

令和元年6月19日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10449

研究課題名(和文)石灰化大動脈弁狭窄症 - 発症のトリガーとなる細胞の同定と石灰化機構の解明

研究課題名(英文) Calcific aortic stenosis: Identification of calcification-inducing cell, clarifying calcification signaling

研究代表者

瀬谷 和彦 (Seya, Kazuhiko)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：40281919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、大動脈弁から得た間質細胞(HAVICs)の多くが間葉系未分化細胞であることを確認した。これらは造血幹細胞マーカー、CD34陽性及び陰性細胞に分けられ、陰性細胞が石灰化刺激に高感受性であった。両細胞間の遺伝子発現をDNAマイクロアレイにより解析し、細胞外マトリックスタンパク質の一つ、テネイシンX(TNX)の発現低下がHAVICs石灰化に寄与する可能性を見出した。一方、骨形成タンパク質2拮抗薬、マトリックスGlaタンパク質(MGP)のノックダウンがHAVICs自発石灰化を誘発した。以上の結果は、TNXやMGPの発現低下細胞が、大動脈弁石灰化の原因細胞となりうる可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

・本研究の学術的意義は、異所性石灰化について動脈硬化以外の要因を調べることであり、そのために弁内に存在する未分化細胞に着目して石灰化の原因細胞を明らかにするところにある。
 ・異所性石灰化機構の解明は、石灰化大動脈弁狭窄症の病態基盤を構築し、石灰化シグナリング機構を抑制する活性物質を礎とした新規薬物治療薬の開発に応用できると共に、高齢者の健康寿命向上に寄与することができることに社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Initially, it was confirmed that many of aortic valve interstitial cells (HAVICs) obtained from the aortic valve had characteristics as mesenchymal undifferentiated cells (CD73, 90, 105 (+) / CD45 (-) cells). When hematopoietic stem cell markers, CD34 positive and negative cells were separated from these cells, it was found that CD34 negative cells were sensitive to various calcification stimulations. Microarray analysis of gene expression between CD34 negative and positive cells indicated that low expression of tenascin X (TNX) gene, one of the extracellular matrix proteins, may contribute to the calcification of HAVICs. On the other hand, we confirmed that knockdown of matrix Gla protein (MGP) which is a bone morphogenetic protein 2 antagonist induced spontaneous calcification of HAVICs. These results suggest that knockdown cells of extracellular matrix proteins, TNX and/or MGP, may become calcification-inducing cells in aortic valve.

研究分野：循環器薬理学

キーワード：大動脈弁狭窄症 異所性石灰化 大動脈弁間質細胞 マトリックスGlaタンパク質 テネイシンX

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

A. 臨床的背景

- ・本邦における大動脈弁狭窄症の手術数年間 8,346 件のうち、弁置換術が 8,109 件を占める。
- ・弁置換後、在院死亡率が 2.7% と高侵襲性であり、術後約 10 年で再置換が必要となる。
- ・弁置換術の適応とならずに心不全に至る患者が約 3 割存在する (Lung et al., Eur Heart J. 2005)。

B. 大動脈弁異所性石灰化機構に関する研究

(1) 動脈硬化原因説

- ・異所性石灰化は、動脈硬化による白血球のサイトカイン放出を介した線維芽細胞の骨芽細胞への分化誘導で起こるとされている (Mohler, Am J Cardiol. 2004)。
- ・しかし、動脈硬化所見が認められない患者が約 5 割存在する (Miller et al., Circ Res. 2011)。

(2) 外来性未分化細胞原因説

- ・未分化細胞が大動脈弁異所性石灰化のトリガーとなる可能性が、以下の通り指摘されたが、これらが石灰化を誘発したとする報告はない。

a. ブタ大動脈弁局在の間葉系前駆細胞による骨芽細胞様細胞への分化 (Chen et al., Am J Pathol. 2009)

b. CD45 (白血球マーカー) や CD34 (造血幹細胞マーカー) 陽性循環的骨形成性前駆細胞の大動脈弁への侵入 (Suda et al., Stem Cells. 2009, Gössl et al., J Am Coll Cardiol. 2012)

