

冠動脈インターベンション前後の 血中可溶性 Fas, Fas リガンド, 核 マトリックス蛋白を使った再狭窄 の評価

Evaluation of Restenosis by Serum Levels of Soluble Fas, Fas Ligand and Nuclear Matrix Protein Before and After Coronary Intervention

原 秀雄
佐藤 龍次
片桐 敬
長谷川 貢*

Hideo HARA, MD
Ryuji SATO, MD
Takashi KATAGIRI, MD, FJCC
Mitsugu HASEGAWA, MD*

Abstract

Serum levels of soluble Fas, soluble Fas ligand, and nuclear matrix protein (NMP) were measured in 38 patients with ischemic heart disease before and after coronary angiography or coronary intervention. Serum levels of soluble Fas, soluble Fas ligand and NMP were determined by enzyme-linked immunosorbent assay.

Patients one week after undergoing stent implantation had much higher levels of soluble Fas ligand and significantly lower levels of soluble Fas than patients without coronary intervention. Serum levels of soluble Fas ligand and NMP in patients with coronary restenosis were significantly higher than those in patients without restenosis. Serum levels of soluble Fas and soluble Fas ligand in patients one week after undergoing stent implantation who had coronary restenosis were markedly lower and higher than in patients without restenosis, respectively. Serum levels of soluble Fas ligand were positively correlated with NMP in those patients. These results indicate that coronary restenosis might be affected by the Fas/Fas ligand system.

We conclude that measurement of soluble Fas, soluble Fas ligand and NMP is useful for determination of coronary restenosis in patients with ischemic heart disease.

J Cardiol 2000; 35(2): 89-93

Key Words

■ Angiography ■ Angioplasty ■ Coronary heart disease
■ Restenosis (Fas, Fas ligand)

はじめに

虚血性心疾患における冠動脈インターベンションは有用な治療法であるが¹, 最大の問題点は再狭窄の頻度が約30-50%の症例に及ぶことである¹⁾. その病態は血管平滑筋細胞の増殖, 血管のリモデリング, 血栓形成または機械的なりコイルから生じる²⁾ことと考えられてはいるものの, いまだ有効な治療法は認められていない. 一方, 細胞増殖に対し生理的に細胞死が存在

し, 両者のバランスによって血管内膜肥厚が左右されると考えられる. 今回, 血管構成細胞の細胞死の側からアポトーシス誘導に関わる Fas および Fas リガンド³⁾, そして細胞死の定量化となる核マトリックス蛋白 (nuclear matrix protein: NMP)⁴⁾ の血中濃度を冠動脈インターベンション前後に測定し, 冠動脈インターベンション後に生じる血管構成細胞の細胞死と再狭窄との関係を検討した.

昭和大学医学部 第三内科: 〒142-8666 東京都品川区旗の台1-5-8; *荻窪病院 循環器内科, 東京

The Third Department of Internal Medicine, Showa University School of Medicine, Tokyo; *Division of Cardiology, Ogikubo Hospital, Tokyo

Address for reprints: HARA H, MD, The Third Department of Internal Medicine, Showa University School of Medicine, Hatanodai 1-5-8, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8666

Manuscript received May 11, 1998; revised April 27 and October 14, 1999; accepted October 15, 1999

対象と方法

1. 対 象

対象は、心臓カテーテル検査[冠動脈造影(coronary angiography: CAG)]目的で入院した陳旧性心筋梗塞患者20例(男性9例, 女性11例, 平均年齢64.0歳, インターベンション既往15例), 労作性狭心症患者18例(男性10例, 女性8例, 平均年齢64.1歳, インターベンション既往14例), 計38例で, そのうちインターベンション後6ヵ月以内に確認CAG目的で入院した患者は27例[経皮的冠動脈形成術(percutaneous transluminal coronary angioplasty: PTCA)後12例, ステント挿入後15例]であった。インターベンション後の再狭窄の定義は International Society and Federation of Cardiology/World Health Organization (ISFC/WHO) 報告に従い, 再狭窄患者には再度インターベンションを行った。全患者のうち入院経過中CAG施行のみの19例をCAG群(男性5例, 女性14例, 平均年齢66.4歳), CAGならびにPTCAを施行した9例をPTCA群(男性7例, 女性2例, 平均年齢61.3歳), CAGおよびステント挿入施行した10例をステント群(男性7例, 女性3例, 平均年齢62.4歳)に分類した。ステント挿入の内訳は Palmaz-Schatz ステント4例, Cordis ステント4例, Multilink ステント1例, Wiktor ステント1例であった。

