

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K17603

研究課題名（和文）大動脈弁狭窄症における石灰化関連因子の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of calcification-related genes in aortic valve stenosis

研究代表者

濱口 美香（Hamaguchi, Mika）

愛媛大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80815928

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：大動脈弁狭窄症発症の分子機序を解明するため患者由来石灰化大動脈弁の網羅的遺伝子発現解析を実施した。その結果同定したタンパク質（Calcification-induced protein1:CIP1と命名）に着目し、機能的役割を明らかにすることを目的として研究を実施した。CIP1抑制弁間質細胞（VICs）を骨芽細胞分化誘導した結果、CIP1抑制VICsの骨芽細胞分化抑制を確認した。大動脈弁狭窄症モデルでは、CIP1遺伝子欠損マウスの大動脈弁流速の上昇抑制、壁肥厚の軽減を確認した。これらの結果より、CIP1は大動脈弁狭窄症における病態進展に重要な役割を果たすことが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大動脈弁狭窄症は、高齢者において最も頻度の高い心臓弁膜症である。先進国では中等度から重度の大動脈弁狭窄症有病率は年齢とともに増加している。重症化すると突然死や心不全など命に関わる転帰をたどる。唯一の治療法は手術による弁置換術であり、大動脈弁狭窄症の病態の根底にある分子メカニズムが依然として不明であるために標的治療薬の開発が妨げられている。大動脈弁狭窄症発症の分子機序を解明することができれば、今後の新たな治療開発につなげることができると考える。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the molecular mechanisms of aortic valve stenosis, we analyzed the mRNA expression patterns of valve interstitial cells(VICs) isolated from Calcific aortic valve stenosis(CAVS) donors using a gene microarray. As a results, we identified a secretory protein (we named Calcification-induced protein1:CIP1). We aimed to clarify the functional roles of CIP1 in CAVS progression. In vitro, CIP1-depleted VICs suppressed differentiation into osteoblasts. Furthermore, CIP1 depletion in the murine CAVS model improved aortic valve dysfunction with high peak velocity and valve thickening. These results strongly suggest that CIP1 plays an important role in the pathogenesis of aortic stenosis.

研究分野：循環器内科

キーワード：大動脈弁狭窄症 石灰化 弁間質細胞 モデルマウス 骨芽細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大動脈弁狭窄症は、高齢者に最も多くみられる心臓弁膜症の一つである。先進国では中等度から重度の大動脈弁狭窄症有病率は年齢とともに増加し、45～55歳の0.1%から75歳以上では2.8%に達することが知られている。現在の高度大動脈弁狭窄症に対する唯一の治療法は、外科的大動脈弁置換術や経カテーテル的大動脈弁植え込み術である。しかしながら、依然として有効な薬物治療は開発されておらず、その背景には大動脈弁狭窄症の発症メカニズムが依然として不明であることが大きな問題となっている。

そこで、我々は大動脈弁狭窄症発症のメカニズムを明らかにするため、大動脈弁間質で起こる石灰化に着目した。外科的に切除した大動脈弁に対して、石灰化と非石灰化組織のそれぞれの組織より、大動脈弁間質に局在する大動脈弁間質細胞を単離培養し、石灰化組織特異的に発現亢進がみられる遺伝子を網羅的に探索した。その結果、カルシウム・リン代謝の調節機能を有する一つの分泌タンパク質 (Calcification-induced protein1:CIP1 と命名した) の同定に成功した。本タンパク質は、弁石灰化部周辺に浸潤する間質細胞に高発現すること、弁間質細胞の骨芽細胞分化依存的に細胞外に分泌されることから、薬物による大動脈弁狭窄症治療標的あるいは早期発見のバイオマーカーとして有望である。しかし、CIP1 を介した大動脈弁組織の石灰化メカニズムは不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大動脈弁狭窄症の発症・進展における CIP1 の役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

1. ヒト大動脈弁から採取した弁間質細胞を用いた検討 (*in vitro*)

