

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09117

研究課題名(和文) プレグナンX受容体を介する大動脈弁異所性石灰化機序の解明と病態生理学的意義の実証

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of pregnane X receptor-mediated aortic valve ectopic calcification and demonstration of its pathophysiological significance

研究代表者

大徳 和之 (Daitoku, Kazuyuki)

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：50374822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈弁間質細胞(HAVICs)においてCD34陰性細胞の役割について、薬物候補として黄連解毒湯の弁石灰化抑制効果について検討した。TNF- α 作用下でHAVICsの石灰化を誘導したが、CD34と細胞外マトリックスタンパクであるテネイシンX(TNX)とマトリックスGlaタンパク(MGP)の遺伝子発現を抑制した。CD34の過剰発現はTNXとMGPの遺伝子発現を維持したまま、TNF- α による石灰化を抑制した。CD34陰性細胞ではCD34陽性細胞と比較してTNXの発現が低かった。また、黄連解毒湯作用下で石灰化を有意に抑制し、ALPの上昇とBMP-2の遺伝子発現を有意に抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大動脈弁狭窄症は大動脈弁の硬化により開閉が制限される病態で、発病率は高齢者で高く、重篤な場合には心不全に至る。弁異所性石灰化の非可逆的進行が特徴であり、有効な治療法は外科的大動脈弁置換術のみである。高侵襲で耐術困難症例が約20%存在するため、低侵襲の薬物治療法開発が急務となる。本研究は、異物受容体、PXRを介した弁異所性石灰化の分子機構やその病態生理学的意義を明らかにし、薬物治療への礎とすることを目的とする。本研究で弁特異的に石灰化に関わるタンパク質を同定し、薬物治療へ適用できれば、本疾患の進行抑制や早期発見・予防につながり、健康寿命の延伸等社会的意義がとみに大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The role of CD34-negative cells in human aortic valve interstitial cells (HAVICs) obtained from the patient with aortic valve stenosis was investigated in terms of the inhibitory effect of orengetokuto as a drug candidate on valve calcification. TNF- α induced calcification of HAVICs under TNF- α action, but suppressed gene expression of CD34 and the extracellular matrix proteins tenascin X (TNX) and matrix Gla protein (MGP). Overexpression of CD34 suppressed TNF- α -induced calcification while maintaining TNX and MGP gene expression. TNX expression was lower in CD34-negative cells compared to CD34-positive cells, suggesting a role for CD34 in suppressing HAVICs calcification by maintaining extracellular matrix protein expression. In addition, TNF- α -induced calcification in HAVICs was significantly inhibited under the action of orengetokuto and orengetokuto significantly suppressed elevated ALP and gene expression of BMP-2 gene.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：異物受容体 プレグナンX受容体 テネイシンX マトリックスGlaタンパク 大動脈弁間質細胞 黄連解毒湯

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。

1. 研究開始当初の背景

大動脈弁狭窄症は大動脈弁の硬化により開閉が制限される病態で、発病率は高齢者で高く、重篤な場合には心不全に至る。発病率は75才以上の高齢者で12.4%と高く、うち重傷症例が3.4%で手術適応となる。日本胸部外科学会年報によると、大動脈弁疾患に対する手術件数が2010年の10,795件に対し、2016年では12,370件と人口停滞にもかかわらず年々増加する傾向にある。この疾患は弁異所性石灰化の非可逆的進行が特徴であり、有効な治療法は人工心肺を用いた外科的大動脈弁置換術あるいは経カテーテル大動脈弁留置術しかない。在院全死亡率が弁置換術で3.7%、経カテーテル弁留置術でも1.3%と高侵襲である他、耐術困難症例が約20%存在する。従って、低侵襲の薬物治療法開発が急務となる。しかし、大動脈弁異所性石灰化の機序は不明な点が多く、薬物治療の標的となるタンパク質等は特定されていない。

2. 研究の目的

申請者らは、最近抗凝固薬ワルファリンや骨粗鬆症治療薬メナキノン-4 (MK-4) が、異物受容体、プレグナン X 受容体 (PXR) を介して大動脈弁の異所性石灰化を誘発することを見出した。この石灰化は従来考えられている炎症性転写因子 (NF- κ B) を介さないで起こるため、他の経路の関与を探索した。その結果、PXR を経由する新規経路の存在を見出した。しかし、PXR の活性化から BMP2 発現亢進に至るメカニズムやこの経路の病態生理学的意義が不明のままである。本研究は、異物受容体、PXR を介した弁異所性石灰化の分子機構やその病態生理学的意義を明らかにし、薬物治療への礎とすることを目的とする。本研究で弁特異的に石灰化に関わるタンパク質を同定し、薬物治療へ適用できれば、本疾患の進行抑制や早期発見・予防につながり、健康寿命の延伸等社会的意義がとみに大きいと考えられる。

