すことを確認し、以後の解析は対数変換後の値を用いた。

表 4:ベースライン時の患者背景

年齢 (平均±標準偏差)	64.1±9.6
男性 n (%)	533 (81.7)
Body mass index (kg/m ²)	24.2±0.1
高血圧 n (%)	481(73.8)
脂質異常症 n (%)	427 (65.5)
糖尿病 n (%)	278 (42.6)
喫煙者 n (%)	234 (35.9)
冠動脈疾患家族歴 (%)	139 (21.3)
高感度 CRP (ng/mL)	2877±277
推定糸球体濾過量 (mL/min/1.73m ²)	68.1±0.87
左室駆出率 (%)	60.7±0.5
陳旧性心筋梗塞 n (%)	206 (31.6)
病変枝数	
0 枝病変 n (%)	1 (0.2)
1 枝病変 n (%)	260 (39.9)
2 枝病変 n (%)	243 (37.3)
3 枝病変 n (%)	109 (16.7)
左主幹部病変 n (%)	39 (6.0)

CRP: C-reactive protein

図 7:本研究における S100A12 蛋白濃度の分布



S100A12 蛋白と各種臨床指標との相関関係を検討したところ、白血球・血小板・高感度 CRP と有意な正の相関を示し、赤血球と有意な負の相関を示した (表 5)。また、それらの指標 (白血球・赤血球・血小板・高感度 CRP) を説明変数として、S100A12 蛋白を従属変数として重回帰分析を行なったところ、高感度 CRP ($\beta = +0.246$, $p < 0.001$) が S100A12 蛋白に関連する有意な指標であることが明らかになった。

表 5:S100A12 蛋白と各種臨床指標との相関関係

臨床指標	相関係数	p 値
年齢	+0.071	0.072
Body mass index (kg/m ²)	-0.022	0.570
白血球 (/mm ³)	+0.148	<0.001
赤血球 (×10 ⁴ /μL)	-0.095	0.015
血小板 (×10 ⁴ /μL)	+0.084	0.033
ヘモグロビン A1c (%)	+0.058	0.145
総コレステロール (mg/dL)	+0.020	0.618
中性脂肪 (mg/dL)	+0.011	0.786
LDL コレステロール (mg/dL)	+0.027	0.506
HDL コレステロール (mg/dL)	+0.024	0.546
高感度 CRP (ng/mL, log)	+0.248	0.001
推定糸球体濾過量 (mL/min/1.73m ²)	-0.027	0.488
左室駆出率 (%)	-0.069	0.080

LDL: low-density lipoprotein, HDL: high-density lipoprotein, CRP: C-reactive protein

次に対象を S100A12 蛋白濃度により 4 分位に分け解析を行った (表 6)。

表 6:S100A12 蛋白濃度により対象を 4 分位へ

範囲 (ng/mL)	平均値 (ng/mL)
Q1 : 0.00~<3.38	1.89±0.07
Q2 : 3.38~<6.50	4.98±0.07
Q3 : 6.50~<11.41	8.64±0.12
Q4:11.41~498.4	28.9±3.84

対象患者の予後を検討した結果、平均 973±639 日 (25~2190 日) の追跡期間中に 108 名 (16.6%) に主要心血管イベントが発生した (表 7)。4 分位別の患者背景を表 8 に示す。

表 7:S100A12 蛋白 4 分位別の心血管イベント発症

S100A12 蛋白 4 分位	Q1	Q2	Q3	Q4
入院治療を要する心不全	4	7	6	12
狭心症再発に対する冠動脈再血行再建	11	13	14	10
急性心筋梗塞	1	5	1	5
脳卒中	0	0	3	2
致死性不整脈	1	0	1	0
末梢動脈血行再建	4	0	1	2
心臓突然死	0	2	2	1
主要心血管イベント(MACE)	21	27	28	32

