



Impact of CD14++CD16+ monocytes on coronary plaque vulnerability assessed by optical coherence tomography in coronary artery disease patients

Yamamoto, Hiroyuki

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2019-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7341号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007341>

※ 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。



学位論文の内容要旨

Impact of CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes on coronary plaque vulnerability assessed by optical coherence tomography in coronary artery disease patients

CD14⁺⁺CD16⁺単球が冠動脈plaquesの脆弱性に及ぼす影響：
光干渉断層撮影法を用いた前向き観察研究

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

山本 裕之

【背景と目的】

低密度リポ蛋白（LDL）コレステロールを低下させる脂質低下療法は、冠動脈疾患（CAD）の1次及び2次予防に有効である。しかし、その予防効果は十分とは言えず、脂質異常症以外の CAD 進展の危険因子（残余リスク）の同定と、介入に注目が集まっている。初期の糖代謝異常である耐糖能異常症患者を登録した STOP-NIDDM 研究では、食後高血糖に対する α グルコシダーゼ阻害薬を用いた早期介入が、CAD 進行を抑制することが示されている。このように糖代謝異常症患者における、食後高血糖をはじめとした血糖変動は、動脈硬化促進因子として作用し、脂質異常症への介入後の重要な残余リスクであることが知られている。近年我々は、血糖変動と冠動脈plaquesの脆弱性には関連があることを示したが、その詳細な機序は依然不明である。

一方で、単球やマクロファージは、動脈硬化の形成に重要な役割を担っていることが知られている。末梢血単球は、血管の内膜に浸潤し、マクロファージに分化し脂質に富んだ泡沫細胞を形成する。これらマクロファージや泡沫細胞は、脆弱性plaques内に豊富に存在し、plaquesの破綻と関連があることが報告されている。さらに、ヒトの末梢血単球とその分画（3 分画：CD14⁺⁺CD16⁺単球、CD14⁺⁺CD16⁺単球、CD14⁺CD16⁺⁺単球）は、動脈硬化巣にそれぞれ異なる影響を及ぼすとされ、中でも CD14⁺⁺CD16⁺単球は心筋梗塞などの心事象発生と関連があることが報告されている。しかしながら、脂質低下療法を受けている冠動脈疾患患者において、CD14⁺⁺CD16⁺単球が冠動脈plaquesの脆弱性と関連するかどうかは不明である。

そこで我々は、安定冠動脈疾患症例における冠動脈plaquesの脆弱性に対する CD14⁺⁺CD16⁺単球と血糖変動との関連性について検討することとした。

【方法】

対象

本研究は、既に脂質管理を受けている安定狭心症（スタチン使用例<120mg/dl、スタチン未使用例<100mg/dl）を対象とした単施設前向き観察研究である。除外基準は、(1)血清クレアチニン>2.0mg/dl；(2)左室駆出率<45%；(3)炎症性疾患や悪性疾患とした。2015年5月から2016年10月の期間で50症例・冠動脈97病変が本研究の解析対象となった。

血液サンプルとフローサイトメトリー

血液サンプルは絶食状態で採取された。検査項目は C 反応性蛋白、糖代謝マーカー（1.5 アンヒドログルシトール、空腹時血糖、HbA1c）、脂質代謝マーカー（高密度リポ蛋白コレステロール、LDL コレステロール、総コレステロール、

中性脂肪)とした。また、フローサイトメトリー用の採血は同時にを行うこととした。末梢血のフローサイトメトリーによる解析は、FlowJo 10.0.6 ソフトウェア (Tree Star) を備えた Attune Acoustic Focusing Cytometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて分析を行った。

光干渉断層撮影 (OCT) 検査とその解析項目

冠動脈の動脈硬化病変は、血管造影上で中等度狭窄（狭窄度：30-70%）かつ光干渉断層撮影 (OCT) 上で 30%以上の狭窄を認める部位と定義した。なお、OCT 検査は、C8 機種 (Dragonfly; St Jude Medical, St. Paul, MN) を用いて 20mm/sec で画像を自動取得した。

次に解析は、独立した観察者が臨床情報を盲検化した状態ですべての画像を OCT 解析ソフト (LightLab Imaging Inc., Westford, MA, USA) を用いて解析した。定量解析、定性解析として、病変毎に以下の解析項目の評価を 1mm 間隔で行った。定性解析項目：最小内腔直径および基準内腔直径の計測、脂質性プラーク・石灰化プラークの各々の全長・平均角度・最大角度・脂質指数 (LI=脂質全長 × 平均脂質角度) ならびに石灰化指数 (CI=石灰化全長 × 平均石灰化角度)・線維性被膜厚（脂質プラークの表層に存在する線維性被膜厚）の測定。定性解析項目：Thin-cap fibroatheroma (TCFA；線維性被膜厚<65μm で 90 度以上の脂質角度を有する脂質プラーク) の有無、ならびに冠動脈内血栓（長径 250μm 以上の血管表面に接し血管内に浮遊する構造物）の有無の計測。

