

令和元年5月28日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26242055

研究課題名(和文) 医薬工連携による画期的診断システムの構築と心不全に対する新規診断法の開発

研究課題名(英文) Development of a new diagnostic method for heart failure in collaboration with drug engineers

研究代表者

堤 康央 (Tsutsumi, Yasuo)

大阪大学・薬学研究科・教授

研究者番号：50263306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、国民病ともいえる心不全を対象に、早期診断・病態診断に叶う診断用バイオマーカー蛋白質を同定したうえで、高親和性の抗体を創製することで、心不全に対する有用な体外診断法を開発することを目的とした。本観点から代表者らは、心臓の前後血清を用いたプロテオーム解析により得られた知見を基に、細胞骨格系の蛋白質が、ヒトにおける心不全バイオマーカーになり得ることを見出した。さらに、この候補蛋白質は、虚血状態における心筋の細胞死を抑制することが示唆された。今後は、多症例の心不全患者サンプルを対象に、患者の病態履歴情報と照らし合わせながら、心不全バイオマーカーとしての有用性について追究していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心不全の病態は多様であり、予後を予測するためのバイオマーカーが確立されているわけではない。従って、本研究成果により、心不全病態に対する特異的血清バイオマーカーが確立されれば、侵襲の多い診断を避けた新しい診断技術に基づき、心不全に対する先制医療が可能となる。また、新たな治療ターゲットの探索になる可能性も秘めており、基礎医学、臨床医学の両方の観点からも、医学的に意義深い臨床研究を遂行できる。さらに、心不全の予防や重症化阻止のみならず、心疾患がもたらす医療費削減にもつながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop biomarker proteins for early diagnosis and pathologic diagnosis for heart failure which has been regarded as a national disease, and the following useful diagnostic method by creating a high-affinity antibody. From this viewpoint, based on our findings obtained by proteomic analysis using the serum before and after the heart, the representative found that cytoskeletal proteins can be a heart failure biomarker in humans. Furthermore, we revealed that this candidate protein might suppress myocardial cell death in an ischemic-like condition. In the future, we will investigate the usefulness of this candidate protein as a heart failure biomarker by assessing the samples of heart failure patient of many cases in comparison with information of patient's disease state history.

研究分野：人間医工学

キーワード：心不全 バイオマーカー 検査・診断システム

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

心不全は、心疾患における死亡総数の約 60%を占めており、高齢化社会も相俟って、罹患者数は増加傾向にあり、まさに国民病とも言うべき疾患の一つである。しかし、診断用バイオマーカーの欠如も相俟って、早期診断・病態診断法が 10 年来殆ど進展しておらず、健康長寿社会の実現に向けて、画期的診断システムの開発が最も望まれている疾患である。一般的に心不全の診断には、心エコーが用いられるが、確定診断が困難な症例も多く、右心不全や拡張不全といった心不全が高頻度で認められる病態ですら、正確に見分け、的確に診断することは、熟練の医療従事者でも困難である。本観点から、数多くの炎症・細胞傷害マーカーなどが試行錯誤で検証され、中でも、B 型ナトリウム利尿ペプチド (BNP) は、比較的有用なマーカーとして利用されている。しかし、BNP ですら、病態早期から上昇するものの、心エコー同様に、拡張不全や右心不全などの診断は困難であり、各病態を区別できないことが判明している。そのため、新たな診断用バイオマーカーの同定と共に、より早期の段階で心不全患者を抽出でき、的確に病態診断可能な体外診断法や、生体イメージングを利用した全身診断法などの革新的な診断システムの確立が喫緊の課題となっている。

本観点から、研究代表者らは、新規心不全マーカーの探索に向けて、同一検体由来の異なる部位より血液を採取することで、これまでのプロテオーム解析の課題とされていた、個体差の問題を回避し得るアプローチに着眼し、心血管入口の血液である動脈血に比べ、心臓冠血管の出口である冠状静脈洞の血液 (CS 血) に多く含まれると考えられる心分泌蛋白質に焦点をあてた。心分泌蛋白質とは、心臓の組織から分泌される蛋白質であり、血中に含まれる、あらゆる組織から分泌される蛋白質の中でも、特に心臓の病態に密接に関与すると考えられている。従って、心不全病態の的確な診断に向けた、新規心不全マーカーを確立するうえで、心臓の病態に応じて発現変動する新たな心分泌蛋白質の同定が期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では、心不全マーカーの探索対象を、心臓の病態に呼応して発現変動する心分泌蛋白質にあらかじめフォーカスしたうえで、プロテオミクスを活用して心不全の早期診断・病態診断に叶う診断用バイオマーカー蛋白質の同定を試み、高親和性の抗体を創製することで、心不全に対する有用な体外診断法を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### プロテオーム解析による心分泌蛋白質の探索・同定

