

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07516

研究課題名（和文）筋細胞障害の革新的バイオマーカーの開発

研究課題名（英文）Development of an innovative biomarker for muscle cell damage

研究代表者

砂田 芳秀 (Sunada, Yoshihide)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：00240713

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、筋疾患と心疾患、とりわけ心筋梗塞超急性期に、筋鞘膜蛋白質であるXが、末梢血に出現する驚くべき発見をシースとして、その革新的バイオマーカーとしての臨床POC取得を目標とする。蛋白質Xの3つの抗原決定基に対する抗体を作成し、ELISA捕捉抗体・認識抗体の最適化を実施し、蛋白質Xの定量が可能となった。また抗体を用いた免疫沈降法により、超急性期心筋梗塞患者検体を解析し、数種類の蛋白質X結合タンパク質が得られ、その血中出現機構を解析している。ELISAキットによって診断有用性の高い対象筋疾患・心疾患を絞り込み、分析的妥当性及び臨床的有用性の臨床POC取得に向けた臨床性能試験を目指している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋疾患と心疾患の迅速診断は、治療選択と予後に重要な情報を提供する。とりわけ心筋梗塞の迅速診断は生命予後を左右する。従来のバイオマーカー血清クレアチンキナーゼ(CK)は筋疾患・心疾患特異性が低く心筋梗塞発症時には直ちにCKが上昇せず、その時間差は生命予後の障壁となる。この障壁を克服するため、鋭敏かつ簡便な筋疾患・心疾患の革新的血中バイオマーカーの開発が待望されている。筋鞘膜蛋白質Xは、心筋梗塞超急性期に上昇・ピークを迎え、その後急速に消退する血中動態からは、CKや従来のマーカーに卓越する心筋梗塞超急性期診断薬として期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to obtain clinical POC of a novel biomarker for muscle and heart diseases. We discovered that a sarcolemma protein X emerges in peripheral blood from patients with muscle and heart diseases. Surprisingly, X appears at the hyperacute period of myocardial infarction and then disappears rapidly. We raised antibodies against three different epitopes of X, respectively. We optimized the recognition antibody and the capture antibody for ELISA assay quantifying X. By immunoprecipitation using an antibody, we obtain several types of X binding proteins in blood samples from patients with hyperacute myocardial infarction. We are now investigating mechanisms by which X appears in blood. We will determine which muscle and heart diseases have high diagnostic value by measuring X, and conduct a clinical performance tests for obtaining clinical POC of analytical validity and clinical usefulness.

研究分野：神経内科学

キーワード：筋疾患 筋ジストロフィー 心疾患 急性心筋梗塞 バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筋疾患と心疾患の迅速診断は、治療方針選択と予後判定に重要な情報を提供する。とりわけ心筋梗塞に至る虚血性心疾患の迅速診断は生命予後を左右するため、的確な治療法の選択に不可欠である。カベオリン-3 は骨格筋と心筋に特異的に発現し筋細胞膜の細胞質側への特殊陥入構造物カベオラを形成する構造蛋白質で、H-Ras、c-Src などのシグナル伝達分子と結合しその活性を制御する足場蛋白質としても機能する。我々は、カベオリン-3 欠損肢帯型筋ジストロフィー (LGMD1C) モデルマウスの解析により、骨格筋ではマイオスタチン受容体活性上昇から骨格筋萎縮、心筋では血管内皮型 NOS 活性上昇から心肥大を発症する分子病態機構を世界に先駆けて発見した。我々は、筋疾患患者の血中に、筋ジストロフィーの様々な原因遺伝子産物が出現するか否かについてウエスタンブロットで解析してみた。これらのうち、カベオリン-3 蛋白質のみが選択的に末梢血中出现し、心筋梗塞患者では、CK に先駆け上昇して超急性期バイオマーカーとなり得るという驚くべき現象を発見した。これまでに、血中カベオリン-3 最適化 ELISA 定量キットの構築に成功し、国内特許(「心疾患または筋疾患の診断薬」)を出願した。さらに筋芽細胞分化によって、正常カベオリン-3 が僅かではあるが培養上清に分泌されるといふユニークな現象を発見した。

2. 研究の目的

骨格筋及び心筋疾患では、様々な血中バイオマーカーが提案されてきたものの、筋疾患、及び心疾患で治療法選択に繋がる臨床応用が実現しているのは依然として CK のみである (Okinaka, Arch Neurol. 1961;4:520-5)。ところが血清 CK は甲状腺機能低下症、悪性腫瘍などの筋疾患・心疾患以外の病態においても上昇する特異性の低いマーカーである。さらに CK 上昇での心筋梗塞発症時の time lag は、生命予後の最大の障壁となっている。現在、CK におけるこれら障壁を克服するため、鋭敏かつ簡便に臨床応用できる筋疾患・心疾患の革新的血中バイオマーカー開発が待望されている。本研究により、筋疾患・心疾患の革新的バイオマーカーとしてカベオリン-3 測定体外診断薬が実用化できれば、従来のバイオマーカーCK と比較し、筋疾患・心疾患に特異性が高く、鋭敏、筋疾患・心疾患のうち、とりわけ心筋梗塞の超急性期診断が可能となる。さらに、カベオリン-3 異常分泌による血中出现機構が解明できれば、筋疾患・心疾患の筋細胞障害機構による鑑別診断を実現する画期的および学術的創造性がある。

