

2025 年度 医療技術研究開発助成 成果報告書

[萌芽・探索型]

所 属 福島県立医科大学循環器内科
氏 名 横川哲朗

[研究テーマ]

右室特異的血中バイオマーカー測定機器の開発

[分野]

- ① 日常生活における健康無関心層の疾病予防、重症化予防に資する医療機器
- ② 予後改善につながる診断の一層の早期化に資する医療機器
- ③ 臨床的なアウトカムの最大化に資する個別化医療に向けた診断と治療が一体化した医療機器
- ④ 高齢者等の身体機能の補完・向上に関する医療機器
- ⑤ 医療従事者の業務の効率化・負担軽減に資する医療機器
- ⑥ 次世代の医療機器開発・生産に資する要素技術・部品・部材の開発、製造基盤

1. 背景と目的

拡張型心筋症や肺動脈性肺高血圧症などの心不全患者の一部は、標準的薬物治療に抵抗性を示し、最終的に心移植や肺移植を必要とする。これらの患者では右心不全の合併がしばしば認められ、右心不全の有無や重症度が生命予後や移植成績を大きく左右することが知られている。特に肺動脈性肺高血圧症や左心系補助人工心臓装着後、心移植待機患者においては、右心不全が独立した予後規定因子であることが示されており、右心不全の評価と管理は重要な課題となっている。

右心不全評価には、心エコー検査や右心カテーテル検査が用いられてきたが、これらには侵襲性や簡便性の問題がある。一方、血中バイオマーカーとして広く用いられている Brain natriuretic peptide (BNP) および NT-proBNP は、心不全の診断や予後予測に有用であるものの、主に左室負荷や左心不全の影響を反映するため、右心不全に特異的な指標とはならない。これまでも右心機能と相関する複数の血中バイオマーカーが報告されてきたが、その多くは左心不全の影響を完全には除外できず、右心不全特異的血中バイオマーカーとして臨床応用されたものは存在しない。

近年の基礎および臨床研究により、右室と左室は発生学的起源、圧負荷・容量負荷への適応、エネルギー代謝、線維化や炎症反応などにおいて本質的に異なる臓器であることが明らかにされている。このような臓器特異性を背景として、右心不全では左心不全とは異なる分子応答や蛋白発現変化が誘導される可能性が示唆されている。しかし、これら右室特異的分子変化を解析し、血中バイオマーカーとして同定・検証した報告は限られている。

そこで本研究では、これまでの右心不全に関する報告を踏まえ、左心不全の影響を受けずに右心不全で特異的に変動する右室由来蛋白に着目する。細胞、組織および血液検体を用いた網羅的解析を通じて、新規右心不全特異的血中バイオマーカーを同定し、右心不全の早期診断お

よび病勢評価への臨床応用可能性を明らかにすることを本研究の目的とする。

2. 研究方法・計画

(a) 活性化心臓線維芽細胞由来蛋白の同定

申請者は、肺高血圧症に伴う右心不全患者においては、心臓線維芽細胞から細胞外に分泌される蛋白が血中バイオマーカーとなる可能性に着目し、心臓線維芽細胞関連した蛋白室が右心不全における血中バイオマーカーとなる研究(Nat Cardiovasc Res 2022; 1: 748-760)を行ってきた。今回、マウス心臓から心臓線維芽細胞を単離培養し、Transforming growth factor β 刺激により活性化心臓線維芽細胞に変化させた際の蛋白発現を網羅的に高感度プロテオミクス(Orbitrap Exploris 240)により解析した。

(b) バイオマーカー解析(血漿プロテオミクス)

血液サンプルを用いた血漿プロテオミクス解析を行った。対象は、右心機能が低下する肺動脈性肺高血圧症(n = 40)、心血管疾患のないコントロールの方(n = 10)とした。血液検体から遠心分離で血漿を得た。分子量の大きなアルブミンなどの蛋白の存在は、微量蛋白の検出を困難にするため、High-Select Top14 Abundant Protein Depletion Midi Spin Columns を使用して分子量の大きな蛋白を除外した。その後、EasyPep Mini MS Sample Prep Kit による蛋白前処理を行った。そして得られたサンプルを用いて、Orbitrap Exploris 240 による高感度プロテオミクス解析を行った。

