



## Identification of Biomarkers of Stent Restenosis With Serum Metabolomic Profiling Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry

破磯川, 実

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2013-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5885

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005885>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

## 学位論文の内容要旨

### Identification of Biomarkers of Stent Restenosis With Serum Metabolomic Profiling Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry

ガスクロマトグラフィー質量分析計を用いた血清メタボローム解析による  
冠動脈ステント内再狭窄バイオマーカーの同定

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

循環器内科学

(指導教員：平田 健一 教授)

破磯川 実

### Identification of Biomarkers of Stent Restenosis With Serum Metabolomic Profiling Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry

ガスクロマトグラフィー質量分析計を用いた血清メタボローム解析による冠動脈ステント  
内再狭窄バイオマーカーの同定

破磯川 実、篠原 正和、津川 裕司、馬場 健史、福崎 英一郎、西海 信、西村 邦  
宏、吉田 優、石田 達郎、平田 健一

#### 【内容要旨】

背景：冠動脈疾患 coronary artery disease(CAD)は、先進国における主要な死因の一つである。CAD 患者の多くは経皮的冠動脈インターベンションを受け、冠動脈ステント留置後、危険因子の管理を中心に適切な二次予防のための治療を受けている。それにもかかわらず、冠動脈ステント植え込み患者の 5~22%がステント再狭窄のために再度血行再建術を受けている。ステント再狭窄は自覚症状を伴わないことが多いため、症状の有無にかかわらず定期的に侵襲的な冠動脈造影を施行しなければならない。したがって、ステント再狭窄を同定しうる新規かつ非侵襲的な血清バイオマーカーを確立することは、冠動脈疾患患者の適切な管理のために重要である。

最近、低分子量の代謝物を系統的、網羅的に解析するメタボロミクスが注目されている。メタボロミクスは、遺伝子解析を行うゲノミクスや蛋白質解析を行うプロテオミクスと異なり、①対象とする物質数が少ないため解析が容易、②表現形に近い、③低分子であり解析しやすい、④動物種特異性が存在しない、などの利点をもち、種々の疾患の診断における有用性が注目されている。

目的：本研究は、メタボロミクスの CAD 診療への臨床応用を目指して、CAD 二次予防患者の血清メタボローム解析を行い、ステント再狭窄に関する特異的な代謝物を同定することを目的とした。

方法：神戸大学医学部附属病院において経皮的冠動脈インターベンションを受けた冠動脈疾患患者で、ステント植え込み 6 ヶ月後に確認冠動脈造影を施行した 86 名の男性患者を対象とした。確認冠動脈造影の結果、47 名がステント再狭窄率 50%以下を示し、minor restenosis 群（=対照群）と定義した。また 23 名がステント再狭窄率 75%以上を示し、major restenosis 群と定義した。また 16 名がステント再狭窄率 50%以下かつ異なる部位に新規病変を有し、de novo 群と定義した。これらの患者から入院翌日の早朝空腹時に血清を採取し、ガスクロマトグラフィー質量分析計 gaschromatography/mass spectrometry(GC/MS) を用いて血清メタボローム解析を行なった。得られた測定値は 2-isopropylmalic acid を内部標準物質として相対定量化し、データ処理を MetAlign ソフトウェアを用いて行った。

結果：患者背景として、3群間で薬剤溶出ステントの使用率に差はなく、minor restenosis群とmajor restenosis群との間に冠危険因子の特徴に有意な相違はみられなかった。一方で、de novo群患者の血清 LDL コレステロール値はcontrol群と比べて有意に低い値を呈したが、de novo群患者では HMG-CoA 遅元酵素阻害薬(スタチン)の内服率が有意に高いことから、その影響と考えられた。また、その他の血清生化学データについても、3群間で有意な差異を認めなかった。すなわち、LDL コレステロール値を含む通常の血清解析では、再狭窄を予測することはできなかった。一方、CAD を有する患者に必須の薬剤とされるアスピリンの内服率は、de novo群では対照群と比べ有意に低値を示した。

