

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 10 月 3 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20590679

研究課題名（和文）DNase I を用いた新しい急性心筋梗塞診断方法の確立

研究課題名（英文）A novel method of diagnosis for acute myocardial infarction.

研究代表者

高塚 尚和（TAKATSUKA HISAKAZU）

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：40242490

研究成果の概要（和文）：

DNase I を急性心筋梗塞の診断マーカーとして利用するための基礎的研究を行い、以下の成果を得た。(1) DNase I のエクソン 8 に存在している A2317G の SNP はアジア人では同じ傾向を示し、また 1 型と 2 型とでは耐熱性、耐酸性及び至適 pH に差が認められた。(2) マイクロチップ電気泳動装置を用いると DNA 分解の程度（DNase I 活性）が 10 分前後で得られた。(3) 死後の心筋組織を用いて RT-PCR を行ったが、サイトカインは検出できなかった。(4) 死後の血液を用いて NT-proBNP の測定を試みたが結果は得られなかった。(5) DNase I のエクソン 8 に存在している A2317G の SNP において、1-2 型は急性心筋梗塞の危険因子であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was confirm a molecular basis for utilization of DNase I as a diagnostic marker death due to acute myocardial infarction; (1) SNP of DNase I exon8, A2317G is the same tendency of Asians, and this SNP affect to heat sensitivity and optimum pH. (2) Detect of DNase I activity within 10 minutes using microchip electrophoresis. (3) Unable to detect cytokines mRNA of postmortem cardiac tissue. (4) Unable to detect NT-pro-BNP using postmortem blood for novel diagnostic method. (5) SNP of DNase I, type of 1-2 is the risk factor for myocardial infarction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：心筋梗塞, DNase I, 司法解剖, 法医学

1. 研究開始当初の背景

司法及び行政解剖では急性心筋梗塞が疑われる事例が少なくないが、司法及び行政解剖されるご遺体では、死亡前の健康状態が不明のことが多く、また死後時間が経過しているため白血球、クレアチニンキナーゼ、トロポニンT等、通常急性心筋梗塞の診断に用いられている各種検査値は、生前の病態を必ずしも反映していないため、診断に有用とはいえない。本研究の連携研究者らは、急性心筋梗塞発症時に血清 DNase I 活性値が一過性に上昇することを見出し、血清 DNase I が新たな急性心筋梗塞の診断マーカーとなり得る可能性が考えられている。本研究では、死後時間が経過したご遺体での、急性心筋梗塞の新たな診断マーカーとして DNase I が有用であるかどうか、またなぜ消化酵素に過ぎないと考えられている DNase I が急性心筋梗塞の際、血清値が上昇するのか、そのメカニズムが解明されていないことから、DNase I の生物学的特性を明らかにすることを目的として本研究を立案した。

2. 研究の目的

前項で記載したように、本研究では、DNase I について、生物学的特性及び急性心筋梗塞への診断への応用を目指して、以下の各事項を研究目的として検討した。

(1) DNase I のエクソン 8 に存在している A2317G (Gln222Arg) の SNP の頻度を各人種で検討し、その変異体を作製して、温度への耐性及び pH への耐性について検討した。

(2) DNase I の酵素活性を簡便、かつ迅速に測定する方法としてマイクロチップ電気泳動法が有効であるかどうかを検討した。

(3) DNase I が死後経過した状態でも、RT-PCR 法により mRNA が検出できるかどうか、さら

に検出できるとしたら急性心筋梗塞の診断に応用可能かどうかを検討した。

(4) N 末端プロ B 型ナトリウム利尿ペプチド (NT-ProBNP) の血中濃度が急性冠症候群発症早期から上昇することから、この NT-proBNP が死後時間経過したご遺体での急性心筋梗塞の診断に応用可能であるかどうかを検討した。

(5) DNase I のエクソン 8 に存在している A2317G (Gln222Arg) の SNP の型が急性心筋梗塞及び安定型狭心症と関連しているかどうかを検討した。

3. 研究の方法

前項で記載した順にそれぞれの研究の方法について記載する。

(1) DNase I のエクソン 8 に存在している A2317G の SNP の頻度を、中国人 (上海 97 人, 広州 96 人), ウイグル人 (56 人), タミル人 (53 人), チベット人 (96 人) について mismatch PCR-RFLP 法を用いて検討した。さらに, pcDNA3.1 vector を使用して変異型を作製し, その後 cos7 細胞にトランスフェクションして, 50°C で 70 分インキュベーションし, DNase I の活性を SRED 法 (single radial enzyme diffusion 法) で測定し, DNase I 各型における熱安定性の検討, pH を 3.0 から 6.0 まで変化させて 37°C で 10 分インキュベーションし耐酸性の検討, 及び酵素活性至適 pH 値の検討をそれぞれ実施した。

