

〈特集：ゲノム解析で見つかったProtein Markerの意義
—PTX3は新たな炎症マーカーとして認知されるか—〉

心疾患におけるPTX3

琴岡 憲彦

Pentraxin 3 as a cardiovascular biomarker

Norihiko Kotooka

Summary There is increasing evidence that inflammation plays a pivotal role in the pathophysiology of cardiovascular disease. PTX3 shares its homology of the C-terminal domain with the classic short pentraxin, a C-reactive protein (CRP). It has already been reported that CRP is a useful marker of cardiovascular disease. Evidence has emerged of an association between PTX3 and cardiovascular disease. Increased plasma PTX3 levels have been reported in patients with unstable angina and acute myocardial infarction. PTX3 may also predict cardiovascular death and hospital admission in patients with chronic heart failure. It has also been reported that PTX3 has cardioprotective and atheroprotective effects. A serious plaque burden and increased inflammation were demonstrated in atherosclerosis model mice lacking PTX3. Thus, it could be reasonably expected to apply PTX3 to therapeutic purposes. With that in mind, we have started to determine whether PTX3 in mouse atherosclerotic plaque might be noninvasively imaged by MRI using a molecular imaging technique.

Key words: PTX3, Inflammation, Ischemic heart disease, Heart failure

I. はじめに

近年、心血管系疾患と炎症との関連が明らかにされつつある。それに伴い、様々なバイオマーカーを用いて心血管系疾患における炎症の状態を評価し、診断や治療に役立てようとする試みが行われている。なかでも高感度C-reactive protein (CRP) については、動脈硬化の進行、心筋梗塞や慢性心不全の予後を予測するなど既に多くの知見が得られている¹⁾。しかしながら高

感度CRPは、軽微な感染症などでも血中濃度が増加することなどから、実臨床においては、高感度CRPを指標として心血管系疾患の治療をおこなうことは一般的ではない。

一方、pentraxin 3 (PTX3) はCRPと同じペントラキシンファミリーに属し、CRPが様々な一次炎症性刺激に反応して主に肝で産生されるのに対して、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、単球/マクロファージ、樹状細胞、脂肪細胞など心血管系疾患の病態形成に深く関与している細胞

佐賀大学医学部 循環器・腎臓内科
〒849-8501 佐賀県佐賀市鍋島5-1-1

Department of Cardiovascular Medicine, Saga University,
5-1-1 Nabeshima, Saga, Saga 849-8501, Japan

によって産生されるため³⁾、心血管系疾患の病態をより反映するバイオマーカーとして期待されている。また、PTX3はマクロファージや樹状細胞の貪食能を修飾することにより、アポトーシスに陥った細胞の除去に影響を与えるほか³⁾、Fibroblast Growth Factor-2 (FGF2) に結合し、FGF2を介した血管新生を抑制する作用や⁴⁾、HDLコレステロールにより血管内皮細胞での産生が増加するなど⁵⁾、心血管系疾患の病態に直接作用している可能性を示唆する知見が近年次々に報告されており、単なる炎症マーカーとしてだけではなく、心血管系疾患の病態に関与するメディエータとしての側面にも注目が集まっている。本稿では、PTX3と心血管系疾患に関するこれまでの知見を紹介するとともに、心血管系疾患の診断、治療におけるPTX3の今後の可能性について考察する。

Ⅱ. 虚血性心疾患とPTX3

ヒト頸動脈の進行した動脈硬化性プラークにおいて、主に、血管内皮細胞とマクロファージにPTX3が発現していることが報告されている⁶⁾。井上らはELISA法によるPTX3の高感度測定法を確立し、この方法を用いた検討によって血中PTX3濃度がコレステロールなど従来の動脈硬化の危険因子とは独立しており、安定労作性狭心症では血中濃度の上昇がみられないが、不安定

