

テロメア合成酵素が大動脈弁狭窄症の発症・進展に与える影響

青野 潤

愛媛大学医学部附属病院 循環器内科学

【研究の背景】

大動脈弁狭窄症 (Aortic valve stenosis: AS) は突然死・急性心不全など致命的病態を生じる最重症心臓弁膜症の一つである。高齢化と生活習慣の欧米化が進み、冠動脈疾患、脳卒中とともに心臓弁膜症の一つである AS の罹患率 (先進国で 65 歳以上の 2-4%) も急激な増加の一途を辿っている。AS は加齢による動脈硬化様変化により弁膜の硬化・狭窄を生じ長期間無症状で経過する進行性の疾患であるが、ひとたび症状が出現し重症化すると突然死・急性心不全などを生じ致死率が非常に高くその根本的治療は心臓弁置換手術しかない。また、AS の『手術適応前の治療』は動脈硬化危険因子の是正程度でその治療を施行しても進行を遅らせることは困難であり、AS の発症・進展に関わるメカニズムまたは新規ターゲットの解明は急務である。しかしながらこれまで、本疾患の分子生物学的メカニズムは解明されておらず、疾患の発症・進展のメカニズムも未だ明らかではない。テロメア合成酵素 (テロメラーゼ) は癌を含めた炎症/増殖性疾患の発症・進展への関与が報告されており、申請者は AS 病変と病理学的に酷似した動脈硬化病変でのテロメラーゼの関与を報告した¹⁾。本計画では AS の進行における新規ターゲットとしてテロメラーゼの関与を実証する。

【目 的】

本研究は申請者の仮説『テロメア合成酵素 (テロメラーゼ) は大動脈弁狭窄症 (Aortic valve stenosis: AS) 発症・進展に関与する』を実証することを目的とする。

【方 法】

- ① ヒト大動脈正常弁を非心臓死剖検症例より、ヒト大動脈狭窄症弁を大動脈弁置換術症例より採取し、リアルタイム PCR を用いてテロメラーゼの発現の差異を検討する。
- ② 大動脈弁より大動脈弁間質細胞 (Aortic valve interstitial cells: AVICs) を採取する²⁾。ブタ大動脈弁より AVICs を採取する予備実験の結果を参考に、ヒト大動脈正常弁 (非心臓死剖検症例) と狭窄弁 (手術検体) より AVICs を採取・培養する。
- ③ AVICs に石灰化誘発刺激³⁾ を行い、弁膜の石灰化に関与すると考えられている遺伝子 (BMP-2、BMP-4、Runx2、Osteopontin、Alkaline phosphatase (ALP) など)⁴⁾ の AVICs における発現を検討する。
- ④ テロメラーゼ shRNA (Telomere Reverse Transcriptase (TERT) shRNA) を用いてテロメラーゼをノックダウンする、さらに TERT プラスミド、TERT ウイルスでテロメラーゼを過剰発現させることで、i) AVICs の石灰化、ii) 弁膜の石灰化に関与する遺伝子に対するテロメラーゼの影響を検討する。

【結 果】

- ① 非心臓死剖検症例、大動脈弁狭窄症患者、大動脈弁閉鎖不全症患者からヒト大動脈弁を採取しリアルタイム PCR を施行したところテロメラーゼの酵素サブユニットである telomere reverse transcriptase (TERT) の遺伝子発現が正常弁、大動脈弁閉鎖不全症の大動脈弁 (手術検体) と比較し大動脈狭窄症弁で亢進していた。
- ② ブタ大動脈弁から採取した AVICs を用いた予備実験を参考に、in vitro calcification assay を確立した。大動脈弁はもと

もと構成細胞が少なく、またその弁より採取した細胞を用いた培養実験では形質転換など細胞の特性変化により、in vitro 解析が困難な場合もあったが、我々は1細胞から細胞特性を維持したまま培養する新規低酸素培養法を導入することで系の最適化に成功した。これにより生体内により近い状態で効率的に細胞を増殖させることが可能であり、効率的に研究を進めていくことが可能になった。本法をもとにヒト大動脈正常弁(非心臓死剖検症例)と狭窄弁(手術検体)より AVICs を採取し石灰化刺激を施行した。

- ③ それら AVICs に石灰化刺激を行いマイクロアレイ解析によりその遺伝子発現プロファイルを詳細に解析した。その結果、石灰化刺激により顕著に発現上昇している遺伝子を 533 種、また発現低下している遺伝子として 476 種を同定することに成功した。これらの中にはカテプシン K など従来 AS 患者由来弁の網羅解析などで同定された遺伝子も多く含まれていたが、機能未知の新規の遺伝子も多数含まれていた。現在この結果に基づいて Pathway 解析を実施しており、弁膜の石灰化に関与すると考えられている遺伝子(BMP-2、BMP-4、Runx2、Osteopontin、Alkaline phosphatase)とともにテロメラーゼとの関連を明らかにする予定である。
- ④ テロメラーゼの酵素サブユニットである telomere reverse transcriptase(TERT) 過剰発現用のレンチウイルスを作成した。また、このウイルスを用いて、TERT 強制発現 AVICs の樹立に成功した。一方、テロメラーゼ shRNA(Telomere Reverse Transcriptase(TERT) shRNA)に関しては現在いくつかの候補を作成済みであり、各 shRNA のノックダウン効率を検討しているところである。これら TERT 過剰発現及び TERT ノックダウン AVICs を用いて石灰化刺激を行い、TERT の発現量が細胞石灰化に与える影響を今後明らかにする予定としている。

【考 察】

以上の結果から我々は、AVICs における TERT の遺伝子発現が AS の石灰化など、病態形成に寄与している可能性があると考えている。今後 TERT の発現量と AVICs の石灰化との関係を明らかにするため、TERT 遺伝子を過剰発現またはノックダウンした AVICs を用いて in vitro calcification assay を行い、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析・Pathway 解析・石灰化評価を施行することで、より詳細に病態における TERT の機能的な役割を明らかにする予定である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

大動脈弁石灰化原因律速因子の同定とその阻害化合物を見い出すことにより、AS の発症・進展抑制治療への期待がさらに広がり、手術適応『前段階』の AS 患者のための創薬・バイオマーカーイノベーションを含めた発症・進行予防治療戦略を確立する上で大きな意義を持つものと期待される。

【参考・引用文献】

1. Aono J, Ruiz-Rodriguez E, Qing H et al. Telomerase Inhibition by Everolimus Suppresses Smooth Muscle Cell Proliferation and Neointima Formation Through Epigenetic Gene Silencing. JACC Basic Transl Sci 2016;1:49-60.
2. Yang X, Fullerton DA, Su X, Ao L, Cleveland JC, Jr., Meng X. Pro-osteogenic phenotype of human aortic valve interstitial cells is associated with higher levels of Toll-like receptors 2 and 4 and enhanced expression of bone morphogenetic protein 2. J Am Coll Cardiol 2009;53:491-500.
3. Osman L, Yacoub MH, Latif N, Amrani M, Chester AH. Role of human valve interstitial cells in valve calcification and their response to atorvastatin. Circulation 2006;114:I547-52.
4. Leopold JA. Cellular mechanisms of aortic valve calcification. Circ Cardiovasc Interv 2012;5:605-14.