

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08068

研究課題名(和文)新規血管石灰化マウスを用いた大動脈弁狭窄症のメカニズム解析

研究課題名(英文) Exploring the mechanism of aortic stenosis by analyzing the novel vascular calcification model mouse

研究代表者

芦田 昇 (Ashida, Noboru)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：00538978

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)：大動脈弁狭窄症(AS)は日本において頻度の高い心血管疾患であり、その罹患患者数は増加傾向にある。このためASの進行を抑制する治療戦略の開発が急務であるが、大動脈弁の石灰化の詳細なメカニズムは明らかにされていない。本研究においては血管石灰化とASとのメカニズム的な共通点に注目し、申請者らが作成・報告した血管石灰化モデルマウスをもちいて大動脈弁狭窄モデルを作成し、また筋線維芽細胞を培養してその分子的特徴を解析した。その結果、ASモデルの作成に成功した。また筋線維芽細胞の解析においてはIKK がノックアウトされることで老化が促進されることを見出し、AS形成との関連が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大動脈弁狭窄症(AS)は心臓流出路の重度閉塞が引き起こされる疾患である。加齢はASの強力なリスク因子であり、高齢化が進む日本においてはその罹患患者数は増加傾向にある。高度AS症例に対しては治療を行うが、観血的・外科的治療であるため相応のリスクが存在する。しかしながら現在のところASの進行抑制に有効であることが示されている薬物療法は存在せず、それは大動脈弁の石灰化の詳細なメカニズムは明らかにされていないために他ならない。本研究の結果は炎症制御転写因子であるNF- κ BがAS形成に深く関与していることを示唆する知見であり、新たな治療戦略の開発につながる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Many people suffer from aortic stenosis in Japan, however, there is no effective treatment to stop its progression because the mechanism of aortic valve calcification is completely unknown. We focused on the similarity between vascular calcification and aortic valve calcification, and we tried to explore the mechanism of AS by inducing AS in our vascular calcification mouse model in which IKK is deleted in myofibroblasts and vascular smooth muscle cells, and also by analyzing the myofibroblasts cultured from the skin of vascular calcification mouse model. We could make AS by stimulating aortic valve with guide wire for PCI (Percutaneous Coronary Intervention). In terms of myofibroblasts analysis in vitro, we found that deletion of IKK induces senescence, which would implicate the link to the mechanism of aortic valve stenosis.

研究分野：循環器内科学 分子生物学

キーワード：大動脈弁狭窄症 NF- κ B 老化 石灰化

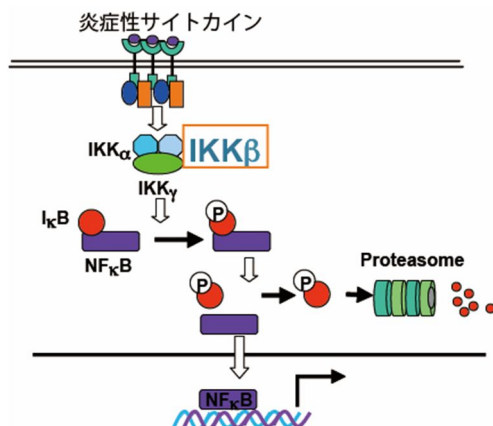
1. 研究開始当初の背景

大動脈弁狭窄症 (AS) は進行性の線維石灰化リモデリングおよび大動脈弁尖肥厚を特徴とし、数年かけて進展すると心臓流出路の重度閉塞が引き起こされる。先進国において AS は冠動脈疾患と全身性動脈性高血圧に次いで 3 番目に頻度の高い心血管疾患であり、その罹患率は一般集団で 0.4%、65 歳以上では 1.7% である。加齢は AS の強力なリスク因子であり、高齢化の進む日本においてはその罹患患者数は増加傾向にある。

症状が出現してからの高度 AS の予後は不良であるため、症状のある高度 AS 症例や、無症状であっても血行動態的に高度 AS であれば治療を行う。治療としては開胸術による大動脈弁置換術 (AVR) かカテーテル AVR (TAVI) が行われるが、そのいずれにせよ高度石灰化を伴う大動脈弁に対する観血的・外科的治療であるため相応のリスクが存在する。また人口の高齢化に伴い AS 患者がより増加することが予想され、医療経済的な面でも AS の進行を抑制する治療戦略の開発が急務である。しかしながら現在のところ AS の進行抑制に有効であることが示されている薬物療法は存在せず、それは大動脈弁の石灰化の詳細なメカニズムは明らかにされていないためである。

