

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16399

研究課題名(和文)大動脈弁狭窄症におけるエクソソームが石灰化、病態に与える影響の解析

研究課題名(英文)Effects of exosome to calcification and pathology in aortic valve stenosis

研究代表者

上田 英昭(Kanda, Hideaki)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：50598274

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)に対して大動脈弁置換術(AVR)を行う対象の血液検体で、蛋白質発現を制御するマイクロRNAを1年後まで解析した。ヒトが保有するマイクロRNAは数千種類あり、経過中に変化するものをプロファイリングした。検出されたマイクロRNA-Xに対して経時変化を確認すると、半年後から術前より優位に増加していた。細胞に対する作用機序までは解明できなかったが、少なくとも対象マイクロRNA-Xは血管平滑筋細胞の石灰化を抑制しており、今後はマイクロRNA-Xとエクソソームとの関連を調査する。ASに対してAVRを行うことで、循環の改善だけでなく石灰化の進行も抑えられ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

大動脈弁狭窄症の病態制御にマイクロRNAが関与していることが示された。今回検出されたマイクロRNA以外にも関与しているものもあり得て、それらを複合して検査することで新たな病態進行のバイオマーカーになる可能性が考えられた。

また本研究で得られたマイクロRNAは、その他の循環器疾患においても関与している可能性があり、他疾患での検討にもつなげていけると考えられた。

研究成果の概要(英文)：MicroRNAs that regulate protein expression were analyzed from preoperation to one year later on blood samples from patients underwent aortic valve replacement (AVR) for aortic stenosis (AS). There are thousands of microRNAs in humans, and we have profiled microRNAs that changing before surgery to 3 month later on blood sample. Detected microRNA-X was analyzed another patient's blood samples, it was found that the microRNA-X expression was increasing compared to before surgery after 6 months later. Although the mechanism of microRNA-X affecting to cells has not been elucidated, at least the target microRNA-X suppresses calcification of vascular smooth muscle cells, and we will investigate the relationship the microRNA-X with exosomes in the future. At least, it was suggested that performing AVR for AS may not only improve circulation but also suppress the progress of calcification.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：大動脈弁狭窄症 マイクロRNA エクソソーム シアストレス 石灰化 血管平滑筋

1. 研究開始当初の背景

高齢化により加齢変性に伴う大動脈弁狭窄症が増加している。治療には大動脈弁置換術が施行されるが患者への侵襲は大きく、手術費用も高額であり社会保険にかかる負担も大きい。さらなる患者数増加に対して、新たな治療が求められる。

加齢性変性に伴う大動脈弁狭窄症の原因の多くは弁の石灰化であり、石灰化に関する研究がなされている。過去の研究で石灰化は高カルシウムあるいは高リンの環境下、あるいは物理的なストレスがかかる環境下で平滑筋細胞が骨芽細胞様に変性して骨形成と類似した過程を経て起こるといわれている(Trends Cardiovasc Med.2015)。しかし、細胞を変性させて石灰化に向かわせる因子と、それらがどのようにして細胞内へ輸送されているかがはっきりしていない。そこで私たちは、細胞間情報伝達を行うエクソソームが石灰化に関係するマイクロ RNA(miRNA)を内包して細胞内に輸送していると考えた。

エクソソームは $\phi 20\sim 100\text{nm}$ ほどの分泌小胞であり、血球、血管内皮細胞、平滑筋など様々な細胞から放出されている。様々な物質を内包しており、細胞から放出された後に離れた細胞や組織に取り込まれ情報伝達を行うといわれている。癌細胞から放出されるものではその進行に関与していると言われており、心血管系疾患の進行にも関与している可能性がある。

miRNA は 20~25 塩基長の短鎖 RNA であり、標的遺伝子を調整し、癌を始め多くの疾患に影響を与えることがわかってきている。心血管領域でも miRNA の関与する疾患の報告があり、弁膜症の進行や病態にも関係している可能性がある。

私たちは大動脈弁狭窄症のエクソソームを解析することで、石灰化を始めとする弁膜の加齢性変性や循環動態に影響する miRNA やその関連分枝を解明でき、今後の新たな治療の開発、周術期の病態を予測する新たなバイオマーカーの解明に結び付くと考えている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大動脈弁狭窄症患者の手術前後の血液検体からエクソソームを分離して内在する miRNA を始めとする関連分子を解析することで、大動脈弁狭窄症での石灰化を始めとする加齢性変性を進行させる因子を解明し、さらに周術期の病態に関連する新たなバイオマーカーを解明することである。

