

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09130

研究課題名(和文) 大動脈弁狭窄症による全身血管変化の分子機序解明—ずり応力による血小板活性化の役割

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of systemic vascular changes due to aortic stenosis-role of platelet activation by shear stress

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈弁狭窄症(AS)患者の長期経過の採血検体を用いて、血小板関連因子を解析した。血小板に多く内在する血管内皮増殖因子(VEGF)は、術前よりAS患者では高い結果になった。また、その中でも血小板に特に多く内在するサブタイプであるVEGF-165は1年目においても術前より高く、大動脈弁置換により血流こそよくなるものの、人工弁が血小板に影響を与えている可能性が示唆された。対象数が少なく、また血小板そのもののVEGFが測定できていないため断言ができないため、今後症例の蓄積、さらなる解析が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大動脈弁狭窄症および大動脈弁置換術で使用する人工弁が血小板に影響を与えVEGFの推移を起こしている可能性が示唆された。また、大動脈弁狭窄症患者では術前からVEGFの血中濃度が高いことが考えられ、病態の進行に影響を及ぼしている可能性がある。さらには、弁置換術を行った後もVEGF血中濃度が高く、術後患者の状態や移植した人工弁に影響を与えている可能性が考えられた。まだ検討が十分ではないが、本研究と同様に循環器系の他疾患を検討していくことも可能と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Long-term blood samples from patients with aortic stenosis (AS) were analyzed for platelet-related factors. Vascular endothelial growth factor (VEGF), which is abundant in platelets, was higher in AS patients than before surgery. Among them, VEGF-165, which is a subtype that is particularly abundant in platelets, was higher than before surgery even in the first year. It was suggested that although blood flow improves with aortic valve replacement, the prothetic valve may affect platelets. Since the number of subjects was small and the VEGF of the platelets themselves could not be measured, it was not possible to make a firm statement, it was considered necessary to accumulate cases and further analysis in the future.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：大動脈弁狭窄症 ずり応力 血小板 血管内皮増殖因子

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 大動脈弁狭窄症の全世界での背景

世界的な高齢化に伴い大動脈弁狭窄症(AS)は増加傾向にある。治療は狭窄弁を置換する大動脈弁置換術が行われるが、人工心肺を使用する必要があり侵襲は大きい。経カテーテル的大動脈弁移植術も普及し低侵襲で治療できるようになったが、解剖学的な条件によっては施行できず治療コストも高い。今後の疾患増加に対応するためには疾患予防が求められるものの、弁膜石灰化の機序は未だわかっておらず、その解明および治療薬の開発が求められる。

### (2) 大動脈弁狭窄症とシアストレス

ASでは弁膜の石灰化が進行に伴い弁口が狭小化し、通過血流が加速し乱流となる。加速血流は大動脈壁や大動脈弁にずり応力(シアストレス)をもたらす。ASでは異常血管新生を伴う腸管出血を起こすハイド症候群が報告されており、原因はASのシアストレスによる von Willebrand 因子の変形と報告されており、ASのシアストレスが血球形態に影響している可能性がある。

### (3) シアストレスと血小板

我々はASの進行にシアストレス及び血小板が関係していると推察した。基礎研究では、シアストレスを受けた血小板は細胞の形質転換を促す TGF- $\beta$  が増加すると報告されており、シアストレスで活性化された血小板が全身状態や弁組織、移植人工弁を変性させている可能性がある。本研究では、血小板に内在する血管内皮増殖因子(VEGF)、セロトニン、miRNA に注目し、シアストレスによる血小板内在因子の変化がASの病態へ影響している可能性を検討する。ASに対する手術前後の血小板形態・機能の解析は、今後のAS治療を進展させることができると考えている。

### (4) 基礎研究における背景：血小板に内在する3因子

血管内皮増殖因子(Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF): 様々な正常細胞で産生され、創傷治癒、血管透過性の亢進などの作用をもつ。また、腫瘍で産生される VEGF は、癌の血管新生や転移にも関与している。我々は血中 VEGF の多くは血小板に内在することを確認しており、疾患との関与も解明してきた(Aryal B. et al. PLoS One. 2016)。本研究では現在報告のない、ASにおける血小板内 VEGF の推移について解析を行う。

セロトニン(Serotonin): 中枢神経系の神経伝達の役割のみならず、血管環境の制御など循環器系の役割をもつ。血小板では濃染顆粒に内在し、コラーゲン刺激により放出され、血小板膜表面にあるセロトニン受容体に結合し血小板凝集を生じる。セロトニンには血管平滑筋細胞に対して血管収縮による止血効果作用がある一方、血管内皮細胞では血管拡張因子である一酸化炭素(nitric oxide; NO)の放出を促す効果もあり、多彩な作用がうかがわれる。

