

質量分析技術を用いた冠動脈狭窄症の血液検査法開発とその臨床研究

東京大学大学院医学系研究科 循環器内科

特任助教 相澤 健一

(共同研究者)

東京大学大学院医学系研究科 ユビキタス予防医学講座 特任准教授 鈴木 亨

はじめに

虚血性心疾患の治療として年間25万件以上実施されている心臓カテーテル治療ではその後の約1割の症例において、施術後半年以内に再狭窄が生じることが、今なおその治療上の限界である。再狭窄を予知する方法がないため、治療半年後に再度心臓カテーテル検査を実施し再狭窄の有無を評価する必要があるが、安全性また医療費の面からも血液検査等の代替法の開発は急務であった。B型ナトリウム利尿ペプチド (BNP) は負荷のかかった心臓から分泌されるホルモンであり、心不全のバイオマーカーとして広く臨床で用いられている。しかし、虚血性心疾患における診断における有用性は未知数である。最近、末梢血中にはプロセッシングを受けたBNPが存在することが報告されてきている (Fig. 1)。そこで我々はこのプロセッシングを受けたBNPが心臓カテーテル治療後の再狭窄を診断するのに有用である仮説を立て、その検証を行った。

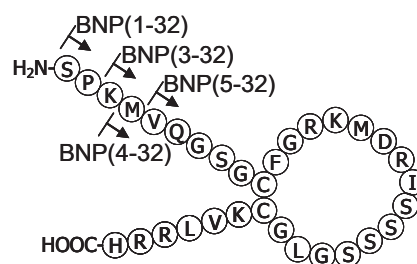


Fig.1 BNPの分子構造とN末端プロセッシング

本研究では我々が開発した質量分析技術を用いた開発中の次世代型新規心疾患バイオマーカーの開発を目的とし、その臨床的有用性を検討した。具体的には、血液中の血管特異的タンパク質BNPならびにその産物 (複数のプロセッシング産物が存在する) を特異抗体で選択的に濃縮し、質量分析計で特定のプロセッシング産物を検出する方法 (イムノマス法) を用いて、虚血性

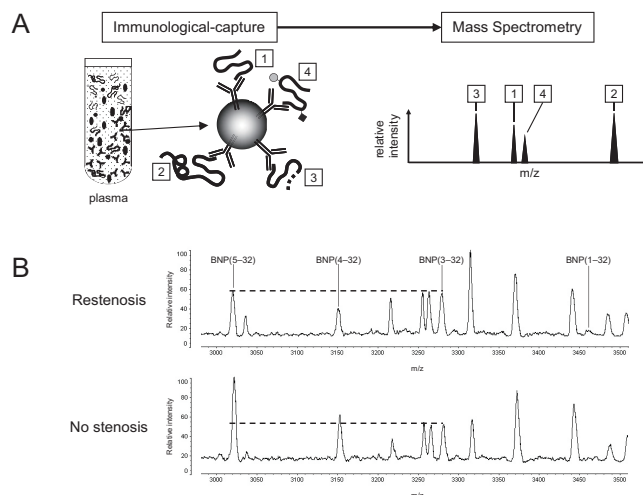


Fig.2 質量分析をもとにした免疫学的アッセイ法の概念図

心疾患等の心血管疾患の早期診断のためのバイオツールの開発を目指す。診断バイオマーカーとしての有用性に関する予備検討は実施済みである。質量分析計を用いた血管特異的タンパク質のプロセッシング産物を測定する系はすでに開発済みであり、特許も出願済みである (PCT/JP2008/65444、血液試料を用いて心筋虚血を評価する方法)。具体的には、特異抗体を用いて血液中の血管特異的タンパク質BNPならびにそのプロセッシング産物を濃縮し、質量分析計で特定のプロセッシング産物を検出する方法 (イムノマス法) である (Fig. 2A)。本方法により臨床検体 (血液) を分析した結果、本来の分子形態である32アミノ酸からなるBNP以外に、それとは異なる3種類のBNP (N末端のアミノ酸が2、3、4個プロセスされた分子形態) を検出した (Fig. 2B)。その異なった分子形態のBNPが冠動脈狭窄、特に心臓カテーテル治療後の再狭窄診断の新しいバイオマーカーとしての有用性を検討する。

