

# 日本医療研究開発機構 女性の健康の包括的支援実用化研究事業 事後評価報告書

公開

## I. 基本情報

研究開発課題名：（日本語）非閉塞性冠動脈疾患患者における冠動脈機能の性差に関する研究開発  
（英 語）Study of sex difference in coronary vasomotor function of the  
patients with ischemia with no obstructive coronary artery (INOCA)

研究開発実施期間：令和3年4月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名：（日本語）高橋 潤  
（英 語）Jun Takahashi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
（日本語）国立大学法人東北大学 大学院医学系研究科・循環器内科学分野・准教授  
（英 語）Department of Cardiovascular Medicine, Tohoku University Graduate School of Medicine  
Associate Professor

## II. 研究開発の概要

### (和文)

#### 1. 研究開発の概要

女性のライフステージにおける性ホルモン環境の変化は、動脈硬化進展のみならず、微小血管狭心症や収縮能が維持された心不全（HFpFE）といった疾患の罹患率における性差にも影響を及ぼしている可能性が近年指摘されている。それらの疾患に共通する病態として冠動脈機能異常が挙げられるが、冠動脈機能異常を引き起こすメカニズムやその性差に関してはいまだ不明な部分が多い。本研究の目的は、胸痛を訴え狭心症の症状を呈するものの冠動脈造影上器質的有意冠動脈狭窄を有さない非閉塞性冠動脈疾患（ischemia with no obstructive coronary artery; INOCA）患者における冠動脈機能異常の性差を明らかにし、その病態に迫ることである。そのため、以下4つの研究開発項目を設定した。

研究開発項目 1. 非閉塞性冠動脈疾患患者における冠動脈機能異常タイプの性差の検討

研究開発項目 2. 冠動脈機能異常を生み出すメカニズムとしての性ホルモンの関連性とその性差の検討

研究開発項目 3. 摘出抵抗血管の血管内皮・平滑筋機能障害における性差の検討

研究開発項目 4. 冠動脈機能異常に対する治療効果における性差の検討

以下、研究開発項目ごとに研究経過と結果をまとめる。

#### 研究開発項目 1. 非閉塞性冠動脈疾患患者における冠動脈機能異常タイプの性差の検討

本研究では、虚血性心疾患精査目的で施行した冠動脈造影検査において主要冠動脈に有意器質的狭窄が認められない患者に対して心臓カテーテルによる包括的冠動脈機能評価を行い、冠動脈機能異常の表現型（エンドタイプ）とその性差を検討した。はじめに冠動脈収縮反応性をアセチルコリン（ACh）負荷試験で評価し、心表面の太い冠動脈攣縮誘発の有無と、心筋内乳酸産生を同時に行い冠微小血管攣縮の発生について調べた。次に、冠循環全般の拡張能を反映する冠動脈血流予備能（CFR）と冠微小血管拡張能に特異的な冠微小血管抵抗（IMR）を圧温度センサー付きガイドワイヤーで測定し、冠微小血管拡張能を評価した。なお、本研究に登録された症例において冠動脈造影で有意器質的狭窄が認められ、INOCA では無いと判断された場合には解析対象外とした。

