

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09089

研究課題名(和文)細胞外マトリックスタンパク質の発現制御による大動脈弁石灰化抑制の実証と機構解明

研究課題名(英文) Demonstration and mechanism elucidation of the inhibition of aortic valve calcification by controlling expression of extracellular matrix protein

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、石灰化大動脈弁狭窄症(AS)患者の大動脈弁から得た間質細胞(HAVICs)の性状や異所性石灰化に関わる様々なシグナリング経路と細胞外マトリックスタンパク質の発現変化との関わりについて検証した。その結果、腫瘍壊死因子TNF-による刺激で活性化する骨形成タンパク質BMP2-Smad1/5/8転写因子を介する経路がマトリックスGlaタンパク質(MGP)やテネイシンX(TNX)の発現低下と関連する可能性を見出すことができた。今後は、TNF--BMP2-Smad1/5/8経路とMGP/TNX発現低下との関連性について分子生物学的に明らかにする所存である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では異所性石灰化について動脈硬化以外の要因、すなわち加齢変性に注目することにある。すなわち、標的タンパク質低発現細胞を特定し、この細胞を減らすことで病態軽減をめざしていく。異所性石灰化誘発機構の解明は、大動脈弁狭窄症の病態基盤を構築することになる。かつ石灰化シグナリング機構を抑制する活性物質に基づいた新規薬物治療薬の開発に貢献するところに創造性があり、その結果として高齢者の健康寿命向上に寄与できると考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the properties of human aortic valve interstitial cells (HAVICs) obtained from calcified aortic stenosis patients and of various signaling pathways involved in the ectopic calcification of HAVICs. In these investigations, we also measured the expression of extracellular matrix proteins. As a result, we found that the signaling pathway mediated by the bone morphogenetic protein (BMP2)-Smad1/5/8 transcription factor activated by the tumor necrosis factor (TNF-) may be associated with the decreased expression of extracellular matrix proteins, such as matrix Gla protein (MGP) and tenascin X (TNX). In the future, we will molecular biologically clarify the relationship between the TNF--BMP2-Smad1/5/8 signaling pathway and the decreased expression of MGP/TNX genes and proteins.

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. 大動脈弁狭窄症の臨床的背景

- ・本邦における発病率は75才以上で12.4%と高く、うち重傷症例が3.4%で手術適応となる。
- ・弁置換術は年間一万件を超え、増加傾向にある。在院全死亡率が2.7%と高侵襲であり、耐術困難症例は約20%あるが、外科治療以外に弁異所性石灰化の進行を抑制する薬物治療法は未だに確立されていない [1]。

B. 大動脈弁狭窄症における弁異所性石灰化機構

B-1 動脈硬化原因説

- ・弁異所性石灰化は、動脈硬化で白血球が引き金になり、サイトカイン放出を介する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 [2]。
- ・しかし、動脈硬化所見が認められない患者も約5割存在する [3]。

B-2 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引き金となる可能性が、以下の通り指摘された。しかし、これらがヒトで石灰化を誘発したとする報告はまだない。
 - a. 間葉系前駆細胞のブタ大動脈弁局在と骨芽細胞への分化 [4]
 - b. CD45 (白血球マーカー) / 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 [5, 6]

C. 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。しかし、臨床試験で有効性が認められなかった [7]。
- ・近年、マトリックス Gla タンパク質 (MGP) による骨形成タンパク質 (BMP2) 活性阻害等異所性石灰化を抑制する生理機構が報告された [8]。

D. 大動脈弁狭窄症における細胞外マトリックスタンパク質の関与

- ・申請者は最近、弁異所性石灰化への細胞外マトリックスタンパク質の関与について、以下二つの知見を得た。
 - a. 腫瘍壊死因子 (TNF- α) による大動脈弁間質細胞 (HAVICs) 石灰化時に MGP やテネイシン X (TNX) mRNA の発現が著しく低下すること。さらに、MGP ではタンパク質量も低下すること。
 - b. 大動脈弁狭窄症患者由来 HAVICs が CD34 陰性間葉系未分化細胞を多く含み、陽性細胞と比較して石灰化刺激に高い感受性を示すこと。同時に CD34 陽陰性細胞間の遺伝子発現の網羅的解析では TNX mRNA のみ著しい発現低下を示すこと。

そこで申請者は、『MGP か TNX、あるいはその両方 (MGP/TNX) の低発現細胞増加が弁異所性石灰化の真の引き金になるのではないか』との仮説を立てるに至った。

2. 研究の目的

- ・細胞外マトリックスタンパク質の発現制御により大動脈弁石灰化を実証し、その機構を解明する

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 (15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。