3. 研究の方法

本研究では、鹿児島大学医歯学総合研究科循環器・呼吸器講座、心臓血管消化器外科学分野および血管代謝病態解析学分野との共同で行った。患者検体は心臓血管・消化器外科学分野で手術を受ける対象より収集した。以下に示す miRNA、蛋白質について術前後を通して解析し、石灰化を始めとする加齢性変性へ影響を及ぼす因子および周術期循環動態と関連のある因子の解析を行った。

(1) 検体収集: 鹿児島大学病院倫理委員会で認可を受けた『大動脈弁狭窄症における炎症、

石灰化、凝固能に関するマイクロ RNA、エクソソームの解析』に基づいて患者検体収集を行った。術前および術後、1 日目、3 日目、7 日目、14 日目、1 か月目、3 カ月目、6 カ月目、1 年目の 10 ポイントで採血を施行し、血漿、血清を分離した。分離した血漿、血清をさらに段階的に遠心処理を行い、最終的に超遠心機を使用してエクソソームを採取した。採取した血漿、血清およびエクソソームは-80 度に保存した。また、手術時に切除した大動脈弁も回収し-80 度で保存した。

(2) エクソソームおよび血漿、血清中の血管増殖因子関連蛋白質解析：保存した血漿、血清、エクソソームを用いて、血管増殖因子関連蛋白質(VEGF)、vWF の測定をウェスタンブロット法および ELISA 法を用いて行った。

(3) miRNA の解析：血清、血漿、エクソソームより miRNA を抽出した。典型的な術前、術後経過をたどった検体で miRNA の網羅的解析を行い、有意上昇あるいは減少を示すマイクロ RNA を解析した。有意変化があった miRNA に対して、複数のポイントの検体で qPCR 法を行い半定量評価して術前後の経時的な変化を解析した。

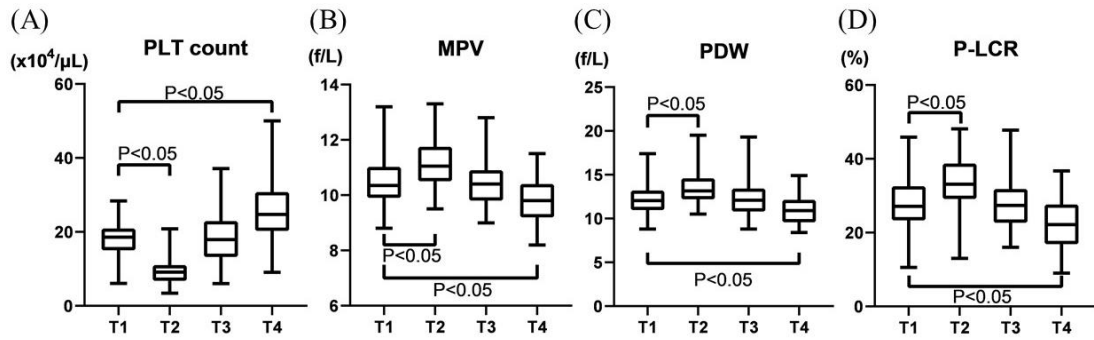
(4) 2・3 で抽出した蛋白質と miRNA の関係の解析：miRNA は標的遺伝子発現を負に制御するので、負の相関のある蛋白質を抽出した。抽出した miRNA を培養細胞に導入して標的遺伝子蛋白質の変化を調べた。

(5) 石灰化の評価：石灰化刺激を行った血管平滑筋細胞に対して、カルシウム結石が染色される Alizarin Red S 染色を行い肉眼的に石灰化の程度を確認した。また石灰化、骨形成の程度と相関するアルカリホスファターゼ活性を測定して、石灰化の定量的評価を行った。先の蛋白質および miRNA の解析結果と比較して、実際の石灰化と蛋白質、miRNA の相関関係を検討した。

