

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 26 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：16K09503

研究課題名(和文) テロメラーゼが大動脈弁狭窄症の発症・進展に与える影響

研究課題名(英文) The effect of telomerase in the development of aortic valve stenosis

研究代表者

青野 潤 (Aono, Jun)

愛媛大学・医学部附属病院・講師(病院教員)

研究者番号：70512169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈弁狭窄症(AS)の進行におけるテロメラーゼ、特にその主要成分であるTERT(telomerase reverse transcriptase)に着目して解析を進めた。各AS患者より得られた組織学・生化学的解析結果、患者背景をもとにAS病態理解のための統合的な研究地盤を作成した。抗TERT抗体を用いた免疫組織染色では大動脈弁組織表層に位置する内皮細胞と弁中部の弁肥厚した間質細胞周辺に染色性を認めた。マイクロアレイデータの中でAS弁より採取培養した弁石灰化由来弁間質細胞において高い発現を示し、かつTERTの発現を制御すると報告されている54kDaの脂質代謝酵素Yに注目し解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

テロメラーゼはテロメア長の調節に必須であり、細胞老化にも大きく関わっている。また癌を含めた炎症/増殖性疾患の発症・進展に関与することが報告されている。大動脈弁狭窄症(Aortic valve stenosis: AS)は加齢により心臓弁膜の硬化/狭窄を生じ突然死・急性心不全など致命的病態を生じる最重症心疾患の一つである。ASにおけるテロメラーゼの役割が明らかになれば、これらをターゲットとした手術適応『前段階』のAS患者のための創薬・バイオマーカーイノベーションを含めた発症・進行予防治療戦略を確立する上で大きな意義を持つものと期待される。

研究成果の概要(英文)：To determine the role of telomerase, especially the catalytic subunit telomerase reverse transcriptase or abbreviated TERT, human aortic valve and valvular interstitial cells (VICs) isolated from aortic valve stenosis (AS) were investigated. The data base for unveiling the mechanism in the development of AS was created from histological, biochemical findings, and patient characteristics. Immunohistochemical analysis was performed using anti-TERT antibody. The expression of TERT was detected in the endothelial cells and interstitial cell in the calcified and sclerotic lesion. Microarray data from VICs showed the increase gene expression of 54kD Lipid metabolism enzyme Y in the VICs derived from calcified lesion of AS valve. The enzyme Y also has been reported to regulate the expression of TERT. Analyzing the microarray data, the investigation for the function of TERT is going to proceed, focusing on aortic valve endothelial and interstitial cells.

研究分野：動脈硬化関連疾患・心不全

キーワード：大動脈弁狭窄症 テロメラーゼ TERT 大動脈弁間質細胞

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化と生活習慣の欧米化が進み、冠動脈疾患、脳卒中とともに心臓弁膜症の一つである大動脈弁狭窄症(Aortic valve stenosis: AS)の罹患率(先進国で65歳以上の2-4%)も急激な増加の一途を辿っている。ASは加齢による動脈硬化様変化により弁膜の硬化・狭窄を生じ長期間無症状で経過する進行性の疾患であるが、ひとたび症状が出現し重症化すると突然死・急性心不全などを生じ、致死率が非常に高くその根本的治療は心臓弁置換手術しかない。また、ASの『手術適応前の治療』は動脈硬化危険因子の是正程度でその治療を施行しても進行を遅らせることは困難であり、ASの発症・進展に関わるメカニズムならびに創薬を目指した新規ターゲットの解明は急務である。ASは心臓弁膜の構成細胞である大動脈弁間質細胞(Valvular interstitial cells: VICs)が炎症により増殖し、石灰化を誘導することで生じる病態として知られるが、その詳細は未だ明らかでない。

テロメア合成酵素(テロメラーゼ)は正常細胞でその発現は抑制されており、細胞の寿命を司るテロメアが細胞分裂の度に短縮することで老化、細胞分裂の停止が生じる。テロメラーゼは、癌を含めた炎症/増殖性疾患の発症・進展に関与することが報告されている。これまで我々は動脈硬化におけるテロメラーゼ、特にその主要構成成分である Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) の役割について明らかにしてきた(Aono J et al. ATVB 2017, JACC Basic Transl Sci. 2016, J Cell Physiol. 2016)。

現在までにASと動脈硬化性疾患の関連性が数多く指摘されており、ASと動脈硬化病変は脂質沈着、石灰化、炎症細胞浸潤、血管新生など病理学的にも非常に類似した特徴を有することが報告されている(Akahori H et al. European Heart Journal 2011)。しかし、動脈硬化においてテロメラーゼが病態形成に寄与することはよく知られているものの、これまでASの発症・進展におけるテロメラーゼの役割については全く分かっていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究ではヒト大動脈弁検体組織及び単離・培養したVICsを用いてASの進行におけるテロメラーゼの役割、特にその主要構成成分であるTERTに着目して解析を進めた。

