

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業）
総括研究報告書

血中自己抗体検出と新規炎症マーカーを用いた急性冠症候群予知因子
および治療標的の探索

研究代表者：西 英一郎（京都大学大学院医学研究科 循環器内科学 特定准教授）

研究要旨

ACS による死亡の約半数を占める発症早期の院外死をいかに抑制するかは喫緊の課題である。本研究で我々は、1) ACS 発症の予知が可能で、かつ 2) 病因論的にも重要で治療標的になり得る新たな ACS 予知マーカーの同定を目指し、ACS 患者血清の自己抗体発現パターン、血清ナルディライジン (NRDc) 濃度の解析を進めている。今年度は、ACS 症例血清を用いた血中自己抗体の二次、三次スクリーニングを行い、8 種類の予知マーカー候補タンパク質が得られた。さらに血清 NRDc の解析から、NRDc がトロポニン T で検出できない微小心筋障害を検出している可能性、あるいは心筋虚血の鋭敏なマーカーである可能性が示唆された。一方マウス疾患モデルを用いた実験から、NRDc が ACS および NASH の病態において、急性期の炎症反応、慢性期の線維化など組織リモデリングを制御していることが示唆された。

A . 研究目的

本研究の目的は、急性冠症候群発症 (ACS) の予知を可能にするバイオマーカーを開発すること、そして ACS による死亡の大半を占める、突然死をふくむ院外死を抑制することにある。将来的に治療薬の開発につながるよう、病因論的にも重要で、病態の本質を反映するマーカーの同定を目指す。

予知マーカー探索にあたり、我々は血中自己抗体検出に注目した。その理由は、1) 抗体産生には 2 週間以上かかることから、ACS 発症後早期に上昇している自己抗体は発症前から出現していること、2) 生活習慣病の共通基盤である慢性炎症に自己抗体が関与している可能性が高いこと、である。

一方我々はメタロプロテアーゼ、ナルディライジン (NRDc) を、HB-EGF 結合タンパク質として同定し、1) NRDc が HB-EGF や TNF- α の細胞外ドメインシェディングを活性化すること、2) NRDc 欠損マウスが、複数の炎症性疾患モデルマウスにおい

て顕著な炎症抵抗性を呈すこと、3) ACS 症例において血清 NRDc が上昇すること、を明らかにした。これらの結果は、NRDc 濃度が慢性炎症を基盤として発症する ACS の病

態をよく反映している可能性を示唆した。

本研究では、ACS 患者血清の自己抗体発現パターンの解析、血清 NRDc の解析を並行して行っている。では、平成 25 年度に施行したタンパク質アレイを用いた一次スクリーニングにおいて、ACS 症例特異的に 33 種類の自己抗体価上昇を認めた。本年度は、これらの抗原タンパク質およびアレイに含まれていなかった独自の候補タンパク質を用いて自己抗体価測定系を構築し、より多症例でのスクリーニングを行った。では、ACS 発症後時間採血により血清 NRDc 値の時間経過の検討を行った。

さらに疾患モデルマウスを用いて、ACS および

NASH における NRDC の意義を検討した。

B . 研究方法

1) ACS 患者血清の自己抗体発現パターンの解析：
一次スクリーニングで抽出した 33 種類、およびタンパク質アレイに含まれていなかった候補タンパク質 11 種類を購入あるいは独自に精製し、それらに対する血清自己抗体測定系を、Alpha (Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay) LISA 法を用いて構築した (詳細は分担報告日和佐の稿参照)。同測定系を用いて、二次スクリーニングとして健康成人 93 例、及び、ACS 症例 67 例の血清を用いて自己抗体価測定を行った。二次スクリーニングで選別された抗原タンパク質について、さらに三次スクリーニングとして、健康成人 192 例、ACS 症例 380 例、非 ACS 心疾患症例 196 例の血清における自己抗体価を測定した。

2) ACS 患者血清 NRDC 濃度の解析：

独自に開発したヒト血清 NRDC 高感度 ELISA (測定感度 50pg/ml) を用いて、ACS 入院症例の血清 NRDC を測定し、同時に測定した CK, TnT などと比較検討した (詳細は分担報告木村の稿参照)。

3) 炎症性疾患における NRDC の病態生理学的意義の解明：

3-1) ACS : 野生型と心筋特異的 NRDC 強発現マウスを、左冠動脈前下行枝結紮による ACS モデルに供し、心筋病変部位の組織学的検討、遺伝子発現様式および血清 NRDC の検討を行った。

