

令和元年5月17日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09208

研究課題名(和文) 心臓性突然死におけるOPG-RANKL軸の解析

研究課題名(英文) Analysis of OPG/RANKL axis in cardiac sudden death

研究代表者

近藤 武史 (Kondo, Takeshi)

神戸大学・医学研究科・講師

研究者番号：20335441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：法医解剖例心筋におけるOPG及びRANKの発現を免疫組織化学にて評価した。OPGは全体に弱く陽性であった。RANKはOPGよりも強く瀰漫性に陽性となった。特定の死因との関係は見いだせなかった。OPG関連分子c-junやTRAF6の免疫染色も有意な結果ではなかった。剖検心筋組織でOPGのISHを施行したが、剖検心筋組織において有意な発現は確認できなかった。血清中のOPG蛋白をELISA法で解析したが、特定の死因との関連性は認めなかった。剖検検体を用いたRNA発現解析では心臓死症例と非心臓死症例でOPG発現に差を認めたものの、免疫染色による検討やmRNAの検討に限界がある可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

死因究明上、診断精度の高い内因性急死の解析は重要な課題である。法医解剖における内因性急死の約半数は心臓疾患であり、その中核をなすのは虚血性心疾患であるが、法医解剖上、顕微鏡的な手法を用いても、その確定診断に難渋することが多い。本研究で扱ったOPGのような、ユビキタスかつ容易に測定できる、法医学的に有用なバイオマーカーを心臓性突然死の解析に用いることは、心臓性突然死の病態解明や治療戦略の標的、突然死の予防という点で非常に意義深い。

研究成果の概要(英文)：In this study, the expression of OPG and its receptor RANK in the myocardium obtained in forensic autopsies were evaluated by immunohistochemistry. The results were presented in part at the 100th Congress of the Japanese Society of Legal Medicine in Tokyo in 2016. The expressions of OPG and RANK in the myocardium were diffuse and had no relationship with the cause of death. Serum OPG concentration also had no relationship with the cause of death. The expression analysis of c-jun and TRAF6 protein expression in the myocardium showed no significant results. The expression of OPG mRNA in the myocardium was evaluated by ISH, but no significant expression was observed in the forensic samples. Although there were differences in myocardial OPG mRNA expression in cardiac and noncardiac death, interpretation of the assays of OPG protein and mRNA expression are limited because OPG is a secretory protein and degeneration of the forensic samples may have occurred.

研究分野：法医病理学

キーワード：OPG

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞抑制因子オステオプロテゲリン Osteoprotegerin (以下 OPG) は、1997 年にクローニングされたサイトカインで、腫瘍壊死因子 tumor necrosis factor (TNF) 受容体スーパーファミリーに属する細胞膜貫通領域を持たない分泌蛋白である。OPG は骨芽細胞/ストローマ細胞によって産生・分泌される。

OPG は破骨細胞分化因子 RANKL とそのレセプターである RANK との結合をおとり受容体 (デコイレセプター) として阻害し、破骨細胞形成を抑制する。破骨細胞の分化には、正に制御する RANKL と負に制御する OPG の二つの因子が重要であり、この二つの因子の reciprocal な調節、すなわち OPG-RANKL 軸が骨代謝の恒常性を維持する上で重要と考えられる。OPG は、骨粗鬆症などの様々な骨代謝性疾患、癌の骨転移形成などの病理病態にも深く関わっており、OPG の発現調節機構を解明することは疾患の病態解明や治療戦略の標的という点で非常に意義深い。

近年、血管壁石灰化は石灰成分の受動的沈着ではなく、骨代謝に類似した血管壁の能動的な活動によって生じるという考え方が生まれ、骨代謝関連因子の血管壁における役割への関心が高まっている。その中で OPG は強力な血管石灰化抑制作用や動脈壁保護作用を持つことが知られており、種々の心疾患や心不全の病態にも関与しているとする報告が出てきている。OPG の血中濃度は種々の心臓の疾患に相関していることが文献上も知られている。法医解剖における死因究明では心臓性の突然死が問題となっており、OPG の作用の中でも血管石灰化における役割、心不全・心筋障害における役割は心臓性突然死に密接に関与している。