2. 方 法

方法は, CAG前, CAGまたはインターベンション施行当日, 1週間後に十分なインフォームドコンセントを行って採血, ただちに血清分離後凍結保存し, 測定時にすべて同時に溶解し, 血中可溶性 Fas (soluble Fas: sFas), sFas リガンド, NMP を測定した。

この3つの測定はそれぞれ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法による sFas ELISA キット (MBL 製), sFas リガンド ELISA キット (MBL 製), NMP ELISA (Oncogene Research Products 製) で行った。基礎的検討において, 同時および日差再現性は sFas, sFas リガンド, NMP, それぞれ4.2%, 5.2%, 5.3% および8.2%, 4.7%, 4.3% と良好であり, 希釈系列を作成しゼロ濃度の吸光度+2標準偏差で有意差の生じた最低濃度は, それぞれ0.1 ng/ml, 0.002 ng/ml, 2 IU/ml で, これらを最低検出濃度とした。

結果は平均±標準偏差で表し, 統計学的検定には群

間の比較は分散分析法検定, 2群間の相関は Pearson の相関係数, Fisher 検定を用い, $p < 0.05$ をもって有意差の判定とした。

結 果

1. 冠動脈造影前後の sFas, sFas リガンド, 核マトリックス蛋白(NMP)濃度の変化

CAG 前後の sFas, sFas リガンド, NMP 濃度の変化を **Table 1** に示した。sFas, sFas リガンド, NMP は CAG 群, PTCA 群, ステント群の間でそれぞれ CAG 前後で有意な変化は認めなかったが, 1週間後, ステント群の sFas は CAG 群に比べ有意 ($p < 0.05$) に低値であり, また, sFas リガンドはステント群が CAG 群に比べ有意 ($p < 0.05$) に高値であった。

2. 再狭窄の有無と sFas, sFas リガンド, 核マトリックス蛋白濃度

インターベンション後の確認として CAG を施行した患者27例のうち12例 (PTCA 後5例, ステント挿入後7例) に再狭窄を認めた。**Table 2** は再狭窄患者と非再狭窄患者の CAG 前 sFas, sFas リガンド, NMP で, インターベンション後再狭窄患者の sFas と NMP は再狭窄のなかった患者に比べ有意 ($p < 0.05$) に高値であった。インターベンションによる差はなかった。

過去にインターベンション未施行で CAG のみ施行した患者は9例で, NMP, sFas リガンドは再狭窄患者に比べ有意 ($p < 0.05$) に低値であった。

3. 再狭窄がありインターベンションを施行した1週間後の sFas, sFas リガンド, 核マトリックス蛋白濃度

CAG 時再狭窄がありインターベンションを行った12例の1週間後の sFas, sFas リガンド, NMP は, それぞれ 2.46 ± 1.04 ng/ml, 0.101 ± 0.046 ng/ml, 8.8 ± 4.6 IU/ml で, 再狭窄のなかった患者15例の 2.56 ± 0.39 ng/ml, 0.057 ± 0.035 ng/ml, 7.6 ± 6.2 IU/ml に比べ, sFas リガンドは有意 ($p < 0.02$) に高値であった。12例のうちステント挿入を行った患者5例では, 1週間後の sFas, sFas リガンド, NMP は, それぞれ 1.47 ± 0.47 ng/ml, 0.104 ± 0.011 ng/ml, 10.4 ± 4.5 IU/ml で, 再狭窄のなかった患者に比べ sFas は有意 ($p < 0.01$) に低値, sFas リガンドは有意 ($p < 0.01$) に高値であった。