GC/MS 解析により、血清中に 83 個の水溶性代謝物を同定した。このうち、isobutylamine・sarcosine・homoserine・ribulose・taurine・glutamine・glucose・tryptophanといった 8 個の代謝物が、major restenosis群と minor restenosis群との間で統計学的に有意な差異が認められた (major restenosis群において、isobutylamine・ribulose・glucoseは高値を、sarcosine・homoserine・taurine・glutamine・tryptophanは低値を示した)。一方で、de novo群と minor restenosis群との間には、isobutylamineにのみ有意差がみられた (de novo群において、isobutylamineは有意に高値を示した)。

さらに、有意狭窄を有する患者群の血清代謝物と有意狭窄のない患者群の血清代謝物における代謝経路の活性化に違いがないのかどうかを確認するために、得られた 8 個の代謝物それぞれの相関関係 (Spearman 順位相関係数を算出) を minor restenosis群と major restenosis群の 2 群間で比較した。すると、以下に示す 8 組の測定項目ペアは minor restenosis群においてのみ有意な相関関係を示した (isobutylamine と sarcosine;  $r = -0.31$ ,  $P < 0.05$ 、isobutylamine と taurine;  $r = -0.32$ ,  $P < 0.05$ 、isobutylamine と glutamine;  $r = -0.52$ ,  $P < 0.001$ 、isobutylamine と tryptophan;  $r = -0.36$ ,  $P < 0.05$ 、homoserine と tryptophan;  $r = 0.47$ ,  $P < 0.01$ 、taurine と glucose;  $r = 0.33$ ,  $P < 0.05$ 、taurine と tryptophan;  $r = 0.77$ ,  $P < 0.001$ 、glutamine と tryptophan;  $r = 0.71$ ,  $P < 0.001$ )。一方、sarcosine と taurine ( $r = 0.59$ ,  $P < 0.01$ ) および、ribulose と glucose ( $r = 0.56$ ,  $P < 0.01$ ) の 2 組の測定項目ペアは major restenosis群においてのみ有意な相関関係を示した。個々の分子の生理作用を考慮すると、これら代謝物の相関関係の 2 群間での相違は、変動した分子の代謝経路がステント再狭窄において活性化されたことを反映していると考えられた。

結語：本研究は CAD 患者において、GC/MS に基づいた水溶性代謝物プロファイルを明らかにした最初の研究であり、ステント再狭窄を示唆する 8 個の重要な代謝物 isobutylamine・sarcosine・homoserine・ribulose・taurine・glutamine・glucose・tryptophanを同定した。これらの測定値の組み合わせの変動を検討することにより、非侵襲的にステント再狭窄を予測できる可能性が示された。すなわち、血清メタボロームはステント再狭窄に特異的なバイオマーカーを同定する上で有効であった。

神戸大学大学院医学(系)研究科 (博士課程)

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2 3 3 4 号	氏名	破磯川 実
論文題目 Title of Dissertation	<p>Identification of Biomarkers of Stent Restenosis With Serum Metabolomic Profiling Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry</p> <p>ガスクロマトグラフィー質量分析計を用いた血清メタボローム解析による冠動脈ステント内再狭窄バイオマーカーの同定</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner 東 健</p> <p>副査 Vice-examiner 清野 遼</p> <p>副査 Vice-examiner 松田 稔</p>		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

冠動脈疾患 coronary artery disease (CAD)は、先進国における主要な死因の一つである。CAD患者の多くは経皮的冠動脈インターベンションを受け、冠動脈ステント留置後、危険因子の管理を中心に適切な二次予防のための治療を受けている。それにもかかわらず、冠動脈ステント植え込み患者の5~22%がステント再狭窄のために再度血行再建術を受けている。ステント再狭窄は自覚症状を伴わないことが多いため、症状の有無にかかわらず定期的に侵襲的な冠動脈造影を施行しなければならない。したがって、ステント再狭窄を同定しうる新規かつ非侵襲的な血清バイオマーカーを確立することは、冠動脈疾患者の適切な管理のために重要である。最近、低分子量の代謝物を系統的、網羅的に解析するメタボロミクスが注目されている。メタボロミクスは、遺伝子解析を行うゲノミクスや蛋白質解析を行うプロテオミクスと異なり、①対象とする物質数が少ないため解析が容易、②表現形に近い、③低分子であり解析しやすい、④動物種特異性が存在しない、などの利点をもち、種々の疾患の診断における有用性が注目されている。本研究では、メタボロミクスのCAD診療への臨床応用を目指して、CAD二次予防患者の血清メタボローム解析を行い、ステント再狭窄に関連する特異的な代謝物を探索した。

