

平成 28 年 11 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460337

研究課題名(和文)抗TNNI3Kモノクローナル抗体を用いた虚血性心疾患の新型診断薬の開発

研究課題名(英文)Circulating TNNI3K levels are useful diagnosis biomarker for ischemic myocardial diseases

研究代表者

頼仲 方一(Yorinaka (Lai), Hoichi (Zhong-Fang))

熊本大学・生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：90244110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：

我々はマウス抗ヒトTNNI3Kモノクローナル抗体を用いた、虚血性心疾患の病態診断薬のELISA法と金コロイド-銀増幅法を開発した。その結果より、血中TNNI3Kレベルの測定は急性心筋虚血や心筋梗塞など急性心筋損傷の早期診断に有用と考えられた。特に、TNNI3K-金コロイド銀増幅型検査チップの作製を開発成功ことは、方法簡単、経時短い、感度高いの心筋虚血疾患の診断チップを使用可能になります。これらの結果より、血中TNNI3Kレベルは、急性心筋損傷の診断に効果的な診断マーカーであり、本診断試薬を用いた血中TNNI3Kレベル測定は急性心筋虚血や心筋梗塞など急性心筋損傷の早期診断に有用と考えられた。

研究成果の概要(英文)：

Circulating TNNI3K level was investigated using anti-TNNI3K monoclonal antibodies with ELISA and gold colloid-based TNNI3K methods to diagnose cardiac ischemia diseases including acute myocardial ischemia diseases(AMI).

Our data obtained from ELISA-method shown that circulating TNNI3K levels were significantly higher in AMI patients($p < 0.01$), and measurement of circulating TNNI3K concentrations is a useful diagnosing tool for AMI. Using gold colloid based-silver enhanced TNNI3K biochips, not only increased sensitivity but also enhanced specificity & shortened measurement-time significantly(15 min) compared with ELISA method($P < 0.01$). The gold colloid based-silver enhanced TNNI3K biochips may be a new and good bio-diagnose tool for early diagnose of some patients suddenly onset acute myocardial ischemia diseases. In conclusion, using gold colloid-based TNNI3K biochips can significantly shorten the diagnosis period, enhance the diagnosis rate for diagnosing ischemic cardiac diseases.

研究分野：薬理学、創薬ゲノム薬理学、循環器薬理学

キーワード：TNNI3K 金コロイド銀増幅型検査チップ 心筋虚血 ゲノム薬理学 心疾患 ELISA 創薬 血中濃度

1. 研究開始当初の背景

冠状動脈閉塞による心臓病は、狭心症から致命的急性心筋梗塞 (AMI) まで様々な病態を呈する。特に AMI は死亡率が約 30% と非常に高く、発症から 24 時間、3 日、一週間と経過する過程で早期診断と集約的治療を行うことができるかがその救命率を左右する。確定診断には心電図の変化と CPK, troponin (cTnI, T) 等の診断マーカーによって行なわれているが、まだ、早期診断には不十分で、確定され得ない症例や、偽陽性も多く (Apple FS 等, *Eur Heart J.* 1998)、より優れた高精度で高感度の心筋梗塞診断技術の確立が望まれている。

TNNI3K は心筋に特異的かつ持続的に発現し、cTnI と相互作用する新規 MAP キナーゼ、cardiac troponin I-interacting kinase である。近年我々は、多能性幹細胞である P19CL6 細胞に TNNI3K 遺伝子を導入し、TNNI3K 高発現が心筋細胞の自発拍動頻度や収縮力を増強させるが、この心筋収縮機能促進の機序には cTnI のリン酸化抑制によること、自発活動電位第 4 相の自動脱分極速度の促進によることを明らかにした；これらの成果に関する特許も取得している。