## 3. 研究の方法

(1) まず倫理委員会承認(愛大医病倫 1603002号)のもと、AS患者に対する大動脈弁置換術の際に取り出した大動脈狭窄弁を用いて、組織学的解析のためパラフィン・凍結切片用に包埋・保存、加えてタンパク質、RNA解析用のサンプル保存を行なった。

(2) 石灰化大動脈弁からタンパク質およびtotal RNAを抽出し、リアルタイム定量PCRおよびCoomassie brilliant blue染色やウェスタンブロッティングを実施し、従来AS発症機序において重要とされる既報の因子に対して、標的遺伝子およびタンパク質の検出を行う事で、分子レベルでの病態解析を行った。さらに、組織学的形態を確認するためヘマトキシリン・エオジン(H.E.)染色、エラスチカ・ワンギーソン(EVG)染色(弾性線維)、PAS染色(多糖類:グリコーゲン・粘液タンパク、糖タンパク、糖脂質)、マッソントリクローム染色(膠原線維)を施行し、組織レベルでの病態解析を実施した。

(3) AS患者、大動脈弁閉鎖不全症患者、剖検症例から採取した正常大動脈弁よりtotal RNAを抽出し、TERT遺伝子に対するリアルタイム定量PCRを施行した。

(4) AS患者、剖検症例から採取した正常大動脈弁を包埋し切片スライドを作成した。TERTの発現をタンパク質レベルで検証するために、抗TERT抗体を用いた免疫組織染色を施行した。加えてTERT遺伝子はテロメア長の調節に必須であり、細胞老化に関与しているため老化細胞を可視化するβガラクトシダーゼ染色を実施した。

(5) 大動脈弁の石灰化のメカニズムを弁構成細胞レベルで検討するため、AS患者より採取した大動脈狭窄弁を石灰化部、非石灰化部に分割し、それぞれの組織からVICsを採取・培養した。採取した培養細胞はコラゲナーゼ処理により組織から取り出した後、37°C CO<sub>2</sub> インキュベーターにて3週間培養したものを用いた。非石灰化および石灰化組織由来VICsにおけるTERT遺伝子の発現量とTERTを中心としたシグナル伝達に関与する分子のタンパク質の遺伝子発現量を統合して解析する目的で、それぞれの細胞に対してマイクロアレイ解析を実施した。

#### 4. 研究成果

(1) (2) 大動脈狭窄弁組織を直接ホモジナイズし、total タンパク質および total RNA を抽出後、Coomassie brilliant blue 染色によりその組織中に存在する総タンパク質の可視化、さらにはリアルタイム定量 PCR により細胞外マトリックス (コラーゲン) の産生量の変化について AS 患者ごとに解析を実施し、AS 病態解明に向けた基礎実験データの収集を行った (図 1)。また、AS の組織学的病態を理解するために、パラフィン切片、凍結切片を作成した。ヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色では組織構造を、エラスチカ・ワンギーソン (E.V.G) 染色では弾性線維の可視化、PAS 染色では多糖類：グリコゲン・粘液タンパク、糖タンパク、糖脂質の沈着を、マッソントリクローム染色により膠原線維沈着を可視化するためにそれぞれ組織染色を実施した。その結果、石灰化組織周辺においては、筋線維芽細胞の集積に伴ってマッソントリクローム染色で青色に強く着色され、またその周辺組織においては、糖タンパク質の蓄積も顕著であった (図 2)。このような解析により、各 AS 患者より得られた大動脈弁に対して、組織学的および生化学的特性解析結果をもとに、基礎実験データと臨床データをリンクさせ、AS 病態理解のための統合的な研究地盤を作成した。

