

京都大学	博士 (医学)	氏名	垣本由布
論文題目	Sorbin and SH3 Domain-containing Protein 2 Is Released from Infarcted Heart in Very Early Phase: Proteomic Analysis of Cardiac Tissues from Patients (SORBS2 は超急性期の梗塞心筋から逸脱する: 患者心臓組織を用いたプロテオーム解析)		
(論文内容の要旨) 心筋梗塞は内因性の突然死において最も多い疾患である。心電図などの臨床検査が行えない死後の診断においては、病理組織所見による診断が主体となるが、発症後ごく早期の梗塞例では肉眼的な組織所見が乏しい。顕微鏡によるミクロ所見では超急性期症例でも形態変化が観察されるが、臓器の固定や染色が必要となり診断確定まで数週間かかる。そこで解剖検体でも有用で、短時間で診断できる、超急性期心筋梗塞のバイオマーカーが求められる。 質量分析(MS)は試料組成の変化を分子レベルで捉える分析法であり、超急性期の心筋梗塞組織においても診断に有用な分子マーカーを検出することが期待される。しかし、ホルマリンによりペプチド架橋が生じた固定標本では、タンパク質 MS は困難とされてきた。特に、死後経過による劣化が想定される法医解剖検体で、タンパク質 MS の適応を試みた報告はこれまでない。 今回、法医学講座における解剖症例のうち心筋梗塞発症後 7 時間以内に死亡した突然死症例 5 例と、年齢および性別を一致させた対照群 5 例の心筋組織を用いてプロテオーム解析を行った。ホルマリン固定した心臓左室自由壁から、心筋梗塞例では虚血性変化をきたした心筋細胞を、対照例からは正常構築の保たれた心筋細胞を、マイクロダイセクターで同体積ずつ切り出した。アセトニトリルと重炭酸アンモニウムの溶媒内でタンパク質を抽出した後、トリプシンで消化したペプチドを液体クロマトグラフィー(LC)で分離し MS を行った。 その結果、False Discovery Rate 1%の精度で 10,396 ペプチド、734 タンパク質を同定した。また、二群間の比較では、既知の心筋梗塞マーカーである Heart-type Fatty Acid Binding Protein (H-FABP)が虚血心筋で減少していた。一方、患者血清の ELISA では H-FABP の陽性が示されており、心筋の MS 結果は H-FABP の血中への逸脱を裏付けるものであった。 また、MS から心臓の Z 帯と介在板に特異的に発現しているタンパク質 Sorbin and SH3 domain containing protein 2 (SORBS2)が虚血心筋で減少していることも示され、虚血心筋の細胞質で SORBS 2 の免疫染色性が低下していた。さらに、急性心筋梗塞 10 例と対照例 11 例の血清を用いた Western Blot では、SORBS2 濃度は心筋梗塞患者で有意に高く、虚血心筋から血中へ逸脱することが示唆された。これまで SORBS2 を心筋梗塞と関連付けた報告はないが、このタンパク質は心筋で多量に発現し、骨格筋では殆ど発現しないことが知られており、急性心筋梗塞診断の診断マーカーとなる可能性が示された。 SORBS2 が臨床診断に有用か、また既知のバイオマーカーに比してより早期に血中へ逸脱するかについては、さらに多くの患者サンプルを用いた検証が必要である。しかし、本研究で確立したタンパク質分析法は、長期間保存されたホルマリン固定標本を用いた研究をより促進するものと期待される。			

(論文審査の結果の要旨)

急性心筋梗塞 (AMI) は内因性突然死において最も多い疾患であるが、法医解剖においては心電図などの生前情報が得られないだけでなく、組織学検査でも診断が困難な場合が多い。そのため、超急性期でも確実に AMI の診断ができるバイオマーカーが求められている。

これまでホルマリン固定標本の質量分析 (MS) は不可能とされてきたが、申請者は今回、AMI 突然死症例の固定心筋組織を用いてプロテオーム解析を行った。法医解剖事例の虚血心筋細胞と健全心筋細胞をマイクロダイセクトし、アセトニトリルと重炭酸アンモニウムの溶媒内でタンパク質を抽出し MS を行った。

その結果、False Discovery Rate 1%の精度で 10,396 のペプチド、734 のタンパクが同定できた。ラベルフリー定量では、古典的な AMI 診断マーカーである Troponin T の変動は検出されなかったが、より早期に血中へ逸脱することが知られている Heart-type Fatty Acid Binding Protein (H-FABP) は虚血心筋で減少していた。また、これらの既知のバイオマーカーと同様に心筋の細胞質に局在するタンパクに注目すると、Z 帯と介在板に特異的に発現する Sorbin and SH3 Domain-containing Protein 2 (SORBS2) も虚血心筋で減少しており、免疫染色においても染色性の低下が確認された。さらに血清の Western Blot では、SORBS2 濃度は AMI 患者で有意に高く、虚血心筋から血中へ逸脱することが示唆された。このため、SORBS2 は AMI の診断マーカーとなる可能性が示された。

以上の研究は、新たな質量分析法を用いて、解剖事例における固定組織からのプロテオーム解析を可能とただけでなく、新しい心筋虚血診断マーカーの候補タンパクを示すなど、病理学や臨床医学の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成 26 年 1 月 8 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降