

表 題 冠動脈プラークと血中 CPP 値の関連に関する横断研究

論文の区分 博士課程

著 者 名 仲里 淳

担当指導教員氏名 荻尾 七臣 教授

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

2019年1月10日申請の学位論文

目次

I. はじめに	2
II. 目的	5
III. 方法	6
IV. 結果	12
V. 考察	24
VI. 結論	32
VII. 今後の展望	33
VIII. 引用文献	34
IX. 謝辞	43

I はじめに

冠動脈疾患は世界において、死因上位の疾患の一つである。冠動脈疾患の原因の多くは、冠動脈プラークに起因する。冠動脈プラークはさまざまな性質のものから構成されている。脂質プラーク、線維性プラーク、石灰化プラークなどである¹。プラークが形成されるメカニズムは、内皮障害、脂質異常症、炎症、免疫反応などの様々な因子によって生じる血管内皮障害が関わっていると考えられている²⁻⁷。

慢性腎臓病(CKD)、特に透析患者は血管石灰化、心肥大、骨粗鬆症を高率に発症しており、その原因の一つとして高リン血症であると考えられている。また、透析患者においては、血中リン濃度と総死亡率との間に正の相関を示すと報告されている⁸。しかし、冠疾患を有する腎機能が正常な患者群において、リン濃度が正常範囲にもかかわらず、血中リン濃度が高いほど心血管イベントが高いという報告もある⁹。これは、他の心血管リスク因子を調整し、かつ心疾患既往の有無に関わらず一貫して認められる¹⁰。さらに、血清リン濃度と動脈硬化との関連を示唆する報告もある¹¹。Kanbayらは、軽度腎機能が低下した群において、リン利尿ホルモンである線維芽細胞増殖因子 23 (FGF23)が冠動脈病変の重症度に寄与すると報告している¹²。これらの事から、血清リン代謝と冠動脈の動脈硬化と関連があると考えられる。

哺乳類の細胞外液中のリン酸カルシウムのイオン濃度は、過飽和状態である。そのため、血中リンやカルシウム濃度が上昇すると、リン酸カルシウムが析出してしまふ。リン酸カ

ルシウムが骨以外で析出してしまうと、異所性石灰化を起こしてしまう。そのため、リン酸カルシウムを析出しない様にする仕組みが必要となる。生体内では、肝臓で作られる fetuin-A 蛋白が析出したリン酸カルシウムを吸着することで、リン酸カルシウム結晶の成長を防いでいる。このリン酸カルシウムを吸着した血清蛋白 fetuin-A の凝集体は Calciprotein particle (CPP) と呼ばれており、コロイド粒子となって血中に分散している。CPP は血中でリン酸カルシウム結晶を成長させないための防御機構が働いた結果生じた物質と考えられるが、無害ではない¹³。現在では、CPP は石灰化のマーカーとして考えられている。また CPP は、慢性腎疾患患者において、非感染性炎症を起こす物質であるとも考えられている¹⁴。最近の臨床研究において、血中 CPP 値が高値であるほど冠動脈 CT 検査で測定された冠動脈石灰化スコアが有意に高いと報告されている¹⁵⁻¹⁷。しかし、これらの研究には制限がある。これまでの研究で用いられた CPP 測定方法は、以下の方法である。血清 fetuin-A 濃度をヒト fetuin-A 酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットを用いて測定する(この濃度を A1 とする)。次に血清を 16000~24000 回転で 2 時間遠心分離し、CPP を沈殿させる。その上清中の fetuin-A 濃度(この濃度を A2 とする)を測定する。遠心による fetuin-A 減少率(reduction ratio; RR)、すなわち(A1-A2)/A1 を計算し、血清 CPP 値としている¹⁵。この fetuin-A 法には限界がある。A1 と A2 の差が小さくなる程、精度が下がることである。この方法で使用されるヒト fetuin-A ELISA キットの変動係数が 2~5% であるため、RR が変動係数に近づくほど測定誤差が大きくなる。最近、三浦らはリン酸カルシウム結晶に特異的に結合する近赤外線蛍光プローブである OsteoSense とゲル濾過スピンカラムを用いた新規 CPP

アッセイを開発した¹⁸。この方法は、fetuin-A法を用いた従来のCPP測定よりも感度が高く、迅速でかつ安価である。さらに重要なことは、従来のfetuin-A法やフローサイトメトリーを用い測定したCPPと比較し、より小さく、より軽いCPPの存在が明らかとなった¹⁸。また、三浦らはCPPとFGF23との間に正の相関を認めるとも報告しており、CPPと冠動脈プラーク量と相関する可能性も考えられる。

血管内超音波検査(Intravascular ultrasound: IVUS)は、フレキシブルなカテーテルの先端に、10~40 MHzの範囲の超音波を発する装置がついたもので、冠動脈壁の動脈プラークを明らかにすることができる。また、プラークの形態と分布を描写し、冠動脈インターベンション治療時に非常に有用なモダリティである^{19,20}。IB-IVUS(Integrated backscatter intravascular ultrasound)は冠動脈プラークの性質を検出することができる^{21,22}。また、IB-IVUSは心血管イベントリスクが高い患者のプラークの進行や退縮を評価するために使用されている²³。

II 目的

本研究の目的は、Osteosence とゲル濾過スピンカラムを用いる新規アッセイで測定した血清 CPP 値と IVUS ならびに IB-IVUS を用いて評価した冠動脈プラークの量と質との関連を検討することである。

Ⅲ 方法

対象患者

本研究は、血清 CPP 値と IVUS および IB-IVUS を用いて評価した冠動脈プラークとの関連を調査した横断研究である。沖縄県立中部病院において、2016 年 1 月から 2017 年 7 月の期間に、急性冠症候群あるいは安定狭心症に対して、合計 307 症例(急性冠症候群 119 症例、安定狭心症 188 症例)の冠動脈インターベンション治療を施行した。循環器専門医がガイドラインに基づいて急性冠症候群と安定狭心症の診断を行った²⁴⁻²⁶。37 症例は推定糸球体濾過率(eGFR) 30 ml/min/1.73m²未満の慢性腎不全ステージ 4 以上であり除外した。eGFR は日本人の推計式で算出した²⁷。病院到着時に心原性ショックや心停止を呈していた 19 症例も除外した。上記症例を除外した 251 症例中、94 症例において研究の同意を得ることができた。安定狭心症患者の場合は、冠動脈インターベンション治療前に書面にて同意を得、急性冠症候群の場合は、冠動脈インターベンション治療後に同意を得た。94 症例中、慢性完全閉塞病変(2 症例)、ステント内再狭窄病変(5 症例)、バイパス血管病変(3 症例)、IVUS 画像が不鮮明あるいは IB-IVUS を用いなかった症例(13 症例)を除いた合計 71 症例を研究対象とした。この研究は、沖縄県立中部病院倫理委員会の審査を経て、倫理的承認を取得し、ヘルシンキ宣言のガイドラインに従って実施された。

研究プロトコール

この研究は急性冠症候群あるいは安定狭心症に対して、冠動脈インターベンション治療を施行した患者を対象とし、年齢・性別・BMI・心筋梗塞歴・脳梗塞歴・冠動脈疾患リスク(脂質異常症や糖尿病、高血圧、喫煙歴など)・心房細動歴・末梢動脈疾患歴のデータを診療録から収集した。また、診療のために行った採血データも収集した。

採血採取と CPP 測定方法

CPP 測定のための採血は、入院中に行った。安定狭心症症例では、冠動脈インターベンション前に採血を行った。急性冠症候群では、病態が安定した、退院前(冠動脈インターベンション治療後約 1 週間後)に採血を行った。採血後 60 分以内に 10 分間 3000 回転で遠心し、血清試料を得た。血清試料は、冷蔵にて大学へ輸送された後、CPP を測定するまで -80°C で凍結保存した。新規の CPP 測定方法は、三浦らの論文¹⁸に詳しく記載されているが、簡単に述べる。血清 $5\ \mu\text{l}$ を $45\ \mu\text{l}$ の $100\ \text{mM}$ HEPES (pH 8.0) と $0.5\ \text{mM}$

OsteoSence を含む $45\ \mu\text{l}$ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) に加えた。 25°C で 60 分間インキュベートした後、混合物 $30\ \mu\text{l}$ をスピニングカラム (Bio-Rad; 排除限界: $40\ \text{kDa}$) に乗せ 1000 回転 2 分間遠心分離した。通過画分 $50\ \mu\text{l}$ を $50\ \mu\text{l}$ の 2% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) と $100\ \text{mM}$ エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) と混合し、近赤外線蛍光スキャナー (Odyssey CLx, LI-COR) を用いて OsteoSence 蛍光画像を撮影した (図 1)。この OsteoSence の蛍光強度は、総 CPP 値を示している¹⁸。このアッセイの変動係数 (CV) は 2.2% であったと報告されている。我々は、全ての検体を自治医科大学に送り、CPP 測定を行