MACE: major adverse cardiovascular event

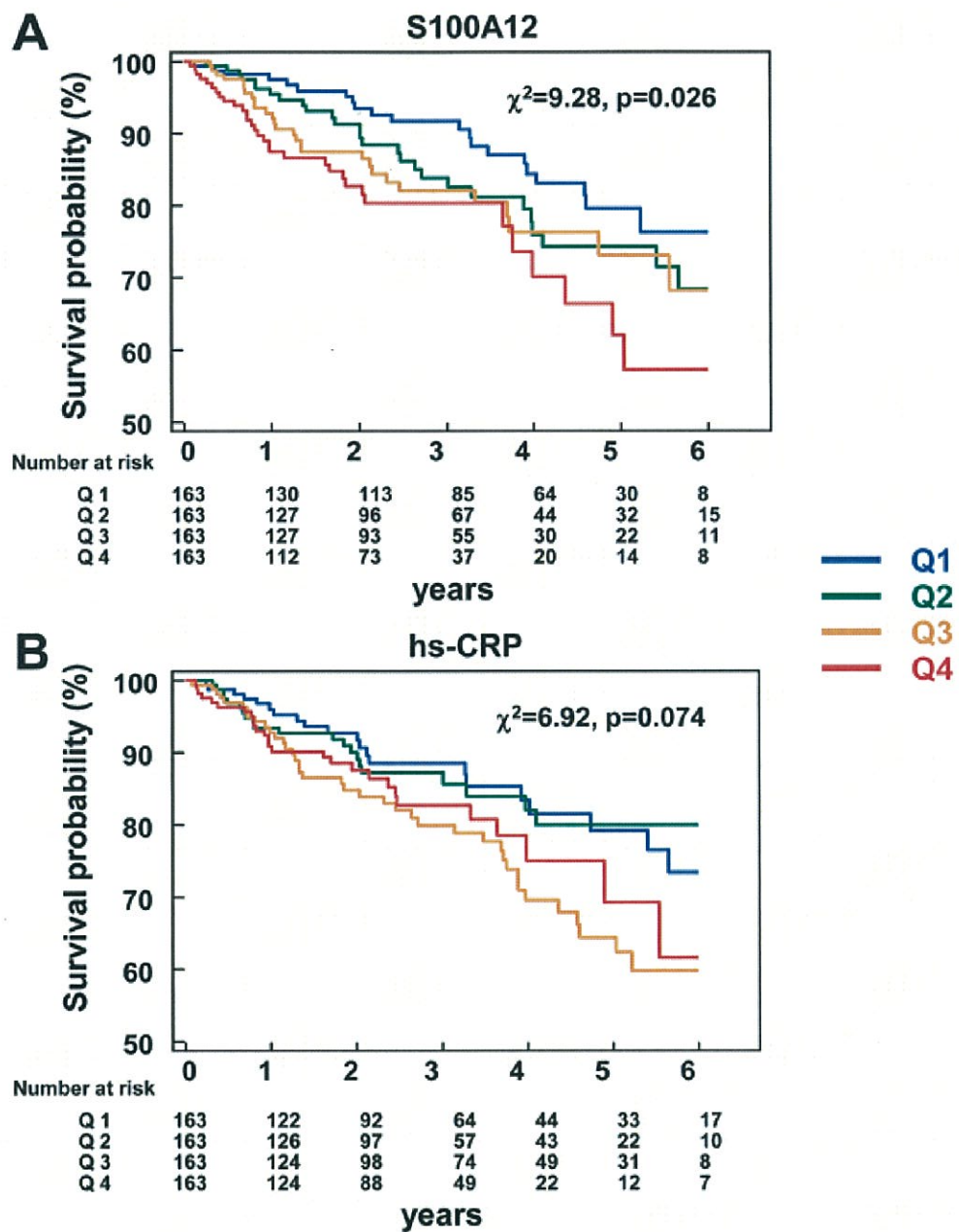
表 8: ベースライン時の S100A12 蛋白 4 分位別患者背景

S100A12 蛋白 4 分位	Q1	Q2	Q3	Q4
年齢 (平均±標準偏差)	63.3±9.8	63.6±9.4	65.5±8.9	63.9±10.1
性 (男性/女性)	129/34	141/22	125/38	138/25
BMI (kg/m ²)	24.3±0.3	24.3±0.2	23.8±0.2	24.3±0.3
高血圧, n (%)	115 (71%)	126 (77%)	126 (83%)	120 (74%)
脂質異常症, n (%)	112 (69%)	105 (64%)	98 (60%)	112 (69%)
糖尿病, n (%)	59 (36%)	70 (43%)	71 (44%)	78 (48%)
喫煙者, n (%)	108 (66%)	122 (75%)	108 (66%)	125 (77%)
家族歴, n (%)	32 (20%)	39 (24%)	31 (19%)	37 (23%)
白血球 (/mm ³)	6223±1202	6644±1375	6465±122	7022±142†
赤血球 (×10 ⁴ /μL)	435±5	431±5	423±5	429±47
血小板 (×10 ⁴ /μL)	21.4±0.5	23.7±0.5	22.2±0.5	24.5±0.8§
ヘモグロビン A1c (%)	5.97±0.10	6.21±0.11	6.05±0.08	6.22±0.10
中性脂肪 (mg/dL)	148±7.0	154±6.8	146±6.1	169±8.4
LDL-chol (mg/dL)	110±2.6	109±2.7	112±2.6	110±1.3
HDL-chol (mg/dL)	48±1.1	47±1.0	48±1.1	48±1.1
高感度 CRP (ng/mL)	1314±248	2036±475	3422±720	4735±618†
eGFR (mL/min/1.73m ²)	67.5±1.6	69.3±1.5	69.4±1.8	66.2±2.0
左室駆出率 (%)	62.0±0.98	61.7±0.95	60.0±1.05	59.1±1.14*
S100A12 (ng/mL)	1.89±0.07	4.98±0.07	8.64±0.12	28.9±3.84†

BMI: body mass index, LDL-chol: low-density lipoprotein cholesterol, HDL-chol: high-density lipoprotein cholesterol, CRP: C-reactive protein, eGFR: estimated glomerular filtration rate, *: p<0.05, § p<0.01, †p<0.001

