

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03740

研究課題名(和文) 大動脈弁石灰化における骨芽細胞分化マスターレギュレーターの同定と機能阻害剤の開発

研究課題名(英文) Identification of master regulator of osteoblast differentiation in valve calcification

研究代表者

泉谷 裕則 (Izutani, Hironori)

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90419200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈弁狭窄症(Aortic valve stenosis; AS)の薬物治療法は開発されておらず、その大動脈弁石灰化に至る分子機序も不明のままである。本研究では、AS病態形成の中でも、特に未分化な弁間質細胞から骨芽細胞への分化メカニズムと組織石灰化に焦点を当て、大動脈弁石灰化を制御するタンパク質を同定すると共に、その機能阻害剤を開発することを目的とした。スクリーニングの結果、Notchシグナルリガントを含む骨芽細胞分化に対する12種のマスター制御遺伝子の同定に成功した。また、AS病態進行に伴って石灰化組織周辺で発現低下する分泌タンパク質を発見し、新たなAS予防・治療薬の開発が期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦における弁膜症の罹患率は年々増加傾向にあり、外科的治療法の発展のみならず新たな薬物治療法の開発は急務である。本研究は大動脈弁狭窄症の中でも特にその重症度と関連する大動脈弁石灰化の分子メカニズム解明に焦点を当てたものである。試験管内で実施した石灰化アッセイを用いて特定した12種類の大動脈弁石灰化関連分子は、今後大動脈弁石灰化を予防または治療する薬剤の開発に応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：There is currently no pharmacological treatment for aortic valve stenosis (AS), and the molecular mechanisms underlying calcification of the aortic valve remain unknown. In this study, we aimed to identify the differentiation mechanism from undifferentiated interstitial cells to osteoblasts and focus on tissue calcification in the pathogenesis of AS. We also aimed to identify proteins that regulate aortic valve calcification and develop inhibitors for their function. We successfully identified 12 master regulatory genes involved in osteoblast differentiation, including Notch signaling ligands. Additionally, we discovered secreted proteins that are downregulated in the vicinity of calcified tissues during the progression of AS, raising expectations for the development of novel preventive and therapeutic drugs for AS.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：大動脈弁狭窄症 石灰化 骨芽細胞 弁膜症

1. 研究開始当初の背景

高齢化する本邦においては、加齢や生活習慣の乱れにより弁膜症 (valvular heart disease) の罹患率が増加している。弁膜症は、心臓の弁膜に異常が起こる疾患の総称であり、病態としては、心臓の弁膜の形態的な異常や機能的な障害によって引き起こされることがよく知られている (Lancet. 2006;368:1005-1011)。大動脈弁狭窄症 (Aortic valve stenosis; AS) は、弁膜症の中でも最も一般的な疾患であり、病態の進行により心臓左心室の負荷が増加し、最終的に心不全や心臓機能の低下を引き起こす疾患である。AS の重症度が進行すると、心不全や狭心症のリスクが増大する。AS は、大動脈弁間質にカルシウムが沈着することで石灰化を来し、また線維化により弁肥厚が生じることで大動脈血流が制限されることで発症する疾患である。主な治療法としては、ウシやブタ心膜を由来とする生体弁または金属やカーボンからなる機械弁への外科的置換術、または、カテーテルを介した留置術などが知られている (Circulation. 2005;111:920-925.)。一般的に AS は聴診などで発見されることが多いが、症状などが表れた時点で AS と診断された場合は病態が進行していることが多い。しかし、現代医療において大動脈弁石灰化を投薬により予防・治療する方法は開発されておらず、その大動脈弁石灰化に至る分子メカニズムも不明のままである。これまでの先行研究から、血流の乱れなどにより血小板由来の血中 transforming growth factor (TGF)- β 1 が活性化し、これが石灰化や線維化、血管新生など様々な病態を形成する中心的な役割を果たすものと考えられている (Curr Cardiol Rep. 2018 Mar 8;20(4):21.)。特に弁間質に存在する大動脈弁間質細胞 (VIC) は TGF- β 1 をはじめとする様々な炎症物質によって活性化し、VIC の増殖及び機能転換を起すことが知られる。さらに最近では、石灰化した大動脈弁組織において骨芽細胞が発現する種々のタンパク質が検出されるなど、異所性に出現する骨芽細胞によるカルシウム沈着が石灰化の一因であると考えられている (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011 Dec;31(12):2777-8.)。しかし、大動脈弁間質に出現する骨芽細胞はどのような細胞由来で、かつどのようなメカニズムで骨芽細胞へと分化を遂げるのかについては未だ不明であり、その分子機序を解明することで、投薬による大動脈弁狭窄症の予防治療法開発につながる可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究では、AS 病態形成の中でも、特に未分化な弁間質細胞から骨芽細胞への分化メカニズムと組織石灰化に焦点を当て、大動脈弁石灰化を制御するタンパク質を同定すると共に、その機能阻害剤を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

