

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21083

研究課題名（和文）ヒト剖検試料を用いたNO関連タンパク質解析による虚血性心疾患死後診断の研究

研究課題名（英文）Analysis of NO-Related Proteins in Human Autopsy Samples for Insights into Ischemic Heart Disease

研究代表者

山崎 元太郎（Yamasaki, Gentaro）

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：60964096

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：剖検で得られた冠動脈および心筋を用いて一酸化窒素関連タンパク質の解析を行い、虚血性心疾患との関連を調べた。

各試料のホモジネート中に含まれる誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS/NOS2）、内皮型一酸化窒素合成酵素（eNOS/NOS3）、可溶性グアニル酸シクラーゼ（sGC）の濃度をELISA法で定量し、その値を総タンパク濃度で除した比を以て冠動脈硬化症の有無の間で統計解析を行ったところ、冠動脈硬化症のある心筋においてiNOSが高い傾向にあった。

今回は単純な冠動脈硬化症の有無の2群で検討を行ったが、今後は更に症例数を増やし、冠動脈硬化症の程度別のiNOS発現の違いを調べていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、剖検で採取された心臓組織のホモジネート中に存在する可溶性グアニル酸シクラーゼ（sGC）・誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）、内皮型一酸化窒素合成酵素（eNOS）の3つの一酸化窒素（NO）関連タンパク質について分析したところ、総タンパクで補正した心筋ホモジネート中のiNOS存在比は、冠動脈硬化のある事例で有意に高かった。iNOSはマクロファージなどによって誘導されるNO合成酵素であり、冠動脈硬化の発生にも大きく関わっているタンパク質である。そのため、超早期の虚血性心疾患の死後診断にも有用である可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：In this study, coronary arteries and myocardium obtained from autopsies were analyzed to investigate the association between ischemic heart disease and nitric oxide-related proteins.

The concentrations of inducible nitric oxide synthase (iNOS/NOS2), endothelial nitric oxide synthase (eNOS/NOS3), and soluble guanylate cyclase (sGC) were quantified using ELISA in the homogenates of each sample and normalized to the total protein content. Statistical analysis comparing samples from hearts with and without coronary arteriosclerosis revealed a higher tendency of iNOS expression in myocardial samples with arteriosclerosis.

This study focused on a binary classification of the presence of coronary arteriosclerosis. Future research planned to expand the sample size and explore variations in iNOS expression relative to the severity of coronary arteriosclerosis.

研究分野：Forensic Pathology

キーワード：NO関連タンパク質 虚血性心疾患 iNOS NOS2 ヒト剖検試料

1. 研究開始当初の背景

心疾患は我が国の死因統計の 2 位を占め、その数は年々増加傾向である。東京都監察医務院が毎年公開している統計報告においても、検案および解剖した症例における死因で虚血性心疾患が全死因の 46%と最も多くを占めており、その正確な死後診断は社会的ニーズが大きい。

しかし、虚血性心疾患に特徴的な心筋壊死や線維化といった所見は、発症後数時間から数日を経過した症例でのみ観察される。一方で、発症後数時間以内に死亡するような超急性の虚血性心疾患では、顕微鏡で確認できる心臓の変化はほとんど見られない。それに加え法医学領域では、臨床医学と異なり、生前の詳細な臨床情報が得られないため、他の死因の可能性を排除し、限られた生活習慣の情報や解剖時の冠動脈硬化症の状態をもとに除外的診断を行わざるを得ない状況にある。

このため、超急性の虚血性心疾患を積極的に診断するため、有用な死後診断マーカーの開発は急務である。

2. 研究の目的

本研究では、組織ホモジネート中の可溶性グアニル酸シクラーゼ(sGC)・誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)、内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)の 3 つの一酸化窒素(NO)関連タンパク質について ELISA 定量を行った。その定量値を死因が冠動脈硬化のある群とない群の 2 群に分けて統計学的解析を行い、冠動脈硬化の有無による定量値の違いを明らかにした。これにより、現状では除外的診断に頼らざるを得ない超急性虚血性心疾患の積極的死後診断に有用な死後心臓タンパク質を同定・分析した。

3. 研究の方法

(1) 免疫染色による局在の確認

剖検で得られた心臓試料をホルマリン固定した後、各 NO 関連タンパク質に対して免疫染色を行い、局在を確認した。虚血性心疾患に関連した NO 関連タンパク質として、sGC、iNOS、eNOS、神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS)の 4 種類をターゲットタンパク質として選定した。

(2) ウェスタンブロットによるターゲットタンパク質の確認

免疫染色によって局在が確認できた NO 関連タンパク質において、剖検によって得られた冠動脈および心筋のホモジネートを用いたウェスタンブロットを行い、各ターゲットタンパク質でバンドが検出されることを確認した。

(3) 総タンパク定量と各 NO 関連タンパク質の ELISA 定量

剖検によって得られた試料のうち、冠動脈硬化のあった事例の冠動脈ホモジネート 20 例および心筋ホモジネート 20 例と、冠動脈硬化のなかった事例の冠動脈ホモジネート 20 例および心筋ホモジネート 20 例を対象とし、BCA 法によって合計 80 例のホモジネートの総タンパク濃度を定量した。同 80 例のホモジネートに対して、ELISA キットを用いて各 NO 関連タンパク質ホモジネート中の濃度定量を行った。