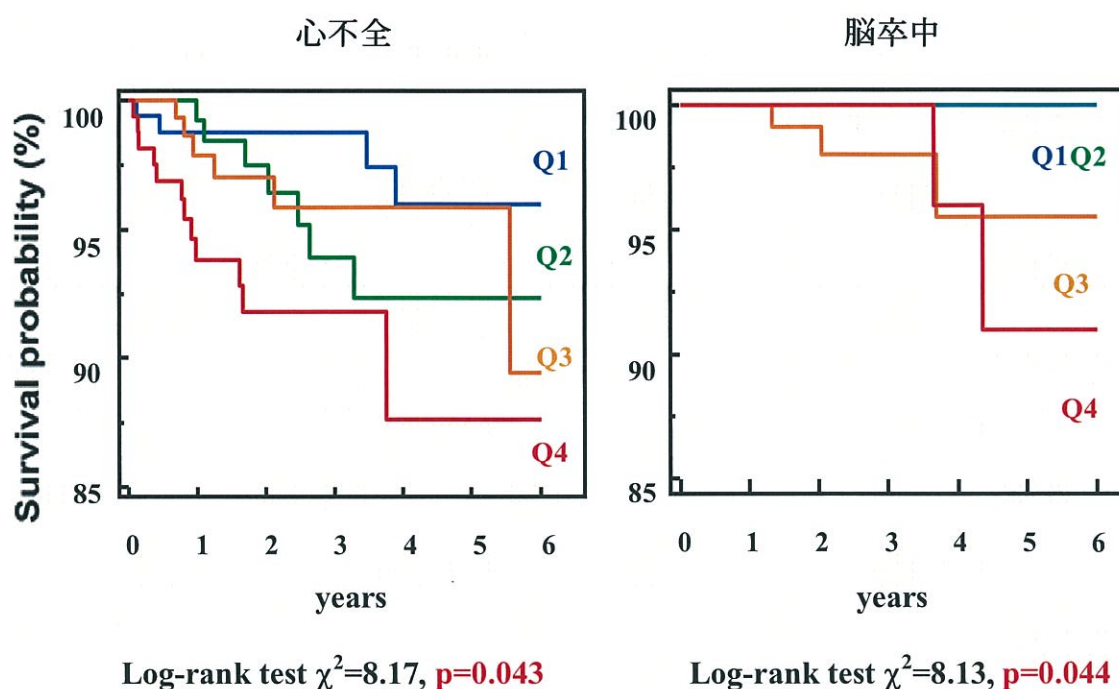
S100A12 蛋白濃度により 4 分位に分け Kaplan-Meier カーブ解析を行ったところ、S100A12 最高値分位 (Q4) で有意に主要心血管イベントの発生率が高いことが示された (図 8A: log-rank test, $p=0.026$)。一方、高感度 CRP で対象を 4 分位に分けた検討では主要心血管イベント発生率に統計学的有意差は得られなかった (図 8B: $p=0.074$)。

図 8: Kaplan-Meier Curve 解析 (MACE)



また、主要心血管イベント毎にそのイベント発生を 4 分位間で検討したところ、Q4 では心不全および脳卒中発生が有意に多いことが示された (それぞれ $p=0.043$, $p=0.044$: 図 9)。

図 9: Kaplan-Meier Curve 解析 (イベント毎)



我々は心血管イベント発症の独立した危険因子を検討するために、Cox 比例ハザードモデル解析 (多変量解析) を行った。まず、モデル 1 として古典的な冠危険因子を設定し、年齢・性・高血圧・脂質異常症・糖尿病・喫煙・冠動脈疾患家族歴・Body mass index および S100A12 蛋白を説明変数とした。モデル 2 ではモデル 1 に冠動脈疾患の予後に関与する因子である、推定糸球体濾過量・高感度 CRP・左室駆出率・陳旧性心筋梗塞・病変枝数・薬剤溶出性ステントを除いた PCI (バルーン形成術・アテレクトミー・従来型ステント) を説明変数として加えた。モデル 3 ではモデル 2 で使用した高血圧・脂質異常症・糖尿病・喫煙の代わりにそれぞれ収縮期血圧・中性脂肪・LDL コレステロール・HDL コレステロール・ヘモグロビン Alc・Brinkman index などの連続変数を説明変数として使用し、解析を行った。

結果、モデル 1 においては高血圧・糖尿病および S100A12 蛋白、モデル 2 においては高血圧・推定糸球体濾過量・左室駆出率および S100A12 蛋白、モデル 3 においては収縮期血圧、HbA1c、推算糸球体濾過量、左室駆出率および S100A12 蛋白が有意な心血管イベント発生の予測因子として同定され、S100A12 蛋白はいずれのモデルにおいても心血管イベント発症を予測する独立した危険因子として同定された (表 9)。

