

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
(循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策実用化研究事業)

「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」
課題番号：H25-循環器等（生習）- 一般 -026

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西 英 一 郎

平成27（2015）年5月

目 次

I．総括研究報告

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

西 英一郎 ----- 1

II．分担研究報告

1．急性冠症候群患者における血清ナルディライジンの時系列解析

木村 剛 ----- 7

2．動脈硬化関連疾患自己抗体マーカーのACS症例における定量評価

日和佐 隆樹 ----- 15

3．急性冠症候群バイオマーカーとしてのマイクロRNAの可能性について

尾野 亘 ----- 19

4．メタボリック・シンドロームにおける肝線維化とNRDcの関連

妹尾 浩 ----- 25

III．研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 29

IV．研究成果の刊行物・別刷 ----- 31

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

・ 分担研究報告書

1 . 急性冠症候群患者における血清ナルディライジンの時系列解析

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） 分担研究報告書

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

急性冠症候群患者における血清ナルディライジンの時系列解析

研究分担者：木村 剛（京都大学大学院医学研究科 循環器内科学 教授）

研究要旨

ACS による死亡の多くは院外死であり、その背景には有意狭窄のない vulnerable な冠動脈プラークや無症候性心筋虚血が存在すると推測される。しかしながら、それらの存在を検出できるバイオマーカーは存在しない。我々はメタロプロテアーゼ、ナルディライジン（NRDc）の高感度測定系を構築し、心筋梗塞症例で血清 NRDc が上昇していることを明らかにした。今回我々は、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。以上から、血清 NRDc が心筋虚血マーカーとなる可能性が示唆された。

A . 研究目的

経皮的冠動脈インターベンションの普及により、ACS による院内死亡率は大幅に低下したが、ACS による死亡の多く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。院外死の背景には、有意狭窄のない vulnerable な冠動脈プラークや無症候性心筋虚血が存在すると推測されるが、それらの存在を検出できるバイオマーカーは存在しない。

我々はメタロプロテアーゼ、ナルディライジン（NRDc）が、炎症性サイトカインや増殖因子の活性化を介して、炎症性疾患や悪性腫瘍の病態を制御していることを報告してきた。さらに ACS 症例入院時採血の検討から、健常者と比較して血清 NRDc が有意に上昇することを明らかにした。

本研究では、ACS 診断マーカーとしての血清 NRDc の有用性をさらに明らかにするため、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。

B . 研究方法

2013 年 7 月から 2014 年 12 月にかけて京都大学附属病院循環器内科に入院し、緊急冠動脈造影にて有意狭窄を認め ACS と診断された連続 46 症例の、入院時および入院後 6 時間おき（CK のピークが確認されるまで）に採取した血清について、ヒト血清 NRDc 高感度 ELISA（測定感度 50pg/ml）を用いて血清 NRDc を測定し、同時に測定した CK、トロポニン T を含む一般血液生化学検査結果との比較検討を行った。

（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で審査を受け承認されたものである。「心

血管疾患患者における血中バイオマーカーおよび RNA 発現レベルと病態との関連の検討」(ヒト遺伝子解析承認番号 G-322)、「急性冠症候群予知を可能にするバイオマーカーの探索」:(疫学研究承認番号 E2030)。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、個人情報の保護に関する(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。

C . 研究結果

ACS と診断された 46 例中、現時点で解析可能な 32 例中 12 例が入院時にトロポニン T (TnT) 陰性、CK 陰性(グループ 1)、10 例が TnT 陽性、CK 陰性、10 例が TnT 陽性、CK 陽性であった。それぞれのグループの入院時血清 NRDC は、グループ 1: 3338 ± 1096 pg/ml、グループ 2: 3237 ± 1200 pg/ml、グループ 3: 7719 ± 1200 pg/ml、であった。グループ 3 の血清 NRDC はグループ 1, 2 と比較して有意に高かったが、グループ 1 とグループ 2 の間に有意差は認めなかった。一方健康成人 112 人の血清 NRDC: 518 ± 190 pg/ml と比較すると、グループ 1、グループ 2 の血清 NRDC はいずれも有意に上昇していた。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。

D . 考察

ESC/ACCF/AHA/WHF 合同タスクフォースにて、心筋梗塞の universal definition として臨床上の心筋虚血に一致して心筋壊死が確認された場合に心筋梗塞と診断し、心筋壊死の有無は心筋トロポニンの上昇の有無で判断することが提唱された。近年心筋トロポニンの測定系の感度が上がり、従来は心筋壊死を伴わない不安定狭心症と診断さ

れた症例にも、微少心筋壊死を伴う症例がかなり含まれていることがわかってきた。一方、心筋トロポニンの上昇を認めない不安定狭心症を感度、特異度とも良好に診断できるバイオマーカーは存在しない。

本研究で我々は、臨床上心筋虚血が示唆され、緊急冠動脈造影にて有意狭窄を認めたが、入院時 TnT は陰性である不安定狭心症群(グループ 1)において、血清 NRDC が有意に上昇していることを示した。さらに、入院時の H-FABP 陽性率と比較しても血清 NRDC は高い陽性率を示しており、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。以上から、NRDC の ACS の超早期診断バイオマーカーとしての有用性、ACS 予知マーカーとなる可能性が示唆された。

E . 結論

今回の解析結果から、血清 NRDC がトロポニン T や CK-MB が陰性である ACS 発症後超早期より有意に上昇していることが明らかになった。今後長浜コホートとの提携にて約 10000 例の後ろ向きコホート試験を行い、ACS 発症前に NRDC が上昇しているかどうかを検討し、予知能の検討を行う。

F . 研究発表

1 . 論文発表

1. Abe M, Morimoto T, Akao M, Furukawa Y, Nakagawa Y, Shizuta S, Ehara N, Taniguchi R, Doi T, Nishiyama K, Ozasa N, Saito N, Hoshino K, Mitsuoka H, Toma M, Tamura T, Haruna Y, Kita T, Kimura T. Relation of contrast-induced nephropathy to long-term mortality after percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol* 2014;114:362-368.
2. Ashida N, Kishihata M, Tien DN, Kamei K, Kimura T, Yokode M. Aspirin

- augments the expression of Adenomatous Polyposis Coli protein by suppression of IKK β . *Biochem Biophys Res Commun* 2014;446:460-464.
3. Campos CM, van Klaveren D, Iqbal J, Onuma Y, Zhang Y-, Garcia-Garcia HM, Morel M-, Farooq V, Shiomi H, Furukawa Y, Nakagawa Y, Kadota K, Lemos PA, Kimura T, Steyerberg EW, Serruys PW. Predictive performance of SYNTAX score II in patients with left main and multivessel coronary artery disease - Analysis of CREDO-Kyoto registry. *Circulation Journal* 2014;78:1942-1949.
 4. Goto K, Nakai K, Shizuta S, Morimoto T, Shiomi H, Natsuaki M, Yahata M, Ota C, Ono K, Makiyama T, Nakagawa Y, Furukawa Y, Kadota K, Takatsu Y, Tamura T, Takizawa A, Inada T, Doi O, Nohara R, Matsuda M, Takeda T, Kato M, Shirotani M, Eizawa H, Ishii K, Lee J-, Takahashi M, Horie M, Takahashi M, Miki S, Aoyama T, Suwa S, Hamasaki S, Ogawa H, Mitsudo K, Nobuyoshi M, Kita T, Kimura T. Anticoagulant and antiplatelet therapy in patients with atrial fibrillation undergoing percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol* 2014;114:70-78.
 5. Hanazawa K, Kaitani K, Hayama Y, Onishi N, Tamaki Y, Miyake M, Kondo H, Tamura T, Izumi C, Shizuta S, Kimura T, Nakagawa Y. Effect of radiofrequency catheter ablation of persistent atrial fibrillation on the left atrial function: Assessment by 320-row multislice computed tomography. *Int J Cardiol* 2015;179:449-454.
 6. Hattori N, Nomoto M, Kimura T, Kikuchi S, Enomoto H, Yoshizawa K, Tamaoka A, Hatano T, Murata M, Hasegawa K, Tanaka K, Arahata Y, Kanda F, Kashihara K, Yamamoto M, Nishikawa N, Tsuboi Y, Ohya Y. Sustained efficacy of apomorphine in Japanese patients with advanced Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders* 2014;20:819-823.
 7. Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Nakazeki F, Ide Y, Koyama S, Sowa N, Yahagi N, Shimano H, Nakamura T, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33b knock-in mice for an intron of sterol regulatory element-binding factor 1 (Srebf1) exhibit reduced HDL-C in vivo. *Scientific Reports* 2014;4.
 8. Imai M, Kimura T, Morimoto T, Saito N, Shiomi H, Kawaguchi R, Kan H, Mukawa H, Fujita H, Ishise T, Hayashi F, Nagao K, Take S, Taniguchi H, Sakamoto H, Yamane T, Shiota K, Tamekiyo H, Okamura T, Kishi K, Miyazaki S, Yamamoto S, Yamaji K, Kawasaki T, Taguchi E, Nakajima H, Kosedo I, Tada T, Kadota K, Mitsudo K. Impact of angiographic peri-stent contrast staining (PSS) on late adverse events after sirolimus-eluting stent implantation: An observation from the multicenter j-Cypher registry PSS substudy. *Cardiovascular Intervention and Therapeutics* 2014;29:226-236.
 9. Ioroi T, Akao M, Iguchi M, Kato M, Kimura T, Izumi Y, Akaike A, Kume T. Serofendic acid protects against

- myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Journal of Pharmacological Sciences* 2014;126:274-280.
10. Isshiki T, Kimura T, Ogawa H, Yokoi H, Nanto S, Takayama M, Kitagawa K, Nishikawa M, Miyazaki S, Ikeda Y, Nakamura M, Saito S. Prasugrel, a Third-Generation P2Y12 receptor antagonist, in patients with coronary artery disease undergoing elective percutaneous coronary Intervention: Phase III, randomized, double-blind study. *Circulation Journal* 2014;78:2926-2934.
 11. Kato M, Kimura T, Kimura T, Hara T. Safety and effectiveness of controlled-release paroxetine in routine clinical practice: results of a postmarketing surveillance study of patients with depression. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 2015;11:435-452.
 12. Kawaji T, Shiomi H, Morimoto T, Tamura T, Nishikawa R, Yano M, Tazaki J, Imai M, Saito N, Makiyama T, Shizuta S, Ono K, Kimura T. Long-term efficacy and safety outcomes after unrestricted use of drug-eluting stents in patients with acute coronary syndrome - Mortality and major bleeding in a single-center registry. *Circulation Journal* 2014;78:1628-1635.
 13. Kawaji T, Shiomi H, Morimoto T, Tazaki J, Imai M, Saito N, Makiyama T, Shizuta S, Ono K, Kimura T. Clinical impact of left ventricular outflow tract obstruction in takotsubo cardiomyopathy. *Circulation Journal* 2015;79:839-846.
 14. Kawase Y, Saito N, Watanabe S, Bao B, Yamamoto E, Watanabe H, Higami H, Matsuo H, Ueno K, Kimura T. Utility of a scoring balloon for a severely calcified lesion: Bench test and finite element analysis. *Cardiovascular Intervention and Therapeutics* 2014;29:134-139.
 15. Kimura T, Shiomi H, Kuribayashi S, Isshiki T, Kanazawa S, Ito H, Ikeda S, Forrest B, Zarins CK, Hlatky MA, Norgaard BL. Cost analysis of non-invasive fractional flow reserve derived from coronary computed tomographic angiography in Japan. *Cardiovascular Intervention and Therapeutics* 2014;30:38-44.
 16. Ko E, Natsuaki M, Toyofuku M, Morimoto T, Matsumura Y, Oi M, Motohashi Y, Takahashi K, Kawase Y, Tanaka M, Kitada M, Yuzuki Y, Tamura T, Inoue K, Mitsudo K, Kimura T. Sirolimus-eluting stent implantation for ostial right coronary artery lesions: Five-year outcomes from the j-Cypher registry. *Cardiovascular Intervention and Therapeutics* 2014;29:200-208.
 17. Kubo T, Akasaka T, Kozuma K, Kimura K, Fusazaki T, Okura H, Shinke T, Ino Y, Hasegawa T, Takashima H, Takamisawa I, Yamaguchi H, Igarashi K, Kadota K, Tanabe K, Nakagawa Y, Muramatsu T, Morino Y, Kimura T. Vascular response to drug-eluting stent with biodegradable vs. durable polymer - Optical coherence tomography substudy of the next. *Circulation Journal* 2014;78:2408-2414.
 18. Kuwabara Y, Horie T, Baba O, Watanabe

- S, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Nakao T, Nishino T, Otsu K, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-451 exacerbates lipotoxicity in cardiac myocytes and high-fat diet-induced cardiac hypertrophy in mice through suppression of the LKB1/AMPK pathway. *Circ Res* 2015;116:279-288.
19. Marui A, Kimura T, Nishiwaki N, Mitsudo K, Komiya T, Hanyu M, Shiomi H, Tanaka S, Sakata R. Percutaneous coronary intervention versus coronary artery bypass grafting in patients with end-stage renal disease requiring dialysis (5-year outcomes of the CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2). *Am J Cardiol* 2014;114:555-561.
20. Marui A, Kimura T, Nishiwaki N, Mitsudo K, Komiya T, Hanyu M, Shiomi H, Tanaka S, Sakata R. Comparison of five-year outcomes of coronary artery bypass grafting versus percutaneous coronary intervention in patients with left ventricular ejection fractions $\leq 50\%$ versus $>50\%$ (from the CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2). *Am J Cardiol* 2014;114:988-996.
21. Nagao K, Sowa N, Inoue K, Tokunaga M, Fukuchi K, Uchiyama K, Ito H, Hayashi F, Makita T, Inada T, Tanaka M, Kimura T, Ono K. Myocardial expression level of neural cell adhesion molecule correlates with reduced left ventricular function in human cardiomyopathy. *Circulation: Heart Failure* 2014;7:351-358.
22. Nakamura M, Yamagishi M, Ueno T, Hara K, Ishiwata S, Itoh T, Hamanaka I, Wakatsuki T, Sugano T, Kawai K, Akasaka T, Tanaka N, Kimura T. Prevalence of visual-functional mismatch regarding coronary artery stenosis in the CVIT-DEFER registry. *Cardiovascular Intervention and Therapeutics* 2014;29:300-308.
23. Nakamura M, Yamagishi M, Ueno T, Hara K, Ishiwata S, Itoh T, Hamanaka I, Wakatsuki T, Sugano T, Kawai K, Akasaka T, Tanaka N, Kimura T. Modification of treatment strategy after FFR measurement: CVIT-DEFER registry. *Cardiovascular Intervention and Therapeutics* 2014;30:12-21.
24. Natsuaki M, Morimoto T, Furukawa Y, Nakagawa Y, Kadota K, Yamaji K, Ando K, Shizuta S, Shiomi H, Tada T, Tazaki J, Kato Y, Hayano M, Abe M, Tamura T, Shirotani M, Miki S, Matsuda M, Takahashi M, Ishii K, Tanaka M, Aoyama T, Doi O, Hattori R, Kato M, Suwa S, Takizawa A, Takatsu Y, Shinoda E, Eizawa H, Takeda T, Lee J-, Inoko M, Ogawa H, Hamasaki S, Horie M, Nohara R, Kambara H, Fujiwara H, Mitsudo K, Nobuyoshi M, Kita T, Kimura T. Late adverse events after implantation of sirolimus-eluting stent and bare-metal stent long-term (5-7 years) follow-up of the coronary revascularization demonstrating outcome study-kyoto registry cohort-2. *Circulation: Cardiovascular Interventions* 2014;7:168-179.
25. Natsuaki M, Morimoto T, Furukawa Y, Shiomi H, Ono K, Kimura T. Effect of statin therapy on cardiovascular outcomes after coronary

