

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23300157

研究課題名(和文) 心筋梗塞発症および冠動脈病変不安定化に関わるバイオマーカーの同定

研究課題名(英文) Examination of biomarker for myocardial infarction and coronary atherosclerosis

研究代表者

塩見 雅志 (Shiomi, Masashi)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50226106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、冠動脈病変の進行および心筋梗塞の発症に関わるバイオマーカーの開発である。実験には遺伝的な高コレステロール血症、冠動脈病変、心筋梗塞を自然発症するWHHLMIウサギを用い、次の結果を得た。1) 血清脂質値および大動脈病変の程度等は冠動脈病変の進行や心筋病変の発生に関与しなかった。2) 血清のメタボローム解析において、25の代謝産物が冠動脈病変の進行および心筋病変の発生に相関を示した。3) ゲノム解析の結果、WHHLMIウサギで25遺伝子の変異が認められた。以上の結果から、WHHLMIウサギの冠動脈病変の進行および心筋病変の発生に関わる血清マーカーを確認した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is examination of serum biomarkers relating to progression of coronary atherosclerosis and/or development of myocardial infarction. We used WHHLMI rabbits in this study. The results of the correlation analyses between candidates of biomarker and coronary lesions or myocardial lesions were as follows; 1) Serum lipid levels and the degree of aortic atherosclerosis did not relate to coronary lesions and myocardial lesions. 2) Serum levels of CRP, oxidized LDL, NOx, and others did not relate to coronary lesions and myocardial lesions. 3) In serum metabolome analyses, 11 metabolites showed significant relation to coronary lesions and myocardial lesion. 4) In rabbit genome analyses, mutation was observed in 25 genes of WHHLMI rabbits. 5) We established lipidome analyses of WHHLMI sera, and we are analyzing 400 samples now. In the present study, we found 11 metabolites as candidate of biomarker for coronary lesions and myocardial lesions.

研究分野：実験動物学

キーワード：疾患モデル動物 バイオマーカー 心筋梗塞 冠動脈病変

## 1. 研究開始当初の背景

神戸大学では、血中コレステロールの細胞内取込 (LDL 受容体) の遺伝的な異常 (12 塩基対の欠失) によって高コレステロール血症を示し、心臓に血液を供給する冠動脈に重度の動脈硬化が発生し、心筋梗塞を自然発症する WHHLMi ウサギを開発し [Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003; 23 (7): 1239-1244]、系統維持している [Atherosclerosis 2009 Nov; 207 (1): 1-7]。WHHLMi ウサギでは、血清脂質値や大動脈の動脈硬化病変が同程度であっても冠動脈病変や心筋病変の程度に個体差が認められることから、血清脂質値以外の因子が冠動脈病変や心筋病変の発生 / 進行に参与していると考えられた。これらの因子を同定することにより、重度の冠動脈病変および心筋梗塞を発症する WHHLMi ウサギの系統維持が容易になるのみならず、ヒトの冠動脈病変および心筋梗塞のバイオマーカーの開発にも繋がる可能性がある。バイオマーカーの開発によって、心血管疾患患者の診断、予防に大きく貢献することが期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、冠動脈病変の進行および心筋梗塞の発症に関わるバイオマーカーを遺伝的に高コレステロール血症、冠動脈病変、心筋病変を自然発症する WHHLMi ウサギを用いて開発することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物、採血、組織等採取

#### a) 血清バイオマーカーに関する研究

神戸大学医学研究科で系統維持している 24 匹の WHHLMi ウサギを 5 - 6 匹ずつ 4 群に分け、それぞれ 4 月齢から 4 月毎に 20 月齢まで体重を測定し、採血し、血清、血漿、赤血球とともに - 80 度で解析まで凍結保存した。ウサギが死亡した時点あるいは 20 月齢に達した時点で組織を採取した。ウサギはペントバルビタールナトリウム静脈投与麻酔下に放血して安楽死し、生理食塩水で灌流し、肝臓、小腸、腸管膜脂肪組織、ヒラメ筋、心臓周囲脂肪、腹腔背側脂肪を採取し、重量を測定した。その後、ホルマリン液で心臓を灌流固定後、心臓と大動脈を採取した。肝臓、小腸、腸管膜脂肪組織については、解析まで - 80 度で凍結保存した。対照として日本白色種 (JW) ウサギ (北山ラベスから購入) 6 匹を同様に使用した。