狭心症においては血中濃度が上昇することを報告した⁷⁾。急性心筋梗塞症例において、血栓吸引療法により採取した標本中にPTX3が発現していることも報告されている⁸⁾。我々は、冠動脈ステント留置直後に血中PTX3濃度が上昇し始め、24時間後にピークとなり、上昇率とステント再狭窄に相関がみられることを報告したが(図1)、この時、冠静脈洞のPTX3濃度が最も高かったことから、ステント留置部の動脈硬化性プラークがPTX3の血中濃度上昇に最も寄与している可能性が高いと考えられた⁹⁾。不安定狭心症ではプラーク破綻が起こっている場合が多く、ステント留置による機械的なプラークの破壊によっても、プラーク内のPTX3が放出されることにより、血中濃度が上昇すると考えられる。動脈硬化性プラークにおいては、血管平滑筋細胞やマクロファージを中心とした炎症性細胞浸潤がみられることから、これらがプラークにおけるPTX3の主な産生源であることが予想されるが、近年、好中球の細胞内顆粒にPTX3が貯蔵されており、炎症性刺激に応じて速やかに顆粒内容を放出するという報告がなされ、血中PTX3濃度の急速な上昇に好中球が関与している可能性も示唆される¹⁰⁾。我々の研究においても、ステント留置後の血中PTX3濃度の上昇とMac-1との関連がみられることから、ステント留置部にrecruitされた好中球が関与している可能性も考えられる(図2)。

ここまでは動脈硬化性プラークとPTX3の関連

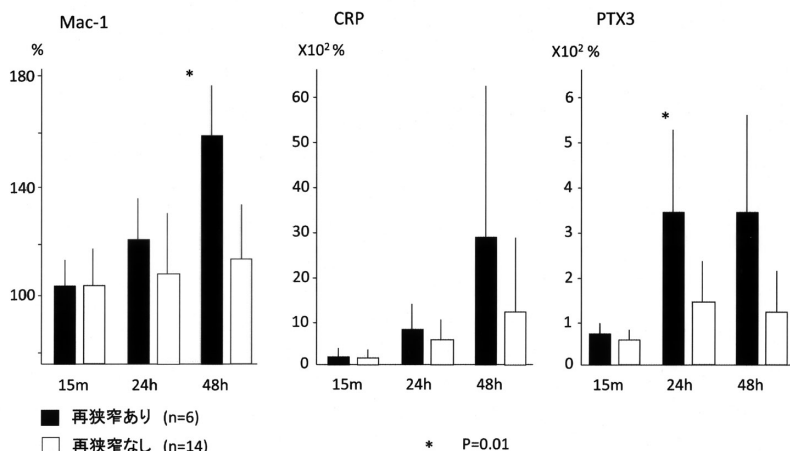


図1 冠動脈ステント留置後のMac-1、CRP、PTX3の増加率とステント再狭窄の関連

について述べたが、急性心筋梗塞においても血中PTX3濃度が上昇することが報告されている。急性期の血中PTX3濃度上昇の程度と予後には相関がみられるとされ、急性心筋梗塞の診断および予後予測マーカーとしての可能性が期待されている¹¹⁾。急性心筋梗塞における血中PTX3濃度上昇の起源については、破綻したプラークに加えて壊死心筋が関与している可能性が考えられる。しかしながらPTX3の心筋における発現およびその役割についての報告は少ない。Intronaらは、マウスにlipopolysaccharide (LPS) を投与し、4時間後に脾臓、胸腺、卵巣、心臓、肝臓、肺、腎臓、腸管、骨格筋、皮膚について検討した結果、心筋と骨格筋において強いPTX3のmRNA発現を認めたと報告している¹²⁾。LPS非投与マウスではmRNA発現を認めず、また長時間刺激にても発現が見られなくなることから、心臓および骨格筋においては、LPSによる炎症性刺激によって急速かつ一過性にPTX3の発現が起こることが示された。さらに、in situハイブリダイゼーションによって、LPS刺激による心臓におけるPTX3発現は、心筋細胞ではなく血管内皮細胞にみられた。このほかSalioらは、マウスにおける冠動脈結紮による急性心筋梗塞および虚血-再灌流モデルを用いた実験により、PTX3のmRNA発現は冠動脈結紮前には見られないが、結紮4時間後から増加し始め、16時間後にピークになりその後は減少すると報告した。この実