2. 研究の目的

当該研究では、骨代謝制御を司るおとり受容体 (デコイレセプター) として知られるオステオプロテゲリン OPG 及び RANK、更には RANK-RANKL 系下流のシグナル系に着目し、法医解剖例での解析から、OPG-RANKL 軸の心臓性突然死における役割を解析する。

3. 研究の方法

A) OPG の血清濃度を心臓性急死の死因に応じて測定、分析する。

法医解剖症例において血清中の OPG 蛋白を ELISA 法や Western blot 等の手法により解析する。虚血性心疾患 (急性冠症候群を含む)、致死性不整脈、心筋症、心筋炎、血栓症などの死因に応じて、その血清濃度との相関を分析する。

B) 免疫組織化学や *insitu* hybridization を用いて、心筋組織における OPG 発現、及び受容体 RANK を介した下流のシグナル系を解析する。

心筋サンプルを用いて、組織学的に OPG の発現をみる。臓器としては心筋を主な対象とするが、OPG 蛋白発現はその他の臓器にも遍在することが知られているので、種々の臓器でも解析を進める。免疫組織化学の対象としては、死後経過時間 48 時間以内のものを対象とする。

OPG のみならず、RANK の発現、RANK-RANKL 系下流のシグナル系の解析から、OPG-RANKL 軸が心臓性急死にどのように関与しているかの解析を行う。

蛋白レベルでは免疫組織化学を用いて、mRNA レベルでは *in situ* hybridization を用いて解析する。

4. 研究成果

OPG-RANKL 軸が心臓性急死にどのように関与しているかという観点から、法医解剖例心筋における OPG 及びその受容体の RANK の発現を免疫組織化学にて評価し、平成 28 年度に日本法医学会学術全国集会にて発表した。心筋組織に OPG、RANK 共に蛋白発現を認めた。OPG は全体に弱く陽性であったが、心内膜側にやや濃く染色された。OPG はまた、血管内の血漿成分、血球成分に強く陽

性となった。一方、RANKIはOPGよりも強く瀰漫性に陽性となり、血管壁にも弱い陽性像を認めた。心筋リモデリングが推定される部分でもOPG及びRANK発現に変化はなかった。他の諸臓器では、脾臓の血球細胞に強く陽性、腎臓の遠位尿細管に陽性、膵臓のランゲルハンス島にも陽性像を認めた。特定の死因との関係は見いだせなかったが、心筋においてOPG-RANKL軸が何らかの恒常的なオートクラインの調節機構を担っている可能性も示唆された。OPG-RANKL軸のシグナル下流分子であるTRAF6発現を免疫組織化学にて検討したが、全症例においてびまん性に発現を認めシグナル系における死因別の差異は示されなかった。研究代表者はOPGの発現調節にはc-junが重要な役割を果たしていることを2004年に既に明らかにしているが、心筋細胞でc-junの免疫染色を行ったところ、陽性コントロールでは陽性を示したが、剖検検体心筋では有意な陽性像を認めなかった。骨代謝関連分子として、TGF betaの免疫染色を施行したが、瀰漫性に陽性であった。蛋白レベルではなく、mRNAレベルでの検討を行うため、OPG特異的プローブを6個設計し、大腸癌組織でプローブの有効性を確認した後に、剖検心筋組織でOPGの *in situ* hybridizationを施行したが、心筋組織において有意な発現は確認できなかった。法医解剖症例において、血清中のOPG蛋白を死因に応じてELISA法で解析したが、特定の死因との関連性は認めなかった。後半の研究期間でOPGの免疫染色を新規抗体2種で追加検討したが、いずれも有意な結果は得られなかった。OPGの染色結果は、抗体によって染色結果が一定しない可能性がある。心筋細胞に見られるいわゆる消耗色素リポフスチンが染色結果の解釈に影響を与える可能性がある。心臓性急死の事例には、褐色萎縮の病態があり心筋細胞にリポフスチンを有する剖検例もあるため、評価には注意を要する。OPGは分泌蛋白のため、免疫染色による検討に限界がある可能性が示唆された。培養心筋細胞においてOPGのmRNA発現を確認した。剖検検体を用いたRNA発現解析では、心臓死症例と非心臓死症例でOPG発現に差を認めたものの、免疫染色による蛋白レベルの検討やmRNAレベルの検討に限界がある可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

