

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08813

研究課題名(和文) 血管内皮増殖因子受容体VEGFR2の大動脈弁異所性石灰化における役割と機序の解明

研究課題名(英文) The role and mechanism of VEGFR2 on aortic valve calcification

研究代表者

于 在強 (Yu, Zaiqiang)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：40624268

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)：我々は大動脈弁石灰化に関わる弁間質細胞の特徴を解明した。弁間質細胞はCD73/90/105陽性であり、さらにVEGFR2陽性を示した。一部の細胞は α -SMA陽性を示したが、弁石灰化の進行に寄与する役割が不明である。これらのVEGFR2陽性の細胞は骨化誘導に対して反応したが、軟骨誘導や脂肪誘導に対して反応しなかった。さらにTNF- α 刺激で、VEGFR2陽性の細胞はSmadリン酸化は有意に亢進したため、弁の石灰化亢進には重要な役割をしていた。さらに、黄蓮解毒湯はTNF- α 誘発石灰化とSHRsの大動脈弁石灰化進行を有意に抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は大動脈弁石灰化に関わる弁間質細胞の特徴を解明し、VEGFR2陽性の細胞は骨化誘導に対して反応し、石灰化刺激に対して反応性が高いことを明らかにした。大動脈弁石灰化の進行に対して抑制効果を持つ黄蓮解毒湯を発見した。これらの成果は今後大動脈弁石灰化のメカニズムの解明及び薬物治療の開発及び確立に対して意義が大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Although we recently demonstrated that human aortic valve interstitial cells (HAVICs) obtained from patients with AVS were highly sensitive to ectopic calcification stimulation, the cell types contributing to calcification are unknown. Most cultured P1 HAVICs were CD73-, CD90-, and CD105-positive, and CD34-negative. HAVICs were vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2)-positive. Calcified aortic valve immunohistochemistry showed that all cells were positive for VEGFR2 and partly α -SMA. Further, VEGFR2-positive cells were more sensitive to tumor necrosis factor- α -induced ectopic calcification with or without α -SMA positivity. We conclude that HAVICs obtained from patients with AVS are VEGFR2- positive undifferentiated mesenchymal cells and may contribute to aortic valve ectopic calcification. Orengetokuto inhibited TNF- α induced calcification in vivo. we also confirmed that orengetokuto intake inhibited acceleration of aortic valve calcification of SHRs in vitro.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：大動脈弁石灰化 VEGFR2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

A. 臨床的背景

・大動脈弁狭窄症 (Aortic valve stenosis, AVS) 患者は高齢社会の進行と共に増加し、弁置換術や経カテーテル弁留置術を含む手術件数も増加しつつある。しかし、弁石灰化の進行を抑制する有効な薬物治療が確立されていない現状にある。

・侵襲性が高い弁置換術は人工心肺装置を使用し、全在院死亡率が 2.7% である。機械弁が使用された場合、ワーファリンを一生涯、内服する必要がある。生体弁は術後約 15 -20 年で再弁置換術が必要となる。経カテーテル弁留置術の普及と共に手術不能例が減少している。

B. 大動脈弁異所性石灰化機構に関する研究

B-1 動脈硬化原因説

・弁異所性石灰化は、動脈硬化で白血球が引き金になり、炎症性サイトカイン放出を介する線維芽細胞の骨芽細胞への分化誘導で起こるとされている。

B-2 未分化細胞原因説

・未分化細胞が大動脈弁異所性石灰化の引き金となる可能性が指摘された。しかし、これらがヒト大動脈弁で石灰化を誘発したとする報告はまだない。

C. 大動脈弁異所性石灰化に対する抑制機構

C-1 血管内皮細胞前駆細胞

CD34 陽性であり、血中を循環し、血管内皮細胞の機能維持を司る。加齢や糖尿病による機能低下が動脈硬化を含む心血管イベントの発症率が高くなるとの報告がある (7)。

C-2 弁内 CD34 陽性細胞

申請者らは、石灰化した大動脈弁に間葉系未分化細胞 (CD73, 90, 105 陽性、CD45 陰性) が存在し、骨芽細胞への高い分化能を持つことを明らかにした。さらに内皮細胞だけでなく間質細胞にも VEGFR2 が存在することを見出した。また一部の弁では、CD34 陽陰性細胞が混在し、陽性細胞が石灰化刺激に抵抗性を示した。

C-3 細胞外マトリックスタンパク質

申請者らは炎症性サイトカイン TNF- α がマトリックス Gla タンパク質 (MGP) の発現を抑制して弁石灰化を亢進させることを明らかにした。さらに、MGP 高発現細胞では、TNF- α 共存にかかわらず、石灰化が抑制された。しかし、MGP を介する石灰化調節機構の存在が未だに不明である。

D. 石灰化大動脈弁狭窄症の薬物治療に関する研究

・弁異所性石灰化に対する有効な薬物治療法は未だに開発されていない。

・コレステロール合成阻害薬(スタチン)や NO などは AVS の血行動体を改善するが、弁石灰化の進行に対して抑制効果がないと報告されている。

・また、matrix Gla protein (MGP) による骨形成タンパク質(BMP2)活性阻害など異所性石灰化を抑制する生理機構の存在が報告された。本研究室でも、MGP の発現亢進による大動脈弁間質細胞 (HAVICs) の石灰化を抑制する。