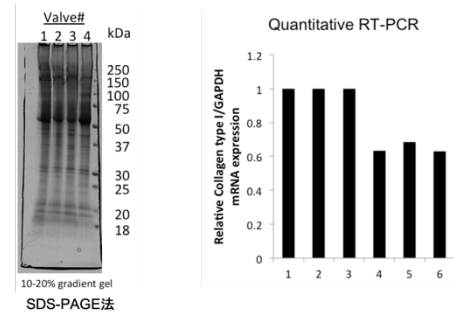


図 1. 大動脈狭窄弁からのタンパク質および mRNA の抽出実験

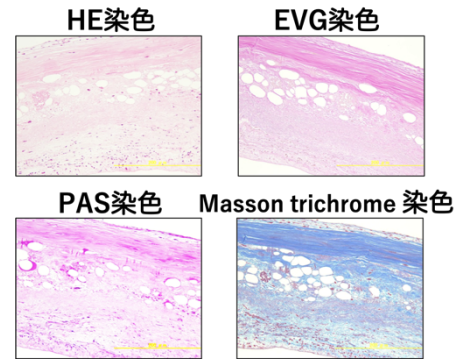


図 2. 大動脈狭窄弁の各種染色による組織学的評価

(3) AS 患者、大動脈弁閉鎖不全症患者、剖検症例から採取した大動脈弁の弁重量を計測し、その後、弁から total RNA を抽出し、TERT 遺伝子に対するリアルタイム定量 PCR を施行した。従来の研究より、弁重量と AS 重症度は、その石灰化の程度から比例関係にあることが知られており、本研究に使用した大動脈弁の石灰化レベルを弁重量を測定することで間接的に見積もった。正常大動脈弁と比較し AS 患者由来の大動脈弁の弁重量は高値を示した。また大動脈弁閉鎖不全症の弁重量は AS 弁より軽量であったが正常弁よりは重く弁厚が AS 弁より薄いものの弁のリモデリングを反映していると考えられた。一般的に AS の病態に関与すると考えられている Transforming Growth Factor- $\beta$  1 (TGF- $\beta$  1) の遺伝子発現を検討したところ既知の報告のように AS 弁で正常弁と比較し上昇していた (図 3)。このように、弁重量が高値でかつ組織中 TGF- $\beta$  1 の発現量が高い AS 患者由来弁を用いて TERT 遺伝子に対する定量 PCR を施行した。その結果、剖検症例から採取した正常弁、あるいは大動脈弁閉鎖不全症由来の弁と比較し、AS 弁では TERT mRNA レベルは、発現が高い傾向であることが分かった (図 4)。AS の重症度・弁重量により TERT 遺伝子の発現を検討したところ、特に重症の AS 患者において TERT 遺伝子の発現増加が認められた (図 5)。現在、検体数を増やして更なる統計処理解析を進めているところである。

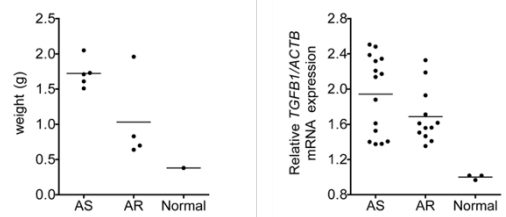


図 3. 弁重量と TGF- $\beta$ 1 の発現

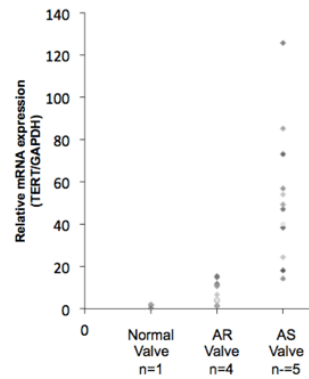


図 4. 大動脈弁における TERT の遺伝子発現

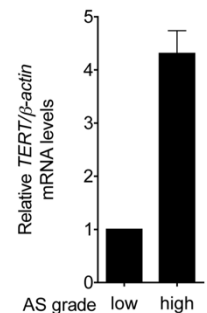


図 5. 大動脈狭窄症患者の重症度と病変部における TERT の遺伝子発現

(4) 定量 PCR の結果をタンパク質レベルで検証するために、抗 TERT 抗体を用いた免疫組織染色を施行した。その結果、正常弁では大動脈弁組織表層に位置する内皮細胞と弁中部の間質の特定の細胞に染色性を認め、狭窄弁においても内皮細胞と弁中部の弁肥厚した VICs 周辺に強い染色性を認めた (図 6)。これらの結果から、TERT は VICs に過剰発現し、弁石灰化に関与している可能性が示唆された。一方、TERT 遺伝子はテロメア長の調節に必須であり、細胞老化にも大きく関わっている。我々は、AS 弁に対する TERT

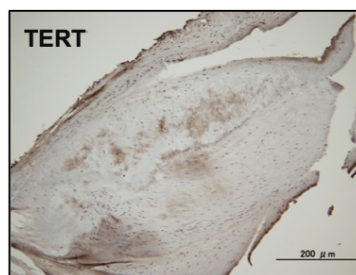


図 6. 大動脈狭窄症患者の病変部における TERT のタンパク発現

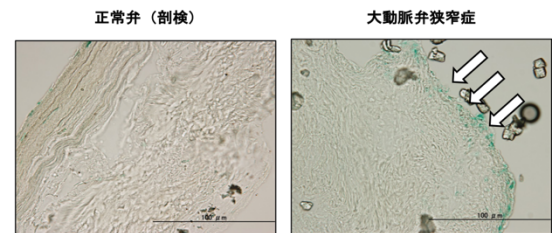


図 7. 大動脈狭窄症のβガラクトシダーゼ染色 (老化)