った。また、CPP 測定者は被験者の臨床情報を盲検化された。

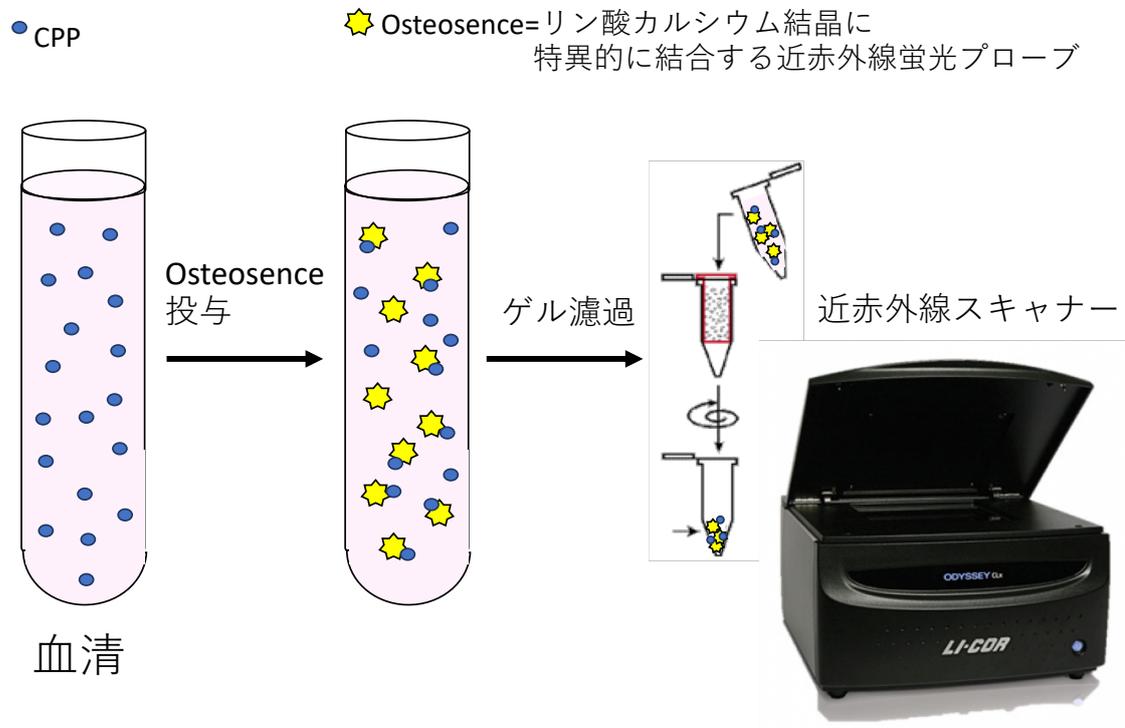


図1. Osteosense とゲル濾過スピнкаラムを用いた CPP 測定方法

血清に 100 mM HEPES と 0.5 mM OsteoSense を含んだ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)を加える。25 °Cで 60 分間インキュベート。混合物 30 μ l をスピнкаラム (排除限界 40 kDa)に乗せ遠心分離。2% SDS と 100 mM EDTA で CPP を溶解し、96 well plate に移して近赤外線蛍光スキャナーで蛍光を定量。

IVUS 検査方法

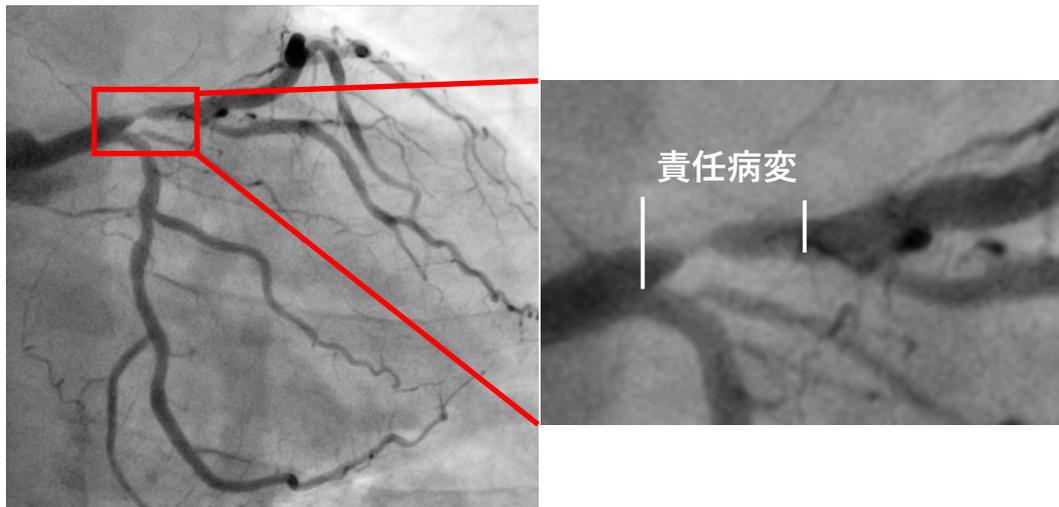
IVUS 画像はバルーン拡張等インターベンション治療前の病変を観察した。冠動脈攣縮予防として、経カテーテル的にニトログリセリン 2 mg を冠動脈内に投与した。5 Fr サイズ 40-MHz の解像度の IVUS カテーテル (ViewIT™; テルモ, 東京)と、VISIWAVE イメージングシステム (テルモ, 東京)を用い、血管内超音波検査を行った。機械的に 0.5 mm/s のスピ

ードで引き抜きながら画像を記録した。記録した部位は、急性冠症候群あるいは安定狭心症の責任病変とした。(図 2-A)

IVUS 解析

プラーク解析は責任病変全長を 0.5 mm の間隔で行った(図 2-B)。プラーク面積は外膜 (EEM; external elastic membrane) 断面面積 (CSA; cross-sectional area) - 内腔断面面積 (lumen CSA) で求めた²⁸。総プラーク体積は各測定画像におけるプラーク面積の合計として計算した²⁹。IB 法は超音波が目的とする構造物に反射する後方散乱波のエネルギーを求める方法である²¹。IB-IVUS では、高速フーリエ変換による演算を用い冠動脈プラークの各組織性状から IB 値が求められた^{21, 30}。それらの値が 2 次元カラーコードマップとして表示され、青色(脂質プラーク)、緑色(線維性プラーク)、黄色(高密度線維性プラーク)、赤色(石灰化プラーク)としてそれぞれ表示される。それぞれのプラーク性状の体積は各測定画像の面積の合計として計算した(図 2-B)。

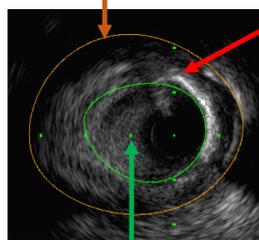
図2
(A)



(B)
IVUS

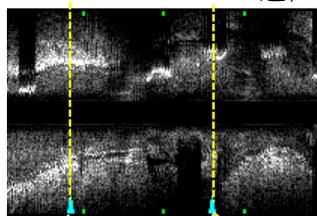
断面積解析

外膜断面積 プラーク面積

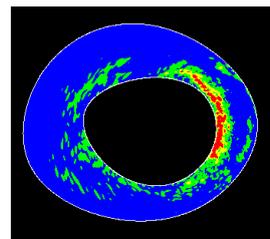


内腔断面積

0.5 mm/s
遠位部 → 近位部



IB-IVUS



脂質

線維性

高密度線維性

石灰化

体積分析

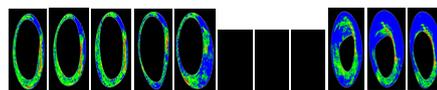
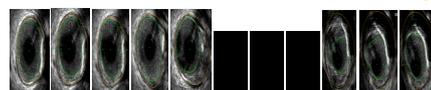


図 2. IVUS と IB-IVUS 解析方法

(A) 冠動脈インターベンション治療の対象となる責任病変。(B) プラーク面積は外膜断面積-内腔面積で求めた。責任病変全長を 0.5 mm の間隔で解析し、各測定断面のプラーク面積を合計し体積を求めた。IB-IVUS 画像にて、青色は脂質プラーク、緑色は線維性プラーク、黄色は高密度線維性プラーク、赤色は石灰化プラークを示す。それぞれのプラーク性状の体積は、各測定画像の面積の合計として求めた。

統計解析

連続変数は平均値±標準偏差で、カテゴリー変数は数(%)で表記した。高感度 C-reactive protein (CRP)や CPP、FGF23 は正規分布を示さないため、解析前に対数変換し、また中央値(四分位)で表記した。2 群間比較については、連続変数は unpaired t 検定を用い、カテゴリー変数は χ^2 乗検定もしくは Fisher の直接確率検定を用いた。CPP レベルの五分位間の冠動脈プラーク成分の差異を検出するために、分散分析を行った。

ピアソンの相関係数は、臨床的特徴と冠動脈プラーク成分との間の相関を調べるために行った。冠動脈プラーク成分の差を有する群を検出するために、共分散分析 (ANCOVA) を行った。このモデルには、ピアソンの相関解析によって有意であった冠動脈プラークと相関する共変量を組み入れ解析した。続いて、共変量として、これまでの古典的な心血管リスクを含む要因 (年齢、性別、BMI, 喫煙の有無、高血圧の有無、糖尿病の有無、LDL コレステロール値、HDL コレステロール値、eGFR) を用いたモデルを用いた (モデル 1)。さらに、モデル 1 の共変量に対数変換後の高感度 CRP 値を加えたもの (モデル 2)、モデル 1 の共変量に対数変換後の FGF23 値を加えたもの (モデル 3)、モデル 1 の共変量に対数変換後の 1,25 ジヒドロキシビタミン D3 値 (モデル 4) を加えたものを用いた。両側検定の結果、 $P < 0.05$ を統計学的有意とした。統計解析には JMP9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC) を用いた。