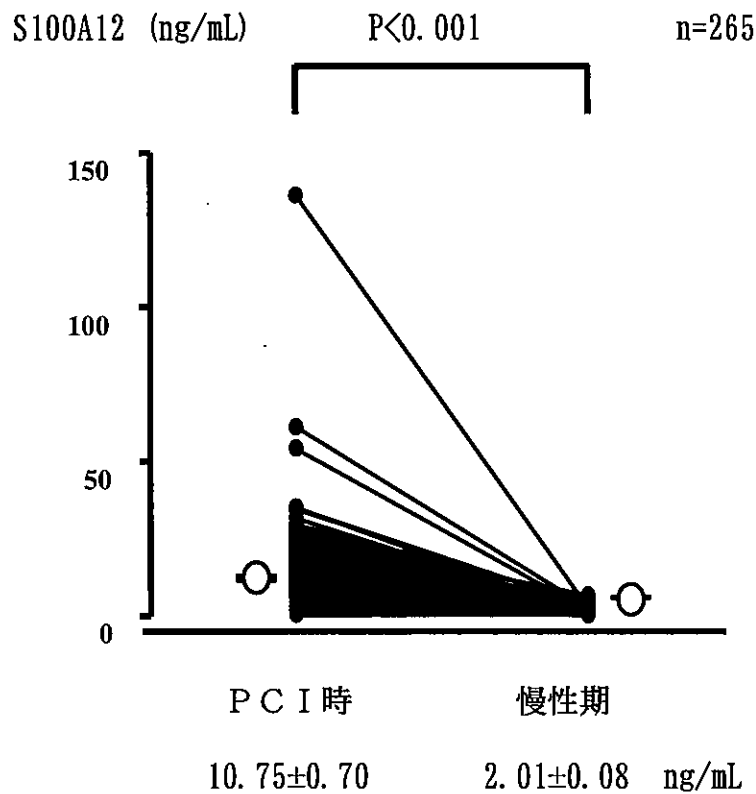
表 9:Cox 比例ハザードモデル解析 (多変量解析)

変数	ハザード比(95%信頼区間)	p 値
モデル 1		
高血圧	2.66 (1.49-4.75)	0.001
糖尿病	1.52 (1.04-2.22)	0.031
S100A12 蛋白 (log)	1.80 (1.17-2.76)	0.007
モデル 2		
高血圧	2.56 (1.43-4.59)	0.002
eGFR (mL/min/1.73m ²)	0.99 (0.98-1.00)	0.004
左室駆出率 (%)	0.97 (0.96-0.98)	<0.001
S100A12 蛋白 (log)	1.59 (1.05-2.42)	0.030
モデル 3		
収縮期血圧	1.01(1.00-1.02)	0.004
ヘモグロビン A1c(%)	1.19 (1.05-1.35)	0.009
eGFR (mL/min/1.73m ²)	0.99 (0.98-1.00)	0.005
左室駆出率 (%)	0.97 (0.96-0.99)	<0.001
S100A12 蛋白 (log)	1.64 (1.06-2.53)	0.025

eGFR: estimated glomerular filtration rate

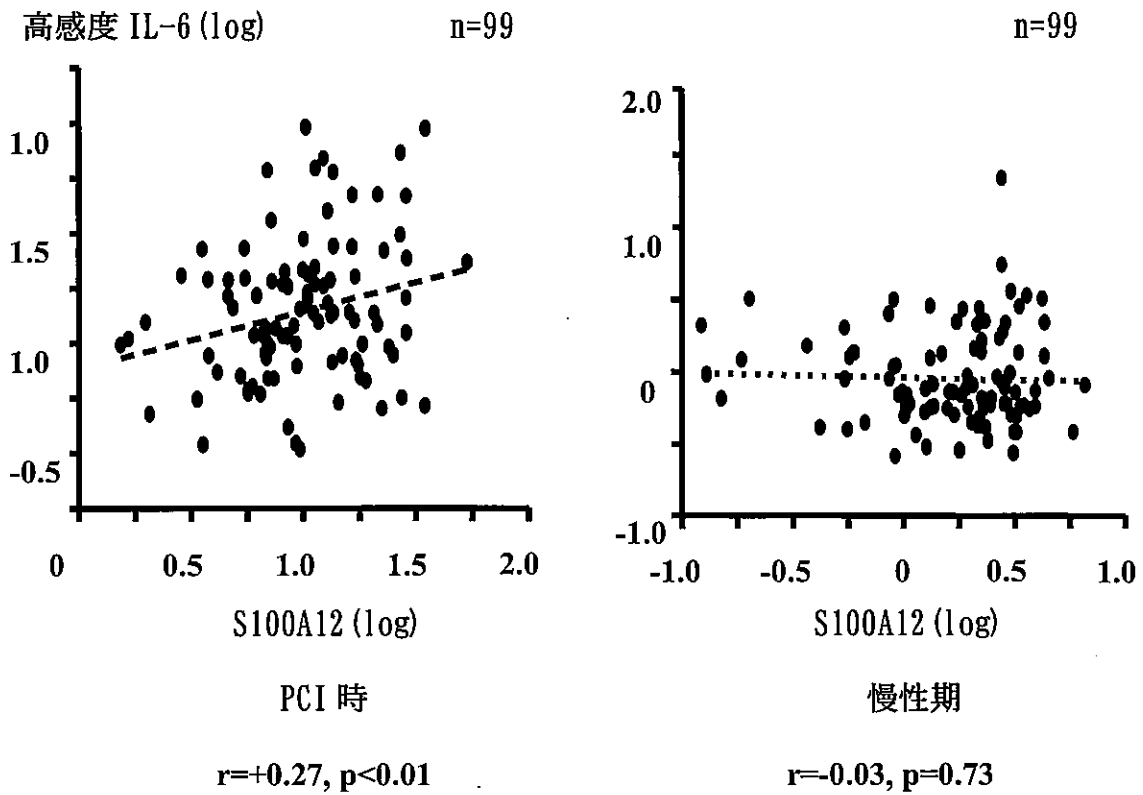
また、652 例中 265 例で慢性期の S100A12 蛋白を測定することが可能であった。PCI 治療平均 298±6.3 日後に施行した慢性期確認カテーテル時の採血では S100A12 蛋白値は有意に低下しており (10.75 ± 0.70 → 2.01 ± 0.08 ng/mL, p<0.001)、PCI を含む冠動脈疾患治療により S100A12 蛋白が低下する可能性が示された (図 10)。

