



# Effect of FURIN SNP rs17514846 on coronary atherosclerosis in human cardiac specimens: an autopsy study of 106 cases

山崎, 元太郎

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2022-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8316号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1008316>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

## 学 位 論 文 の 内 容 要 旨

### Effect of FURIN SNP rs17514846 on coronary atherosclerosis in human cardiac specimens: An autopsy study of 106 cases

ヒト冠状動脈硬化症に対して FURIN SNP rs17514846  
が与える影響: 106 剖検例の法医病理学的研究

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻  
法医学

(指導教員: 上野 易弘 教授)

山崎 元太郎

#### 【背景】

冠動脈疾患は法医学において最も頻度の高い死因の一つである。時にその死後診断には、冠状動脈狭窄だけでなく、冠危険因子の考慮や除外診断といった総合的な判断が必要となる。

FURIN は特定のアミノ酸配列でタンパク質を切断するセリンプロテアーゼであり、様々な組織や細胞で発現し、主にトランスゴルジ網に存在する。近年ゲノムワイド関連解析によって冠動脈疾患のリスクとなる一塩基多型(以下 SNP)が研究されており、FURIN の染色体 15q26.1 に存在する SNP である rs17514846 が冠動脈疾患のリスクであるという報告がなされた。rs17514846 のマイナーアレル A は、in vitro においてヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)や単球/マクロファージにおいて FURIN の高発現と関連していることが報告されている。FURIN は、マトリックスメタロプロテアーゼ-1 や TGF- $\beta$ 1、エンドセリン-1 の活性化を通じて動脈硬化を促進する。冠動脈疾患は多くが冠状動脈硬化症によって引き起こされることから、rs17514846 は冠動脈疾患の潜在的なリスクになると考えられている。心臓は冠状動脈硬化症の主座であるため、心臓における FURIN が冠状動脈硬化症に影響を与えらると思われるが、実際のヒト試料を用いた rs17514846 と FURIN に関する研究は殆どない。

本研究では、ヒト剖検試料を用いて、rs17514846 の遺伝子型を特定するとともに、心臓における FURIN を定量し、各症例における冠状動脈硬化症の程度を肉眼的および病理組織学的に分類することによって、それぞれの関係を統計学的に調べた。

#### 【方法】

2020 年から 2021 年の間に神戸大学大学院医学研究科法医学分野で法医解剖を行った 133 症例のうち、死後 72 時間以内で完全な剖検データが得られた 106 症例を対象とした。

冠状動脈硬化症の程度には、剖検時に肉眼的に観察して決定した狭窄度 4 群[~25%未満、~50%未満、~75%未満、75%以上]を用いた。病理組織学的分類には Stary 分類を用い、初期病変であるタイプ I から最も進行病変であるタイプ VI までの 6 分類とした。

rs17514846 の遺伝子型は、剖検時に採取した血液から DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出し、TaqMan プローブによるリアルタイム PCR 法で検出を行った。

FURIN 定量は、剖検時に採取した左冠状動脈前下行枝および左心室心筋に対して行った。冠状動脈および心筋組織をそれぞれ 40mg にトリミングし、PBS 100mL を加えてホモジナイズした上で遠心し、得られた上清に対し ELISA 定量を行った。それぞれの FURIN 定量値は、Bradford 法によって測定した総タンパクによって補正した。またホモジネート中に FURIN が適切に抽出されているかを確認するためにウエスタンブロットを行った。

心臓組織に対して免疫組織化学検査を行い、マクロファージについては CD68 と FURIN の二重免疫染色を行い、FURIN の局在を観察した。

rs17514846 遺伝子型と FURIN 定量値との相関関係はフィッシャーの正確検定とクラスカル・ウォリス検定で解析し、多重比較にはスティーラー・デュワス法を行った。また肉眼的な冠状動脈狭窄度や Stary 分類、各種剖検データ(年齢、性別、BMI、死後経過時間、心臓重量、HbA1c、LDL、HDL、中性脂肪、前室間溝脂肪厚、腹部脂肪厚)と FURIN 定量値との相関関係の解析にはクラスカル・ウォリス検定、マン・ホイットニーの U 検定、スピアマンの順位相関係数を用いた。いずれも有意水準は  $p < 0.05$  として解析を行った。