IV 結果

研究対象者

今回の対象患者の臨床的特徴、血液検査結果、内服薬等を表 1 に示す。年齢は 68 ± 12 歳、76%が男性であった。大部分の患者は冠動脈疾患リスク(脂質異常症 99%、高血圧症 89%、糖尿病 45%、慢性腎不全 41%、心筋梗塞既往 52%)を有していた。CPP の中央値は 40334 arbitrary units (AU)であり、CPP の分布は図 3 に示す。

表 1. 患者背景

	全例 (n=71)
年齢	68±12
男性	54 (76)
体格指数(BMI), kg/m ²	26±4
高血圧症	63 (89)
糖尿病	32 (45)
インスリン使用	8 (11)
脂質異常症	70 (99)
慢性腎不全 ^a	29 (41)
現在喫煙歴	11 (15)
心房細動	8 (11)
心筋梗塞既往	37 (52)
脳梗塞既往	8 (11)
末梢動脈疾患	8 (11)
慢性心不全	9 (13)
eGFR, ml/min/1.73m ²	68.8±19.5
Hb A1c, %	6.5±1.1
LDL-C, mg/dl	101±32
HDL-C, mg/dl	49±12
中性脂肪, mg/dl	141±68
カルシウム, mg/dl	9.1±0.5

リン, mg/dl	3.3±0.6
マグネシウム, mg/dl	2.0±0.2
高感度 CRP, mg/L	1.8 (0.5–4.0)
CPP, AU	40953 (19171–74131)
線維芽細胞増殖因子 23, pg/ml	44.6 (34.0–63.6)
1,25-ジヒドロキシビタミン D3, pg/ml	57.7±33.4
臨床所見	
狭心症	42 (59)
急性冠症候群	29 (41)
内服薬	
レニン・アンジオテンシン系阻害薬	47 (66)
βブロッカー	33 (46)
利尿薬	16 (23)
スタチン	68 (96)

カテゴリー値は数(%)で、連続変数は平均値±標準偏差と中央値(四分位)で表記した。^a 慢性腎不全は eGFR30～60 と定義。eGFR は推定糸球体濾過量を表す。BMI, body mass index; HbA1c, hemoglobin A1c; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; NT-proBNP, N-terminal pro-B-type natriuretic peptide; CRP, C-reactive protein; CPP, calciprotein particle; PTH, parathyroid hormone;

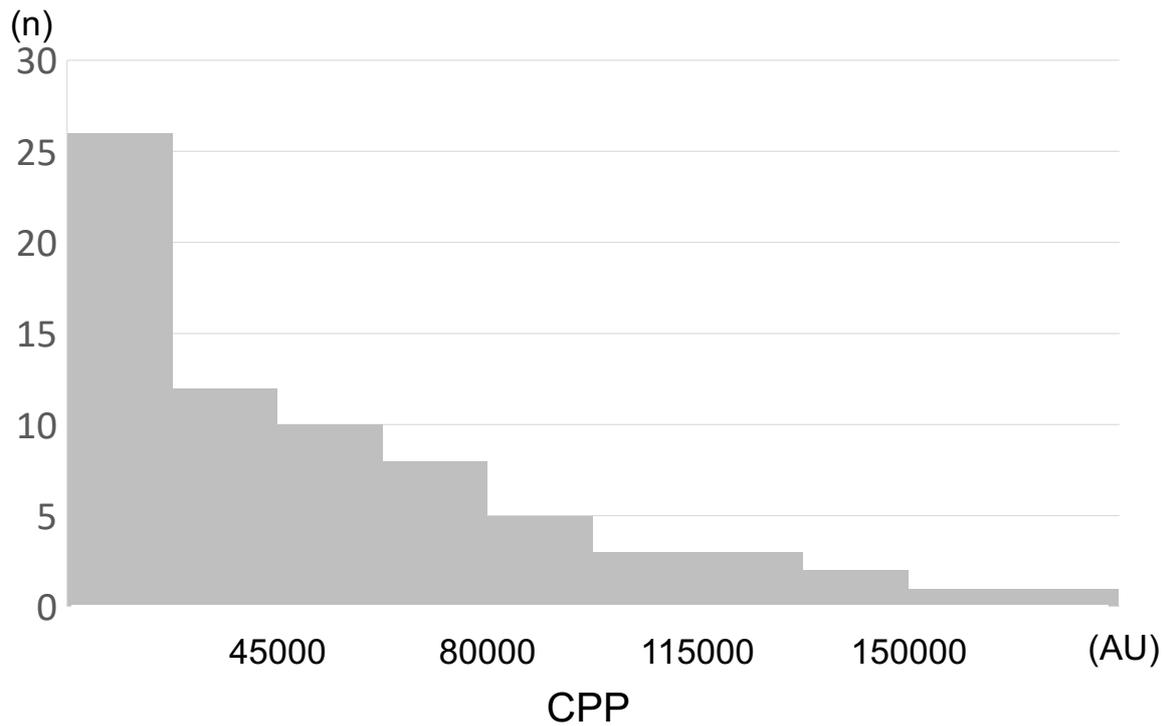


図 3. CPP 分布図

中央値は 40334 arbitrary units (AU) で 25%値は 18721 AU で 75%値は 74584 AU であった。

冠動脈プラーク成分と血清 CPP 値の関連

CPP5 分位と冠動脈プラーク成分との関連を図 4 に示す。総プラーク体積と脂質プラーク体積は Q1 から Q5 にかけて有意に高値を認めた。しかし、線維性プラークと石灰化プラークでは有意な傾向は認めなかった。

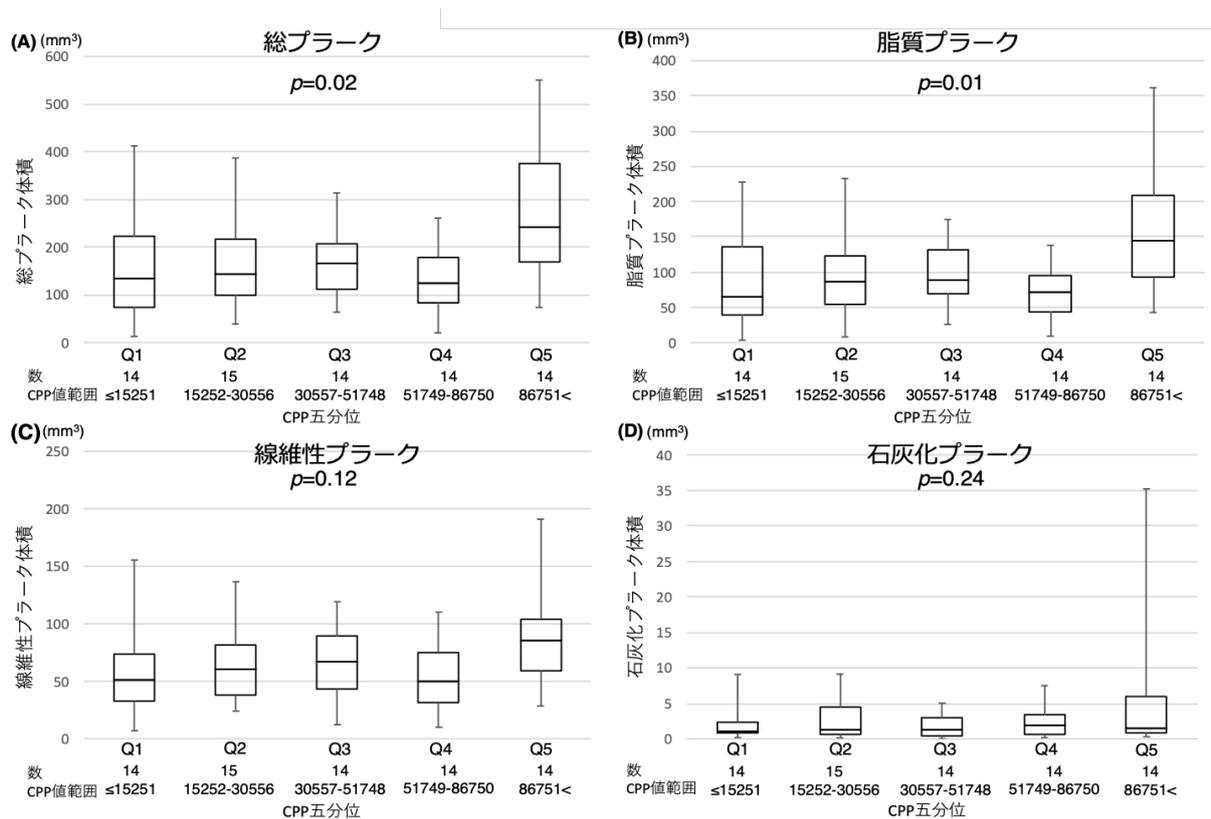


図 4. CPP5 分位と冠動脈プラーク成分との関連

CPP を 5 分位と、各プラーク成分との関連においては、総プラークと脂質プラークにおいてのみ統計学的に Q1 から Q5 にかけて上昇した。

臨床指標と総プラーク体積ならびに脂質プラーク体積との相関関係を表 2 に示

す。

線形回帰分析にて、対数変換した血中 CPP 値が総プラーク体積 ($r=0.24$, $P=0.046$) および脂質プラーク体積 ($r=0.23$, $P=0.049$) と正の相関を認めた。年齢は、総および脂質プラーク体積の両方に負の相関を示した。BMI と eGFR は、総および脂質プラーク体積の両方に正の相関を示した。ANCOVA を用いて、年齢・BMI・eGFR による調整後の CPP 上位五分位