#### b) ウサギゲノム解析について

12 月齢の WHHLMi ウサギ 10 匹を使用した。

#### c) 動物実験の実施について

動物実験計画については、神戸大学動物実験委員会にて審査を受け、学長の承認を受けた。動物実験は、「神戸大学動物実験実施規則」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省)、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する

基準」(平成 18 年環境省告示第 88 号) に基づいて実施した。

#### (2) 血清生化学的項目の測定

採血当日に血清総コレステロール、中性脂肪、リン質、血糖値を酵素法で測定し、リポ蛋白質を超速心法で VLDL ( $d < 1.006 \text{ mg/ml}$ )、LDL ( $1.006 \text{ mg/ml} < d < 1.063 \text{ mg/ml}$ )、HDL ( $d > 1.063 \text{ mg/ml}$ ) に分画し、脂質値を酵素法で測定した。凍結保存していた血清中の CRP、酸化 LDL、SOD、窒素酸化物、インスリン、heart type fatty acid binding protein (H-FABP)、cardiac Troponin I、ミオグロビンは動物を安楽死した後、まとめて ELISA 法で測定した。

#### (3) 心臓の病理組織標本の作製

以前に報告した方法 [Atherosclerosis 1992; 96(1): 43-52] に従って病理組織標本を作製し、Victoria blue HE 染色を実施した。ウサギでは、ヒトと異なり、左回旋枝は前下向枝より太く、長く、動脈硬化病変が多発する [Exp Anim. 2004 Jul; 53 (4): 339-346] ため、冠動脈病変は左回旋枝を対象として評価した。冠動脈病変の程度は、管腔狭窄率 (内弾性板に囲まれた内側の面積に対する病変面積の割合) で評価した。心筋病変は以前に報告した方法 [Am Heart J 1987; 113: 280-288; Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003; 23 (7): 1239-1244] で評価し、左心室壁に対する虚血所見を示す心筋の割合で評価した。

#### (4) 血清のメタボローム解析

凍結血清を神戸大学医学研究科附属質量分析総合センターに送付し、メタボローム解析を依頼した。メタボローム解析では GC-MS 装置を用いて実施した。

#### (5) ウサギゲノム解析

12 月齢の WHHLMi ウサギ 10 匹を山梨大学大学院総合研究部医学域分子病理学講座の範江林教授に送付し、安楽死後に組織を摘出して凍結保存し、University of Michigan Medical Center, Center for Advanced Models for Translational Sciences and Therapeutics, Department of Cardiac Surgery の Y. Eugene Chen 教授に解析を依頼した。なお、対照として山梨大学で JW ウサギ、Michigan 大学で New Zealand white ウサギから同様に組織を摘出した。心臓はホルマリン固定し、神戸大学にて病理組織標本作製し、冠動脈病変の程度および心筋病変の発生状況を確認した。

#### (6) 血清のリピドーム解析

凍結保存していた血清、血漿、赤血球画分を大阪大学大学院 工学研究科生物資源工学領域および九州大学生体防御医学研究所附属トランスオミクス医学研究センターメタボロミクス分野の馬場健史教授に送付し、解析を依頼した。リピドーム解析は Supercritical fluid chromatography (ACQUITY UPC2, Waters Co.) - Triple quadrupole mass spectrometer (Xevo TQ-S

micro, Waters Co.)を用いて実施した。

#### (7) データの統計解析

データは平均値±標準誤差を計算し、平均値の差の検定は Student t-test/Welch's t-test, Mann-Whitney U-test で実施した。血清マーカー候補物質と冠動脈病/心筋病変との相関解析は Spearman の相関解析を実施した。