ヒト 1 検体から採取した、大腿動脈血 (FA 血) と冠状静脈洞血 (CS 血) を供し、安定同位体標識を施すことで蛋白質の発現量の比較定量を可能とする iTRAQ 試薬を用いて、ペプチドをラベル化し、LC-MS/MS により FA 血と CS 血中に含まれる蛋白質の発現変動を網羅的に解析することで、心分泌蛋白質の同定を試みた。なお、CS 血および FA 血に関しては、大阪大学医学部附属病院にて、臨床研究に同意が得られた患者より採取したものであり、大阪大学医学部附属病院および関連機関の倫理審査委員会の承認を得て、解析を実施した。

#### 心不全モデルマウス

マウスは 7 週齢の C57BL/6、雄マウスを用い、MI モデルマウス群に関しては、イソフルラン吸入麻酔下にて、マウスの左冠動脈前下行枝を結紮し、14 日後に腹部大動脈より採血した。また、線維化率の評価に関しては、処置 14 日後に心臓を摘出し、組織切片を作成した後、Masson'

s Trichrome 染色を実施した。左室面積における、Masson' s Trichrome 染色により染色された線維化領域の面積を Scion Image (Scion Corporation)により解析し、繊維化率を算出した。

#### 心分泌蛋白質のヒトにおける心不全との関連評価

健常者末梢血および患者末梢血は、それぞれ大阪大学キャンパスライフ健康支援センターおよび大阪大学医学部附属病院にて、臨床研究に同意が得られた方より採取したものであり、大阪大学医学部附属病院および関連機関の倫理審査委員会の承認を得て、解析を実施した。

#### 4. 研究成果

心分泌蛋白質の探索、同定を目的に、網羅的プロテオーム解析を実施し、同定された各蛋白質の発現変動比を解析したところ、647 個の蛋白質のうち、CS 血中での発現変動比が高い蛋白質、即ち、心臓を通過することで血中濃度が増加すると考えられる蛋白質が 328 個、逆に、FA 血中での発現変動比が高い蛋白質、即ち、心臓を通過することで血中濃度が減少すると考えられる蛋白質が 319 個得られた。そこで、これらの蛋白質の中から、心分泌蛋白質候補を絞り込むにあたり、FA 血中に対する CS 血中での発現変動比に着目し、FA 血に対する CA 血中での発現変動比が 1.5 倍以上の変動があった蛋白質を 23 個、そのうち、2.0 倍以上の変動があった蛋白質を 4 個選定した。これら 4 個の蛋白質に関しては、これまで心分泌蛋白質としての報告はなく、新たな心分泌蛋白質の候補となる可能性を有していることが示唆された。次に、これら心分泌候補蛋白質が、心不全に対するバイオマーカーとして利用可能か否かについて、心不全モデルマウスを用いて評価した。マウス血清を用いた心分泌候補蛋白質の定量評価の結果、対照群と比較し、心不全モデルマウス群の血中において、細胞骨格関連蛋白質や細胞外マトリックス制御蛋白質の発現量が増加することを見出した。そこで、これら候補蛋白質について、ヒト FA 血、および CS 血中における定量解析を実施したところ、ヒト CS 血中における候補蛋白質量の増加が認められ、心分泌蛋白質となり得ることが示唆された。また、細胞骨格関連蛋白質の血中量の増加と、モデルマウスの心臓での繊維化率の増加との間に正の相関が認められることが明らかとなり、心不全の病態を反映し得る新規バイオマーカーとなり得ることを示した。そこで、これら候補蛋白質について、ヒトでの発現変動を評価するため、健常者血清と心筋症患者血清中における候補蛋白質の定量解析を実施した。その結果、細胞骨格関連蛋白質が、一部の心筋症患者の血中において増加傾向を示すことが明らかとなり、ヒトにおける、心不全バイオマーカーとしての可能性を見出した。