群と他の五分位群とを比較したところ、上位五分位群の総プラーク体積(263 mm³ vs 161 mm³; P=0.001)、脂質プラーク体積(156 mm³ vs 89 mm³; P<0.001)は有意に高値であった(図 5)。

表 2. 臨床指標と総プラーク体積ならびに脂質プラーク体積との相関関係

	総プラーク体積		脂質プラーク体積	
	r	P	r	P
年齢	-0.31	0.01	-0.31	0.009
BMI	0.24	0.04	0.26	0.03
eGFR	0.23	0.055	0.26	0.03
LDL-C	-0.04	0.76	-0.08	0.50
HDL-C	-0.16	0.17	-0.15	0.22
中性脂肪	-0.03	0.83	-0.10	0.41
カルシウム	0.03	0.80	-0.006	0.96
リン	-0.04	0.72	-0.08	0.50
マグネシウム	-0.16	0.20	-0.12	0.34
高感度 CRP	0.10	0.42	0.13	0.29
CPP	0.24	0.045	0.23	0.049
線維芽細胞増殖因子 23	0.11	0.39	0.07	0.62
1,25-ジヒドロキシビタミン D3	-0.02	0.27	-0.04	0.75

略語に関しては表1を参照

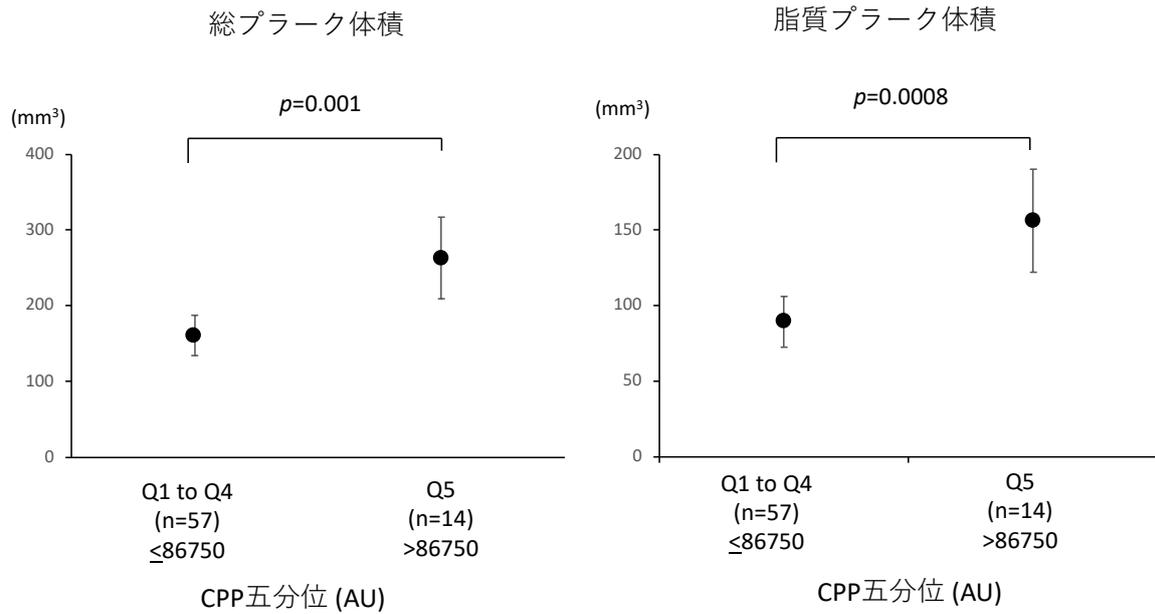


図5. 年齢・BMI・eGFR で調整後の総プラーク体積および脂質プラーク体積と CPP 上位五分位と他の五分位群との比較

上位五分位群は、Q1-Q4 群と比較し総プラーク体積 (263 mm³ vs 161 mm³; P=0.001)、脂質プラーク体積 (156 mm³ vs 89 mm³; P<0.001) は有意に高値であった

上記の年齢・BMI・eGFR に加え、動脈硬化症の一般的なリスク因子、性別・喫煙の有無・高血圧の有無・糖尿病の有無・LDL コレステロール値・HDL コレステロール値を含めたモデルで ANCOVA を用いて多変量解析を行った (表 3, モデル 1)。

表 3. 5 分位した CPP 値と総プラーク体積および脂質プラーク体積との関係

CPP (AU)	総プラーク体積 (mm ³)		P	脂質プラーク体積 (mm ³)		P
	Q1 to Q4	Q5		Q1 to Q4	Q5	
人数	≤86750 n=57	>86750 n=14		≤86750 n=57	>86750 n=14	
モデル 1 (n=71)	160.4±6.9	268.4±19.0	0.003	88.9±4.6	158.1±13.0	0.003
モデル 2 (n=66)	155.5±7.9	268.4±18.2	0.005	86.1±5.2	158.1±12.6	0.006
モデル 3 (n=60)	169.3±8.3	253.8±19.1	0.057	93.9±5.1	143.2±12.2	0.082
モデル 4 (n=71)	160.5±7.0	268.4±19.2	0.003	88.9±4.7	158.1±13.0	0.004

データは、平均値±標準誤差で示す。統計解析は、ANCOVA で行った。

モデル 1 は、年齢・性別・Body mass index・喫煙の有無・高血圧の有無・糖尿病の有無・LDL-コレステロール値・HDL-コレステロール値・eGFR で補正された。

モデル 2 は、モデル 1 の補正項目に加え、対数変換後の高感度 CRP 値を加えた。

モデル 3 は、モデル 1 の補正項目に加え、対数変換後の FGF23 値を加えた。

モデル 4 は、モデル 1 の補正項目に加え、対数変換後の 1,25 ジヒドロキシビタミン D3 値を加えた。

結果、CPP 上位五分位は他の五分位群と比較して、総プラーク体積と脂質プラーク体積が

有意に高値であった。続いて、CPP と総プラークおよび脂質プラークの関係に高感度

CRP、FGF23 および 1,25-ジヒドロキシビタミン D3 が介在するかどうかを検討した。モデル 1

に対数変換後の高感度 CRP 値を加えたが、同様に CPP 上位五分位群は、総プラーク体

積と脂質プラーク体積とも有意に高値のままであった (モデル 2)。モデル 1 に対数変換後

の FGF23 値を加えたところ、総プラーク体積と脂質プラーク体積とも統計学的有意差は消

失し、その関係は傾向にとどまった (モデル 3)。モデル 1 に対数変換後の 1,25-ジヒドロキ

シビタミン D3 値を加えたところ、CPP 上位五分位群は、総プラーク体積と脂質プラーク体積

とも有意に高値のままであった (モデル 4)。

CPP 値と臨床指標の関連

CPP の上位五分位は、他の五分位より現在喫煙ありの割合が多く、慢性心不全の罹患率が高く、高感度 CRP および FGF23 が高値であった。HDL コレステロールおよび 1,25-ジヒドロキシビタミン D3 は、上位五分位群では他の五分位群より低値であった (表 4)。

表 4. CPP 値と臨床指標の関連 CPP 上位五分位群と他の五分位群との比較

	Q1-4 (n=57)	Q5 (n=14)	P
年齢	68±12	67±12	0.68
男性	43 (75)	11 (79)	0.81
体格指数(BMI), kg/m ²	26±4	27±4	0.64
高血圧	51 (89)	12 (86)	0.69
糖尿病	25 (44)	7 (50)	0.68
インスリン使用	7 (12)	1 (7)	0.59
脂質異常症	56 (98)	14 (100)	0.62
慢性腎不全 ^a	24 (42)	5 (36)	0.66
現在喫煙	6 (11)	5 (36)	0.02
心房細動	7 (12)	1 (7)	0.59
心筋梗塞既往	27 (47)	10 (71)	0.11
脳梗塞既往	8 (14)	0 (0)	0.14
末梢動脈疾患	5 (9)	3 (21)	0.18
慢性心不全	4 (7)	5 (36)	0.004
eGFR, ml/min/1.73m ²	65.7±16.6	72.3±25.3	0.32
Hb A1c, %	6.5±1.1	6.6±0.8	0.63
LDL-C, mg/dl	103±31	94±35	0.38
HDL-C, mg/dl	51±12	43±9	0.02
中性脂肪, mg/dl	145±71	125±53	0.33
カルシウム, mg/dl	9.2±0.4	9.0±0.8	0.18