験において、再灌流24時間後の観察ではPTX3は主に壊死した心筋細胞の周囲に発現していた。さらに、3日後の観察において、壊死組織の中心部ではPTX3はマクロファージや血管内皮細胞に発現しており、壊死組織の周囲では細胞外に局在していた。いずれのタイミングにおいても心筋細胞における発現は見られなかった。この報告では、さらに、PTX3遺伝子欠損マウスを用いた実験も行われ、PTX3遺伝子欠損マウスの冠動脈結紮-再灌流モデルでは心筋梗塞サイズが33%増加した。この実験モデルにおいては、再灌流後のno-reflow領域が大きく、好中球の浸潤が増加するとともにアポトーシスに陥った心筋細胞の数が増加していた。これらの結果からPTX3が虚血-再灌流ストレス環境下において心筋保護作用を有する可能性が示唆された¹³⁾。

Ⅲ. 心不全とPTX3

心不全の病態における炎症の関与については、慢性心不全におけるtumor necrosis factor (TNF)- α 、interleukin (IL)-1 β 、IL-6などの炎症性サイトカインの血中濃度との関連についての報告や¹⁴⁻¹⁶⁾、高感度CRPと予後との関連など¹⁾、すでに、数多くの知見が存在する。慢性心不全は β 遮断薬をはじめとする薬物療法の進歩にもかかわらず、薬剤抵抗例の予後は不良であり、先進国における主要な死亡原因となっている。人口

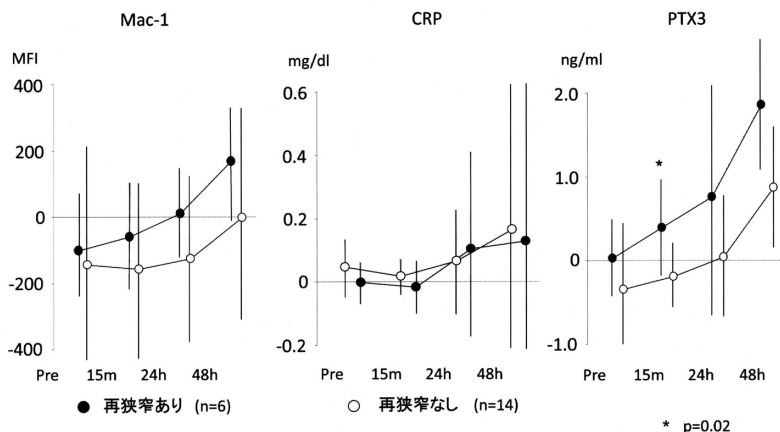


図2 冠動脈ステント留置後の、Mac-1、CRP、PTX3の変化

の高齢化に伴って今後も急速に増加することが予想されており、再生医療などを含めた新たなブレイクスルーが待ち望まれている。

心不全に対する薬物療法の新たなアプローチとして、炎症をターゲットとした治療の可能性が挙げられる¹⁷⁾。高コレステロール血症治療薬のスタチンなどが候補に挙げられているが、治療対象の選択や効果判定の指標となる病態特異的な炎症マーカーを確立することが必要であると考えられる。

