

財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2013 年 3 月 10 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名：	羽尾 裕之	
所属機関名：	兵庫医科大学	
所属部署名：	病院病理部	職名：准教授
所在地：	兵庫県西宮市武庫川町 1-1	
電話：	0798-45-6667	内線：

1. 助成金額： 800,000 円

2. 研究テーマ

循環器疾患の病態に関与する新規バイオマーカーの検索

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：	羽尾 裕之	職名：准教授
所属機関名：	兵庫医科大学	部署名：病院病理部
中国側研究者氏名：	俞 梦越	職名：副主任医師
所属機関名：	阜外心血管病医院	部署名：心内科

4. 当該研究における発表論文等

現在のところなし。

循環器疾患の病態に関与する新規バイオマーカーの検索

研究者氏名	准教授 羽尾裕之
日本所属機関	兵庫医科大学 病院病理部
中国研究者氏名	副主任医師 俞 梦越
中国所属機関	阜外心血管病医院

要 旨

我々はこれまで、心臓における冠状動脈の粥状動脈硬化の進展と血栓形成に至る粥状動脈硬化病変の破綻に小胞体ストレスが関与していることを世界に先駆けて報告し、急性心筋梗塞や不安定狭心症、心臓突然死を含む急性冠症候群の病態の一部を明らかにした。本研究ではこれらの知見を活かし、急性心筋梗塞、心筋炎、大動脈瘤などの循環器疾患における小胞体ストレス関連分子の病態への関与を検討し、更にこれらの疾患における小胞体ストレス関連分子のバイオマーカーとしての可能性について検討した。病理解剖症例や動物モデルを使って、心筋梗塞・心筋炎・大動脈瘤の組織における小胞体ストレス関連分子の分布を免疫組織化学によって検討した。これらの疾患の心筋や血管壁において、小胞体ストレスシャペロン分子 GRP78 や低酸素誘導性小胞体酸化還元酵素 Ero1 の発現が認められた。当院及び阜外心血管病医院における急性心筋梗塞患者の急性期における小胞体ストレスシャペロン分子 GRP78 の血中濃度を ELISA 法で測定した。現在までのところ健常者コントロール群と比較してやや高値を示すものの有意差を認めなかった。今後、症例数を増やして更に検討を重ねる予定である。

Key Words 急性心筋梗塞, 心筋炎, 大動脈瘤, 小胞体ストレス, バイオマーカー

緒 言：

小胞体は分泌蛋白質を合成する細胞内小器官で、全蛋白質の約 30%を産生している。新たに合成された分泌蛋白質は、小胞体内でシャペロンや酸化還元酵素により折りたたまれた後に分泌経路に運ばれる。一方、低酸素刺激は高次構造上の異常蛋白質の小胞体内蓄積を引き起こし、これを小胞体ストレスと呼ぶ。この小胞体ストレスに対する細胞応答として、蛋白質折りたたみを担う小胞体シャペロンが誘導され、同時に新規蛋白質の翻訳が抑制され小胞体への負荷を軽減させる。しかし、ミスフォールド蛋白質蓄積が小胞体応答による対応能力を逸脱した時、小胞体よりアポトーシスシグナルが発信される。現在では小胞体は細胞の生死を決定する重要な細胞内小器官として注目されている。近年ミスフォールド蛋白質蓄積が神経変性疾患や糖尿病・脂肪肝などの疾患に関与することが明らかになり、世界中で活発な研究が行われている。

我々はこれまで、冠状動脈の粥状動脈硬化の進展と血栓形成に至る動脈硬化病変の破綻に小胞

体ストレスが関与していることを世界に先駆けて報告した¹⁾。しかし循環器疾患と小胞体ストレスの関連についての研究は十分されていないのが現状である。本研究では循環器疾患として重要な位置を占めている急性心筋梗塞・心筋炎・大動脈瘤などにおける小胞体ストレス関連分子の病態への関与を検討し、更にこれらの疾患における小胞体ストレス関連分子のバイオマーカーとしての可能性について模索した。

対象と方法：

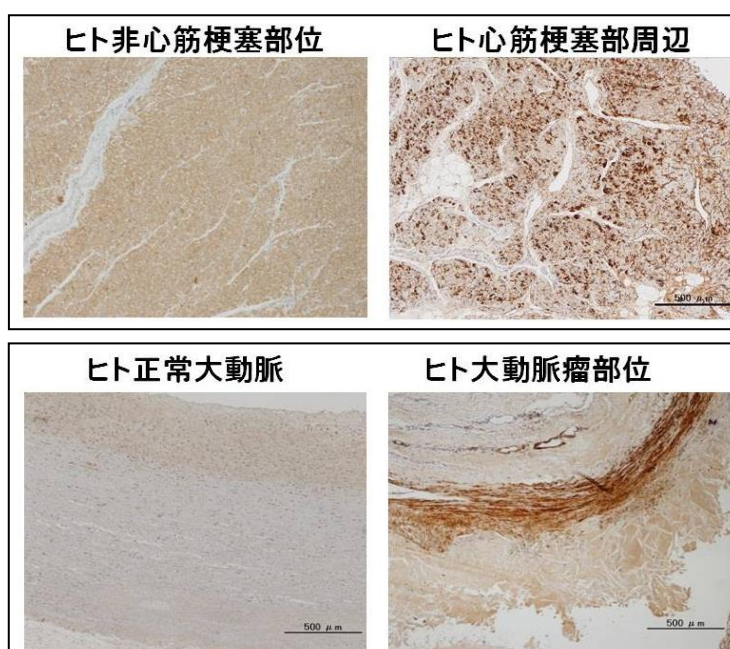
病理解剖症例の組織を用いて、心筋梗塞・心筋炎・大動脈瘤の組織における小胞体関連分子の分布を免疫組織化学によって検討した。小胞体関連分子として小胞体ストレスシャペロンである GRP78 および GRP94、低酸素誘導性小胞体酸化還元酵素である endoplasmic reticulum oxidoreductin 1 (Ero1) について、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて酵素抗体法により、これらの蛋白の分布について検討した。