本研究は東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会の承認を得て実施した。東京大学医学部附属病院入院患者の心臓カテーテル検査を行う予定の患者全員に対し、医師が本研究について説明した。なお、このうち同意の得られた連続105名の患者から心臓カテーテル検査時に、血液採取した。採血後の採血管はすみやかに氷上、もしくは4度にて保存した。採血後6時間以内に血漿分離を行い、分析を行うまでマイナス80度にて保存した。その血液 (血漿) から磁気ビーズとBNP抗体によりBNPを分離濃縮し、溶出後、質量分析を行った。磁気ビーズから溶出した全量を質量分析用ターゲットプレートに滴下した。風乾後、すみやかにMALDI-TOF型質量分析計 (AXIMA-Confidence, 島津製作所) を用いて分析を行った。また、全症例について患者情報のデータマイニングを行い、カテーテル検査による冠動脈狭窄および治療デバイスの使用状況、内服治療薬の処方状況プロファイルを得た。統計解析にはJMP ver. 7. 0. 1 (SAS社) を用いた。

結果

冠動脈治療後の確認造影検査を受けた連続105名の患者から、その検査時に血液を採取した。その血液から抗体によりBNPを分離濃縮し、溶出後、質量分析を行った。対象とした105名の患者について再狭

| Characteristics | Factors Associated with Restenosis (Cross-sectional Study) | | | p Value* |
|---|--|----------------------|---------------------|----------|
| | Total (n = 105) | No-stenosis (n = 83) | Restenosis (n = 22) | |
| Age, yrs | 70 (63-76) | 71 (63-77) | 69 (66-72) | 0.41 |
| Male gender | 66 (63) | 55 (66) | 11 (50) | 0.21 |
| Coexisting conditions | | | | |
| Hypertension | 90 (86) | 73 (88) | 17 (77) | 0.30 |
| Diabetes mellitus | 65 (62) | 52 (63) | 13 (59) | 0.81 |
| Smoking | 71 (68) | 56 (67) | 15 (68) | 1.00 |
| Laboratory values | | | | |
| Total BNP, pg/mL | 51.9 (37.5-83.7) | 54.0 (37.5-90.8) | 48.1 (31.1-71.3) | 0.29 |
| Creatinine, mg/dL | 0.83 (0.70-0.94) | 0.84 (0.71-0.96) | 0.78 (0.65-0.89) | 0.15 |
| CRP, mg/L | 0.5 (0.3-1.2) | 0.5 (0.3-1.2) | 0.6 (0.3-1.2) | 0.50 |
| Ratio of total cholesterol to HDL cholesterol | 3.1 (2.6-3.9) | 3.1 (2.5-3.9) | 3.1 (2.8-3.8) | 0.34 |
| Total cholesterol, mg/dL | 170.5 (152.5-190.5) | 169.0 (153.9-189.3) | 176.0 (149.0-197.0) | 0.82 |
| HDL cholesterol, mg/dL | 53.2 (44.5-68.6) | 53.3 (44.5-68.9) | 50.5 (41.5-65.0) | 0.63 |
| Triglycerides, mg/dL | 134.0 (85.5-184.8) | 135.0 (89.0-189.0) | 117.0 (77.0-178.5) | 0.39 |
| LDL cholesterol, mg/dL | 88.5 (78.3-103.5) | 87.0 (76.0-102.0) | 96.0 (84.0-107.5) | 0.09 |
| Systolic blood pressure, mm Hg | 128.0 (115.0-140.0) | 128.0 (112.8-140.0) | 128.0 (116.0-142.0) | 0.90 |
| Diastolic blood pressure, mm Hg | 68.0 (60.0-78.5) | 68.0 (60.0-78.0) | 66.0 (58.0-80.0) | 0.58 |
| BNP(5-32)/BNP(3-32) | 1.35 (1.19-1.55) | 1.43 (1.22-1.61) | 1.19 (1.11-1.34) | <0.001 |
| %DS by QCA, % | 14.43 (10.26-25.54) | 12.68 (9.18-17.14) | 65.52 (59.22-70.54) | <0.001 |
| Lesion length, mm | 17.20 (12.58-22.45) | 17.47 (13.42-21.89) | 14.02 (11.12-24.83) | 0.28 |
| Lipid-lowering agents | 84 (77) | 65 (78) | 19 (86) | 0.55 |
| Anti-hypertensive treatment | 93 (90) | 72 (88) | 21 (100) | 0.21 |
| Drug-eluting stent | 79 (75) | 69 (83) | 10 (45) | <0.001 |