我々は、非虚血性慢性心不全による入院患者37名について、退院時に血中PTX3濃度を測定し、平均10ヶ月間追跡を行った。その結果、非虚血性慢性心不全患者の血中PTX3濃度は健常群と比較して有意に高く、濃度別に3群に分けた場合、血中PTX3濃度が最も高い群では有意に心事故発生率が高かった¹⁸⁾。その後、さらに症例数を増やし、観察期間を延長して検討を続けたが、平均36カ月間の観察においても、やはり血中PTX3濃度が最も高い群の心事故発生率は有意に高かった(図3)。この研究において、我々は特発性拡張型心筋症例の心筋にPTX3の発現が増加していることを示した。慢性不全心においては、炎症の関与によりPTX3が心筋に持続的に発現している可能性を示唆するが、きわめて少数例の観察であり、さらなる詳細な病理学的検討が必要である。

鈴木らは、心不全患者196名の検討を行い、同

様に血中PTX3濃度は健常群と比較すると高値であり、血中PTX3濃度が独立した予後予測因子となることを報告した。この報告における患者群を濃度別に4群に分けた場合、血中PTX3濃度が最も高い群では、最も低値であった群と比較して心事故発生率が9.23倍であったとされる¹⁹⁾。しかしながら慢性心不全における血中PTX3濃度の有用性を検討した研究はまだ少なく、心不全の特異的な炎症マーカーとして確立するためには、さらなる研究が必要である。

現在、我々は、慢性心不全に対するスタチンによるランダム化前向き介入試験を行っている。この研究において血中PTX3濃度を測定しており、慢性心不全の予後予測マーカーとしてだけでなく、スタチンによる治療効果を判定するための指標となりうるか注目している。

Ⅳ. 今後の展開

心血管系疾患における血中PTX3濃度については、これまで報告された疾患に加えて、今後不整脈や大動脈瘤などの大血管疾患、弁膜症などにおいても検討されることが期待される。また、最近、PTX3遺伝子欠損マウスとapo E遺伝子欠損マウスのダブルノックアウトマウスでは、apo E遺伝子単独欠損マウスと比較して動脈硬化サイズが大きく、炎症の程度が増強することが報告された²⁰⁾。これまでに、PTX3がマクロファ-

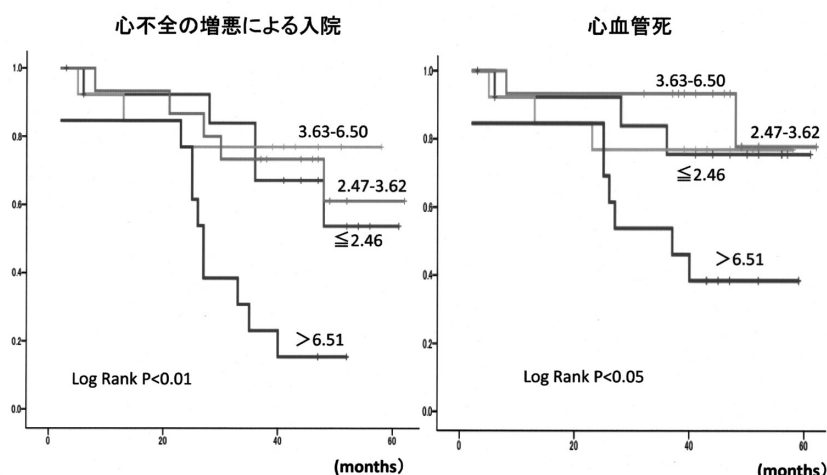
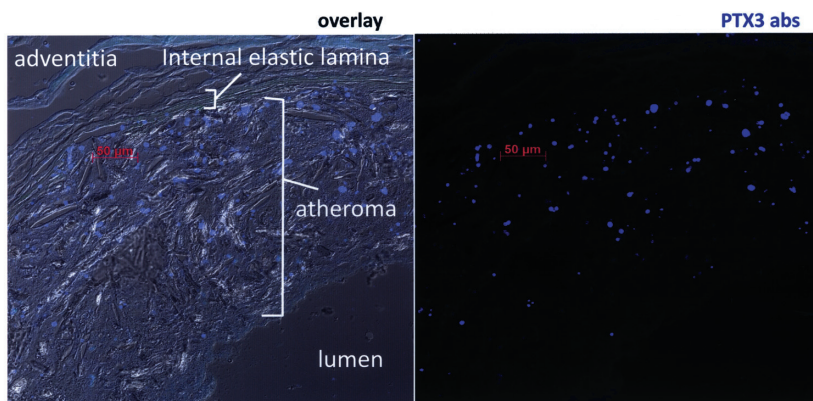