図 10: 慢性期の S100A12 蛋白 (平均 298±6.3 日後)



また、PCI 施行時および慢性期にそれぞれ 99 例ずつ高感度 IL-6 を測定することが可能であった。その結果、PCI 時の高感度 IL-6 と S100A12 蛋白は有意な正相関を示していたが ($r=+0.254$, $p=0.01$)、PCI 治療平均 298±6.3 日後に施行した慢性期確認カテーテル時の採血では高感度 IL-6 と S100A12 蛋白には相関関係は認められなかった (図 11)。

図 11: S100A12 蛋白と高感度 IL-6 との関係



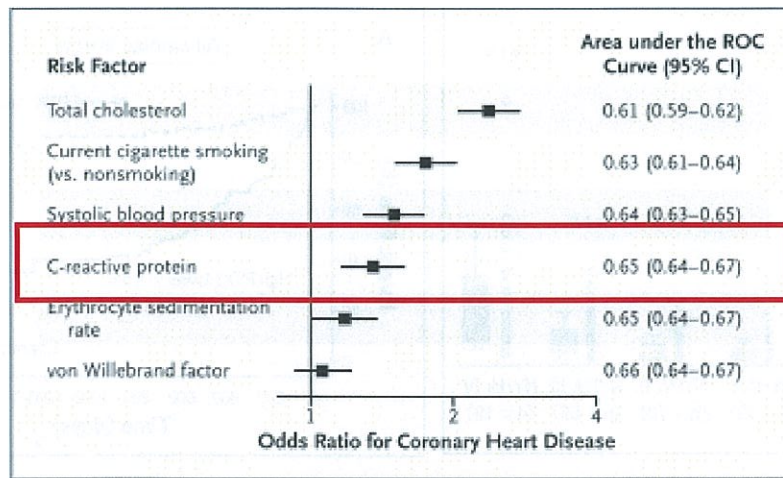
8. 考察

本研究により S100A12 蛋白は高感度 CRP および高感度 IL-6 と有意に正の相関を呈し、安定冠動脈疾患の炎症に関与することが示唆された。また、S100A12 蛋白は安定冠動脈疾患患者において、冠動脈血行再建による治療成功後の主要心血管イベント発生に関与していた。

大規模臨床試験において、炎症反応の指標である高感度 CRP は他の冠危険因子とは独立した心血管イベント発症予測因子であることが示されている (図 12)

23-24)。

図 12: 高感度 CRP は他の冠危険因子とは独立した予後予測因子である



しかし、本研究においては高感度 CRP と主要心血管イベント発生には差が認められなかったことより、S100A12 蛋白は高感度 CRP と比較し、より鋭敏に主要心血管イベント発生を予測するマーカーとなり得ることが示された。この結果が得られた理由として CRP は肝臓で産生され全身の炎症を反映しているのに対し、S100A12 蛋白は血管など局所の炎症を反映していることが要因と考えられた。

特に我々の研究において、S100A12 蛋白は心不全の発症と関連しており、またイベント発生数は少数ながらも脳卒中との関連も認めていた。詳細な機序は不明であるが、心筋微小循環障害や内皮機能障害などの病態が影響している可能性が考えられた。

また、今回我々の研究では未検討であったが、同じ炎症マーカーである pentraxin3 で心不全重症度や心血管イベント発症に関与していたとする報告 (図 13)²⁵⁻²⁸⁾ や matrix metalloproteinase が冠動脈プラーク破綻や心血管死に関与していたとの報告も認められており (図 14)²⁹⁻³⁰⁾、炎症マーカーの種類によりその予後予測能が異なる可能性も考えられた。