リン, mg/dl	3.3±0.5	3.3±0.8	0.98
マグネシウム, mg/dl	2.0±0.2	2.0±0.3	0.75
高感度 CRP, mg/L	1.2 (0.5–2.9)	3.5 (1.5–8.9)	0.03
CPP, AU	30806 (15312–53164)	116386 (95310–141144)	<0.001
線維芽細胞増殖因子 23, pg/ml	42.9 (32.3–59.3)	57.2 (39.9–98.4)	0.03
1,25-ジヒドロキシビタミン D3, pg/ml	60.7±22.2	45.5±15.0	0.02
臨床所見			
安定狭心症	38 (67)	4 (29)	0.01
急性冠症候群	19 (33)	10 (71)	
内服薬			
レニン・アンジオテンシン系阻害 薬	38 (67)	9 (64)	0.87
βブロッカー	24 (42)	9 (64)	0.14
利尿薬	13 (23)	3 (21)	0.91
スタチン	54 (95)	14 (100)	0.38

カテゴリー値は数(%)で、連続変数は平均値±標準偏差と中央値(四分位)で表記した。^a 慢性腎不全は eGFR 30～60 と定義。略語に関しては表1を参照。

CPPと高感度 CRP の散布図

対数変換した CPP 値と対数変換した高感度 CRP 値との相関関係を図 6 に示す。線形回

帰分析を行ったところ、 $r=0.38$, $P=0.002$ と有意な正の相関を認めた。

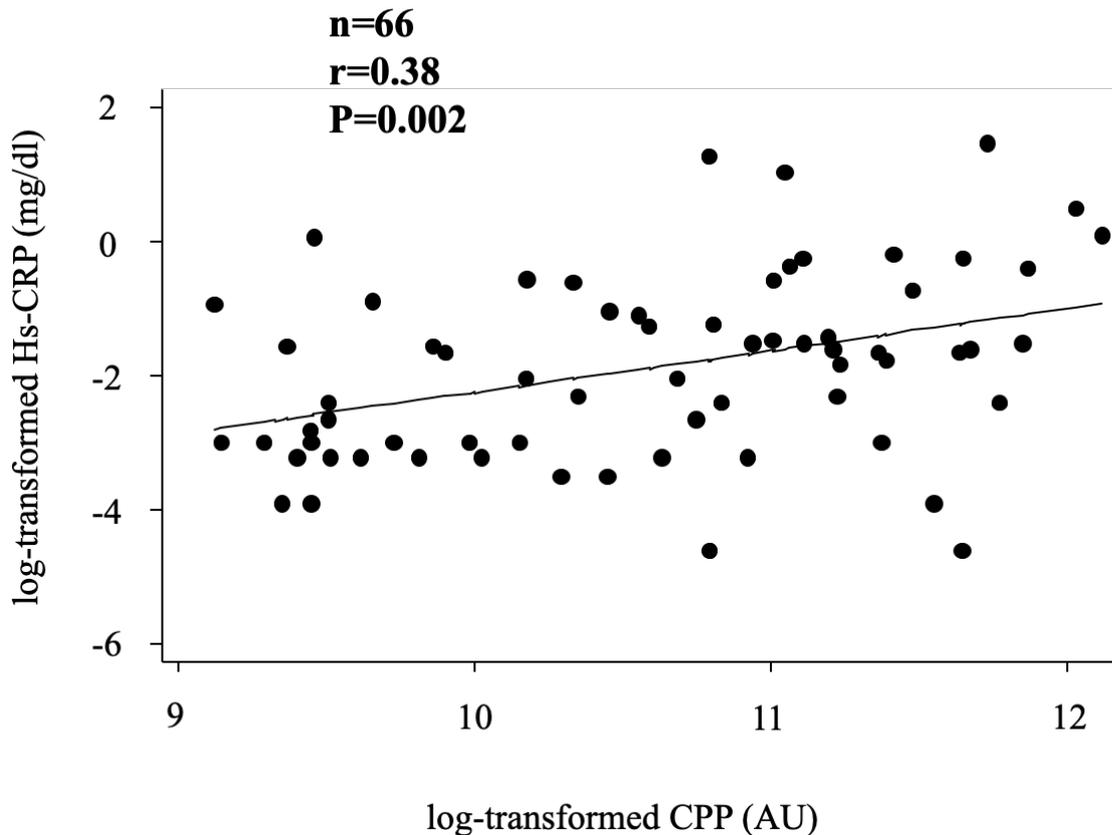


図6. 対数変換した CPP 値と対数変換した高感度 CRP 値との相関関係

66 人で検討を行ったところ、 $r=0.38$, $P=0.002$ と有意な正の相関を認めた。

急性冠症候群と安定狭心症群における血清 CPP 値

急性冠症候群と安定狭心症群の患者特徴に関しては表 5 に示す。

急性冠症候群では、現在喫煙歴 (31% vs. 5%, $P=0.003$) と心筋梗塞既往歴 (79% vs. 33%,

$P<0.001$) が多く、それ以外での有意差は認めなかった。血中 CPP 値は急性冠症候群で有

意に高かった (60,545 [20,430-105,248] AU vs. 31,024 [17,899-61,281] AU, $P=0.02$)。表

6 に急性冠症候群と安定狭心症群での標的冠動脈病変ならびに IVUS 所見の特徴を示

す。急性冠症候群、安定狭心症群とも標的病変は、左前下行枝が半数を超えていた。IVUS

所見結果は、急性冠症候群では総プラーク体積 ($215.1 \pm 123.9 \text{ mm}^3$ vs. $158.9 \pm 100.4 \text{ mm}^3$, $P=0.04$)と脂質プラーク体積 ($128.1 \pm 85.1 \text{ mm}^3$ vs. $85.0 \pm 57.2 \text{ mm}^3$, $P=0.01$)が有意に高値であった。

表 5. 急性冠症候群と安定狭心症患者の患者背景

	安定狭心症 (n=42)	急性冠症候群 (n=29)	P
年齢	69±11	66±13	0.35
男性	31 (74)	23 (79)	0.59
体格指数(BMI), kg/m ²	26±4	26±4	0.88
高血圧	37 (88)	26 (90)	0.84
糖尿病	19 (45)	13 (45)	0.97
インスリン使用	8 (19)	0 (0)	0.01
異質異常症	41 (98)	29 (100)	0.40
慢性腎不全 ^a	19 (45)	10 (34)	0.36
現在喫煙	2 (5)	9 (31)	0.003
心房細動	5 (12)	3 (10)	0.84
心筋梗塞既往	14 (33)	23 (79)	<0.001
脳梗塞既往	5 (12)	3 (10)	0.84
末梢動脈疾患	6 (14)	2 (7)	0.33
慢性腎不全	6 (14)	3 (10)	0.62
eGFR, ml/min/1.73m ²	65.3±16.1	71.4±21.5	0.18
Hb A1c, %	6.6±1.3	6.3±0.7	0.14
LDL-C, mg/dl	98±32	105±31	0.35
HDL-C, mg/dl	52±13	46±11	0.06
中性脂肪, mg/dl	141±73	140±61	0.93
カルシウム, mg/dl	9.2±0.5	9.0±0.6	0.04
リン, mg/dl	3.4±0.5	3.2±0.6	0.08
マグネシウム, mg/dl	2.0±0.2	2.1±0.2	0.21
高感度 CRP, mg/L	1.0 (0.5–3.4)	2.0 (0.7–6.7)	0.10
CPP, AU	31024 (17899–61281)	60545 (20430–105248)	0.02

線維芽細胞増殖因子 23, pg/ml	43.3 (32.5–63.4)	49.8 (35.5–77.3)	0.46
1,25-ジヒドロキシビタミン D3, pg/ml	59.5±21.6	55.1±22.1	0.41
内服薬			
レニン・アンジオテンシン系阻害薬	26 (62)	21 (72)	0.36
β ブロッカー	17 (41)	16 (55)	0.22
利尿薬	11 (26)	5 (17)	0.38
スタチン	40 (95)	28 (97)	0.79

カテゴリー値は数(%)で、連続変数は平均値±標準偏差と中央値(四分位)で表記した。^a 慢性腎不全は eGFR30～60 と定義。略語に関しては表1を参照。

表 6. 安定狭心症・急性冠症候群における標的病変と IVUS 所見

	安定狭心症 (n=42)	急性冠症候群 (n=29)	P
標的病変			
前下行枝	22 (53)	16 (55)	
左回旋枝	6 (14)	3 (10)	0.89
右冠動脈	14 (33)	10 (35)	
病変長 (mm)	26.4±14.1	25.6±11.1	0.80
血管体積 (mm ³)	279.9±156.8	355.9±183.3	0.07
プラーク体積 (mm ³)	158.9±100.4	215.1±123.9	0.04
脂質プラーク体積 (mm ³)	85.0±57.2	128.1±85.1	0.01
線維性プラーク体積 (mm ³)	61.9±37.2	77.2±42.2	0.11
密線維性プラーク体積 (mm ³)	8.0±7.8	7.5±4.9	0.75
石灰化体積 (mm ³)	3.4±5.7	2.4±3.0	0.39

