

令和 2 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：2016～2019

課題番号：16K10631

研究課題名(和文)大動脈弁狭窄症バイオマーカーの探索と病態発症機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanism and development of novel diagnostic methods for aortic valve stenosis

研究代表者

泉谷 裕則(Hironori, Izutani)

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈弁狭窄症(AS)は、加齢性と、二尖弁などの先天性のものが知られているが、その発症メカニズムは未だ不明であり、薬物治療法もいまだ存在しない。本研究では、AS発症の分子機構を解明するとともに、AS早期診断のためのバイオマーカーの探索研究を実施した。その結果、大動脈弁石灰化に伴って弁間質細胞(VIC)に発現亢進する遺伝子として脂質代謝分子COX-1を同定した。COX-1はVICの骨芽細胞分化時特異的に発現亢進するが、RNA干渉法を用いて発現抑制すると骨芽細胞分化が完全に抑制されることがわかった。従って、本分子は、AS治療標的として最適である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦において、ASの罹患率は増加傾向にある。心臓外科領域におけるAS治療は、TAVI(経カテーテル的大動脈弁留置術)の導入などにより飛躍的に進歩したが、AS発症の分子機序が不明であるため根治療法のための薬剤開発も未だ進んでいない。本研究で得られた新規知見は、この問題解決に資するものであり、今後の研究発展の可能性が大いに期待できる。

研究成果の概要(英文)：The main causes of AS are heart disorders such as bicuspid aortic valve and the degeneration of valves resulting from atherosclerosis. However, the medical therapy for prevention of calcification has not been established yet, because the molecular mechanism underlying calcium deposition remain unknown. In this study, we aimed to clarify the molecular mechanism and develop the novel diagnostic methods for aortic valve stenosis. As the results, we successfully identified COX-1 as a calcification-specific factor in aortic valves. When valve interstitial cells (VICs) were stimulated by osteogenic media, COX-1 was strongly induced. However, osteoblast differentiations were completely abrogated by COX-1-depletion. Our data suggested that COX-1 might be novel drug target for AS treatment.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：大動脈弁狭窄症 大動脈弁 石灰化 AS 間質細胞

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 (AS) 発症の分子メカニズムは未だ分かっていない。AS は、加齢性のもと、生まれつき二枚しかない先天性のものが知られているが、いずれも大動脈弁が石灰化することにより発症する。AS は聴診やエコーにより診断されることが一般的であるが、息切れや動悸などの症状が現れた時点で心不全が合併している場合、予後不良である。現在の AS 治療法は、外科的に石灰化した大動脈弁を切除し、人工弁を移植する、大動脈弁置換術 (AVR) が一般的であるが、薬剤を用いた根治療法はいまだに存在せず、基礎研究介入による分子メカニズムの解明は必須である。これまでの国外において、遺伝子発現プロファイルの網羅的解析研究が散見されるが (*Circ Cardiovasc Genet.*, 2009)、日本人を対象とした分子レベルでの解析は実際ほとんど進んでいないのが現状である。そこで我々は、愛媛大学医学部附属病院臨床研究倫理審査委員会の承認のもと、AVR 適用となった AS 患者由来大動脈弁を用いて分子および組織学的解析を詳細に実施することにした。

2. 研究の目的

AS 早期発見、または AS 発症機序の解明のため、遺伝子発現網羅的解析およびプロテオミクス解析手法を用いて、疾患特異的に変動する因子の同定を目指した。また、これまで心臓発生過程における弁形成に必須のタンパク質である heparin binding-epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) に着目し、AS 発症における役割を明らかにすることを併せて目指した。

3. 研究の方法

AVR 手術適用となった患者由来大動脈弁から大動脈弁間質細胞 (VIC) を単離・培養した。この時、石灰化組織および非石灰化組織部位に分けた (それぞれ Calc-VIC、Noncalc-VIC と命名)。それぞれの VIC から total RNA または total protein を抽出し、網羅的遺伝子発現解析およびプロテオミクス解析を実施し、HB-EGF を含めた各遺伝子の発現変動パターンを明らかにするとともに、Calc-VIC 特異的に過剰発現する因子の探索解析を実施した。また、AS 患者血清サンプルから、エクソソームを精製し、バイオマーカーの候補となる miRNA 分子を探索し、Calc-VIC 由来 miRNA プロファイリングと比較解析することで、発現細胞の特定解析を実施した。