マイクロRNA(miRNA): 20~25塩基長の非コード短鎖RNAであり、標的遺伝子の発現を抑制する。マイクロRNAの増減は、発生・成長と共に各種疾患での動きを制御する。miRNAは細胞外へ受動的・能動的に分泌され、細胞間情報伝達のツールとして、また疾患の診断にも注目されている。本研究では血小板内miRNAについて検討する。

## 2. 研究の目的

本研究は、ASにおける術前から術後遠隔期の血小板内在miRNAや血小板内在分子を解析することで、血小板が弁の石灰化、心不全を含めた病態進行に影響する因子を解明し、血小板に関連する病態増悪マーカーの解明、石灰化を含めた病態進行機序解明を目的とする。

ASのシアストレスの変化が、血小板内在因子へどのような変化をもたらすのかを解明する。今までにAS患者検体から血小板のみを分離し、直接内在因子を解析した研究はない。シアストレスにより活性化された血小板は、内在因子を放出、あるいは血管内皮欠損部で他の細胞と接着して内在因子を伝達し、様々な影響を与えていると考えている。

本研究では臨床検体のデータ解析に加えて、得られた結果を基にした基礎実験を行う。巨核球系培養細胞と循環器系培養細胞とで共培養を行い、患者検体の血小板から得られた因子を増減してその影響を解析し細胞機能を多方面から検討する。臨床研究と基礎研究を連続的に行うことで、ASのシアストレスが血小板を通して石灰化や心不全進行に与える影響を直接解明でき、具体的な治療法の開発につながると考える。

## 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・呼吸器学講座、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う。検体は大動脈弁狭窄症に対して大動脈弁置換術を受ける患者対象より、術前から術後を通して血液検体を採取、血小板を分離し、血小板に内在するマイクロRNA、蛋白質を解析する。さらに巨核球関連培養細胞(Meg 01細胞)に患者検体

から病的意義があると考えられたマイクロ RNA を導入し、蛋白質発現の変化や細胞への影響を確認する。さらにマイクロ RNA を導入した Meg 01 細胞を血管平滑筋細胞や血管内皮細胞と共培養し、循環器細胞に与える影響を解明する。

( 1 ) 検体収集

本研究は鹿児島大学病院倫理委員会に承認を受けた『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』に基づいて行う。術前、術後、1 日目、3 日目、7 日目、14 日目、1 か月目、3 か月目、6 か月目、1 年目の 10 ポイントで採血する。血漿用スピッツで採血した検体から血小板を分離し、-80 の超低温槽で保管する。通常血漿、血清検体についても分離し同様に保管する。

( 2 ) 血小板中の血管増殖因子関連蛋白質解析血小板、血漿、血清検体を用いて、VEGF、セロトニンを ELISA 法で測定する。

( 3 ) マイクロ RNA の解析

血小板よりマイクロ RNA を抽出する。典型的な術後経過をたどった検体を選択しマイクロ RNA の網羅的解析を行い、有意変化を示すマイクロ RNA を抽出する。抽出されたマイクロ RNA に対し、全ての検体で qPCR 法を行い半定量評価し経時的な変化を解析する。

( 4 ) 術後臨床経過、検査値とサイトカイン、マイクロ RNA の比較相関検討

( 3 ) で得られたデータと術後の経過を比較検討する。心エコーから得られる各種測定値の変化、末梢血データ、特に血小板関連因子との相関について調べる。

( 5 ) 巨核球系培養細胞 (Meg 01 細胞) を用いた検討

巨核球由来細胞である Meg 01 細胞を用いる。2・3 で抽出したマイクロ RNA を培養細胞に導入して、細胞の形態変化、増殖能、遊走能を検討する。マイクロ RNA が制御する標的蛋白質は、既報の解析ソフトを使用して選択する。マイクロ RNA は標的遺伝子発現を負に制御するので、ELISA 法で導き出した蛋白質量と比較して負の相関のあるものを抽出する。

