

(第3号様式)

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名 菅野 果歩

論 文 名 大動脈弁間質細胞の増殖と幹細胞性の維持における  
低酸素培養の有用性

---

### 学位論文要旨

【背景】大動脈弁狭窄症 (Aortic Stenosis: AS) は、石灰化により弁狭窄を起こす疾患であるが、発症予測のためのバイオマーカーはなく、また弁石灰化に至る分子機序も未だ不明である。そのため、石灰化大動脈弁を外科的に切除して人工弁に置き換える弁置換術、あるいはカテーテルにより人工弁を留置する経カテーテル大動脈弁留置術による治療が主であり、薬物根治療法は未だ存在しない。大動脈弁尖を構成する弁間質細胞は、通常では弁の組織恒常性維持に重要な役割を担うことが知られている。最近、ヒト石灰化大動脈弁組織を用いた病理学的解析から、石灰化組織周辺に骨芽細胞様細胞の局在が確認されていることから、弁間質細胞を起源とした異所性骨芽細胞分化との関係性が注目されている。そこで、健常時及びAS発症時の大動脈弁間質細胞の特性を詳細に解析することは、大動脈弁石灰化機序解明の手掛かりとなる。一方、低酸素培養法は間葉系幹細胞など未分化性を維持した状態で細胞を培養維持できる手法として注目されているが、これまでヒト弁間質細胞に対して低酸素培養法の優位性を実証した報告はない。そこで、低酸素培養により弁間質細胞培養法を最適化できると、骨芽細胞への分化機序解明に対する研究に大きく貢献できる。

【目的】本研究では、低酸素培養法によって維持した弁間質細胞に対して、次世代シーケンサーを用いた遺伝子プロファイリング解析および細胞生物学的解析によってその細胞特性を明らかにし、AS創薬研究のための弁間質細胞の培養条件の最適化を目指した。

【結果】大動脈弁置換術適応となった石灰化を伴わない大動脈弁逆流症患者より大動脈弁間質細胞を単離し、通常酸素下および2%酸素低酸素下で培養した。その結果、通常酸素下で培養した弁間質細胞は、低酸素に比べて有意に増殖が抑制された。さらに、低酸素培養と通常酸素培養における弁間質細胞の遺伝子発現解析の結果、培養7日目、14日目、28日目と培養経過に伴って、両群で発現変動する遺伝子数の増加が認められた。変動し

氏名 菅野 果歩

た遺伝子群に対して、パスウェイ解析ソフトウェア IPA を用いてそのシグナル経路を解析したところ、低酸素培養群において、培養 7 日目に低酸素誘導因子  $1\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) 依存性応答遺伝子シグナル経路の活性化が認められた。また、培養 14 日目以降において、通常酸素培養群においてインターフェロン誘導性の炎症シグナル経路の有意な活性化が認められた。さらに、IPA に基づいた canonical pathway 解析と western blotting 解析の結果、通常酸素培養ではグルタチオンおよびスーパーオキシド代謝シグナル伝達など酸化ストレス応答遺伝子の活性化が認められたと同時に、低酸素培養下の間質細胞では cyclin (CCN) D1 などの細胞周期進行関連シグナル経路の活性化、および細胞周期停止に関連するシグナル経路の不活性化が認められた。さらに、得られた遺伝子発現プロファイルに基づいて低酸素培養の弁間質細胞の幹細胞性を調べるために、間葉系幹細胞および造血細胞のマーカー遺伝子の発現レベルをリアルタイム定量 PCR 及び western blotting によって解析した。その結果、低酸素培養間質細胞における CD34、CD29、VCAM1 などの幹細胞マーカーの発現レベルは、通常酸素培養間質細胞に比べて有意に発現亢進していた。さらに、低酸素培養由来弁間質細胞の骨芽細胞への分化効率を調べるために、骨芽細胞分化培地を用いて分化誘導実験を行った。その結果、低酸素培養由来弁間質細胞では通常酸素培養由来弁間質細胞に比べて有意にアリザリンレッド染色で陽性となる骨芽細胞への分化効率を有意に上昇させた。最後に、AS 治療標的分子の同定を試みるために、低酸素培養法を駆使して石灰化大動脈弁間質細胞特異的に発現するタンパク質を、二次元ゲル電気泳動とナノ液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS/MS) を組み合わせたプロテオミクス手法を用いて探索した。その結果、石灰化弁組織特異的に酸化ストレスマーカーである Superoxide dismutase (SOD)2 が有意に高発現していることを見出した。SOD2 抗体を用いた免疫組織化学的染色では、SOD2 が石灰化領域の周囲の間質細胞に局在しており、非石灰化領域にはその発現が認められなかった。

【まとめ】以上の結果より、2%酸素低酸素培養法は、通常酸素培養法と比較して、酸化ストレス負荷軽減により大動脈弁間質細胞の未分化性維持を可能とし、弁間質細胞の培養・維持に大きな利点があることが分かった。低酸素培養法により得られる弁間質細胞は、大動脈弁石灰化への分子機構を明らかにするための創薬研究に対して重要な研究ツールとなることが示唆された。

このヒト大動脈弁における実験は、愛媛大学医学部の倫理審査委員会によって承認されている。(protocol nos.: 1509022 and 1603002)

キーワード (3～5)	大動脈弁間質細胞 大動脈弁狭窄症 低酸素培養 酸化ストレス
-------------	--