3-2) NASH : 野生型と NRDC 欠損マウスを、コリン欠乏食、高脂肪食による NASH モデルに供し、肝臓の組織学的検討、遺伝子発現様式および血清肝逸脱酵素の検討を行った (詳細は分担報告妹尾の稿参照)。

(倫理面への配慮)

本研究は、京都大学医学部・医学研究科医の倫理委員会 (急性冠症候群予知を可能にするバイオマーカーの探索 : E2030) および千葉大学大学院

医学研究科倫理委員会 (動脈硬化関連疾患のバイオマーカーの開発 : 千大医総第 110 号) で審査を受け承認されたものである。本研究は、疫学研究に関する倫理指針に基づいて実施する。また、個人情報保護に関する (平成 15 年法律第 57 号) の規定を遵守し、個人データの安全管理のための必要かつ適切な処置、個人情報の取り扱いに関する苦情の処理その他の個人情報の適正な取り扱いを確保するために必要な措置を講じ、かつ、当該措置の内容を公表するよう努める。動物実験計画は全て、京都大学動物実験委員会での審査を経て承認されたものである。京都大学の動物実験に関する指針に従い、動物に対する苦痛負荷は極力抑え、倫理的に問題のない状態で行う。本研究計画は、組み替え DNA 実験を含む研究計画であり、京都大学において『組み替え DNA 実験申請』の承認を受けている。

C . 研究結果

1) ACS 患者血清の自己抗体発現パターンの解析：
プロテインアレイによる一次スクリーニングで抽出した 33 種類、およびアレイに含まれていなかった候補タンパク質 11 種類の抗原タンパク質について、健康成人 93 例、及び、ACS 症例 67 例の血清を用いて二次スクリーニングを行った。その結果、18 種類のタンパク質に対する抗体価が ACS 症例群で有意に上昇していた。ACS67 症例のうち、33 例はクレアチンキナーゼ (CK) 上昇を伴う急性心筋梗塞 (AMI) 症例、34 例は CK 上昇を伴わない不安定狭心症 (UAP) 症例であったが、18 種類のマーカー候補のうち 8 種類は AMI、UAP 双方で上昇を認め、10 種類は UAP のみで有意な上昇を認めた。

二次スクリーニングで選別した 18 種類の候補タンパク質について、引き続き健康成人 192 例、ACS 症例 380 例、非 ACS 心疾患症例 196 例の血清を用いて三次スクリーニングを行ったところ、8 種類のタンパク質に対する抗体価が、二群のコントロールと比較して ACS 症例で有意に上昇して

いた。

2) ACS 患者血清 NRDC 濃度の解析：

ACS を心筋壊死（心筋トロポニンの上昇）の有無により心筋梗塞と不安定狭心症に分類し、それぞれ発症後の時系列採血による検討を行った。その結果、血清 NRDC がトロポニン T や CK 陰性である ACS 発症後超早期より有意に上昇していること、TnT 陰性、CK 陰性の不安定狭心症群においても TnT 陽性、CK 陰性の心筋梗塞群と同等に上昇していることが明らかになった。一方入院時の陽性率で比較すると、心臓型脂肪酸結合タンパク（H-FABP）陽性率 75%、TnT 陽性率 65%に対して、血清 NRDC 陽性率は 95%と高い値を示した。

3) 炎症性疾患における NRDC の病態生理学的意義の解明：

3-1) ACS：マウス ACS モデル（冠動脈結紮）における免疫染色法を用いた検討から、虚血にさらされた心筋部位において、壊死に至る前の非常に早い段階（冠動脈結紮後 1.5 時間）から、NRDC の有意な発現低下を認めた。冠動脈結紮後の経時的採血の結果、血清 NRDC は 1.5 時間後にすでに上昇していることが明らかになった。心筋細胞特異的 NRDC 欠損マウスにおいては、冠動脈結紮後の血清 NRDC の上昇は認めなかったことから、血清 NRDC の上昇は虚血心筋からの放出を反映しているものと考えられた。

一方冠動脈結紮後 24 時間の梗塞巣組織において、心筋特異的 NRDC 強発現マウス（NRDC-Tg）では好中球浸潤の増加を認めた。同部位から抽出した RNA を用いて検討したところ、NRDC-Tg において TNF- α やインターロイキン 6 など炎症性サイトカインの発現レベルが上昇していることが明らかになった。さらに結紮後 4 週間で比較したところ、NRDC-Tg で線維化領域が増加する傾向が認められ、NRDC が急性期炎症の増強を介して、慢性期心筋リモデリングを制御している可能性が示唆された。

