

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16396

研究課題名(和文)大動脈弁狭窄症の治療標的分子の同定および治療薬の開発について

研究課題名(英文)Molecular-based analysis and therapeutic development of aortic valve stenosis

研究代表者

浪口 謙治(Namiguchi, Kenji)

愛媛大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10815343

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):大動脈弁狭窄症(AS)は未だその発症メカニズムが解明されていない。現在の治療法は心膜由来生体弁を移植する大動脈弁置換術または留置術が主流であるが、生体弁もまた石灰化を起こすことがある。本研究では、自己弁および生体弁の石灰化機構に着目し、石灰化がおこる機構を分子レベルで明らかにするため、網羅的遺伝子およびタンパク質発現解析を実施した。その結果、自己弁石灰化を規定する因子として、酸化ストレス制御因子と糖タンパク質ホルモンを新たに見出した。また、生体弁の石灰化はコラーゲン線維の損傷が開始点となっている可能性が示唆され、自己弁石灰化とは異なる機序である事も分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大動脈弁組織において石灰化が起こる分子機構は未だに不明である。我々が実施している臨床検体を開始点としたトランスレーショナル研究は、ASの新規治療法の開発に繋がる。特に本研究で見出した石灰化関連分子はAS治療の新しい標的となる可能性があり、今後の研究が期待される。また、一方で今回新たに見出した生体弁劣化機構に関する研究成果は、今後劣化しない耐久性のある生体弁の開発に繋げることができる。

研究成果の概要(英文):The molecular mechanism of aortic valve stenosis remains unknown. Calcified aortic valves are replaced with porcine or bovine pericardium-derived bioprosthetic valves. However, the implanted bioprosthetic valves are occasionally explanted due to structural valve degeneration. In the current study, we focused on molecular mechanism underlying calcification of native and bioprosthetic valves. Comprehensive mRNA and protein expression analyses discovered oxidative stress-related proteins and glycoproteins as the master regulators of calcification. Additionally, we also found that collagen digestion might prime calcification of bioprosthetic valves. Taken together, our results contribute to the establishment of anti-deterioration therapy for valve calcification.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：大動脈弁狭窄症 石灰化 生体弁 骨芽細胞 膠原線維 心膜癒着組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

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 (Aortic valve stenosis: AS)は、弁が石灰化あるいは線維化を起こして狭窄し、心不全を誘発する疾患である。我が国では高齢化と生活習慣の欧米化により、患者数が増加しており、AS 発症に至るまでの分子メカニズムの解明が急務となっている。現在 AS の治療法は、石灰化した自己弁を摘出し、ウシまたはブタ心膜由来の生体弁を移植する大動脈弁置換術などが知られている。しかし、生体弁は 15 年ほどで劣化することが知られており、生体弁劣化機序の解明やその予防治療法の開発もまた必要であるとされている。

2. 研究の目的

大動脈弁置換術により採取した石灰化由来または非石灰化由来大動脈弁間質細胞を調整・培養し、大動脈弁石灰化の分子メカニズムの解明を目指した。また、本研究では非石灰化と石灰化大動脈弁組織から抽出したタンパク質および核酸に対して網羅的発現解析を実施し、AS 治療標的分子の同定を試みた。さらに、生体弁の劣化機序を明らかにするとともに、劣化しない生体弁組織の開発につながる技術開発を目指した。

3. 研究の方法

大動脈弁置換術によって採取された大動脈弁を石灰化および非石灰化組織に分けた。それぞれの組織におけるカルシウム含有率はメタロアッセイにより定量化した。また、大動脈弁間質細胞から骨芽細胞へと分化させるため、骨芽分化誘導培地 (ケー・エー・シー社製) にて 3 週間培養し、アリザリンレッド染色にてカルシウム沈着を定量化した。さらに、それぞれの組織から核酸およびタンパク質については、有機溶媒を用いた手法により抽出した。遺伝子発現解析は、Mi-seq により、またタンパク質発現解析は Liquid Chromatograph-Mass Spectrometry (LC-MS/MS) を用いて実施した。組織学的解析については、得られた組織に対してパラフィンブロックを作成した後、5 μm ごとに薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色にて組織構造を、マッソントリクローム染色により膠原線維を、von Kossa 染色にて石灰化を、免疫組織染色によって解析対象とする分子の同定を解析した。