C. 石灰化大動脈弁狭窄症の薬物治療に関する研究

- ・異所性石灰化が非可逆性のため、本疾患の薬物治療は不可能と考えられている。
- ・異所性石灰化抑制薬としてコレステロール合成阻害薬 (スタチン) が提案されたが、臨床試験で有効性が認められなかった (Goldberg et al., J Am Coll Cardiol. 2007)。
- ・近年、matrix Gla protein による骨形成タンパク質 (BMP2) 活性阻害など異所性石灰化を抑制する生理機構の存在が報告された (Rajamannan et al., Circ Res. 2011)。

以上の背景から、保存的薬物治療法の開発が喫緊の課題であり、そのためには大動脈弁異所性石灰化の原因細胞を同定して治療への可能性を見出していく必要があると考えた。

2. 研究の目的

- ・大動脈弁間質細胞から、異所性石灰化の引き金となる原因細胞を同定し、その分子機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) 使用試料

- ・弘前大学医学部倫理委員会の了承の下、十分なインフォームドコンセントが得られた患者を対象とし、弁置換術施行の大動脈弁狭窄症患者より石灰化弁の提供を受けた (11 例)。正常大動脈弁切片は大動脈弁閉鎖不全症等患者より非石灰化弁の提供を受けた (3 例)。
- ・弁切片は、酵素処理により単離培養し、ヒト大動脈弁間質細胞 (HAVICs) とした。
- ・間葉系未分化細胞 (CD73, 90, 105 (+)/45 (-) 細胞) は、HAVICs の蛍光活性化セルソーティング (FACS) を用いた細胞選別により得た。
- ・CD34 陽性及び陰性細胞は、CD73, 90, 105 (+)/45 (-) 細胞を、再度 FACS を用いた細胞選別に付すことにより得た。

(2) CD34 陽性と陰性細胞間の遺伝子発現解析

- ・両細胞間の遺伝子発現差は、トータル RNA を用いた DNA マイクロアレイにより網羅的に解析した。DNA 解析プラットフォームは SurePrint G3 Human Gene Expression (Agilent 社) を用いた。

(3) HAVICs や間葉系未分化細胞の石灰化誘発

- ・腫瘍壊死因子 (TNF- α , 30 ng/mL) 添加、またはリン酸添加 (high Pi, 培地内濃度 3.2 mM) 後、3~4 日おきに培地交換し、7~14 日間継続培養した。
- ・石灰化に影響を与える各種試薬は、石灰化条件設定の 1 時間前に投与した。

(4) HAVICs への遺伝子導入

- ・ノックダウンのために各種 siRNA、過剰発現のために各種遺伝子タグした plasmid DNA (サイトメガロウイルス) を用いた。トランスフェクション試薬として、前者は MultiFectam、後者は Turbofectin 8.0 を用いた。

(5) 主な測定

- ・石灰化検出: Alizarin Red S 試薬を用いて検出した。

- ・ 遺伝子発現：real-time PCR 法を用いた。
- ・ タンパク質発現：Western blot による免疫蛍光染色により定量した。

4. 研究成果

(1) 摘出大動脈弁から得た間質細胞 (HAVICs) の多くが間葉系未分化細胞としての特徴を持ち (CD73, 90, 105 (+)/CD45(-)細胞) この細胞が造血幹細胞マーカーである CD34 陽性と陰性に細胞に分けられることを見出した。さらに、AS 患者石灰化弁から得た CD73, 90, 105 (+)/CD45(-)細胞が非石灰化弁と比較して CD34 陰性細胞を多く含むこと、CD34 陰性細胞が陽性細胞と比較して石灰化刺激 (高リン酸、TNF- α) に感受性が高いことを明らかにした。

(2) 石灰化原因遺伝子を明らかにするため、CD34 陽陰性細胞間で発現に差のある遺伝子を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析したところ、CD34 陰性細胞で骨吸収を調整するタンパク質、Wnt5a や脳性ナトリウム利尿ペプチド、BNP が高発現し、一方 CD34 陽性細胞では平滑筋転写因子、GATA5 や細胞外マトリックスタンパク質の一つ、テネイシン X の転写因子、TNXB が高発現していることを見出した。

