

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K10126

研究課題名(和文) 心臓性突然死の病態における炎症分子ペントラキシン3の関与と法医実務への応用

研究課題名(英文) Involvement of inflammatory molecule Pentraxin-3 in pathogenesis of cardiac sudden death and its postmortem application

研究代表者

高橋 玄倫 (Takahashi, Motonori)

神戸大学・医学研究科・講師

研究者番号：90509100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：生体に於いては血中ペントラキシン3 (PTX3) 濃度が急性冠症候群と関連することが報告されている。死体血液についても同様の報告もあるが、本研究では白血球ペルオキシダーゼで補正した血中PTX3と死因との間に関連は見られなかった。死体血液では時間経過とともにPTX3の高次構造が変化し、測定値に影響を及ぼしている可能性がある。剖検心臓組織では心筋細胞や線維芽細胞にPTX3陽性像を認めた。培養細胞では時間依存性に形態変化が強くなり、MEK1/2を介してPTX3 mRNA発現は増加していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

法医解剖に於いて死後生化学検査は生前の病態解明を目指して広く実施されているが、その結果の解釈には、多量体構造の変化など死後変化の影響を考慮する必要があることが示された。また、心筋細胞および心臓線維芽細胞の細胞傷害・細胞死にPTX3が関わっている可能性が示され、心臓性突然死の病態解明がわずかではあるが前進したと思われる。今後さらに検討を進めることで、心臓性突然死の予防につなげたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：An elevated plasma Pentraxin-3 (PTX3) was reported in patients with acute coronary syndrome in a clinical setting and autopsy cases. In the present study, we found no significant relationship between myeloperoxidase-adjusted PTX3 levels and cause of death. A postmortem time-dependent degeneration of PTX3 seemed to affect quantification of blood PTX3. An immunohistochemistry detected PTX3 in cardiomyocytes and fibroblasts of autopsy samples. Cultured these cells showed time-dependent transformation by inflammatory stimulation. PTX3 mRNA expression was enhanced through MEK1/2 pathway.

研究分野：法医学

キーワード：心臓性突然死 法医解剖 死後生化学検査

## 1. 研究開始当初の背景

法医解剖の対象となる突然死症例は、病院で死亡する人に比べて若いことが多い。そのため、これらの突然死は死亡した本人にとって重大な健康問題であることはもとより、遺族が被る精神的・経済的な影響や社会全体が受ける損失も大きい。このことから、突然死の病態を解明し未然に防ぐ手段を開発することが求められている。

突然死症例について死因究明のために解剖を行っても、死因診断に難渋することは珍しくない。突然死の原因として循環器系疾患が多数を占めるとされるが、解剖で形態変化を検出できる病態は限られている。急性心筋梗塞では発症後数時間以内では肉眼的・組織学的変化を伴わないことが知られているし、また、心室細動などの不整脈が関与している病態では肉眼的変化を欠くため検案・解剖による診断確定はほぼ不可能である。

突然死の原因となる致死性不整脈や動脈硬化性虚血性心疾患の成因として慢性炎症反応が注目されている。1990年前後より、動脈硬化は炎症性疾患であるとする「血管傷害反応仮説」が広く認知され、近年では、炎症性分子である TNF や IL-6 が動脈硬化の新たな治療標的と考えられている。また、心筋細胞の炎症は再分極異常や、間接的に自律神経系の機能異常を介して不整脈を悪化させるとされる。

新規炎症マーカーであるペントラキシン 3 (PTX3) は、C 反応蛋白質 (CRP) と同じくペントラキシンファミリーに属する蛋白質であり、循環器病・感染症・個体発生などの諸分野において研究が進められている。近年、法医学分野でも注目されつつあり、エタノールによる発現調節や、急性冠症候群死亡事例に於いて血中濃度が高いことが報告されつつある。

## 2. 研究の目的

将来的には突然死を未然に防ぐ手段の開発につなげるために、本研究では心臓性突然死の病態における PTX3 の関与を明らかにし、法医診断への応用を目指すことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 血液中 PTX3 濃度と死因との関連。

剖検時に採取した血液を試料として ELISA 法で PTX3 濃度を定量し、死因との関連を明らかにする。ただし、死体血液における PTX3 濃度は白血球数に影響されることが報告されているため、好中球ペルオキシダーゼで補正した血中 PTX3 濃度を新たに用いた。

### (2) PTX3 の死後変化に関する検討。

血中 PTX3 の死後変化の有無と程度、機序を明らかにする目的で、健常人の血液にリコンビナント蛋白質を添加した試料を非変性条件下で電気泳動し、多量体構造について経時的に解析を行った。

### (3) 剖検試料を用いた PTX3 の蛋白質発現に関する検討。

心臓性突然死事例と対照群の計 77 例について、ホルマリン固定心臓組織に対して抗 PTX3 抗体を用いた免疫組織化学法を用いて発現の有無・局在・程度を解析した。

### (4) ヒト培養細胞を用いた PTX3 の発現調節とシグナル解析。

PTX3 の生理・病理的機能を明らかにするため、培養細胞を用いて PTX3 の発現調節機構と下流のシグナル経路を検討した。種々の炎症刺激に対する PTX3 mRNA の発現について RT-PCR 法にて検討した。また、種々の阻害剤を用いて、PTX3 発現と細胞に与えるシグナル経路について検討した。