TNNI3K は、急性心筋梗塞 AMI 時には心筋から逸脱する酵素であるが、心筋の再生および生理機能の維持には必須の特異的分子である。このような心筋機能の重要分子をターゲットして心筋梗塞の診断をすることがより信頼性の高い確認診断を可能とすると考えられる。最近我々は TNNI3K のリコンビナント蛋白を抗原とする、抗 TNNI3K ポリクローナル抗体を作成し、健常者血清と AMI 患者血清および急性腎不全や慢性心不全歴のある人の血液標本を検体として、TNNI3K の血中レベルを測定した。その結果、AMI 患者の血中 TNNI3K 濃度は他の実験群 (健常志願者、急性腎不全、慢性心不全) より十倍以上高い結果を得た。一方、血中 TNNI3K 濃度と cTnI 濃度を比較すると、AMI の血中 cTnI の上昇は TNNI3K のより低く、血中 cTnI 濃度の上昇は、AMI 患者のみならず、急性腎不全 (ARF) 患者の血液サンプルにも見られ、TNNI3K と比べ特異性が低いと考えられた。

2. 研究の目的

TNNI3K は心筋特異的に発現する細胞質局在の MAP キナーゼである。本研究は、抗ヒト TNNI3K モノクローナル抗体を用い通常の ELISA 法及び金コロイド銀増幅法を駆使して、虚血性心疾患に対する特異性の高い診断薬開発を行い、心筋虚血疾患の予防と治療に資することを目的とする。研究計画：1) 抗ヒト TNNI3K モノクローナル抗体の精製、抗体価の確認及びその抗体を用いた迅速な ELISA 測定系、金コロイド銀増幅型診断チップの確立；2) 300 例の血液サンプルによる検証；3) 心疾患発症と血中 TNNI3K 濃度の経時的相関性の確認；4) 既存の診断薬との比較を行う、虚血性心疾患の新規、高特異的迅速な診断試薬を開発する。

その研究期間内に、我々は抗ヒト TNNI3K モノクローナル抗体を用いて、虚血性心疾患の新型で、特異性が高いより迅速な診断試薬を開発する。その為に：a. 抗 TNNI3K モノクローナル抗体を用いた ELISA 測定系の確立；b. 新型で特異性が高く迅速な金コロイド銀増幅型診断試薬系の作製および ELISA 測定系との比較；c. 300

例以上のヒト血液サンプルでの検証；d. 心疾患発症と血中 TNNI3K 濃度の経時的相関性の分析、e. 既存の cTnI マーカーとの比較を明らかにしようと考えられた。

3. 研究の方法

本研究は、我々開発した抗ヒト TNNI3K モノクローナル抗体を用いて、TNNI3K 診断薬の通常の ELISA 法及びナノ金コロイド銀増幅法を樹立し、虚血性心疾患に対する特異性の高い診断薬を開発する目的とする。研究計画：1) 抗ヒト TNNI3K モノクローナル抗体の精製、抗体価の確認及び迅速な ELISA 測定系、金コロイド銀増幅型診断チップの確立；2) 300 例の血液サンプルの検証；3) 既存の診断薬との比較；4) マウス急性心筋梗塞モデルを利用して、心疾患発症と血中 TNNI3K 濃度の経時的相関性の分析を行う。

その研究の目標として、申請者はこれまでの研究成果を進展させ、抗ヒト TNNI3K モノクローナル抗体を用いて、虚血性心疾患の新型、特異性が高い、快速な診断試薬を開発することを目標とする。具体的には、以下の 3 つ研究を展開する：a. 抗 TNNI3K **モノクローナル抗体**を用いた ELISA 測定系の確立、300 例以上血液サンプルの検証；b. 新型で特異性が高い、迅速な TNNI3K の金コロイド銀増幅型診断試薬システムの作製およびその効果の ELISA 測定系との比較；c. 心疾患発症と血中 TNNI3K 濃度の経時的相関性の分析、既存の cTnI マーカーとの比較を行う；d. 東アジア地域の多くの検体による心筋梗塞等の急性期心疾患患者における有用性の検討を行う。

1) 抗 TNNI3K モノクローナル抗体の作製：TNNI3K リコンビナント蛋白をマウスに免疫した後、得た脾臓細胞と NS-1 ミエロマ細胞とを融合し、抗体産生 TNNI3K -NS-1 ハイブリドマを選択、培養し、BALBc マウスに移植、腹水から得られる抗体を大量調製し、精製、抗体価確認、抗体価が測定によって最適のクローンを選別する。その後、抗体価が高いクローンを、トータルが 7 種類があったが、得られた抗ヒト TNNI3K モノクローナル抗体を用いて、ELISA 法による TNNI3K 診断キットを作成した。