(2) HAVICs の性状解析

- ・免疫細胞染色により、間葉系未分化細胞・造血幹細胞マーカー、内皮細胞・平滑筋細胞・線維芽細胞マーカーを用いて、蛍光染色により発現を細胞レベルで解析した。
- ・弁組織切片を作成し、免疫蛍光染色により、先述のマーカーの他に、各種細胞外マトリックスタンパク質 (TNX、MGP など) などの発現を解析した。

(3) HAVICs の石灰化誘発

- ・腫瘍壊死因子 (TNF- α , 30 ng/mL) やトランスフォーミング増殖因子 (TGF 類, 100 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 (ワルファリン、メナキノンなど) 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

- ・プレグナン X 受容体 (PXR) レポーター遺伝子を導入し、ワルファリンやメナキノンなどの存在下で PXR 活性を測定した。トランスフェクション試薬として、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 qPCR 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。また分泌タンパク質 (BMP2、IFN- β など) は培養液から採取し、ELISA により測定した。
- ・酵素活性: アルカリホスファターゼなどの活性は専用測定キットを用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 我々はすでに、TNF- α による骨形成タンパク質 BMP2 発現亢進が転写因子 Smad1/5/8 のリン酸化を介して HAVICs 石灰化を誘発し、同時に MGP や TNX 発現が著しく低下することを見出している。

(2) しかし、上記データは石灰化を認めた時点での発現を示したものである。そこで TNF- α 単回添加後からの遺伝子発現の時間変化を調べた。その結果、図 1 に示すように添加 4 時間後から BMP2 発現の著しい亢進を認めた。この亢進は 1 日目に弱まったが、その後も高発現を維持した。一方、MGP や TNX は図 2 に示すように、逆に時間依存性に発現低下し、1 週間後まで継続した (いずれも未発表データ)。以上の結果は、MGP や TNX の発現低下が TNF- α -BMP2-Smad1/5/8 経路と関連する可能性を示唆しており、今後分子生物学的に明らかにする所存である。

(3) 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に加え、骨粗しょう症治療薬として使用されているビタミン K (メナキノン) が、高リン酸条件下 (3.2 mM) でプレグナン X 受容体 (PXR) を介して BMP2 発現を亢進することで石灰化を誘発することを明らかにした。さらに、ケトコナゾールなどの PXR 拮抗薬が、BMP2 発現を抑制し、HAVICs 石灰化を抑制した。一方、ワルファリンやメナキノンは単独では MGP や TNX の発現に影響せず、さらに高リン酸条件下でも有意な低下を示さなかった。

(4) これまで HAVICs が間葉系未分化細胞としての性質を有することを明らかにした。さらに石灰化大動脈弁狭窄症 (AS) 患者の大動脈弁から得た HAVICs の性状について解析を行った結果、ほとんどが内皮細胞に特徴的なエンドグリンマーカー CD105 や血管内皮細胞増殖因子受容体 VEGFR2 陽性である一方、造血幹細胞マーカー CD34 陰性であった。細胞外マトリックスタンパク質では MGP や TNX の発現が石灰化刺激により低下した。我々は CD34 陰性 HAVICs が石灰化刺激に高感受性であることを確認している。また、正常大動脈弁内皮細胞が CD34 陽性であることが知られている。以上の結果から、AS における異所性石灰化が、弁内皮細胞の内皮間葉移行による CD34 陰性細胞への形質転換により亢進する可能性を示唆している。

(5) CD34 陰性細胞で陽性細胞と比較して発現が亢進するタンパク質の一つとして発生や炎症性疾患に関わることが知られている分泌タンパク質 Wnt5a を同定し、これが石灰化において果たす役割について検討を行った。Wnt5a は TNF- α 刺激で発現が亢進することを確認したが、Wnt5a アゴニストの Foxy5 やアンタゴニストの Box5 を用いた薬理的検討では、TNF- α による HAVICs 石灰化に影響を与えなかった。

(6) HAVICs 石灰化には TNF- α -BMP2-Smad1/5/8 経路の他に TGF- β -Smad2/3 の経路が知られており、後者が Wnt5a によって活性化することが知られている。しかし、石灰化 AS 患者から得た HAVICs に TGF- β を添加しても石灰化が進行しなかった。また MGP や

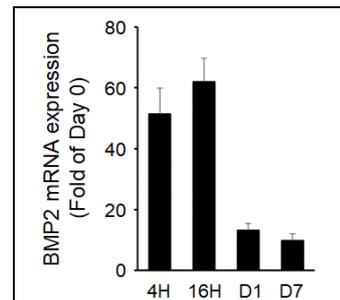


図 1: TNF- α による BMP2 遺伝子発現の時間変化
TNF- α (30 ng/mL) 添加後 16 時間まで著しい発現亢進を認めた。その後も 10 倍程度の高発現を長期間維持した。