東北大学病院倫理委員会において倫理申請が承認された後、令和4年1月から症例登録が開始された。当初、令和4年度中に東北大学病院と研究分担施設である国立循環器病研究センターにおいて合計100例の INOCA 症例を本研究に登録する予定であったが、コロナ感染症パンデミックの影響で病棟の入院制限が行われるなどしたため登録症例数が計画通り伸びなかった。このため PS/PO の先生方に相談し登録期間を延長した。最終的に令和6年3月までに東北大学で70例（女性49例/男性21例）、国立循環器病研究センターで30例（女性14例/男性16例）、合計100例（女性63例/男性37例）を登録した。東北大学と国立循環器病研究センターそれぞれの登録症例数の推移は令和4年度7例/0例、令和5年度21例/17例、令和6年度42例/13例であった。国立循環器病研究センターの登録された2例において冠動脈造影上有意な器質的冠動脈狭窄が認められ、本研究の解析対象外と判断したため、最終的な解析対象は98例となった。98例（女性65例、男性33例）の患者背景であるが、年齢は女性64.7歳、男性60.9歳であり、女性に比べ男性で糖尿病罹患歴と喫煙歴のある症例が多かった。登録時のシアトル狭心症質問票による「生活の質：クオリティオブライフ」評価は男女間で差は認められなかった。アセチルコリン負荷試験による冠動脈のアセチルコリンに対する反応性評価の結果であるが、心表面の太い冠動脈の攣縮に伴う狭心症（VSA）/冠微小血管攣縮に伴う狭心症（MVS）/アセチルコリン負荷試験陰性（Negative）の割合は、女性60.0%/13.9%/26.2%に対して、男性63.6%/0%/36.4%であり、男性に比べ女性で「微小血管攣縮による微小血管狭心症」と診断される症例の割合が有意に高かった（ $\chi^2$ 検定  $P=0.02$ ）。一方、冠微小血管拡張能を反映する冠血流予備能（CFR）は女性3.7に対し男性3.4で性差は認められな

かったが ( $P=0.76$ )、冠微小血管抵抗 (IMR) は女性 14.4 に対し男性 22.6 と男性に比べ女性で有意に低かった ( $P=0.03$ )。ただ、それぞれの異常閾値を  $CFR<2.0$ 、 $IMR>25$  と設定した場合、男女とも異常値を呈する症例の割合に有意差は無く、 $CFR<2.0$  もしくは  $IMR>25$  を呈した場合を冠微小血管機能異常 (CMD) と定義すると、CMD を合併する症例の割合は女性 23.1% に対し男性 30.3% ( $P=0.44$ ) と男女差は認められなかった

## 研究開発項目 2. 冠動脈機能異常を生み出すメカニズムとしての性ホルモンの関連性とその性差の検討

本研究では男性を含め全症例で高感度エストラジオール (hsE2)、テストステロン (TS)、卵胞刺激ホルモン (FSH)、黄体形成ホルモン (LH) といった性ホルモンを測定し、それら性ホルモン濃度と心臓カテーテル検査で評価した冠動脈機能との関連性を性差の観点から検討した。さらに冠動脈機能異常のバイオマーカーである末梢血白血球中 Rho キナーゼ活性や血中エンドセリン-1 濃度と性ホルモン濃度との関連性も評価した。LH、FSH 濃度は男性に比べ女性で高値であったが (LH 女性 18.0 vs. 男性 4.3,  $P<0.01$ 、FSH 女性 51.4 vs. 10.8,  $P<0.01$ )、TS、hsE2 濃度は女性に比べ男性で高値であった (TS 女性 0.2 vs. 男性 5.4,  $P<0.01$ 、hsE2 女性 15.7 vs. 男性 21.0,  $P<0.01$ )。なお、年齢と性ホルモンの相関関係を調べたところ、男性において LH と FSH の血中濃度は年齢と正の相関を示した (LH  $r=0.51$ ,  $P<0.01$ ; FSH  $r=0.63$ ,  $P<0.01$ ) が、女性では有意な相関関係が認められなかった。一方、女性では hsE2 濃度が年齢と負の相関を示した (hsE2  $r=-0.36$ ,  $P<0.01$ )。また、末梢血白血球中 Rho キナーゼ活性には明らかな男女差は認められなかった。血中エンドセリン-1 濃度について現在データ取得中である。次に冠動脈機能異常エンドタイプ別に性ホルモン濃度を比較した。冠動脈機能が正常な患者と INOCA 患者において、TS と hsE2 濃度に差は認められなかったが、性腺刺激ホルモン (LH、FSH) の濃度は INOCA 患者において低い傾向を示した。特に女性において、冠攣縮狭心症患者は冠動脈機能が正常な患者に比べ性腺刺激ホルモン (LH、FSH) 濃度は有意に低値であった。今後さらに、INOCA 症例における各種性ホルモン濃度と末梢血白血球中 Rho キナーゼ活性、エンドセリン-1 濃度との相関関係とその性差について検討する予定である。