2) ELISA 法の TNNI3K 診断キットを用いた心筋虚血患者の血中 TNNI3K 濃度を測定し、ELISA 法による TNNI3K 診断キットを用いた、急性心筋梗塞を含む心筋虚血患者 300 例の血中 TNNI3K 濃度を調べた。

3) TNNI3K-金コロイド銀増幅型検査チップの作製と調製を行なった。我々は TNNI3K -金コロイド銀増幅型検査チップを成功に作製し、TNNI3K 診断チップの感度を増幅して、将来的に、虚血性心疾患の快速の診断薬として開発可能であると考えられた。(Fig. 3)

4. 研究成果

1) TNNI3K リコンビナント蛋白を用いた、抗ヒト TNNI3K モノクローナル抗体の作製

実験は全長アミノ酸配列をコードする cDNA より作製したリコンビナント TNNI3K 蛋白に対する抗体を作成し、その IgG 分画を用いてリコンビナント TNNI3K に対する反応特異性を血清の存在および存在下で電気泳動後、イムノブロット法にて確認した。各種濃度のリコンビナント蛋白を用いて検量線を作製し、蛍光 ELISA 法の性能を

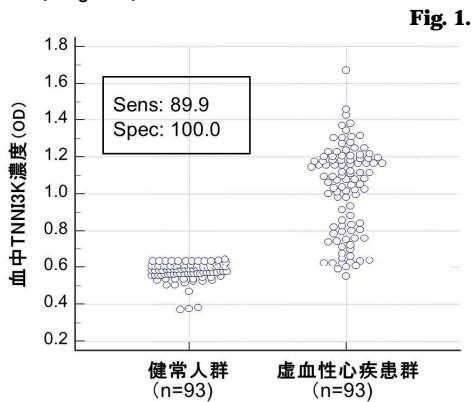
評価した。

2) 抗 TNNI3K モノクローナル抗体を用いた心筋虚血疾患患者及び正常健常者の血液サンプルを利用してその抗体の効果を検定した。

我々は共同研究者の中国幹南医学院附属病院心内科の王小萍教授の研究チームとの共同研究で、同病院で心筋虚血疾患に診断された患者さん(93名)の血液サンプル及び健康診断を採血後健常者(93名)の廃棄血液サンプルを利用して、抗 TNNI3K モノクローナル抗体の効果を検定した。その結果、心筋虚血実験群はその血中 TNNI3K 濃度が健常者実験群により、有意的に増加したことが示唆されました ($p < 0.01$, 図 1)

3). モウスの急性心筋梗塞モデルを用いた血中 TNNI3K 濃度の計時的な変動。

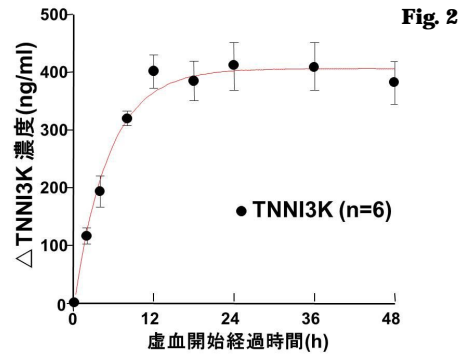
マウス急性心筋虚血の発症から血中 TNNI3K 濃度に上昇時間、ピーク及び持続時間のデータを取得する(手術後 2, 4, 6, 12, 24, 32, 48 時間で尾に採血して、ELISA 法で比較を行なった)。結果より、血中 TNNI3K 濃度は虚血開始 2 時間後から上昇し、12 時間後にはピークに達し、48 時間後にも同様な高いレベルを維持していることを示唆した。(Fig. 2)



4). TNNI3K 診断薬と他の診断剤の比較

新規性: TNNI3K は心筋に特異的に発現している新規 MAP キナーゼであり、逸脱酵素として現在用いられている各種の心筋細胞傷害マーカー分子では捉えられない心筋の再生および収縮力についての情報を与える新規病態マーカーとなることが期待される。