その後、(a)の活性化心臓線維芽細胞と(b)の血漿プロテオミクスの双方で特定した蛋白に関して、予後(心不全増悪、死亡)との関連、BNP 値、New York Heart Association 分類、心エコー(Right ventricular S'、Right ventricular fractional area change)で測定した右心機能、右心カテテル検査で測定した血行動態(Cardiac index、Pulmonary artery wedge pressure、Pulmonary artery pressure)との関連を調べた。

(c) 右心不全右室組織での検討

肺高血圧症に伴う右心不全モデルマウスの右室組織を用いた。コントロールとして、右心不全を呈していない野生型マウスの右室組織を用いた。ウェスタンブロット、免疫染色を用いて右室組織において、(a)(b)双方の検討で同定した蛋白の発現や局在を調べた。

(d) バイオマーカー解析(Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)

慢性血栓塞栓性肺高血圧症患者では、バルーン肺動脈形成術による治療で右心機能が改善する。(a)(b)双方の検討で同定した蛋白が治療効果を反映したバイオマーカーとなり得るかを、バルーン肺動脈形成術を施行した慢性血栓塞栓性肺高血圧症患者の血漿サンプルを用いて ELISA 法で検討を進めた。

3. 研究成果及び考察

(a)の心臓線維芽細胞において、Transforming growth factor β 刺激(5 ng/mL)により有意に

低下する蛋白 156 種を同定した。さらに、(b) の血漿プロテオミクス解析を進めた。Orbitrap Exploris240 によるヒト血漿プロテオミクス解析の条件を最適化するため、血漿を Thermo High Select Top14 Abundant Protein Depletion Mini Spin Columns (以後、Mini Spin Columns) によるアバンドント蛋白除去を行った後、Orbitrap Exploris240 による解析を行ったところ、2500 種以上の蛋白が検出できた。しかし Mini Spin Columns 後のサンプル中の蛋白濃度が薄く(測定可能な下限に近い)、多数の検体の解析を行った場合、蛋白濃度のバラツキが大きくなってしまいう問題が生じる可能性が高かった。サンプル中の蛋白濃度が薄いという問題を解決するため、① Thermo High Select Top14 Abundant Protein Depletion Midi Spin Columns (以後、Midi Spin Columns) によるアバンドント蛋白除去⇒Amicon Ultra を用いた蛋白濃縮⇒Orbitrap Exploris240 による解析、②Midi Spin Columns によるアバンドント蛋白除去⇒Orbitrap Exploris240 による解析の 2 通りで条件検討を行った。①では 1692 種、②では 1561 種の蛋白が同定できた。また、②において、Midi Spin Columns 後のサンプル中の蛋白濃度は 0.386 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ であり、再現性を持って測定可能な蛋白濃度であった。そのため蛋白濃度の濃い②の手法が最適化された Orbitrap Exploris240 を用いたヒト血漿プロテオミクス解析の条件と考えられた。そして、肺動脈性肺高血圧症 ($n = 40$)、コントロール ($n = 10$) の血漿を用いて血漿プロテオミクスを行い、有意に肺高血圧症患者で低下している蛋白 20 種を同定した。以上より、(a) の活性化心臓線維芽細胞と(b) の血漿プロテオミクス解析で一致して低下している蛋白 Y を同定した。蛋白 Y は、細胞外マトリックスの構成成分の一つである。相関解析において蛋白 Y は、ヒトにおける SvO₂、血中 BNP、Right ventricular S[']、Right ventricular fractional area change と有意な相関を認めた。ただし、蛋白 Y は右心カテーテル検査における Cardiac index、Pulmonary artery wedge pressure、Pulmonary artery pressure との相関は認めなかった。肺高血圧症患者における生存曲線解析では、蛋白 Y 高値群 ($n = 20$) と、蛋白 Y 低値群 ($n = 20$) において、予後(心不全増悪、死亡)に有意差を認めなかった。肺高血圧症に伴う右心不全モデルマウスの右室組織における、蛋白 Y の免疫染色とウェスタンブロットについては、各種抗体を用いて現在検討中である。ELISA を用いてバルーン肺動脈形成術前後の慢性血栓性肺高血圧症患者の血漿サンプルの検討を行っているが、予備検討において、蛋白 Y は、症例 1 でバルーン肺動脈形成術前 163 pg/mL、バルーン肺動脈形成術後 180 pg/mL、症例 2 でバルーン肺動脈形成術前 64 pg/mL、バルーン肺動脈形成術前後 83 pg/mL と変化していた。よって右心機能の改善と共に蛋白 Y が増加する可能性があり、症例を増やして検討を進める予定である。