- 本研究では、大動脈弁置換術によって得られる石灰化大動脈弁または非石灰化大動脈弁より大動脈弁間質細胞を培養・維持した。培養については 2% O₂ の低酸素培養法を用いて維持し、4 週間で 100% コンフルエントになった状態の VIC を用いて骨芽細胞分化実験を実施した。
- 骨芽細胞への分化誘導は、Osteoblast-Inducer Reagent (タカラバイオ社製) を Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) に添加した培地を用いて 4 週間培養することで評価した。なお、骨芽細胞への分化評価についてはアリザリンレッド染色によって評価した。
- 遺伝子の発現解析については網羅的な RNA-seq 解析やリアルタイム RT-PCR などによって解析した。さらに Western blotting によりタンパク質レベルでの定量解析を実施した。

- AS の病態モデルとして、大動脈弁をワイヤーで損傷させることで弁石灰化を誘導できる AS モデルマウス (Honda S et al. ATVB 2014) を用いた。大動脈弁石灰化における分子機能解析を実施した。なお、大動脈弁組織における病態解明については von Kossa 染色や Masson's trichrome 染色や免疫組織学的解析などで評価した。

4 . 研究成果

大動脈弁石灰化を制御する遺伝子のスクリーニング

以前に我々は、大動脈弁狭窄症患者より培養単離した VIC のうち、石灰化組織由来 VIC (Calc-VICs) と非石灰化組織由来 VIC (Noncalc-VICs) とに分けて網羅的遺伝子発現解析を実施した (Ann Thorac Surg. 2020 Jul;110(1):40-49.)。さらに、Noncalc-VICs を用いて骨芽細胞へと分化誘導をかけ、その時に発現変動する遺伝子を網羅的に探索した。両者の実験から骨芽細胞への分化誘導を制御するマスター制御遺伝子群として 72 種リストアップしていた。本研究ではその 72 種からさらに骨芽細胞への分化誘導を制御する遺伝子を絞り込むために、siRNA ライブラリーを作製し、発現抑制によって骨芽細胞への分化誘導が抑制または加速される遺伝子群を絞り込む in vitro 実験を実施した。その結果、石灰化を制御するマスター制御遺伝子として 12 種類の遺伝子に絞り込むことに成功した。それらの遺伝子の中には銅イオンの代謝に関わる遺伝子、細胞周期の制御に関わる遺伝子、細胞骨格制御に関わる遺伝子、カリウムのトランスポートに関わる遺伝子、Notch のリガンドなどが含まれていた。Notch signaling と大動脈弁狭窄症との関連性については既に報告されており (Biomed Res Int. 2017; 6917907.) 我々が網羅的遺伝子発現解析から見出したこれら 12 種類の遺伝子については AS 治療標的としては極めて有望である。その中で特に我々は、生殖システムで機能的な役割を果たす遺伝子に着目し、新規大動脈弁石灰化制御遺伝子 (Aortic valve calcification-regulating factor; AVCRF) と命名した。

スクリーニングにより同定したマスター制御因子の局在解析と機能解析

AVCRF は生理的には卵巣や精巣から産生される分泌タンパク質であり、卵胞の発達を抑制する生理機能を有することが知られている。これらの因子がどのようなメカニズムで大動脈弁狭窄症の病態に寄与するのかについてさらに検討を重ねた。Western blotting 解析やリアルタイム RT-PCR 解析の結果、AVCRF は非石灰化組織由来 VIC で発現が高く、石灰化組織由来 VIC ではその発現量が低い傾向にあった。次に免疫組織化学的検討によりヒト大動脈弁組織における局在を解析したところ、AVCRF は非石灰化領域に局在する Vimentin 陽性の弁間質細胞において染色され、かつ正常大動脈弁組織において高発現していることがわかった (図 1)。さらに興味深いことに、AVCRF は TGF- β シグナル伝達経路を抑制することによって、TGF- β による細胞増殖や線維化を抑制する機能があると報告されている。従って、本タンパク質は正常弁においては大動脈弁の間質内のホメオスタシスを制御しており、大動脈弁石灰化を負に制御する役割を担っているものと考えられる。実際に、AVCRF のリコンビナントタンパク質を VIC に処理し、骨芽細胞への分化誘導を行ったところ、コントロール群ではアリザリンレッド