#### 【結果】

106 症例のうち、AA は 5 例、AC は 19 例、CC は 82 例であった。

ウェスタンブロットでは FURIN 抗体を用いて単一なバンドが確認された。

遺伝子型と FURIN 定量値の解析では、心筋組織において有意差を持って相関関係を認め(クラスカル・ウォリス検定,  $p = 0.0130$ )、多重比較では AA は AC や AC よりも高値であり、AA と CC の間には有意差を認めた(スティーラー・デュワス法,  $p = 0.0123$ )。冠状動脈では遺伝子型と FURIN 定量値の間に有意差はなかったが(クラスカル・ウォリス検定,  $p = 0.317$ )、心筋組織と同様に AA は AC や CC よりも FURIN 定量値が高い傾向にあった。冠状動脈硬化症の程度と FURIN 定量値との解析では、心筋組織において有意差を認め(クラスカル・ウォリス検定,  $p = 0.0469$ )、Stary 分類タイプ II やタイプ III といった比較的早期の病変群で FURIN 定量値が高く、タイプ II とタイプ V の FURIN 定量値に有意差を認めた(スティーラー・デュワス法,  $p = 0.0416$ )。冠状動脈においても有意差を認め(クラスカル・ウォリス検定,  $p = 0.0296$ )、多重比較では心筋組織よりもさらに早期病変であるタイプ I において最も FURIN 定量値が高く、動脈硬化が進行するにつれて FURIN 定量値は低下する傾向にあり、タイプ I とタイプ V の FURIN 定量値間に有意差を認めた(スティーラー・デュワス法,  $p = 0.0262$ )。一方で rs17514846 は冠状動脈の肉眼的な狭窄度や Stary 分類と統計学的な相関関係を認めず、各種剖検データと FURIN 定量値との相関関係においてもいずれも有意差は認めなかった。

免疫染色および二重免疫染色では、心筋組織や血管平滑筋細胞、血管内皮細胞、脂肪細胞、マクロファージで陽性像が認められた。

#### 【考察】

本研究では以下の 2 点が明らかとなった。一点目は、rs17514846 のアレル A がアレル C に比べて心筋組織における FURIN の発現を増加させることである。この結果は、rs17514846 のアレル A が HUVEC や単球/マクロファージで FURIN の高発現に関係するという過去の報告に一致しており、冠状動脈や心筋組織でも同様の傾向であることを示した。

二点目は、心臓組織において冠状動脈硬化の進行病変よりも初期病変で FURIN 定量値が高値であることである。以前の報告では、冠状動脈硬化症が進行するにつれて、マクロファ

ージで FURIN が高度に発現するとされている。本研究においても、進行病変で FURIN の高発現を伴うマクロファージが確認されたが、マクロファージだけでなく、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞、心筋細胞にも広く FURIN 発現が観察されていることから、それらが冠状動脈硬化症の早期病変において FURIN の高発現により強く関係していると考えられる。また動物実験ではあるが、血流による剪断力によって血管内皮細胞の FURIN 発現が増加し、心不全の初期において心筋細胞の FURIN 高発現が認められたという報告がある。これを参考にすると、本研究結果は、剪断力によって血管内皮細胞で FURIN が高発現となり、それに続いて心筋細胞で FURIN の発現が増加するというダイナミクスを示している可能性が示唆された。

#### 【結論】

剖検試料による分析であるので、死後変化胃の影響は避けられないが、本研究では rs17514846 の A アレルが心臓組織において FURIN の高発現と関連しており、冠状動脈硬化症の進行病変よりも初期病変で FURIN がより高いことを明らかにした。また SNP が心臓組織における FURIN 発現に及ぼす影響に加え、冠状動脈硬化症が比較的早期病変の場合に、冠状動脈と心筋組織の FURIN 発現は有意に高く、冠状動脈や心筋組織の FURIN 発現が冠状動脈硬化症の進行に伴って変化する可能性が示唆された。本研究結果は、冠状動脈硬化症の進行メカニズムに対する理解を深めるものと考えられた。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 3 1 6 7 号	氏 名	山崎 元太郎
論 文 題 目 Title of Dissertation	Effect of FURIN SNP rs17514846 on coronary atherosclerosis in human cardiac specimens: An autopsy study of 106 cases  ヒト冠状動脈硬化症に対して FURIN SNP rs17514846 が与える 影響：106 剖検例の法医病理学的研究		
審 査 委 員 Examiner	主 査 榎 峰 幸 Chief Examiner 副 査 平 田 康 一 Vice-examiner 副 査 小 谷 稔 治 Vice-examiner		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