(2) スタンダードマーカー (100 及び 800 bp) 4 ng を DNase I, 5.0 及び 5.7 U, 37°C, 10~80 分間インキュベーションした後, マイクロチップ電気泳動装置にアプライして電気泳動し, DNA 分解の信号強度を測定した。

(3) マウスから摘出した心臓を 0, 1, 3, 5, 7 日間, それぞれ室温に放置して, その後,

RNA 抽出及び RT-PCR を種々の TNF- α , IL-1 β , IL-6, M-CSF 等において実施した。

(4) 司法解剖時に採取した血液（心臓血，死後 1～7 日）20 本を用いて，NT-proBNP のほか，ミオグロビン及びトロポニン T について測定した。

(5) 心筋梗塞患者（MI）311 人，安定型狭心症患者（AP）300 人及び健常人 1212 人での A2317G（Gln222Arg）で認められる SNP の各型を mismatch PCR-RFLP 法を用いて検討した。

4. 研究成果

前項で記載した順にそれぞれの研究成果について記載する。

(1) DNase I のエクソン 8 に存在している A2317G の SNP の型は，A/A 型を 1 型，G/G 型を 2 型とすると，1 型の頻度は，中国人（上海）では 0.29，中国人（広州）では 0.29，ウイグル人では 0.27，タミル人では 0.25，チベット人では 0.30 であり，1-2 型の頻度は，順に 0.56，0.50，0.50，0.55，0.51，2 型の頻度は，順に 0.15，0.21，0.23，0.21，0.19 であった。また，熱安定性及び耐酸性は，いずれも 1 型と比較して 2 型で高く認められた（図 1-1 及び図 1-2）。また，酵素活性の至適

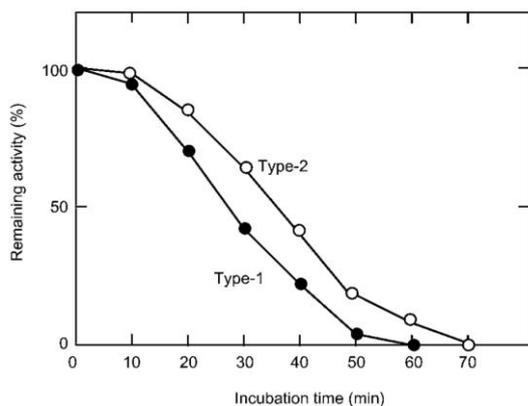


図 1-1

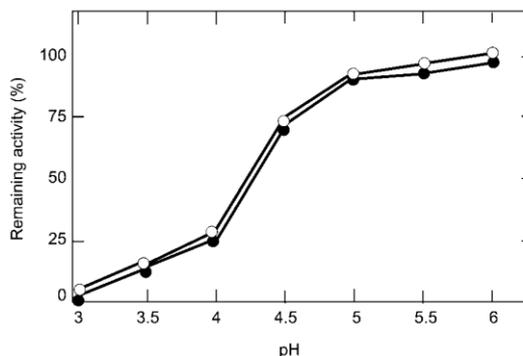


図 1-2

pH 値は，1 型では 6.752 型では 6.5 であった（図 1-3）。SNP の頻度分布に関して，これま

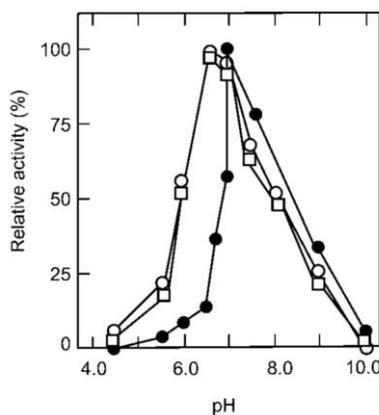


図 1-3

でに報告されている結果も参考にすると，中国人（上海，広州），ウイグル人，タミル人及びチベット人の他，アジア人では同じような傾向を示していたが，ガーナ人では 0.90，アフリカオバンボス人では 0.87 等とアフリカ人では高い傾向にあり，また，ドイツ人（ミュンスター，ミュンヘン）では，1-2 型が 0.78 及び 0.66 と高い傾向にあった（図 1-4）。