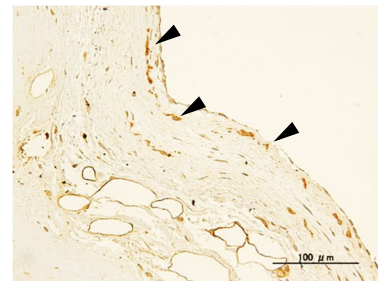


図 1. 正常大動脈弁組織における AVCRF の局在 (免疫組織化学的検討結果)

陽性の骨芽細胞への分化が誘導されるのに対して、AVCRF 処理群では骨芽細胞への分化が強く抑制されることが明らかとなった (図 2)。以上の実験結果より、AVCRF は AS 発症予

防や石灰化治療予防のための重要な標的遺伝子として極めて有望であることがわかった。現在はワイヤー損傷によって誘導できる AS モデルマウスを用いた AVCRF の機能的役割を解析しており、AVCRF のリコンビナントタンパク質または AVCRF の発現を促進させる化合物の投与により AS の重症度が抑制されることを確認する実験を進めている。また AVCRF は分泌タンパク質であるため、血中濃度の測定系を樹立することで AS 発症を予測するバイオマーカーとしての有用性についても併せて評価を進めている。



図 2. 骨芽細胞への分化誘導実験結果. カルシウム沈着についてはアリザリンレッド染色にて評価した.

大動脈弁石灰化メカニズムの解明研究

これまで我々は、ヒト AS 患者より採取した VIC を培養する方法として低酸素培養法を用いてきた。この低酸素培養法により、VIC を効率的に増殖させることが可能であり、ヘキスト染色によって認められる細胞核も低酸素培養から得られる VIC では通常酸素下から得られる VIC に比べてより正常組織内に存在する VIC の細胞核の形態に近いものであった。つまり、低酸素培養法で維持する VIC は効率的に VIC を増殖させるための適した培養方法であると考えられる (Int J Mol Sci. 2021 Sep 29;22(19):10534.)。Western blotting 解析の結果、低酸素培養法によって得られる VIC は血管内皮細胞前駆細胞で認められる CD34 陽性の細胞集団であり、骨芽細胞への分化効率が通常酸素下で維持した VIC よりも高いことがわかった。またマイクロアレイの解析結果から、CD34 の発現レベルは石灰化組織由来 CIV より非石灰化組織由来 VIC の方が高い傾向にあること、さらに CD34 陽性細胞は正常の大動脈弁間質に豊富に含まれることなどから、CD34 陽性細胞は大動脈弁石灰化を誘導する骨芽細胞の源となる細胞集団である可能性が強く示唆された。現在、正常大動脈弁組織に存在する CD34 陽性細胞の弁間質のホメオスタシス維持としての役割について AVCRF の機能との関連性を解析しているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kanno Kaho, Sakaue Tomohisa, Hamaguchi Mika, Namiguchi Kenji, Nanba Daisuke, Aono Jun, Kurata Mie, Masumoto Junya, Higashiyama Shigeki, Izutani Hironori	4. 巻 22
2. 論文標題 Hypoxic Culture Maintains Cell Growth of the Primary Human Valve Interstitial Cells with Stemness	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10534 ~ 10534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms221910534	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 Higashi Haruhiko, Nishimura Takashi, Aono Jun, Sakaue Tomohisa, Kurata Mie, Izutani Hironori, Yamaguchi Osamu	4. 巻 14
2. 論文標題 Pathological Evidence of Native Aortic Valve Injury After Impella Support	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circulation: Heart Failure	6. 最初と最後の頁 14(2):e007571.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.120.007571	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 Sakaue Tomohisa, Hamaguchi Mika, Aono Jun, Nakashiro Koh-ichi, Shikata Fumiaki, Kawakami Natsuki, Oshima Yusuke, Kurata Mie, Nanba Daisuke, Masumoto Junya, Yamaguchi Osamu, Higashiyama Shigeki, Izutani Hironori	4. 巻 110
2. 論文標題 Valve Interstitial Cell-Specific Cyclooxygenase-1 Associated With Calcification of Aortic Valves	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Annals of Thoracic Surgery	6. 最初と最後の頁 40 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.athoracsur.2019.09.085	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 該当する
1. 著者名 Akazawa Yusuke, Inaba Shinji, Sakaue Tomohisa, Kurata Mie, Aono Jun, Yasugi Takumi, Moritani Tomozo, Nishiyama Hikaru, Higaki Takashi, Eguchi Mariko, Yamaguchi Osamu	4. 巻 23
2. 論文標題 Active aneurysm thrombosis after Kawasaki disease in an adult: Insight into anticoagulation therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology Cases	6. 最初と最後の頁 206 ~ 209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jccase.2020.11.005	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 該当する

