

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 26 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790685

研究課題名（和文） Shear stress による大動脈弁石灰化機序解明に関する研究

研究課題名（英文） Research of the elucidation of the mechanism in the development of calcific aortic valve stenosis by shear stress

研究代表者

宮本 卓也 (MIYAMOTO TAKUYA)

山形大学 医学部 助教

研究者番号：20447204

研究成果の概要（和文）：

マウスの大動脈弁をワイヤーで傷害することにより、ヒト大動脈弁狭窄症を擬似した動物モデルの作成に成功した。弁傷害にてヒト大動脈弁狭窄症と同様の左室表現型を呈し、心不全の器質となることが観察された。弁狭窄から弁尖肥厚へ至る過程、すなわち、炎症の惹起から骨石灰化形成へ至る一連の病態が証明できた。ヒト AS をこれほど擬似しえたモデル動物の報告は過去になく、病態解明と創薬への貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：

We produced animal model of aortic stenosis (AS) by wire-injury of aortic valve of mice. Wire-injury induced significant AS and concentric cardiac hypertrophy and led to heart failure. We also documented the serial pathophysiological process including infiltration of inflammatory cell, phenotypic change of fibroblast to myofibroblast, and osteogenic differentiation in the injured valve tissue. This model might contribute to the understanding of pathogenesis of AS and new therapeutic strategy of AS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科学臨床医学・循環器内科学

キーワード：大動脈弁狭窄症、石灰化、shear stress, osteoblast, Maf B

1. 研究開始当初の背景；大動脈弁狭窄症（Aortic stenosis; AS）は、大動脈弁の開放が制限され進行すれば心不全や突然死を来す弁膜症の代表的疾患である。AS

は無症候性に進行し、心不全症状出現後の平均余命は2年程度と予後不良の疾患である。現在、ASの進行を抑制する有効な薬物療法はない。開胸による大動脈弁

置換術が唯一確立した治療法である。AS罹患増加人口は増加傾向にあり、手術治療が困難かつ心不全症状を有する高齢者に対して、有効な治療手段がない。ASの成立機序は十分に解明されていない。大動脈弁に対する血行力学的負荷が石灰化及び骨形成の重要な促進因子であるが、その詳細な機序は不明である。病態の詳細な解明には疾患モデルの存在が不可欠である。

2. 研究の目的；ASの疾患モデルを作成すること。そのモデルを使用し、ASの進行機序、特に弁石灰化機序を明らかにすること。さらに、弁石灰化成立過程における線維芽細胞から骨芽細胞分化の過程における、マクロファージの役割、特に転写因子MafBの意義について明らかにすること（MafBは、単球やマクロファージにのみ発現する転写因子で、骨形成細胞のバランスを調節する。AS弁組織中へ遊走するマクロファージに発現するMafBが線維芽細胞から骨芽細胞への分化に関与している可能性がある）。
3. 研究の方法；ASの疾患モデルは幾つか存在するが、ApoE欠損マウス等血中脂質が強く影響するモデルであり、ヒトAS病態を擬似する疾患モデルではない。臨床的に、ヒトASで高脂血症合併率は2割程度で、他の動脈硬化性疾患と比べ多くはない。更に、強力な脂質低下作用を有する薬剤のASに対する抑制効果は大規模臨床試験で完全に否定された。今回我々は、野生型マウスを使用しASモデルを作成した。マウス大動脈弁をワイヤーにて傷害し、ASが誘導できることを確認した。ワイヤー傷害後の大動脈弁狭窄の程度と心機能を心臓超音波にて経時的に詳細に観察した。また、傷害後の生存率をシャム群と比較し、臨床的ヒトASに類似した経過を辿るか検討した。さらに、大動脈弁を摘出し組織学的及び分子生物学的に石灰化・骨化の有無を検討し、その機序を検討した。
4. 研究成果；手術死亡例はほとんどなく、再現性をもってモデルを作成することができた。弁傷害1週以降に心エコーにて大動脈弁弁口面積(AVA)が有意に低下し、8週以降までAVAの低下が維持されることが確認された（図1）。傷害後4週で有意な心重量の増加が認められ、ヒトASと同様の求心性左室肥大の表現型を呈した。少なくとも傷害後8週以前は左室短縮率(FS)の低下は認められず、代償性の左室

肥大モデルである（無症候性代償期ヒトASに相当する時期を考えられる）。傷害8週以降はFSの低下傾向が認められ、8週以降に非代償性心肥大、すなわち心不全へ移行することが示唆された（ヒトASの症候期に相当すると考えられる）。生存曲線を示す（図2）。観察期間中シャム群では1例も死亡例は認めず、傷害群で有意に生存率は低い結果であった。傷害群で12週まで11例（11/66）の死亡が確認され、これらは心不全が原因と考えられる。組織学的に弁狭窄の機序を検討した。弁尖肥厚がその主な原因で、弁尖間の癒合も認められたが、弁尖弁輪部近傍での弁尖の肥厚は認められなかった。弁尖肥厚は線維芽細胞の増殖と間質の増加で構成されていた。弁傷害早期に弁尖組織中にMAC3陽性のマクロファージの浸潤と α SMA陽性の幼若な線維筋芽細胞の形質転化が確認された。更に、明らかな石灰化形成（Alizaline red陽性）が確認された。また、傷害早期から炎症性サイトカイン（IL-1 β , TNF α , TGF β ）の発現も確認され、骨形成シグナルを誘導するBMP-2やRunx2の発現も確認された。BMP-2, Runx2は線維筋芽細胞を骨芽細胞へ分化誘導し、骨石灰化に導くと考えられる。弁傷害から炎症性サイトカインの惹起誘導、さらには骨形成シグナルの発動を介し、弁尖の肥厚から狭窄、更には弁の石灰化と、1連の過程が経時的に確認された。ASの成立機序を経時的に捉えた、極めてヒトASに類似したモデルの報告はこれまでにない。ヒトASは臨床経過が数十年以上と非常に経過が長く、その自然経過は不明な点が多い。ASの自然経過を明らかにする上で有用性は極めて高い。さらには、弁狭窄並びに石灰化進行機序解明、ASの進行を抑制する新しい薬剤の創薬に貢献することが期待される。