3. 研究の方法

弘前大学医学部倫理委員会の承認の下、インフォームドコンセントが得られた患者を対象とした。石灰化大動脈弁は大動脈弁置換術を受けた患者より得る。大動脈弁の酵素処理により得られた大動脈弁間質細胞 (HAVICs) を研究材料とした

A: 大動脈弁間質細胞の TNF- α や高リン酸誘発性石灰化における Wnt5a が果たす役割および分子機構を解明するため、石灰化についてはカルシウムと結合する色素 Alizarin Red S を用いて検出し、遺伝子発現は Real time-PCR 法で調べた。

B: 正常の HAVICs は CD34 陽性である一方で、大動脈弁狭窄症患者から抽出した HAVICs における CD34 の病態生理学的な役割については不明のままである。HAVICs において CD34 陽性から陰性に形質転換するかどうかを確かめるため、二つのサイトカイン (TNF- α と TGF- β) の効果を比較検討した。

C: 黄連解毒湯のヒト大動脈弁間質細胞 (Human aortic valve interstitial cells: HAVICs) における弁石灰化抑制効果について検討した。

4. 研究成果

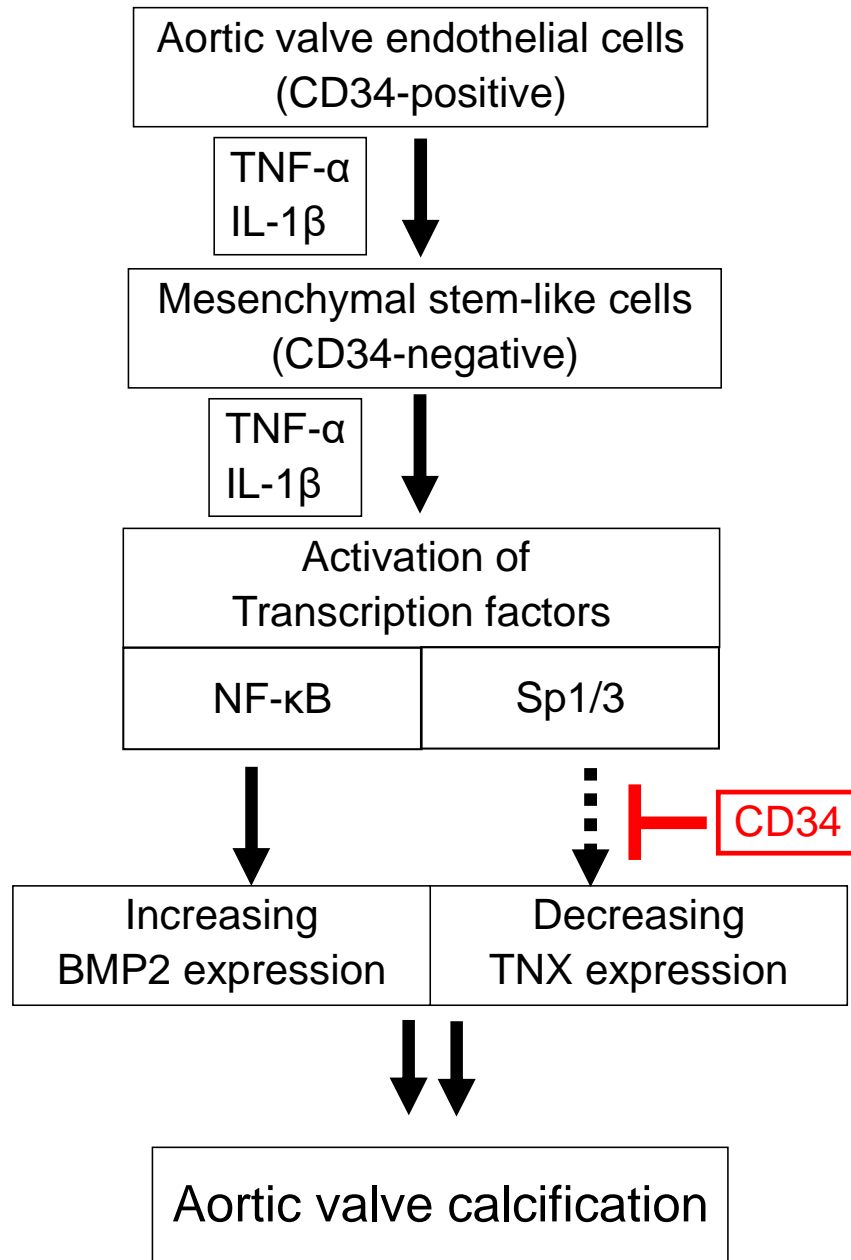
A: 石灰化した大動脈弁より単離した HAVICs は TNF- α (30 ng/mL) や高リン酸 (3.2 mM) 条件下で石灰化が起こり、同時に Wnt5a の遺伝子発現も亢進した。また、HAVICs 中に多く含まれる CD45 陰性及び CD73/90/105 陽性未分化細胞のうち、CD34 陰性細胞が陽性細胞より Wnt5a 遺伝子を強発現しており、高リン酸条件下で石灰化しやすいことを見出した。以上の結果は、TNF- α や高リン酸誘発性 HAVIC 石灰化において Wnt5a が石灰化亢進に寄与することを示唆している。