3-2) NASH：マウス NASH モデル（コリン欠乏食、高脂肪食）を用いた検討で、NRDC 欠損マウスにおける肝臓の脂肪沈着は、野生型と比較して軽微な

がら、経時的に増強した。一方、NRDC 欠損マウスでは血清中の肝逸脱酵素の上昇、肝線維化の進行はほとんど認めなかった（詳細は分担報告妹尾の稿参照）。

D . 考察

経皮的冠動脈インターベンション（PCI）の進歩、普及により、ACS の治療成績は飛躍的に向上し、院内死亡率は 5 %前後にまで低下した。一方、ACS による死亡の約半数を占める発症早期の院外死をいかに抑制するかは喫緊の課題である。今のところ、発症前に症状のない無症候性心筋虚血、あるいは有意狭窄のない冠動脈プラーク破裂による発症を簡便に予知する方法はない。

現在 ACS 診断に用いられているバイオマーカーは虚血による心筋障害の結果漏出するものである。本申請で我々は、1) ACS 発症の予知が可能で、かつ 2) 病因論的にも重要で治療標的になり得る新たな ACS マーカーの同定を目指し、血中自己抗体のスクリーニング、血清 NRDC の解析を行った。

今年度得られた重要な結果および考察として、1) ACS 症例の血清を用いた一次、二次、三次スクリーニングを経て、8 種類の予知マーカー候補タンパク質が得られたこと、2) 血清 NRDC が TnT で検出できない微少心筋障害を検出している可能性、あるいは心筋虚血の鋭敏なマーカーである可能性が示唆されたこと、3) マウス ACS モデルにて、冠動脈結紮直後から血清 NRDC の上昇を認め虚血心筋からの放出を反映していると考えられたこと、NRDC が ACS および NASH の病態において、急性期の炎症反応、慢性期の線維化など組織リモデリングを制御していることが示唆されたこと、が挙げられる。

特筆すべきは、血中自己抗体のスクリーニングで最終候補として残った 8 種類の中に NRDC が入っていることである。2) で述べたように、NRDC が鋭敏な心筋虚血マーカーである可能性が強く示唆されていることから、血中自己抗体のスクリーニング系が、ACS 予知マーカーを同定する方法として

適当であることも同時に示唆されているものと考えている。

E . 結論

本研究の目的は、1) ACS 発症の予知が可能で、かつ 2) 病因論的にも重要で治療標的になり得る新たな ACS マーカーを同定することだが、平成 26 年度に得られた成果から、NRDc がそれらの条件を満たす可能性がさらに示唆された。一方、血中自己抗体の網羅的スクリーニングも順調に進んでおり、今後後ろ向きコホート試験（長浜コホートとの提携）を行い、NRDc および新規候補タンパク質の ACS 予知能検証を行う。

F . 健康危険情報

該当なし

G . 研究発表

1 . 論文発表

1. Ishizu-Higashi S, Seno H*, Nishi E*, Matsumoto Y, Ikuta K, Tsuda M, Kimura Y, Takada Y, Kimura Y, Nakanishi Y, Kanda K, Komekado H, Chiba T (*Co-corresponding author) Deletion of nardilysin prevents the development of steatohepatitis and liver fibrotic changes. *PLOS ONE* 9(5): e98017, 2014.
doi:10.1371/journal.pone.0098017
2. Tien DN, Kishihata M, Yoshikawa A, Hashimoto A, Sabe H, Nishi E, Kamei K, Arai H, Kita T, Kimura T, Yokode M, Ashida N. AMAP1 as a negative-feedback regulator of nuclear factor- B under inflammatory conditions. *Sci Rep.* 4:5094. 2014. doi: 10.1038/srep05094.

2 . 学会発表

1. Nishi K, Sato Y, Ohno M, Saijyo S, Sakamoto J, Chen P, Inagaki N, Kimura T, Nishi E. Nardilysin is a critical regulator of glucose-stimulated insulin secretion Keystone Symposia (Emerging