#### 4. 研究成果

遺伝的なコレステロール代謝異常に基づいて冠動脈に重度の動脈硬化が発生し、心筋梗塞を自然発症する WHHLM1 ウサギ 24 匹を用いて解析を実施した。24 匹中 2 匹で自然発症の腫瘍が観察されたため、解析から除外した。また、15 月齢で 1 匹、16 月齢で 1 匹、18 月齢で 1 匹死亡したが、心筋病変が認められたため、心筋梗塞で死亡したと判断して解析に加え、合計 22 匹を用いてバイオマーカーの探索を実施し、次の成果を得た。

##### 1) 冠動脈病変および心筋病変の発生状況

冠動脈の狭窄率は、5% - 95%と大きなバラツキが認められ、90%以上の狭窄病変が認められるウサギ 6 匹を好発群、5%の狭窄率を示したウサギ 3 匹を抵抗群とした。好発群と抵抗群の間を、狭窄率 70 - 85%の連続した病変が認められるグループ 5 匹、狭窄率 60 - 90%の単独の病変が認められるグループ 4 匹、狭窄率 30 - 60%の単独病変が認められるグループ 2 匹に区分した。虚血性心筋病変は好発群で認められ、抵抗群では認められなかった。

##### 2) 血清脂質値との関連

血清総コレステロールの平均値は、冠動脈病変好発群で 4 月齢が 1,406mg/dl, 20 月齢が 767mg/dl であり、冠動脈病変抵抗群では、それぞれ 1,408g/dl, 996/dl であり、血清総コレステロール値の上昇は冠動脈病変の進行や心筋病変の発生に関与しなかった。血清中性脂肪値およびリポ蛋白質も同様の傾向を示した。これらの結果は、血清脂質値以外の因子が冠動脈病変の進行及び虚血性心筋病変の発生に関与していることを示唆している。

##### 2) 大動脈病変との関連

大動脈内膜表面に占める病変面積の割合は、いずれのウサギも 90%以上であり、好発群と抵抗群はいずれも平均値が 93%であった。したがって大動脈動脈硬化病変の程度は冠動脈病変の進行や心筋病変の発生に関与しなかった。これらの結果は冠動脈病変の進行や心筋病変の発生に関わる因子が、大動脈病変の進行に関わる因子とは異なることを示唆している。

##### 3) 血清脂質値以外の従来のマーカー

動脈硬化の発生・進行に関与している可能性が示唆されている血中 CRP, 酸化

LDL、窒素 SOD, 素酸化物、インスリン値、血糖値、H-FABP, cardiac Troponin I, ミオグロビンは、冠動脈病変の進行および心筋病変の発生と相関を示さなかった。

##### 4) 血清メタボローム解析の結果

血清のメタボローム解析の結果を表 1 に示す。メタボローム解析において 60 の代謝産物を検出し、11 の代謝産物が冠動脈病変の進行と統計的に有意な相関を示した。1 代謝産物が冠動脈病変の発生時期 (4 月齢) に正の相関 ( $r=0.545$ ,  $P=0.007$ ) を示し、相対分子数は好発群が抵抗群の 1.77 倍 ( $P=0.034$ ) の高値を示した。10 の代謝産物が、冠動脈病変が進行して心筋病変が発生する時期 (15 月齢以上) で強い負の相関を示し、好発群は抵抗群に比較して有意に低い相対分子数を示した。リピドーム解析の結果と合わせて論文として公表する予定であるため、代謝産物の名称等については本報告書での公表は差し控える。

表 1. 代謝産物と冠動脈病変の相関

| 代謝産物 | 相関係数   | P-値    | 抵抗群との比 | P-値   |
|------|--------|--------|--------|-------|
| 1    | 0.545  | 0.007  | 1.77   | 0.034 |
| 2    | -0.799 | <0.001 | 0.61   | 0.008 |
| 3    | -0.626 | 0.003  | 0.69   | 0.037 |
| 4    | -0.643 | 0.002  | 0.59   | 0.004 |
| 5    | -0.683 | <0.001 | 0.51   | 0.008 |
| 6    | -0.607 | 0.006  | 0.65   | 0.012 |
| 7    | -0.554 | 0.011  | 0.671  | 0.035 |
| 8    | -0.637 | 0.003  | 0.66   | 0.017 |
| 9    | -0.610 | 0.004  | 0.665  | 0.022 |
| 10   | -0.538 | 0.014  | 0.67   | 0.025 |
| 11   | -0.538 | 0.014  | 0.66   | 0.025 |