図3 慢性心不全患者における、血中PTX3濃度と心血管イベントの関係

ジや抗原提示細胞の機能を修飾する可能性や、アポトーシスに陥った細胞の除去を促進する可能性、FGF-2を介したプラーク内血管新生を抑制する可能性などが示されており、これらを介してプラークの退縮や安定化をもたらす可能性が考えられることから、動脈硬化治療へのPTX3の応用も期待される。

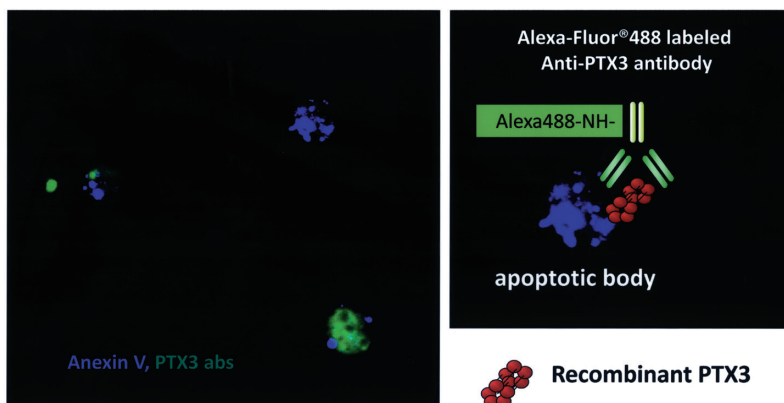
不安定狭心症や急性心筋梗塞などの急性冠症候群は、冠動脈に存在する不安定プラークが様々な誘因により破綻することにより血栓形成をひき起こし、急速に血流が途絶することによって発症する。急性冠症候群を発症すると、約半数が病院到着前に死亡するとされる。カテー

テルによる血行再建術など治療の進歩により院内死亡率は低下したが、心不全や致死的不整脈など合併症の治療を永続的に続ける必要があることから、急性冠症候群の発症そのものを予防することが重要であると考えられている。そのためメタボリック症候群への介入、コレステロールなど古典的危険因子の是正などが行われているが、予防の費用対効果は必ずしも良いとは言いがたい。また、これらの危険因子と関連のない患者も多く存在する。不安定プラークの存在を診断し、安定化させることが最も有効な手段と考えられるが、現在臨床で用いられている冠動脈の画像診断法（冠動脈造影、冠動脈CT、



confocal laser microscopy images of fluorescent immunohistochemistry staining using Alexa Fluor® 647 labeled anti-PTX3 antibody