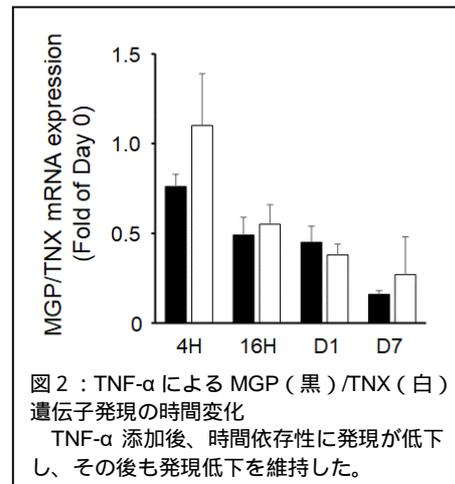


図 2: TNF- α による MGP (黒) / TNX (白) 遺伝子発現の時間変化
TNF- α 添加後、時間依存性に発現が低下し、その後も発現低下を維持した。

- TNX 発現も影響を受けなかった。以上の結果は、前述(3)の結果と合わせて石灰化 AS 患者由来 HAVICs では、TGF- β -Smad2/3 経路が機能していない可能性を示唆している。
- (7) 上記の結果は、MGP や TNX の発現低下が TNF- α -BMP2-Smad1/5/8 経路との関連性が高いことを示唆しており、今後その関連性や MGP/TNX 発現低下細胞への分化を含めた分子機構についてさらに検証する必要があると考えられた。
- (8) 本研究の一環として、大動脈弁石灰化抑制薬の投与方法について基礎的検討を行い、弁カテーテル留置術による弁置換で固定される上行性大動脈の起始部に薬物を模倣した色素を投与すると、大動脈弁の弁輪に色素が移行することを予備実験として確認した。
- (9) 薬物開発の観点から、心筋保護作用が知られている resveratrol の 4 量体 hopeaphenol がウイルス感染による自然免疫の亢進を抑制する作用があることを見出した。