- revascularization in patients ≥ 80 years of age: Observations from the CREDO-Kyoto Registry Cohort-2. *Atherosclerosis* 2014;237:821-828.
26. Ohki T, Yokoi H, Kichikawa K, Kimura T, Snyder SA, Ragheb AO, O'Leary EE, Jaff MR, Ansel GM, Dake MD. Two-year analysis of the Japanese cohort from the Zilver PTX randomized controlled trial supports the validity of multinational clinical trials. *Journal of Endovascular Therapy* 2014;21:644-653.
 27. Ohno M, Hiraoka Y, Lichtenthaler SF, Nishi K, Saijo S, Matsuoka T, Tomimoto H, Araki W, Takahashi R, Kita T, Kimura T, Nishi E. Nardilysin prevents amyloid plaque formation by enhancing α -secretase activity in an Alzheimer's disease mouse model. *Neurobiol Aging* 2014;35:213-222.
 28. Oshita K, Itoh M, Hirashima S, Kuwabara Y, Ishihara K, Kuwahara K, Nakao K, Kimura T, Nakamura K, Ushijima K, Takano M. Ectopic automaticity induced in ventricular myocytes by transgenic overexpression of HCN2. *J Mol Cell Cardiol* 2015;80:81-89.
 29. Ruwald MH, Okumura K, Kimura T, Aonuma K, Shoda M, Kutya V, Ruwald A-H, McNitt S, Zareba W, Moss AJ. Syncope in High-Risk Cardiomyopathy Patients with Implantable Defibrillators: Frequency, Risk Factors, Mechanisms, and Association with Mortality: Results from the Multicenter Automatic Defibrillator Implantation Trial-Reduce Inappropriate Therapy (MADIT-RIT) Study. *Circulation* 2014;129:545-552.
 30. Saito S, Isshiki T, Kimura T, Ogawa H, Yokoi H, Nanto S, Takayama M, Kitagawa K, Nishikawa M, Miyazaki S, Nakamura M. Efficacy and safety of adjusted-dose prasugrel compared with clopidogrel in Japanese patients with acute coronary syndrome - The PRASFIT-ACS study -. *Circulation Journal* 2014;78:1684-1692.
 31. Sasaki N, Kunisawa S, Otsubo T, Ikai H, Fushimi K, Yasumura Y, Kimura T, Imanaka Y. The relationship between the number of cardiologists and clinical practice patterns in acute heart failure: A cross-sectional observational study. *BMJ Open* 2014;4.
 32. Shiomi H, Kozuma K, Morimoto T, Igarashi K, Kadota K, Tanabe K, Morino Y, Akasaka T, Abe M, Suwa S, Muramatsu T, Kobayashi M, Dai K, Nakao K, Uematsu M, Tarutani Y, Fujii K, Simonton CA, Kimura T. Long-term clinical outcomes after everolimus- and sirolimus-eluting coronary stent implantation: Final 3-year follow-up of the randomized evaluation of sirolimus-eluting versus everolimus-eluting stent trial. *Circulation: Cardiovascular Interventions* 2014;7:343-354.
 33. Shiomi H, Morimoto T, Makiyama T, Ono K, Furukawa Y, Nakagawa Y, Kadota K, Onodera T, Takatsu Y, Mitsudo K, Kita T, Sakata R, Okabayashi H, Hanyu M, Komiya T, Yamazaki F, Nishiwaki N, Kimura T. Evolution in practice patterns and long-term outcomes of coronary

- revascularization from bare-metal stent era to drug-eluting stent era in Japan. *Am J Cardiol* 2014;113:1652-1659.
34. Suematsu Y, Miura S-, Zhang B, Uehara Y, Tokunaga M, Yonemoto N, Nonogi H, Nagao K, Kimura T, Saku K. Associations between the consumption of different kinds of seafood and out-of-hospital cardiac arrests of cardiac origin in Japan. *IJC Heart and Vessels* 2014;2:8-14.
 35. Taniguchi T, Shiomi H, Toyota T, Morimoto T, Akao M, Nakatsuma K, Ono K, Makiyama T, Shizuta S, Furukawa Y, Nakagawa Y, Ando K, Kadota K, Horie M, Kimura T. Effect of preinfarction angina pectoris on long-term survival in patients with ST-segment elevation myocardial infarction who underwent primary percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol* 2014;114:1179-1186.
 36. Tazaki J, Morimoto T, Sakata R, Okabayashi H, Yamazaki F, Nishiwaki N, Mitsudo K, Kimura T. Impact of statin therapy on patients with coronary heart disease and aortic aneurysm or dissection. *Journal of Vascular Surgery* 2014;60:604-612.e2.
 37. 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- κ B under inflammatory conditions. *Scientific Reports* 2014;4.
 38. Tokushige A, Shiomi H, Morimoto T, Ono K, Furukawa Y, Nakagawa Y, Kadota K, Ando K, Shizuta S, Tada T, Tazaki J, Kato Y, Hayano M, Abe M, Hamasaki S, Ohishi M, Nakashima H, Mitsudo K, Nobuyoshi M, Kita T, Imoto Y, Sakata R, Okabayashi H, Hanyu M, Shimamoto M, Nishiwaki N, Komiya T, Kimura T. Incidence and outcome of surgical procedures after coronary artery bypass grafting compared with those after percutaneous coronary intervention: A report from the coronary revascularization demonstrating outcome study in Kyoto PCI/CABG registry cohort-2. *Circulation: Cardiovascular Interventions* 2014;7:482-491.
 39. Tsutsumi N, Kimura T, Arita K, Ariyoshi M, Ohnishi H, Yamamoto T, Zuo X, Maenaka K, Park EY, Kondo N, Shirakawa M, Tochio H, Kato Z. The structural basis for receptor recognition of human interleukin-18. *Nature Communications* 2014;5.
 40. Watanabe S, Horie T, Nagao K, Kuwabara Y, Baba O, Nishi H, Sowa N, Narazaki M, Matsuda T, Takemura G, Wada H, Hasegawa K, Kimura T, Ono K. Cardiac-specific inhibition of kinase activity in calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase- β leads to accelerated left ventricular remodeling and heart failure after transverse aortic constriction in mice. *PLoS ONE* 2014;9.
 41. Yamada S, Nakamura J, Asada M, Takase M, Matsusaka T, Iguchi T, Yamada R, Tanaka M, Higashi AY, Okuda T, Asada N, Fukatsu A, Kawachi H, Graf D, Muso E, Kita T, Kimura T, Pastan I, Economides AN, Yanagita M.

Twisted gastrulation, a bmp antagonist, exacerbates podocyte injury. *PLoS ONE* 2014;9.

42. Yamada Y, Kinoshita H, Kuwahara K, Nakagawa Y, Kuwabara Y, Minami T, Yamada C, Shibata J, Nakao K, Cho K, Arai Y, Yasuno S, Nishikimi T, Ueshima K, Kamakura S, Nishida M, Kiyonaka S, Mori Y, Kimura T, Kangawa K, Nakao K. Inhibition of N-type Ca²⁺ channels ameliorates an imbalance in cardiac autonomic nerve activity and prevents lethal arrhythmias in mice with heart failure. *Cardiovasc Res* 2014;104:183-193.
43. Yamaji K, Kubo S, Inoue K, Kadota K, Kuramitsu S, Shirai S, Ando K, Nobuyoshi M, Mitsudo K, Kimura T. Association of localized hypersensitivity and in-stent neoatherosclerosis with the very late drug-eluting stent thrombosis. *PLoS ONE* 2014;9.
44. Zaid M, Fujiyoshi A, Miura K, Abbott RD, Okamura T, Takashima N, Torii S, Saito Y, Hisamatsu T, Miyagawa N, Ohkubo T, Kadota A, Sekikawa A, Maegawa H, Nakamura Y, Mitsunami K, Ueshima H, Horie M, Nakano Y, Yamamoto T, Ogawa E, Miyazawa I, Murata K, Nozaki K, Shiino A, Araki I, Tsuru T, Toyama I, Ogita H, Kurita S, Maeda T, Miyamatsu N, Kita T, Kimura T, Nishio Y, Barinas-Mitchell EJM, Edmundowicz D, Hozawa A, Okuda N, Higashiyama A, Nagasawa S, Kita Y, Kadowaki T, Kadowaki S, Murakami Y, Ohno S. High-density lipoprotein

particle concentration and subclinical atherosclerosis of the carotid arteries in Japanese men. *Atherosclerosis* 2015;239:444-450.

