

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10619

研究課題名(和文)大動脈弁石灰化モデル動物を用いた石灰化抑制機序の解明と治療法の確立

研究課題名(英文)To investigate mechanism of aortic valve calcification and to establish medical agents for aortic valve stenosis

研究代表者

大徳 和之(Daitoku, Kazuyuki)

弘前大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：50374822

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)：同意を得て、大動脈弁狭窄症患者から手術時に摘出した大動脈弁より抽出した大動脈弁間質細胞を用いた一連の研究を行った。マトリックスGla蛋白(MGP)について検討した。MGPはビタミンK依存性蛋白であり、異所性石灰化抑制因子である。血管における石灰化を抑制することはすでに報告されているが、HAVICsにおける石灰化抑制効果については報告されていなかった。研究結果ではMGPが増加すると異所性石灰化を効果的に抑制することが示唆された。同じ実験系を用いて、高リン酸条件下におけるHAVICsではワルファリンおよびメナキノン4(ビタミンV2)はプレグナンX受容体を介して石灰化を誘導することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大動脈弁狭窄症における大動脈弁石灰化はBMP2-Smad4-Runx2-Dlx5の経路が関与していることを示した。同様にワルファリンやメナキノン4(ビタミンV2)はPXR-BMP2-ALPは石灰化を誘発することを示すことができ、分子生物学的機序の解明の一助になったと思われる。これらの機序から分子標的薬を創薬することで大動脈弁石灰化を抑制することが可能となれば、大動脈弁狭窄症に対する薬物治療を確立することができ、患者は侵襲の高い手術を受けることなく治療を受けることが可能となる。

研究成果の概要(英文)：Human aortic valves were obtained from patients with calcific aortic valve stenosis (CAS group) and patients with aortic dissection or aortic regurgitation (Non-CAS group) who underwent aortic valve replacement. All patients gave written informed consent, and the study was approved by the Institutional Review Board of the Hirosaki University Hospital. Human aortic valve interstitial cells (HAVICs) were isolated by collagenase digestion. The cells were cultured in -MEM containing 10 % FBS, and fourth passages of cells was used in all experiments. We investigated and confirmed the role of Matrix Gla protein (MGP) in TNF- α induced calcification of HAVICs. Our results showed that TNF- α substantially downregulated MGP gene expression in HAVICs. At an inorganic phosphate (Pi) concentration of 3.2 mM, warfarin accelerated the calcification of HAVICs of CAS group. We also found critical roles for pregnane X receptor (PXR) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) in aortic valve calcification.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：大動脈弁狭窄 石灰化大動脈弁 分子標的薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本胸部外科学会の年報によれば、2005年の大動脈弁疾患に対する手術件数は7,795件であったが、2010年では10,795件と増加の一途を辿っている (Kuwano. Gen Thorac Cardiovasc Surg 2012)。生体弁は7,016件に用いられていた。我が国において動脈硬化による弁膜症(退行変性性弁膜症)が増加していることは明らかである。超高齢化社会の到来が間近であることから、近い将来、退行変性性弁膜症の増加と治療対象の高齢化が予想される。食生活の欧米化も疾病増加の原因である。高コレステロールの食事を日常的に摂取することは動脈硬化へとつながり、病的な動脈や弁膜を惹起することとなる。欧米諸国のみならずアジア諸国に目を向けてみると、経済発展が著しい中国では日本と同様に食の欧米化が進み、近い将来日本と同じ健康問題を抱えることが示唆され、治療対象者は相当数に上るとみられる。

我々のグループでは、加齢変性による大動脈弁狭窄症患者から得られた大動脈弁間質細胞 (Human aortic valve interstitial cells: HAVICs)の炎症性サイトカイン Tumor necrosis factor- (TNF-)による異所性石灰化 (Yu, Seya, Daitoku et al. J Pharmacol Exp Ther. 2011)や正常ラット大動脈弁の加齢による異所性石灰化 (Seya, Daitoku et al. J Pharmacol Sci. 2011)の分子機構を明らかにした。HAVICsの骨芽細胞への分化が異所性石灰化の原因であると考えられた。