[引用文献] [1] MW van Geldorp et al., Eur J Cardiothorac Surg 35:953 (2009); [2] Mohler, Am J Cardiol 94:1396 (2004); [3] Miller et al., Circ Res 108:1392 (2011); [4] Chen et al., Am J Pathol 175:2676 (2009); [5] Suda et al., Stem Cells 27:2209 (2009); [6] Gössl et al., JACC 60:1945 (2012); [7] Lorgenl et al., Arch Intern Med 170:1032 (2010); [8] Rajamannan et al., Circ Res 109:564 (2011).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Xu Liu, Yu Zaiqiang, Uekusa Yoshinori, Kawaguchi Shogo, Kikuchi Haruhisa, Daitoku Kazuyuki, Minakawa Masahito, Motomura Shigeru, Furukawa Ken-Ichi, Oshima Yoshiteru, Seya Kazuhiko, Imaizumi Tadaatsu	4. 巻 149
2. 論文標題 Elucidation of the inhibitory effect of (+)-hopeaphenol on polyinosinic-polycytidylic acid-induced innate immunity activation in human cerebral microvascular endothelial cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 147 ~ 157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2022.04.011	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 Ding Jiangli, Matsumiya Tomoh, Hayakari Ryo, Shiba Yuko, Kawaguchi Shogo, Seya Kazuhiko, Ueno Kayo, Imaizumi Tadaatsu	4. 巻 101
2. 論文標題 Daily Brazilian green propolis intake elevates blood artemipillin C levels in humans	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the Science of Food and Agriculture	6. 最初と最後の頁 4855 ~ 4861
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jsfa.11132	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 Xu Liu, Yu Zaiqiang, Daitoku Kazuyuki, Fukuda Ikuo, Motomura Shigeru, Matsumiya Tomoh, Imaizumi Tadaatsu, Furukawa Ken-Ichi, Seya Kazuhiko	4. 巻 145
2. 論文標題 Human aortic valve interstitial cells obtained from patients with aortic valve stenosis are vascular endothelial growth factor receptor 2 positive and contribute to ectopic calcification.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 213 ~ 221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2020.12.002	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 Zaiqiang Yu, Xu Liu, Kazuyuki Daitoku, Ken-Ichi Furukawa, Ikuo Fukuda, Shigeru Motomura, Kazuhiko Seya	4. 巻 71
2. 論文標題 Preliminary study on local medical treatment of aortic valve calcification: Drug delivery to aortic valve in rat	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hirosaki Medical Journal	6. 最初と最後の頁 101~107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.32216/hirosakiigaku.71.2-4_101	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 Kawaguchi Shogo, Sakuraba Hirotake, Kikuchi Hidezumi, Numao Noriyuki, Asari Taka, Hiraga Hiroto, Ding Jiangli, Matsumiya Tomoh, Seya Kazuhiko, Fukuda Shinsaku, Imaizumi Tadaatsu	4. 巻 129
2. 論文標題 Tryptanthrin suppresses double-stranded RNA-induced CXCL10 expression via inhibiting the phosphorylation of STAT1 in human umbilical vein endothelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Immunology	6. 最初と最後の頁 32 ~ 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molimm.2020.11.003	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 Hirono Koji, Imaizumi Tadaatsu, Aizawa Tomomi, Watanabe Shojiro, Tsugawa Koji, Shiratori Toshihiro, Kawaguchi Shogo, Seya Kazuhiko, Matsumiya Tomoh, Ito Etsuro, Tanaka Hiroshi	4. 巻 1
2. 論文標題 Endothelial expression of fractalkine (CX3CL1) is induced by Toll-like receptor 3 signaling in cultured human glomerular endothelial cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2019.1682768	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 Yang Wei, Yu Zaiqiang, Chiyoya Mari, Liu Xu, Daitoku Kazuyuki, Motomura Shigeru, Imaizumi Tadaatsu, Fukuda Ikuo, Furukawa Ken-Ichi, Tsuji Motonori, Seya Kazuhiko	4. 巻 372
2. 論文標題 Menaquinone-4 Accelerates Calcification of Human Aortic Valve Interstitial Cells in High-Phosphate Medium through PXR	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics	6. 最初と最後の頁 277 ~ 284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/jpet.119.263160	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 Imaizumi Tadaatsu, Satake Urara, Miyashita Ruri, Kawaguchi Shogo, Matsumiya Tomoh, Seya Kazuhiko, Ding Jiangli, Tanaka Hiroshi	4. 巻 337
2. 論文標題 Interferon-induced transmembrane protein 1 and Myxovirus resistance protein 1 are induced by polyinosinic-polycytidylic acid in cultured hCMEC/D3 human cerebral microvascular endothelial cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 577047 ~ 577047
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jneuroim.2019.577047	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 KI.	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) 10.1007/s00774-019-01001-3	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 Kawaguchi S, Sakuraba H, Haga T, Matsumiya T, Seya K, Endo T, Sawada N, Iino C, Kikuchi H, Hiraga H, Fukuda S, Imaizumi T.	4. 巻 42
2. 論文標題 Melanoma Differentiation-Associated Gene 5 Positively Modulates TNF- α -Induced CXCL10 Expression in Cultured HuH-7 and HLE Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 2095-2104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10753-019-01073-3	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 劉 旭, 于 在強, 大徳和之, 福田幾夫, 元村 成, 松宮朋穂, 今泉忠淳, 古川賢一, 瀬谷和彦
2. 発表標題 石灰化大動脈弁狭窄症患者より得た大動脈弁間質細胞はVEGFR2陽性であり、異所性石灰化に寄与する
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuhiko Seya, Wei Yang, Zaiqiang Yu, Mari Chiyoya, Kazuyuki Daitoku, Shigeru Motomura, Tadaatsu Imaizumi, Ikuo Fukuda, Ken-ichi Furukawa
2. 発表標題 Menaquinone-4 accelerates calcification of human aortic valve interstitial cells in high-phosphate medium through PXR
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Zaiqiang Yu, Liu Xu, Tadaatsu Imaizumi, Shogo Kawaguchi, Haruhisa Kikuchi, Kazuyuki Daitoku, Masahito Minagawa, Shigeru Motomura, Ken-Ichi Furukawa, Yoshiteru Oshima, and Kazuhiko Seya
2. 発表標題 (+)-Hopeaphenol inhibits Poly IC-induced innate immunity activation via IFN- in human cerebral microvascular endothelial cells
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 福田幾夫、大徳和之、瀬谷和彦、于 在強	4. 発行年 2021年
2. 出版社 やまと印刷株式会社	5. 総ページ数 74
3. 書名 大動脈弁はなぜ石灰化するのか	

〔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	于 在強 (Zaiqiang Yu) (40624268)	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・名誉教授 (11101)	
研究分担者	大徳 和之 (Daitoku Kazuyuki) (50374822)	弘前大学・医学研究科・教授 (11101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	今泉 忠淳 (Imaizumi Tadaatsu) (90232602)	弘前大学・医学研究科・教授 (11101)	

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