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

2. 動脈硬化関連疾患自己抗体マーカーの ACS 症例における定量評価

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） 分担研究報告書

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

動脈硬化関連疾患自己抗体マーカーの ACS 症例における定量評価

研究分担者：日和佐 隆樹（千葉大学大学院医学研究院 遺伝子生化学 准教授）

研究要旨

我々はこれまで動脈硬化に関係する血清自己抗体マーカーを探索した結果、そのうちのいくつかは急性冠症候群（ACS）にも関連することが判明した。そこで本研究において、新たにプロテインアレイ法による一次スクリーニングを行ない、約 70 種類の候補マーカーを同定した。これらの精製タンパク質、または合成ペプチドを抗原として、血清抗体レベルを AlphaLISA 法により測定し、二次、及び三次スクリーニングの選別を行なった。その結果、ACS 患者検体における 3 種類の抗原に対する抗体レベルは健常者検体のみならず、疾患対照検体と比較しても有意に高かった。これらの自己抗体レベルを測定することにより ACS の発症を予測できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

ACS は発症前に予知することが最も重要である。しかしながら、発症前の患者検体を入手することは極めて困難であり、発症後の検体を調べてもそのほとんどは結果を見ているに過ぎない。その意味において、発症直後に特異的に出現する抗体は、発症が原因となって出現したとは考えられず、発症前から存在していたと推定される。即ち、そのような抗体は発症予測マーカーとなり得る。そこで、ACS の発症直後の検体に特異的に出現する抗体を同定し、予知マーカーとなり得るかどうかを検証する。

前年度の一次スクリーニングとして施行されたプロトアレイ解析において、約 70 種類の候補抗原が選別された。そこでこれらの中に有用マーカーが含まれているかどうかを二次、及び三次スクリーニングによって調べた。

B. 研究方法

二次スクリーニング用の抗原として用いるために、市販品のタンパク質抗原 33 種類を入手し

た。また、独自にサイトカイン類 11 種類を精製した。ペプチド抗原は 49 種類の抗原タンパク質のエピトープ部位として 95 種類を設計し、その未精製品を用いた。

それらの抗原に対する血清抗体レベルを AlphaLISA 法により調べた。タンパク質抗原は 10 µg/ml に希釈し、glutathione- ドナービーズ、または Nickel chelate- ドナービーズと抗ヒト IgG- アクセプタービーズを用いた Alpha (Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay) LISA 法により血清抗体レベルを解析した。ペプチド抗原は 400 ng/ml に希釈し、Avidin- ドナービーズと抗ヒト IgG- アクセプタービーズを用いた。

血清検体は HD コントロールとして健康診断受信者（柏戸クリニック）96 例、及び、ACS 群として、京都大学附属病院の ACS 検体 93 例、及び、千葉大附属病院の AMI 検体 3 例を用いた。

三次スクリーニングとして、二次スクリーニングで選別されたタンパク質 10 種類、及びペプチド 7 種類、動脈硬化関連マーカーである抗原ペプ

チド 3 種類、さらにサイトカイン 23 種類、プロテアーゼ類 6 種類、合わせて 49 種類の抗原を用いて同様に血清抗体レベルを AlphaLISA 法により調べた。用いた血清検体は、健常者検体 192 例、ACS 患者検体 380 例、疾患対照検体 196 例であった。

（倫理面への配慮）

急性冠症候群、及びその関連疾患の患者血清を用いる研究については、「動脈硬化関連疾患のバイオマーカーの開発」（実施責任者：日和佐隆樹）の課題名で千葉大学大学院医学研究院倫理委員会に申請し、平成 22 年 3 月 30 日に承認を受け、さらにその修正版が平成 27 年 2 月 20 日付けで承認されている（承認番号：千大医総第 110 号）。その申請書の記載に従って使用している。協力病院はそれぞれの倫理審査委員会の承認を得ている。検体はインフォームドコンセントを得て採取している。

C . 研究結果

二次スクリーニングの結果、プロトアレイ選別マーカーのうち、タンパク質抗原 8 種類、及びペプチド抗原 5 種類に対する血清抗体レベルは ACS 患者検体において健常者検体よりも有意に高かった。ペプチド抗原 5 種類のうち、3 種類はタンパク質抗原で有意差を示したものと共通しており、この 3 種類（PIK、GDN、SEL）は有用マーカーであると考えられた。これらの精製品の供給を理化学研究所に依頼した。

その他、サイトカイン類 4 種類に対する抗体レベルも ACS 患者検体において高かった。

上記の二次スクリーニングにおいて選別された抗原についてさらに別の検体セットを用いてバリデーションテストを行なった。ペプチドは精製品を用いた。さらに ACS に影響を及ぼす可能性のあるサイトカインやプロテアーゼ類についても調べた。その結果、タンパク質抗原 5 種類、ペプチド抗原 3 種類について、健常者検体、及び疾患対

照検体に比べ、ACS 患者検体は有意に高いレベルを示した。この中には NRD も含まれていた。これら 8 種類が現時点での最有力マーカーである。

一方で、前回の ACS 患者検体 6 例を用いたプロトアレイの結果をもとに、今回、別の健常者検体 5 例を解析し、両者の比較により新たに 17 種類の候補抗原を同定した。

D . 考察

二次スクリーニングで選別された抗原タンパク質のうち 3 種類、及び三次スクリーニングで選別された抗原のうち 2 種類は Akt を介するシグナル伝達経路に関係するタンパク質であった。このシグナル経路が心筋細胞のアポトーシスを抑制するという既報に関係すると推定される。

NRD は抗原だけでなく抗体レベルも ACS マーカーとして有用であると考えられた。

最初のプロトアレイ法により選別された候補マーカーのうち、現段階までに有用マーカーとして残ったのは 2 種類である。それは当初の段階で特異マーカーとして選別されたものが少なかったためと思われる。そこで、今回、別の健常者検体のプロトアレイ解析を行ない、前回の ACS 患者検体の結果と比較し、新たに 17 抗原を同定した。これらの中により有用なマーカーが含まれていると期待される。

ACS はさまざまな要因により発症すると考えられており、それぞれの要因によって対応するマーカーが異なることもあり得る。従って、詳細で正確な診断のためには、より多くのマーカーを同定することが必要である。

E . 結論

現段階において選別された 3 種類の有用マーカーは ACS の発症予測に適用できると推定された。

F . 研究発表

1 . 論文発表

1. Adachi-Hayama, M., Adachi, A., Shinozaki,

- N., Matsutani, T., Hiwasa, T., Takiguchi, M., Saeki, N., Iwadate, Y. (2014) Circulating anti-filamin C antibody as a potential serum biomarker for low-grade gliomas. **BMC Cancer** 14, 452.
2. Morii, S., Kato, M., Seki, N., Shinmen, N., Iwase, K., Takiguchi, M., Hiwasa, T. (責任著者) (2014) Inhibition of cell growth by nuclear receptor COUP-TFI: possible involvement of decorin in growth inhibition. **Biochem. Physiol.** S4-001.
 3. Machida, T., Kubota, M., Kobayashi, E., Iwadate, Y., Saeki, N., Yamaura, A., Nomura, F., Takiguchi, M. and Hiwasa, T. (責任著者) (2015) Identification of stroke-associated-antigens via screening of recombinant proteins from the human expression cDNA library (SEREX). **J. Translat. Med.** 13, 71.
 4. Goto, K., Sugiyama, T., Matsumura, R., Zhang, X. M., Kimura, R., Taira, A., Arita, E., Iwase, K., Kobayashi, E., Iwadate, Y., Saeki, N., Mori, M., Uzawa, A., Muto, M., Kuwabara, S., Takemoto, M., Kobayashi, K., Kawamura, H., Ishibashi, R., Sakurai, K., Fujimoto, M., Yokote, K., Nakayama, T., Harada, J., Kobayashi, Y., Ohno, M., Chin, H., Nishi, E., Machida, T., Iwata, Y., Mine, S., Kamitsukasa, I., Wada, T., Aotsuka, A., Katayama, K., Kikkawa, Y., Sunami, K., Takizawa, H., Nakamura, R., Tomiyoshi, G., Shinmen, N., Kuroda, H., Hiwasa, T. (責任著者) (2015) Identification of cerebral enfraction-specific antibody markers from autoantibodies detected in patients with systemic lupus erythematosus. **J. Mol. Biomark. Diagnos.** 6: 2.
 5. Shimada, H., Ito, M., Kagaya, A., Shiratori, T., Kuboshima, M., Suzuki, M., Liu, T. L., Nabeya, Y., Matsubara, H., Matsushita, K., Nomura, F., Takiguchi, M., Hiwasa, T. (責任著者) (2015) Elevated serum antibody levels against cyclin L2 in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **J. Cancer Sci. Ther.** 7(2), 60-66.
 6. Kuroiwa, N., Iwase, K., Morii, S., Takiguchi, M., Hiwasa, T. (責任著者) (2015) Up-regulation of growth-inhibitory or tumor suppressive genes by overexpression of C/EBP or C/EBP in ras-transformed NIH3T3 cells. **Integr. Mol. Med.** 2(2): 150-157.
- ## 2. 学会発表
1. 日和佐隆樹、後藤憲一郎、松村竜太郎、杉山隆夫、瀧口正樹 (2014) 全身性エリテマトーデス患者の自己抗体から選別された脳梗塞血清抗体マーカー . 第 10 回日本臨床プロテオーム研究会 (2014.5.10、東京)
 2. 日和佐隆樹、佐藤万里子、木村理沙、瀧口正樹、峯清一郎、竹本稔、小林一貴、河村治清、石橋亮一、横手幸太郎、中村利華、富吉郷、新免奈津子、黒田英行 (2014) 脳梗塞および糖尿病の診断に有用な血清 BMP-1 抗体マーカー . 第 19 回日本病態プロテアーゼ学会 (2014.8.8-9、大阪)
 3. 島田英昭、谷島聡、小池淳一、松下一之、野村文夫、日和佐隆樹、田川雅俊 (2014) 消化管癌患者における RalA 抗原に対する免疫反応 . 第 73 回日本癌学会学術総会 (2014.9.25-27、横浜)
 4. 日和佐隆樹、峯清一郎、木村理沙、佐藤万里子、張曉萌、瀧口正樹、小林英一、岩立康男、佐伯直勝、後藤憲一郎、松村竜太郎、杉山隆夫、町田利生、工藤孝、土居洋文、中村利華、富吉郷、新免奈津子、黒田英行 (2014) 動脈硬化性脳梗塞に対応する血清抗体マーカーの同定 . 第 87 回日本生化学会 (2014.10.15-18、京都)
 5. 日和佐隆樹 (2014) 動脈硬化関連疾患の血清