## 4. 研究成果

(1) 剖検時に採取した血液上清を非変性条件下で電気泳動し、白血球ペルオキシダーゼを化学発光法にて検出した。溶血試料においてとくに強いペルオキシダーゼ活性を認めた。その後、ウェスタンブロット法にて PTX3 を検出し、先に測定した白血球ペルオキシダーゼ量で補正した。死因と補正 PTX3 濃度との間に関連は認められなかった。

(2) 死体試料に於ける PTX3 は高次構造の死後変化のために死亡前の状態を反映していない恐

れがある。そこで、PTX3 検出における死後変化、とくに溶血による影響について検討した。また、相対的に高濃度に存在する CRP による PTX3 測定系における影響について検討した。健常人の血液にリコンビナント蛋白質を添加した試料を非変性条件下で電気泳動し、抗 PTX3 抗体を用いて検出したところ、溶血試料において低泳動領域のバンドが薄く、代わりに高泳動領域に複数バンドが検出された。また、蛍光標識 2 次抗体を用いた PTX3 と CRP の同時検出にて、血中 CRP およびリコンビナント CRP は交叉反応を示さなかった。本検討で得られた泳動パターンの変化は死体試料中 PTX3 の多量体構造が変化したためと考えられた。

(3) 解剖事例の心筋組織について PTX3 発現を検討したところ、PTX3 は心筋細胞に概ね瀰漫性に発現していた。また、心筋組織のうち線維化巣には PTX3 を認めなかった。心筋組織内および細胞内での局在を検討したところ、77 例中 10 例では組織内・細胞内に於いて不均一なまだら状陽性像を示したり、内膜側 2 ないし 3 層の心筋細胞が特に強く染色されたりした。炎症細胞浸潤を伴わないものの心筋の核消失・断片化を示す 16 例のうち 13 例では、近傍の間質において PTX3 の網状陽性像を呈した。しかし、この所見と死因との間に相関は認めなかった。冠状動脈壁に関しては、動脈硬化巣の内膜および中膜のとくに線維芽細胞に PTX3 陽性像を示したが、染色強度と死因との関連は見られなかった。一方、血管内腔に非特異的陽性像を認めなかった。

(4) 培養ヒト心筋細胞を用いて TNF による PTX3 mRNA 発現の変化について検討した。心筋細胞を TNF で刺激したところ、PTX3 mRNA はやや発現が増加する傾向にあり、また、時間依存性に発現が増強した。PTX3 発現にかかる細胞内シグナル経路を明らかにするために、種々の酵素阻害剤を用いて検討した。PTX3 の発現は MEK1/2 阻害剤にて抑制される傾向を認めた。一方、NF B 阻害剤では、PTX3 発現は TNF よりもさらに増加していました。細胞の形態について検討したところ、PTX3 発現が増えている実験系では、細胞の形態が細く痩せ、または、球状に変形していた。

同様に、培養ヒト心臓線維芽細胞について検討したところ、TNF によって PTX3 mRNA の発現は増加傾向にあった。また、時間経過によって細胞形態の変化や生存細胞の減少を来すとともに、PTX3 mRNA 発現が増加した。この発現増加は MEK1/2 阻害剤処理によって抑制された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋 玄倫, 近藤 武史, 山崎 元太郎, 杉本 茉里恵, 森近 舞, 久世 亜澄, 中川 加奈子, 櫻田 誠, 浅野 水辺, 上野 易弘
2. 発表標題 心筋組織に於ける炎症性蛋白質ペントラキシン3の発現分布に関する検討
3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋 玄倫, 近藤 武史, 山崎 元太郎, 杉本 茉里恵, 森近 舞, 久世 亜澄, 中川 加奈子, 櫻田 誠, 上野 易弘
2. 発表標題 ヒト心臓線維芽細胞における炎症性蛋白質ペントラキシン 3 の発現に関する検討
3. 学会等名 第105次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉本 茉里恵, 櫻田 誠, 長崎 靖, 久世 亜澄, 森近 舞, 北川 孝一, 高橋 玄倫, 山崎 元太郎, 近藤 武史, 上野 易弘
2. 発表標題 生前暴露か死後暴露か - ラットモデルによるトルエンの経皮暴露に関する法医学的研究
3. 学会等名 第105次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋玄倫、櫻田誠、久世亜澄、森近舞、山崎元太郎、近藤武史、杉本真理恵、中川加奈子、浅野水辺、上野易弘
2. 発表標題 炎症性蛋白質ペントラキシン 3 の法医学応用を目指した死後変化に関する基礎的検討
3. 学会等名 日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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	近藤 武史  (Kondo Takeshi)  (20335441)	神戸大学・医学研究科・講師   (14501)	
研究 分担者	上野 易弘  (Ueno Yasuhiro)  (30184956)	神戸大学・医学研究科・教授   (14501)	

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
---------	---------