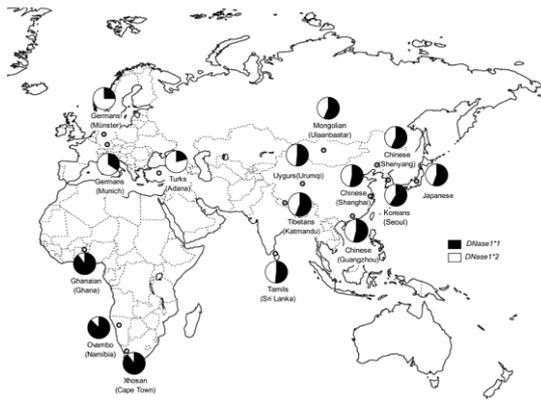


図 1-4

以上の結果から、人種により A2317G の多型頻度には差があり、またこの型の違いにより熱感受性、耐酸性及び至適 pH にも差がみられた。今回報告した結果から、この SNP の違いが各種疾患に影響を与える可能性が考えられることから、疾患との関連性をさらに検討する必要があると考える。また、私たちが今回示した、中国人（上海、広州）、ウイグル人、タミル人、チベット人での A2317G の頻度分布は、これまでに報告されておらず、人類遺伝学的にも貴重なデータであると考えられる。

(2) 前項において記載した方法で検討したところ、DNA はインキュベーション時間依存

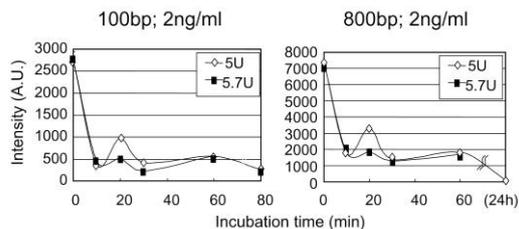


図 2-1

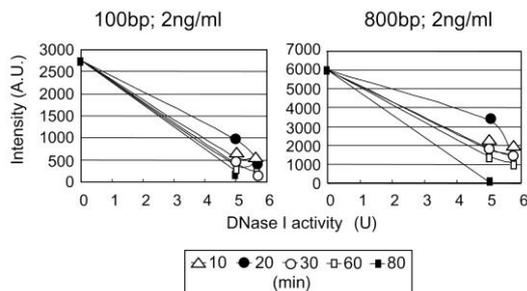


図 2-2

性に (図 2-1), 並びに DNase I の酵素量依存性に (図 2-2) に、それぞれ DNA の分解が確認され、マイクロチップ電気泳動により DNase I 活性を評価できる可能性が示唆された。従来、DNase I の活性を測定するには、SRED 法では 20 時間、ELISA 法では 3 時間要していたが、この方法では 10 分前後で結果を得られることから、極めて画期的な測定方法であり、今後、急性心筋梗塞等の臨床応用への可能性が考えられる。

(3) 前項において記載した方法で検討したところ、死後 1 日で、すでに TNF- α 等のサイトカインを検出することができなかった。死後の組織（心臓）を用いて RT-PCR 法により病態を検討することは、適していないことが明らかとなった。

(4) 前項において記載した方法で検討したところ、死後 1 日以上経過した血液では、NT-proBNP、ミオグロビン及びトロポニン T の各値をいずれも測定できなかった。しかし、測定に用いたコバス h 232 (ロッシュ) に利用した検査試薬の反応を肉眼で確認すると、NT-proBNP では陽性像が肉眼で確認できたことから、測定がすべてエラーとなったのは、機械の設定条件の可能性が高く、リーダーに改良を施すことにより、1 ないし 2 日程度経過した古い検体（血液）でも十分、測定が可能となる可能性が示唆された。機器の改良に成功すればやや古い事例での急性心筋梗塞の診断に対して極めて有効な方法となり得る可能性が考えられる。

(5) 前項において記載した方法で検討したところ、1 型の頻度は、MI では 0.457、AP では 0.572、健常人では 0.561 であり、1-2 型の頻度は、MI では 0.543、AP では 0.428、健常人では 0.439 であり、1-2 型では、MI と健常人間では有意差 ($p < 0.001$) が認められ、1-2 型が急性心筋梗塞の危険因子であること

が明らかになった。この結果は世界で初めての報告であり、急性心筋梗塞の予防するうえで極めて有効であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

①Fujihara J, Ueki M, Yasuda T, Iida R, Soejima M, Koda Y, Kimura-Kataoka K, Kato H, Panduro A, Tongu M, Takeshita H.