## 研究開発項目 3. 摘出抵抗血管の血管内皮・平滑筋機能障害における性差の検討

東北大学登録症例のうち、特に同意が得られた患者においてカテーテル検査終了後の鼠径部シース抜去時にシース挿入部近傍から皮下脂肪組織を 1g 程度採取した。その皮下脂肪組織から抵抗血管レベルの微小な血管を摘出してオーガンチャンバーによる等尺性張力測定実験を実施し、血管内皮および平滑筋機能障害の成因を詳細に検討した。東北大学で登録された 70 例のうち 23 例から皮下脂肪組織を採取し、そのうち 22 例 (女性 15 例/男性 7 例) から等尺性張力測定実験実施可能な微小血管の採取が可能であった。22 例におけるカテーテルによる冠動脈機能評価の結果は INOCA 18 例 (女性 12 名)、冠動脈機能が保たれたコントロール群 4 名 (女性 3 名) であり、女性の占める割合も含め両群間の患者背景に差は認められなかった。摘出微小血管 (平均径 286  $\mu\text{m}$ ) の血管内皮および平滑筋機能評価において、アセチルコリンに対する内皮依存性弛緩反応が INOCA 群で低下している傾向が認められた (最大弛緩率  $73 \pm 8\%$  vs.  $100 \pm 0\%$  [mean  $\pm$  SEM],  $p = 0.11$ )。特に内皮依存性過分極因子 (EDH) による弛緩反応はコントロール群に比べ INOCA 群で有意に減弱していた (最大弛緩率  $47 \pm 9\%$  vs.  $95 \pm 5\%$ ,  $p = 0.02$ ; 用量反応曲線の曲線下面積  $78 \pm 22$  vs.  $194 \pm 33$  [arbitrary unit],  $p = 0.04$ )。INOCA 群 18 例を男性 6 例、女性 12 例に分けて ACH に対する内皮依存性弛緩反応を比較すると、最大弛緩率に男女差は認められず、男女共に同程度に内皮依存性弛緩反応が低下していた (最大弛緩率 女性  $77 \pm 9\%$  vs. 男性  $65 \pm 17\%$ ,  $P=0.55$ )。一方、血管平滑筋の反応性を評価するニトロプルシドやカリウムチャンネルオープナーを用いた内皮非依存性弛緩反応には INOCA 群とコントロール群の両群間に有意差は認められず、内皮由来弛緩因子に対する平滑筋自体の弛緩能は INOCA 患者でも保たれていると考えられた。さらにフェニレフリンに対する収縮反応においても両群間に差は認められなかった。以上から INOCA 患者では全身性に内皮依存性

弛緩反応が低下しており、特に冠微小血管における主要な内皮由来弛緩因子である EDH による拡張反応が有意に減弱していることが初めて明らかになった。今後は INOCA 患者における冠動脈機能異常のエンドタイプ別に内皮依存性弛緩反応を比較し、CFR や IMR、ならびに Rho キナーゼ活性やエンドセリンといった各種バイオマーカーと内皮依存性弛緩反応との相関について検討する予定である。

#### **研究開発項目 4. 冠動脈機能異常に対する治療効果における性差の検討**

東北大学登録例で冠動脈機能異常が認められた症例全例に対して長時間作用型カルシウム拮抗薬による治療を開始し、慢性期追跡を行っている。登録時に胸痛頻度やクオリティオブライフを評価するため、シアトル狭心症質問票（SAQ）を登録例全例で実施した。現在、治療効果判定のため慢性期の SAQ 結果を収集中であり、今後治療効果における男女差について検討する予定である。また、東北大学登録症例 70 例のうち 23 例において治療開始前に薬剤負荷心臓 MRI（CMR）を用いて冠微小血管機能进行评估している。これらの症例については、長時間作用型カルシウム拮抗薬の投与後慢性期（3～12 か月後）にも薬剤負荷 CMR を再度施行し冠血流予備能の変化のデータを収集中である。

## 2. 顕著な成果

(1) INOCA 症例の冠動脈過収縮反応における性差を明らかにした。

概要：(200 字程度)