大動脈瘤については、動物モデルにおいてこれらの分子の分布を検討するため、Apolipoprotein E (ApoE) 欠損マウスに対する Angiotensin II 持続投与モデルを用いて腹部大動脈瘤モデルを作製し、大動脈瘤モデル動物における小胞体ストレス関連分子の発現についても検討した。

更に小胞体ストレス関連分子のうち ELISA 法にて測定可能な GRP78 (HSPA5) 測定キットを用いて、当院の 20 例及び阜外心血管病医院 15 例の急性心筋梗塞患者の血清中の GRP78 の濃度を測定した。

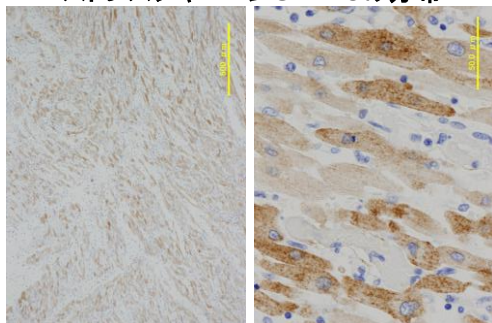
結 果：

心筋梗塞病変において免疫組織化学で Ero1 の分布が正常の非梗塞部位の心筋組織と比較して強く認められた（下図）。この結果より Ero1 が心筋梗塞の病態に関与している可能性が示唆された。さらに大動脈組織と腹部大動脈瘤組織での Ero1 の分布を検討したところ、正常大動脈では発現が認められなかったが、大動脈瘤壁で Ero1 蛋白が広く分布していた（右図）。大動脈瘤の病態にも Ero1 が関与している可能性が考えられた。また心筋炎患者における GRP78 の分布では心筋細胞の細胞質内に GRP78 の分布が認められ、心

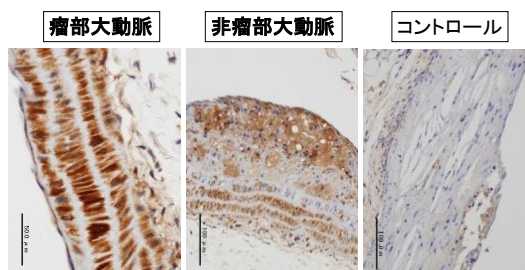


筋炎にて障害された心筋細胞では、小胞体ストレスの過剰状態で、そのシャペロン分子である GRP78 の過剰発現が起こっていると考えられた（下左図）。

心筋炎患者の心筋組織における小胞体
ストレスシャペロンGRP78の分布



マウス大動脈瘤モデルにおける
小胞体ストレス関連分子Ero1の分布



ApoE 欠損マウスに対する Angiotensin II 持続投与による腹部大動脈瘤モデルでもヒト大動脈瘤同様にコントロール<非瘤部大動脈<瘤部大動脈の順で Ero1 の発現は増強していた（上右図）。

そこで我々は心筋梗塞の急性期の血清中の小胞体ストレスシャペロン GRP78 の血中濃度の測定を ELISA 法で行った。これまでのところ日本・中国あわせて 35 症例の血清について検討したが、やや心筋梗塞症例で高値を示したものの、正常コントロール群と有意な差は認められなかった。

考 察：

今回我々は心筋梗塞や心筋炎・大動脈瘤といった循環器疾患でも特に生命予後を左右する重要な疾患において、小胞体ストレス関連分子が発現していることを同定した。さらに大動脈瘤においては、動物モデルでも小胞体酸化還元酵素 Ero1 の発現が増強しており、病態に深く関与している可能性が示唆された。現在さらにラット心筋梗塞モデルおよび心筋炎モデルを作製しており、これらのモデル動物において病変の組織中・血清中の小胞体関連分子の分布や動態を検討する予定である。患者血清の検討では残念ながら今回の報告までの症例数では、正常群と患者群において血中 GRP78 の濃度は有意な差を認めなかった。しかし今後更に共同研究を継続して中国においても心筋梗塞患者の血清を確保し、血中の小胞体ストレス関連分子の動態について検討したい。さらに阜外心血管病医院は北京の循環器疾患専門病院であり、多くの心疾患患者の治療に当たっているため、急性心筋梗塞のみならず心不全・心臓弁膜症・心筋炎などの重症循環器疾患患者の血清についても同様の検討を行って、同分野の診断や治療に応用できるバイオマーカーの検索を行っていきたい。

参考文献：

1. Myoishi M, Hao H, et al: Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. Circulation 116:1226-1233, 2007.

作成日：2013 年 3 月 10 日