このように、細胞骨格系の蛋白質が、ヒトにおける心不全バイオマーカーになり得ることを示してきたものの、心不全病態におけるこの候補蛋白質の機能は明らかとされていない。従って、心不全病態における機能解明を図ることで、心不全の分子レベルでの病態解明とそれに基づく確かな病態評価・診断法・治療法の開発につながると考えた。そこで、ラット心臓横紋筋細胞株を用いて、心不全の主な原因疾患のひとつである虚血性心疾患に着目し、心筋の虚血様状態を模すことで、候補蛋白質の発現変動と心不全病態との関連解析を試みた。その結果、(1) 細胞を虚血条件下で培養することで、候補蛋白質の発現量が増加すること、(2) 候補蛋白質を siRNA でノックダウンさせることで、虚血条件下において誘導される細胞死が亢進することが明らかとなった。従って、代表者らが見出してきた心不全バイオマーカーの候補蛋白質は、虚血状態における心筋の細胞死を抑制することが示唆された。今後は、得られた疾患関連バイオマーカー蛋白質については、モデル動物を用いた、分子病態学・分子生物学的な機能解明を試みると共に、より多症例の心不全患者サンプルを対象に、患者の病態履歴情報と照らし合わ

せながら、心不全バイオマーカーとしての有用性について追究する予定である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Higashisaka K., Nakashima A., Iwahara Y., Aoki A., Nakayama M., Yanagihara I., Lin Y., Nagano K., Tsunoda S., Saito S., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Neutrophil depletion exacerbates pregnancy complications, including placental damage, induced by silica nanoparticles in mice., *Front. Immunol.*, 査読有, 9: 1850, 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.01850.
- ② Aoyama M., Yoshioka Y., Arai Y., Hirai H., Ishimoto R., Nagano K., Higashisaka K., Nagai T., Tsutsumi Y. : Intracellular trafficking of particles inside endosomal vesicles is regulated by particle size., *J. Controlled Release.*, 査読有, 260: 183-93, 2017. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.06.007.
- ③ Nagano T., Nagano K., Nabeshi H., Yoshida T., Kamada H., Tsunoda S., Gao JQ., Higashisaka K., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Modifying the surface of silica nanoparticles with amino or carboxyl groups decreases their cytotoxicity to parenchymal hepatocytes., *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, 40(5): 726-8, 2017. doi: 10.1248/bpb.b16-00917.
- ④ Taki S., Kamada H., Inoue M., Nagano K., Mukai Y., Higashisaka K., Yoshioka Y., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : A novel bispecific antibody against human CD3 and Ephrin receptor A10 for breast cancer therapy., *PLOS ONE*, 査読有, 10(12):e0144712, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0144712.
- ⑤ Nagano K., Imai S., Zhao X., Yamashita T., Yoshioka Y., Abe Y., Mukai Y., Kamada H., Nakagawa S., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Identification and evaluation of metastasis-related proteins, oxysterol binding protein like 5 and calumenin, in lung tumor., *Int. J. Oncol.*, 査読有, 47(1): 195-203, 2015. doi: 10.3892/ijo.2015.3000.

[学会発表] (計 11 件)

- ① 豊田麻人, 東阪和馬, 大須賀絵理, 笠原淳平, 櫻井美由紀, 辻野博文, 長野一也, 藤尾 慈, 坂田泰史, 堤 康央: 心不全病態における細胞骨格系蛋白質の発現変動とその機能解明., 日本薬学会第 139 年会., 幕張メッセ (千葉県千葉市), 2019 年 3 月 21-23 日.
- ② 東阪和馬, 大須賀絵理, 笠原淳平, 豊田麻人, 尾花理徳, 鎌田春彦, 前田真貴子, 長野一也, 藤尾 慈, 坂田泰史, 堤 康央: 心分泌蛋白質に着目した心不全に対する新規バイオマーカー探索., 日本薬学会第 138 年会., ANA クラウンプラザホテル金沢 (石川県金沢市), 2018 年 3 月 26-28 日.
- ③ 豊田麻人, 東阪和馬, 大須賀絵理, 笠原淳平, 藤尾 慈, 坂田泰史, 長野一也, 堤 康央: 新規心不全マーカー候補蛋白質の心不全病態における機能解明., 日本薬学会第 138 年会., ANA クラウンプラザホテル金沢 (石川県金沢市), 2018 年 3 月 26-28 日.
- ④ 大須賀絵理, 東阪和馬, 笠原淳平, 豊田麻人, 鎌田春彦, 前田真貴子, 長野一也, 藤尾 慈, 坂田泰史, 堤 康央: 心不全に対する新規診断法の開発に向けたバイオマーカーの探索., 日本薬学会第 137 年会., 仙台国際センター (宮城県仙台市), 2017 年 3 月 25-27 日.
- ⑤ 豊田麻人, 東阪和馬, 大須賀絵理, 笠原淳平, 尾花理徳, 鎌田春彦, 長野一也, 藤尾