大動脈弁の石灰化と病理学的によく似た疾患として血管の石灰化がある。血管の石灰化においては血管平滑筋が骨芽細胞へ分化することがそのメカニズムとしてよく知られているが、大動脈弁の石灰化においても弁を構成する心臓弁間質細胞、特に筋線維芽細胞が骨芽細胞へと分化し、弁自体の骨化をきたしていることが報告されている。しかしながら、その分子メカニズムについては血管石灰化・動脈弁石灰化ともに詳細は不明である。

例えば、NF- κ B の石灰化における役割はほとんど解明されていない。炎症反応制御において中心的役割を果たす NF- κ B は TNF などの炎症惹起物質によってそのシグナル経路が活性化され、IKK α , IKK β , IKK γ 複合体のリン酸化、I κ B のリン酸化及び分解を介して最終的に NF- κ B が核内に移動することによって転写因子として各種蛋白やサイトカインなどの発現を制御する。この NF- κ B シグナルの動脈硬化における役割はよく解析されているが、血管や大動脈弁の石灰化における役割はほとんどわかっていない。興味深いのは、NF- κ B を不活化することにより動脈硬化を抑制する薬物として臨床で確たる地位を確立したスタチンが、様々な臨床研究においてことごとく石灰化への効果が否定され、特に血管石灰化についてはスタチン投与が逆にこれを促進するという報告がなされていることである。このことは石灰化における NF- κ B シグナルの役割の不透明さと、その解析の重要性を示唆している。



2. 研究の目的

我々は、NF- κ B の活性化に不可欠なキナーゼである IKK を血管平滑筋・筋線維芽細胞において欠損したマウス (KO マウス) を作成したところ、大動脈への CaCl₂ 塗布による血管石灰化モデルにおいて石灰化が亢進することを観察した。また、そのメカニズムとして KO マウスの血管平滑筋においては骨芽細胞への分化を促進する遺伝子を制御する転写因子 Runx2 が増加しており、またその制御分子である β -catenin が活性化していることを見出した (*Journal of the American Heart Association*)。このマウスはこれまでのような骨石灰化に関連する遺伝子群を改変したマウスではない点で血管石灰化モデルとして独創的であり、また血管平滑筋細胞のみならず筋線維芽細胞においても遺伝子改変がなされている点で、大動脈弁石灰化の研究においても好適である。

そこで本研究においては、この血管石灰化マウスを用いて大動脈弁石灰化モデルを作成することにより大動脈弁石灰化のメカニズムを解析し、その進行を抑制する治療戦略を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

大動脈弁石灰化モデルとして、エコーガイド下に PCI 用ガイドワイヤーを頸動脈から左心室まで挿入し、それを前後回転させて大動脈弁に機械的刺激を加えることにより、安定して大動脈弁の石灰化が形成されることが報告されている。このモデルを我々の血管石灰化マウスにおいて作成し、組織学的評価を含めてその表現形を観察した。また in vitro での検討ではマウス皮膚から採取・培養した線維芽細胞を用いた。

【使用したマウス】血管平滑筋および筋線維芽細胞において発現する SM22 をプロモーターとした SM22 Cre⁺/ - マウスを、IKK flox マウスと掛け合わせるにより KO マウスを作成した。

【大動脈弁石灰化モデル】麻酔下に PCI 用ガイドワイヤーを総頸動脈から挿入し、心エコーで確認しながら先端を大動脈弁遠位まで通過させた。しかるのち前後方向に 20 回、回転方向に 20 回ワイヤーを動かすことにより大動脈弁に機械的刺激を与えた。術後 6 週間後に sacrifice を行った。

