

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	循環病態科学領域心臓血管外科学教育研究分野 氏名 野村亜南
<p>(論文題目) CD34-negative mesenchymal stem-like cells may act as the cellular origin of human aortic valve calcification.</p> <p>(CD34 陰性間葉系幹細胞様細胞はヒト大動脈弁の石灰化の細胞起源となるかもしれない)</p>	
<p>【はじめに】石灰化大動脈弁狭窄症 (CAS) は 65 歳以上に多く見られ、年齢と共にその頻度は増加する。CAS は、サイトカイン (TNF-α、TGF-β 1、IL-1β) の発現に関わる過度の炎症反応によって引き起こされる、弁の肥厚及び弁口面積の狭小化によって特徴づけられる。これらのサイトカインは、2.2~3.2mM の高リン酸条件下で促進する細胞外マトリックスの形成、リモデリング、異所性骨化に寄与している。我々は最近、CAS の患者において、TNF-α が大動脈弁の石灰化を誘発することを証明したが、異所性石灰化において原因となっている細胞は未だ明らかになっていない。大動脈弁の石灰化は、Type I コラーゲン陽性/CD45 陽性細胞や、オステオカルシン陽性/CD45 陽性細胞のような、骨髓由来の循環骨芽前駆細胞(COP 細胞)によって引き起こされる異所性骨化と関連があると報告している論文もある。しかし、大動脈弁に存在するこれらの前駆細胞が弁の石灰化を引き起こすかどうかは確認されておらず、弁石灰化の詳細なメカニズムは不明のままである。</p> <p>今回我々は、ヒト大動脈弁間質細胞(HAVICs)を用いて fluorescence-activated cell sorting(FACS)により、大動脈弁石灰化の細胞起源を調べた。石灰化した弁と石灰化していない弁の両方から得られたほとんどの HAVICs は CD73、90、105 陽性細胞かつ、CD45 陰性細胞の間葉系幹細胞様細胞(MSLCs)で特徴づけられていた。これらの MSLCs は CD34 陽性細胞と CD34 陰性細胞の両方を含んでおり、CD34 陰性細胞は 3.2mM の高リン酸条件下で石灰化が亢進した。更に、CD34 陰性細胞は非石灰化大動脈弁よりも石灰化大動脈弁に多く含まれていた。</p> <p>【方法】事前にインフォームドコンセントを行い、了承を得た CAS の患者 8 人と非石灰化大動脈弁 (大動脈弁閉鎖不全症(AR)の患者) 8 人の弁を用いて実験を行った。摘出した弁を細かく切断し、コラゲナーゼ処理した後、10%ウシ胎児血清(FBS)を含む培地で培養した。細胞が増殖した後、CD45、73、90、105 抗体を反応させ、FACS により間葉系幹細胞の要件を満たす細胞を分離した。分離した細胞を培地で培養し、その中で CD34 陽性細胞と陰性細胞を分離するため、同様に抗体を反応させた後 FACS により分離した。石灰化の違いを見るため、CD34 陽性細胞と陰性細胞をそれぞれ培養し、confluent になったところで、リン酸を含む 12 穴のプレートに移して 7 日間培養した。石灰化の程度は Alizarin Red S 染色と、550nm での吸光度の測定により評価した。また、大動脈弁の切片を用いて免疫染色により、組織での MSLCs の分布も調べた。</p> <p>【結果】フローサイトメトリーの結果、CAS、AR の弁には CD73、90、105 陽性細胞が含まれており、ほとんど全ての MSLCs は CD45 陰性であった。しかし、CD34 は陽性と陰性細胞の両方が含まれており、細胞レベルでは CAS と AR の間でその比率に著しい差は認めなかった。培養し、confluent になった MSLCs を 3.2mM の高リン酸条件下で 7 日間培養すると、CD34 陰性細胞で著しく石灰化が亢進したが、Pit-1 (リン酸トラ</p>	

ンスポーター) 阻害剤である SPF を加えるとその石灰化は抑制された。組織染色においては、CAS と AR の弁で DAPI 陽性となる細胞の数に違いはなく、CD73/105 陽性、CD90/105 陽性、CD73/90 陽性となる細胞の数にも著しい違いは認めなかった。更に、CD34 陽性細胞と陰性細胞の局在について調べたところ、AR の弁で CD34 陽性 MSLCs の数が多く、CD34 陰性 MSLCs の局在比は CAS の弁で高かった。

【考察】今回我々は、大動脈弁には細胞レベル、組織レベルの両方において CD73・90・105 陽性 MSLCs が存在し、MSLCs は CD34 陽性と陰性細胞の両方で構成されていることを初めて示した。更に、CAS の弁に CD34 陰性細胞が多く含まれ、高リン酸条件下で石灰化が亢進した。また、CD34 陽性 MSLCs を一週間培養すると、その約 10% が CD34 陰性 MSLCs に形質転換した。これらのことから、CD34 陽性 MSLCs は陰性に形質転換することで大動脈弁の石灰化を引き起こすと仮説した。異所性大動脈弁石灰化の細胞起源は長年不明のままである。線維芽細胞のような大動脈弁の間葉系間質細胞が骨芽細胞様細胞に分化し、その結果弁が石灰化するという考えもある。今回の研究で、CD34 陰性 MSLCs は高リン酸条件下で急速に石灰化し、石灰化大動脈弁に多く含まれていたため、CD34 陰性 MSLCs は大動脈弁石灰化における細胞起源、或いはそれに近いものと考えられる。更なる研究により、CD34 陰性・陽性 MSLCs の起源をより詳細に解明し、CD34 陽性から陰性への形質転換を引き起こす要因を同定することで、CAS に対する新しい治療戦略が見えてくるかもしれない。