

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08585

研究課題名(和文) ヒト臨床検体を用いた大動脈弁狭窄症の分子機序・血中病態予測マーカーの探索

研究課題名(英文) Investigation of molecular mechanisms and predictive blood biomarkers in aortic valve stenosis using human clinical specimens

研究代表者

青野 潤 (Aono, Jun)

愛媛大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70512169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈弁の硬化・石灰化が原因である大動脈弁狭窄症は重症化すると突然死・急性心不全など致命的転帰をたどる代表的な心臓疾患のひとつである。大動脈弁置換術の際に採取した患者の大動脈弁を石灰化部・非石灰化部(正常部+硬化部)に分割し、治療標的分子や病態予測マーカー候補タンパク質の同定を目指してプロテオミクス解析を行った。その結果、両者で明らかに発現量が異なる約50 kDaの分子量を持つタンパク質分子を新たに発見した。このタンパク質分子は非石灰化組織で高発現するものの石灰化部位では消失することから、大動脈弁狭窄症における抗石灰化療法ならびに疾患バイオマーカーの標的分子となる可能性が強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大動脈弁狭窄症(Aortic stenosis: AS)は心臓から全身に血液を送るための出口にある扉が肥厚し固く石灰化し開かなくなる心臓の重症疾患である。重症化すると突然死・急性心不全など命に関わる急激な転帰をたどる。高齢化の進展に伴い患者数は増加傾向にあるが、有効な治療薬は存在せず手術を実施する他ない。この理由はASの発症・進展の主体である、弁組織の変性と石灰化に関わるメカニズムがわからないことに起因する。ASの発症・進展に関わる分子を発見することで治療戦略の開発に繋げることができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Aortic valve stenosis (AS), which is caused by sclerosis and calcification of the aortic valve, is one of the most common cardiac diseases with fatal outcomes such as sudden death and acute heart failure. We divided aortic valve samples obtained during aortic valve replacement surgery into calcified and non-calcified (normal and sclerotic) lesions. Two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry were performed to identify the candidate molecules for therapeutic targets and predictive markers of AS. Protein molecule with a molecular weight of approximately 50 kDa was newly discovered. This molecule was strongly detected in non-calcified tissues but not in calcified tissues. These results indicate that the discovered molecule may be a potential target for anti-calcification therapy and predictive biomarker of AS.

研究分野：循環器内科学

キーワード：大動脈弁狭窄症 石灰化 網羅解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大動脈弁狭窄症 (Aortic stenosis: AS) の罹患率は、先進国では 65 歳以上で 2-4% と高く、今後もなお増加の一途を辿ると言われている。一般的に AS は加齢による動脈硬化様変化により弁膜の硬化・狭窄を生じることが知られており、長期間無症状で経過する進行性の疾患である。ひとたび症状が出現し、重症化すると突然死・急性心不全などを生じ致死率が非常に高くなり、その根本的治療は心臓弁置換手術しかない。また、AS の進行抑制戦略は動脈硬化危険因子の是正程度で、その治療を施行しても進行を遅らせることは困難であるため、AS の発症・病態進展に関わるメカニズム解明ならびに新規治療標的分子の同定は急務である。近年、AS と動脈硬化性疾患の関連性が数多く指摘されており、AS と動脈硬化病変は脂質沈着、石灰化、炎症細胞浸潤、血管新生など病理学的にも非常に類似した特徴を有することが報告されている。AS の病態解明に動脈硬化の発症機序の理解が重要であると考えられるが、その研究は十分になされておらず、詳細なメカニズムも明らかではない。また AS は動脈硬化の進行抑制に効果的であるスタチン製剤の有効性が乏しい事などから、その病態形成は動脈硬化とは全く別のシグナル伝達経路によっても制御されていることが示唆される。

AS が日本国民の生命を脅かし生活の QOL を著しく障害しているにも関わらず、その発症・進展のメカニズムは明らかでなく進行を抑制する薬物治療も存在しない。加えて 100 万人存在すると言われる潜在患者を見つけるためのバイオマーカーもない。

2. 研究の目的

本研究では以下の二点の目的を達成するため、大動脈弁置換術を施行された AS 患者の臨床検体(手術・血液サンプル)を用いてタンパク質の発現プロファイルを網羅的に解析した。

- 1) AS の病態進行に関わる分子機構解明
- 2) AS 患者血清中の疾患バイオマーカーの同定

3. 研究の方法

大動脈弁置換術の際に採取した患者の大動脈弁を石灰化部・非石灰化部(正常部+硬化部)に分割し保存した(図1)。純粋な AS 発症機序の解明を目指すため、糖尿病、脂質異常症、冠動脈疾患の合併した患者を除外し、2次元電気泳動を施行した。

