

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21632

研究課題名（和文）大動脈弁における異所性骨芽細胞分化を司る新規脂質代謝シグナルネットワークの解析

研究課題名（英文）Novel lipid metabolic signaling regulating ectopic osteoblast differentiation in the aortic valve.

研究代表者

泉谷 裕則（Izutani, Hironori）

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90419200

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：大動脈弁狭窄症（AS: Aortic Valve Stenosis）は、大動脈弁に石灰化や線維化が生じることにより、大動脈弁を通過する血流量が制限される病態である。しかし、大動脈弁組織で石灰化が起こるメカニズムは未解明であり、その石灰化機序の解明はASに対する薬物治療法の開発において重要である。本研究では、プロスタグランジン代謝酵素やその代謝産物に着目し、組織石灰化に重要である骨芽細胞への分化におけるこれらの分子の役割を明らかにすることを旨とし、研究を行なった。その結果、これまで報告のないリン脂質を出発点とした新規のプロスタグランジン代謝酵素が骨芽細胞分化誘導に重要であることを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大動脈弁組織において大動脈弁間質細胞から骨芽細胞へと分化する細胞内シグナルの鍵分子として同定されたプロスタグランジン代謝酵素やその代謝産物は、AS進行を抑制する新しい薬剤の標的分子として有用である可能性がある。今回の成果はin vitro実験系やヒト大動脈弁組織を用いた研究成果ではあるため、臨床への応用のためには、ヒト病態を再現するモデル動物を用いた検証実験が必要不可欠ではあるが、今回得られた研究成果はASの新規薬物治療法開発のための今後の研究に生かされるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Aortic valve stenosis (AS) is a common heart valve disease characterized by calcification and fibrosis of the valve. The mechanism underlying calcification in aortic valve tissue is not yet understood, and elucidating this mechanism is crucial for developing drug therapies for AS. In this study, we focused on prostaglandin-metabolizing enzymes and their metabolites, aiming to clarify the role of these molecules in the differentiation into osteoblasts, which are important for tissue calcification. As a result, we found that a novel prostaglandin-metabolizing enzyme plays a significant role in inducing osteoblast differentiation.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：大動脈弁狭窄症 石灰化 骨芽細胞 プロスタグランジン

1. 研究開始当初の背景

大動脈弁狭窄症 (AS; Aortic Valve Stenosis) は、大動脈弁に石灰化や線維化が生じることにより、大動脈弁を通過する血流量が制限される病態である。AS の唯一の治療法としては、外科的手術による弁置換術や、生体弁などの人工弁をカテーテルで留置する TAVI (Transcatheter Aortic Valve Implantation) が知られている。しかし、大動脈弁組織で石灰化が起こるメカニズムは未解明であり、その石灰化機序の解明は AS に対する薬物治療法の開発において重要である。

大動脈弁組織における石灰化には、大動脈弁間質細胞を起源とする異所性骨芽細胞分化が関与するとの報告があり、その骨芽細胞への分化シグナルの特定とその阻害剤の開発が新規 AS 治療法として期待されている。これまで我々は、大動脈弁置換術で得られる石灰化大動脈弁組織から弁間質細胞を単離・培養し、網羅的遺伝子発現解析により、石灰化大動脈弁組織周囲に浸潤する弁間質細胞特異的に高発現する分子、PTGS1 (Prostaglandin-endoperoxide synthase 1) を同定した。PTGS1 は、細胞膜を構成するリン脂質を原料としてアラキドン酸から様々なプロスタノイドを生合成する中心的役割を果たすことが知られており、大動脈弁石灰化機構の一端には、骨芽細胞分化シグナルとプロスタノイドを介した脂質代謝シグナル経路のシグナルクロストークが関与することが強く示唆された。しかし、骨芽細胞分化を司る PTGS1 の下流シグナル、またはそのシグナルと骨芽細胞分化シグナルのクロストークについては未だ分かっていない。

2. 研究の目的

本研究では、プロスタグランジン代謝酵素やその代謝産物に着目し、骨芽細胞への分化や組織石灰化におけるこれらの分子の役割を明らかにすることを目指した挑戦的研究である。

3. 研究の方法

培養大動脈弁間質細胞 (VIC) は大動脈弁置換術によって得られる大動脈弁を用いて単離されたものを用いた。VIC については、コラゲナーゼ処理によって酵素消化させた大動脈弁組織から単離したシングルセル VIC を 2%O₂ 低酸素インキュベーターによって 4 週間培養・増殖された細胞を用いた。VIC 培養は、骨芽細胞分化培地である Osteoblast-Inducer Reagent (for animal cell) (タカラバイオ株式会社製) あるいは骨芽細胞分化培地 (ケー・エー・シー社製) を用いた。また、骨芽分化に関わる脂質代謝分子のスクリーニングにおいては、ケー・エー・シー社製のヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞をモデルとして用い、脂質代謝産物は質量分析により定量した (VIC を用いた骨芽細胞分化アッセイ系は不安定な系であったため)。また、骨芽分化における脂質代謝酵素の機能的役割については siRNA を用いた RNA 干渉法により実施した。スクリーニングによって明らかにした脂質代謝酵素の局在については免疫組織染色法 (3,3' Diaminobenzidine 法) を用いた。