大動脈弁狭窄症に対して大動脈弁置換術を実施した患者検体から弁間質細胞 (valve interstitial cells : VICs) を培養した。次に CIP1 遺伝子発現を抑制する siRNA をデザインし、それらを VICs へのトランスフェクションすることで、CIP1 が発現抑制された VICs を作製した。トランスフェクション後 21 日間、骨芽細胞分化培地で VICs を培養した。その後、VICs を回収し、cell lysate 中の骨芽細胞マーカーである Runx2-related transcription factor 2 (RUNX2) の遺伝子レベル及びタンパク質レベルでの発現量をリアルタイム PCR 法及びウエスタンブロット法により評価した。

2. 大動脈弁狭窄症モデルマウスを用いた検討 (*in vivo*)

生後 8～10 週齢マウスに、0.36 mm のワイヤーを右頸動脈から左心室に挿入し、左心室内でのワイヤーの出し入れ、大動脈弁上でのワイヤー回転による機械的刺激により大動脈弁内皮細胞を傷害する大動脈弁狭窄症モデルマウスを作製した。手技はエコーガイド下で行い、大動脈弁傷害後にワイヤーを抜去し、右頸動脈を結紮した。このモデルは、活性酸素や炎症性サイトカイン、骨軟骨形成因子の発現が誘因となり、大動脈弁の肥厚が進行することで、大動脈弁狭窄を発症することが報告されている (Honda S, et al. *ATVB* 2014)。上記の大動脈弁狭窄症モデルを、野生型マウス、CIP1 遺伝子欠損マウスに対して施行し、大動脈弁狭窄症の重症度について

定量的に評価した。術後 16 週の時点で、大動脈弁狭窄症の重症度の指標として、エコーでの大動脈弁最大血流速度の評価、及び組織学的な大動脈弁の肥厚の程度を両群間で比較した。

4. 研究成果

CIP1 発現抑制による骨芽細胞マーカー遺伝子の定量解析結果

CIP1 を siRNA によって発現抑制した VICs に対して、21 日間骨芽細胞分化培地で培養した後、total RNA 及びタンパク質を抽出し、mRNA レベル及びタンパク質レベルでの RUNX2 の発現量を定量的に評価した。その結果、RUNX2 の遺伝子発現レベル、タンパク質発現レベルのどちらにおいてもコントロール群と比較して CIP1 抑制 VICs 群では RUNX2 の発現が抑制されていることがわかった。この RUNX2 の発現抑制は、本実験に用いた二種類の siRNA とともに同様の phenotype を示し、さらに RUNX2 の発現レベルは、CIP1 の発現抑制レベルと相関性があった。つまり、VICs を起源とした骨芽細胞への分化転換を制御する細胞内シグナルには CIP1 の機能が必須であることが示唆された。

病態モデルマウスを用いた大動脈弁狭窄症発症における CIP1 の機能的解析

野生型マウス、CIP1 遺伝子欠損マウスに対してワイヤー傷害性大動脈弁狭窄症モデルを作製し、術後 16 週での大動脈弁狭窄症の重症度について定量評価した。エコーを用いて大動脈弁最大血流速度を評価したところ、野生型マウスと比較し CIP1 遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスで認められる大動脈弁流速の上昇が有意に抑制されていることがわかった。

CIP1 欠損マウス由来大動脈弁に対する組織学的解析結果

CIP1 遺伝子欠損マウスに対して、von Kossa 染色にて石灰化について評価したところ、CIP1 遺伝子欠損マウスにおいて野生型に比べて有意に石灰化が抑制されていた。また、ヘマトキシリンエオジン染色を用いて大動脈弁組織構造について評価したところ、野生型マウスと比較し CIP1 遺伝子欠損マウスでは弁肥厚が有意に抑制され、さらには大動脈弁間質細胞の増殖も有意に抑制されていることが確認された。

以上の結果から、大動脈弁の病態進行に伴って発現上昇する CIP1 は、VICs の骨芽細胞への分化や大動脈弁間質細胞の増殖を正に制御し、大動脈弁狭窄症の病態進展に重要な役割を果たすことが強く示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------