図 13: Pentraxin3 は心不全重症度や心血管イベント発症に関与

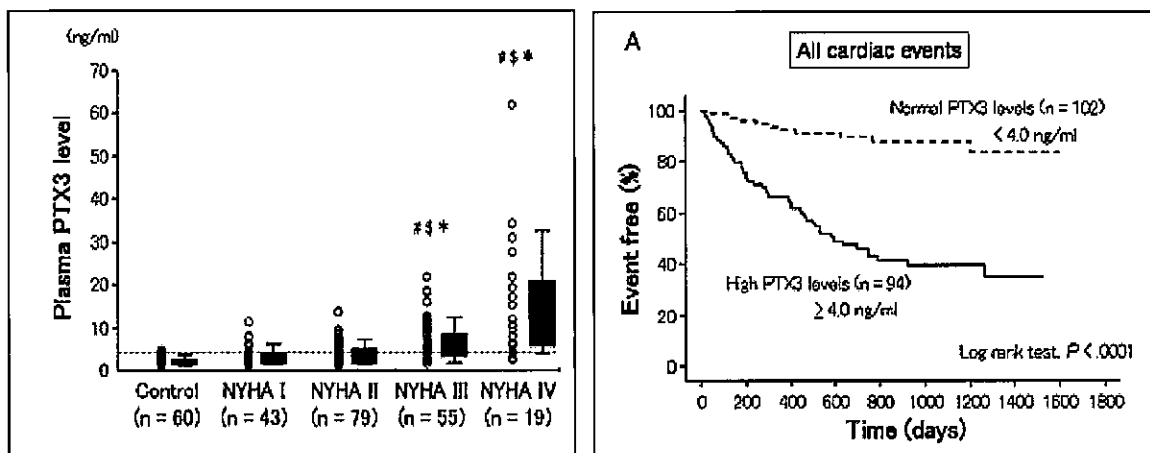
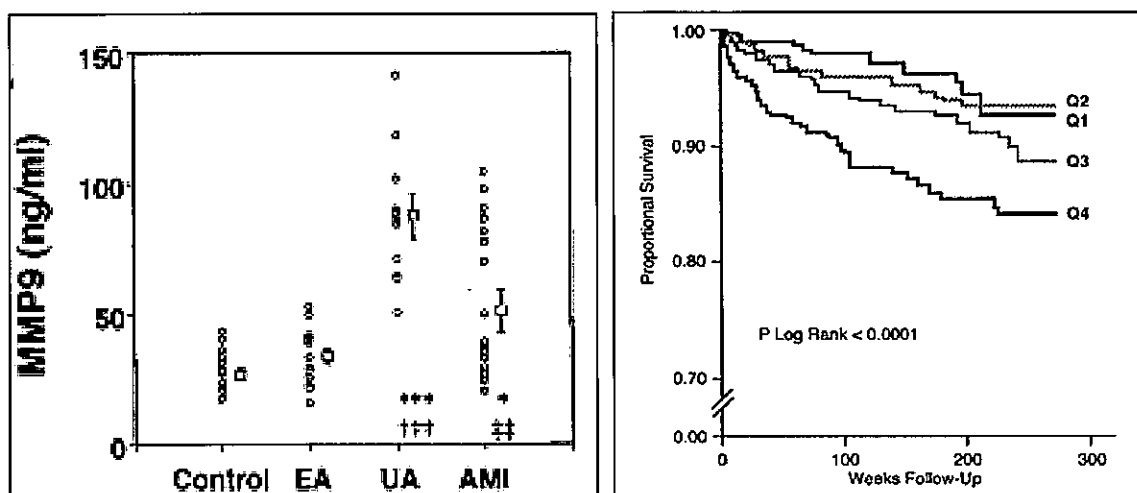


図 14: Matrix metalloproteinase-9 が冠動脈プラーク破綻や心血管死に関与



Foell らによると抗 TNF (tumor necrosis factor)- α である infliximab により S100A12 蛋白を抑制する可能性が考えられており¹¹⁾、今後 S100A12 蛋白が安定冠動脈疾患患者の予後を予測するマーカーとして利用されることが期待される他、S100A12 蛋白のような炎症性メディエーターが心血管イベント発症の抑制を目的とした治療のターゲットとなる可能性も考えられた。

また追加データとして、本研究においては慢性期に 265 例の S100A12 蛋白を測定することが可能であった。解析の結果、これらの症例において S100A12 蛋白は PCI を含んだ冠動脈疾患治療により、慢性期に有意に低下していることが示された。我々は先行研究において、抗炎症作用を有するスタチン治療により、血液中の S100A12 蛋白が有意に低下することを報告していることから、スタチ

ンや PCI を含む冠動脈疾患に対する治療により、慢性期に S100A12 蛋白が低下したと考えた。

一方で、これらの症例において慢性期の S100A12 蛋白を用いた解析では予後を予測する因子としては十分な結果が得られなかった。この結果を説明する理由としては、統計学的に症例数が十分でない可能性と冠動脈疾患に対する治療によって血液中の S100A12 蛋白は修飾を受け、組織中の S100A12 蛋白発現を十分に反映していない可能性などが考えられた。また、慢性期の保存検体においては数年を経過する検体も存在していたため、測定系に関する影響も考慮された。

基礎実験においては IL-6 や TNF- α 、LPS などが S100A12 蛋白を誘導する因子として報告されているが、本研究においては PCI 治療前の高感度 IL-6 が S100A12 蛋白と有意に正相関を示しており、安定冠動脈疾患患者においては S100A12 蛋白のみでなく IL-6 も病態に関与している可能性が考えられた。

これら S100A12 蛋白の生体内での動向や S100A12 蛋白の発現に関する誘導や抑制に関わる因子の検討、また各種治療に対する影響なども今後検討していく必要があると思われた。また、本研究では安定冠動脈疾患患者を対象としたが、さらに急性心筋梗塞発症患者における S100A12 蛋白の動向や心筋逸脱酵素との関係、その後の心筋リモデリングや心血管イベント発生などについても検討していく予定である。