冠状動脈疾患は法医学領域において最も頻度の高い死因の一つであるが、死後診断では冠状動脈狭窄のみならず冠危険因子の考慮や除外診断など総合的な判断を必要とされる。FURIN は特定のアミノ酸配列でタンパク質を切断するセリンプロテアーゼであり、様々な組織や細胞で主にトランスゴルジ網に発現する。近年 FURIN の存在する染色体 15q26.1 の一塩基多型 (以下 SNP) rs17514846 が冠状動脈疾患のリスクであるという報告がなされた。心臓は冠状動脈硬化症の主座であるため、心臓における FURIN が冠状動脈硬化症に影響を与えると考えられるが、実際のヒト試料を用いた rs17514846 と FURIN 発現に関する研究は殆どない。そこで本研究では、ヒト剖検試料を用いて rs17514846 の遺伝子型を特定するとともに、心臓における FURIN を定量し各症例における冠状動脈硬化症の程度を肉眼のおよび病理組織学的に分類することによって、それぞれの関係を統計的に解析した。用いた材料と方法は以下のごとくである。

検索対象は、2020 年から 2021 年の間に神戸大学大学院医学研究科法医学分野で法医学解剖を行った 133 症例のうち、死後 72 時間以内で完全な剖検データが得られた 106 症例である。冠状動脈硬化症の程度は、剖検時に肉眼的に観察して決定した狭窄度 4 群を、病理組織学的分類には Stary 分類を用いた。FURIN の rs17514846 遺伝子型は、剖検時採取血液から抽出した DNA を用い、TaqMan プローブによるリアルタイム PCR 法で解析した。FURIN タンパク定量は剖検時に採取した左冠状動脈前下行枝および左心室心筋に対し実施した。組織における FURIN の可視化には免疫組織化学を用い、マクロファージについては CD68 と FURIN の二重免疫染色を施行した。rs17514846 遺伝子型と FURIN 定量値との相関関係はフィッシャーの正確検定とクラスカル・ウォリス検定で、多重比較にはステイール・デュワス法を用いた。肉眼的な冠状動脈狭窄度や Stary 分類、各種剖検データと FURIN 定量値との相関関係の解析にはクラスカル・ウォリス検定、マン・ホイットニーの U 検定、スピアマンの順位相関係数を用いた。いずれも有意水準は  $p < 0.05$  とした。得られた結果は次のごとくである。

検索した 106 例の FURIN rs17514846 遺伝子型の内訳は、AA5 例、AC19 例、CC82 例であった。遺伝子型と FURIN 定量値の比較では、心筋組織で有意の相関関係がみられ ( $p = 0.0130$ )、多重比較では AA は AC や AC より高値で、AA と CC の間に有意差が認められた ( $p = 0.0123$ )。冠状動脈では遺伝子型と FURIN 定量値の間に有意差はなかったが

( $p=0.317$ )、心筋組織と同様に AA は AC や CC よりも FURIN 定量値が高い傾向にあった。冠状動脈硬化症の程度と FURIN 定量値との比較では、心筋組織において有意差を認め ( $p = 0.0469$ )、比較的早期の病変群で FURIN 定量値が高く、タイプ II とタイプ V の FURIN 定量値に有意差を認めた ( $p = 0.0416$ )。冠状動脈においても有意差を認め ( $p = 0.0296$ )、多重比較では心筋組織よりもさらに早期病変であるタイプ I において最も FURIN 定量値が高く、動脈硬化が進行するにつれて FURIN 定量値は低下する傾向にあり、タイプ I とタイプ V の FURIN 定量値間に有意差を認めた ( $p = 0.0262$ )。一方で rs17514846 は冠状動脈の肉眼的な狭窄度や Stary 分類と統計学的な相関関係を認めず、各種剖検データと FURIN 定量値との相関関係においてもいずれも有意差は認めなかった。免疫組織化学的には、心筋細胞、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞、脂肪細胞、マクロファージに FURIN 免疫活性が認められた。以上から、1) FURIN の rs17514846 遺伝子型アレル A はアレル C に比較して、心筋組織における FURIN の発現を増加させること、2) 心臓組織において冠状動脈硬化の進行病変よりも初期病変で FURIN 定量値が高値であることが明らかとなった。

本研究は、法医解剖検体を用いて FURIN の rs17514846 一塩基多型と心筋組織、冠状動脈における発現、冠状動脈硬化症病変性状を比較解析したものであるが、従来行われなかった多数の剖検検体を用いて冠状動脈硬化症の肉眼・組織学的程度分類と FURIN の遺伝子型、心筋・冠状動脈におけるタンパク発現定量結果を系統的に解析し、FURIN 遺伝子型と心筋組織における発現の相関、冠状動脈硬化症病変の程度との関連を明らかにした価値ある集積と認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。