(3) CD34 陽陰性細胞で発現に差のある遺伝子について、石灰化刺激に対する反応の検討を試みた。しかし、FACS による細胞選別後、細胞のバイアビリティ低下が著しく、継続培養が困難であった。そこで、HAVICs で代用しながら実験を継続した。現在も磁器ビーズや分離ビーズを用いた細胞選別の試みを続けている。

(4) HAVICs を用いて、TNF- α や高リン酸による石灰化刺激に対する候補タンパク質の遺伝子発現を調べたところ、テネイシン X 遺伝子の著しい発現低下を認められた。一方、他の候補タンパク質については発現変化を認めなかった。AS 患者でテネイシン X 遺伝子発現が低下しているとする報告もあり、上記結果を合わせてテネイシン X が大動脈弁石灰化の原因タンパク質である可能性が示唆された。

(5) 一方、AS 患者由来 HAVICs の TNF- α 誘発性石灰化時に、マトリックス Gla タンパク質 (MGP) が著しく発現低下することを見出した。そこで、MGP 遺伝子を組み込んだベクターを導入し過剰発現させたところ、TNF- α による HAVICs 石灰化が著しく抑制された (図 1)。さらに、MGP siRNA を導入してノックダウンさせたところ、HAVICs が自発的に石灰化することを確認した (図 2)。以上の結果から、MGP や TNX が大動脈弁石灰化の原因タンパク質である可能性が示唆された。

(6) MGP は骨形成タンパク質 2 (BMP2) アンタゴニストであり、石灰化抑制作用が知られているが、TNX とは異なり、CD34 陽陰性細胞間の遺伝子発現解析では差を認めなかった。現在、TNX が MGP の場合と同様の挙動を示すのかどうかについて検証を行っている。

(7) 以上の結果は、細胞外マトリックスタンパク質、TNX や MGP の発現が低下している細胞が大動脈弁狭窄症における石灰化進行の原因細胞となり得る可能性を強く示唆している。今後は、細胞や組織レベルで MGP や TNX の発現低下による石灰化誘発の分子機構や病態生理学的意義を明らかにすることで、原因細胞の特定につなげていく。

(8) 本研究の一環として HAVICs 異所性石灰化を抑制する生理活性物質の探索も行い、強心作用が知られている呉茱萸成分、1-methyl-2-undecyl-4(1H)-quinolone に高リン酸誘発性 HAVICs 石灰化を濃度依存性に抑制する作用を認めた。

(9) さらに、長期服用で大動脈弁石灰化を起こしやすいことが知られている経口抗凝固薬ワルファリンが、プレグナン X 受容体を介して BMP2 発現を亢進することによって石

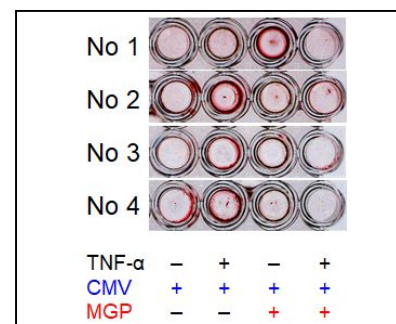


図 1: TNF- α 誘発性 HAVICs 石灰化における MGP 過剰発現の影響 (Alizarin Red S 染色像)

サイトメガロウイルス (CMV) 導入のみでは、TNF- α は著しい石灰化を示したが (左から 2 列目) MGP 遺伝子を導入して過剰発現させると石灰化が著しく抑制された (左から 4 列目)

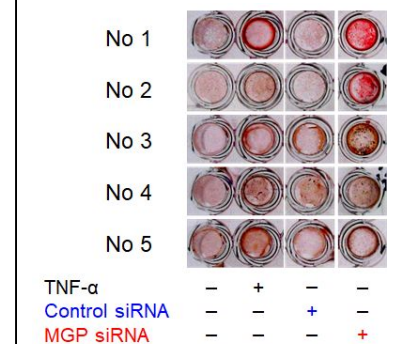


図 2: HAVICs 石灰化の MGP ノックダウンによる影響 (Alizarin Red S 染色像)

