

冠動脈狭窄症の低侵襲診断法の開発と臨床応用

自治医科大学医学部 臨床薬理学部門

准教授 相澤 健一

(共同研究者)

レスター大学医学部 循環器内科 教授 鈴木 亨

はじめに

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約1割の症例において、施術後の約半年以内に再狭窄が生じることが、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。近年、末梢血中にはプロセッシングを受けた複数のBNPフラグメントが存在することが報告された。最近、申請者らは質量分析技術を用いてBNPフラグメントを特異的に検出する方法を確立し(図1)、その比(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る可能性を明らかにした(東京大学医学部附属病院と島津製作所から2013年5月16日に共同プレス発表)(図2)。

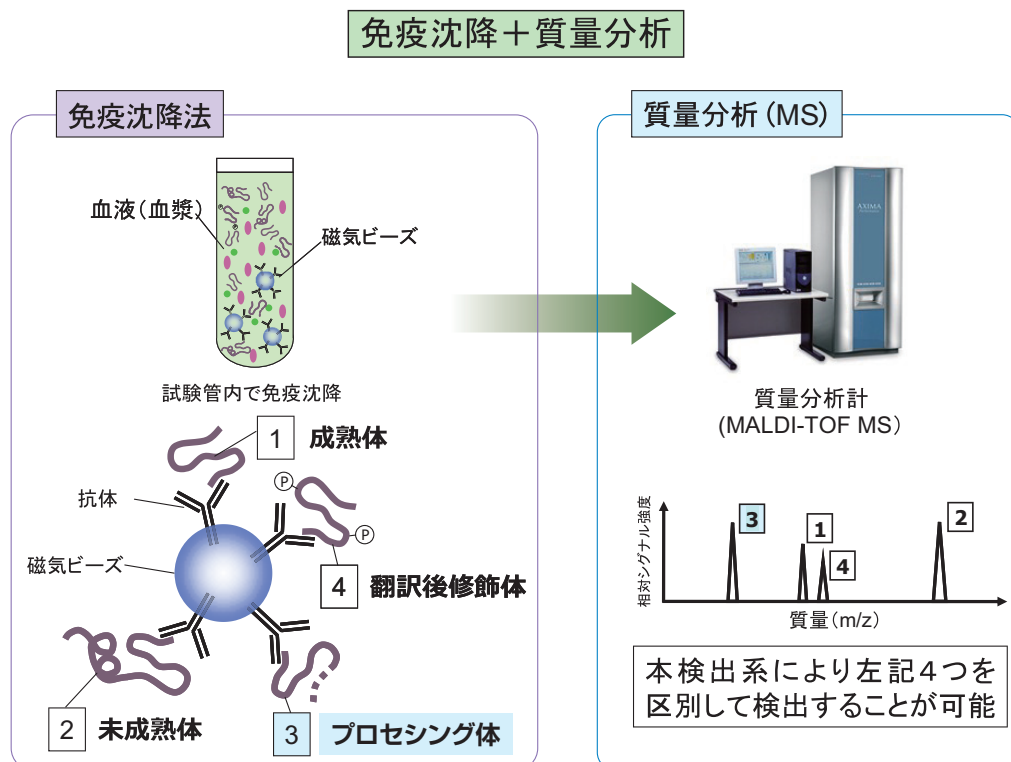


図1 新しく開発した診断手法の概念図

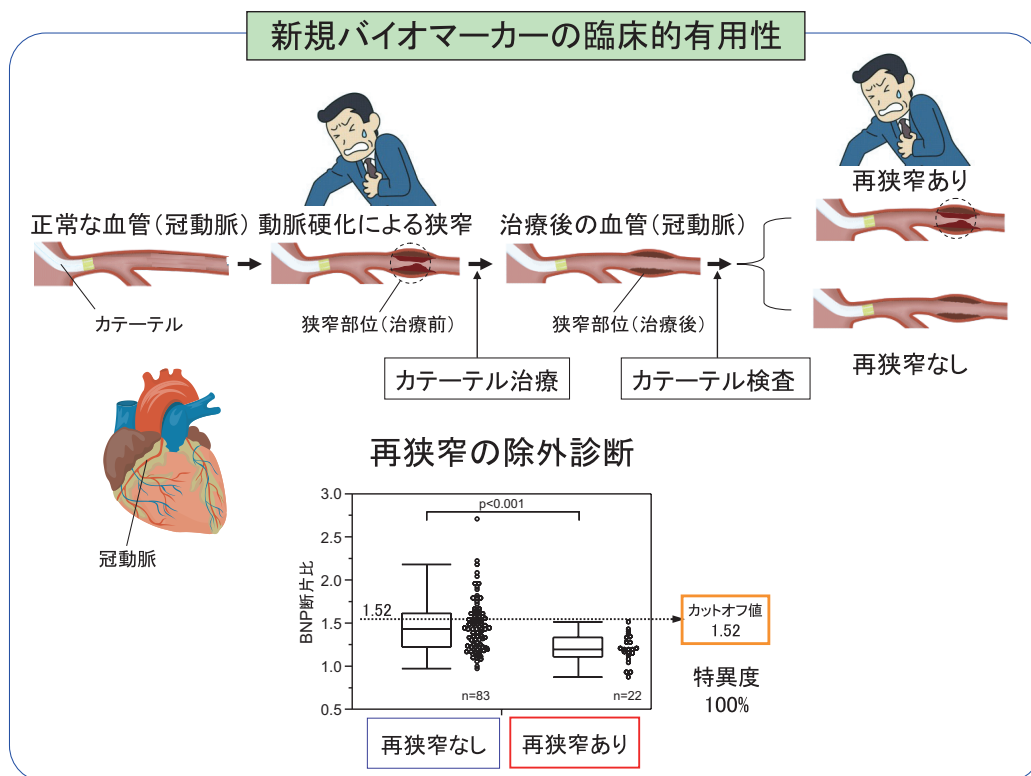


図2 新規バイオマーカーの臨床的有用性

本研究では、申請者らが開発した「質量分析技術を用いた冠動脈狭窄症の血液検査法」の臨床的有用性を検証する。具体的には、カテーテルを実施する際のハイリスク（カテーテルによる血管障害の既往、腎機能障害、放射線皮膚炎等）患者を対象に本診断法（血液検査法）を実施し、カテーテル検査に代用可能か否かを明らかにした。

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を用いて、虚血性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、前述したように、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（図1）。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。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。

東京大学大学院医学系研究科・医学部および自治医科大学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および自治医科大学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（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206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。