以上の背景から、大動脈弁異所性石灰化の原因細胞を同定した上、弁異所性石灰化への薬物治療法の開発が必要と考えた。

2．研究の目的

本研究は、大動脈弁において、VEGFR2 を軸とする内因性の異所性石灰化抑制系の存在を実証すると同時にその機構や病態生理学的意義を明らかにすることを目的とする。以上の知見から、申請者は大動脈弁内皮細胞に VEGFR2 を軸とする内因性の異所性石灰化抑制系が存在するのではないかという考えに至った。

3．研究の方法

(1)使用試料

- ・弘前大学医学部倫理委員会の了承の下、術前インフォームドコンセントで同意を得た AVS 患者を対象とした。大動脈弁置換術を受ける AVS 患者より石灰化弁の提供を受けた(10 例)。大動脈弁閉鎖不全症等患者より非石灰化弁の提供を受け、正常大動脈弁切片を作成する(5 例)。
- ・弁を 1 ～ 2mm に切って、酵素処理法によりヒト大動脈弁間質細胞(HAVICs)を単離培養した。
- ・CD34 陽性及び陰性細胞、血管内皮増殖受容体 2 (VEGFR2) 陽性及び陰性細胞、平滑筋アクチン (α -SMA) 陽性及び陰性細胞を、FACS を用いた細胞選別に付すことにより得た。

(2)HAVICs や間葉系未分化細胞の石灰化誘発

- ・腫瘍壊死因子 (TNF- α , 30 ng/mL) 添加、またはリン酸添加 (high Pi, 培地内濃度 3.2 mM) 後、3～4 日おきに培地交換し、7～14 日間継続培養した。
- ・石灰化に影響を与える各種試薬は、石灰化誘発 1 時間前に投与した。

(3)主な測定

- ・石灰化検出: Alizarin Red S 試薬を用いて検出した。
- ・遺伝子発現: real-time PCR 法を用いた。
- ・タンパク質発現: Western blot 法を用いた免疫染色により定量した。

(4)弁組織蛍光染色

- ・弁組織を 10%ホルマリンで固定し、4 μ m の切片を作製した。
- ・各種細胞表面マーカー : CD34/VEGFR2, CD34/ α -SMA, α -SMA/VEGFR2 などの二重蛍光染色を行なった。

(4)SHR の大動脈弁石灰化誘発

- ・SHR を長期飼育し、同時に一部のラットに黄蓮解毒湯 (1 mg/mL) を投与した。
- ・動物を安楽死させたのち、弁組織を取り出し、10%ホルマリンで固定し、4 μ m の切片を作製した。弁石灰化の有無は von Kossa 染色で確認する。

4．研究成果

(1)石灰化した大動脈弁から得た間質細胞(HAVICs)の多くが間葉系未分化細胞としての特徴を持ち、CD73, 90, 105 (+)/CD45(-)であった。さらに、ほぼ 100%で CD34 陰性と血管内皮増殖因子受容体 2 (VEGFR2) 陽性細胞であることを確認した。これらの細胞は石灰化しやすい性質を持っている。平滑筋アクチン (α -SMA) については約半数の細胞が陽性であった。

(2) CD34 陰性とVEGFR2陽性のHAVICsは腫瘍壊死因子 (TNF- α) 誘発性石灰化に対して骨形成因子 (BMP2) の発現亢進とアルカリホスファターゼ (ALP) の活性上昇を認めた。骨化誘導に対して反応性が高かった。SN-50 はBMP2の分泌を有意に抑制した。

(3) 漢方製剤、黄連解毒湯は 10-30 μ g /mL の用量で TNF- 誘発性石灰化を有意に抑制した。また、BMP2 の発現亢進と ALP 活性の上昇を有意に抑制した。さらに、NF- κ B の発現亢進を有意に抑制した。黄連単独でも TNF- 誘発性石灰化を有意に抑制した。さらに、黄連の主成分である berberine は有意に TNF- 誘発性石灰化における BMP2 および NF- κ B の発現を有意に抑制した。

(4) SHRに黄連解毒湯 1 mg/mL を 1 ヶ月間経口投与後、大動脈弁を摘出し、von Kossa 染色で弁石灰化の有無を確認した。その結果、黄連解毒湯を投与された SHR の大動脈弁石灰化は投与しないラットに比べて有意に抑制された。同時に肝機能障害や腎機能障害を認めなかった。临床上では、大動脈弁石灰化の薬物治療法の確立には重要な発見と考えられた。

(5) 今後の研究について大動脈弁石灰化に関わる CD 34 陰性細胞の石灰化能の制御を解明しながら、黄連解毒湯などの弁石灰化の進行を抑制する薬物治療効果の再現性を確認し、弁石灰化の治療法を確立する。

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〕

-

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	大徳 和之 (Daitoku Kazuyuki) (50374822)	弘前大学・医学研究科・教授 (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