

令和 4 年 5 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10685

研究課題名(和文) 心臓性急死における内皮関連分子のダイナミクス-トロンボモジュリンを中心として-

研究課題名(英文) Dynamics of Endothelium-Associated Molecules in Sudden Cardiac Death (Focusing on Thrombomodulin)

研究代表者

近藤 武史 (Kondo, Takeshi)

神戸大学・医学研究科・講師

研究者番号：20335441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：トロンボモジュリンは血管内皮表面に発現する糖蛋白であり、抗血栓・抗凝固分子として働く。死因を虚血性心疾患と診断した法医解剖40例について心筋におけるトロンボモジュリンの蛋白発現を免疫組織化学にて評価した。虚血性心筋障害後の心筋リモデリングにおいて、トロンボモジュリンの発現は上昇し、リモデリングが完成すると消失した。虚血性心疾患において肉眼的所見が乏しい場合やHE染色で有意な所見が見られない場合は診断に苦慮するが、トロンボモジュリン免疫染色によって虚血性心筋障害後の心筋リモデリングのどのフェーズにあるかの判定が可能になり、剖検における虚血性心疾患の補助診断に有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

死因究明・法医実務上、診断精度の高い内因性急死の解析は重要な課題である。法医解剖における内因性急死の約半数は心臓疾患であり、その中核をなすのは虚血性心疾患であるが、法医解剖上、顕微鏡的な手法を用いても、その確定診断に難渋することが多い。従来のHE染色を用いる手法に加え、内皮関連分子トロンボモジュリンの動態を検討することは、虚血性心疾患に伴う内皮細胞の動態を明瞭にし内皮細胞障害を検出するという点で剖検における虚血性心疾患の補助診断に有用である可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：Thrombomodulin (TM) is a transmembrane glycoprotein expressed on the surface of vascular endothelial cells. Myocardial tissue from cases of ischemic heart disease (IHD) was subjected to immunohistochemistry by thrombomodulin. We examined 40 neutral-formalin-fixed, paraffin-embedded myocardial tissue samples from autopsy cases that were diagnosed with IHD. TM expression was observed in vascular endothelial cells and in mesothelial cells of the epicardium. In necrotic myocardium, diffusion of TM was observed. Upregulated TM expression was observed around myocardial cells under ongoing remodeling, which suggested endothelial proliferation in these locations. Completed fibrotic foci of the myocardium did not show upregulated TM expression. In a mouse model of acute myocardial infarction, the same phenomena as that found in human samples were observed. Immunostaining of TM may be useful for supplementing conventional staining techniques in the diagnosis of IHD in forensic pathology.

研究分野：法医学

キーワード：トロンボモジュリン

## 1. 研究開始当初の背景

トロンボモジュリンは分子量 57000 の糖タンパクであり、血管内皮表面に発現し、抗血栓・抗凝固分子としてトロンピンに結合し、プロテイン C 系を活性化する。製剤の開発など、臨床医学の凝固系の領域では精力的に研究されている。一方、細小血管の破壊によって血中に遊離するため、内皮細胞障害のマーカーとして知られる。血中トロンボモジュリン値は DIC や MOF の病態解析にも寄与している。その免疫染色は、診断病理学では中皮腫の補助的染色として知られるが、各種臓器の内皮細胞にも明瞭に染まってくる。循環器領域では、血中トロンボモジュリン濃度は、動脈硬化病変と相関があり、心血管イベントの予測因子であると報告されている。

法医解剖における死因究明では心臓性突然死が問題となっているが、解剖を行っても心臓性突然死事例の死因診断には困難を伴う場合が多く、形態的变化が明らかな事例は限られている。虚血性心疾患が疑われても、心筋に形態的变化の出ない場合や通常の HE 染色で有意な所見がない場合の死因診断は困難である。

心臓性突然死における内皮障害に際しての内皮関連分子の動きを法医診断に応用できないかというのが、本課題の核心をなす学術的「問い」であり、心臓疾患において内皮関連分子の動きを解明することは心臓性突然死の病態解明や治療戦略の標的、突然死の予防という点で非常に意義深い、と考え本研究計画を立案した。

## 2. 研究の目的

死因究明上、診断精度の高い内因性急死の解析は重要な課題である。法医解剖における内因性急死の約半数は心臓疾患とされ、その中核をなすのは虚血性心疾患であるが、法医解剖上その確定診断に難渋することも多い。肉眼的に所見が乏しい場合や HE 染色で有意な所見が出ない場合に特に死因診断に苦慮する。血管内皮細胞に発現する分子であるトロンボモジュリンは、凝固系の領域では精力的に研究されている。トロンボモジュリンは内皮障害のマーカーとしても知られ、DIC や MOF の病態にも関与している。当該研究では、特にトロンボモジュリンに着目し、法医解剖心臓性急死例での解析から、トロンボモジュリンを中心とした内皮関連分子の心臓性突然死、特に虚血性心疾患におけるダイナミクスを解析し、これまで注目されていなかった手法で内皮障害・心筋負荷・心筋障害を検出し、法医学的に有用な診断マーカーの開発を目指す。