抗体マーカーの開発．第 87 回日本生化学会
(2014.10.15-18、京都)(フォーラム)

6. 日和佐隆樹 (2014) 動脈硬化症に対応する血清抗体マーカーの同定．第回日本分子生物学会
(2014.11.25-27、横浜)(フォーラム)

G . 知的所有権の取得状況

1 . 特許取得

1. 「デオキシハイプシン・シンターゼ遺伝子を指標として用いる動脈硬化の検出方法」2014 年 11 月 7 日出願、発明者：中村利華、黒田英行、富吉郷、日和佐隆樹、瀧口正樹、佐伯直勝；出願者：千葉大学及び藤倉化成株式会社、出願番号：特願 2014-226847 号
2. 「動脈硬化診断用ポリペプチドマーカー、及び該マーカー等を用いる動脈硬化の検出方法、並びに動脈硬化診断用キット」2014 年 11 月 12 日特許査定(中国)、発明者：中村利華、黒田英行、富吉郷、日和佐隆樹、瀧口正樹、佐伯直勝、町田利生；出願者：千葉大学及び藤倉化成株式会社、出願番号：特願 2008-209210

2 . 実用新案登録

該当なし

3 . その他

1. 分担執筆：日和佐隆樹 (2014) 疾患抗体マーカーの開発．医学のあゆみ－臨床プロテオミクス．251 巻．953-957 頁.

3. 急性冠症候群バイオマーカーとしてのマイクロ RNA の可能性について

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） 分担研究報告書

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

急性冠症候群バイオマーカーとしてのマイクロ RNA の可能性について

研究分担者：尾野 亘（京都大学大学院医学研究科 循環器内科学 准教授）

研究要旨

細胞の中だけでなく、血液を含む体液にもマイクロ RNA が脂質膜に包まれて存在している。我々は心血管疾患の患者血清中のマイクロ RNA について検討した。その結果、急性冠症候群において、胸痛発症後トロポニン T よりも早期に末梢血に miR-133 が上昇し、これがトロポニン T とよく相関することを見出した。さらに、この血中マイクロ RNA が臓器間において情報を伝達する可能性についても明らかにした(Kuwabara Y et al. *Circulation: Cardiovascular Genetics*. 2011;4:446-454.)。さらに心血管疾患症例において血中および体液中の診断マーカー、情報伝達について検討をつづけている。

A. 研究目的

我々は、心血管病における病態生理学的意義がまだ充分解明されていない核酸、特にマイクロ RNA の疾患バイオマーカー、あるいは予知マーカーとしての可能性を追求している。

心不全の病態に関与している可能性のあるマイクロ RNA を同定し、その診断能および病態形成への寄与を検討するのが本年度の研究の主目的である。心不全関連血中マイクロ RNA のスクリーニングのために、心不全の急性期および緩解期の血清を用いて検討を行う。同一個人の血清を比較して検討を行うことにより個体差を排除した病態に特異的なデータが得られるものと考えている。

B. 研究方法

急性心不全の増悪期と緩解期の血清サンプルを比較し、その変動から疾患関連マイクロ RNA 候補を選出する。このためのスクリーニングとしてプールした血清からマイクロ RNA を抽出し、定量的 PCR 法と RNA シークエンス法を用いて網羅的にマイクロ RNA の変動を検出した。これにより変動が確認されたマイクロ RNA については症

例ごとに個別に抽出および定量を行う。これらにより得られた発現量およびその変化のデータを臨床的情報と照らし合わせ、診断能や予後予測能を検定する。これらの臨床情報との相関から血清中のマイクロ RNA の働きとして想定されるものについては細胞・動物モデルにおいて更なる実験を行い、機能解明を行う。

（倫理面への配慮）

「心血管疾患患者における血中バイオマーカーおよび RNA 発現レベルと病態との関連の検討（ヒト遺伝子解析承認番号 G-322）」は倫理委員会にて承認済みであり、倫理面で問題のないように進める。

C. 研究結果

少数例のプールサンプルからの網羅的解析の結果、数種類のマイクロ RNA の変動が確認された。これは定量的 PCR 法および RNA シークエンス法のいずれにおいても確認されており、信頼性が高いものと考えている。具体的には臓器特異的な発現が知られているマイクロ RNA-X1、血管内皮機能に重要とされるマイクロ RNA-X2 の急性期での

上昇と治療による低下などが観察されている。これらの変動を今後、個別症例からの RNA 抽出および定量を行い確認する。また、個別の定量値と臨床データとの相関を検討する。また並行して動物の心不全モデルにおいても同様の結果が得られるかどうか検討を開始する。

D . 考察

心不全患者の診断における血清マイクロ RNA についての報告は少数散見されるが、いずれも健常者との比較で検討しており急性期の変動に着目した報告はまだ見られていない。我々は短期間の間に変動する疾患において、同一個体内での要素を比較することでその要素に与える当該疾患の純粋な影響を抽出することが可能であると考えている。急性心不全はこの条件によく合致する疾患であり、本研究は心不全にまつわる研究という観点だけでなく、生体におけるストレスが血清中のマイクロ RNA を変動させるモデルとしても非常に意義深いものであると考えている。

E . 結論

心不全の急性期において血清中のマイクロ RNA 量は変動している可能性が示唆された。また、これは異なる二つの方法によっても同様の結果が得られており結果の信頼性は高いものと考えられる。今後多症例における検討において同様の変動が確認されればこれらのマイクロ RNA の変動は心不全の病勢の変動を反映していると考えられ、心不全の診断に有用である可能性がある。

F . 研究発表

1 . 論文発表

1. Horie-T, Baba-O, Kuwabara-Y, Yokode-M, Kita-T, Kimura-T, Ono-K; MicroRNAs and lipoprotein metabolism. *J Atheroscler Thromb.* 2014;21:17-22.
2. Nagao K, Sowa N, Inoue K, Tokunaga M, Fukuchi K, Uchiyama K, Ito H, Hayashi F, Makita T, Inada T, Tanaka M, Kimura T, and Ono K. Myocardial expression level of neural cell adhesion molecule correlates with reduced left ventricular function in human cardiomyopathy. *Circulation; Heart Failure.* 2014;7:351-8
3. Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Sowa N, Yahagi N, Shimano H, Matsumura S, Inoue K, Marusawa H, Nakamura T, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T, and Ono K; MicroRNA-33 regulates sterol regulatory element-binding protein 1 expression in mice. *Nat Commun.* 2013;4:2883. doi: 10.1038/ncomms3883.
4. Ono K; Seeing is believing - imaging of a plaque in the renal artery. *J Cardiol Cases* 2013 in press
5. Yamamoto E, Natsuaki M, Morimoto T, Furukawa Y, Nakagawa Y, Ono K, Mitsudo K, Nobuyoshi M, Doi O, Tamura T, Tanaka M, Kimura T; CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2 Investigators. Long-Term Outcomes After Percutaneous Coronary Intervention for Chronic Total Occlusion (from the CREDO-Kyoto Registry Cohort-2). *Am J Cardiol.* 2013;112:767-74.
6. Takanabe-Mori R, Ono K, Wada H, Takaya T, Ura S, Yamakage H, Satoh-Asahara N, Shimatsu A, Takahashi Y, Fujita M, Fujita Y, Sawamura T, Hasegawa K. Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1 Plays an Important Role in Vascular Inflammation in Current Smokers. *J Atheroscler Thromb.* 2013;20:585-90.
7. Morikami Y, Natsuaki M, Morimoto T, Ono

K, Nakagawa Y, Furukawa Y, Sakata R, Aota M, Okada Y, Onoe M, Kawasuji M, Koshiji T, Nakajima H, Nishizawa J, Yamanaka K, Yamamoto H, Kimura T; CREDO-Kyoto PCI/CABG registry cohort-2 investigators. Impact of polyvascular disease on clinical outcomes in patients undergoing coronary revascularization: An observation from the CREDO-Kyoto Registry Cohort-2. **Atherosclerosis**. 2013;228:426-31.