4. まとめ

拡張型心筋症や肺動脈性肺高血圧症に伴う右心不全では、左心不全の影響を受けない特異的評価法が確立されていない。本研究は、右室特異的血中バイオマーカーの同定を目的に、活性化心臓線維芽細胞のプロテオミクスと肺高血圧症患者血漿プロテオミクスを統合して解析した。その結果、両者で共通して低下する細胞外マトリックス関連蛋白 Y を同定、右心機能指標と有意に相関していたが、予後との関連は認めなかった。現在、蛋白 Y の右心不全バイオマーカーとしての妥当性の検討のため、右心不全モデルマウス右室組織での検討および治療介入前後の ELISA 解析を進めている。

5. 倫理面への配慮

本研究は、本学倫理委員会の承認を得た上でっており、倫理面への配慮が行われている。

6. 研究業績

記載事項なし

助成期間終了後の開発構想

これまでの研究により、活性化心臓線維芽細胞および血漿プロテオミクス解析の双方で一致して低下する蛋白 Y を同定し、右心機能指標や BNP と有意な相関を示すことを明らかにした。一方で、右心カテーテルによる血行動態指標や予後との関連は明確ではなく、蛋白 Y の右心不全特異性、病態学的意義、臨床的有用性についてはさらなる検討が必要である。そこで今後は以下を中心に研究を進める。

(1) 右心不全モデルマウス右室組織、患者由来右室組織における蛋白 Y の発現・局在の確立

現在進行中の右心不全モデルマウス右室組織を用いた免疫染色およびウェスタンブロット解析を完遂し、蛋白 Y の発現量および局在(心臓線維芽細胞、細胞外マトリックス領域など)を詳細に評価する。さらに、患者由来右室組織における蛋白 Y への局在についても、本学所有の Hyperion XTi による多重免疫染色を行う。そして、蛋白 Y が右室リモデリングや線維化過程において果たす役割を明らかにし、血中バイオマーカーとしての生物学的妥当性を検証する。

(2) 臨床コホートを用いた蛋白 Y の動態解析と右心不全特異性の検証

慢性血栓塞栓性肺高血圧症患者におけるバルーン肺動脈形成術前後の血漿サンプル数を増やし、ELISA 法により蛋白 Y の変化を評価する。右心機能改善に伴う蛋白 Y の変動を、心エコー指標や BNP の変化と比較することで、治療反応性バイオマーカーとしての有用性を検証する。また、左心不全主体の心不全患者の血漿サンプルをコントロールとして解析することで、蛋白 Y の右心不全特異性の検討を進める。

(3) 予後予測因子としての評価および複合バイオマーカー解析

本研究では蛋白 Y 単独では予後との有意な関連を認めなかったため、今後は症例数を拡大するとともに、既存指標(BNP など)と組み合わせた複合バイオマーカー解析を行う。これにより、右心不全の病勢評価やリスク層別化における蛋白 Y を評価する。

以上の研究を通じて、蛋白 Y の右心不全における病態的意義を多角的に明らかにし、左心不全の影響を受けにくい右心不全特異的血中バイオマーカーとしての確立を目指す。本研究成果は、右心不全の早期診断、治療効果判定、さらには新規治療標的探索へと発展することが期待される。

右室特異的バイオマーカーとして蛋白 Y が確立できた場合、特許申請手続、論文作成、投稿作業を進める。さらに抗体反応による迅速検査が可能な医療機器を開発し、その医療機器を用いた臨床研究を進める。そして、開発した医療機器を用いた血中バイオマーカー検査を右心不全特異的検査として、体外診断用医薬品として新規保険収載手続を進め、臨床現場で使用できるようにする。