

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 8 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591067

研究課題名(和文)心疾患におけるデオキシリボ核酸分解酵素 I のアポトーシス誘導効果に関する研究

研究課題名(英文)A study of the effect that deoxyribonuclease I induces apoptosis in cardiac diseases

研究代表者

河合 康幸 (KAWAI, Yasuyuki)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40324157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円、(間接経費) 1,230,000 円

研究成果の概要(和文)：心疾患においてデオキシリボ核酸分解酵素 I によるアポトーシス誘導効果は確認できなかった。その後、冠れん縮性狭心症患者において、冠れん縮誘発試験後に酸化ストレスマーカーの一つであるニトロチロシンが血液中で増加するかどうか検討したところ、ニトロチロシンは、冠れん縮誘発後3時間、12時間で有意に増加することを見出し、ニトロチロシンは、冠れん縮後の一過性心筋虚血のバイオマーカーとなり得ることが明らかになった。さらにニトロチロシンを発生させるペルオキシニトライトが、冠攣縮を引き起こす一因であり、冠攣縮後もニトロチロシン濃度の増加が持続することから、冠攣縮性狭心症の増悪に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We could not find out that deoxyribonuclease I induce apoptosis in cardiac diseases. Then, we evaluated whether nitrotyrosin (NT), a marker of oxidative stress, would elevate after vasospasm induced by acetylcholine provocation test in patients with vasospastic angina pectoris (VSAP). The serum NT levels significantly increased after coronary vasospasm induced by the test, suggesting that serum NT could be a biomarker of transient myocardial ischemia and could contribute to the development of VSAP.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科臨床医学・循環器内科学

キーワード：酸化ストレス 冠れん縮 一過性心筋虚血 ニトロチロシン

1. 研究開始当初の背景

(研究1)

デオキシリボ核酸分解酵素 I (DNase I) は、アポトーシスに直接関与する酵素として注目されている。一方、心筋梗塞後の左室リモデリングや心不全の進展は、アポトーシスが関与していると報告されている。これらのことから申請者らは、DNase I が心筋細胞においてもアポトーシスを誘導し、心筋梗塞後の左室リモデリングに関与している可能性を想定した。

(研究2)

新たな研究のテーマとして、申請者はこれまで、冠れん縮性狭心症 (VSAP) 患者において冠れん縮誘発試験後に一過性に血清 DNase I 活性が上昇することを報告している (Morikawa N, Kawai Y et al. Eur Heart J. 2007;28:2992-2997)。この VSAP は、冠動脈のれん縮すなわち冠れん縮によって一時的に冠血流が途絶状態に陥り、一過性心筋虚血を生じる症候群で、しばしば心筋梗塞や突然死の原因となる。この冠れん縮の原因は様々であるが、酸化ストレスの過剰産生による血管内皮機能障害がその一つであると考えられている。しかしながら、血液中の酸化ストレスのバイオマーカー濃度が、冠れん縮後、どのように推移するかこれまで明らかにされていない。

申請者らは、冠れん縮によって生じる一過性心筋虚血を鋭敏に検出できる酸化ストレスマーカーとして 4 ヒドロキシノネアル (HNE) とニトロチロシン (NT) に注目した。HNE は、心筋虚血によって産生される過酸化脂質である。一方 NT は、一酸化窒素 (NO) と虚血/再還流によって発生した活性酸素によって産生されたペルオキシニトライトにより蛋白質のチロシン残基が修飾され産生された物質である。さらに NT は、血管内皮機能障害を引き起こすため、血管内皮機能障害のバイオマーカーと考えられている。

2. 研究の目的

(研究1)

本研究の目的は、DNase I が培養心筋細胞にアポトーシスを誘導するかを確認し、心筋梗塞患者において上行大動脈基部 (AO)、冠静脈洞 (CS) での DNase I 活性の差 (DNase I) と左室リモデリングとの相関、および心筋症患者の心筋生検標本で免疫組織学的にアポトーシスを検出し、その程度と DNase I との相関を検討することである。

(研究2)

本研究の目的は、アセチルコリン負荷試験によって誘発された、冠れん縮後の血清 HNE と NT 濃度の変化を経時的に検討することである。

3. 研究の方法

(研究1)

(1) 新生児ラット培養心筋細胞を用いて

アポトーシス誘導効果を培養心筋細胞に様々な濃度のウシ臍臓由来 DNase I を加え、24 時間培養し、DNA ラダーによるアポトーシス誘導効果を検討した。

(2) 心筋梗塞患者の急性期と慢性期において AO と CS で同時採血を行い、DNase I と左室リモデリングを検討した。

(3) 57 例の心不全患者で AO および CS 採血を行い、それぞれの血清 DNase I 活性を測定した。血清 DNase I 活性について (CS-AO) /CS × 100% の計算式で変化率を算出した。また心不全患者から採取した心筋生検標本を用いて、DNA 末端 in situ endlabelling 法によりアポトーシスを検出した。さらにそのアポトーシスの程度と DNase I との相関を検討した。

(研究2)