糖代謝異常の定義と持続血糖測定 (CGM) 検査を用いた血糖変動の解析方法

糖代謝異常症は、OGTT 結果に基づき以下のように定義した：(1)正常耐糖能：空腹時血糖<110mg/dl かつ 2 時間血糖<140mg/dl、(2)耐糖能異常：空腹時血糖<126mg/dl かつ 140<2 時間血糖<200mg/dl、(3)糖尿病：HbA1c>6.5%、空腹時血糖≥126mg/dl または経口 75g 糖負荷検査 (OGTT) 2 時間後血糖≥200mg、あるいは既往歴のある例のいずれかを満たすもの。

持続血糖測定 (CGM) による計測は、少なくとも連続 3 日間に行った。CGM 検査は、全症例において最適な食事（標準体重に対して 25-28 kcal/kg；炭水化物 60%、蛋白質 15-20%、脂質 20-25%）の上で施行された。なお、糖尿病患者では全例糖尿病治療薬内服下に、非糖尿病患者では無投薬下に CGM を施行した。

次に、臨床情報を盲検化し独立した観察者が得られた CGM データを解析ソフト (CareLink iPro, Medtronic, Northridge, California) を用いて評価した。解析項目は、平均血糖変動幅 (MAGE：平均血糖値の 1 標準偏差分を超える変動値の平均値)、高血糖時間 (>140 mg/dl) ならびに低血糖時間 (<70mg/dl) とした。

【結果】

患者背景

初めに、対象患者 (n=50 症例) を CD14⁺⁺CD16⁺単球に応じて 3 分位に分類し、患者背景の評価を行った (tertile 1 <13.6% (n = 17) ; tertile 2 13.6 -18.3% (n = 16) ; tertile 3 >18.3% (n = 17))。採血項目・内服薬・既往歴は、3 群間で統計学的な有意差を認めなかった。CGM 検査結果は、4 例で取得データの解析困難であったため 46 症例の解析が可能であったが、平均血糖変動幅 (MAGE) は CD14⁺⁺CD16⁺ 単球の 3 分位に応じて段階的に緩やかに有意に高値であった。

OCT による計測値と CD14⁺⁺CD16⁺単球と採血項目の関連性

CD14⁺⁺CD16⁺単球の 3 分位では、CD14⁺⁺CD16⁺単球が多い群ほど FCT は有意に小さくなり、平均脂質角度・最大脂質角度・脂質指数はそれぞれ有意に大きくなつた。

また、全症例の相関性を検討したところ、CD14⁺⁺CD16⁺単球と FCT との間には統計学的に有意な負の相関関係が認められた ($r=0.508$, $p <0.01$)。さらに、CD14⁺⁺CD16⁺単球は最大/平均脂質角度・平均脂質角度と正の相関関係にもあつた ($r=0.34$, $p <0.01$)。

TCFA と CD14⁺⁺CD16⁺単球の関連性

TCFA は、50 症例 97 病変中に 17 病変に認められた。TCFA を有する症例群では CD14⁺⁺CD16⁺単球が有意に高かった。また、TCFA 数は CD14⁺⁺CD16⁺ 单球の 3 分位に応じて段階的に多くなつた。

TCFA に対する潜在的なリスク因子を検討するために、单变量解析にてリスク因子を抽出した後に $p <0.2$ を満たす項目に関して多变量解析を行つた。最終的に、CD14⁺⁺CD16⁺単球は TCFA の独立した唯一の危険因子であることが示された。次に、TCFA の予測に対する CD14⁺⁺CD16⁺単球値を算出するために Receiver operating characteristics (ROC) 解析を行つた。TCFA 診断のための CD14⁺⁺CD16⁺ 単球の最適なカットオフ値は、CD14⁺⁺CD16⁺単球 $\geq 15.55\%$ (感度 93.3%、特異度 65.7%、曲線下面積 0.885) であった。

血糖変動と CD14⁺⁺CD16⁺単球

次に、糖尿病と非糖尿病例に区別し血糖変動と単球分画についての相関性を検討した。糖尿病例では、CD14⁺⁺CD16⁺単球は MAGE と相関関係になかつた ($r=0.259$, $p=0.244$) が、非糖尿病例では CD14⁺⁺CD16⁺単球は有意に正の相関関係 ($r=0.477$, $p=0.018$) であった。さらに、耐糖能異常症のみに絞つて解析を行つたところ、CD14⁺⁺CD16⁺単球は MAGE と統計学的には有意ではないが正の相関傾向