慈, 坂田泰史, 堤 康央: 新規心不全バイオマーカーの確立に向けた、モデルマウスによる有用性評価., 日本薬学会第 137 年会., 仙台国際センター (宮城県仙台市), 2017 年 3 月 25-27 日.

- ⑥ 堤 康央: 革新的バイオ医薬の目指すべき安全性面からのアプローチ., 第 7 回日本安全性薬理研究会学術年会., 東京大学弥生講堂 (東京都文京区) ., 2016 年 2 月. (シンポジウム: 革新的バイオ医薬品の安全性/安全性薬理評価)
- ⑦ Nagano K., Maeda Y., Yamashita T., Inoue M., Mukai Y., Kamada H., Higashisaka K., Yoshioka Y., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: Development and evaluation of a monoclonal antibody against Eph receptor A10 for novel molecular targeted therapy of breast cancers., Controlled Release Society (CRS) Annual Meeting 2015, Edinburgh (Scotland), 26-29 July, 2015.
- ⑧ Nagano K., Imai S., Inoue M., Higashisaka K., Yoshioka Y., Mukai Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: High-throughput validation of lymph node metastasis-related proteins in lung tumor by antibody proteomics technology., 2015 American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) National Biotechnology Conference, San Francisco (USA), 8-10 June, 2015.
- ⑨ 堤 康央: オールジャパンでのアカデミア創薬の加速に向けて., CBI 関西., グランフロント大阪 (大阪府大阪市), 2014 年 12 月 2 日.
- ⑩ Ogura T., Mukai Y., Maeda M., Fujio Y., Sakata Y., Higashisaka K., Yoshioka Y., Nagano K., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: The search for heart secretory proteins as heart disease biomarkers., HUP0 13th Annual World Congress., Madrid (Spain), 5-8 October, 2014.
- ⑪ Mukai Y., Ogura T., Misato K., Nagano T., Higashisaka K., Yoshioka Y., Nagano K., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Creation of a novel non-immune phage human antibody library which consists of four stable VH-VL pairs., 5th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress., Melbourne (Australia), 13-16 April, 2014.

[図書] (計 1 件)

- ① 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: 医学の歩み プロテオミクス技術を用いたバイオマーカーの開発., 医歯薬出版, 2014

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

該当なし

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

[その他]

ホームページ等

該当なし

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：井上 豪

ローマ字氏名：Tsuyoshi Inoue

所属研究機関名：大阪大学

部局名：工学研究科（当時）

職名：教授

研究者番号：20263204

研究分担者氏名：角田 慎一

ローマ字氏名：Shin-ichi Tsunoda

所属研究機関名：医薬基盤・健康・栄養研究所（当時）

部局名：バイオ創薬プロジェクト（当時）

職名：プロジェクトリーダー（当時）

研究者番号：90357533

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：坂田 泰史、藤尾 慈、木岡 秀隆、西田 誠、尾花 理徳、澤 芳樹、浜窪 隆雄、津本 浩平、村瀬 至生、鎌田 春彦、吉岡 靖雄、向 洋平、長野 一也、東阪和馬

ローマ字氏名：Yasushi Sakata, Yasushi Fujio, Hidetaka Kioka, Makoto Nishida, Masanori Obana, Yoshiki Sawa, Takao Hamakubo, Kohei Tsumoto, Norio Murase, Haruhiko Kamada, Yasuo Yoshioka, Yohei Mukai, Kazuya Nagano, Kazuma Higashisaka

※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。