* : 表 1 : 異なる方法で血中 TNNI3K 濃度を測定する方法の比較 ;
* : 表 2 : TNNI3K キット (診断チップ) と他の診断キットの比較
(詳細的には頁 5 の表 2 に参考)



優位性: TNNI3K は細胞質及び細胞核内に局在し、心筋虚血や心筋梗塞で細胞死やアポトーシスなど心筋傷害により細胞外に逸脱する可能性がある。TNNI3K を用いた新しい心疾患診断薬については特異性及び感受性が高い。

5). 金コロイド銀増幅法の作成と血中 TNNI3K 濃度への反応効果と ELISA 法の速度との比較

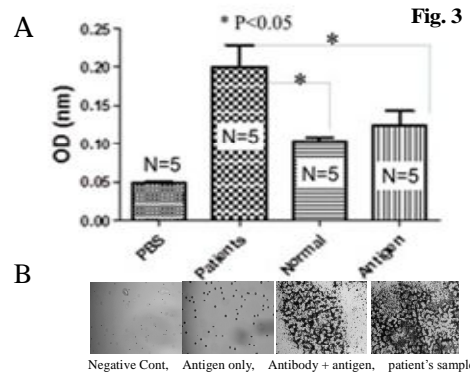


Fig.3. TNNI3K-金コロイド銀増幅法で TNNI3K 濃度の測定:

A. ELISA 測定 OD 値 ; PBS; 患者陽性血清 ; 正常人血清 ; 陽性抗原 ; B. 金コロイド銀染色結果 : ネガティブコン, 抗原だけ、抗体抗原反応、患者陽性血清それぞれを測定した結果。

我々は、TNNI3K-金コロイド銀増幅型検査チップを作製し、その TNNI3K-金コロイド銀増幅型検査チップを用いた TNNI3K 抗体の反応性及び反応速度を検討した。全血或いは血清のサンプルを用いた、展開液をサンプル添加部に滴下して、反応終わるまでやや 15 分間で結果を見えた。即ち、金コロイドに固定化された抗体が目的の抗原を捕捉して、形成された抗原を捕捉した金コロイド-抗体複合が、判定部位の抗体に捕捉され、赤色を目視判定するが、その結果を見て、陽性あるいは陰性を判断でき、その感度は銀増幅より、さらに感度が高くなった。

表 1: 診断マーカーの特徴、従来技術・競合技術との比較

	通常 ELISA 法	金コロイド法	金コロイド銀増幅法
測定時間	3 - 4 時間	15 分程度	15 分程度
操作	複雑	簡単	簡単
判断方法	プレートリーダーで解析	装置不要	装置不要/要
測定値	定量	定性	定性/定量
測定標本	血清	全血、血漿、血清	全血、血漿、血清
特色	特異性高い	背景濃い、偽陽性多い、金の値段が高い	感受性、特異性高い、少量金も可能

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4件)

1. **Chen YZ***, **Wang XP***, **Zhang TL**, Chen J, **Sakaguchi N**, Tsuda H, Kim-Mitsuyama S, Wang BQ and **Yorinaka H**. Circulating level of cardiac-specific MAP kinase, TNNI3K, as a new diagnosis biomarker for acute myocardial infarction 2016, 投稿中.
2. Wu P, Han N, Yu HT, Wang LL, Xue Li, Dong ZH, **Yorinaka H**, Yin J, Jiang BH: Amelioration of salvianolic acid C on aortic structure in apolipoprotein E-deficient mice treated with angiotension II. **BBRC (ELS)**, 投稿中
3. Kitabatake M, Soma M, **Zhang T**, Kuwahara K, Fukushima Y, Nojima T, Kitamura D, Sakaguchi N. JNK regulatory molecule G5PR induces IgG autoantibody-producing plasmablasts from peritoneal B1a cells. *J Immunol.* 194:1480-8; 2015. doi: 10.4049/jimmunol.1401127. Epub 2015 Jan 19.
4. Liu XZ, Liu X, **Lai ZF**, Song YX, Zhai CM. Stability and toxicology of the controlled-release tablets of sasanquasaponin-casein. **Advanced Materials Research** Vol 884-885, 526-530, 2014. doi: 10.4028/www.scientific.net/AMR.884-885.526.

