

氏名	仲里 淳
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 568 号
学位授与年月日	平成 31 年 3 月 20 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	冠動脈プラークと血中 CPP 値の関連に関する横断研究
論文審査委員	(委員長) 教授 藤田 英雄 (委員) 教授 亀崎 豊実 教授 小谷 和彦

論文内容の要旨

1 研究目的

冠動脈疾患は世界中でも高い死因の一つである。冠動脈疾患の原因の多くは、冠動脈プラークに起因する。冠動脈プラーク形成には、内皮障害、脂質異常症、炎症、免疫反応などが関わっている。血清リン濃度と動脈硬化との関連を示唆する報告やリン利尿ホルモンである線維芽細胞増殖因子 23 (FGF23) が冠動脈の重症度に寄与する報告もあることから、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。哺乳類では、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する。リン酸カルシウムが骨以外で析出すると、異所性石灰化が起こるため、リン酸カルシウムを析出しない仕組みが必要である。生体内では、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) と呼ばれている。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とも考えられており、CPP が血管内膜で炎症を惹起し、冠動脈プラーク形成に関わっている可能性も考えられる。本研究の目的は、黒尾らが開発した新規アッセイを用いて測定した血中 CPP 値と Integrated backscatter (IB) 血管内超音波 (IVUS) を用いて評価した冠動脈プラークとの関連を検討する事である。

2 研究方法

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て冠動脈インターベンション治療を行った症例を対象とし、書面にて同意を得、選択基準を満たした総数 71 症例を研究対象とした。CPP 測定のための採血は、安定狭心症では冠動脈インターベンション前に、急性冠症候群では病態が安定した、冠動脈インターベンション約 1 週間後にそれぞれ採血を行った。採血後 60 分以内に遠心分離をかけ、血清成分を取りだし、冷蔵にて自治医大へ輸送された後、CPP を測定するまで -80°C で凍結保存した。CPP は、OsteoSence とゲル濾過スピンカラムを使用した、新規アッセイ法を用いて測定した。IVUS はテルモ社の ViewIT カテと VISIWAVE イメージングシステムを用いて画像を記録した。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。解析は、オフライン装置を用いて行い、病変の総プラーク体積、脂質プラーク体積、線維性プラーク体積、石灰化プラーク体積をそれぞれ算出した。

統計解析は、連続変数は平均値 \pm 標準偏差で、カテゴリ変数は数 (%) で表記した。また、正

規分布を示さない変数は、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。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。共変量として、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 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。

3 研究成果

対象患者の年齢は 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を有した。総プラーク体積および脂質プラーク体積は、CPP 五分位が増加するにつれ、有意に高くなったが、線維性プラークと石灰化プラークでは相関関係は認めなかった。多変量解析の結果、モデル 1 では上位五分位群において、総プラーク体積、脂質プラーク体積とも有意に高値であった。モデル 2 では、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。一方、モデル 3 では、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 4 では、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。

4 考察

従来の CPP 測定法 (fetuin-A 法) は、ヒト fetuin-A ELISA キットを用いて測定した fetuin-A 減少率を用いている。このヒト fetuin-A キットは 2~5% の変動係数を有するため、減少率が変動係数に近づくほど測定誤差が大きくなる。さらに、fetuin-A 法やフローサイトメトリー法では、直径 100 nm 以下のより小さな CPP を測定する事は出来ない。我々の研究で使用した新規アッセイ法では、小さく軽い新しい種類の CPP (L-CPP) を測定することが出来る。本研究では L-CPP を含む総 CPP 値が総プラーク体積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。CPP が冠動脈プラークとの関連を認める原因としては、慢性炎症と関連があると考えられる。酸化 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。これまで、血中 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。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た。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 を用いており、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。

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ことから、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。血清 FGF23 が冠動脈病変の重症度に寄与することや FGF23 が頸動脈のプラーク面積に寄与する事、

FGF23 が体脂肪量や脂質代謝異常を起こす可能性が報告されている。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。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。

5 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。

論文審査の結果の要旨

本研究は、新規のアッセイ系で測定した血清 Calciprotein particle (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急性冠症候群患者ならびに安定狭心症患者を対象として検討した横断研究である。冠動脈インターベンション治療を施行した合計 74 症例（急性冠症候群 29 症例、安定狭心症 42 症例）を対象として血清を採取し、Osteosense とゲル濾過スピンカラムを用いる新規の方法で CPP を測定した。本法はすでに論文化され、従来法よりも定量性に優れていることが示されている。同法を用いた測定により 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。2019 年 2 月 5 日に行われた論文審査会では、CPP 測定手法の信頼性や、多変量解析の統計手法に問題が指摘されたが、その後質疑に忠実に応える形で統計分析が再び行われ 2 月 19 日に改訂版が再提出された。改訂版では主論の信頼性を高めたのみならず更に CPP とプラーク体積の関連には FGF23 が介在する可能性をも示し、血清リン代謝と冠動脈の動脈硬化との病因論的関連に新たな仮説をも付加する結果となり、本論文の学術的な質が向上し合格水準に達したことを査読の上委員が全員一致で認めた。信頼性をもった新規性の高い結論、また独創的な学説であり、臨床医学への貢献度も高い。さらに地域医療において日常診療と両立するかたちで冠動脈の IVUS, IB-IVUS という検査法を丁寧に多くの症例に施行した結果得られた学術的成果という点で地域医療における臨床研究の 1 モデルとしても評価されるべきである。

以上より、本論文を合格と判定する。

最終試験の結果の要旨

本研究は、新規のアッセイ系で測定した血清 Calciprotein particle (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急性冠症候群患者ならびに安定狭心症患者を対象として検討した横断研究である。審査委員の質疑に対して適切に改訂された結果、更に学術的な質が向上し合格水準に達したことを査読の上委員が全員一致で認める結果となった。

以上より、仲里氏の大学院修了試験については、合格と判定する。