本研究では、INOCA が疑われる 100 症例に対してアセチルコリン負荷試験とアデノシン負荷圧・温度センサー付きガイドワイヤー試験により包括的冠動脈機能評価を行った。冠動脈過収縮反応において男性に比べ女性では微小血管攣縮に伴う微小血管狭心症を呈する症例の比率が多く、日本人 INOCA 症例における冠動脈機能異常エンドタイプに性差が存在することを明らかにした。

(2) INOCA 症例では冠動脈機能正常症例に比べ性腺刺激ホルモン濃度が低下していることを明らかにした。

概要：(200 字程度)

冠動脈機能異常エンドタイプ別に性ホルモン濃度を比較したところ、冠動脈機能が正常な患者と INOCA 患者の間でテストステロンとエストラジオール濃度に差は認められなかったが、性腺刺激ホルモン（黄体形成ホルモン、卵胞刺激ホルモン）の濃度は INOCA 患者において低い傾向を示した。特に女性において、冠攣縮狭心症患者は冠動脈機能が正常な患者に比べ性腺刺激ホルモン（黄体形成ホルモン、卵胞刺激ホルモン）濃度が有意に低値であった。

(3) INOCA 症例の末梢微小血管における内皮依存性過分極因子による弛緩反応が低下していることを明らかにした。

概要：(200 字程度)

平均径 286  $\mu\text{m}$  の摘出微小血管の血管内皮および平滑筋機能評価においてアセチルコリンに対する内皮依存性弛緩反応が INOCA 群で低下傾向が認められ、特に内皮依存性過分極因子（EDH）による弛緩反応がコントロール群に比べ INOCA 群で有意に減弱していることを明らかにした。また、これら内皮依存性弛緩反応低下に性差は認められず、男女ともに同程度低下していた。

(英文)

## **Research summary**

The purpose of this study is to clarify sex differences in coronary artery dysfunction of patients with ischemia with no obstructive coronary artery disease (INOCA). The following four topics were established and considered for advancing this project. The research progress by each topic is presented as below.

### **Topic 1: Sex differences in endotypes of coronary artery dysfunction in INOCA patients**

In this study, we performed a comprehensive evaluation of coronary artery function by cardiac catheterization in patients with INOCA, and investigated the phenotype and sex differences of coronary artery dysfunction. Case enrollment began in January 2022, and finally by March 2024, 70 cases (49 female/21 male) were registered at Tohoku University and 30 cases (14 female/16 male) at the National Cerebral and Cardiovascular Center, for a total of 100 cases (63 female/37 male). In the evaluation of coronary artery response to acetylcholine (ACh), the proportion of cases diagnosed as microvascular angina due to microvascular spasm was significantly higher in women than in men ( $\chi^2$ test;  $P=0.02$ ). On the other hand, there was no significant difference between men and women in the number of patients with impaired coronary flow reserve or coronary microvascular resistance (women 23.1% vs. men 30.3%,  $P=0.44$ ).

### **Topic 2: A role of sex hormones in the mechanism that causes coronary artery dysfunction**

In this study, we measured serum levels of sex hormones such as high-sensitivity estradiol (hsE2), testosterone (TS), follicle-stimulating hormone (FSH), and luteinizing hormone (LH) in all patients including males, and examined the relationship between those sex hormone levels and coronary artery function. We also measured Rho-kinase activity in peripheral blood leukocytes and blood endothelin-1 concentration as biomarkers for the impairment of coronary function. TS and hsE2 levels were higher in males than in females (TS 0.2 vs. 5.4,  $P<0.01$ ; hsE2 15.7 vs. 21.0,  $P<0.01$ ). When the correlation between age and sex hormones was examined, blood levels of LH and FSH were positively correlated with age in men (LH  $r=0.51$ ,  $P<0.01$ ; FSH  $r=0.63$ ,  $P<0.01$ ), but not in women. In contrast, hsE2 concentration was negatively correlated with age in women (hsE2  $r=-0.36$ ,  $P<0.01$ ). There were no obvious gender differences in Rho-kinase activity in peripheral blood leukocytes. Data on blood endothelin-1 levels are currently being obtained, and analysis will begin as soon as the data are available. Sex hormone concentrations were then compared by type of coronary artery dysfunction. No differences were found between patients with normal coronary artery function and INOCA patients in TS and hsE2 concentrations, but serum concentrations of gonadotropic hormones including LH and FSH tended to be lower in INOCA patients. In particular, among women, patients with vasospastic angina had significantly lower levels of both gonadotropic hormones (LH and FSH) than patients with normal coronary artery function. In addition, we plan to examine the correlation between various sex hormone concentrations and peripheral blood leukocyte Rho kinase activity and endothelin-1 concentrations in INOCA patients.