安静時胸痛を主訴とし、VSAP が疑われた患者に対して、少なくとも検査 24 時間前に血管拡張剤を中止し、冠動脈造影検査を施行した。冠動脈造影で冠動脈に器質的有意狭窄を認めなかった 30 人を研究対象とした。冠動脈内にアセチルコリンを注入し、冠れん縮誘発の有無を冠動脈造影で評価した。誘発試験後、ニトログリセリンで寛解する一過性の冠動脈閉塞もしくは 90% を越える冠動脈狭窄を認めた患者を冠れん縮陽性と定義した。誘発試験の結果、これらの患者は、冠れん縮陽性群 (N=14)、冠れん縮陰性群 (N=16) に分けられた。誘発試験前、誘発試験 15 分後、3 時間後、12 時間後に採血を行い、血清に分離後これらの血清サンプルを -80 °C の冷凍庫で保管した。各サンプルの血清 HNE と NT 濃度を従来の方法に比べて 100 倍感度が高い、時間分解蛍光イムノアッセイによって測定した。

なお本研究は、金沢医科大学倫理委員会で承認され、患者の同意を得て行われた。

4. 研究成果

(研究1)

(1) 培養心筋細胞において DNase I の明らかなアポトーシス誘導効果は、確認できなかった。

(2) (1) の結果より心筋梗塞患者における臨床研究を断念した。

(3) 心不全患者で AO および CS 採血の結果、変化率が負の値かつ有意に変化 (文献 1 より変化率の絶対値が 12.4% 以上) している、すなわち DNase I が心筋に取り込まれていると考えられる群 (CS-AO - 群: N=15)、CS-AO が正の値かつ有意に変化している、すなわち DNase I が心筋から分泌されていると考えられる群 (CS-AO + 群: N=19) に分けられた。この 2 群で心不全患者の臨床像と比較すると、BNP、左室駆出率は、CS-AO - 群がそれぞれ 303 ± 270 pg/ml、47.7 ± 14.8%、CS-AO + 群が 377 ± 845 pg/ml、47.5 ± 11.0% と両群に差を認めなかった。さらに両群と組織学的なアポトーシスの程度も両群で有意差を認めなかった。以上より、心疾患における明らかな DNase I

によるアポトーシス誘導効果は確認できず、新たな研究2に着手した。

DNase I はアクチンによってその活性が阻害される。このアクチンは近年ゲルソリンによって調節され、DNase I を介する心筋アポトーシスに関与していると報告(Circ Res. 2009;104:896-904)されており、DNase I の心筋におけるアポトーシス誘導効果を確認するためには、DNase I のみならずアクチンやゲルソリンについても合わせて今後検討していく必要があると考えられた。

文献1 Arakawa K, Kawai Y et al. Eur Heart J. 2005;26:2375-2380.

(研究2)

患者背景では、年齢、性別、冠危険因子(高血圧、高脂血症、糖尿病、喫煙)において両群で有意差を認めなかった。ただし、入院前の硝酸薬もしくはカルシウム拮抗薬を内服していた患者数が、冠れん縮陽性群において有意に多かった(P=0.007)(表1)。

	冠れん縮陰性群(陰性)	冠れん縮陽性群(陽性)	P value
患者数(人)	14	16	
年齢(平均±SD)	66±8.2	63±11	0.62
男性(%)	5(36)	9(56)	0.34
冠危険因子(%)			
高血圧	7(50)	7(44)	0.73
脂質異常症	7(50)	6(38)	0.49
糖尿病	1(7)	1(6)	0.92
喫煙	4(29)	2(13)	0.27
胸痛(%)	9(64)	6(38)	
ACh負荷試験(%)			
100%	2(14)		
99%	12(86)		
冠動脈狭窄(%)			
左冠動脈前下行枝	9(64)		
左冠動脈回旋枝	1(7)		
右冠動脈	7(50)		
内服薬(%)			
硝酸薬	7(50)	3(19)	0.07
Ca拮抗薬	9(64)	5(31)	0.07
硝酸薬とCa拮抗薬	12(86)	6(38)	0.007
スタチン	3(21)	2(13)	0.51
アズピリン	5(36)	4(25)	0.64
ACE/ARB	1(7)	5(31)	0.08