大動脈弁間質細胞の細胞特性を明らかにすべく大動脈弁狭窄症患者の弁と大動脈弁閉鎖不全症患者の弁(対照)をコラゲナーゼで処理し、細胞を分離した後、Fluorescence-activated cell sorting (FACS)により、大動脈弁石灰化の起源細胞を調べた。石灰化した弁と石灰化していない弁の両方から得られたほとんどのHAVICsはCD73、90、105陽性細胞かつCD45陰性細胞の間葉系幹細胞様細胞 (Mesenchymal stem-like cells: MSLCs)で特徴づけられていた。組織レベルでの細胞分布を見るために組織染色を行ったところ、大動脈弁狭窄症患者ではCD34陰性細胞の割合が多いことがわかった (Nomura, Seya, Daitoku, Furukawa, et al. BBRC 2013)。これらの結果からヒト大動脈弁間質細胞の石灰化にはCD34陰性細胞が大きく関与している可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

大動脈弁狭窄症は大動脈弁の硬化により開閉が制限される病態で、発病率が高齢者で高く、重篤な場合には心不全に至る。弁異所性石灰化の非可逆的進行が特徴であり、有効な治療法は人工心肺を用いた外科的弁置換術または経カテーテル弁留置術しかない。高侵襲で耐術困難症例が約20%存在するため、低侵襲の薬物治療法開発が急務となる。しかし、大動脈弁異所性石灰化の機序は不明な点が多く、薬物治療の標的となるタンパク質等は特定されていない。弁異所性石灰化の分子機構やその病態生理学的意義を明らかにし、薬物治療への礎とすることを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

事前にインフォームドコンセントを行い、同意を得られた加齢変性による大動脈弁狭窄症患者から採取した大動脈弁を使用した。HAVICsを単離し、培地で培養を行い、4代目の細胞を使用した。カルシウムの同定にはAlizarin Red染色で検出した。遺伝子発現はreal-time PCR法を用いて測定を行った。タンパク質の定量はウエスタンブロット法を用いた。

4. 研究成果

(1)マトリックスGla蛋白はHAVICsの石灰化を抑制する

マトリックスGla蛋白(MGP)はビタミンK依存性蛋白であり、異所性石灰化抑制因子である。血管における石灰化を抑制することはすでに報告されているが、HAVICsにおける石灰化抑制効果については報告されていない。HAVICsに対するMGPの効果について検討した。大動脈弁狭窄症患者 (Calcified aortic valve stenosis: CAS)から得られたHAVICsを用い、非大動脈弁狭窄症患者 (大動脈弁閉鎖不全症または大動脈解離手術の時に得られた大動脈弁: Non-CAS)から得られたHAVICsを対照とした。CAS群ではTNF- 添加すると有意な石灰化を認め、Non-CAS群では認められなかった。CAS群、Non-CAS群共にTNF- を添加しない状態ではMGP遺伝子発現を認め、TNF- を添加すると2群共にMGP遺伝子発現を抑制した。CAS群のHAVICsを用いて、Bone morphogenetic protein: BMP-2 (骨形成タンパク質)の発現について検討した。TNF- を添加すると有意に発現したが、MGP遺伝子発現を抑制した。MGP遺伝子をノックアウトしたHAVICsにおいて、TNF- を添加するとコントロールと比較して有意にMGP遺伝子発現は抑制され、石灰化は有意に亢進した。MGP遺伝子を強制発現させたHAVICsではTNF- による石灰化を有意に抑制した。一方でBMP-2遺伝子発現は抑制されなかった。このことはMGPが増加すると異所性石灰化を効果的に抑制することが示唆された。

(2)高リン酸条件下におけるHAVICsではワルファリンはプレグナンX受容体を介して石灰化を誘導する

ワルファリンはビタミンKアンタゴニストとして知られている。ワルファリンの長期使用により大動脈弁の石灰化をきたすことが報告されているが、詳細なメカニズムについてはわかっていない。HAVICsにおけるワルファリンの石灰化メカニズムについて検討を行った。CAS群に