TNF- α (30 ng/mL) は HAVICs 石灰化を誘発したが (左から 2 列目) MGP を siRNA でノックダウンすると TNF- α 無処理でも HAVICs の自発石灰化が起こった (左から 4 列目)

灰化を誘発する分子機構を明らかにした。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. Zaiqiang Yu, Kazuhiko Seya, Mari Chiyoya, Kazuyuki Daitoku, Shigeru Motomura, Tadaatsu Imaizumi, Ikuo Fukuda, Ken-Ichi Furukawa. Warfarin calcifies human aortic valve interstitial cells at high phosphate conditions via pregnane X receptor. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 査読あり, in press (2019).
2. Qiang Liua, Tadaatsu Imaizumi, Tomomi Aizawa, Koji Hirono, Shogo Kawaguchi, Shojiro Watanabe, Koji Tsugawa, Tomoh Matsumiya, Kazuhiko Seya, Hidemi Yoshida, Hiroshi Tanaka. Cytosolic Sensors of Viral RNA Are Involved in the Production of Interleukin-6 via Toll-Like Receptor 3 Signaling in Human Glomerular Endothelial Cells. *Kidney Blood Press Res*. 査読あり, 44:62–71 (2019).
3. Tadaatsu Imaizumi, Naoko Sassa, Shogo Kawaguchi, Tomoh Matsumiya, Hidemi Yoshida, Kazuhiko Seya, Toshihiro Shiratori, Koji Hirono, Hiroshi Tanaka. Interferon-stimulated gene 60 (ISG60) constitutes a negative feedback loop in the downstream of TLR3 signaling in hCMEC/D3 cells. *J Neuroimmunol*. 査読あり, 324:16-21 (2018).
4. Hidemi Yoshida, Tadaatsu Imaizumi, Tomoh Matsumiya, Kazuhiko Seya, Shogo Kawaguchi, and Hiroshi Tanaka. Gnetin C suppresses double-stranded RNA-induced C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2) and CCL5 production by inhibiting Toll-like receptor 3 signaling pathway. *Biomedical Research (Tokyo)*. 査読あり, 39: 231–240 (2018).
5. Syota Seino, Takeru Kimoto, Hidemi Yoshida, Kunikazu Tanji, Tomoh Matsumiya, Ryo Hayakari, Kazuhiko Seya, Shogo Kawaguchi, Kazushi Tsuruga, Hiroshi Tanaka, and Tadaatsu Imaizumi. Gnetin C, a resveratrol dimer, reduces amyloid- β 1–42 (A β 42) production and ameliorates A β 42-lowered cell viability in cultured SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Biomedical Research (Tokyo)*. 査読あり, 39: 105–115 (2018).
6. Mari Chiyoya, Kazuhiko Seya, Zaiqiang Yu, Kazuyuki Daitoku, Shigeru Motomura, Tadaatsu Imaizumi, Ikuo Fukuda, Ken-Ichi Furukawa. Matrix Gla protein negatively regulates calcification of human aortic valve interstitial cells isolated from calcified aortic valves. *J Pharmacol Sci*. 査読あり, 136: 257-265 (2018).
7. Akine Arai, Hidemi Yoshida, Ryo Hayakari, Tomoh Matsumiya, Shogo Kawaguchi, Kazuhiko Seya, Hiroshi Tanaka, Tadaatsu Imaizumi. Expression of CCL5 is induced by polyinosinic-polycytidylic acid in cultured hCMEC/D3 human brain microvascular endothelial cells. *Clin Exp Neuroimmunol*. 査読あり, 8: 331–340 (2017).
8. Hidetomo Niwa, Ken-Ichi Furukawa, Kazuhiko Seya, and Kazuyoshi Hirota. Ketamine suppresses the proliferation of rat C6 glioma cells. *Oncology Lett*. 査読あり, 14: 4911-4917 (2017)
9. Kazuhiko Seya, Shigeru Motomura, Tadaatsu Imaizumi, Ken-Ichi Furukawa. Simultaneous measurement of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate and guanosine 3',5'-cyclic monophosphate in biological samples. *Hirosaki Med J*. 査読あり, 68: 52-61 (2017).
10. Yoshiki Ogata, Manabu Yonekura, Rouichi Yamaki, Chong Han, Tomonori Fujisawa, Kazuhiko Seya, Hidetoshi Niwa, Tetsuya Kushikata, Tadaatsu Imaizumi, Kazuyoshi Hirota, Hirofumi Tomita, and Manabu Murakami. Effects of enflurane on cardiac autonomic nervous activity in mice. *Hirosaki Med J*. 査読あり, 67:153-157 (2017).
11. Kazuhiko Seya, Ken-Ichi Furukawa, Mari Chiyoya, Zaiqiang Yu, Haruhisa Kikuchi, Kazuyuki Daitoku, Shigeru Motomura, Manabu Murakami, Yoshiteru Oshima, Ikuo Fukuda. 1-Methyl-2-undecyl-4(1H)-quinolone, a derivative of quinolone alkaloid evocarpine, attenuates high phosphate-induced calcification of human aortic valve interstitial cells by inhibiting phosphate cotransporter PiT-1. *J Pharmacol Sci*. 査読あり, 131: 51-57 (2016).