[学会発表](計20件)

1. **Lai ZF**, **Chen YZ**, Hiroshisa, Kitamoto Y and Kim-Mitsuyama S. Evidence, hypotheses and significance of MAP kinase TNNI3K interacting with its partners. The 86th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society. Fukuoka, Japan, Mar 21-23, 2013.
2. **頼仲方一**(特別講演) TNNI3K 遺伝子の機能解析とその意義. *Special Lecture* at Gannan Medical University. Oct. 8, 2013
3. **頼仲方一**, **頼仲玉珍**, 光山勝慶, **張田力**, 阪口薫雄, 北本康則. 新しい虚血性心疾患診断バイオマーカーの開発と意義. 第66回日本薬理学会西南部会、福岡大学薬学部、平成25年11月16日
4. **Lai ZF**, **Chen YZ**, **Zhang TL**, **Sakaguchi N**, Kim-Mitsuyama. Functional analysis of Tnni3k gene and its significance for suppressing cardiac sudden death. *Late-Breaking Basic Science abstracts from AHA's scientific Sessions.* Dallas, Texas. 2013
5. **Lai ZF**, **Chen YZ**, **Zhang TL**, **Sakaguchi N**, Kim-Mitsuyama, and Kitamoto Y. MAP kinase TNNI3K gene functional analysis and new drug development for suppressing cardiac sudden death. The 87th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society. Sendai, Japan, Mar 19-21, 2014.

6. **Lai ZF**, **Chen YZ**, **Zhang TL**, Kim-Mitsuyama, and Sakaguchi N. Controlled-release tablets enhance pharmacological effects of sasanquasaponin on cardiovascular system. The 88th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society. Nagoya, Japan, Mar 18-20, 2015.
7. **頼仲方一**¹, 今村隆寿², 小池紀夫³, 北本康則. ウロキナーゼ固定化材質の生体適合性について. 熊本大学第一回医工連携フォーラム. 熊本大学生命科学研究部総合研究棟3階講習室、熊本、平成25年5月29日
8. 頼仲方一, 頼仲玉珍:抗TNNI3K抗体を用いた新しい心筋虚血疾患診断キットを開発する可能性と必要性. 熊本大学第二回医工連携フォーラム. 熊本大学生命科学研究部総合研究棟3階講習室、熊本、平成26年10月29日
9. **Zhang T** and **Lai ZF**. Circulating level of cardiac-specific MAP kinase TNNI3K would be a useful diagnosis biomarker for acute ischemic myocardial diseases. 第8回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム 熊本大学薬学部内、平成26年11月15-16日
10. Kitabatake M, Soma M, **Zhang T**, and **Sakaguchi N**. JNK regulatory molecule G5PR induces peritoneal B1a cells into IgG autoantibody-producing plasmablasts. 第43回日本免疫学会(京都). 2014年11月10-12日.
11. Kitabatake M, **Zhang T**, Kuwahara K and **Sakaguchi N**. Protein phosphatase subunit G5PR regulates the plasmablast differentiation and autoantibody production of peritoneal B-1a cells. 第42回日本免疫学会(千葉) 2013年12月11-13日.
12. **頼仲方一**, **頼仲玉珍**: Cl⁻-トランスポーターと心筋虚血損傷 酸化ストレスとNFκB活性化の関与. 第8回トランスポーター研究会年会. 熊本薬学部宮本記念館 2013年6月15-16日.
13. **頼仲方一**, **Yu-Zhen Chen**, 劉小珍. サザンカサポニンとその徐放剤研究の歩み. 第67回日本薬理学会西南部会、産薬医大テマツイーニホール、北九州市 2014年11月23日
14. **Yorinaka H** and **Chen YZ**, **Zhang TL**. Pharmacological studies on controlled-release tablets of sasanquasaponin. 第7回トランスポーター研究会九州部会. 2014年11月22日.
15. **Lai ZF**, **Chen YZ**, Hiroshisa, Kitamoto Y and Kim-Mitsuyama S. Evidence, hypotheses and significance of MAP kinase TNNI3K interacting with its partners. The 86th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society. *Fukuoka*, Japan, Mar 21-23, 2013.
16. **Lai ZF**. Circulating Tnni3k Levels Are Useful Diagnosis Biomarker For Acute Ischemic Myocardial Diseases. *AHA ATVB/PVD Symposium.* San Francisco, May 6-9, 2015.