また同時に、それぞれの組織から単離・培養した弁間質細胞を用いてマイクロアレイにより遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析した。

2次元電気泳動を行い同様の発現パターンを示すターゲットタンパクを選別し、そのタンパク質を識別するため患者大動脈弁で非石灰化部(正常部+硬化部)と石灰化部で発現に差のあるタンパク質を同定するために質量分析を施行した。質量分析については国立大学法人 徳島大学大学院医歯薬学研究部総合研究支援センター 先端医療研究部門と共同で Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いた高精度タンパク質同定解析システムを使用した。加えてプロテオミクス解析によって石灰化組織特異的に発現変動するタンパク質として同定した因子について、さらに定量的に発現差を確認・検証するためにウエスタンブロッティングを施行した。

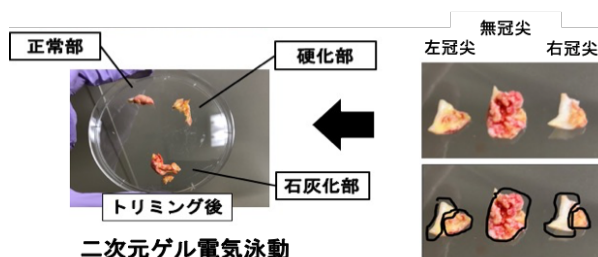


図1 摘出した大動脈弁を正常部、硬化部(黄色調)、石灰化部に分割し、プロテオミクス解析を実施した。

4. 研究成果

大動脈弁置換術の際に採取した患者の大動脈弁を非石灰化部（正常部+硬化部）と石灰化部に分割し、2次元電気泳動を行い両者のタンパク質発現プロファイルを解析した（図2）。その結果、両者で明らかに発現量の異なるタンパク質スポットを発見した。高精度質量分析を用いて同定を試みたところ、分子量約 50 kDa を持つ血漿タンパク質であることが明らかとなった。この 50 kDa タンパク質の分子量は、ゲノム情報をもとにした分子量サイズよりも低値であったため、分泌後に弁組織中において Xa(C 末領域)と候補分子 Xb(N 末領域)の2つのフラグメントに加水分解を受けたものであると推定された。2次元電気泳動法と質量分析装置を用いた解析により、この 50 kDa タンパク質の発現量が石灰化組織及び非石灰化組織において異なることから、その切断効率に大きな差があるものと考えられた。なお、マイクロアレイ解析の結果、非石灰化部位と硬化部位での遺伝子プロファイルにおいて統計学的有意な発現差を持つ遺伝子が見つからなかったため、硬化部での2次元電気泳動は行わず、今回の解析では非石灰化部と石灰化部との比較にフォーカスした。

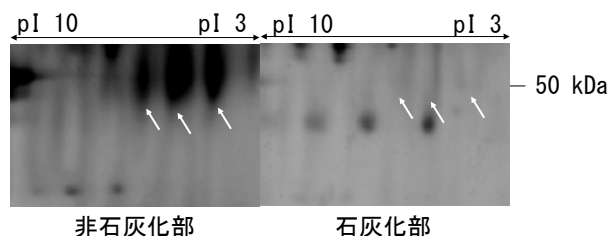


図2 大動脈狭窄弁の非石灰化部と石灰化部で発現量が異なる 50 kDa タンパク質（二次元ゲル電気泳動）。

次に 50 kDa タンパク質がプロテアーゼによる切断産物であるという仮説を証明するために、候補分子 Xa に対する抗体（ポリクローナル抗体）を用いてウエスタンブロッティングを実施した。その結果、予想通り、非石灰化組織由来 lysate 中においては 70 kDa 付近に切断前と思われる intact な分子 X 由来のバンドが検出され、その低分子領域に Xa(C 末領域)に由来するバンドが検出された。一方で、石灰化組織由来 lysate 中には intact form に由来するバンドしか観察されなかったことから、本タンパク質は、健常人では大動脈弁組織中でプロテアーゼ等によってプロセッシングを受けるものの、石灰化組織においてはプロセッシングを受けないことが示唆された。

次に、プロセッシングを受けるタンパク質の切断部位を同定するために、50 kDa の分子サイズを持つスポットに対して、エンドマン分解法による N 末端アミノ酸シーケンス解析を実施した。その結果、50 kDa タンパク質は intact form のタンパク質のリジン残基にて切断されたフラグメントであることが新たに判明し、トリプシン様酵素によるプロセッシングが大動脈弁組織における病態進展に重要であるものと考えられた。