4. 研究成果

AS 特異的 miRNA 探索研究

最近、腫瘍生物学の分野では、腫瘍細胞由来エクソソーム内に含まれる因子が、癌早期発見や治療標的として有効であることが知られている (*Yokoi A., Nat Commun.* 2017., *Grange C et al., Cancer Res.* 2011)。そこで、AS 患者エクソソーム中の miRNA の網羅的プロファイリングを行うことで、AS の早期診断マーカーとなる核酸分子の同定を試みた。その結果、AS 患者特異的に高発現する miRNA として 9 種類、健常人に比べて有意に発現低下する miRNA として 98 種類を新規に発見した。これらの多くは、欧米人を対象とした網羅的発現解析からも見出されていないことから、日本人における AS の早期発見のための分子マーカーの開発研究につながる可能性がある。しかし、これらのほとんどは VIC 細胞内において Calc-VIC と Noncalc-VIC 間で差が認められなかったことから、大動脈弁表層に局在する血管内皮細胞由来である可能性が考えられる。現在は、AS 患者血清中エクソソームにおいて特異的に過剰発現される miRNA について、検体数を増やしてさらなる解析を進めているところである。

AS 特異的に発現変動する遺伝子の探索研究

Calc-VIC および Noncalc-VIC (それぞれ n = 5) を単離培養した。通常培養では両初代培養細胞ともに増殖能力が低く、筋線維芽細胞への分化が顕著であった。そこで、これを回避するために低酸素培養法開発し、未分化な状態を維持した多くの VIC を得ることができた (図 1)。本法を用いて増殖させて得られた Calc-VIC と Noncalc-VIC を対象にマイクロアレイ解析を実施したところ、Calc-VIC 特異的に過剰発現する脂質代謝タンパク質 COX-1 を見出すことに成功した (*Sakaue T et al., Ann Thorac Surg.,* 2019)。COX-1 はアラキドン酸代謝カスケードの律速酵素であることが知られているが、AS における機能については全くわかっていなかった。見出した酵素に対する抗体を用いて、AS 患者由来大動脈弁組織における局在性を免疫組織染色法により解析した。その結果、剖検から得られた健常弁において COX-1 の局在性は全く認められなかったものの、AS 患者由来石灰化大動脈弁において、von Kossa 染色陽性の石灰化組織周辺で顕著に認められた (図 2)。近年、AS 患者石灰化大動脈弁においては RUNX2 陽性の骨芽細胞の存在が認められており、VIC の骨芽細胞分化が着目さ

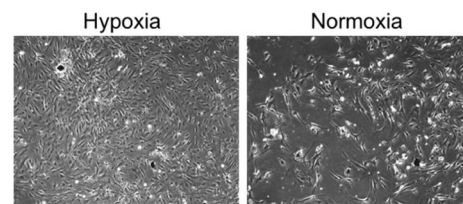


図 1. Hypoxia および Normoxia 培養条件下における VIC の細胞形態

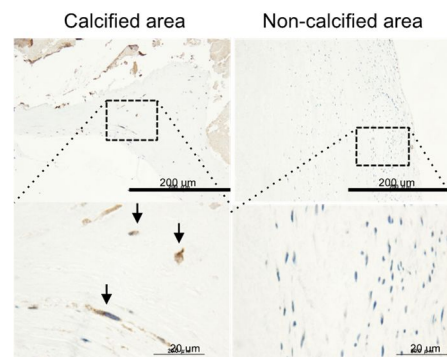


図 2. AS 弁における COX-1 の局在解析

れている。そこで、生体内大動脈弁石灰化におけるVICによるCOX-1過剰産生を *in vitro* で再現するために、VICを骨芽細胞分化培地で培養することで細胞分化誘導し、COX-1の発現レベルをWestern blotting法により解析した。その結果、骨芽細胞に分化誘導したVICは強くCOX-1を過剰発現させることがわかった。さらに、COX-1をRNA干渉法により発現抑制すると、骨芽細胞への分化が完全に抑制されることがわかった。今後、COX-1を特異的に阻害する新規AS治療法の確立を目指してさらなる解析を進める予定としている。