(4) 冠動脈硬化の有無における統計解析

冠動脈硬化のある群とない群の 2 群間で、冠動脈ホモジネートおよび心筋ホモジネート中の各 NO 関連タンパク質の存在比に違いがあるかをそれぞれ統計学的に分析した。各 NO 関連タンパク質ホモジネートの濃度を総タンパク濃度で除した値を用いて分析を行い、定量できなかった試料は除外して検討を行った。解析法にはマン・ホイットニーの U 検定を用い、有意確率が 0.05 未満で有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) ターゲットとした 4 種類のタンパク質のうち、sGC、iNOS、eNOS では陽性細胞が確認されたが、nNOS ではほとんど陽性細胞が認められず、以後の検討は sGC、iNOS、eNOS の 3 タンパク質とした。sGC は冠動脈内皮細胞および心筋細胞で陽性、iNOS では冠動脈外膜の結合組織で陽性、eNOS では冠動脈内皮細胞および心筋細胞で陽性であった(図 1)。

(2) sGC、iNOS、eNOS の 3 種類のタンパク質および GAPDH に対して免疫染色で使用したものと同一抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところ、全てのタンパク質でバンドが確認できた。

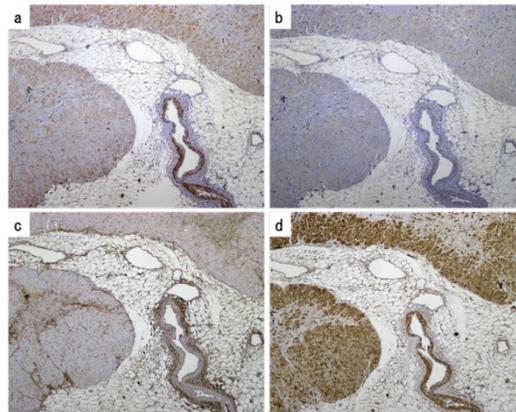


図1. 心臓試料に対する各種免疫染色(×40)
a: sGC, b: nNOS c: iNOS, d: eNOS

(3) 冠動脈ホモジネートおよび心筋ホモジネートの総タンパク濃度を測定した結果、冠動脈ホモジネートの平均値は 2.53765 mg/mL (範囲; 1.798~3.279 mg/mL)、中央値は 2.5695 mg/mL (SD; 0.396331 mg/mL) であり、心筋ホモジネートの平均値は 2.88008 mg/mL (範囲; 2.141~3.569 mg/mL)、中央値は 2.88550 mg/mL (SD; 0.299196 mg/mL) であった。

sGC の ELISA 定量の結果は、冠動脈ホモジネートで平均値 0.09586 ng/mL (範囲; 0.024~0.607 ng/mL)、中央値 0.670 ng/mL (SD; 0.119368 ng/mL)、心筋ホモジネートで平均値 0.15129 ng/mL (範囲; 0.024~0.376 ng/mL)、中央値 0.133 ng/mL (SD; 0.087478 ng/mL) であった。

iNOS の ELISA では、冠動脈ホモジネートで平均値 15.81105 pg/mL (範囲; 4.626~43.743 pg/mL)、中央値 14.405 pg/mL (SD; 8.426645 pg/mL)、心筋ホモジネートで平均値 21.78035 pg/mL (範囲; 7.071~69.820 pg/mL)、中央値 20.110 pg/mL (SD; 11.681773 pg/mL) であった。

eNOS の ELISA では、冠動脈ホモジネートで平均値 626.58020 pg/mL (範囲; 3.152~1850.347 pg/mL)、中央値 436.088 pg/mL (SD; 729.197644 pg/mL)、心筋ホモジネートで平均値 4834.72238 pg/mL (範囲; 955.612~22833.334 pg/mL)、中央値 3250.1750 pg/mL (SD; 4215.692630 pg/mL) であった。

冠動脈ホモジネートにおいては sGC で 18 例、eNOS で 35 例が、心筋ホモジネートでは、sGC で 6 例が out of range の判定であり、濃度測定が不可能であった。

(4) ELISA 定量できた冠動脈および心筋ホモジネートにおいて、その定量値を総タンパク濃度で除した比を用いて、冠動脈硬化の有無で統計解析を行ったところ、冠動脈硬化のあるグループでの心筋ホモジネート中 iNOS は、冠動脈硬化のないグループのものより有意に高かった (p=0.0491)。それ以外のホモジネート中の各 NO 関連タンパク質の濃度には、2 群間で有意差は認められなかった。(表 1)

	sGC/総タンパク	iNOS/総タンパク	eNOS/総タンパク
冠動脈	p=0.142	p=0.64	p=0.4
心筋	p=0.734	p=0.0491	p=0.583

表1. 冠動脈硬化の有無2群間における、冠動脈および心筋ホモジネート中の各NO関連タンパク質の定量値/総タンパク濃度比の有意確率

(5) 今回は単純な冠状動脈硬化症の有無の 2 群で分けて検討を行い、心筋における iNOS 定量値/総タンパク比に有意差が認められた。

iNOS は心臓においてマクロファージなどによって誘導される NO 合成酵素であり、冠動脈硬化の発生にも大きく関わっており、超早期の虚血性心疾患の死後診断にも有用である可能性が考えられる。今後の研究では、更に多くの症例を対象として、iNOS 発現と死因の関係、冠状動脈硬化症の程度による iNOS 発現の違い、および iNOS 発現細胞の動態といった iNOS に焦点の絞った研究を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎元太郎, 高橋玄倫, 近藤武史
2. 発表標題 冠状動脈硬化症事例におけるNO関連タンパク質の局在
3. 学会等名 第70回日本法医学会学術近畿地方集会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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