4. 研究成果

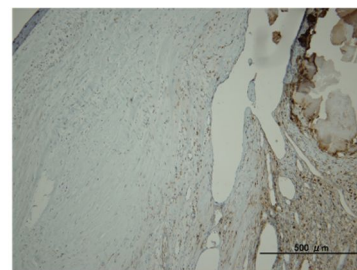
大動脈弁石灰化組織特異的に高発現するタンパク質の同定

石灰化組織および非石灰化組織から培養した大動脈弁間質細胞に対して、タンパク質発現解析を実施したところ、石灰化組織由来間質細胞で高発現するタンパク質として分子量約 23 kDa の酸化ストレス制御因子を新たに同定した。本因子は、大動脈弁組織において石灰化組織周辺に浸潤する間葉系細胞において高発現していることから (図 1) 大動脈弁の病態進行に伴って弁間質細胞が受ける酸化ストレスに対して、間質細胞を保護する役割を担うものと考えられた。しかし、どのようなメカニズムで発現上昇するのか、あるいは AS 治療標的としての可能性については、現在 *in vitro* および *in vivo* 実験を通じて更なる検討を重ねているところである。

また一方で遺伝子発現網羅解析から、大動脈弁石灰化組織特異的に発現低下する糖タンパク質ホルモン (CRGP と命名) を同定することに成功した。これらのタンパク質をヒト間質細胞に対して RNA 干渉法により遺伝子発現レベルを低下させることで、アリザリンレッド陽性となる骨芽分化への分化効率が著しく向上することがわかった (図 2)。この結果から、この糖タンパク質は骨芽細胞分化を負に制御する機能を持っており、AS の病態進行に従って発現低下し、結果的に大動脈弁石灰化が加速される可能性が考えられる。今後は、AS モデルマウスを用いて、本糖タンパク質を投与することで AS 病態が改善することを証明し、AS 治療薬としての可能性を実証する研究を進める予定としている。

生体弁劣化機序の解析と劣化しない次世代型生体弁の開発

本邦にて移植されている生体弁の多くはウシあるいはブタ心膜由来である。また最近ではカテーテルにて生体弁を移植する経カテーテル大動脈弁留置術 (TAVI) が主流になってきており、生



非石灰化 石灰化

図 1. 酸化ストレス制御因子 23 kDa-protein の大動脈弁組織における局在解析結果

コントロール 発現抑制

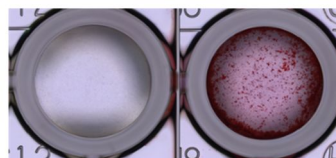


図 2. CRGP 発現抑制による石灰化亢進 (アリザリンレッド染色)

生体弁劣化機序の解明は急務となってきた。Von Kossa 染色の結果、生体弁も自己弁ともに著しいカルシウム沈着が起きており、その周辺に多数のビメンチン陽性の間葉系細胞が集積していた。一方で、マッソントリクローム染色の結果、生体弁においてのみ弁組織を構成する膠原線維の断裂所見が多数認められていることと(図 3A) さらにその組織断裂によって形成された間質スペースに多数の細胞浸潤が認められていた(図 3 アスタリスク)。このような組織初見は自己弁においてはほとんど認められず、心膜由来生体弁特異的であることがわかった。この組織学的解析から、生体弁の劣化予防法の開発には血管内皮細胞バリアの形成、あるいは膠原線維の強化が重要であるという結論を得た。しかし、前者については、心膜組織を組織固定することによって血管内皮細胞の浸潤活性が低下する傾向にあり、困難であった。

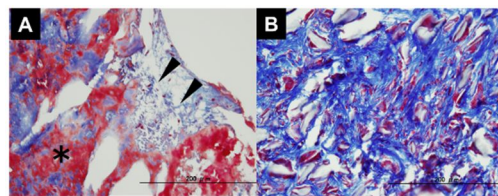


図 3. 劣化生体弁組織と心臓癒着組織のマッソントリクローム染色結果. A 劣化生体弁組織においてはコラーゲン線維の著しい損傷(矢頭)と細胞浸潤が認められた(アスタリスク). B 心臓癒着組織における。

そこで、我々が次世代型の生体弁の組織構造を考案する上で着目したのが心膜癒着組織である (Kojima A et al. *J Cardiothoracic Surg.* 2019)。小児心臓外科のみならず、成人心臓外科において再手術時に問題となるのが心膜癒着である。マッソントリクローム染色の結果、心臓周囲に形成される癒着組織は強力な膠原線維層を形成している。モデルマウスを用いた継時的な癒着組織形成の解析から、コラーゲン線維は周辺組織からの線維芽細胞の浸潤によって形成され、その後膠原線維が形成された後に消失し、半永久的に癒着組織が生体内に残存する。この線維芽細胞消失後の癒着組織は自己弁の構造と同様にコラーゲンが極めて高密度であり次世代の生体弁の素材として有望であるとの結論に至った。癒着組織形成を応用したコラーゲンシートを作成し、生体弁としての機能評価を進めているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

愛媛大学医学部医学科 心臓血管呼吸器外科学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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------