図4 LDL受容体欠損マウス動脈硬化巣におけるPTX3の発現



青は、fas ligandによりアポトーシスを誘導したJurkatリンパ腫細胞

図5 PTX3は、アポトーシスに至った細胞の表面に結合する

冠動脈MRI等)によって不安定プラークを診断することは難しく、不安定プラークの存在を確実に示すバイオマーカーも確立していない。そこで我々は、分子イメージングの手法を用いて不安定プラークを非侵襲的に可視化する研究を行っており、その分子標的のひとつとしてPTX3を選択した。不安定プラークの破綻から急性冠症候群を発症する動物モデルは存在しないが、一般に不安定プラークでは、薄い線維性皮膜を有し、マクロファージを主体とする炎症細胞浸潤が強く、脂質コアのサイズが大きく、プラーク内血管新生やそれに伴うプラーク内出血がみられるなどの特徴が示されている。脂質コアでは脂質を貪食したマクロファージや増殖した血管平滑筋細胞などが大量にアポトーシスに至っており、このような領域ではPTX3の発現が亢進していると考え、我々は、まず始めに、LDL受容体欠損マウスに高脂肪食を与えて作製した動脈硬化巣において、PTX3の発現が亢進していることを確認した(図4)。また、PTX3がアポトーシスに至った細胞表面に結合すること(図5)、プラーク内のアポトーシスを認識することなどを確認した後、酸化鉄のナノ粒子の表面に抗PTX3抗体を結合させたナノ粒子を作製し、マウスの大動脈プラーク内のPTX3をMRIによって非侵襲的に撮像する実験を開始した。現在までに、作製したナノ粒子をマウスに投与したところプラーク内に集積することを確認し、*ex-vivo*においてプラークをMRIにより撮像することに成功しているが、今後はマウスの生体におけるMRI撮像の実現に向けて実験を続けている。

参考文献

- 1) Yin WH, et al.: Independent prognostic value of elevated high-sensitivity C-reactive protein in chronic heart failure. *Am Heart J*, 147: 931-938, 2004.
- 2) Garlanda C, et al.: Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu Rev Immunol*, 23: 337-366, 2005.
- 3) Patrizia R, et al.: The long pentraxin PTX3 binds to apoptotic cells and regulates their clearance by antigen-presenting dendritic cells. *Blood*, 96: 4300-4306, 2000.
- 4) Rusnati M, et al.: Selective recognition of fibroblast growth factor-2 by the long pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis. *Blood*, 104: 92-99, 2004.
- 5) Norata GD, et al.: Long Pentraxin 3, a Key Component of Innate Immunity, Is Modulated by High-Density Lipoproteins in Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28: 925-931, 2008.
- 6) Rolph MS, et al.: Production of the Long Pentraxin PTX3 in Advanced Atherosclerotic Plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22: e10-e14, 2002
- 7) Inoue K, et al.: Establishment of a High Sensitivity Plasma Assay for Human Pentraxin3 as a Marker for Unstable Angina Pectoris. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27: 161-167, 2007.
- 8) Savchenko AS, et al.: Expression of pentraxin 3 (PTX3) in human atherosclerotic lesions. *J Pathol*, 215: 48-55, 2008.
- 9) Kotooka N, et al.: Pentraxin3 is a novel marker for stent-induced inflammation and neointimal thickening. *Atherosclerosis*, 197: 368-374, 2008.
- 10) Jaillon S, et al.: The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J Exp Med*, 204: 793-804, 2007.
- 11) Latini R, et al.: Prognostic Significance of the Long Pentraxin PTX3 in Acute Myocardial Infarction. *Circulation*, 110: 2349-2354, 2004.
- 12) Introna M, et al.: Cloning of mouse ptx3, a new member of the pentraxin gene family expressed at extrahepatic sites. *Blood*, 87: 1862-1872, 1996.
- 13) Salio M, et al.: Cardioprotective Function of the Long Pentraxin PTX3 in Acute Myocardial Infarction. *Circulation*, 117: 1055-1064, 2008
- 14) Stephan DA, et al.: Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview. *Heart*, 90: 464-470, 2004.
- 15) Roig E, et al.: interleukin-6 in congestive heart failure secondary to idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*, 82: 688-690, 1998.
- 16) Levine B, et al.: Elevated circulation levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med*, 323: 236-241, 1990.
- 17) Matsumori A: Anti-inflammatory therapy for heart failure. *Curr Opin Pharmacol*, 4: 171-176, 2004.
- 18) Kotooka N, et al.: Prognostic value of pentraxin3 in patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol*, 130: 19-22, 2008.
- 19) Suzuki S, et al.: Pentraxin3, a new marker for vascular inflammation, predicts adverse clinical outcomes in patients with heart failure. *Am Heart J*, 155: 75-81, 2008.
- 20) Norata GD, et al.: Deficiency of the Long Pentraxin PTX3 Promotes Vascular Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation*, 120: 699-708, 2009.