1. 著者名 Miyoshi Toru, Izutani Hironori, Yamaguchi Osamu	4. 巻 44
2. 論文標題 Pathologic findings of aortic valve leaflet injury via IMPELLA insertion	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 European Heart Journal	6. 最初と最後の頁 902 ~ 902
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/eurheartj/ehac806	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 Namiguchi Kenji, Sakaue Tomohisa, Okazaki Mikio, Kanno Kaho, Komoda Yuhei, Shikata Fumiaki, Kurata Mie, Ota Noritaka, Kubota Yoshiaki, Kurobe Hirotsugu, Nishimura Takashi, Masumoto Junya, Higashiyama Shigeki, Izutani Hironori	4. 巻 8
2. 論文標題 Unique Angiogenesis From Cardiac Arterioles During Pericardial Adhesion Formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cardiovascular Medicine	6. 最初と最後の頁 761591
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcvm.2021.761591	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 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 11件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 坂上倫久、濱口美香、浪口謙治、倉田美恵、青野潤、山口修、泉谷裕則
2. 発表標題 石灰化大動脈弁におけるシクロオキシゲナーゼ陽性細胞の局在解析
3. 学会等名 第74回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomohisa Sakaue, Kenji Namiguchi, Jun Aono, Hironori Izutani
2. 発表標題 Valve interstitial cells-specific inhibins are novel regulator of osteoblast differentiation in aortic valve
3. 学会等名 STS 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂上倫久
2. 発表標題 トランスレーショナルリサーチによる循環器疾患発症メカニズムの解明
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomohisa Sakaue
2. 発表標題 Cathepsin-positive macrophages promote structural deterioration with calcification
3. 学会等名 European Association for Cardio-Thoracic Surgery 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomohisa Sakaue
2. 発表標題 Identification of the Master Regulators of Aortic Valve Calcification
3. 学会等名 The 21st international Vascular Biology Meeting
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂上倫久、濱口美香、青野潤、中城公一、倉田美恵、浪口謙治、鹿田文昭、増本純也、山口修、泉谷裕則
2. 発表標題 大動脈弁狭窄症におけるリソソーム酵素の解析
3. 学会等名 第73回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂上倫久、濱口美香、青野潤、中城公一、倉田美恵、大嶋佑介、東山繁樹、泉谷裕則
2. 発表標題 大動脈弁異所性石灰化の分子メカニズムの解明
3. 学会等名 第4回黒潮カンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 泉谷裕則
2. 発表標題 重症心不全の外科治療
3. 学会等名 第1回Heart Failure Web Conference (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 泉谷裕則
2. 発表標題 心不全・人工心臓・心臓移植について
3. 学会等名 第1回心臓移植に関する講演会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 泉谷裕則
2. 発表標題 心臓弁膜症に対する低侵襲心臓手術 ~MICSからロボット支援手術へ~
3. 学会等名 心臓弁膜症の医療連携を考える会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 泉谷裕則
2. 発表標題 もっと心臓について知る - 人生100年時代に -
3. 学会等名 第74回ヘルスアカデミー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 泉谷裕則
2. 発表標題 透析患者の心臓血管外科治療
3. 学会等名 第66回日本透析医学会学術集会・総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 泉谷裕則
2. 発表標題 TAVI 時代の弁膜症低侵襲手術（MICS）
3. 学会等名 第130回日本循環器学会九州地方会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 泉谷裕則
2. 発表標題 ペリPロングタイプを使用したMICS
3. 学会等名 第74回日本胸部外科学会定期学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 泉谷裕則
2. 発表標題 心臓手術の低侵襲化とロボット支援心臓手術
3. 学会等名 日本医工学治療学会第38回学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 泉谷裕則
2. 発表標題 僧帽弁形成術はMICSを第一選択とすべし
3. 学会等名 第65回関西胸部外科学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 泉谷裕則
2. 発表標題 MICSの祝縛
3. 学会等名 第60回日本人工臓器学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

愛媛大学 医学部 心臓血管・呼吸器外科学HP
<https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/surgery2/staff/>
 愛媛大学大学院医学系研究科 心臓血管・呼吸器外科学ホームページ
<https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/surgery2/>
 愛媛大学医学部心臓血管・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
研究 分 担 者	坂上 倫久 (Sakaue Tomohisa) (20709266)	愛媛大学・医学系研究科・講師(特定教員) (16301)	

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