9. 結論

安定冠動脈疾患患者において S100A12 蛋白は高感度 CRP および高感度 IL-6 と有意な正相関を認めており、安定冠動脈疾患の炎症反応に関与している可能性が示された。また、S100A12 蛋白は PCI を含む冠動脈疾患治療により慢性期に有意に低下することが示された。

さらに S100A12 蛋白は、その後の主要心血管イベント発症に関与している可能性が示されたが、従来大規模臨床試験において報告されてきた高感度 CRP と比べて、S100A12 蛋白が安定冠動脈疾患治療後の心血管イベント発症により特異的な予測因子となる可能性が示された。

S100A12 蛋白は心血管系の炎症反応を反映し、今後心血管疾患の予後予測因子や治療のターゲットとなる可能性が示された。

10. 謝辞

本研究を施行するにあたり、学術論文指導教員の北條行弘准教授および苅尾七臣教授より丁寧かつ熱心な御指導を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。また、本研究を施行するにあたり、勝木孝明准教授、島田和幸教授に御支援頂きましたことを深く感謝申し上げます。

本研究に参加・協力・御指導頂いた新保昌久准教授、池本智一先生、広瀬雅裕先生、西村芳興先生、清水勇人先生、渡部智紀先生、岩田友彦先生、近藤秀行先生、永井道明先生、桂田健一先生、小古山由佳子先生、中山美緒先生、大場祐輔先生初め医局の諸先生方・研究補助員の皆様および心臓カテーテル検査室・病棟スタッフの皆様にご心より御礼申し上げます。

尚、本研究の一部に自治医科大学大学院スタートアップ研究費および研究奨励賞による研究費が使用されていることをここに明記致します。

11.参考文献

1. Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O'Shaughnessy C, Caputo RP, Kereiakes DJ, Williams DO, Teirstein PS, Jaeqer JL, Kuntz RE, SIRIUS Investigators. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med.* 349:1315-1323, 2003.
2. Holmes DR J, Leon MB, Moses JW, Popma JJ, Cutlip D, Fitzgerald PJ, Brown C, Fischell T, Wong SC, Midei M, Snead D, Kuntz RE. Analysis of 1-Year Clinical Outcomes in the SIRIUS Trial: A Randomized Trial of a Sirolimus-Eluting Stent Versus a Standard Stent in Patients at High Risk for Coronary Restenosis. *Circulation.* 109(5):634-640, 2004.
3. Weisz G, Leon MB, Holmes DR J, Kereiakes DJ, Clark MR, Cohen BM, Ellis SG, Coleman P, Hill C, Shi C, Cutlip DE, Kuntz RE, Moses JW. Two-year outcomes after sirolimus-eluting stent implantation: results from the Sirolimus-Eluting Stent in de Novo Native Coronary Lesions (SIRIUS) trial. *J Am Coll Cardiol.* 47:1350-1355, 2006.
4. Weisz G, Leon M, Holmes DR J, Kereiakes D, Popma J, Teirstein P, Cohen SA, Wang H, Cutlip DE, Moses JW. Five-Year Follow-Up After Sirolimus-Eluting Stent Implantation: Results of the SIRIUS (Sirolimus-Eluting Stent in De-Novo Native Coronary Lesions) Trial. *J Am Coll Cardiol.* 53:1488-1497, 2009.
5. Kastrati A, Mehilli J, Pache J, Kaiser C, Valgimigli M, Kelbaek H, Menichelli M, Sabate M, Suttorp MJ, Baumgart D, Seyfarth M, Pfisterer ME, Schomig A. Analysis of 14 trials comparing sirolimus-eluting stents

- with bare-metal stents. *N Engl J Med.* 356:1030-1039, 2007.
6. Boden WE, O'Rourke RA, Teo KK, Hartigan PM, Maron DJ, Kostuk WJ, Knudtson M, Dada M, Casperson P, Harris CL, Chaitman BR, Shaw L, Gosselin G, Nawaz S, Title LM, Gau G, Blaustein AS, Booth DC, Bates ER, Spertus JA, Berman DS, Mancini GB, Weintraub WS; COURAGE Trial Research group. Optimal medical therapy with or without PCI for stable coronary disease. *E Nngl J Med.* 356:1503-16, 2007.
 7. Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slattery T, Beach D, McClary J, Nagashima M, Morser J, Stern D, Schmidt AM. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell.* 97:889-901, 1999.
 8. Rosario D. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 33:637-668, 2001.
 9. Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun.* 322:1111-1122, 2004.
 10. Vogl T, Pröpper C, Hartmann M, Strey A, Strupat K, van den Bos C, Sorg C, Roth J. S100A12 is expressed exclusively by granulocytes and acts independently from MRP8 and MRP14. *J Biol Chem.* 274:25291-25296, 1999.
 11. Foell D, Kucharzik T, Kraft M, Vogl T, Sorg C, Domschke W, Roth J. Neutrophil derived human S100A12 (EN-RAGE) is strongly expressed during chronic active inflammatory bowel disease. *Gut.* 52:847-853, 2003.