Table 1 Serum levels of soluble Fas, soluble Fas ligand, and nuclear matrix protein before and after coronary angiography or intervention

		CAG group (n=19)	PTCA group (n=9)	Stent group (n=10)
sFas (ng/ml)	Before	2.33±0.70	2.35±0.55	2.01±0.57
	After	2.16±0.87	2.80±1.09	1.79±0.53
	1 week after	2.58±0.38	4.04±3.39	1.83±0.97*
sFasL (ng/ml)	Before	0.060±0.035	0.073±0.036	0.083±0.048
	After	0.062±0.039	0.079±0.049	0.064±0.027
	1 week after	0.059±0.032	0.086±0.058	0.085±0.028*
NMP (IU/ml)	Before	5.0±2.0	6.9±6.1	7.6±4.8
	After	7.0±3.5	6.0±3.0	11.1±15.8
	1 week after	7.0±5.6	7.0±4.5	7.2±4.5

* $p < 0.05$. Significant difference from the CAG group by ANOVA. Values are mean ± SD.
 CAG=coronary angiography; PTCA=percutaneous transluminal coronary angioplasty; sFas=soluble Fas; sFasL=soluble Fas ligand; NMP=nuclear matrix protein.

Table 2 Serum levels of soluble Fas, soluble Fas ligand, and nuclear matrix protein in patients with or without restenosis before coronary angiography or intervention

	Patients without restenosis		Patients with restenosis
	Intervention (+) (n=15)	Intervention (-) (n=9)	Intervention (+) (n=12)
sFas (ng/ml)	2.12±0.53	2.36±0.76	2.09±0.64
sFasL (ng/ml)	0.062±0.030	0.064±0.036	0.097±0.041*
NMP (IU/ml)	4.53±2.06	5.0±2.0	9.0±6.1*

* $p < 0.05$. Significant difference from the CAG group by ANOVA. Values are mean ± SD.
 Abbreviations as in Table 1.

NMPにおいては差を認めなかった。一方、再狭窄がありPTCAを施行した患者7例の1週後のsFas, sFasリガンド, NMPはそれぞれ3.02±0.82ng/ml, 0.097±0.062ng/ml, 7.8±4.8 IU/mlで、ステント挿入患者に比べsFasは有意($p < 0.01$)に高値であったが、再狭窄のない患者との差を認めなかった。

4. sFasとsFasリガンドおよび核マトリックス蛋白との相関

CAG前sFasリガンドとNMPとの相関をFig.1に示す。相関係数 $r = 0.402$, $p < 0.02$ と有意の正相関を認めた。また、施行1週後においても相関係数 $r = 0.367$, $p < 0.02$ と有意の正相関を認めた。sFasとNMPならびにsFasリガンドとの相関は、いずれの時期においても認めなかった。

考 案

Fas(APO-1/CD95)は腫瘍壊死因子/神経成長因子レセプターファミリーに属するI型膜貫通蛋白^{5,6)}であり、Fasリガンドは腫瘍壊死因子ファミリーに属するII型膜貫通蛋白⁷⁾である。Fas/Fasリガンドシステムはアポトーシスを誘導し³⁾, sFasは膜貫通部分のないFasでアポトーシスを抑制し^{8,9)}, sFasリガンドはアポトーシスを誘導する¹⁰⁾と考えられている。一方、NMPは核蛋白を構成する2,115個のアミノ酸よりなるもので¹¹⁾, すべてのヒト細胞に存在し、DNAの複製やRNAの合成などに関わり、細胞死の過程で血中に遊出する。虚血性心疾患においては急性心筋梗塞においてアポトーシスが存在するという報告^{12,13)}があり、また、動脈硬化巣でのアポトーシス細胞や泡沫細胞で