が認められた。

【考察】

本研究は、脂質低下療法を受けた安定冠動脈疾患例における CD14⁺⁺CD16⁺単球と脆弱性plaquesの関連性ならびに血糖変動との関連性を初めて示した研究である。本研究の主な結果は以下の通りで、(1) CD14⁺⁺CD16⁺単球は FCT と負の相関性を有したこと；(2) CD14⁺⁺CD16⁺単球は TCFA の独立寄与因子であったこと；(3) CD14⁺⁺CD16⁺単球は非糖尿病例において血糖変動と有意な正相関を有したことである。

単球分画は、動脈硬化の病変形成に対してそれぞれ異なる役割を担っている。中でも CD14⁺⁺CD16⁺単球は、動脈硬化の形成・進展に重要な役割を担う腫瘍死因子 (TNF- α) を多量に分泌し、plaquesの不安定性に寄与する細胞内ミエロペルオキシダーゼを増加させる。このようにして、CD14⁺⁺CD16⁺単球は動脈硬化病変を不安定化させる可能性が推察されている。実際に CD14⁺⁺CD16⁺単球は、心血管死・非致死性心筋梗塞のような心血管事象の予測因子となり、動脈硬化巣の破綻と関連があることが報告してきた。最近のメタ解析によると、FCT が薄いplaques (特に TCFA) は、急性冠症候群でのplaques破綻に強く関与していると報告されている。本結果でも LDL を低下させた状態であっても FCT が薄い病変が多くに観察され、CD14⁺⁺CD16⁺単球は FCT と負の相関性を有していた。さらに、CD14⁺⁺CD16⁺単球は TCFA の予測因子であった。アテローム性動脈硬化病変の形成が血管内皮細胞を介した単球/マクロファージ浸潤で始まることも考慮すると、CD14⁺⁺CD16⁺単球は将来の冠動脈plaquesの破綻を予測するための有用なマーカーとなり、CD14⁺⁺CD16⁺単球への介入が重要となりうる可能性が示唆された。

次に注目すべき点は、CD14⁺⁺CD16⁺単球が、初期の耐糖能異常である非糖尿病例では糖尿病例とは異なり MAGE と正相関を認めたことである。しかし、糖尿病例では既にジペプチジルペプチダーゼ 4 阻害薬やメトホルミンのような糖尿病治療薬が導入されており、血糖変動、単球分画、そしてplaques性状へ影響していた可能性が考えられる。非糖尿病例では、興味深いことに、低血糖時間が糖尿病例よりも多い傾向があった。最近の基礎研究によると、低血糖は特異的な白血球分画の動員を促進し、免疫細胞における炎症促進性変化を誘導することが示されている。非糖尿病例では、低血糖を含めた大きな血糖変動が CD14⁺⁺CD16⁺単球に影響を及ぼし、plaquesの脆弱性の促進につながった可能性が考えられる。血糖変動が大きい症例に対する早期介入は、非糖尿病例でも予後改善の可能性が期待される。しかしながら血糖変動への介入による CD14⁺⁺CD16⁺単球の変化については現時点では不明であり、更なる研究が期待される。

【結語】

CD14⁺⁺CD16⁺単球の増加は、脂質低下療法を受けた安定冠動脈患者のplaques脆弱性と関連していた。CD14⁺⁺CD16⁺単球は、冠動脈の脆弱性plaquesの安定化のための治療標的となる可能性がある。特に、初期の糖代謝異常症では血糖変動を減少させることによる CD14⁺⁺CD16⁺単球を介したplaquesの安定化を図る治療戦略の可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2834 号	氏名	山本 裕之
論文題目 Title of Dissertation	Impact of CD14++CD16+ monocytes on coronary plaque vulnerability assessed by optical coherence tomography in coronary artery disease patients		
	CD14++CD16+単球が冠動脈plaquesの脆弱性に及ぼす影響:光干渉断層撮影法を用いた前向き観察研究		
審査委員 Examiner	主査 森信 晴 Chief Examiner	副査 杉本 幸司 Vice-examiner	副査 月野、裕介 Vice-examiner

(要旨は1,000字~2,000字程度)