## 3. 研究の方法

### A) トロンボモジュリンの血清濃度を死因に応じて測定、分析する

法医解剖症例(心臓死、非心臓死)において血清中のトロンボモジュリン蛋白を ELISA 法やウェスタンブロット等の手法により解析する。心臓死においては、虚血性心疾患(急性冠症候群を含む)、致死性不整脈、心筋症、心筋炎、心外膜炎などの死因に応じて、その血清濃度との相関を分析する。

### B) 免疫組織化学や *in situ* hybridization を用いて、心筋組織や血管組織におけるトロンボモジュリン発現を解析する

心筋サンプルを用いて、トロンボモジュリン発現を解析する。免疫組織化学の対象としては、死後経過時間 48 時間以内のものを対象とする。複数あるトロンボモジュリン抗体の至適染色条件の設定を行う。内皮マーカーとして知られる他の分子、第 VIII 因子関連抗原、CD31、CD34 の

発現も抗体選定、条件設定ののちに検討する。内皮関連分子としてビメンチンの発現も検討する。蛋白レベルでは免疫組織化学を用いて、mRNA レベルでは *in situ* hybridization を用いて解析する。

#### C) 心筋梗塞モデル動物でのトロンボモジュリンの挙動の解析を行う

人体材料・剖検材料では、検体の置かれる条件の不均一性や死後変化により、厳密な解析が難しく、心血管系の関与する突然死症例の死因解析に資するためには、最終的には動物モデルを作製し解析することが必須である。心筋梗塞モデル動物を作製し、内皮関連分子の発現状況を詳細に検討した。免疫組織化学の予備検討で、虚血性心疾患におけるヒト内皮細胞のトロンボモジュリン発現が抗原の染み出し *diffusion* で変化する結果を得ているが、実験動物でも同じ現象が見られるか検討する。

### 4 . 研究成果

A) 虚血性心疾患法医解剖例について心筋における内皮関連分子(トロンボモジュリン、CD31、CD34)の蛋白発現を免疫組織化学にて評価した。虚血性心疾患後の心筋リモデリングにおいて、トロンボモジュリンの発現は上がり、リモデリングが完成すると消失した。CD31 はトロンボモジュリンと似た動きを示すが、リモデリングが完成した部分でも発現が保たれていた。CD34 はリモデリングの過程において一定の発現を保ち続けていた。また、トロンボモジュリンの染色では微小な心筋出血や HE 染色で見づらい心筋壊死が強調された。以上の結果を「虚血性心疾患剖検例心筋組織における内皮関連分子の免疫組織化学的検討」として、令和元年の日本法医学会学術全国集会で発表した。学会発表後に動物実験を進めた。ヒトサンプルで見られた抗原の *diffusion* はマウス心筋梗塞モデルでも確認され、虚血性心疾患後の線維化巣において、トロンボモジュリン発現上昇が見られ、リモデリングが完成すると発現が低下する、という現象は動物実験でも確認された。また、トロンボモジュリンの血清濃度を測定した結果、虚血性心疾患と非虚血性心疾患の間で有意な差を認めていない。

B) 間葉系組織の細胞骨格として広く分布している中間径フィラメントビメンチンの心筋における蛋白発現を免疫組織化学にて評価した。虚血性心疾患と診断された法医解剖 30 例の中性ホルマリン固定パラフィン包埋心筋組織を用いてビメンチンの発現を免疫組織化学にて検討した。心筋はビメンチン陰性であるが、それ以外の非上皮系細胞は陽性像を示した。虚血性心疾患後の線維化巣において、幼弱な線維芽細胞にビメンチンの発現が見られ、リモデリングが完成すると発現が低下した。壊死心筋に対する好中球浸潤・マクロファージ浸潤を検出した。また、ビメンチンは血球細胞や内皮細胞に陽性になるため心筋出血や心筋鬱血も強調されて染色された。ビメンチン免疫染色では線維芽細胞、血管平滑筋、血管内皮、神経線維、血球等心筋細胞以外の細胞を全て染め出し心筋の組織改築を明瞭化した。従来の HE 染色を用いる手法に加え、虚血性心疾患に伴う心筋細胞以外の細胞の動きを免疫染色で明瞭に染め出すという点で剖検における虚血性心疾患の補助診断に有用である可能性が示唆された。以上の結果を「虚血性心疾患剖検例心筋組織におけるビメンチン発現の免疫組織化学的検討」として、令和 2 年開催の日本法医学会学術全国集会で発表した。また、マウスの冠状動脈前下行枝を完全閉塞させる心筋梗塞モデルを作製し、梗塞 1 週間後の心筋組織においてビメンチンの発現を検討し、虚血性心