代謝産物 1 は 4 月齢における検体、その他の代謝産物は 20 月例あるいは死亡前の検体を用いた解析

##### 5) ゲノム解析に関する実験結果

12 月齢の WHHLM1 ウサギの冠動脈病変狭窄率は 80%以上の狭窄率が連続して認められる好発群 4 匹、60%以下の狭窄病変が単発した抵抗群が 2 匹、その中間のウサギ 4 匹が認められた。冠動脈病変の程度に大きなバラツキが認められたことから、冠動脈病変の進行に関わるゲノムの同定が期待できる。ゲノム解析の結果、JW ウサギや New Zealand white ウサギと比較して、WHHLM1 ウサギで 25 の遺伝子に変異が認められた。現在投稿中であるため、詳細については本報告書での公表は控える。

##### 6) リピドーム解析

大阪大学大学院 工学研究科生物資源工学領域および九州大学生体防御医学

研究所附属トランスオミクス医学研究センターメタボロミクス分野の馬場健史教授の研究室にて、ウサギ血清のリピドーム解析システムを確立し(J Biosci Bioeng. 2015; 120(4): 476-482) 本研究に使用したウサギの凍結血清を用いて解析を継続している。2016年度末までに結果が出る予定である。

以上の結果から、WHHLMI ウサギの冠動脈病変の進行および心筋病変の発生に関わる血清マーカーを確認した。今後は、ゲノム解析およびリピドーム解析で得られた結果を統計解析し、冠動脈病変および心筋病変の予測マーカーを確認する予定である。さらに、臨床検体を用いた解析を実施してヒトでの有用性を確認することによって、ヒトの冠動脈病変の進行および虚血性心筋病変発生の予測マーカーおよび診断マーカーの開発の端緒となることが期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Takeda H, Koike T, Izumi Y, Yamada T, Yoshida M, Shiomi M, Fukusaki E, Bamba T. Lipidomic analysis of plasma lipoprotein fractions in myocardial infarction-prone rabbits. J Biosci Bioeng. 2015; 120(4): 476-482.

〔学会発表〕(計 3件)

Hiroaki Takeda, Tomonari Koike, Yoshihiro Izumi, Takayuki Yamada, Masaru Yoshida, Masashi Shiomi, Eiichiro Fukusaki, Takeshi Bamba: Lipidome analysis of plasma lipoprotein fractions in myocardial infarction-prone rabbits. The International Chemical Congress, Pacific Basin Societies 20 (Sheraton Waikiki Hotel, Hawaii, U.S.A., Dec 15-20, 2015)

Hiroaki Takeda, Tomonari Koike, Yoshihiro Izumi, Takayuki Yamada, Masaru Yoshida, Masashi Shiomi, Eiichiro Fukusaki, Takeshi Bamba: Lipidomics of plasma lipoprotein fractions in myocardial infarction-prone rabbits. 111th International Conference of the Metabolomics Society (June 29-July 2, 2015, Hyatt Regency Burlingame, San Francisco, U.S.A.)

H.Takeda, T.Koike, Y.Izumi, T.Yamada, M.Yoshida, M.Shiomi, E.Fukusaki, T.Bamba: Lipidome analysis of plasma lipoprotein fractions in myocardial infarction-prone rabbits. 63rd Annual Conference on Mass Spectrometry, Japan. 2015年6月17-19日、つくば国際会議場

(茨城県)

〔図書〕(計 0件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

該当なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

該当なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

該当なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

塩見 雅志 (SHIOMI, Masashi)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 50226106

(2)研究分担者

伊藤 隆 (ITO, Takashi)

神戸大学・大学院医学研究科・助手

研究者番号: 30135793

小池 智也 (KOIKE, Tomonari)

神戸大学・大学院医学研究科・助手

研究者番号: 40432158

石田 達郎 (ISHIDA, Tatsuro)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 00379413

(3)連携研究者

篠原 正和 (SHINOHARA, Masakazu)

神戸大学・大学院医学研究科・助手

研究者番号: 80437483