concepts and targets in islet biology), Apr 8, 2014, Keystone, CO, USA

2. Nishi E, Nishi K, Ohno M, Saijo S, Chen P, Sakamoto J, Kimura T, Kita T. Critical role of nardilysin in glucose-stimulated insulin secretion(Selected for oral presentation) Cold Spring Harbor Meeting (Nuclear Receptors & Diseases), Oct 28-Nov1, 2014, Cold Spring Harbor, NY, USA
3. Ohno M, Hiraoka Y, Nishi K, Saijo S, Sakamoto J, Chen P, Makiyama T, Kita T, Matsuura H, Kimura T, Nishi E. Nardilysin controls heart rate through the regulation of sinus node automaticity Cold Spring Harbor Meeting (Nuclear Receptors & Diseases), Oct 28-Nov1, 2014, Cold Spring Harbor, NY, USA.
4. 鳥口 寛、波多野 悦朗、竹本 研二、田邊和孝、瀬尾智、田浦 康二郎、上本 伸二、西 英一郎. 肝細胞癌の発症進展における Nardilysin (NRDc)の意義の検討. 第 114 回日本外科学会定期学術集会(2014 年 4 月 3 - 5 日、京都)
5. 西清人, 佐藤 雄一, 大野美紀子, 平岡義範, 西城さやか, 稲垣 暢也, 西英一郎. ナルディライジンは膵 β 細胞においてインスリン分泌を制御する. 第 6 1 回日本生化学会近畿支部例会(2014 年 5 月 17 日) **優秀発表賞受賞**
6. 西城さやか, 平岡義範, 松岡龍彦, 大野美紀子, 西清人, 西英一郎. ナルディライジンは PGC-1α を制御することで体温恒常性維持機構と適応熱産生を調節する. 第 61 回 日本生化学会近畿支部例会(2014/5/30 京都)
7. 西清人, 佐藤雄一, 大野美紀子, 平岡義範, 西城さやか, 坂本二郎, 陳博敏, 北徹, 稲垣暢也, 木村剛, 西英一郎. ナルディライジンはグルコース応答性インスリン分泌を制御する. 第 46 回日本動脈硬化学会学術集会(2014 年 7 月 10-11 日 東京)
8. 西城さやか, 平岡義範, 松岡龍彦, 大野 美紀

- 子, 中村和弘, 松村成暢, 西清人, 坂本 二郎, 陳 博敏, 北 徹, 木村 剛, 西 英一郎. ナルディライジンはPGC-1 α を制御することで体温恒常性維持機構と適応熱産生を調節する. 第46回 日本動脈硬化学会総会・学術集会 (2014/7/10-11 東京)
9. 大野美紀子, 平岡義範, 松浦博, 西清人, 西城さやか, 坂本二郎, 陳博敏, 牧山武, 北徹, 木村剛, 西英一郎. 多機能プロテアーゼによる心拍数制御機構 日本循環制御医学会 2014年7月4日~5日, 福岡 第35回日本循環制御医学会総会 **会長賞最優秀賞受賞**
10. 坂本二郎, 大野美紀子, 西清人, 西城さやか, 陳博敏, 木村剛, 西英一郎. ナルディライジンの心肥大, 心不全における役割. 第19回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 (2014年8月8-9日, 大阪)
大野美紀子, 西清人, 西城さやか, 坂本二郎, 陳博敏, 北徹, 木村剛, 西英一郎. 多機能プロテアーゼによる交感神経系を介した循環動態制御機構. Molecular Cardiovascular Conference II 2014年9月5日, 神戸
11. 西城さやか, 平岡義範, 大野美紀子, 中村和弘, 松村成暢, 西清人, 坂本二郎, 陳博敏, 森田雄介, 北徹, 木村剛, 西英一郎. 褐色脂肪組織に発現するナルディライジンは体温恒常性維持機構において重要な役割を示す. 第37回日本分子生物学会年会 (2014年11月25-27日, 横浜)
12. 大野美紀子, 松浦博, 平岡義範, 西清人, 西城さやか, 坂本二郎, 陳博敏, 牧山武, 北徹, 木村剛, 西英一郎. 多機能プロテアーゼによる洞房結節自動能制御機構. 第37回日本分子生物学会年会 (2014年11月25-27日, 横浜)
13. 坂本二郎, 大野美紀子, 西清人, 西城さやか, 陳博敏, 森田雄介, 北徹, 木村剛, 西英一郎. ナルディライジンの心肥大, 心不全における役割. 第37回日本分子生物学会年会 (2014年11月25-27日, 横浜)
14. 西清人, 佐藤雄一, 大野美紀子, 平岡義範, 西城さやか, 坂本二郎, 陳博敏, 森田雄介, 松岡龍彦, 北徹, 稲垣暢也, 木村剛, 西英一郎. ナルディライジンによるインスリン分泌制御の解析. 第37回日本分子生物学会年会 (2014年11月25-27日, 横浜)
15. 西 英一郎:『セクレターゼ活性化因子ナルディライジンのアルツハイマー病における意義』シンポジウム A 産生制御によるアルツハイマー病根本治療戦略の進歩. 第33回認知症学会学術集会 (2014年11月30日, 横浜)

G . 知的所有権の取得状況

1 . 特許取得

該当なし

2 . 実用新案登録

該当なし

3 . その他

該当なし