疾患後の幼若な線維芽細胞の出現する線維化巣においてビメンチン発現上昇が見られることを確認した。

C)第VIII因子関連抗原は内皮細胞、巨核球、血小板に発現する糖蛋白であり、内皮細胞のマーカ―として知られる。虚血性心疾患法医解剖例について心筋における第VIII因子関連抗原の発現を免疫組織化学にて評価した。虚血性心疾患と診断された法医解剖20例の中性ホルマリン固定パラフィン包埋心筋組織を用いて第VIII因子関連抗原の発現を免疫組織化学にて検討した。マウスの冠状動脈前下行枝を完全閉塞させる心筋梗塞モデルを作製し、梗塞1週間後の心筋組織において第VIII因子関連抗原発現を検討した。虚血性心疾患後の幼弱な線維化巣においては血管密度の上昇を反映して、第VIII因子関連抗原発現が上昇した。リモデリングが完成すると線維化巣での血管密度の減少を反映して発現が低下した。壊死心筋においては瀰漫性の陽性像を示し、出血部位・血漿漏出部位に陽性像を示すためHE染色で観察するより壊死部が目立ってみえた。フィブリン析出部位にも陽性を示した。マウスの心筋梗塞モデルにおいては、心筋が壊死し線維芽細胞が出現し修復過程が起こっている部分に一致して陽性像が観察された。第VIII因子関連抗原は内皮マーカ―であり、心筋の組織改築に伴う内皮細胞の動きを検出する。血漿成分も陽性となるため、非壊死心筋にも非特異的に陽性像を示す場合があるという欠点を有するが、従来のHE染色を用いる手法に加え、虚血性心疾患に伴う内皮細胞の動態を明瞭に染め出し、血漿成分の漏出を検出するという点で剖検における虚血性心疾患の補助診断に有用である可能性が示唆された。以上の結果を「虚血性心疾患剖検例心筋組織における第VIII因子関連抗原発現の免疫組織化学的検討」として、令和3年開催の日本法医学会学術全国集会で発表した。

以上の成果を日本法医学会の英文誌 Legal Medicine に論文発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kondo Takeshi, Takahashi Motonori, Yamasaki Gentaro, Sugimoto Marie, Kuse Azumi, Morichika Mai, Nakagawa Kanako, Sakurada Makoto, Asano Migiwa, Ueno Yasuhiro	4. 巻 51
2. 論文標題 Immunohistochemical analysis of thrombomodulin expression in myocardial tissue from autopsy cases of ischemic heart disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 101897 ~ 101897
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.legalmed.2021.101897	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kondo Takeshi, Takahashi Motonori, Yamasaki Gentaro, Sugimoto Marie, Kuse Azumi, Morichika Mai, Nakagawa Kanako, Sakurada Makoto, Asano Migiwa, Ueno Yasuhiro	4. 巻 54
2. 論文標題 Immunohistochemical analysis of vimentin expression in myocardial tissue from autopsy cases of ischemic heart disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 102003 ~ 102003
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.legalmed.2021.102003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kondo Takeshi, Takahashi Motonori, Yamasaki Gentaro, Sugimoto Marie, Kuse Azumi, Morichika Mai, Nakagawa Kanako, Sakurada Makoto, Asano Migiwa, Ueno Yasuhiro	4. 巻 54
2. 論文標題 Immunohistochemical analysis of von Willebrand factor expression in myocardial tissues from autopsies of patients with ischemic heart disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 101997 ~ 101997
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.legalmed.2021.101997	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 近藤 武史, 高橋 玄倫, 山崎 元太郎, 杉本 茉里恵, 久世 亜澄, 森近 舞, 中川 加奈子, 櫻田 誠, 浅野 水辺, 上野 易弘
2. 発表標題 虚血性心疾患剖検例心筋組織におけるビメンチン発現の免疫組織化学的検討
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 近藤武史、高橋玄倫、山崎元太郎、杉本茉里恵、久世亜澄、森近 舞、中川加奈子、櫻田 誠、浅野水辺、上野易弘
2. 発表標題 虚血性心疾患剖検例心筋組織における内皮関連分子発現の免疫組織化学的検討
3. 学会等名 第103次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤武史、高橋玄倫、山崎元太郎、杉本茉里恵、久世亜澄、森近 舞、中川加奈子、櫻田 誠、浅野水辺、上野易弘
2. 発表標題 虚血性心疾患剖検例心筋組織における第 VIII 因子関連抗原 発現の免疫組織化学的検討
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

〔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	上野 易弘  (Ueno Yasuhiro)  (30184956)	神戸大学・医学研究科・教授   (14501)	
研究分担者	高橋 玄倫  (Takahashi Motonori)  (90509100)	神戸大学・医学研究科・講師   (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
---------	---------