### **Topic 3: Sex differences in vascular endothelial and smooth muscle dysfunction of distal resistance vessels**

Among the patients enrolled at Tohoku University who gave their consent, we collected about 1 g of subcutaneous adipose tissue from near the sheath insertion site in the groin area. The microvessels at the level of resistance vessels were removed from the adipose tissue, and isometric tension measurement experiments using an organ chamber were performed to analyze causes of vascular endothelial and smooth muscle dysfunction. After consent was obtained from 23 of 70 patients enrolled at Tohoku University, subcutaneous fat tissue was collected from them. Then, microvessels were harvested for isometric tension measurement experiments from 22 patients

(15 women/7 men) consisting of 18 INOCA patients and 4 normal controls. There was no difference in patient characteristics between the two groups, including the proportion of women. Endothelial and smooth muscle function of harvested microvessels (mean diameter 286  $\mu$ m) showed a trend toward a reduced endothelium-dependent relaxation response to acetylcholine (ACh) in the INOCA group (maximum relaxation rate  $73 \pm 8\%$  vs.  $100 \pm 0\%$  [mean  $\pm$  SEM],  $p = 0.11$ ). In particular, the endothelium-dependent hyperpolarizing factor (EDH)-induced relaxation response was significantly attenuated in the INOCA group compared to the control group (maximal relaxation  $47 \pm 9\%$  vs.  $95 \pm 5\%$ ,  $p = 0.02$ ; area under the dose-response curve  $78 \pm 22$  vs.  $194 \pm 33$  [arbitrary unit],  $p = 0.04$ ). Comparison of the endothelium-dependent relaxation response to ACh in the 18 INOCA patients divided into 6 males and 12 females showed no difference between males and females, and male and female patients had similarly reduced endothelium-dependent relaxation response compared to the control group (maximum relaxation rate  $77 \pm 9\%$  vs.  $65 \pm 17\%$  in females and males,  $P = 0.55$ ). On the other hand, there was no significant difference in endothelium-independent relaxation response to nitroprusside or potassium channel opener, suggesting that smooth muscle itself maintained its ability to relax against endothelium-derived relaxing factors. Furthermore, there was no difference in the response to phenylephrine, which verified the contractile response, between the two groups. These results indicate for the first time that systemic endothelium-dependent relaxation might be impaired in INOCA patients, particularly in the EDH component. Further analysis is now underway to compare the endothelium-dependent relaxation response in INOCA patients with different endotypes of coronary artery dysfunction and to correlate the endothelium-dependent relaxation response with various biomarkers such as CFR, IMR, Rho kinase activity, and the serum endothelin-1 level.

#### **Topic 4: Sex Differences in therapeutic effectiveness for coronary artery dysfunction**

All patients enrolled at Tohoku University with impaired coronary function were started on treatment with long-acting calcium channel blockers and followed up during the chronic phase. The Seattle Angina Questionnaire (SAQ), which assesses the frequency of chest pain and quality of life, was administered to all subjects at the time of enrollment. SAQ results are currently being collected to evaluate treatment efficacy, and future analysis of gender differences in treatment efficacy is planned. In addition, 23 of the 70 patients enrolled at Tohoku University have undergone stress-cardiac magnetic resonance imaging (CMR) to evaluate coronary microcirculatory function prior to drug treatment. In those patients, stress-CMR is being performed again in the chronic phase (12 months after treatment with a long-acting calcium channel blocker) to evaluate changes in coronary flow reserve, and data are currently being collected.