Functional and genetic survey of all known the SNPs within human deoxyribonuclease I gene in wide-ranging ethnic groups. DNA and Cell Biol. 2011; 30(4):205-217, 査読有

DOI: 10.1089/dna.2010.1120

②Fujihara J, Tabuchi M, Yasuda T, Fujita Y, Takeshita H. Rapid measurement of deoxyribonuclease I activity with the use of microchip electrophoresis based on DNA degradation. Anal Biochem. 2011 ; 413(1):78-79, 査読有

DOI: 10.1016/j.ab.2011.02.011

③Yasuda T, Ueki M, Takeshita H, Fujihara J, Kimura-Kataoka K, Iida R, Tsubota E, Soejima M, Koda Y, Kato H, Panduro A. A biochemical and genetic study on all non-synonymous single nucleotide polymorphisms of the gene encoding human deoxyribonuclease I potentially relevant to autoimmunity. Int J Biochem Cell Biol. 2010; 42(7):1216-1225, 査読有

DOI: 10.1016/j.biocel.2010.04.012

④Fujihara J, Yasuda T, Iida R, Kimura-Kataoka K, Soejima M, Koda Y, Kato H, Panduro A, Yuasa I, Takeshita H. Global analysis of single nucleotide polymorphisms in the exons of human

deoxyribonuclease I-like 1 and 2 genes. Electrophoresis. 2010 ;31(21):3552-3557, 査読有

DOI: 10.1002/elps.201000319

⑤Takeshita H, Soejima M, Koda Y, Yasuda T, Takatsuka H, Fujihara J. Gln222Arg (A2317G) polymorphism in the deoxyribonuclease I gene exhibits ethnic and functional differences. Clin Chem Lab Med 2009;47(1):51-55, 査読有

DOI: 10.1515/CCLM.2009.002

⑥Yasuda T, Iida R, Kawai Y, Nakajima T, Kominato Y, Fujihara J, Takeshita H. Serum deoxyribonuclease I can be used as a useful marker for diagnosis of death due to ischemic heart disease. Legal Med 2009; 11, S213-S215, 査読有

DOI: 10.1016/j.legalmed.2009.01.092

⑦Takeshita H, Fujihara J, Soejima M, Koda Y, Yasuda T, Nakajima T. Extremely high prevalence of DNASE1*1 allele in African populations. Cell Biochem Funct 2008; 26:151-153, 査読有

DOI: 10.1002/cbf.1414

[学会発表] (計 11 件)

①藤原純子, 哺乳類DNase IにおけるN-グリコシド型糖鎖解, 第94次日本法医学会総会, 2010年6月24日, 東京。

②木村かおり, DNase I及びDNase II遺伝子exon内SNP検索: 集団調査及び酵素活性に及ぼす変異の影響. 第94次日本法医学会総会, 2010年6月24日, 東京。

③中島たみ子, サンドイッチELISA法による血清DNase I蛋白量の測定, 第94次日本法医学会総会, 2010年6月24日, 東京。

④藤原純子, DNase I exon内非同義置換SNP検索: 酵素性状に及ぼす置換の影響, 第26回

日本法医学会中四国地方会, 2009年10月17日, 山口。

⑤木村かおり, DNase II遺伝子exon内SNP検索: 酵素活性に及ぼす変異の影響, 第26回日本法医学会中四国地方会, 2009年10月17日, 山口。

⑥竹下治男, DNA修復酵素 (hOGGおよびXRCC1) 多型における酸化ストレスとの相関, 第93次日本法医学会総会, 2009年5月15日, 大阪。

⑦藤原純子, DNASE 1 exon内SNP検索: アジア人においてDNase I Gln222Argのみが多型性を有する, 第93次日本法医学会総会, 2009年5月14日, 大阪。

[図書] (計1件)

①藤原純子, 竹下治男, 高塚尚和, 安田年博, 植木美鈴, 飯田礼子, 河合康幸, 中島たみ子, 小湊慶彦, 副島美貴子, 神田芳郎, 東洋書店, DNA 多型 vol. 16, 2009年, 210-212 項

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

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)

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]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高塚 尚和 (TAKATSUKA HISAKAZU)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号: 40242490

(2) 研究分担者

竹下 治男 (TAKESHITA HARUO)
島根大学・医学部・教授
研究者番号: 90292599
(H21→H23: 連携研究者)
藤原 純子 (FUJIHARA JUNKO)
島根大学・医学部・助教
研究者番号: 20346381
(H21→H23: 連携研究者)

(3) 連携研究者

安田 年博 (YASUDA TOSHIHIRO)
福井大学・医学部・教授
研究者番号: 80175645