V 考察

本研究では、急性冠症候群あるいは安定狭心症のため冠動脈インターベンション治療を行った CKD ステージ 1-3 あるいは CKD を有さない患者において、新規アッセイによって測定した血中 CPP 値の上昇が、総プラーク体積ならびに脂質プラーク体積の増加と関連していたことを初めて報告した。さらに、CPP 値は安定狭心症患者よりも急性冠症候群の患者においてより高値であった。

これまでの研究にて、血清 CPP 値の臨床的意義を検討しているが、一般的に高度 CKD 患者のみが登録されている。これは、従来の研究では、本研究で使用されている方法とは根本的に異なる CPP 測定手法が使用されていたためである。これまでの fetuin-A を用いた CPP 測定方法は、ヒト fetuin-A ELISA キットを用いて測定した fetuin-A 減少率 (RR) を用いている¹⁵。ヒト fetuin-A キットは 2~5%の変動係数を有するため、RR が変動係数に近づくほど測定誤差が大きくなる¹⁸。さらに、fetuin-A 法やフローサイトメトリー法³¹では、直径 100 nm 以下のより小さな CPP を測定することは出来ない。本研究では、OsteoSence とゲル濾過スピンカラムを用いた新しい方法¹⁸で総 CPP を測定した。この新規 CPP 測定方法は、これまでの CPP よりも小さくかつ軽い、新しい種類の CPP (L-CPP) を測定することができる。三浦らは、新鮮血漿中の CPP はほぼ L-CPP であり、軽度の CKD (CKD ステージ 1-3) または CKD を認めない患者でも CPP を検出することが可能であると報告している¹⁸。我々の研究では、新規アッセイ法で測定した CPP 値が総および脂質プラーク体積と相関を認めるこ

とが示された。しかし、我々の研究は、CPP 値と冠動脈プラークの関連性の基礎となる生物学的メカニズムを評価するものではない。

これまでの文献等から、新規 CPP アッセイ法、血清 CPP 値と冠動脈プラークおよび脂質プラークとの関連について考察する。

新規 CPP アッセイ法と測定方法および採血のタイミングに関して

本研究では、三浦らが開発したゲル濾過法を用いて総 CPP を測定した。この測定方法は、異なる血清サンプルに一定量の合成 CPP を加え、蛍光強度を測定したところ、回帰直線の傾きが一致した事から、CPP を定量化できるものである¹⁸。また、これまでの CPP と比べて軽くて小さい L-CPP と遠心で沈殿する高比重 CPP (H-CPP) の 2 種類の CPP が判明している。実際、H-CPP は従来の fetuin-A 法で測定した CPP 値を表す RR と相関を認めしたが、L-CPP は RR とは相関しなかったと報告している¹⁸。また、腎機能正常の健常者からは H-CPP は殆ど検出されなかった。本研究では総 CPP は測定したが、H-CPP と L-CPP を個別に測定していないため、断定は出来ないが、対象者は、eGFR 30 ml/min/1.73m² 以上の腎機能の保たれた症例であり、総 CPP の大部分は L-CPP であろうと予想できる。

本研究では、血清試料を用いて CPP を測定したが、これはこれまで報告されている CPP 研究の大部分は血清試料を用いているため^{15, 16, 32}、今回も血清試料を用いた。採取された検体は、全て同一の行程を経て、自治医科大学まで運ばれ、凍結解凍の回数も同一であることから、本研究において CPP は同一の条件で測定されたと判断できる。ただし、急性冠症

候群の場合は、冠動脈インターベンション治療後、約 1 週間前後で採取された検体を用いており、インターベンション治療による影響の可能性は否定できない。今回の研究を含めこれまで、インターベンション治療前後での CPP の差異を調査した研究はなく、インターベンション治療が CPP に影響を与えたかどうかは不明である。

CPP が脂質プラークを惹起する可能性

本研究では、図 4 に示す通り、CPP 上位 5 分位群 (Q5 群) において、5 分位以外の群 (Q1~Q4 群) と比較して、総および脂質プラーク体積が有意に高値を示した。三浦らが開発したゲル濾過スピンカラムを用いた新規 CPP 測定方法は、血中 CPP 値とリニアな相関を認め、定量化出来るものであり¹⁸、アッセイ方法が原因で Q5 群のみプラーク体積と関連があったとは考えにくく、一定の閾値を超えた CPP 値がプラーク形成に関わり、病的な意義がある可能性がある。例えば、Shah らが報告した FGF23 と頸動脈プラーク量との関係を検討した研究³³においても、FGF23 上位 5 分位群でのみ、残りの 5 分位群と比較して、頸動脈プラーク量が高値であったという結果であり、本研究と同様にプラーク量に関わるバイオマーカーの中には、一定の閾値をもってプラーク量に関連するものがあると思われる。今回のその閾値は、86750 AU であったが、この値が一般化されるのかどうかは、他の集団での検討が必要である。

表 3 に示すように、従来の動脈硬化のリスク因子 (年齢・性別・BMI・喫煙の有無・高血圧の有無・糖尿病の有無・LDL コレステロール値・HDL コレステロール値・eGFR) で補正を行っ

でも CPP Q5 群が Q1-4 群と比較して、総および脂質プラーク体積が大きかった。CPP は動脈硬化リスク因子と独立して、プラーク特に脂質プラーク形成に関係することが示唆された。プラーク形成の機序は、内皮機能障害、脂質異常症、炎症および免疫学的因子からなると考えられている²⁻⁷。これらの中で、慢性炎症がアテローム性動脈硬化症の成因の基礎となると考えられる³⁻⁵。酸化 LDL (ox-LDL) は、アテローム性動脈硬化症の開始と進行の必要条件であり、マクロファージや内皮細胞、平滑筋細胞によって促進される^{34, 35}。さらに、急性冠症候群を呈する患者の剖検研究では、マクロファージが責任病変内で認められている^{35, 36}。マクロファージは表面に、膜貫通シグナル伝達に関与する Toll-like 受容体 (TLRs) を発現する³⁷。TLRs は、炎症促進性転写因子を活性化し、局所炎症を増大させるサイトカインを産生する。上記事項より、マクロファージはアテローム性動脈硬化症の原因の中心と考えられる。これまでの研究において、血清 CPP は高感度 CRP と酸化 LDL と有意な相関関係を認めるとの報告がある³²。さらに、in-vitro 研究において、リン酸カルシウム結晶はマクロファージを刺激し自然免疫反応を誘導し、TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカインの産生・分泌を促す活性を認めている³⁸。本研究で用いたゲル濾過法では、リン酸カルシウム結晶に特異的に結合する Osteosence を用いて蛍光強度を測定した。そのため、CPP として測定される物質にはリン酸カルシウム結晶を含んでおり、マクロファージを刺激し、脂質プラーク形成を促進する可能性が考えられる。しかしながら、本研究において、慢性炎症を示すバイオマーカーとして、高感度 CRP 値を測定したが、高感度 CRP 値と血清 CPP 値は有意な相関を認めたものの、CPP と脂質プラークの関係に高感度 CRP 値は介在因子とはならな

かった (表 3、モデル 2)。その理由としては、動脈硬化に関わる炎症の要因は、様々であることがあげられる³⁻⁵。また、他の炎症を示すバイオマーカーにおいても本関連については、さらなる検討が必要である。

CPP と FGF23 および 1,25-ジヒドロキシビタミン D3 との関係

本研究において、CPP と総プラーク及び脂質プラークとの関連を示すモデルに、FGF23 値を加えたところ、CPP 上位 5 分位群の総プラーク体積と脂質プラーク体積の統計的に有意な上昇の関連は消失した (表 3、モデル 3)。このことは、CPP と総プラークおよび脂質プラーク形成の関係が、FGF23 を介在している可能性を示唆する。

FGF23 は、骨で生成されるリン調節ホルモンである^{39,40}。リン負荷等により、FGF23 が分泌され、リン排泄を高め、リンを一定に保つ働きをする。近年、高リン血症と心血管イベントとの関連が注目されており、血清 FGF23 に関する臨床データが数多く報告されているが、CPP の関与はほとんど検討されていない。

血清 FGF23 が冠動脈病変の重症度に寄与する¹³という報告や、FGF23 が頸動脈プラークの存在と頸動脈プラーク面積に寄与する³³という報告がある。また、FGF23 ノックアウトマウスが、脂質異常に加え副甲状腺ホルモン、ビタミンD、およびカルシウム代謝の調節障害をきたし、心血管石灰化をきたすことから、FGF23 が、体脂肪量や脂質代謝異常を起こす可能性があることが報告されている^{39,41}。CPP は、血清リンが上昇するようなリン過剰摂取や腎機能低下時のリン排泄が低下したときに、リン酸カルシウム結晶の集合体として生成され、こ

の CPP を過剰に生成しないようにするため、FGF23 が骨より分泌される可能性がある。実際、これまでの研究においても、新規アッセイによって測定された CPP 値が FGF23 値と正の相関があると報告されている¹⁸。これまでの FGF23 の心血管リスク及びイベントに関わる臨床データは、CPP が大きく関わっている可能性がある。