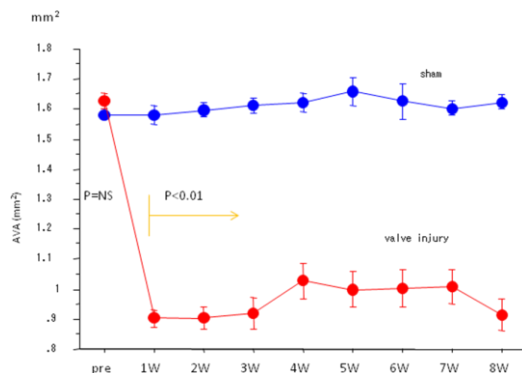


図1 弁傷害後の大動脈弁口面積

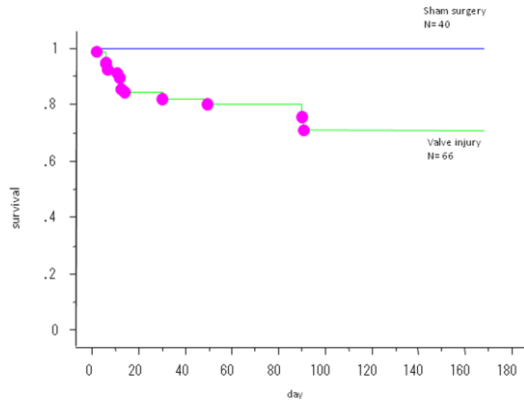


図2弁傷害後の生存曲線

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Funayama A, Shishido T, Netsu S, Ishino M, Sasaki T, Katoh S, Takahashi H, Arimoto T, Miyamoto T, Nitobe J, Watanabe T, Kubota I: Serum pregnancy-associated plasma protein a in patients with heart failure. *J Card Fail.* 17(10), 819-826, 2011, 査読有 <http://dx.doi.org/10.1016/j.cardfail.2011.05.011>
- ② Funayama A, Watanabe T, Tamabuchi T, Otaki Y, Netsu S, Hasegawa H, Honda S, Ishino M, Arimoto T, Takahashi H, Shishido T, Miyamoto T, Nitobe J, Kubota I: Elevated cystatin C levels predict the incidence of vasospastic angina. *Circ J.* 75(10), 2439-2444, 2011, 査読有 <http://dx.doi.org/10.1253/circj.CJ-11-0008>
- ③ Susuki S, shishido T, Ishino M, Katoh S, Sasaki T, Nishiyama S, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Watanabe T, Takeishi Y, Kubota I: 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine is a prognostic mediator for cardiac event.

Eur J Clin Invest. 41(7), 759-766, 2011, 査読有 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2362.2010.02465.x>

1365-2362.2010.02465.x

- ④ Tamura H, Watanabe T, Nishiyama S, Sasaki S, Arimoto T, Takahashi H, Shishido T, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Nirono O, Kubota I: Increased left atrial volume index predicts a poor prognosis in patients with heart failure. *J Card Fail.* 17(3), 210-216, 2011, 査読有 <http://dx.doi.org/10.1016/j.cardfail.2010.10.006>

[学会発表] (計3件)

- ① Ishino M, Shishido T, Suzuki S, Katoh S, Sasaki T, Netsu S, Funayama A, Arimoto T, Nishiyama S, Takahashi H, Miyashita T, Miyamoto T, Watanabe T, Takeishi Y, Kubota I: Deficiency of the long pentraxin PTX3 deteriorates neointimal hyperplasia after vascular injury. American Heart Association Scientific Sessions 2011, Orlando, America, November 12-16 2011
- ② Netsu S, Shishido T, Ishino M, Kadowaki S, Narumi T, Otaki Y, Funayama A, Honda S, Hasegawa H, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Miyashita T, Miyamoto T, Watanabe T, Kubota I: Midkine exacerbates cardiac hypertrophy and remodeling in response to pressure overload. American Heart Association Scientific Sessions 2011, Orlando, America, November 12-16 2011
- ③ Funayama A, Shishido T, Netsu S, Ishino M, Otaki Y, Honda S, Hasegawa H, Kadowaki S, Narumi T, Nishiyama S,

Takahashi H, Arimoto T, Miyashita T,
Miyamoto T, Watanabe T, Woo CH, Kuwahara
K, Nakao K, Takeishi Y, Kubota I:
Cardiac-specific overexpression of
high mobility group box 1 (HMGB1)
attenuates cardiac dysfunction induced
by pressure overload. American Heart
Association Scientific Sessions 2011,
Orlando, America, November 12-16 2011

〔図書〕（計 2 件）

- ① 宮本卓也:慢性心不全のトータルマネジメント. 平成 22 年度山形県医師会学術雑誌.
41, 49-66, 2011-
- ② 宮本卓也:第Ⅲ部 治療における最近の新薬の位置付け〈薬効別〉～新薬の広場～
心不全治療薬. 医薬ジャーナル 新薬展望
2010. 増刊号 46(S-1), 278-283, 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 卓也 (MIYAMOTO TAKUYA)
山形大学 医学部 助教
研究者番号 20447204