【背景と目的】

血糖変動は、脂質異常症への介入後の重要な残余リスクである。血糖変動と冠動脈plaquesの脆弱性の関連は示されたが、その機序は不明である。単球は、血管の内膜に浸潤し、マクロファージに分化し脂質に富んだ泡沫細胞を形成する。ヒトの末梢血単球とその分画(3分画: CD14++CD16+単球、CD14++CD16+単球、CD14+CD16++単球)は、動脈硬化巣にそれぞれ異なる影響を及ぼすとされ、中でも CD14++CD16+単球は心筋梗塞などの心事象発生と関連があることが報告された。しかし、脂質低下療法を受けている冠動脈疾患患者において、CD14++CD16+単球が冠動脈plaquesの脆弱性と関連するかどうかは不明である。本研究の目的は、安定冠動脈疾患症例における冠動脈plaquesの脆弱性に対するCD14++CD16+単球と血糖変動との関連性について検討することである。

【方法】

既に脂質管理下の安定狭心症を対象とした単施設前向き観察研究で、2015年5月～2016年10月に50症例・冠動脈97病変が対象となった。

評価項目は、フローサイトメトリーによる単球評価(CD14++CD16+単球、CD14++CD16+単球、CD14+CD16++単球の割合)、OCTでのplaques評価(最小内腔直径、脂質性plaquesの各々の全長・平均角度・最大角度・脂質指数(LI=脂質全長×平均脂質角度)・線維性被膜厚(脂質plaquesの表層に存在する線維性被膜厚)・Thin-cap fibroatheroma(TCFA; 線維性被膜厚<65μmで90度以上の脂質角度を有する脂質plaques)の有無)、持続血糖測定(CGM)による評価(平均血糖変動幅(MAGE)、高血糖時間(>140mg/dl)・低血糖時間(<70mg/dl))とした。

【結果】

対象患者(n=50)をCD14++CD16+単球に応じて3分位で評価したところ、CD14++CD16+単球が多い群ほど糖代謝異常症、平均血糖変動幅(MAGE)、平均脂質角度・最大脂質角度は有意に大きくなり、FCTは小さくなった。また、CD14++CD16+単球とFCTとの間には統計学的に有意な負の相関性が認められた($r=0.508, p < 0.01$)。次にTCFAを有する症例群ではCD14++CD16+単球が有意に高く、TCFA数はCD14++CD16+単球の3分位に応じて段階的に多くなった。TCFAに対する潜在的なリスク因子を多変量解析で検討したところ、CD14++CD16+単球はTCFAの独立した唯一の危険因子であった。TCFA診断のためのCD14++CD16+単球の最適なカットオフ値は、CD14++CD16+単球 $\geq 15.55\%$ であった。血糖変動と単球分画の相関性は、糖尿病例ではCD14++CD16+単球はMAGEと正の相関傾向($r=0.259, p=0.244$)であったが、非糖尿病例ではCD14++CD16+単球は有意に正の相関関係($r=0.477, p=0.018$)であった。

【考察】

本研究の主な結果は、(1) CD14⁺⁺CD16⁺単球は FCT と負の相関性を有する；(2) CD14⁺⁺CD16⁺単球は TCFA の独立寄与因子である；(3) CD14⁺⁺CD16⁺単球は非糖尿病例において血糖変動と有意な正相関を有することである。

CD14⁺⁺CD16⁺単球は、動脈硬化の形成・進展に重要な役割を担う腫瘍壞死因子 (TNF- α) を多量に分泌し、plaques の不安定性に寄与する細胞内ミクロペルオキシダーゼを増加させ、CD14⁺⁺CD16⁺単球は動脈硬化病変を不安定化させる可能性が推察されている。アテローム性動脈硬化病変の形成が血管内皮細胞を介した単球/マクロファージ浸潤で始まることも考慮すると、CD14⁺⁺CD16⁺単球は将来の冠動脈plaques の破綻を予測するための有用なマーカーとなり、CD14⁺⁺CD16⁺単球への介入が重要となりうる可能性が示唆された。次に CD14⁺⁺CD16⁺単球が、初期の耐糖能異常である非糖尿病例では糖尿病例とは異なり MAGE と正相関を認めた。糖尿病例では既に血糖降下薬が導入されており、血糖変動、単球分画、そしてplaques 性状へ影響していた可能性が考えられる。

【結語】

CD14⁺⁺CD16⁺単球は、冠動脈の脆弱性plaques の安定化のための治療標的となる可能性がある。特に、初期の糖代謝異常症では血糖変動を減少させることによる CD14⁺⁺CD16⁺単球を介したplaques の安定化を図る治療戦略の可能性が示唆された。

本研究は、冠動脈の脆弱性plaques における CD14⁺⁺CD16⁺単球と血糖変動の役割を研究したものであるが、従来明らかでなかった、平均血糖変動幅が末梢血 CD14⁺⁺CD16⁺単球の割合に与える影響について重要な知見を得たものとして価値ある集積である。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。