の免疫組織染色において強陽性となっていた内皮細胞にも注目した。老化細胞を可視化する $\beta$ ガラクトシダーゼ染色を実施したところ、正常弁における染色性は弱かったものの、AS患者由来大動脈弁の内皮細胞において強い染色性が認められた(図7)。このような細胞はTERTが過剰に発現していることから、血管内皮細胞のバリア機能の破綻や内皮細胞の活性化機構におけるTERTの役割について、その重要性が示唆される結果であった。

(5) 近年、VICsは、TGF- $\beta$ などの受容体刺激により、骨芽細胞や軟骨細胞に分化することで、異所性石灰化に重要な役割を果たすことが明らかにされつつある。そこで、VICsにおけるTERTの役割を明らかにするために、AS患者より採取した大動脈狭窄弁を石灰化部、非石灰化部に分割し、それぞれVICsを採取・培養した。採取した培養細胞はコラゲナーゼ処理により組織から取り出した後、37°C CO<sub>2</sub>インキュベーターで3週間培養したものをを用いた。非石灰化および石灰化組織由来TERT遺伝子の発現量とTERTを中心としたシグナル伝達を構成する分子の遺伝子発現量を統合して解析する目的で、それぞれの細胞に対してマイクロアレイ解析を実施し、それぞれの細胞における遺伝子発現プロファイルを明らかにした。解析対象とした5名全てのAS患者のうち、全ての患者に共通して石灰化組織由来VICs特異的に高発現するあるいは低発現する遺伝子が100以上見つかった。しかし、予想に反してVICsにおけるTERTの発現レベルは他の遺伝子群と比較し低値を示しており、石灰化・非石灰化組織においてmRNAレベルでの発現量に差を認めなかった。免疫組織染色の結果から、AS患者由来石灰化組織周辺に局在するVICsにおいてはTERT強陽性であり、生体から取り出し、培養を継続する過程で、TERT遺伝子の発現量が低下した可能性もあるため、今後は過剰発現系に切り替えて弁VICs石灰化における役割解明を進める予定としている。また、マイクロアレイデータの中で石灰化組織由来VICsにおいて高い発現を示し、かつTERTの発現を制御すると報告されている54kDaの脂質代謝酵素Yに注目し解析を進めた。剖検より採取した正常大動脈弁組織と大動脈弁置換術の際に採取したAS弁組織に対して免疫組織染色を実施したところ正常大動脈弁には、ほとんど脂質代謝酵素Yの発現を認めなかったが、AS大動脈弁組織の中でも、特に石灰化の周囲に過剰な発現亢進を認めた。また同部位ではTERTの発現も認めており、酵素YとTERTのシグナル関連性が示唆された。現在、単離培養したVICsにおいて、脂質代謝酵素Yの過剰発現や発現抑制に伴うTERT遺伝子の発現変化について定量PCRやWestern blotting法を用いて検証している。ASの病態進行において、脂質代謝酵素YからTERTへのシグナル伝達経路の重要性が明らかになれば、新たな病態メカニズムの解明ならびに創薬開発につながる可能性がある。

今後、内皮細胞と間質細胞の両面からAS発症におけるTERTの機能的役割について更なる解析を進め、学会や学術論文を通じて情報発信する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Sakaue T, Nakaoka H, Shikata F, Aono J, Kurata M, Uetani T, Hamaguchi M, Kojima A, Uchita S, Yasugi T, Higashi H, Suzuki J, Ikeda S, Higaki J, Higashiyama S, Izutani H.	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 Biol Open.	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） なし	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 青野 潤, 濱口 美香, 末廣 千佳, 高橋 佳世, 坂上 倫久, 中岡 裕智, 倉田 美恵, 鈴木 純, 池田 俊太郎, Bruemmer Dennis, 増本 純也, 東山 繁樹, 泉谷 裕則, 山口 修	4. 巻 37
2. 論文標題 動脈硬化性疾患におけるテロメラゼ・テロメアの役割	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 愛媛医学	6. 最初と最後の頁 117 - 123
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 無
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〕

-

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	末廣 千佳 (Suehiro Chika) (00770356)	愛媛大学・医学部附属病院・医員  (16301)	
研究分担者	坂上 智城 (Sakaue Tomoki) (40725917)	愛媛大学・医学系研究科・寄附講座講師  (16301)	