ASにおけるHB-EGFの解析

HB-EGFは心臓弁形成に極めて重要な役割を果たしており、*hbegef*^{-/-}マウスは心臓弁形成不全によって致死となる。そこで成人大動脈弁におけるHB-EGFが弁石灰化の過程で重要な役割を果たすものと考え、単離・培養したVICを用いて生化学的に詳細に解析を実施した。マイクロアレイおよびリアルタイムRT-PCR解析の結果、VICにおける発現レベルは非常に低値であることが判明したが、一方でHB-EGFは血管内皮細胞においては高発現することがわかった。そこで、mRNAレベルでの解析結果についてタンパク質レベルでも同様であることを明らかにするため、AVR適用となったAS患者由来大動脈弁を用いて、抗HB-EGF抗体を用いて、組織学的解析を実施した。その結果、HB-EGFは大動脈弁組織内部において、CD31陽性の新生血管における血管内皮細胞に強い発現が認められた(図3)。一般的に、大動脈弁組織内部は無血管組織であるが、弁石灰化に伴って血管新生が強く誘導されることがよく知られている(*Fariba et al., Exp Cell Res. 2004*)。HB-EGFはこの大動脈弁における血管新生において重要な役割を担っているものと考え、現在その分子メカニズムのさらなる解析を進めているところである。

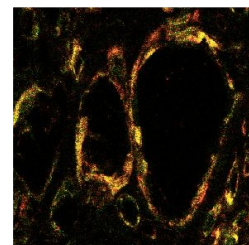


図3. 大動脈弁内部における新生血管(赤:CD31)に発現するHB-EGF(緑:HB-EGF)の蛍光免疫組織染色結果.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sakaue Tomohisa, Nakaoka Hiroto, Shikata Fumiaki, Aono Jun, Kurata Mie, Uetani Teruyoshi, Hamaguchi Mika, Kojima Ai, Uchida Shunji, Yasugi Takumi, Higashi Haruhiko, Suzuki Jun, Ikeda Shuntaro, Higaki Jitsuo, Higashiyama Shigeki, Izutani Hironori	4. 巻 7
2. 論文標題 Biochemical and histological evidence of deteriorated bioprosthetic valve leaflets: the accumulation of fibrinogen and plasminogen	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 bio034009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/bio.034009	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 T, Nakaoka H, Aono J, Kurata M, Oshima Y, Koga S, Namiguchi K, Izutani H.	4. 巻 37 (1)
2. 論文標題 Molecular-based analysis and therapeutic development of aortic valve stenosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ehime Medical Journal.	6. 最初と最後の頁 05-09
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 Sakaue T, Suzuki J, Hamaguchi M, Suehiro C, Tanino A, Nagao T, Uetani T, Aono J, Nakaoka H, Kurata M, Sakaue T, Okura T, Yasugi T, Izutani H, Higaki J, Ikeda S.	4. 巻 70(4)
2. 論文標題 Perivascular Adipose Tissue Angiotensin II Type 1 Receptor Promotes Vascular Inflammation and Aneurysm Formation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Hypertension	6. 最初と最後の頁 780-789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09512.	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 Sakaue T, Shikata F, Utsunomiya K, Fukae S, Kurata M, Nakaoka H, Okazaki M, Kawanishi Y, Kojima A, Higashiyama S, Izutani H	4. 巻 161(6)
2. 論文標題 Proteomics-based analysis of lung injury-induced proteins in a mouse model of common bile duct ligation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Surgery	6. 最初と最後の頁 1525-1535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.surg.2016.12.017.	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 該当する