これまでの研究において、疫学研究では、1,25-ジヒドロキシビタミン D3 低下が心血管疾患の発症に関連することが報告されている⁴²。また、1,25-ジヒドロキシビタミン D3 濃度の低下が血管平滑筋細胞の増殖および石灰化に影響を及ぼすことが示唆されている⁴³。1,25-ジヒドロキシビタミン D3 の低下が、動脈硬化の促進、心血管イベント上昇に関連する理由としては、in-vitro 研究および動物実験では、1,25-ジヒドロキシビタミン D3 欠乏症がアテローム性動脈硬化症の炎症および免疫プロセスを活性化することが明らかとなっている。今回の結果では、CPP の上昇が、1,25-ジヒドロキシビタミン D3 の低下と関連していた。CPP は FGF23 増加を促し、FGF23 が腎臓でのビタミン D から 1,25-ジヒドロキシビタミン D3 への活性化を阻害する可能性がある。1,25-ジヒドロキシビタミン D3 は、泡沫細胞形成を阻害する作用をもっているため⁴⁴、これが低下することになって、泡沫細胞が活性化し、冠動脈プラーク形成にも関連することを予想したが、1,25-ジヒドロキシビタミン D3 は、CPP と冠動脈プラークの関連の介在要因とはならなかった（表 3、モデル 4）。上述したように、観察研究では、1,25-ジヒドロキシビタミン D3 高値と、プラークの安定化との関連を認めているが、1,25-ジヒドロキシビタミン D3 を投与した多くのランダム化比較試験では、プラーク安定化作用は認めなかったことが報告されている⁴⁵。1,25-ジヒドロキシビタミン D3 と心血管リスクの関連は

あるものの、他のリスクと比較すると、その関与は低い可能性がある。

CPPと冠動脈石灰化プラークとの関係

これまでの研究で、fetuin-A法によって測定されたCPP値は冠動脈CTでの冠動脈石灰化スコアと関連すると報告されている³²。しかし、我々の研究では、ゲル濾過スピンカラムを用いて測定した総CPP値とIB-IVUSで計測した石灰化プラーク体積との間に有意な相関関係を認めなかった。これは、本研究で測定した総CPPはこれまでのFetuin-A減少率(RR)では測定出来ないL-CPPを含んでいるためと考えられる。三浦らによると、H-CPPはRRと相関するが、L-CPPはRRとは相関しなかったと報告している¹⁸。すなわち、従来のCPPはH-CPPに該当するものの、L-CPPはH-CPPとは異なる、石灰化形成に関与しない、新しいコロイド粒子の可能性が考えられる。本研究では、H-CPPとL-CPPを個別に測定していないため、これ以上の言及はできないが、対象者は、eGFR 30 ml/min/1.73m²以上の腎機能の保たれた症例であり、大部分はL-CPPであった可能性がある。そのため、石灰化プラーク体積と相関を認めなかったのかもしれない。

CPPと急性冠症候群との関係

急性冠症候群において、CPP値は安定狭心症群に比べ、有意に高値であった。驚くべき事ではないが、急性冠症候群では総プラーク体積と脂質プラーク体積は有意に大きかった。これまでの報告では、大量の脂質プラークとまだらな石灰化プラークが合わさって、脆弱

プラークとなり、急性冠症候群を引き起こすと報告されている⁷。これらの知見より、CPP 値が高い程、より多くのプラークならびに脂質プラークをもたらし、急性冠症候群を引き起こす可能性があると考える。

本研究の限界

本研究は、いくつかの限界を有している。第一に、単一施設における比較的少数の患者が登録されている点である。しかし、患者群には急性冠症候群患者が含まれており、CPP の急性期反応の検討に有用であったと考える。第二に、通常の IVUS および IB-IVUS によってプラーク内のマクロファージを検出することは困難であり、責任病変のプラークにおけるマクロファージと血中 CPP との関係を直接検討する事はできなかった。しかし、最近の研究では光干渉断層法 (OCT) はプラーク内のマクロファージを同定できると報告されている^{46, 47}。今後、OCT を用いてプラークを解析することで、血中 CPP 値とプラーク内のマクロファージとの関係を直接調べる事ができる可能性がある。第三に、本研究は横断研究であり、一時点での関連を述べただけの可能性はある。CPP が冠動脈プラーク形成との関係を完全に解明するためには、症例数を増やして本研究の結果を検証することや、CPP を低下させることで、冠動脈プラーク体積が減少するかどうかをみる介入研究が必要となると考える。

VI 結論

我々は、ゲル濾過スピンカラムを用いた新規アッセイによって測定された CPP 値が高い集団においては、IVUS および IB-IVUS によって計測された総プラーク体積ならびに脂質プラーク体積が高値であることを見出した。この関連は、FGF23 を介在する可能性が示唆された。

VII 今後の展望

本研究より L-CPP を含む総 CPP は、総プラーク体積および脂質プラーク体積と関連があることが判明した。特に、脂質プラーク体積の増加と有意に関連がある事から、CPP がマクロファージを活性化し、炎症を惹起し、アテローム性動脈硬化の原因の一つである可能性が考えられる。今後、光干渉断層法 (OCT) を用いて、冠動脈プラーク内のマクロファージと CPP との関連を調べる事で、生体内においても CPP がマクロファージを活性化し、プラーク形成を促すことが明らかになると期待出来る。また、CPP が形成される原因は、血中リン過剰であることから、リン制限食や食品添加物であるリン酸塩を多く含む食事を控えること、あるいはカルシウムを含まない高リン血症治療薬 (炭酸ランタンやセベラマー塩酸塩など) を用い、CPP を低下させることで、プラークの退縮や脂質プラークの減少といった、動脈硬化抑制作用を認めるか介入研究を行うことが、今後の研究課題と考える。

VIII 引用文献

1. Stary HC. Natural History and Histological Classification of Atherosclerotic Lesions : An Update. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 20:1177-1178, 2000
2. Kitta Y, Obata JE, Nakamura T, Hirano M, Kodama Y, Fujioka D, Saito Y, Kawabata K, Sano K, Kobayashi T, Yano T, Nakamura K and Kugiyama K. Persistent impairment of endothelial vasomotor function has a negative impact on outcome in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 53:323-330, 2009
3. Paoletti R, Gotto AM, Jr. and Hajjar DP. Inflammation in atherosclerosis and implications for therapy. *Circulation*. 109:III20-26, 2004
4. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 352:1685-1695, 2005
5. Libby P, Ridker PM, Hansson GK and Leducq Transatlantic Network on A. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol*. 54:2129-2138, 2009
6. Weber C and Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*. 17:1410-1422, 2011
7. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R and Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res*. 114:1852-1866, 2014
8. Taniguchi M, Fukagawa M, Fujii N, Hamano T, Shoji T, Yokoyama K, Nakai S,

Shigematsu T, Iseki K and Tsubakihara Y, Committee of Renal Data Registry of the Japanese Society for Dialysis Therapy. Serum phosphate and calcium should be primarily and consistently controlled in prevalent hemodialysis patients. *Therapeutic Apheresis and Dialysis*. 17: 221-228, 2013

9. Tonelli M, Sacks F, Pfeffer M, Gao Z, Curhan G, for the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Trial Investigators. Relation between serum phosphate level and cardiovascular event rate in people with coronary disease. *Circulation*. 112: 2627-2633, 2005

10. Dhingra R, Sullivan LM, Fox CS, Wang TJ, D'Agostino RB, Gaziano M and Vasan RS. Relations of serum phosphorus and calcium levels to the incidence of cardiovascular disease in the community. *Arch Intern Med*. 167: 879-885, 2007

11. Ellam TJ and Chico TJA. Phosphate: The new cholesterol? The role of the phosphate axis in non-uremic vascular disease. *Atherosclerosis*. 220: 310-318, 2012

12. Kanbay M, Nicoleta M, Selcoki Y, Ikizek M, Aydin M, Eryonucu B, Duranay M, Akcay A, Armutcu F and Covic A. Fibroblast growth factor 23 and fetuin A are independent predictors for the coronary artery disease extent in mild chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 5: 1780-1786, 2010

13. Heiss A, DuChesne A, Denecke B, Grotzinger J, Yamamoto K, Renne T and Jahn-Dechent W. Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles. *J Biol Chem*. 278:13333-13341, 2003