4. 研究成果

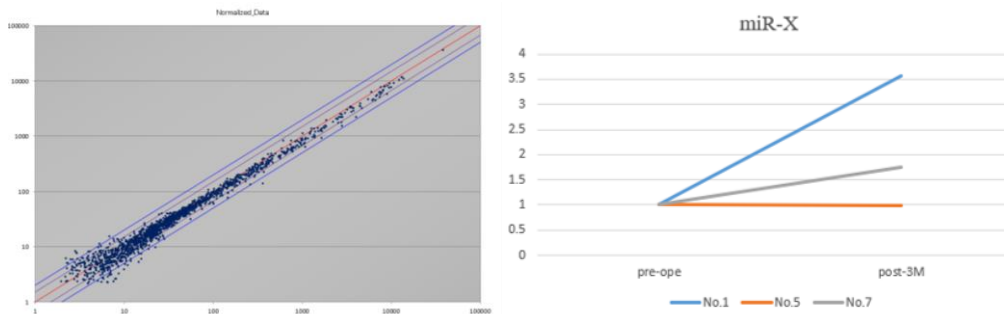
(1)大動脈弁置換術 (aortic valve replacement; AVR)前後での血球成分の変化

患者対象の血液検体を回収している間に、大動脈弁置換術を行うことでどのように血液成分に変化を与えているのかを検証するため、当院で過去 8 年間に単独大動脈弁置換術を施行した対象 78 名について末梢血液データの推移を解析した。術前 (T1)の血小板数は $18.3 \pm 4.69 \times 10^4 /\mu\text{L}$ であり、術後 1 か月目 (T4)ではそれ以上に血小板数は増加していた。血小板数の変化に伴い血小板形態を表す平均血小板容積 (mean platelet volume; MPV)、血小板分布幅 (platelet distribution depth; PDW)、大型血小板比率 (platelet-large cell ratio; P-LCR)も変化していた。AVR 施行によりシアストレスが減少し、血小板数は増加して血小板形態も安定したものと考えられ、シアストレスが血球に影響を及ぼしていることが考えられた。(T1 術前、T2 術後 3 日目、T3 術後 1 週間目、T4 術後 1 か月目)

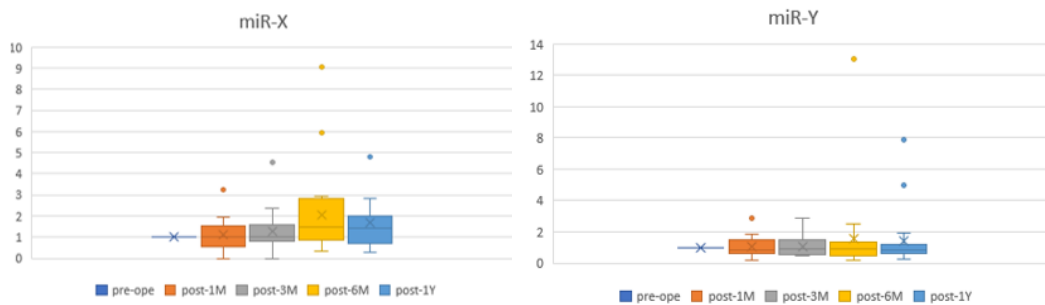


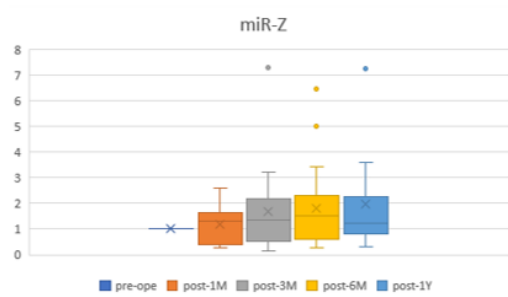
(2) miRNA プロファイリング

収集した血液検体より miRNA のプロファイリングを行った。術後 1 か月目ではまだ手術自体の影響を強く受けている可能性が考えられたので、典型的な術後経過をたどった対象 3 名の術前と術後 3 か月目の血漿を用いた。解析に用いた約 2,500 種類の miRNA の中で、優位変化があるものを 10 種類ほどピックアップした。検出された miRNA に対して、実際に血漿検体で PCR を行い同様の変化をたどった miR-X をターゲットとした。