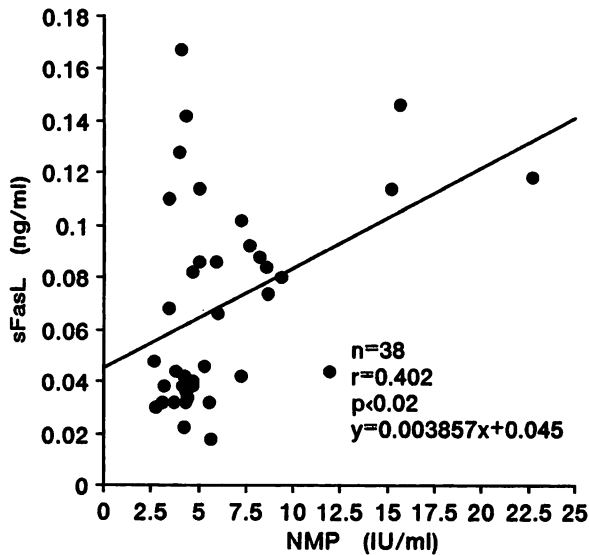


Fig. 1 Correlation between serum levels of soluble Fas ligand and nuclear matrix protein
Abbreviations as in Table 1.

の Fas 抗原の実在が報告¹⁴⁾されているが、心臓カテーテル検査またはインターベンションと Fas/Fas リガンドシステムならびにアポトーシスとの関係の報告は少ない¹⁵⁾。そこで、虚血性心疾患における細胞死の状態を心臓カテーテル検査または冠動脈インターベンション前後で Fas/Fas リガンドに関わる血中 sFas、sFas リガンド、そして細胞死の定量化となる血中 NMP を測定し検討した。

ステント挿入 1 週後の患者の sFas が CAG のみの患者に比べ有意に低値であり、sFas リガンドにおいてはステント挿入患者が有意に高値であったこと、そして NMP と sFas リガンドとは有意の正相関を示したことから、ステント挿入後 Fas/Fas リガンドシステムならびに細胞死の誘導が起こっているものと考えられた。

インターベンション後 6 ヶ月以内の患者においては、再狭窄患者の CAG 前 NMP と sFas リガンドは、再狭窄のない患者に比べ有意に高値であったことや、再狭窄患者でインターベンション 1 週後 sFas リガンドが高値で、さらにステント挿入 1 週後では sFas と sFas リガンドがインターベンションのない患者に比べ、それ

ぞれ有意に低値ならびに高値であったことは、再狭窄には Fas/Fas リガンドシステムならびに細胞死の誘導が生じているものと強く示唆された。

Fas/Fas リガンドシステムの誘導が細胞増殖に拮抗するものか、その増殖の結果または過程で生じてきているものか、また、Fas/Fas リガンドシステムの誘導が冠血管内において存在しているのかどうかは明らかではない。PTCA に比べステント挿入の再狭窄率はやや低い¹⁶⁾といわれており、今回、PTCA 施行患者に比べステント挿入患者の CAG 1 週後の sFas が有意に低値であったことは、sFas が再狭窄に関わり、sFas にも影響される Fas/Fas リガンドシステムの誘導が再狭窄抑制に有利に働いている可能性も否定できないと思われる。同一症例での確認 CAG にての再狭窄の有無、sFas、sFas リガンド、NMP の推移をさらに検討する必要があるものと考えられた。しかし、再狭窄患者における sFas、sFas リガンドまたは NMP の異常から、インターベンション後の再狭窄の判定に sFas、sFas リガンド、NMP を測定することは有用になりうるものと考えられた。

結 語

虚血性心疾患患者において CAG または PTCA を行い、その前後の血中 sFas、sFas リガンド、NMP を測定した結果、以下のような結論を得た。

- 1) ステント挿入患者では 1 週後 sFas は CAG のみの患者に比べ有意に低値、また sFas リガンドは有意に高値であった。
- 2) 再狭窄を生じていた患者の NMP と sFas リガンドは再狭窄のない患者に比べ有意に高値であった。
- 3) 再狭窄がありステント挿入した患者の sFas と sFas リガンドは、施行 1 週後、再狭窄のない患者に比べ sFas は有意に低値、sFas リガンドは有意に高値であった。
- 4) sFas リガンドと NMP とは有意の正相関を認めた。