14. Kuro-o M. Calciprotein particle (CPP): a true culprit of phosphorus woes? *Nefrologia*. 34:1-4, 2014
15. Hamano T, Matsui I, Mikami S, Tomida K, Fujii N, Imai E, Rakugi H and Isaka Y. Fetuin-mineral complex reflects extraosseous calcification stress in CKD. *J Am Soc Nephrol*. 21:1998-2007, 2010
16. Smith ER, Ford ML, Tomlinson LA, Bodenham E, McMahon LP, Farese S, Rajkumar C, Holt SG and Pasch A. Serum calcification propensity predicts all-cause mortality in predialysis CKD. *J Am Soc Nephrol*. 25:339-348, 2014
17. Kuro-o M. A phosphate-centric paradigm for pathophysiology and therapy of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl (2011)*. 3:420-426, 2013
18. Miura Y, Iwazu Y, Shiizaki K, Akimoto T, Kotani K, Kurabayashi M, Kurosu H and Kuro OM. Identification and quantification of plasma calciprotein particles with distinct physical properties in patients with chronic kidney disease. *Sci Rep*. 8:1256-1271, 2018
19. Yock PG, Fitzgerald PJ, Linker DT and Angelsen BAJ. Intravascular Ultrasound Guidance for Catheter-Based Coronary Interventions. *J Am Coll Cardiol*. 17: 39B-45B, 1991
20. Mintz GS, Nissen SE, Anderson WD, Bailey SR, Erbel R, Fitzgerald PJ, Pinto FJ, Rosenfield K, Siegel RJ, Tuacu EM and Yock PG. American College of Cardiology Clinical Expert Consensus Document on Standards for Acquisition, Measurement and Reporting of Intravascular Ultrasound Studies (IVUS). *Eur J Echocardiography*. 2: 299-313, 2001

21. Kawasaki M, Takatsu H, Noda T, Sano K, Ito Y, Hayakawa K, Tsuchiya K, Arai M, Nishigaki K, Takemura G, Minatoguchi S, Fujiwara T and Fujiwara H. In Vivo Quantitative Tissue Characterization of Human Coronary Arterial Plaques by Use of Integrated Backscatter Intravascular Ultrasound and Comparison With Angioscopic Findings. *Circulation*. 105:2487-2492, 2002
22. Okubo M, Kawasaki M, Ishihara Y, Takeyama U, Kubota T, Yamaki T, Ojio S, Nishigaki K, Takemura G, Saio M, Takami T, Minatoguchi S and Fujiwara H. Development of integrated backscatter intravascular ultrasound for tissue characterization of coronary plaques. *Ultrasound Med Biol*. 34:655-663, 2008
23. Garcia-Garcia HM, Gogas BD, Serruys PW and Bruining N. IVUS-based imaging modalities for tissue characterization: similarities and differences. *Int J Cardiovasc Imaging*. 27:215-224, 2011
24. O'Gara PT, Kushner FG, Ascheim DD, Casey DE, Jr., Chung MK, de Lemos JA, Ettinger SM, Fang JC, Fesmire FM, Franklin BA, Granger CB, Krumholz HM, Linderbaum JA, Morrow DA, Newby LK, Ornato JP, Ou N, Radford MJ, Tamis-Holland JE, Tommaso CL, Tracy CM, Woo YJ, Zhao DX, Anderson JL, Jacobs AK, Halperin JL, Albert NM, Brindis RG, Creager MA, DeMets D, Guyton RA, Hochman JS, Kovacs RJ, Kushner FG, Ohman EM, Stevenson WG, Yancy CW and American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice G. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-

elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 127:e362-425, 2013

25. Fihn SD, Blankenship JC, Alexander KP, Bittl JA, Byrne JG, Fletcher BJ, Fonarow GC, Lange RA, Levine GN, Maddox TM, Naidu SS, Ohman EM and Smith PK. 2014 ACC/AHA/AATS/PCNA/SCAI/STS focused update of the guideline for the diagnosis and management of patients with stable ischemic heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, and the American Association for Thoracic Surgery, Preventive Cardiovascular Nurses Association, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons. *J Am Coll Cardiol*. 64:1929-1949, 2014

26. Amsterdam EA, Wenger NK, Brindis RG, Casey DE, Jr., Ganiats TG, Holmes DR, Jr., Jaffe AS, Jneid H, Kelly RF, Kontos MC, Levine GN, Liebson PR, Mukherjee D, Peterson ED, Sabatine MS, Smalling RW, Zieman SJ and Members AATF. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 130:e344-426, 2014

27. Matsuo S, Imai E, Horio M, Yasuda Y, Tomita K, Nitta K, Yamagata K, Tomino Y, Yokoyama H and Hishida A. Revised Equations for Estimated GFR From Serum Creatinine in

Japan. *American Journal of Kidney Diseases*. 53:982-992, 2009

28. Mehran R, Mintz GS, Lansky AJ, Pichard AD, Satler LF, Kent KM and Stone GW.

Atherosclerotic Plaque Burden and CK-MB Enzyme Elevation After Coronary Interventions
Intravascular Ultrasound Study of 2256 Patients. *Circulation*. 101:604-610, 2000

29. Nicholls SJ, Hsu A, Wolski K, Hu B, Bayturan O, Lavoie A, Uno K, Tuzcu EM and

Nissen SE. Intravascular ultrasound-derived measures of coronary atherosclerotic plaque
burden and clinical outcome. *J Am Coll Cardiol*. 55:2399-2407, 2010

30. Ohota M, Kawasaki M, Ismail TF, Hattori K, Serruys PW and Ozaki Y. A Histological

and Clinical Comparison of New and Conventional Integrated Backscatter Intravascular
Ultrasound (IB-IVUS). *Circulation Journal*. 76:1678-1686, 2012

31. Smith ER, Hewitson TD, Cai MMX, Aghagolzadeh P, Bachtler M, Pasch A and Holt

SG. A novel fluorescent probe-based flow cytometric assay for mineral-containing
nanoparticles in serum. *Sci Rep*. 7:5686-5702, 2017

32. Smith ER, Ford ML, Tomlinson LA, Rajkumar C, McMahon LP and Holt SG.

Phosphorylated fetuin-A-containing calciprotein particles are associated with aortic stiffness
and a procalcific milieu in patients with pre-dialysis CKD. *Nephrol Dial Transplant*. 27:1957-
1966, 2012

33. Shah NH, Dong C, Elkind MS, Sacco RL, Mendez AJ, Hudson BI, Silverberg S, Wolf

M, Rundek T and Wright CB. Fibroblast growth factor 23 is associated with carotid plaque

presence and area: The Northern Manhattan Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 35:2048-2053, 2015

34. Libby P, Tabas I, Fredman G and Fisher EA. Inflammation and its resolution as determinants of acute coronary syndromes. *Circ Res.* 114:1867-1879, 2014

35. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD and Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 92:1355-1374, 1995

36. Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V and Fallon JT. Macrophage Infiltration in Acute Coronary Syndromes Implications for Plaque Rupture. *Circulation.* 90:775-778, 1994

37. Pearson AM. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 8:20-8, 1996

38. Smith ER, Hanssen E, McMahon LP and Holt SG. Fetuin-A-containing calciprotein particles reduce mineral stress in the macrophage. *PLoS One.* 8:e60904, 2013

39. Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Tomizuka K, Yamashita T. Targeted ablation of FGF23 demonstrates an essential

physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest.* 113:561–568, 2004

40. Bowe AE, Finnegan R, Jan de Beur SM, Cho J, Levine MA, Kumar R, Schiavi SC. FGF-23 inhibits renal tubular phosphate transport and is a PHEX substrate. *Biochem Biophys Res Commun.* 284:977–981, 2001

41. Mirza MA, Alsiö J, Hammarstedt A, Erben RG, Michaëlsson K, Tivesten A, Marsell R, Orwoll E, Karlsson MK, Ljunggren O, Mellström D, Lind L, Ohlsson C, Larsson TE. Circulating fibroblast growth factor-23 is associated with fat mass and dyslipidemia in two independent cohorts of elderly individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31:219–227, 2011

42. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, Benjamin EJ, D'Agostino RB, Wolf M and Vasan RS. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation.* 117:503-511, 2008

43. Kassi E, Adamopoulos C, Basdra EK and Papavassiliou AG. Role of vitamin D in atherosclerosis. *Circulation.* 128:2517-2531, 2013

44. Muscogiuri G, Annweiler C, Duval G, Karras S, Tirabassi G, Salvio G, Balercia G, Kimball S, Kotsa K, Mascitelli L, Bhattoa HP and Colao A. Vitamin D and cardiovascular disease: From atherosclerosis to myocardial infarction and stroke. *Int J Cardiol.* 230:577-584, 2017

45. Dimitrios Challoumas. Vitamin D supplementation and lipid profile: What does the best available evidence show? *Atherosclerosis*. 235;130-139, 2014
46. Tearney GJ. Quantification of Macrophage Content in Atherosclerotic Plaques by Optical Coherence Tomography. *Circulation*. 107:113-119, 2002
47. Phipps JE, Vela D, Hoyt T, Halaney DL, Mancuso JJ, Buja LM, Asmis R, Milner TE and Feldman MD. Macrophages and intravascular OCT bright spots: a quantitative study. *JACC Cardiovasc Imaging*. 8:63-72, 2015

IX 謝辞

本研究を行うにあたり終始ご指導頂きました自治医科大学内科学講座循環器内科部門 星出聡教授、荻尾七臣教授、自治医科大学抗加齢医学研究部 黒尾誠教授に厚くお礼申し上げます。

また、CPP、FGF23 測定を行って頂いた、自治医科大学抗加齢医学研究部 三浦裕先生に厚くお礼申し上げます。

本研究の対象者登録にご協力頂いた、沖縄県立中部病院 循環器内科 屋宜宣仁先生、宮城唯良先生、高橋孝典先生、和氣稔先生、沖縄県立中部病院 内科部長 平田一仁先生に厚くお礼申し上げます。