

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	所 属：循環病態学領域 心臓血管外科学分野 4 年 氏 名：千代谷 真理
(論文題目) Matrix Gla protein negatively regulates calcification of human aortic valve interstitial cells isolated from calcified aortic valves (石灰化大動脈弁由来のヒト大動脈弁間質細胞はマトリックス Gla 蛋白によって石灰化が抑制される)	
<p>【はじめに】大動脈弁石灰化は高齢者に多く認められる疾患であり、原因としてリウマチ性変化、先天性 2 尖弁、加齢による石灰化変性が挙げられる。近年高齢化が進むにつれてリウマチ性変化に代わり、加齢変性に伴う石灰化大動脈弁狭窄症 (CAS) が大動脈弁狭窄症の主な原因になりつつある。CAS 患者の大動脈弁は弁葉の広範な線維性肥厚と限局性異所性石灰化を伴っている。大動脈弁の石灰化は不可逆的であり、最も効果的な治療法は外科手術となる。しかし、手術には侵襲が伴うため CAS の進行を遅らせる内服治療の開発が重要であり、そのためには大動脈弁石灰化の詳細なメカニズムの解明が求められる。CAS はいくつかの炎症性因子との関連が認められており、石灰化した大動脈弁には動脈硬化リスク因子による内皮機能不全によってもたらされたと考えられる炎症所見が認められる。マクロファージや T リンパ球が大動脈弁の石灰化した部分で認められており、これら免疫細胞は腫瘍崩壊因子 α (TNF-α) や形質転換増殖因子 β 1 (TGF-β 1)、インターロイキン 1 (IL-1) といったサイトカインを放出し、細胞外マトリックスの形成、リモデリング、異所性石灰化の一因となる。TNF-α は酸化低比重リポ蛋白 (酸化 LDL) への暴露や細胞外マトリックスへのダメージ、細菌感染など多くの要因に対する反応として主に活性化したマクロファージや T リンパ球から分泌される。TNF-α はヒト、マウス双方のアテローム性動脈硬化部位や石灰化した大動脈弁から検出されている。我々は最近 TNF-α が NF-κ B シグナル伝達経路を刺激することで、CAS 患者から得られたヒト大動脈弁間質細胞 (HAVICs) の骨化を促進していることを報告した。NF-κ B は骨形成促進蛋白 (BMP2) の遺伝子発現を亢進させ、SMAD4、Runx2、転写調整因子 Dlx5 を介して最終的にアルカリフォスファターゼ活性を引き起こす。しかし、BMP2 上流の経路を抑制しても TNF-α 誘発性 HAVICs 石灰化は部分的にしか抑制されないため、別の経路の存在が推定された。一方、マトリックス Gla 蛋白質 (MGP) はビタミン K 依存蛋白質であり異所性石灰化抑制蛋白質として知られている。MGP は BMP2 を抑制することでアテローム性動脈硬化や心血管系の石灰化を防いでいるとの報告もあるが、TNF-α と MGP の相互作用に関する報告はない。</p> <p>今回我々は TNF-α 誘発性 HAVICs 石灰化における MGP の役割を調べ、TNF-α によって HAVICs における MGP 遺伝子発現が大幅に抑制されることを示した。さらに CAS 患者から得られた HAVICs を用いて、MGP をノックダウンした HAVICs と MGP を過剰発現させた HAVICs を作成し、検証することで MGP は大動脈弁石灰化の負の調節因子であることを明らかにした。</p> <p>【方法】インフォームドコンセントを得た大動脈弁置換術を受ける CAS 患者 6 名 (CAS 群) と、コントロールとして非石灰化大動脈弁 (大動脈解離もしくは大動脈弁閉鎖不全症) の患者 4 名 (非 CAS 群) の弁を用いた。摘出した弁組織を切断してコラゲナーゼ処理を行い、HAVICs を分離した後 10% ウシ胎児血清を含む α-MEM 培地で培養し、4 代目の細胞を使用した。confluent に達した細胞は TNF-α 添加、非添加に分けてさらに 14 日間培養し、石灰</p>	

化の程度、BMP2 と MGP の遺伝子および蛋白質発現を調べた。更に MGP 遺伝子をノックダウンした CAS 患者由来 HAVICs と MGP 遺伝子を過剰発現させた CAS 患者由来 HAVICs を作成し、それぞれ石灰化と BMP2 遺伝子の発現を調べた。石灰化は Alizarin Red S 染色とカルシウムに結合した Alizarin Red の 550nm での吸光度測定によって評価した。遺伝子発現は Real-time PCR 法によって測定した。蛋白質発現はウエスタンブロット法で解析した。HAVICs の MGP 遺伝子は siRNA を用いてノックダウンし、トランスフェクションによって過剰発現させた。【結果】CAS 群と非 CAS 群の HAVICs を confluent 到達後に TNF- α 添加下、非添加下で各 14 日間培養したところ、CAS 群の HAVICs で BMP2 遺伝子発現亢進と共に著しい石灰化を認めた。一方、CAS 群、非 CAS 群ともに MGP の遺伝子発現は TNF- α によって抑制されていた。そこで、MGP 遺伝子発現低下が石灰化亢進につながるのかどうかを明らかにするため、CAS 群についてさらに検討を行った。まず、siRNA によって CAS 群 HAVICs の MGP 遺伝子発現を 32 日間という長期に渡りノックダウンすると MGP 蛋白質の発現が抑制され、TNF- α 非添加の状況でも BMP2 遺伝子発現の亢進に伴い、HAVICs の石灰化も亢進した。一方、MGP 遺伝子を強制発現させると TNF- α 誘発性石灰化は強く抑制された。しかし、MGP 遺伝子を強制発現させても TNF- α 存在下では BMP2 遺伝子の発現は抑制されなかった。【考察】今回我々は CAS 患者、非 CAS 患者の HAVICs を用いて TNF- α によって引き起こされる HAVICs の石灰化と、BMP2 アンタゴニストとして知られている MGP 遺伝子の発現抑制作用の両方を研究した。また、以前我々は先行研究で CAS 患者において NF- κ B-BMP2-DLx5-ALP 経路を介した TNF- α 誘発性 HAVICs 石灰化を確認しているが、今回はさらに CAS 患者の HAVICs を用いて異所性石灰化における MGP の役割を検証した。結論として、TNF- α を投与することで HAVICs における MGP 遺伝子の発現は大いに抑制された。さらに CAS 患者の HAVICs では、MGP 遺伝子が抑制されることで BMP2 遺伝子の発現が亢進していたことから、MGP 遺伝子の発現抑制は NF- κ B-BMP2-DLx5-ALP 経路を介した TNF- α 誘発性石灰化の促進因子として HAVICs の石灰化を引き起こしていると考えられた。このことは、TNF- α 誘発性 HAVICs 石灰化には NF- κ B シグナル活性化と MGP による BMP2 抑制作用の不活化という 2 つの経路が関与していることを示している。また、MGP 遺伝子を過剰発現させると TNF- α 存在下であっても HAVICs 石灰化は抑制された。以上から MGP は BMP2 発現を介して HAVICs 石灰化の負の調節因子として重要な役割を果たしていることが分かった。今後さらに研究をすすめ、大動脈弁の異所性石灰化メカニズムが解明されることで、大動脈弁の石灰化に対する新しい治療戦略がみえてくるかもしれない。

※1 乙の場合、〇〇領域〇〇教育研究分野にかえて、所属の〇〇講座を記入すること。

※2 論文題目が英文の場合は（ ）内に和訳を付記すること。