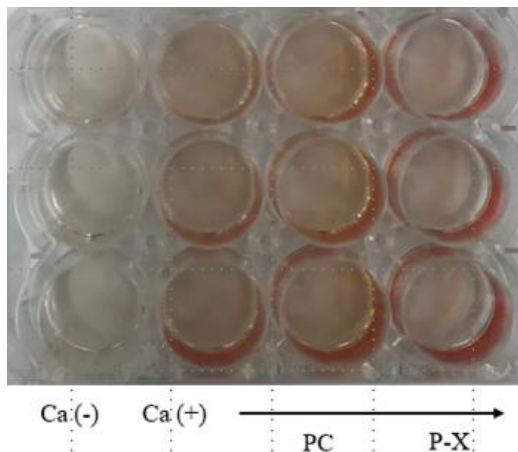
1 年目まで全ポイントでの採血ができた 19 名に対して、術前、術後 1 か月、3 か月、6 か月、1 年目の血清検体で miR-X の PCR を施行した。miR-X は経時的に増加傾向となっていた。また、網羅的解析では指摘されていないが文献的にいくつかの miRNA について PCR を施行、AVR 後に変化が見られた。





(3)血管平滑筋に対する作用

大動脈血管平滑筋 (aorta smooth muscle cell; AoSMC)を石灰化培地 (DMEM にアスコルビン酸、塩化カルシウム、 β -グリセロリン酸添加した培地) で培養した。miR-X の血管平滑筋に対する効果を確認するため、mimic miR-X を添加して 12 日間培養した。カルシウム貯留をみる Alizarin red 染色では染色が落ちることを確認した。



(4)今後の展望

miR-X が循環器系培養細胞に影響を及ぼすところまでは確認できたが、ターゲットとなる遺伝子、蛋白質までは本研究期間で解明することができなかった。また miR-X とエクソソームとの関係も確認することができてなく、今後残余検体を用いて解析を続けていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上田英昭、松本和久、山口宗一、竹之内和則、大山陽子、橋口照人、井本 浩
2. 発表標題 大動脈弁狭窄症に対する大動脈弁置換術前後での末梢血、凝固系の検討
3. 学会等名 第13回日本血栓止血学会学術標準化委員会（SSC）シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田英昭、松本和久、山口宗一、竹之内和則、大山陽子、橋口照人、井本 浩
2. 発表標題 大動脈弁狭窄症に対する大動脈弁置換術前後での末梢血、凝固系の検討
3. 学会等名 第51回日本臨床検査自動化学学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田英昭、松本和久、山口宗一、竹之内和則、大山陽子、橋口照人、井本 浩
2. 発表標題 大動脈弁狭窄症に対する大動脈弁置換術前後での末梢血、凝固系の検討
3. 学会等名 第30回日本臨床化学会九州支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田英昭、重久喜哉、向原公介、井本浩、山口宗一、橋口照人
2. 発表標題 The Impact of Shear Stress on Platelet Distribution Width in Aortic Stenosis .
3. 学会等名 第82回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上田英昭、松本和久、向原公介、重久喜哉、立石直毅、井本浩、山口宗一、橋口照人
2. 発表標題 大動脈弁狭窄症における弁置換術前後の末梢血の推移
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上田英昭、向原公介、重久喜哉、松本和久、井本浩、山口宗一、橋口照人
2. 発表標題 大動脈弁狭窄症における弁置換術前後の血小板の推移
3. 学会等名 第124回日本循環器学会九州地方会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上田英昭、山口宗一、竹之内和則、大山陽子、井本 浩、橋口照人
2. 発表標題 大動脈弁狭窄症における弁置換術前後の末梢血の推移
3. 学会等名 第58回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上田英昭、松本和久、山口宗一、竹之内和則、大山陽子、橋口照人、井本 浩
2. 発表標題 大動脈弁狭窄症に対する大動脈弁置換術前後での末梢血、凝固系の検討
3. 学会等名 第13 回日本血栓止血学会学術標準化委員会 (SSC) シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田英昭, 松本和久, 山口宗一, 竹之内和則, 大山陽子, 橋口照人, 井本 浩
2. 発表標題 大動脈弁狭窄症に対する大動脈弁置換術前後での末梢血, 凝固系の検討
3. 学会等名 第 64回日本臨床検査医学会九州地方会
4. 発表年 2019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