- 1.Rapid identification of *Gloriosa superba* and *Colchicum autumnale* by melting curve analysis: application to a suicide case involving massive ingestion of *G. superba*. Sakurada M, Yoshioka N, Kuse A, Nakagawa K, Morichika M, Takahashi M, Kondo T, Asano M, Ueno Y. Int J Legal Med, in press. 査読有 doi: 10.1007/s00414-019-02060-x.
- 2.Wide distribution of alpha-synuclein oligomers in multiple system atrophy brain detected by proximity ligation. Sekiya H, Kowa H, Koga H, Takata M, Satake W, Futamura N, Funakawa I, Jinnai K, Takahashi M, Kondo T, Ueno Y, Kanagawa M, Kobayashi K, Toda T. Acta Neuropathol. 2019 137(3):455-466. 査読有 doi: 10.1007/s00401-019-01961-w.
- 3.Autopsy case of right ventricular rhabdomyoma in tuberous sclerosis complex. Kondo T, Niida Y, Mizuguchi M, Nagasaki Y, Ueno Y, Nishimura A. Leg Med (Tokyo). 2019 36:37-40. 査読有 doi: 10.1016/j.legalmed.2018.10.001.
- 4.Autopsy Case of a Penetrating Wound to the Left Cerebral Hemisphere Caused by an

Accidental Shooting With a Crossbow.

Kondo T, Takahashi M, Kuse A, Morichika M, Nakagawa K, Tagawa Y, Taniguchi T, Taguchi Y, Fujiwara T, Tsuchiya J, Nakamura M, Sakurada M, Asano M, Ueno Y.

Am J Forensic Med Pathol. 2018 39:164-168. 査読有 doi: 10.1097/PAF.0000000000000381.

5.An autopsy case of cardiac tamponade caused by a ruptured ventricular aneurysm associated with acute myocarditis.

Kondo T, Nagasaki Y, Takahashi M, Nakagawa K, Kuse A, Morichika M, Sakurada M, Asano M, Ueno Y. Leg Med (Tokyo). 2016 18:44-8. 査読有 doi: 10.1016/j.legalmed.2015.12.002.

6.An autopsy case of zinc chloride poisoning.

Kondo T, Takahashi M, Watanabe S, Ebina M, Mizu D, Ariyoshi K, Asano M, Nagasaki Y, Ueno Y. Leg Med (Tokyo). 2016 21:11-4. 査読有 doi: 10.1016/j.legalmed.2016.05.002.

7.Postmortem detection of antibiotic-specific immunoglobulin E in the case of anaphylactic death.

Takahashi M, Kondo T, Morichika M, Kuse A, Nakagawa K, Ueno Y.

Forensic Sci Int. 2016 266:14-17. 査読有 doi: 10.1016/j.forsciint.2016.04.025.

8.Postmortem interval estimation: a novel approach utilizing gas chromatography/mass spectrometry-based biochemical profiling.

Kaszynski RH, Nishiumi S, Azuma T, Yoshida M, Kondo T, Takahashi M, Asano M, Ueno Y. Anal Bioanal Chem. 2016 408:3103-12. 査読有 doi: 10.1007/s00216-016-9355-9.

〔学会発表〕(計1件)

近藤武史, 高橋玄倫, 久世亜澄, 森近 舞, 中川加奈子, 櫻田 誠, 浅野水辺, 上野易弘. 心筋における OPG-RANKL 軸の免疫組織化学的検討. 第 100 次日本法医学会学術全国集会. 日本法医学雑誌. 2016; 70(1): p110, 東京.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：上野易弘

ローマ字氏名：Yasuhiro Ueno

所属研究機関名：神戸大学

部局名：大学院医学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：30184956

研究分担者氏名：高橋玄倫

ローマ字氏名：Motonori Takahashi

所属研究機関名：神戸大学

部局名：大学院医学研究科

職名：講師

研究者番号（8桁）：90509100

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。