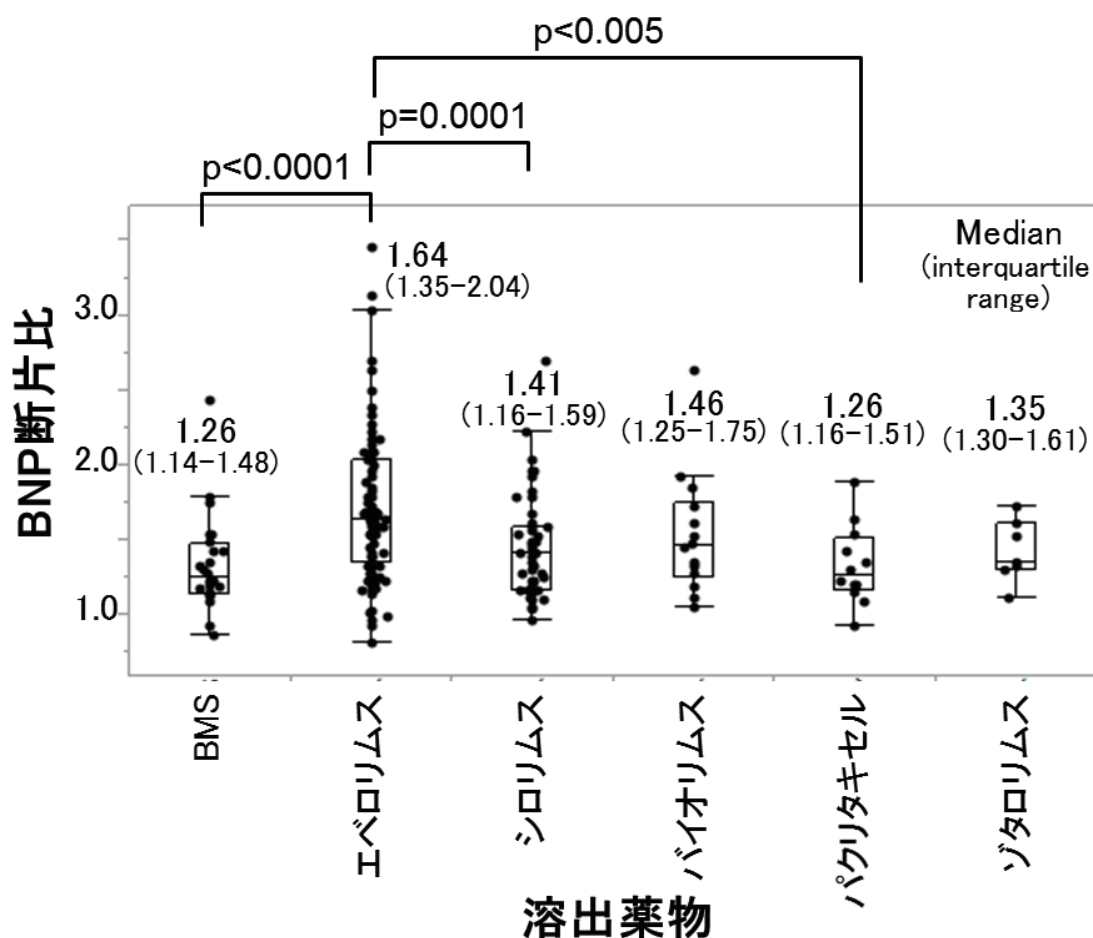


図3 冠動脈ステント溶出薬物別のBNPのプロセッシング

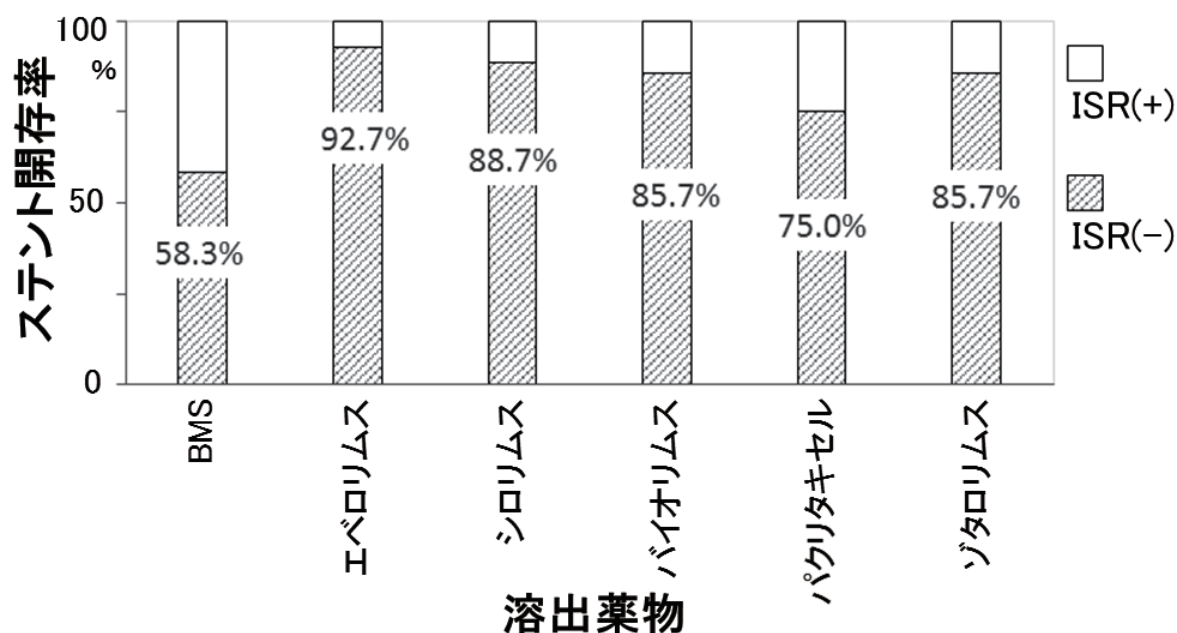


図4 冠動脈ステント溶出薬物別のステント開存率

薬物溶出性冠動脈ステントの薬物ごとに、BNPのプロセッシング（BNP5-32断片比の増加）を評価したところ、ステントのみ（BMS）と比較し、エベロリムス溶出ステントではBNPのプロセッシングが抑制されており（図3）、ステント開存率も高いことが明らかになった（図4）。同様に他の薬物溶出ステント（シロリムス、バイオリムス、パクリタキセル、ゾタロリムス）においても、BNPのプロセッシングの抑制が高いステント開存率と相関しており、BNPのプロセッシングを司るペプチダーゼを同定し、その反応を抑制することが可能であれば、冠動脈ステント治療後再狭窄を軽減することが可能になると考えられる。

考 察

冠動脈薬剤溶出ステント全盛期の現在でも、未だ1割以上の症例で再狭窄が認められる。これはインターベンション療法の限界の一つであり、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して保険収載されているが、現在の診断性能では臨床の間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。開発した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。今回の研究結果より、BNPのプロセッシング（BNP5-32断片比の増加）している薬物ほど、ステント開存率が高いことが示された。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。

今回の研究結果が示すように、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であるのみならず、溶出薬物の開発の指標となる可能性がある。溶出薬物の開発のためのコンパニオンバイオマーカーとしても期待される。

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.