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 瀬谷 和彦、于 在強、千代谷 真理、大徳 和之、元村 成、今泉 忠淳、福田 幾夫、

古川 賢一、大動脈弁狭窄症患者から得た大動脈弁間質細胞の石灰化に対するマトリックス Gla タンパク質の抑制作用、日本薬学会第 139 年会、2019.

2. Kazuhiko Seya, Zaiqiang Yu, Mari Chiyoya, Wei Yang, Kazuyuki Daitoku, Shigeru Motomura, Tadaatsu Imaizumi, Ikuo Fukuda, Ken-Ichi Furukawa, Matrix Gla protein negatively regulates calcification of human aortic valve interstitial cells isolated from calcified aortic valves、第 92 回日本薬理学会、2019.
3. 瀬谷 和彦、于 在強、楊 薇、大徳 和之、元村 成、今泉 忠淳、福田 幾夫、古川 賢二、大動脈弁狭窄症患者から得た大動脈弁間質細胞の高リン酸による石灰化誘発に対する 1-methyl-2-undecyl-4(1H)-quinolone の抑制作用、第 48 回日本心脈管作動物質学会、2019.
4. Kazuhiko Seya, Zaiqiang Yu, Mari Chiyoya, Kazuyuki Daitoku, Shigeru Motomura, Tadaatsu Imaizumi, Ikuo Fukuda, Ken-Ichi Furukawa, TNF- α -induces calcification of cultured human aortic valve interstitial cells obtained from patients with calcific aortic stenosis: involvement of BMP2., 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, 2018.
5. 瀬谷 和彦、于 在強、千代谷 真理、大徳 和之、元村 成、今泉 忠淳、福田 幾夫、古川 賢二、石灰化大動脈弁狭窄症患者由来の大動脈弁間質細胞における TNF- 誘発性異所性石灰化機序の解明、日本薬学会第 138 年会、2018.
6. Kazuhiko Seya, Zaiqiang Yu, Kazuyuki Daitoku, Shigeru Motomura, Tadaatsu Imaizumi, Ikuo Fukuda, Ken-Ichi Furukawa, Human aortic valve interstitial cells obtained from patients with calcific aortic stenosis have high sensitivity to TNF- α resulting in ectopic calcification., 2018 ISHR-JPN Section Meeting, 2017.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：古川 賢一

ローマ字氏名：Ken-Ichi Furukawa

所属研究機関名：弘前大学

部局名：医学研究科

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：20165468

(2)研究分担者

研究分担者氏名：福田 幾夫

ローマ字氏名：Ikuo Fukuda

所属研究機関名：弘前大学

部局名：医学研究科

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：50344594

(3)研究分担者

研究分担者氏名：大徳 和之

ローマ字氏名：Kazuyuki Daitoku

所属研究機関名：弘前大学

部局名：医学部附属病院

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：50374822

(4)研究分担者

研究分担者氏名：村上 学

ローマ字氏名：Manabu Murakami

所属研究機関名：弘前大学

部局名：医学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：80302090

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、研究者個人に帰属されます。