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3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、中岡裕智、倉田美恵、東山繁樹、泉谷裕則
2. 発表標題 大動脈弁狭窄症患者由来石灰化大動脈弁のプロテオミクス解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018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、浪口謙治、中岡裕智、倉田美恵、打田俊司、八杉巧、東山繁樹、泉谷裕則
2. 発表標題 摘出大動脈弁からの弁間質細胞の調製と網羅的遺伝子発現解析
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 Tomohisa Sakaue, Mika Hamaguchi, Jun Aono, Koh-ichi Nakashiro, Fumiaki Shikata, Kenji Namiguchi, Hiroto Nakaoka, Mie Kurata, Shunji Uchita, Takumi Yasug, Ai Kojima, Hironori Izutani
2. 発表標題 Comprehensive gene expression analysis of valve interstitial cells from surgically excised stenotic aortic valves
3. 学会等名 Vascular Biology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomohisa Sakaue, Mika Hamaguchi, Jun Aono, Koh-ichi Nakashiro, Fumiaki Shikata, Hironori Izutani
2. 発表標題 Valve interstitial cell-specific cyclooxygenase-1 associated with calcification of aortic valves
3. 学会等名 STS 55th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂上倫久、中岡裕智、倉田美恵、青野潤、鹿田文昭、村上貴志、浪口謙治、小嶋愛、打田俊司、八杉巧、泉谷裕則
2. 発表標題 摘出大動脈弁由来間質細胞の調整とその特性解析
3. 学会等名 第46回日本心脈管作動物質学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中岡裕智、坂上倫久、倉田美恵、青野潤、村上貴志、浪口謙治、小嶋愛、鹿田文昭、打田俊司、八杉巧、泉谷裕則
2. 発表標題 ヒト血管内皮機能障害関連疾患におけるアンジオテンシン変換酵素2 (ACE2)およびMas受容体の発現解析
3. 学会等名 第46回日本心脈管作動物質学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂上倫久、中岡裕智、鹿田文昭、村上 貴志、阪下裕司、小嶋愛、打田俊司、八杉巧、泉谷裕則
2. 発表標題 大動脈弁置換術患者由来の摘出大動脈弁を用いた組織学的解析
3. 学会等名 第47回日本心臓血管外科学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中岡裕智、坂上倫久、村上貴志、阪下裕司、小嶋愛、鹿田文昭、打田俊司、八杉巧、泉谷裕則
2. 発表標題 再弁置換術によって得られた摘出生体弁の組織学的解析
3. 学会等名 第47回日本心臓血管外科学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂上倫久、中岡裕智、鹿田文昭、村上貴志、阪下裕司、小嶋愛、打田俊司、八杉巧、泉谷裕則
2. 発表標題 弁置換術によって得られた摘出大動脈弁のプロテオミクス解析
3. 学会等名 第117回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中岡裕智、坂上倫久、鹿田文昭、村上貴志、阪下裕司、小嶋愛、打田俊司、八杉巧、泉谷裕則
2. 発表標題 大動脈弁置換術における摘出大動脈弁を用いた -SMAの発現解析
3. 学会等名 第117回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tomohisa Sakaue, Hiroto Nakaoka, Fumiaki Shikata, Jun Aono, Mie Kurata, Teruyoshi Uetani, Takashi Murakami1, Yuji Sakashita, Ai Kojima, Shunji Uchita, Takumi Yasugi, Shigeki Higashiyama, Hironori Izutani.
2. 発表標題 Plasminogen and fibrinogen promote calcification in bioprosthetic valve leaflets in aortic position
3. 学会等名 31st EACTS 2017 Annual Meeting - European Association for Cardio-Thoracic Surgery (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂上 倫久、中岡 裕智、鹿田 文昭、村上 貴志、阪下 裕司、小嶋 愛、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摘出大動脈弁を用いたヘパリン結合性EGF様成長因子 (HB-EGF) の解析
3. 学会等名 第69回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 坂上 倫久、中岡 裕智、倉田 美恵、青野 潤、鹿田 文昭、村上 貴志、浪口 謙治、小嶋 愛、打田 俊司、八杉 巧、泉谷 裕則
2. 発表標題 摘出大動脈弁から弁細胞の調整とその特性解析
3. 学会等名 第46回日本心臓血管作動物質学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中岡 裕智、坂上 倫久、倉田 美恵、青野 潤、鹿田 文昭、村上 貴志、浪口 謙治、小嶋 愛、打田 俊司、八杉 巧、泉谷 裕則
2. 発表標題 ヒト血管内皮機能障害関連疾患におけるアンジオテンシン変換酵素2 (ACE2)およびMas受容体の発現解析
3. 学会等名 第46回日本心臓血管作動物質学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂上 倫久、中岡 裕智、鹿田 文昭、村上 貴志、阪下 裕司、小嶋 愛、打田 俊司、八杉 巧、東山 繁樹、泉谷 裕則
2. 発表標題 大動脈弁置換術患者由来の摘出大動脈弁を用いた組織学的解析
3. 学会等名 第47回日本心臓血管外科学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中岡 裕智、坂上 倫久、村上 貴志、阪下 裕司、小嶋 愛、鹿田 文昭、打田 俊司、八杉 巧、泉谷 裕則
2. 発表標題 再弁置換術によって得られた摘出生体弁の組織学的解析
3. 学会等名 第47回日本心臓血管外科学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔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)	