【筋線維芽細胞解析】マウスの皮膚から線維芽細胞を培養し、TGF- β で刺激することにより筋線維芽細胞に分化させ解析した。

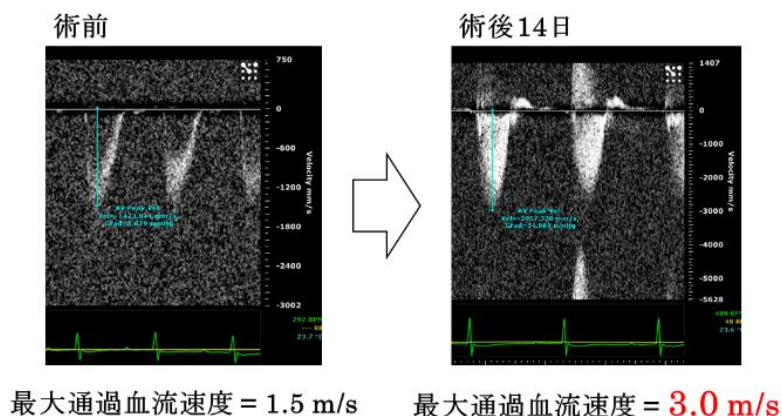
4. 研究成果

【大動脈弁石灰化モデル】大動脈弁石灰化モデルとして、エコーガイド下に PCI 用ガイドワイヤーを頸動脈から左心室まで挿入し、それを前後回転させて大動脈弁に機械的刺激を加えることにより、安定して大動脈弁の石灰化をきたすマウスモデルの作成を行ったところ、ドップラー心エコーでの大動脈弁の流速亢進を認め、大動脈弁狭窄が起きていることが示唆された。その組織学的評価を行ったところ、大動脈弁の肥厚と石灰化を認めた（右上下図）。

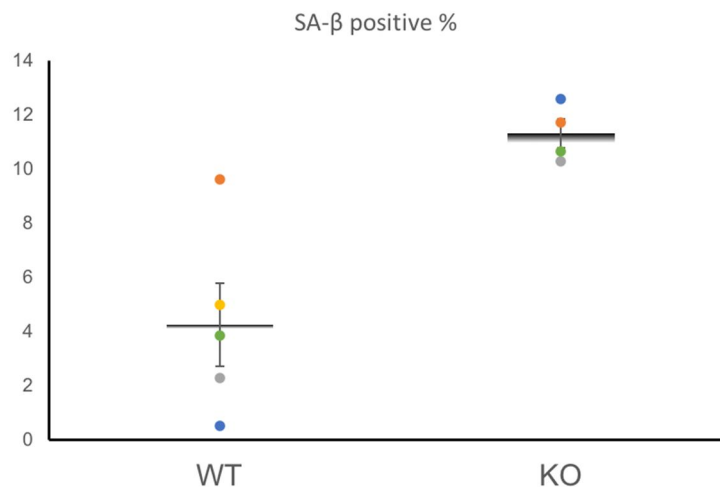
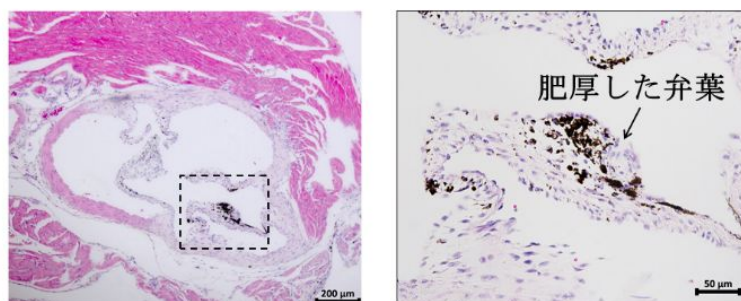
本年度はこのモデルを追加して作成したが、やはり手術による死亡が相当数にあり、手技のさらなる熟練が必要と思われた。あるいは、高脂肪食を与えるなどの別の大動脈弁狭窄モデルの併用も考慮すべきと考えられた。