Table 1 対象患者の背景比較

狭窄群(Restenosis)と非狭窄群(No restenosis)の臨床背景比較を行った結果、両群において有意な差は認められなかった(Table 1)。

本方法により分析した結果、通常のBNP検査でほぼ同じ値になった検体であるにも係わらず(Fig. 3B)、その冠動脈治療後の再狭窄の有無に応じて、検出されたBNPフラグメントのシグナル強度比が異なっていた(Fig. 3A)。再狭窄が生じていた患者22検体においては、その中央値が1.19(四分位範囲、1.11-1.34)であり、一方、再狭窄を生じていなかった患者83検体では、その中央値が1.43(同、1.22-1.61、 $p=0.001$)であった(Table 2)。なお、 $AUC=0.775$ 、カットオフ値=1.41において、感度=91%、特異度=54%、陽性尤度比=1.99、陰性尤度比=0.17であった。多変量解析の結果、この比と薬剤溶出型ステントの不使用という因子の2つだけが診断にかかわる独立した因子であり、そのオッズ比は0.63(95%CI, 0.45-0.83)であった(Table 2)。

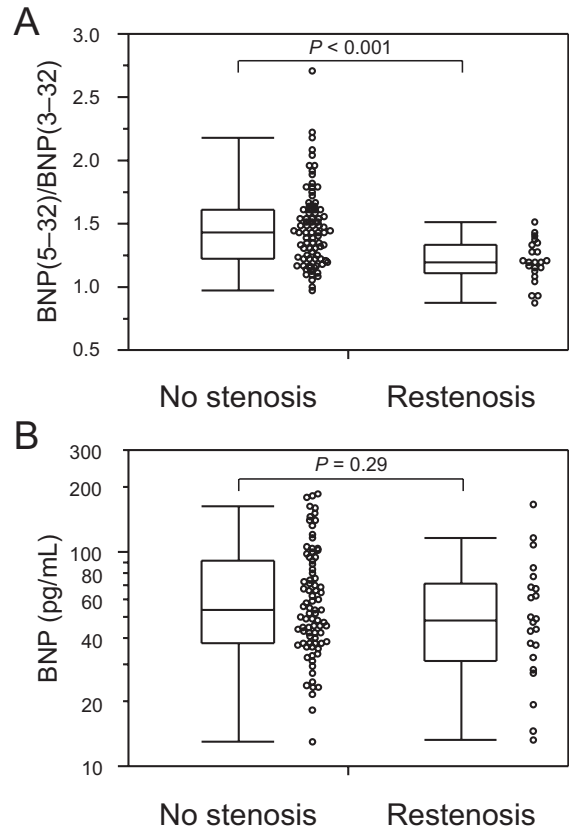


Fig.3 再狭窄との相関
A : BNP(5-32)/BNP(3-32)との相関
B : 従来のEIA法で測定したBNP値との相関

考察

本検査法は冠動脈疾患のバイオマーカー、とりわけ再狭窄の予測マーカーは、冠動脈インターベンション時に再狭窄を発症しそうないわゆるハイリスク症例の特定に役立つ。薬剤溶出ステント全盛期

の現在でもまだ1割以上の症例でみられる再狭窄はインターベンション療法のリミテーションであり、診断ならびに予測支援に用いることが可能なバイオマーカーの開発は急務である。現在、酸化LDL(マロンジアルデヒド修飾)やLp(a)が冠動脈疾患の予測バイオマーカーと