8. Tamaki Y, Iwanaga Y, Niizuma S, Kawashima T, Kato T, Inuzuka Y, Horie T, Morooka H, Takase T, Akahashi Y, Kobuke K, Ono K, Shioi T, Sheikh SP, Ambartsumian N, Lukanidin E, Koshimizu TA, Miyazaki S, Kimura T. Metastasis-associated protein, S100A4 mediates cardiac fibrosis potentially through the modulation of p53 in cardiac fibroblasts. **J Mol Cell Cardiol**. 2013;57:72-81.
9. Tokushige A, Shiomi H, Morimoto T, Ono K, Furukawa Y, Nakagawa Y, Kadota K, Iwabuchi M, Shizuta S, Tada T, Tazaki J, Kato Y, Hayano M, Abe M, Hamasaki S, Tei C, Nakashima H, Mitsudo K, Nobuyoshi M, Kita T, Kimura T. Influence of initial acute myocardial infarction presentation on the outcome of surgical procedures after coronary stent implantation: a report from the CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2. **Cardiovasc Interv Ther**. 2013 ;28:45-55.

2 . 学会発表

1. 国際学会

1. Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y,

Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Sowa N, Yahagi N, Shimano H, Hasegawa K, Kume N Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33 encoded by an intron of sterol regulatory element-binding protein-2 (Srebp2) regulates Srebp1 in vivo. The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014 April 14th, Kyoto, Japan.

2. Baba O, Horie T, Kuwabara Y, Chujo Y, Watanabe S, Kinoshita M, Horiguchi M, Nakamura T, Chonabayashi K, Hishizawa M, Hasegawa K, Kume N Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33 deficiency reduces atherosclerotic plaque progression in apoE knockout mice. The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014 April 14th, Kyoto, Japan.
3. Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakano T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33 deficiency leads to high fat diet- induced obesity and insulin resistance in vivo. European Society of Cardiology Congress 2014, 30 Aug 2014 - 4 Sep., Barcelona – Spain.
4. Nishino T, Horie T, Baba O, Kuwabara Y, YOkode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33, embedded in Srebf2 intron, regulate fatty acid synthesis through targeting SREBP-1 in vivo. European Society of Cardiology Congress 2014, 30 Aug 2014 - 4 Sep., Barcelona – Spain.
5. Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakano T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Kimura T, Ono K. Serum HDL-C decreases in microRNA-33b knock-in mice for an intron of sterol regulatory element-binding factor 1 (Srebf1). 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress September 12-14, Kyoto, Japan.

6. Baba O, Horie T, Ono K, Kuwabara Y, Sowa N, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T. MicroRNA-33 deficiency reduces atherosclerotic plaque progression in apoE knockout mice. 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress September 12-14, Kyoto, Japan.
 7. Kuwabara Y, Horie T, Baba O, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Nakao T, Nishino T, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-451 is involved in diabetic cardiomyopathy through suppression of the LKB1/AMPK pathway. 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress September 12-14, Kyoto, Japan.
 8. Nishino T, Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33, embedded in Srebf2 intron, regulate fatty acid synthesis through targeting SREBP-1 in vivo. 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress September 12-14, Kyoto, Japan.
 9. Current Topics in HDL-C~Novel regulation by microRNA-33 and implications for future therapeutic strategies~. Koh Ono. The 8th Otsuka Asia Atherosclerosis Conference Oct 11th-12th, 2014 Shanghai, China.
 10. Nishino T, Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Ide Y, Nakazeki F, Koyama S, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33, Located Within Srebf2 Intron, Regulate Fatty Acid Synthesis via Targeting SREBP-1 in vivo. American Heart Association Annual Scientific Sessions 2014, November 15-19, Chicago, Illinois, U.S.A.
 11. Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Ide Y, Nakazeki F, Koyama S, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33b Knock-in Mice for an Intron of Sterol Regulatory Element-Binding Factor 1 (Srebf1) Exhibit Reduced HDL-C in vivo. American Heart Association Annual Scientific Sessions 2014, November 15-19, Chicago, Illinois, U.S.A.
 12. Wada H, Satoh-Asahara N, Akao M, Abe M, Ono K, Morimoto M, Shimatsu A, Takahashi Y, Hasegawa K. Self-rating Depression Scale Score as an Inverse and Independent Predictor of Successful Smoking Cessation with a Pharmacological Treatment for Nicotine Addiction. American Heart Association Annual Scientific Sessions 2014, November 15-19, Chicago, Illinois, U.S.A.
- 2.国内学会
1. 堀江貴裕. SREBP-2のイントロンに存在するマイクロRNA-33はSREBP-1の発現を制御する.第51回日本臨床分子医学会学術集会 YIA-3 日本臨床分子医学会奨励賞(YIA)受賞 平成26年4月11日, 東京.
 2. 桑原康秀. microRNA-451はLKB1-AMPK経路を抑制することで、ラット心筋細胞において細胞障害を、生体においては高脂肪食誘導性心肥大を誘導する. 第51回日本臨床分子医学会学術集会 平成26年4月11日, 東京.
 3. 馬場 理. アポE欠損マウスにおいてマイクロRNA-33欠損は動脈硬化進展を抑制する. 第51回日本臨床分子医学会学術集会 平成26年4月11日, 東京.
 4. 堀江貴裕、西野共達、馬場理、桑原康秀、中尾哲史、西賀雅隆、宇佐美俊輔、出原正康、

- 矢作直也、島野仁、横出正之、北徹、木村剛、尾野巨. SREBP-2 のイントロンに存在するマイクロ RNA-33 は SREBP-1 の発現を制御する. 第 1 回 Research Planet 平成 26 年 5 月 10 日,
5. 尾野 巨. Featured Session:最先端の病態研究 「microRNA-33 の動脈硬化・脂質制御における役割」. 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 平成 26 年 7 月 10 日, 東京.
 6. 尾野 巨. 第 9 回五島雄一郎賞受賞講演 「High impact of microRNA-33 on atherosclerosis and lipid metabolism」. 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 平成 26 年 7 月 11 日, 東京.
 7. 尾野 巨. 「脂質代謝を起点としたマイクロ RNA、転写因子の相互作用の解明」. 転写代謝システム班会議 平成 26 年 7 月 12 日, 仙台.
 8. 馬場 理、堀江貴裕、桑原康秀、木村 剛、尾野 巨. 「マイクロ RNA の骨髄機能および慢性炎症における役割」. 転写代謝システム班会議 平成 26 年 7 月 12 日, 仙台.
 9. 西野共達、堀江貴裕、尾野 巨. 「microRNA-33 は生体内で SREBP-1 を介して脂肪酸合成を制御する」. 転写代謝システム班会議 平成 26 年 7 月 12 日, 仙台.
 10. 「microRNA-33b knock-in mice for an intron of sterol regulatory element-binding factor 1 (Srebf1) exhibit reduced HDL-C in vivo」尾野 巨、堀江貴裕、西野共達、北徹、木村剛. 第 1 回 iHF フォーラム 平成 26 年 8 月 10 日,
 11. 尾野 巨、堀江貴裕、西野共達、北 徹、木村 剛. microRNA-33b knock-in mice for an intron of sterol regulatory element-binding factor 1 (Srebf1) exhibit reduced HDL-C in vivo. 第 5 回 Molecular Cardiovascular Conference 平成 26 年 9 月 5-6 日, 神戸ベイシェラトンホテル&タワーズ.
 12. 桑原康秀、堀江貴裕、馬場 理、出原正康、宇佐美俊輔、中尾哲史、西賀雅隆、西野共達、井手裕也、中関典子、小山智史、木村 剛、尾野 巨. 飽和脂肪酸により誘導される microRNA-451 は、糖尿病性心筋症の増悪因子である. 第 5 回 Molecular Cardiovascular Conference 平成 26 年 9 月 5-6 日, 神戸ベイシェラトンホテル&タワーズ.
 13. 堀江貴裕、西野共達、馬場 理、桑原康秀、中尾哲史、西賀雅隆、宇佐美俊輔、出原正康、中関典子、井手裕也、小山智史、曾和尚也、矢作直也、島野 仁、横出正之、北 徹、木村 剛、尾野 巨. Srebf1 のイントロンに microRNA-33b をノックインしたマウスは HDL コレステロールの減少を示す. 新学術領域研究 転写代謝システム 新学術領域若手ワークショップ 2015 年 2 月 6-7 日, 群馬県伊香保.
 14. 桑原康秀、堀江貴裕、中島康弘、伯野大彦、馬場 理、出原正康、宇佐美俊輔、西賀雅隆、西野共達、中尾哲史、井手裕也、中関典子、小山智史、北 徹、木村 剛、尾野 巨. 心肥大・心不全における lincRNA の機能解析. 新学術領域研究 転写代謝システム 新学術領域若手ワークショップ 2015 年 2 月 6-7 日, 群馬県伊香保.
 15. 中尾哲史、堀江貴裕、馬場 理、西賀雅隆、西野共達、宇佐美俊輔、桑原康秀、出原正康、中関典子、井手裕也、小山智史、曾和尚也、大野聡子、青木浩樹、木村 剛、尾野 巨. miR-33 ノックアウトマウスにおける大動脈瘤についての検討. 新学術領域研究 転写代謝システム 新学術領域若手ワークショップ 2015 年 2 月 6-7 日, 群馬県伊香保.
 16. 西野共達、堀江貴裕、馬場 理、桑原康秀、尾野 巨. microRNA-33b promotes atherosclerotic plaque formation in vivo. 新学術領域研究 転写代謝システム 新学術領域若手ワークショップ 2015 年 2 月 6-7 日,