神戸大学医学部附属病院において経皮的冠動脈インターベンションを受けた冠動脈疾患者で、ステント植え込み6ヶ月後に確認冠動脈造影を施行した86名の男性患者を対象とした。確認冠動脈造影の結果、47名がステント再狭窄率50%以下を示し、minor restenosis群(=対照群)と定義した。また23名がステント再狭窄率75%以上を示し、major restenosis群と定義した。また16名がステント再狭窄率50%以下かつ異なる部位に新規病変を有し、de novo群と定義した。これらの患者から入院翌日の早朝空腹時に血清を採取し、ガスクロマトグラフィー質量分析計 gaschromatography/mass spectrometry(GC/MS)を用いて血清メタボローム解析を行なった。得られた測定値は2-isopropylmalic acidを内部標準物質として相対定量化し、データ処理をMetAlignソフトウェアで行った。

GC/MS 解析により、isobutylamine・sarcosine・homoserine・ribulose・taurine・glutamine・glucose・tryptophanといった8個の代謝物が、major restenosis群と minor restenosis群との間で統計学的に有意な差異が認められた(major restenosis群において、isobutylamine・ribulose・glucoseは高値を、sarcosine・homoserine・taurine・

glutamine・tryptophan は低値を示した)。一方で、de novo 群と minor restenosis 群との間には、isobutylamine にのみ有意差がみられた。さらに、有意狭窄を有する患者群の血清代謝物と有意狭窄のない患者群の血清代謝物における代謝経路の活性化に違いがないのかどうかを確認するために、得られた 8 個の代謝物それぞれの相関関係 (Spearman 順位相関係数を算出) を minor restenosis 群と major restenosis 群の 2 群間で比較した。すると、以下に示す 8 組の測定項目ペアは minor restenosis 群においてのみ有意な相関関係を示した (isobutylamine と sarcosine;  $r = -0.31$ ,  $P < 0.05$ 、isobutylamine と taurine;  $r = -0.32$ ,  $P < 0.05$ 、isobutylamine と glutamine;  $r = -0.52$ ,  $P < 0.001$ 、isobutylamine と tryptophan;  $r = -0.36$ ,  $P < 0.05$ 、homoserine と tryptophan;  $r = 0.47$ ,  $P < 0.01$ 、taurine と glucose;  $r = 0.33$ ,  $P < 0.05$ 、taurine と tryptophan;  $r = 0.77$ ,  $P < 0.001$ 、glutamine と tryptophan;  $r = 0.71$ ,  $P < 0.001$ )。一方、sarcosine と taurine ( $r = 0.59$ ,  $P < 0.01$ ) および、ribulose と glucose ( $r = 0.56$ ,  $P < 0.01$ ) の 2 組の測定項目ペアは major restenosis 群においてのみ有意な相関関係を示した。個々の分子の生理作用を考慮すると、これら代謝物の相関関係の 2 群間での相違は、変動した分子の代謝経路がステント再狭窄において活性化されたことを反映していると考えられた。

本研究は CAD 患者において、従来ほとんど行われなかった、GC/MS に基づいた水溶性代謝物プロファイルを研究したものであるが、ステント再狭窄を示唆する 8 個の重要な代謝物 isobutylamine・sarcosine・homoserine・ribulose・taurine・glutamine・glucose・tryptophan を同定し、これらの測定値の組み合わせの変動を検討することにより、非侵襲的にステント再狭窄を予測できる可能性が示された。すなわち、本研究は、ステント再狭窄に特異的なバイオマーカーを同定する上で重要な知見をえたものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。