( 6 ) 循環器系培養細胞との共培養による検討

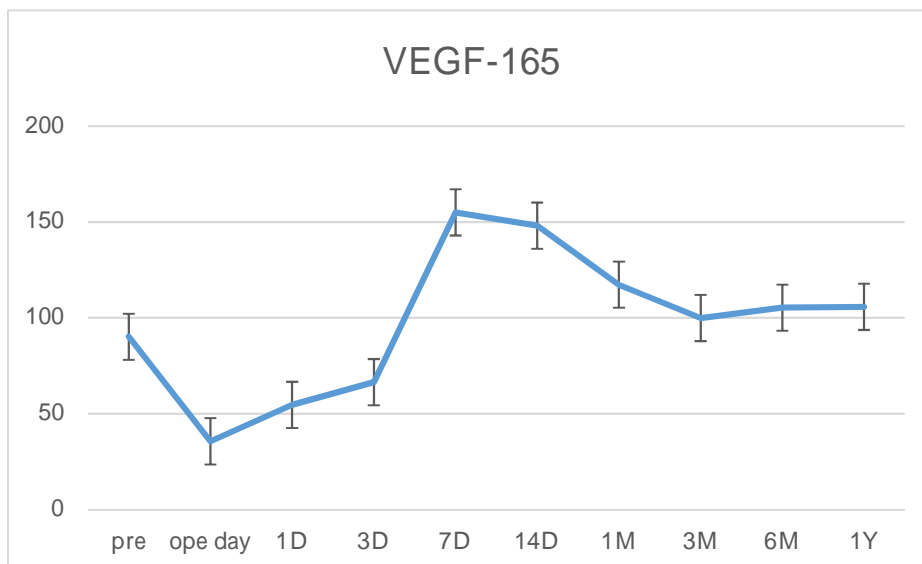
臨床検体で得られた情報を基に Meg 01 細胞にマイクロ RNA の導入、あるいは VEGF 等での前処理を行う。前処置を行った Meg 01 細胞と血管平滑筋や血管内皮細胞と共培養し解析することで、生体内で血小板が他種の細胞へ与える影響を検討する。

( 7 ) 他の循環器疾患への応用

今回の臨床検体、基礎実験で得られた結果は、心筋細胞など他種の細胞と血小板との相互作用に応用できる。また今回の結果は、その他の循環器疾患と血小板との関連についても応用できると考えている。最終的には、血小板が循環疾患に与える影響、血小板内在因子の解析により、臨床経過を予測できる有用なバイオマーカーを導き出す。

#### 4 . 研究成果

1 年目まで採取できた対象のうち、8 例の検体を使用して術後 1 年目までの血小板内在因子の解析を行った。鹿児島大学心臓血管外科分野と血管代謝病態解析学分野と共同で血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) のサブタイプ解析を行っており、VEGF を中心に解析を行った。大動脈弁狭窄症患者においては VEGF が健常人より高い傾向になり、その中でも血小板に多く内在する VEGF-165 は術後 1 年目で術前値よりも高い傾向だった。大動脈弁置換術で使用する人工弁が血小板に影響を与えている可能性が考えられたが、現時点では血小板そのものの解析まで行っていないため、断言はできないと考えられた。さらなる追加実験が必要と考えられた。



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 Hideaki Kanda, Munekazu Yamakuchi, Kazuhisa Matsumoto, Kosuke Mukaihara, Yoshiya Shigehisa, Shuji Tachioka, Masashi Okawa, Kazunori Takenouchi, Yoko Oyama, Teruto Hashiguchi, and Yutaka Imotoa	4. 巻 77
2. 論文標題 Dynamic changes in platelets caused by shear stress in aortic valve stenosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Hemorheology and Microcirculation	6. 最初と最後の頁 71-81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3233/CH-200928	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 Munekazu Yamakuchi, Masashi Okawa, Kazunori Takenouchi, Aryal Bibek, Shingo Yamada, Keiichi Inoue, Kazuhiko Higurashi, Akito Tabaru, Kiyonori Tanoue, Yoko Oyama, Sadayuki Higashi, Chieko Fujisaki, Hideaki Kanda, Hiroto Terasaki, Taiji Sakamoto, Yoshiharu Soga, Teruto Hashiguchi	4. 巻 18
2. 論文標題 VEGF-A165 is the predominant VEGF-A isoform in platelets, while VEGF-A121 is abundant in serum and plasma from healthy individuals	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLoS One	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） 10.1371/journal.pone.0284131	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hideaki KANDA, Munekazu YAMAKUCHI, Kazuhisa MATSUMOTO, Kosuke MUKAIHARA, Yoshiya SHIGEHISA, Shuji TACHIOKA, Masashi OKAWA, Kazunori TAKENOUCI, Yoko OYAMA, Teruto HASHIGUCHI, Yutaka IMOTO
2. 発表標題 The significance of platelet dynamics in perioperative period of aortic valve replacement for aortic valve stenosis
3. 学会等名 The Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis (国際学会)
4. 発表年 2021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	松本 和久  (Matsumoto Kazuhisa)  (10363631)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・助教    (17701)	
研究分担者	山口 宗一  (Yamakuchi Munekazu)  (20325814)	鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授    (17701)	
研究分担者	井本 浩  (Imoto Yutaka)  (60274461)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授    (17701)	
研究分担者	橋口 照人  (Hashiguchi Teruto)  (70250917)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授    (17701)	
研究分担者	大川 政士  (Okwa Masashi)  (90869322)	鹿児島大学・鹿児島大学病院・医員    (17701)	

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