| Variables | Univariate analysis | | Multivariate analysis* | |
|---|---------------------|---------|------------------------|---------|
| | Odds Ratio (95%CI) | p Value | Odds Ratio (95%CI) | p Value |
| Age, yrs | 0.99 (0.94-1.05) | 0.74 | | |
| Male gender | 0.51 (0.19-1.33) | 0.17 | | |
| Hypertension | 0.47 (0.14-1.65) | 0.22 | | |
| Diabetes mellitus | 0.86 (0.33-2.31) | 0.76 | | |
| Smoking | 1.03 (0.39-2.98) | 0.95 | | |
| BNP, pg/mL | 0.99 (0.98-1.00) | 0.23 | | |
| Creatinine, mg/dL | 0.09 (0.004-1.28) | 0.08 | | |
| CRP, mg/L | 0.99 (0.86-1.08) | 0.91 | | |
| Ratio of total cholesterol to HDL cholesterol | 1.17 (0.69-1.93) | 0.55 | | |
| Total cholesterol, mg/dL | 1.00 (0.98-1.01) | 0.53 | | |
| HDL cholesterol, mg/dL | 0.99 (0.96-1.02) | 0.70 | | |
| Triglycerides, mg/dL | 1.00 (0.99-1.00) | 0.26 | | |
| LDL cholesterol, mg/dL | 1.01 (0.99-1.03) | 0.44 | | |
| Systolic blood pressure, mm Hg | 1.00 (0.97-1.03) | 0.90 | | |
| Diastolic blood pressure, mm Hg | 0.99 (0.95-1.03) | 0.65 | | |
| BNP(5-32)/BNP(3-32), per 0.1 unit increase | 0.60 (0.43-0.78) | <0.001 | 0.63 (0.45-0.83) | <0.001 |
| Lesion length, mm | 0.97 (0.91-1.03) | 0.39 | | |
| Lipid-lowering agents | 1.75 (0.52-8.05) | 0.38 | | |
| Anti-hypertensive treatment | 3.21 (0.57-60.32) | 0.21 | | |
| Drug-eluting stent not used | 5.91 (2.16-16.80) | <0.001 | 4.20 (1.40-12.99) | 0.011 |

Table 2 再狭窄に関与する臨床的諸因子の検討

して保険収載されているが、現在の診断性能では臨床の場ではまだ不十分である。本検査法はそれらと比べて最も診断確度が高く、画期的といえる。さらに、今後、薬剤感受性の有無についてのメカニズムに迫り、他の病態への適応拡大に繋がる期待もあり、臨床への貢献はさらに大きくなるものと期待している。

要 約

冠動脈狭窄症の治療として年間20万件以上実施されている心臓カテーテル治療ではその後の約1割の症例において、施術後の約6ヶ月後に再狭窄が生じることが、今なおその治療上の限界となっている。B型ナトリウム利尿ペプチド（BNP）は負荷のかかった心臓から分泌されるホルモンであり、心不全のバイオマーカーとして広く臨床で用いられている。しかし、虚血性心疾患の診断における有用性は未知数である。最近、末梢血中にはプロセッシングを受けたBNPが存在することが報告されてきている。

本研究では、プロテオーム手法を用いて、基礎研究として心血管障害メカニズムの解明、ならびに臨床応用を視野に入れたトランスレーショナル研究を行うことを目的とした。具体的には、このプロセッシングを受けたBNPが心臓カテーテル治療後の再狭窄を診断するのに有用か検討を行った。

末梢血中のプロセッシングを受けたBNPを分析するために、検出系に質量分析を用いた免疫学的アッセイ法を新たに開発した。東京大学医学部附属病院において心臓カテーテル治療を受けて約6ヶ月経過した時点でカテーテルによる冠動脈造影の再検査を受けた連続105症例について横断研究を行った。各患者の末梢血中のプロセッシングを受けたBNPのシグナル強度比BNP (5-32) /BNP (3-32) の測定を行うとともに、冠動脈造影検査による再狭窄の診断を行った。

再狭窄を生じていた患者群において、BNPフラグメント比BNP (5-32) /BNP (3-32) が有意に低くなっていた [再狭窄群 (n=22) : 非狭窄群 (n=83) =1.19 (四分位範囲 1.11-1.34) : 1.43 (四分位範囲 1.22-1.61), (P<0.001)]。BNPフラグメント比 (BNP (5-32) /BNP (3-32)) のカットオフ値を1.52とすると感度100%で再狭窄の除外診断が可能であった。

以上のことから、BNPフラグメント比 (BNP (5-32) /BNP (3-32)) は再狭窄の有無を診断する有用なバイオマーカーとなりうることが明らかとなった。

文 献

1. Aizawa K, Suzuki T, Fujimoto H, Sawaki D, Ishida J, Ando J, Fujita H, Komuro I, Nagai R. Processed B-Type Natriuretic Peptide Is a Biomarker of Postinterventional Restenosis in Ischemic Heart Disease. *Clin Chem*. 59: 1330-1337, 2013.