群馬県伊香保.

17. 馬場理、堀江貴裕、伯野大彦、中島康弘、桑原康秀、中尾哲史、出原正康、宇佐美俊輔、西賀雅隆、西野共達、井手裕也、中関典子、小山智史、木村 剛、尾野 亘. マイクロRNA-33 の骨髄機能および慢性炎症における役割. 新学術領域研究 転写代謝システム 新学術領域若手ワークショップ 2015 年 2 月 6-7 日, 群馬県伊香保.
18. 尾野 亘. 「miR-33a/b による細胞・臓器レベルの脂質代謝制御機構」. 第 44 回日本心臓血管作動物質学会 シンポジウム 2 高血圧における臓器連関 2015 年 2 月 7 日, 高松.

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

4. メタボリック・シンドロームにおける肝線維化と NRDC の関連

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） 分担研究報告書

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

メタボリック・シンドロームにおける肝線維化と NRDC の関連

研究分担者：妹尾 浩（京都大学大学院医学研究科 消化器内科学 講師）

研究要旨

循環器疾患、糖尿病などとリンクしたメタボリック・シンドロームのひとつとして、消化器領域では、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）が注目されている。NASH および続発する肝線維化（肝硬変）に果たす NRDC の意義を明らかにするために、平成 26 年度は NRDC ノックアウトマウスを用いて、肝臓の炎症と線維化を検討した。コリン欠乏食および高脂肪食の投与により、野生型マウスでは肝臓の脂肪沈着、炎症と線維化を認めた。しかし NRDC の欠如により、肝臓に脂肪沈着を認めても炎症および線維化は生じなかった。これらの検討から、NRDC が NASH とそれに続発する肝硬変の病態に重要な役割を果たしていることが示唆された。

A. 研究目的

循環器疾患、糖尿病等の生活習慣病と密接な関連をもち、その一表現型として注目を集めている消化器疾患が、非アルコール性脂肪性肝炎（Non alcoholic steatohepatitis、以下 NASH）である。近年、B 型肝炎や C 型肝炎などのウイルス性肝炎は、診断および治療法の進歩により、その患者数は頭打ちになりつつある。ところが、健康診断や人間ドックにおいて指摘される肝機能異常者は増加傾向にあることが問題となっている。これら肝機能異常を示す健康診断、人間ドック受験者数の増加の主因として、NASH が大きな割合を占めると考えられている。実際、肥満のある 40 歳以上の男性では約 50% に、女性では約 25% に脂肪肝を合併し、そのうち少なからぬ数が NASH を罹患しているとされる。そして、NASH およびそれに起因する肝硬変、肝細胞癌の発症は近年とくに頻度を増しつつあり、NASH に対する治療介入がない場合、5～10 年という比較的早い経過で 5～20% の患者が肝硬変へと進行し、さらに 5 年累計肝細胞癌の発症率は 11.3% に及ぶという。

これらの疫学的事実に基づいて、NASH およびそれに続発する肝線維化の病態解明と治療、予防法の開発が待ち望まれている。

そこで研究分担者らは、NASH およびその進展状態である肝硬変の病態解明と新規治療、予防標的の探索を課題とした。炎症の制御に重要な役割を果たすナルディライジン（以下 NRDC）に着目し、平成 25 年度には NASH 発症に NRDC が必要であることを、主にマウスモデルを用いて明らかにした。平成 26 年度には、NASH に続発する肝線維化発症に、NRDC がどのような役割を果たすかを、遺伝子改変マウスを用いた実験を通じて解明することとした。

B. 研究方法

野生型（WT）および NRDC ノックアウト（KO）マウスに対して、NASH を生じさせるためにコリン欠乏食、高脂肪食、またはコントロール食を経口摂取させた。4、12、20 週後に、各マウスから肝臓を採取し、組織学的、免疫組織学的検討を行った。また、肝線維化はシリウス・レッド染

色で評価した。さらに、collage I、collagen IV、TIMP、TGF-beta1、alpha-SMA など線維化進展にかかわる因子について、定量的 PCR 法で mRNA の定量を行った。

（倫理面への配慮）

平成 26 年度には、遺伝子改変マウスを用いた前臨床研究を中心に行った。それに際して、組換え DNA 実験については、京都大学組換え DNA 実験安全委員会の承認を得たのち、「組換え DNA 実験指針」に基づいて実施した。動物実験に関しては、京都大学動物実験委員会の承認を得たのち、「動物の保護および管理に関する法律」、「実験動物の飼育および保管に関する基準」、「大学等における実験動物の通知」に準拠し、動物実験が適切かつ愛護的に行われるよう配慮した。したがって、本研究遂行にあたり、倫理面での問題はないものと判断した。

C . 研究結果

コリン欠乏食を投与した WT マウスでは投与開始後 4 週から肝臓に脂肪が沈着し、12、20 週と徐々に脂肪の沈着は増強した。また高脂肪食を投与した場合も、WT マウスでは経時的に肝臓への脂肪沈着を認め、投与開始後 20 週で脂肪沈着は明らかとなった。コントロール食を投与した WT マウスでも同様に、経時的に軽度ながら脂肪沈着が増強したが、コリン欠乏食および高脂肪食に比べて軽度であった。一方、NRDc KO マウスでは、コリン欠乏食、高脂肪食ともに肝臓への脂肪沈着の程度はやや軽微であったが、やはり脂肪肝と判断し得た。肝臓中の中性脂肪を測定したところ、WT マウスでも NRDc KO マウスでも、コリン欠乏食、高脂肪食の投与により、組織像に比例して中性脂肪の増加を認めた。しかし、血清中の肝逸脱酵素（ALT）は、コリン欠乏食または高脂肪食を投与した WT マウスのみで上昇し、NRDc KO マウスでは上昇を認めなかった。なお、コントロ

ール食を投与した群では、経過中 WT マウスでも NRDc KO マウスでも、ALT の上昇は認めなかった。引き続き、肝線維化をシリウス・レッド染色で検討したところ、WT マウスではコリン欠乏食では投与開始後 12 週、20 週と徐々に肝線維化が増強し、高脂肪食では投与開始後 20 週目に肝線維化を認めた。なお、コントロール食を投与した群では、とくに肝線維化は認めなかった。さらに、collage I、collagen IV、TIMP、TGF-beta1、alpha-SMA など線維化進展にかかわる因子についても mRNA の定量を行ったところ、WT マウスではコリン欠乏食で経時的に、高脂肪食で投与開始後 20 週目にすべての因子の mRNA の上昇を認めた。それに対して NRDc KO マウスでは、シリウス・レッド染色による組織学的な肝線維化、および線維化マーカー mRNA の上昇を全く認めなかった。