3. 研究の方法

実施項目 1 .カベオリン-3 ELISA キットによる筋疾患・心疾患の診断有用性の検討: 筋疾患・心疾患の患者血液検体の収集、筋疾患・心疾患の患者血液検体における定量、正常ボランティアの運動負荷血液検体における定量; 提携企業である IBL 社と抗体および継続的 ELISA 供給体制について契約し、で収集した血液サンプルについて、迅速な測定を実施。

実施項目 2 .カベオリン-3 簡易検出キットの開発: ELISA 正常カットオフ値による化学発光の条件設定、簡易迅速検出キットの作成; 実施項目 1 で、ELISA における正常カットオフ値(上限)が決定されたら、定量レンジが最も広範な最適化 ELISA キットの捕捉、及び検出抗体を基盤として、提携企業であるタウンズ社と化学発光キットを構築する。正常上限で発色する条件を設定する。

実施項目3 . バイオマーカー血中出现機構の分子病態解析: マウス筋芽細胞分化系による結合蛋白質の同定、筋ジストロフィーモデルマウス血液検体における結合蛋白質同定、筋疾患・心疾患の患者血液検体における結合蛋白質同定; マウス筋芽細胞分化培地、筋ジストロフィーモデルマウス、および実施項目1で得られたカベオリン-3定量値が高値の血液サンプルを用いて、分泌型カベオリン-3結合蛋白質を免疫沈降法でスクリーニングする。培地および血液の結果を比較し、結合蛋白質候補分子を同定して、カベオリン-3分泌機構を推定する。マウス筋芽細胞で、結合蛋白質のRNA干渉をおこない、分泌障害が発症するまで、結合蛋白質を同定し、正常および筋障害時の分泌機構を解明する。

4 . 研究成果

まず、ヒトカベオリン-3の、3つの抗原決定基(合成ペプチド)に対する抗体を、それぞれ3種類ずつ、合計9種類作成した。いずれの抗体も、哺乳類細胞発現リコンビナントカベオリン-3に反応、マウス骨格筋粗分画に反応、免疫組織染色ではマウス骨格筋鞘膜に染色性を認めた。次いで、リコンビナントヒトカベオリン-3を標準蛋白質として、それぞれの抗体について、ELISAの組み合わせを検討した。血液干渉についての条件設定も実施し、ヒトカベオリン-3の捕捉抗体・認識抗体の組み合わせについて最適化が達成された。このELISAを用いて、健常人検体を用いて血中カベオリン-3の正常カットオフ値を設定した。また、筋疾患・心筋梗塞超急性期の血液検体について定量化が可能となり、超急性期検体で極めて高値であることが示された。現在、筋疾患・心疾患患者検体を用いて、超急性期心筋梗塞の他、診断有用性の高い対象筋疾患について絞り込んでいる。またこのELISAの結果を基盤として、簡易定性イムノクロマトキット作成を開始した。一方、抗体を用いた免疫沈降法により、超急性期検体を解析して、数種類のカベオリン-3結合タンパク質を得て、その血中出现機構を解析している。今後は、ELISAキットによって、超急性期心筋梗塞の他、診断有用性の高い対象筋疾患・心疾患を絞り込む。また、簡易定性イムノクロマトキットの開発を進め、CMC試験を進捗させ、将来の分析的妥当性及び臨床的有用性の臨床POC取得に向けた臨床性能試験の実施を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 砂田芳秀, 大澤 裕, 西松伸一郎, 萩原宏毅, 後藤雄一, 太田成男
2. 発表標題 ドラックリポジショニング医師主導治験による薬事承認: タウリン大量投与はMELAS脳卒中様発作再発を防止する
3. 学会等名 日本筋学会第5回学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大澤 裕, 深井雄太, 丹田和恵, 藤野雅広, 西松伸一郎, 砂田芳秀
2. 発表標題 マイオスタチン阻害ペプチドによる筋ジストロフィー治療の基盤研究
3. 学会等名 日本筋学会第5回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sunada Y
2. 発表標題 Development of anti-myostatin therapeutics.
3. 学会等名 第11回日仏ワークショップ (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 砂田芳秀, 大澤 裕, 力丸満恵, 深井雄太, 藤野雅広, 西松伸一郎, 太田成男
2. 発表標題 Taurine for long-term prevention of stroke-like episodes in MELAS
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sunada Y, Ohsawa Y, Hagiwara H, Nishimatsu S, Goto Y, Ohta S.
2. 発表標題 Taurine supplementation prevents stroke-like episodes in MELAS, the first-ever tRNA modification disorder.
3. 学会等名 Cell Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 砂田芳秀	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 2160
3. 書名 今日の治療指針 2019年版 私はこう治療している	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西松 伸一郎 (Nishimatsu Shin-Ichiro) (20222185)	川崎医科大学・医学部・准教授 (35303)	
研究分担者	藤野 雅広 (Fujino Masahiro) (50633856)	川崎医療福祉大学・医療技術学部・講師 (35309)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------