において、3.2 mM の高リン酸条件下においてワルファリンは石灰化を促進させ、Alkaline Phosphatase: ALP 活性を亢進させた。一方で Non-CAS 群では石灰化を亢進させなかった。ワルファリンの投与により、BMP2 遺伝子発現は亢進していた。高リン酸条件下ワルファリン誘発性石灰化は Dorsomorphin (Smad 阻害薬) により抑制した。Ketoconazole と Coumestrol (いずれも抗真菌薬でプレグナン X 受容体(PXR)阻害薬)投与によっても同様に抑制された。ワルファリンは HAVICs において、PXR-BMP2-ALP 経路により石灰化を誘発することが示唆された。

(3)Menaquinone-4 は高リン酸条件下 HAVICs においてプレグナン X 受容体を介して石灰化を促進する

Menaquinone-4(MK-4)はビタミン K2 として動物体内に存在する。高リン酸条件下の HAVICs におけるワルファリン誘発性石灰化について MK-4 の効果を検討した。MK-4 は高リン酸条件下の HAVICs におけるワルファリン誘発性石灰化を容量依存性に亢進させた。ALP 活性や BMP2 遺伝子発現も亢進させた。MK-4 誘発性 HAVICs 石灰化は Ketoconazole と Coumestrol 投与下では抑制された。また MK-4 は PXR 活性を増加させた。生理的リン酸条件下では MK-4 は BMP2 遺伝子発現と石灰化を促進させた。これらの結果より MK-4 すなわちビタミン V2 はワルファリンと同様、HAVICs の石灰化は PXR-BMP2-ALP 経路によることが示唆された。

(4)薬物送達システムの開発

薬物送達システムについては予備実験を行った。野生型ラットにイソフルランを用いて麻酔をかけ、開胸した後、sino-tubular junction より 5mm 遠位部にある上行大動脈の大動脈壁に amido black 10A を大動脈解離を起こさないように注入した。30 分後に心臓を摘出し、HE 染色後に鏡顕したところバルサルバ洞と大動脈弁に amido black 10A を認めた。大動脈壁から直接薬物を注入することで大動脈弁へ送達できる可能性が示唆された(データ未発表)。

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 Chiyoya M, Seya K, Yu Z, Daitoku K, Motomura S, Imaizumi T, Fukuda I, Furukawa KI	4. 巻 136
2. 論文標題 Matrix Gla protein negatively regulates calcification of human aortic valve interstitial cells isolated from calcified aortic valves	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 257-265
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Yu Z, Seya K, Chiyoya M, Daitoku K, Motomura S, Imaizumi T, Fukuda I, Furukawa K-I.	4. 巻 37
2. 論文標題 Warfarin calcifies human aortic valve interstitial cells at high-phosphate conditions via pregnane X receptor.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 944-956
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 于在強、瀬谷和彦、千代谷真理、大徳和之、今泉忠淳、古川賢一、福田幾夫
2. 発表標題 ワルファリンは大動脈弁異所性石灰化を促進するか？：大動脈弁間質細胞を用いた検討
3. 学会等名 第48回日本心臓血管外科学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 于在強、大徳和之、楊微、鈴木保之、福田幾夫
2. 発表標題 大動脈弁異所性石灰化における細胞外マトリックスタンパク質テネイシンXの役割
3. 学会等名 第71回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 于在強、瀬谷和彦、千代谷真理、大徳和之、今泉忠淳、元村成、福田幾夫、古川賢一
2. 発表標題 大動脈弁間質細胞の石灰化におけるマトリックスグラタンパク質遺伝子発現の抑制効果
3. 学会等名 第68回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2017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	古川 賢一 (Furukawa Ken-Ichi) (20165468)	弘前大学・医学研究科・客員研究員 (11101)	
研究分担者	瀬谷 和彦 (Seya Kazuhiko) (40281919)	弘前大学・医学研究科・助教 (11101)	
研究分担者	福田 幾夫 (Fukuda Ikuo) (50344594)	弘前大学・医学研究科・教授 (11101)	