

## 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 劉旭
<p>(論文題目)</p> <p>Human aortic valve interstitial cells obtained from patients with aortic valve stenosis are vascular endothelial growth factor receptor 2 positive and contribute to ectopic calcification</p> <p>(大動脈弁狭窄症患者より得た大動脈弁間質細胞は VEGFR2 陽性であり、異所性石灰化に寄与する)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p>大動脈弁狭窄症 (AVS) は心血管系死亡の主な原因の一つであり、特に弁の異所性石灰化が本疾患の予後悪化に寄与する。超高齢社会の進行で、石灰化 AVS はますます一般的な疾患となっており、先進国においては弁膜症の最も一般的なタイプになっている。スウェーデンの研究では、65 歳から 79 歳の年齢層で石灰化 AVS の有病率は、2 から 4%と推定された。なお、80 歳以上のグループでは約 10%であった。しかしながら、現在 AVS の進行を抑える効果的な医療手段がない。外科的治療である大動脈弁置換術は根治的治療である一方で、高侵襲のため高齢者のようなハイリスク患者には耐術能に疑問が残る。最近、経カテーテル大動脈弁留置術が開発され、ハイリスク患者に使用されるようになったが、それでも AVS 患者の約 20 %が耐術困難である。従って、石灰化を抑制する効果的な薬物療法の開発が重要である。我々の研究グループでは、ヒト大動脈弁間質細胞 (HAVICs) の異所性石灰化機構の解明を目指してきた。最近、AVS 患者から得た HAVICs が、炎症性サイトカインの一つである腫瘍壊死因子 <math>\alpha</math> (TNF-<math>\alpha</math>) や高リン酸など様々な異所性石灰化刺激に対して高感受性であることを示したが、石灰化に寄与する細胞の特性が不明のままであった。本研究の目的は免疫染色手法を用いて AVS 患者大動脈弁より単離した HAVICs の性状解析を行い、弁石灰化に寄与する細胞集団を明らかにすることである。</p> <p>HAVICs は AVS 患者から単離し、ノンコートディッシュで培養した後、第一継代 (P1) 細胞について免疫細胞化学的特徴や各種分化能を調べた。また、</p>	

弁組織についても同様に免疫染色により調べた。その結果、P1 HAVICs のほとんどが CD73、CD90、および CD105 陽性であり、CD45 および CD34 陰性であることがわかった。さらに HAVICs は血管内皮増殖因子受容体 2 (VEGFR2) 陽性でもあり、そのうち約半分は  $\alpha$ -平滑筋アクチン (SMA) 陽性であることがわかった。これらの細胞は、コロニー形成能を持ち、骨芽細胞様細胞への分化能を示した。石灰化した弁組織の免疫染色でも、VEGFR2 陽性細胞が弁全体に広い範囲で局在する一方、 $\alpha$ -SMA 陽性細胞は一部の組織でしか認めなかった。また、VEGFR2 陽性 HAVICs が TNF- $\alpha$  存在下で転写因子、NF- $\kappa$ B 活性化を促進し、BMP2-ALP 経路を介して異所性石灰化を誘発することを確認した。しかし、VEGFR2+ $\alpha$ -SMA 両陽性細胞は、VEGFR2 陽性+ $\alpha$ -SMA 陰性細胞による TNF- $\alpha$  誘発性異所性石灰化を亢進しなかった。

AVS の患者から単離された HAVICs は、間葉系幹細胞としての性状 (CD73、CD90、CD105 陽性、および CD45、CD34 陰性) を示したが、骨芽細胞以外に脂肪細胞や軟骨細胞への分化能を示さなかった。これらの細胞は、全て VEGFR2 陽性であり、様々な石灰化刺激に感受性が高い。従来、大動脈弁の異所性石灰化は平滑筋細胞や線維芽細胞の骨芽細胞への分化が原因と考えられてきたが、VEGFR2+ $\alpha$ -SMA 両陽性細胞と VEGFR2 陽性+ $\alpha$ -SMA 陰性細胞間で石灰化能に差が認められなかった。 $\alpha$ -SMA は平滑筋細胞や線維芽細胞のマーカーとして知られており、これらの結果は平滑筋細胞や線維芽細胞が弁異所性石灰化に寄与しない可能性を示唆している。一方、VEGFR2 陽性細胞は、AVS 患者から得た石灰化大動脈弁において、内皮だけでなく間質にも多数局在していた。このことは、AVS 患者から単離された HAVICs が大動脈弁内皮細胞に由来し、例えば、内皮間葉移行によるこれらの細胞の分化が大動脈弁の異所性石灰化に寄与する可能性があることを示唆している。今後、これらの結果に基づいて、内皮間葉移行を視野に据えた大動脈弁異所性石灰化のメカニズムを解明し、AVS 増悪の主要因である異所性石灰化の進行を抑制するための新しい治療法を開発する必要がある。