

## 研究助成 2016—生活習慣病領域—

### 研究成果報告書(最終) <概要>

<b>属</b>	愛媛大学大学院循環器・呼吸器・腎高血圧内科学
<b>系</b>	青野 潤
<b>研究テーマ</b>	臨床検体(剖検・手術サンプル)を用いた大動脈弁狭窄症のメカニズム解明による予防・治療戦略の探索

- ・ 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- ・ 概要の構成は自由とするが、研究目的、手法、成果など、一般の方にもわかりやすくすること。
- ・ 枚数は1ページにまとめること。(図表、写真などの添付を含む)

#### 研究目的

大動脈弁狭窄症(Aortic valve stenosis: AS)は心臓弁膜の硬化/狭窄により突然死・急性心不全など致命的病態を生じる最重症心疾患の一つである。ヒト大動脈正常弁(剖検例)と狭窄弁(手術検体)を用い分子生物学的手法を含めた網羅解析を施行しASの発症・進展に関与する新規ターゲットを探索することを目的とした。

#### 研究手法

- ①正常弁(剖検症例)とAS弁に対してCD31および $\alpha$ SMAで蛍光免疫組織染色を施行し弁の構造について組織学的検討を行う。
- ②細胞レベルのASメカニズムの解析を行うため弁置換術で摘出したAS狭窄弁から大動脈弁間質細胞を採取するための適正培養法を検討する。
- ③弁の正常部位と石灰化部位から間質細胞を採取し両者の細胞の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイにより詳細に解析する。
- ④マイクロアレイで見出した遺伝子の正常部位大動脈弁間質細胞における発現をウエスタンブロッティングで、ヒト大動脈正常弁(剖検例)と狭窄弁(手術検体)における発現を免疫染色で評価検討する。

#### 研究成果

- ①剖検から得られた正常弁とAS弁において、弁線維化に関わる筋線維芽細胞と弁構造の防御壁である大動脈弁内皮細胞に対し免疫組織染色を行ったところ、正常弁では大動脈側と心臓側にそれぞれ筋線維芽細胞のマーカーである $\alpha$ SMA陽性細胞が表層にアライメントされているのに対して、AS弁では無秩序に弁間質に浸潤増殖していることを確認した。また内皮細胞は正常弁では、大動脈側表層の筋線維芽細胞の外側と、心臓側の表層に秩序正しく存在しているが、AS弁では弁間質内部にまで異常な増殖が認められた。また、管腔状の染色像も多数認められることからAS弁では血管新生が強く誘導されていると考えられた。
- ②AS病態のメカニズムを細胞レベルで検証するため病態の発症に関与している大動脈弁間質細胞を採取した。大動脈弁から回収できる間質細胞数が少ないため、継代維持における間質細胞の特性変化、増殖能の維持が実験を進める上で問題になると考えられたが、申請者は細胞特性を維持したまま培養する新規低酸素培養法の開発に成功し、これらの問題を解決した。
- ③AS患者由来の大動脈弁(5例)を対象に、弁の正常部位と石灰化部位から弁間質細胞を採取し、遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイで解析した。その結果、正常部位に比べて病変部位で顕著に発現上昇している遺伝子を19種、発現低下している遺伝子として68種同定し、また全体的には数百以上の遺伝子の発現パターンに違いが認められた。その中で我々はタンパク質X(仮称)が正常部由来細胞と比較し石灰化部位由来の細胞で上昇していることをQPCRで確認した。
- ④正常部由来、石灰化部由来の大動脈弁間質細胞でタンパク質Xの発現をウエスタンブロッティングで評価したところ石灰化由来の細胞で発現が上昇していることを確認した(図1)。またヒト大動脈正常弁(剖検例)と狭窄弁(手術検体)をタンパク質X抗体で免疫染色したところ石灰化周囲に存在する細胞を中心に発現していることを確認した(図2)。

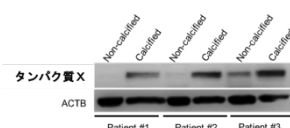


図1 石灰化部位由来と非石灰化部位由来の大動脈弁間質細胞のタンパク質Xの蛋白発現。

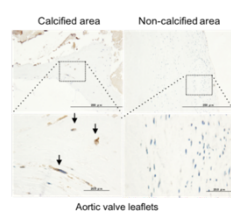


図2 ヒト大動脈狭窄弁におけるタンパク質Xの発現。

#### 今後の展開

今回の網羅解析で見出した分子をRISPR-Cas9系でノックアウトまたは過剰発現させるレンチウイルスシステムを用いて、石灰化に対する機能評価を行い、遺伝子改変マウスのASマウスモデルを用いた動物実験に発展させる予定である。

研究助成 2016—生活習慣病領域—

研究成果報告書(最終) <発表実績/予定一覧>

所 属	愛媛大学大学院循環器・呼吸器・腎高血圧内科学
氏 名	青野 潤

**1. 論文発表実績**

- ・ 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- ・ 掲載年次順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。
- ・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。
- ・ 国内外雑誌を問わない。
- ・ 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。
- ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。

1	Sakaue T, Nakaoka H, <u>Aono J</u> , Kurata M, Oshima Y, Koga S, Namiguchi K, Izutani H. Molecular-based analysis and therapeutic development of aortic valve stenosis. Ehime Medical Journal. 37(1): 05-09, 2018
---	---

2	Sakaue T, Nakaoka H, Shikata F, <u>Aono J</u> , Kurata M, Uetani T, Hamaguchi M, Kojima A, Uchita S, Yasugi T, Higashi H, Suzuki J, Ikeda S, Higaki J, Higashiyama S, Izutani H. Biochemical and histological evidence of deteriorated bioprosthetic valve leaflets: the accumulation of fibrinogen
---	---

3	
---	--

4	
---	--

--	--

--	--

--	--

--	--

--	--

--	--

--	--

様式 4-2②

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。</li> <li>・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。</li> <li>・ 国内外を問わない。</li> <li>・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。</li> </ul>		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2017年10月7日 ～10月11日	31st EACTS 2017 Annual Meeting – European Association for Cardio-Thoracic Surgery, Tomohisa Sakaue, <u>Jun Aono</u> et al. Plasminogen and fibrinogen promote calcification in bioprosthetic valve leaflets in aortic position
2	2017年9月26日 ～9月29日	第70回日本胸部外科学会定期学術集会, 坂上倫久, <u>青野 潤</u> 他, 再弁置換術によって得られた劣化生体弁の生化学的解析
3	2017年2月10日 ～2月12日	第46回日本心脈管作動物質学会, 坂上倫久, <u>青野 潤</u> 他, 摘出大動脈弁由来間質細胞の調整とその特性解析
4		
3. 投稿、発表予定		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1		
2		
3		
4		