17. **Lai ZF, Zhang TL, Yu-Zhen Chen.** Functional analysis of TNNI3K MAP kinase - From basic to clinical research. *ASCEPT-BPS Molecular and Cellular pharmacology Session, 2015. Hong Kong, May 19-21, 2015.*
18. **Yorinaka H.** (*Special Lecture*): From Brain to Heart—Walk through the medical research of thirty years. *Special Lecture at Gannan Medical University.* Oct. 14, 2014.
19. **シンポジウム開催:** 第 89 回日本薬理学会年会オープニングシンポジウム 19: TNNI3K: 心疾患治療の新しい分子標的。パシフィコ 横浜国際会議場、Mar. 10, 2015. 発起人: **頼仲方一**
 Meng XM: Adenovirus-mediated overexpression of cardiac troponin I-interacting kinase promotes cardiomyocyte hypertrophy. *Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing, China*
Yorinaka H: Evidence, hypotheses and significance of MAP kinase TNNI3K interacting with its partners. Kumamoto University, Japan.
 Song L. TNNI3K affects the cardiac contractile function by cTnI phosphorylation. *Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing, China.*
Zhang T: Circulating TNNI3K levels are useful diagnosis biomarker for ischemic myocardial diseases
 Zhang Y. Dystrophin-deficient cardiomyocytes derived from human urine: new biologic reagents for drug discovery. Wake Forest Institute for Regenerative Medicine, Wake Forest University, Winston-Salem, NC, USA

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

発明の名称: 血中 TNNI3K 濃度を測定する金コロイドー銀増幅チップの作製と応用

(特許番号): CN201410391774

取得年月日: 2014 年 10 月; 国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ等

www.geocities.jp/yorinakah/4378/research.html

6 . 研究組織

(1) 研究代表者(助教) 頼仲方一 (YORINAKA, Hoichi)

熊本大学生命科学研究部

研究者番号: 902441101

(2) 連携研究者(研究員) 頼仲玉珍 (YORINAKA, Gyokuchin)

熊本大学生命科学研究部

研究者番号: 50418828

連携研究者(教授) 阪口薫雄 (SAKAGUCHI, Nobuo)

熊本大学生命科学研究部

研究者番号: 70192086

(3) 研究協力者:

日本国内: 張 田力 (ZHANG, Tianli)

熊本大学生命科学研究部

北本康則 (KITAMOTO, Yasunori)

JCHO 仙台病院.

外国の共同研究者

中国幹南医科大学第一附属医院:

王 小萍 (WANG, Xiaoping) 王 伯群 (WANG, Boqun)

中国上海応用技術学院: 劉 小珍 (LIU, Xiaozhen)

中国科学院上海藥物研究所: 姜 宝紅 (JIANG, Baohong)

表2: 診断マーカーの特徴、従来技術・競合技術との比較

比較項目	TNNI3K キット	従来検査キット	
		トロポニンI	トロポニンT
濃度の上昇について	虚血開始2 時間後から上昇、12 時間後にピークを迎え、48 時間後でも同様な高いレベルを維持している。	虚血開始4 時間後から検出され、約14 時間でピークとなる。その後、トロポニンI は75 ~ 140 時間検出可能	虚血開始4 時間後から検出され、約14時間でピークとなる。トロポニンT は2 相性の上昇を示し約10 日間検出可能
心臓以外への反応性	なし	腎不全例も陽性反応	テストしてない
心筋細胞の特異性	非常に特異的である	相対的特異性 (骨格筋もあり)	