これまでの解析結果をバリデーションするため、N 末端シーケンスの結果をもとに、候補分子 Xa (C 末領域)及び候補分子 Xb (N 末領域)を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いて、6 人の大動脈弁狭窄症由来弁検体を対象に二重蛍光免疫ブロット解析及び免疫組織学的解析を実施した。その結果、切断を受けていない intact な分子 X は非石灰化部（正常部+硬化部）と石灰化部ともに発現を認めた。興味深いことに非石灰化部において候補分子 Xa (C 末領域)と候補分子 Xb (N 末領域)の発現を認めるが、石灰化部ではその発現が認められなかった。これらの結果から石灰化部位では候補分子 X を切断する酵素が発現しないか不活化されており、候補分子 Xa (C 末領域)と候補分子 Xb (N 末領域)の存在を認めない可能性が示唆された。一般的に、AS 病態進展過程に起こる石灰化は、大動脈弁組織において異所性の骨芽細胞分化が重要であると知られている (Kanno et al., Int J Mol Med. 2021)。大動脈弁間質細胞は通常弁間質の恒常性維持にとって重要な役割を果たすが、様々なサイトカイン刺激により骨芽細胞へと分化し、リン酸カルシウムなどを沈着させることで石灰化病変を招くことが知られている。現在は、タンパク質翻訳後にプロセッシングを受けた切断型フォーム Xa 及び Xb に対して、骨芽細胞への分化における役割を明らかにするために、骨芽分化アッセイ系を用いて検討を進めているところである。また、この切断フラグメントの血漿中への分泌が、AS の早期発見のためのバイオマーカーとなる可能性について併せて検討を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Higashi Haruhiko, Nishimura Takashi, Aono Jun, Sakaue Tomohisa, Kurata Mie, Izutani Hironori, Yamaguchi Osamu	4. 巻 14
2. 論文標題 Pathological Evidence of Native Aortic Valve Injury After Impella Support	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circulation: Heart Failure	6. 最初と最後の頁 e007571
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.120.007571	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomohisa Sakaue, Mika Hamaguchi, Jun Aono, Koh-Ichi Nakashiro, Fumiaki Shikata, Natsuki Kawakami, Yusuke Oshima, Mie Kurata, Daisuke Nanba, Junya Masumoto, Osamu Yamaguchi, Shigeki Higashiyama, Hironori Izutani	4. 巻 110
2. 論文標題 Valve Interstitial Cell-Specific Cyclooxygenase-1 Associated With Calcification of Aortic Valves	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann Thorac Surg .	6. 最初と最後の頁 40-49
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.athoracsur.2019.09.085.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 坂上倫久、濱口美香、青野 潤、鹿田文昭、浪口謙治、打田俊司、八杉 巧、東山繁樹、泉谷裕則
2. 発表標題 大動脈弁狭窄症患者由来の石灰化大動脈弁のタンパク質プロファイリング解析
3. 学会等名 第72回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂上倫久、濱口美香、青野 潤、中城公一、倉田美恵、大嶋佑介、東山繁樹、泉谷裕則
2. 発表標題 大動脈弁異所性石灰化の分子メカニズムの解明
3. 学会等名 第4回黒潮カンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂上倫久、濱口美香、青野 潤、中城公一、鹿田文昭、倉田美恵、大嶋佑介、浪口謙治、山口 修、東山繁樹、泉谷裕則
2. 発表標題 網羅的遺伝子発現解析による大動脈弁石灰化機序の解明
3. 学会等名 第49回日本心脈管作動物質学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomohisa Sakaue, Mika Hamaguchi, Jun Aono, Koh-ichi Nakashiro, Fumiaki Shikata, Yusuke Oshima, Mie Kurata, Junya Masumoto, Osamu Yamaguchi, Shigeki Higashiyama, Hironori Izutani
2. 発表標題 Identification of the Master Regulators of Aortic Valve Calcification
3. 学会等名 The 21st international Vascular Biology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂上倫久、濱口美香、青野 潤、中城公一、鹿田文昭、倉田美恵、大嶋佑介、浪口謙治、山口 修、東山繁樹、泉谷裕則
2. 発表標題 大動脈弁狭窄症におけるリソソーム酵素の解析
3. 学会等名 第73回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomohisa Sakaue, Mika Hamaguchi, Kenji Namiguchi, Jun Aono, Hironori Izutani
2. 発表標題 Valve interstitial cells-specific inhibins are novel regulator of osteoblast differentiation in aortic valve
3. 学会等名 STS 58th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	坂上 倫久 (Sakaue Tomohisa) (20709266)	愛媛大学・医学系研究科・講師(特定教員) (16301)	
研究 分担者	濱口 美香 (Hamaguchi Mika) (80815928)	愛媛大学・医学部附属病院・医員 (16301)	
研究 分担者	山口 修 (Yamaguchi Osamu) (90467580)	愛媛大学・医学系研究科・教授 (16301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------