D . 考察

NASH モデルとしてよく用いられるコリン欠乏食に加えて高脂肪食の投与によっても、WT マウスおよび NRDc KO マウスの肝臓には脂肪沈着を認め、両食餌負荷はヒトの脂肪肝を良く再現するモデルと考えられた。しかし、NRDc KO マウスでは、コリン欠乏食および高脂肪食の投与によっても、肝組織中に脂肪滴の沈着を認めながら、血清中の肝逸脱酵素が上昇しなかったことから、NRDc の欠如により、単純性脂肪肝は生じても NASH に至らないことが示された。さらに、近年臨床的重要性を増している NASH に続発する肝線維化の進展に関しても、コリン欠乏食および高脂肪食の投与により、NRDc が欠如している場合はまったく線維化が生じないことが明らかとなった。

NASH の臨床上の問題点は、冒頭でも触れたように、今後中長期的にはウイルス性肝炎にかわって、肝硬変、肝細胞癌のもっとも主要な原因になることが予想されることである。このように NRDc が NASH と肝線維化の双方の進展

に決定的な役割を果たし、NRDc の欠損により、ほぼ完全に NASH と肝線維化が抑制されたことは注目に値する。研究分担者らは、NRDc が代表的な炎症性サイトカイン TNF-alpha のシグネリングを介して肝臓の炎症を制御することを平成 25 年度の研究によって示した。それに引き続き、平成 26 年度には NRDc が肝線維化もきわめて明瞭に制御する因子であることを示すことができた。今後は、これらふたつの知見を統合、展開していくことによって、新たな国民病の治療法を開発し、またその発症、増加を予防する方策作りに貢献すべきと考える。

E . 結論

コリン欠乏食投与、高脂肪食負荷によるマウス実験は、ヒト脂肪肝および NASH を良く再現するモデルであることが確認された。NRDc の欠如によって、単純性脂肪肝は生じて NASH を生じなかったことから、NRDc は NASH の病態に極めて重要な役割を果たすことが示唆された。さらに、NRDc の欠如によって、肝線維化も全く生じなかったことは、NASH に続発する肝線維化（肝硬変）の病態解明の一助となるとともに、新たなメタボリック・シンドロームの治療、予防標的としての NRDc の可能性を示唆すると思われた。

F . 研究発表

1 . 論文発表

1. Matsumoto Y, Matsukawa H, Seno H, Ono S. Breast cancer metastasis to the esophagus diagnosed using endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration. **J Gastroenterol Hepatol.** 2015 Feb;30(2):233.
2. Ikuta K, Umeda M, Seno H. Esophageal ulcer due to lymphoma. **Intern Med.** 2014;53(22):2649-50.
3. Kimura Y, Seno H, Matsumoto Y, Yamashita Y. Primary splenic

angiosarcoma. **Intern Med.** 2014;53(15):1717-9.

4. 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. Deletion of nardilysin prevents the development of steatohepatitis and liver fibrosis. **PLoS One.** 2014 May 21;9(5):e98017.
5. Kimura Y, Seno H, Ono S. A case of acute necrotizing esophagitis. **Gastrointest Endosc.** 2014 Sep;80(3):525-6.
6. Ikuta K, Seno H, Chiba T. Molecular changes leading to gastric cancer: a suggestion from rare-type gastric tumors with GNAS mutations. **Gastroenterology.** 2014 May;146(5):1417-8.
7. 妹尾浩、上尾太郎、中西祐貴、千葉勉. 大腸がん幹細胞に特異的な因子がもつ可能性. **がん分子標的治療** 12, 52-56, 2014.
8. 妹尾浩. 消化管におけるがんの微小環境と幹細胞の研究. **最新医学** 69, 120-125, 2014.
9. 妹尾浩、千葉勉. 癌幹細胞を特定するマーカーの可能性. **医学のあゆみ** 284, 863-864, 2014.

2 . 学会発表

1. Seno H, Kanda K, Nishi E, Chiba T. The role of Nardilysin in intestinal tumorigenesis. The 4th symposium on TGF-beta family and cancer, January, 12, 2015, Tsukuba, Japan.
2. Seno H. The role of Dclk1-positive cells in digestive organ tumors. 4th Global Cancer Genomics Consortium, November, 14, 2014, Kyoto, Japan.
3. Seno H. Dclk1, a specific marker for cancer stem cells that does not mark normal stem cells. **iPS and Stem Cells in Cancer**

Research, April, 17, 2014, Kyoto, Japan.

4. 妹尾浩、丸野貴久、山賀雄一、中西祐貴、福田晃久、千葉勉. 細胞系譜解析を用いた消化器腫瘍幹細胞の検討. 第 14 回日本再生医療学会総会 2015.3. 横浜
5. 妹尾浩. 細胞系譜解析が示す消化器がん幹細胞マーカーの可能性. 愛知県がんセンター特別招聘セミナー 2015.2.6 名古屋
6. 妹尾浩. 消化器腫瘍モデルにおける DCLK1 陽性細胞の意義. 平成 26 年度がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動冬期公開シンポジウム 2015.1.28 東京
7. 妹尾浩. 大腸腫瘍幹細胞を標的とした新規治療法の可能性. がん医療研修機構 第 17 回オンコロジーセミナー 2014.11.15 東京
8. 妹尾浩. 消化器癌モデルマウスにおける癌幹細胞マーカーの意義. 第 8 回 In vivo 実験医学シンポジウム 2014.11.13 東京
9. 妹尾浩. 消化器癌モデルマウスにおける Dclk1 陽性細胞の役割. 第 1 回六甲医学研究会 2014.11.8 神戸
10. 妹尾浩、丸野貴久、山賀雄一、吉岡拓人、中西祐貴、千葉勉. Role of Dclk1-expressing cells in digestive organ tumors. 第 73 回日本癌学会学術総会 コアシンポジウム 1 Reprograming and transdifferentiation in cancer 2014.9.26 横浜
11. 丸野貴久、福田晃久、妹尾浩、千葉勉. 膵腫瘍幹細胞マーカーの探索. 第 73 回日本癌学会学術総会 2014.9.26 横浜 パシフィコ横浜
12. 山賀雄一、妹尾浩、千葉勉. Microarray analysis of Dclk1-positive cells in ApcMin mouse polyps. 第 73 回日本癌学会学術総会 2014.9.25 横浜
13. 妹尾浩、中西祐貴、千葉勉. Dclk1, a specific marker for tumor stem cells in digestive organs. 癌治療の未来 消化器癌幹細胞研究と最新の知見 第 52 回日本癌治療学会学術集

会 高松宮妃癌研究基金共催国際シンポジウム 2014.8.28 横浜

14. 妹尾浩. がん幹細胞を標的とした新しいがん治療の可能性. 第 2 回生命医科学コロキウム 2014.6.27 草津
15. 千葉勉、中西祐貴、妹尾浩. マウスモデルを用いた大腸がん幹細胞マーカーDclk1の同定. 第 100 回日本消化器病学会総会 シンポジウム 2014.4.25 東京

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

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Goto K, Sugiyama T, Matsumura R, Zhang Xc, Kimura R, Taira A, Arita E, Iwase K, Kobayashi E, Iwade Y, Saeki N, Mori M, Uzuawa A, Muto M, Kuwabara S, Takemoto M, Kobayashi K, Kawamura H, Ishibashi R, Sakurai K, Fujimoto, M, Yokote K, Nakayama T, Harada J, Kobayashi Y, Ohno M, Chin H, Nishi E, Machida T, Iwata Y, Mine S, Kamitsukasa I, Wada T, Aotsuka A, Katayama K, Kikawa Y, Sunami K, Takizawa H, Nakamura R, Tomiyoshi G, Shinmen N, Kuroda H, Hiwasa T	Identification of cerebral infarction-specific antibody markers from autoantibodies detected in patients with systemic lupus erythematosus.	J. Mol. Biomark. Diagn.	6	2	2015

<p>Ishizu-Higashi S, Seno H, Nishihira E, Matsumoto Y, Ikuta K, Terasuda M, Kimura Y, Takada Y, Kimura Y, Nakanishi Y, Kanada K, Komekado H, Chiba T.</p>	<p>Deletion of nardilysin prevents the development of steatohepatitis and liver fibrosis.</p>	<p>PLoS One.</p>	<p>9</p>	<p>e98017</p>	<p>2014</p>
---	---	------------------	----------	---------------	-------------