以上より、冠動脈インターベンション後に Fas/Fas リガンドシステムが誘導されているものと考えられた。

要 約

虚血性心疾患患者38例における冠動脈造影またはインターベンション前後の血中可溶性Fas (sFas), sFasリガンド, 核マトリックス蛋白(NMP)測定をenzyme-linked immunosorbent assay法にて行った. sFasはステント挿入患者においては1週後, インターベンションのない患者に比べ有意に高値で, sFasリガンドは有意に低値であった. インターベンション後再狭窄患者のsFasリガンドとNMPは再狭窄のない患者に比べ有意に高値であり, また, 再狭窄がありステント挿入を行った患者では1週後, sFasは再狭窄のない患者に比べ有意に低値で, sFasリガンドは有意に高値であった. sFasリガンドとNMPとは有意の正相関を認めた. これらのことから, インターベンション後の再狭窄とFas/Fasリガンドシステムの関係が示唆され, sFas, sFasリガンド, NMPの測定は再狭窄の判定に有用と考えられた.

J Cardiol 2000; 35(2): 89-93

文 献

- 1) Mabin TA, Holmes DR Jr, Smith HC, Vlietstra RE, Reeder GS, Bresnahan JF, Bove AA, Hammes LN, Elveback LR, Orszulak TA: Follow-up clinical results in patients undergoing percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Circulation* 1985; **71**: 754-760
- 2) Dangas G, Fuster V: Management of restenosis after coronary intervention. *Am Heart J* 1996; **132**: 428-436
- 3) Nagata S: Fas and Fas ligand: A death factor and the receptor. *Adv Immunol* 1994; **57**: 129-144
- 4) Miller TE, Beausang LA, Winchell LF, Lidgard GP: Detection of nuclear matrix proteins in serum from cancer patients. *Cancer Res* 1992; **52**: 422-427
- 5) Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara S, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S: The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991; **66**: 233-243
- 6) Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li-Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth BC, Postinger H, Krammer PH: Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily: Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem* 1992; **267**: 10709-10715
- 7) Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S: Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993; **75**: 1169-1178
- 8) Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD: Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994; **263**: 1759-1762
- 9) Mountz JD, Wu J, Cheng J, Zhou T: Autoimmune disease: A problem of defective apoptosis. *Arthritis Rheum* 1994; **37**: 1415-1420
- 10) Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S: Expression of the functional soluble form of human Fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J* 1995; **14**: 1129-1135
- 11) Compton DA, Szilak I, Cleveland DW: Primary structure of NuMA, an intranuclear protein that defines a novel pathway for segregation of proteins at mitosis. *J Cell Biol* 1992; **116**: 1395-1408
- 12) Itoh G, Tamura J, Suzuki M, Suzuki Y, Ikeda H, Koike M, Nomura M, Jie T, Ito K: DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis. *Am J Pathol* 1995; **146**: 1325-1331
- 13) Bardales RH, Hailey LS, Xie SS, Schaefer RF, Hsu SM: In situ apoptosis assay for detection of early acute myocardial infarction. *Am J Pathol* 1996; **149**: 821-829
- 14) Cai W, Devaux B, Schaper W, Schaper J: The role of Fas/APO 1 and apoptosis in the development of human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 1997; **131**: 177-186
- 15) Isner JM, Kearney M, Bortman S, Passeri J: Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation* 1995; **91**: 2703-2711
- 16) Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, Detre K, Veltri L, Ricci D, Nobuyoshi M, Cleman M, Heuser R, Almond D, Teirstein PS, Fish RD, Colombo A, Brinker J, Moses J, Shaknovich A, Hirshfeld J, Bailey S, Ellis S, Rake R, Goldberg S, for Stent Restenosis Study Investigators: A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. *N Engl J Med* 1994; **331**: 496-501