4. 研究成果

骨芽細胞分化に伴って産生されるプロスタノイドのスクリーニング結果

これまでの先行研究から、大動脈弁間質細胞は骨芽細胞のみならず脂肪細胞などにも分化できる特性を持っており、間葉系幹細胞としての特徴を併せ持つことが知られている (Chen JH et al., Am J Pathol. 2009 Mar;174(3):1109-19.)。このように、間葉系幹細胞を起源とした骨芽細胞分化過程において過剰発現するプロスタノイドを網羅的に明らかにするために、骨芽細胞へ分化誘導させた際の培養上清と、骨芽細胞分化誘導培地非添加群 (コントロール対照実験) の培養上清とを用いて各種プロスタノイドの定量解析を実施した。50 種類を超える脂質メディエーターの定量解析を実施した結果、アラキドン酸の下流に位置する多くの脂質代謝物質が、骨芽細胞分化刺激によって発現上昇することを発見した。特にプロスタグランジン E についてはコントロールに比べて 20 倍以上の発現亢進が認められていた。プロスタグランジン E は骨芽細胞への分化に重要であることはよく知られていることから、既報の骨芽細胞分化誘導脂質分子のみならず新規脂質メディエーターの特定にも成功した。

骨芽細胞分化に伴って産生されるプロスタノイドの PTGS1 シグナル依存性評価

骨芽細胞への分化誘導時に産生亢進したプロスタノイドが PTGS1 を介したシグナルに関与するかどうかを明らかにするために、PTGS1 に対する siRNA を用いて発現抑制させ、その代謝産

物の産生量を定量評価した。その結果、PTGS1 の発現抑制に伴って産生抑制されるプロスタノイドと発現亢進するプロスタノイド、さらに変化が認められないプロスタノイドに分類されることがわかった。このことは、骨芽細胞分化に伴って PTGS1 シグナルを介するものと介さないシグナル経路があることを強く示唆する結果となった。

骨芽細胞分化に伴って産生されるプロスタノイドの骨芽細胞分化における役割

これまでの骨芽細胞分化実験から、プロスタノイド代謝マップが作成できたため、骨芽分化刺激に伴って産生亢進するプロスタノイドを合成する代謝酵素に対する siRNA を用いて、その代謝酵素の機能的役割を明らかにするとともに、プロスタノイドそのものを培地中に添加することで、骨芽細胞分化誘導の活性についてアリザリンレッド染色法を用いて定量化した。その結果、PGH2 の下流に位置する二種のプロスタノイドに強い骨芽細胞分化誘導活性があることを突き止めた。この結果は、プロスタグランジン代謝シグナルと骨芽細胞分化誘導シグナルとのクロストークを強く示唆するものである。現在このプロスタノイドの役割と、そのプロスタノイドを代謝する酵素の機能的役割について AS モデルマウスを用いて *in vivo* での検証実験を継続している。

骨芽細胞への分化誘導を促進するプロスタノイド代謝酵素のヒト大動脈弁における局在

これまでのスクリーニングで明らかにしてきたプロスタノイド代謝酵素について、その発現量及び、石灰化大動脈弁組織における局在について、免疫組織染色法を用いて確認した。その結果、石灰化大動脈弁組織の石灰化組織周辺の間質細胞において同定した二種の代謝酵素の有意な発現亢進が認められた。

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 1件）

1. 著者名 Kanno Kaho, Sakaue Tomohisa, Hamaguchi Mika, Namiguchi Kenji, Nanba Daisuke, Aono Jun, Kurata Mie, Masumoto Junya, Higashiyama Shigeki, Izutani Hironori	4. 巻 22
2. 論文標題 Hypoxic Culture Maintains Cell Growth of the Primary Human Valve Interstitial Cells with Stemness	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10534 ~ 10534
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms221910534	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sakaue Tomohisa, Hamaguchi Mika, Aono Jun, Nakashiro Koh-ichi, Shikata Fumiaki, Kawakami Natsuki, Oshima Yusuke, Kurata Mie, Nanba Daisuke, Masumoto Junya, Yamaguchi Osamu, Higashiyama Shigeki, Izutani Hironori	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 The Annals of Thoracic Surgery	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

愛媛大学 医学部 心臓血管呼吸器外科学HP https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/surgery2/
--

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)	

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