ACh: アセチルコリン, Ca: カルシウム, ACE: アンジオテンシン変換酵素阻害薬
ARB: アンジオテンシンII受容体拮抗薬

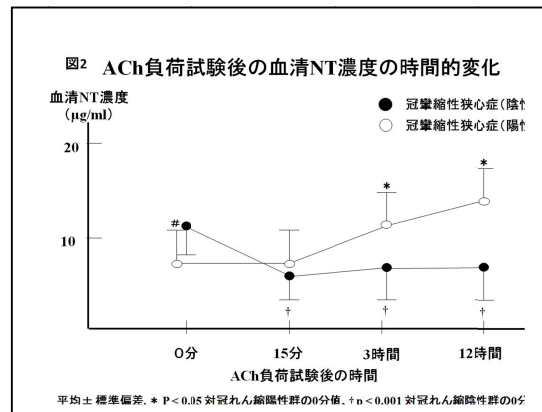
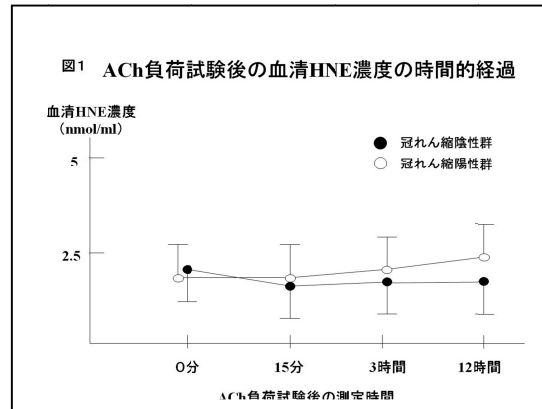
誘発試験後における血圧、心拍数、ダブルダブルプロダクト(収縮期血圧×心拍数)といった血行動態は、両群で有意差を認めなかった(表2)。

	ACh負荷前	ACh負荷後	
冠れん縮陽性群			
心拍数(回/分)	68 ± 16	70 ± 15	
平均血圧(mm Hg)	88 ± 11	90 ± 13	
ダブルプロダクト	8740 ± 2510	8800 ± 2980	
冠れん縮陰性群			NS
心拍数(回/分)	64 ± 7	66 ± 16	
平均血圧(mm Hg)	84 ± 10	90 ± 17	
ダブルプロダクト	7528 ± 1212	8048 ± 1785	

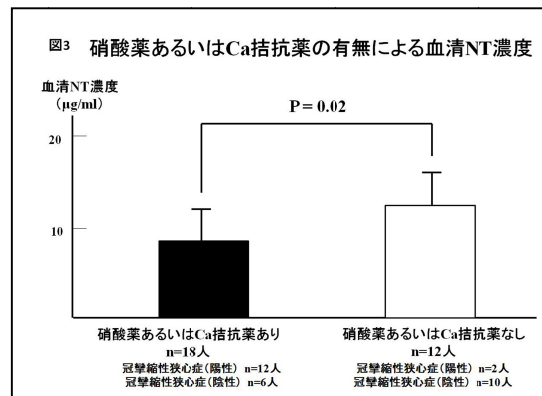
平均±SD、ACh: アセチルコリン、NS: 有意差なし

誘発試験前の血清HNE濃度は両群とも有意差を認めなかった(図1)血清NT濃度は、有意に冠れん縮陰性群で高値であった(P=0.008)(図2)。血清HNE濃度は、誘発試験後に両群とも有意な変化を示さなかった(図1)。一方、血清NT濃度は、冠れん縮陽性群において誘発試験前(8.1±3.2 μg/ml)より3時間後(11.3±3.3 μg/ml)、12時間後(12.1±5.7 μg/ml)で有意に増加した(対3時間後、P=0.015、対12時間後、P=0.03)。

(図2)冠れん縮陰性群において血清NT濃度は、逆に誘発試験前に比べ、誘発試験後から有意に減少した(図2)。



当初は、冠れん縮陽性群の方が冠れん縮陰性群に比べ、血清NT濃度は高値であると想定していたが、逆の結果となりその理由を明らかにするため、誘発試験前の血清NT濃度に及ぼす入院前の薬剤の影響を検討したところ、硝酸薬もしくはカルシウム拮抗薬を内服していた患者の誘発試験前の血清NT濃度(8.7±3.1 μg/ml)は、いずれも内服していない患者の血清NT濃度(11.8±3.8 μg/ml)に比べて有意に低値であった(P=0.02)(図3)。



これらの結果からNTは、一過性心筋虚血のバイオマーカーとなり得ると考えられた。また血清NT濃度は、活性酸素を減少させる効果がある硝酸薬もしくはカルシウム拮抗薬によって減少することが明らかになった。NTを発生させるペルオキシニトライトが、冠れん縮を引き起こす一因であり、冠れん縮

も血清 NT 濃度の増加が持続することから、VSAP の増悪に關与する可能性が示唆された。臨床的には、血清 NT 濃度測定が VSAP 診断の一助になり、難治性 VSAP の鑑別にも役立つことが期待される。

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1件)

Tanabe K, Kawai Y, Kitayama M, Akao H, Ishida R, Motoyama A, Wakasa M, Saito R, Aoki H, Fujibayashi K, Watanabe M, Tsuchiya T, Kimura H, Yoshida K, Kajinami K. Increased levels of the oxidative stress marker, nitrotyrosine in patients with provocation test-induced coronary vasospasm. *Journal of Cardiology*, 査読有り, 2014, in press.

[学会発表](計1件)

Tanabe K, Kawai Y, Kitayama M, Akao H, Ishida R, Motoyama A, Watanabe M, Kojima K, Kajinami K. Increased levels of the oxidative stress marker, nitrotyrosine in patients with provocation test-induced coronary vasospasm. The 73rd annual scientific meeting of the Japanese Circulation Society, March 15, 2013, Yokohama

6. 研究組織

(1)研究代表者

河合 康幸 (KAWAI, Yasuyuki)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40324157

(2)研究分担者

なし

研究者番号：

(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