

トランスクリプトーム解析を駆使した大動脈弁石灰化機序の解明

坂上倫久

愛媛大学大学院 医学系研究科 心臓血管・呼吸器外科学
愛媛大学 プロテオサイエンスセンター 細胞増殖・腫瘍制御部門

【研究の背景】

動脈硬化は、動脈内側の粥腫形成により血管狭窄や閉塞を起こす病態であり、その発症機序はこれまで分子レベルで幅広く解明されてきた。大動脈弁狭窄症 (Aortic valve stenosis: AS) は動脈硬化性疾患の一つであり、大動脈弁組織に石灰化や線維化などにより弁狭窄を来すことが知られているが病態発症機序は依然として不明である。AS は二尖弁などの先天的要因のみならず加齢や生活習慣の乱れなど後天的要因により発症することが報告されている¹⁾。また、AS の主な治療法は外科的大動脈弁置換術あるいは経カテーテル大動脈弁留置術であるが、薬物根治療法は未だ存在しない。本邦における AS 罹患率は年々増加傾向にあり、大動脈弁組織における石灰化や線維化の分子メカニズムの解明が期待されている。これまで、弁石灰化には異所性の骨芽細胞分化が関与するとの報告がなされているが²⁾、弁間質細胞 (VIC) のうち、どのような細胞集団を起源とし、またどのようなメカニズムで骨芽細胞へと分化するのか、そのメカニズムについては未解明のままである。そこで本研究では、新しい AS 治療標的分子または細胞種を探索するため、AS モデルマウスおよびヒト臨床検体を用いたトランスクリプトーム解析により大動脈弁石灰化の分子メカニズムを明らかにすることを目的として研究を実施した。

【目 的】

トランスクリプトーム解析を駆使した大動脈弁間質細胞の特性解析により、大動脈弁狭窄症発症メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方 法】

全ての動物実験は、愛媛大学学術支援センター・動物実験部門の定める動物実験規則に従って行った。7 週齢 C57BL/6 マウスを麻酔したのち、右頸動脈よりワイヤーを挿入し、大動脈弁をワイヤーにて障害することで AS 病態を誘導できる AS モデルマウスを作製した³⁾。AS 発症および重症度についてはマウス用心エコーを用いて流速を測定することで評価した。AS モデルは野生型 (WT) マウスおよび Neural crest cell (NC) 細胞レポーターマウスを背景に作製した。ワイヤーによる弁の物理的障害後の組織学的な変化については、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、エラスチカ・マッソン (EM) 染色、NC 細胞マーカーである Nestin (NES)、骨芽細胞マーカーである runt-related transcription factor 2 (RUNX2)、VIC マーカー Vimentin (VIM) に対する免疫組織染色を実施した。また、マウスおよびヒト VIC を単離、2% 低酸素条件下にて培養し、骨芽細胞 (アリザリンレッド染色陽性) へ分化させるアッセイ系 (Osteoblast-inducer Reagent MK430 (TAKARA 社製)) と RNA シーケンス解析を組み合わせ、IPA (Ingenuity Pathway Analysis, QIAGEN 社製) 解析によりシグナルネットワーク解析を進め、骨芽細胞の源となる細胞の同定および細胞分化を制御する責任シグナルの解析を実施した。なお、ワイヤー障害群を WI 群、対照群を sham 群とした。

【結 果】

1. AS モデルマウスおよびヒト AS 患者を対象とした組織解析の結果、von Kossa 陽性カルシウム沈着周辺において RUNX2 陽性の骨芽細胞様の VIC が多数認められた。
2. WI 群における大動脈弁間質では Sham 群と比較して VIM 陽性間質細胞の著しい増加を認めていた。その VIM 陽性の VIC の中でも NC 細胞マーカーである NES 陽性の細胞は、sham 群における弁間質ではほとんど認められないのに対して、WI 群では有意に増加していた。
3. RUNX2 陽性骨芽細胞は NES 陰性であったが、RUNX2 陽性骨芽細胞周辺において認められる多数の VIC の大部分は RUNX2 陰性 NES 陽性細胞であった。
4. トランスクリプトーム解析より、ヒト、マウスともに VIC の骨芽細胞分化に伴って NES などの NC 細胞マーカー遺伝子の著しい発現低下が認められた。

【考 察】

WI によって AS を誘導したマウス大動脈弁間質において多数の NC 細胞が認められ、その一部が RUNX2 陽性かつ NES 陰性となることから、大動脈弁狭窄症には NC 細胞を細胞起源とする異所性骨芽分化が、大動脈弁石灰化の原因である可能性が示唆された。実際、トランスクリプトーム解析では、骨芽細胞分化誘導によって NC 細胞マーカー遺伝子発現が有意に低下することから NC 細胞が大動脈弁石灰化に寄与する可能性が高い。現在、NC 細胞レポーターマウスを用いた1細胞レベルでのトランスクリプトーム解析を継続中であり、今後、動物実験レベルで大動脈弁石灰化機構全容を明らかにする予定である。一方、ヒト VIC に対するトランスクリプトームおよび IPA 解析の結果、2%低酸素培養法で得られる VIC は RUNX2 陽性骨芽細胞への分化効率が高く、多くの間葉系幹細胞マーカー遺伝子の発現を有する細胞集団であることが分かってきた⁴⁾。このことから、これらの VIC はヒト大動脈弁石灰化の源となる細胞である可能性が示唆された。現在、細胞分化前後で変動する細胞内シグナルについて IPA を用いて解析を継続しており、動物実験から得られたトランスクリプトームデータと相互的な解析を展開する予定としている。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

VIC は、大動脈弁組織の恒常性維持に重要であるが、AS 病態においては骨芽細胞へと分化しカルシウム沈着に寄与することが報告されている。すなわち、本研究により、正常 VIC が病的 VIC へと変化する過程を分子および細胞レベルでより深く理解することは、大動脈弁組織における石灰化を予防し、さらには AS の新規治療法の開発研究の加速に大きく貢献するものと期待される。

【参考・引用文献】

- 1) CM Otto, and B Prendergast., Aortic-valve stenosis—from patients at risk to severe valve obstruction., *N Engl J Med.* 2014 Aug 21;371(8):744-56.
- 2) Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, Stock SR, Donovan J, Springett M, Orszulak T, Fullerton DA, Tajik AJ, Bonow RO, Spelsberg T., Human Aortic Valve Calcification Is Associated With an Osteoblast Phenotype., *Circulation.* 2003 May 6;107(17):2181-4.
- 3) Honda S, Miyamoto T, Watanabe T, Narumi T, Kadowaki S, Honda Y, Otaki Y, Hasegawa H, Netsu S, Funayama A, Ishino M, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Shishido T, Miyashita T, Kubota I., A novel mouse model of aortic valve stenosis induced by direct wire injury., *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 Feb;34(2):270-8.
- 4) Kanno K, Sakaue T, Hamaguchi M, Namiguchi K, Nanba D, Aono J, Kurata M, Masumoto J, Higashiyama S, Izutani H., Hypoxic Culture Maintains Cell Growth of the Primary Human Valve Interstitial Cells with Stemness., *Int J Mol Sci.* 2021 Sep 29;22(19):10534.