【筋線維芽細胞解析】皮膚線維芽細胞の培養系の確立：大動脈弁石灰化の分子的メカニズム解析のため、マウス皮膚から線維芽細胞を培養し、TGF- β で刺激することにより筋線維芽細胞に分化させる系の確立を試みたところ、それに成功した。予想外の知見としては、線維芽細胞を培養しただけで TGF- β で刺激するまでもなく筋線維芽細胞のマーカーである SMA が発現しており、筋線維芽細胞に分化していることが認められた。これはすでに報告されている、線維芽細胞が固い面において培養されると筋線維芽細胞に分化することが再現されたものと思われる。さらに IKK ノックアウトマウスおよび野生型マウスからの培養皮膚線維芽細胞を比較したところ、IKK ノックアウトマウス線維芽細胞において SMA の発現が有意に亢進していることを観察した。このことは IKK がノックアウトされることで筋線維芽細胞への分化が促進されることを示しており、本研究におけるメカニズムとして重要であると思われた。さらにそのメカニズムを検討していたところ、野生型線維芽細胞と比較して IKK ノックアウト線維芽細胞が早期に老化をきたして増殖が低下すること、またより早期に不死化 phase に入ることを確認した。さらに、老化マーカーである SA-gal 陽性細胞が増加していることも確認した（右下图）。

【まとめ】ガイドワイヤー刺激による大動脈弁狭窄モデルマウスについてはそれを作成することには成功したが、技術的な困難さがあり、十分な解析を行うだけのサ



HE染色



サンプルを蓄積することができなかった。ただガイドワイヤーの太さを変えるなどまだ条件検討の余地はあり、さらに高脂肪餌の投与などと組み合わせることによってより低い侵襲で十分な石灰化をきたすモデルを作成できる可能性はあると考えられるので、今後も検討を行っていく予定である。一方、筋線維芽細胞の解析においては IKK のノックアウトにより SMA の発現が亢進すること、さらに老化の表現型を呈することは想定外であった。老化に伴って大動脈弁狭窄が進行する事は、臨床においてもよく知られているところであることを鑑みると、筋線維芽細胞の IKK がノックアウトされることにより老化が亢進し、その結果として SMA が上昇して大動脈弁狭窄が進行する可能性が示唆された。以上の結果は大動脈弁狭窄における NF- κ B シグナルの未知なる制御の存在を示しており、その詳細な解析は大動脈弁狭窄の進行抑制などの新たな治療戦略の開発に繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 Al-Huseini Ishaq, Harada Masayuki, Nishi Kiyoto, Nguyen-Tien Dat, Kimura Takeshi, Ashida Noboru	4. 巻 9
2. 論文標題 Improvement of insulin signalling rescues inflammatory cardiac dysfunction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-51304-8	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 芦田 昇	4. 巻 275
2. 論文標題 心臓疾患における線維化	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ特集号 臓器線維症を科学する - 病態解明と治療法開発への展望 -	6. 最初と最後の頁 1119-1124
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 -

1. 著者名 芦田 昇	4. 巻 7
2. 論文標題 炎症を再考する 血管石灰化におけるNF-κBシグナルの働き -	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JISCP（日本心血管協会）会誌 心血管薬物療法	6. 最初と最後の頁 8-12
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10件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 芦田 昇
2. 発表標題 Role of inflammatory signaling in vascular calcification
3. 学会等名 23rd Annual Scientific Meeting of the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 芦田 昇
2. 発表標題 The true colors of myofibroblast in heart - where it comes, and where it goes -
3. 学会等名 第50回日本結合組織学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 芦田 昇
2. 発表標題 Roles of IKK-beta in vascular calcification
3. 学会等名 第50回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 芦田 昇
2. 発表標題 Unanticipated roles of IKKb in vascular calcification
3. 学会等名 第2回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉岡 紗千子、芦田 昇、木村 剛
2. 発表標題 心筋緻密化障害 (LVNC) における心臓線維芽細胞NF- Bシグナルの役割
3. 学会等名 第17回日本心臓血管発生研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 芦田 昇
2. 発表標題 IKK as a common basis of calcification, fibrosis and senescence
3. 学会等名 第51回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芦田 昇
2. 発表標題 心臓発生における機能不全心筋細胞clearance機構の可能性
3. 学会等名 第18回日本心臓血管発生研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉岡 紗千子、芦田 昇、木村 剛
2. 発表標題 Activated NF- B signaling Both in Cardiomyocytes and cardiac fibroblasts induces Non-compaction Cardiomyopathy
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河合 喬文、芦田 昇、木村 剛
2. 発表標題 Deletion of IKK in Myofibroblasts Augments Cardiac Fibrosis after Myocardial Infarction
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原田 雅之、芦田 昇、木村 剛
2. 発表標題 The roles of IKK in the differentiation from dermal fibroblasts to adipocyte
3. 学会等名 第52回 日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2020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

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