B: TGF- β と異なり TNF- α は HAVICs の石灰化を誘導したが、CD34 と細胞外マトリックスタンパクであるテネイシン X とマトリックス Gla タンパクの遺伝子発現を抑制した。CD34 の過剰発現はテネイシン X とマトリックス Gla タンパクの遺伝子発現を維持したまま、TNF- α による石灰化を抑制した。DNA マイクロアレイにより CD34 陰性細胞では CD34 陽性細胞と比較してテネイシン X の発現が低いことを見出した。これらの結果は CD34 の役割はテネイシン X のような細胞外マトリックスタンパクの発現を維持することにより HAVICs 石灰化を抑制することを示唆する (Supplement を参照)。

C: 大動脈弁狭窄症患者由来の HAVICs は、石灰化刺激因子である TNF- α (30 ng/ml) や高リン酸 (3.2 mM) 刺激に対する感受性が高く、いずれの存在下でも有意に石灰化が進行した。上記結果は黄連解毒湯 (10-30 μ g/ml) 共存により、いずれも有意に抑制された。TNF- α 誘発 HAVICs 石灰化では、BMP2 及び NF- κ B の遺伝子発現亢進および ALP 活性の上昇を有意に抑制した。同時に、石灰化亢進に関わる Smad リン酸化も有意に抑制した。抗炎症作用を有する漢方薬、黄連解毒湯の有効成分、berberine は TNF- α や高リン酸

誘発性 HAVIC 石灰化を抑制すると同時に、Wnt5a 遺伝子の発現亢進も有意に抑制した。

Supplement



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Xu L, Yu Z, Uesaka Y, Kawaguchi S, Kikuchi H, Daitoku K, Minakawa M, Motomura S, Furukawa KI, Oshima Y, Seya K, Imaizumi T	4. 巻 149
2. 論文標題 Elucidation of the inhibitory effect of hopeaphenol on polynosinic- polycytidylic acid-induced innate immunity activation in human cerebral microvascular endothelial cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 147-157
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2022.04.011.	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 Liu X, Yu X, Daitoku K, Fukuda I, Motomura S, Matsumiya T, Imaizumi T, Furukawa KI, Seya K	4. 巻 145
2. 論文標題 Menaquinone-4 Accelerates Calcification of Human Aortic Valve Interstitial Cell Human aortic valve interstitial cells obtained from patients with aortic valve stenosis are vascular endothelial growth factor receptor 2 positive and contribute to ectopic calcification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 213-221
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2020.12.002	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 于在強、大徳和之、福田幾夫
2. 発表標題 大動脈弁異所性石灰化におけるWnt5aが果たす役割の解析
3. 学会等名 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 Zaiqiang Yu, Shihu Men, Kazuyuki Daitoku, Dadaatsu Imaizumi, Kazuhiko Seya, Masahito Minakawa
2. 発表標題 Orengetokuto inhibits aortic valve calcification: Confirming by animal model of SHR rat
3. 学会等名 第53回日本心臓血管外科学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Zaiqiang Yu, Shihu Men, Kazuyuki Daitoku, Tadaatsu Imazumi, Masahito Minakawa, Kazuhiko Seya
2. 発表標題 Orengedokuto inhibits TNF- α -induced HAVIC calcification obtained from calcific aortic valve stenosis patients
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shihu Men, Zaiqiang Yu, Liu Xu, Kazuyuki Daitoku, Tadaatsu Imaizumi, Masahito Minakawa, Ken-Ichi Furukawa, Kazuhiko Seya
2. 発表標題 Inhibitory effect of CD34 on human aortic valve calcification
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023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
研究分担者	瀬谷 和彦 (Seya Kazuhiko) (40281919)	弘前大学・医学研究科・助教 (11101)	
研究分担者	于 在強 (Yu Zaiqiang) (40624268)	弘前大学・医学研究科・助教 (11101)	
研究分担者	今泉 忠淳 (Imaizumi Tadaatsu) (90232602)	弘前大学・医学研究科・教授 (11101)	

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