12. Foell D, Seeliger S, Vogl T, Koch HG, Maschek H, Harms E, Sorg C, Roth J. Expression of S100A12 (EN-RAGE) in cystic fibrosis. *Thorax*. 58:613-617, 2003.
13. Niini T, Vettenranta K, Hollmén J, Larramendy ML, Aalto Y, Wikman H, Nagy B, Seppanen JK, Ferrer Salvador A, Mannila H, Saarinen-Pihkala UM, Knuutila S. Expression of myeloid-specific genes in childhood acute lymphoblastic leukemia - a cDNA array study. *Leukemia*. 16:2213-2221, 2002.
14. Foell D, Ichida F, Vogl T, Yu X, Chen R, Miyawaki T, Sorg C, Roth J. S100A12 (EN-RAGE) in monitoring Kawasaki disease. *Lancet*. 361:1270-1272, 2003.
15. Eun CH, Sung BC, Keun JA, Sang HO, Jihyun K, Dong SK, Kwang HL, Dongsik B. Expression of Pro-inflammatory Protein S100A12 (EN-RAGE) in Behcet's Disease and Its Association with Disease Activity: A Pilot Study. *Ann Dermatol* 23:3, 2011.
16. Hofmann Bowman MA, Gawdzik J, Bukhari U, Husain AN, Toth PT, Kim G, Earley J, McNally EM. S100A12 in vascular smooth muscle accelerates vascular calcification in apolipoprotein E-null mice by activating an osteogenic gene regulatory program. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31(2):337-344, 2011
17. Hofmann Bowman M, Wilk J, Heydemann A, Kim G, Rehman J, Lodato JA, Raman J, McNally EM. S100A12 mediates aortic wall remodeling and aortic aneurysm. *Circ Res* 106(1):145-154, 2010.
18. Jesse G, Wei XY, Eric Y, Yuen MC, Su YL, Kenneth H, Farid R, Nick DG, Changjie S, Wendy J, Maaik K, Yuri V, Bobryshev S, Ben F, Carolyn LG.

- Pleiotropic Roles of S100A12 in Coronary Atherosclerotic Plaque Formation and Rupture. *J Immunol* 183:593-603, 2009
19. Ledue TB, Weiner DL, Sipe JD, Poulin SE, Collins MF, Rifai N. Analytical evaluation of particle-enhanced immunonephelometric assays for C-reactive protein, serum amyloid A and mannose-binding protein in human serum. *Ann Clin Biochem.* 35:745-753, 1998.
 20. Japanese Society of Hypertension Guidelines Subcommittee for the Management of Hypertension. Guidelines for the management of hypertension for general practitioners. *Hypertens Res.* 24:613-634, 2001.
 21. Teramoto T. Japan Atherosclerosis Society guidelines for prevention of atherosclerotic diseases in Japanese. *Nihon Ronen Igakkai Zasshi.* 45:597-600, 2008.
 22. Kosaka K. Diagnosis of diabetes mellitus. *Nihon Naika Gakkai Zasshi.* 71:759-763, 1982.
 23. Lagrand WK, Visser CA, Hermens WT, Niessen HW, Verheugt FW, Wolbink GJ, Hack CE. C-reactive protein as a cardiovascular risk factor: more than an epiphenomenon? *Circulation.* 100:96-102, 1999.
 24. Zebrack JS, Muhlestein JB, Horne BD, Anderson JL, Intermountain Heart Collaboration Study Group. C-reactive protein and angiographic coronary artery disease: independent and additive predictors of risk in subjects with angina. *J Am Coll Cardiol.* 39:632-637, 2002.
 25. Ishino M, Takeishi Y, Niizeki T, Watanabe T, Nitobe J, Miyamoto T, Miyashita T, Kitahara T, Suzuki T, Bilim O, Kubota I. Risk stratification of chronic heart failure patients by multiple biomarkers: implications of BNP, H-FABP, and PTX3. *Circ J.* 72:1800-1805, 2008.

26. Ferratini M, Ripamonti V, Masson S, Grati P, Racca V, Cuccovillo I, Raimondi E, Capomolla S, Macchi C, Coruzzi P, Vago T, Calvo M, Mantovani A, Latini R. Pentraxin-3 Predicts Functional Recovery and 1-Year Major Adverse Cardiovascular Events After Rehabilitation of Cardiac Surgery Patients. *J Cardiopulm Rehabil Prev.* 32:17-24, 2012.
27. Matsubara J, Sugiyama S, Nozaki T, Sugamura K, Konishi M, Ohba K, Matsuzawa Y, Akiyama E, Yamamoto E, Sakamoto K, Nagayoshi Y, Kaikita K, Sumida H, Kim-Mitsuyama S, Ogawa H. Pentraxin 3 is a new inflammatory marker correlated with left ventricular diastolic dysfunction and heart failure with normal ejection fraction. *J Am Coll Cardiol.* 57:861-869, 2011.
28. Kotooka N, Inoue T, Aoki S, Anan M, Komoda H, Node K. Prognostic value of pentraxin 3 in patients with chronic heart failure. *Internal Journal of Cardiology* 130:19-22, 2008.
29. Kai H, Ikeda H, Yasukawa H, Kai M, Seki Y, Kuwahara F, Ueno T, Sugi K, Imaizumi T. Peripheral blood levels of matrix metalloproteases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol.* 32No.2:368-72, 1998.
30. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, Meyer J, Cambien F, Tiret L, Athero Gene Investigators. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation.* 107:1579-1585, 2003.