

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 楊 薇
(論文題目) Menaquinone-4 accelerates calcification of human aortic valve interstitial cells in high-phosphate medium through PXR	
(内容の要旨：和文で 2,000 字程度) 我々は最近、大動脈弁狭窄症 (AVS) 患者から得たヒト大動脈弁間質細胞 (HAVIC) で、ビタミン K2 拮抗薬であるワルファリン (WFN) が高リン酸培地で石灰化を誘発することを確認した。大動脈弁石灰化における WFN の病態生理学的役割を明らかにするには、ビタミン K2 の役割を明らかにする必要がある。本研究では、高リン酸培地、WFN による HAVIC 石灰化が、動物に含まれるビタミン K2 で最も一般的な存在であるメナキノ-4 (MK-4) によって阻害されるかどうかを調べた。 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 AVS 患者から得られた HAVICs を本研究に用いた (n=6)。摘出した弁組織を約 2 mm 角に切断してこらべな一ゼ処理を行い、HAVICs を分離したのち、10%FBS を含む α -Modified Eagle's Medium で培養した。80%~90%コンフルエントに達したのち、MK-4 および WFN の存在下または非存在下で 7 日間、高リン酸培地 (3.2 mM) で培養した。興味深いことに、高リン酸培地では、MK-4 は用量依存的 (3-100 nM) に WFN 誘発 HAVIC 石灰化を促進した。また、MK-4 単独 (10 nM) でも HAVICs 石灰化を促進することを確認した。さらに、MK-4 は 7 日間の培養で HAVICs のアルカリホスファターゼ (ALP) 活性を増強し、石灰化マーカーの骨形成タンパク質 2 (BMP2) の遺伝子発現を著しくアップレギュレートした。 そこで、MK-4 誘発性 HAVIC 石灰化の分子機構を明らかにするため、様々な阻害薬を用いて薬理的検討を行った。まず、Pit-1 の阻害薬、ホスホノギ酸、または Smad1/5/8 の阻害薬、ドルソモルフィンがそれぞれ高リン酸培地で MK-4 誘発性 HAVIC 石灰化を有意に抑制することを確認した。一方、MAPK の阻害薬、SB23906、または NF- κ B 阻害薬、SN-50 は MK-4 誘発性石灰化を抑制しませんでした。我々は、TNF- α が NF- κ B を介して BMP2 発現を亢進し、その結果として転写因子 Smad1/5/8 発現亢進、さらに石灰化関連遺伝子の発現を介して ALP を活性化することで石灰化を誘発することを明らかにしている (Yu et al., 2011)。しかし、今回の結果は、NF- κ B が関与しないことを示唆している。そこで、他の経路の存在を探索したところ、2 つのプレグナン X 受容体 (PXR) 阻害剤、ケトコナゾールとクメストロールが MK-4 誘発性 HAVIC 石灰化を強力に抑制することを見出した。さらに、PXR 活性が MK-4 によって用量依存的に有意に増加することを確認した。以上の結果は、MK-4 が PXR 活性を刺激することで BMP2 発現を亢進し、HAVICs 石灰化を誘発することを強く示唆している。 次に、生理学的に正常なリン酸培地で、MK-4 が BMP 発現を亢進するかどうか検証した。その結果、MK-4 は正常リン酸培地でも BMP2 遺伝子発現を有意に増加させ、これが PXR 阻害薬、クメストロールの共存で抑制された。さらに、過剰な BMP2 (30 ng/mL) による HAVIC 石灰化モデルを作成し、これに対する MK-4 の作用を調べたところ、MK-4 は過剰 BMP2 誘発性 HAVIC 石灰化をさらに亢進し、この変化がクメストロールによって抑制されることを明らかにした。	

以上の結果は、MK-4 が PXR-BMP2-ALP 経路を介して AVS 患者の HAVIC の石灰化を促進することを強く示唆している。