

(第7号様式)

学位論文審査結果の要旨

氏名	菅野 果歩
審査委員	主査 山口 修 副査 藤澤 康弘 副査 岩波 純 副査 中城 公一 副査 亀井 義明

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

審査結果の要旨

【背景と目的】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。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。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おり、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。申請者は低酸素培養による弁間質細胞培養法最適化は、骨芽細胞への分化機序解明に貢献できるとの着想を得て本研究に着手した。

【方法と結果】大動脈弁逆流症患者の摘出大動脈弁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。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。遺伝子発現解析の結果、培養経過に伴って両群で発現変動する遺伝子の増加が認められた。変動した遺伝子群に対してパスウェイ解析を行ったところ、低酸素培養7日目に低酸素誘導因子 1 α 依存性応答遺伝子シグナル経路の活性化を見出した。また、培養14日目以降の通常酸素培養群において、インターフェロン誘導性炎症シグナル経路の有意な活性化が認められた。さらに、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。また、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。骨芽細胞分化培地による分化誘導実験の結果、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骨芽細胞への分化効率が有意に上昇した。プロテオミクス手法による検討により、石灰化弁組織特異的に Superoxide dismutase (SOD)2 が有意に高発現していることを見出した。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。

【結論】 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、大動脈弁間質細胞の stemness 維持を可能とし、弁間質細胞の培養・維持に大きな利点が認められた。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。

本論文では、大動脈弁狭窄症の発症進展メカニズムに迫るための重要な培養条件を明らかにした。さらに、低酸素培養条件下において培養された弁間質細胞が、増殖能が維持されるとともに、骨芽細胞への分化誘導が向上した。これらの現象に関する分子機構についても、候補を解明したものであり、今後の研究にも活かされるものと期待できる。公開審査会は、令和5年3月7日に開催され、申請者は、研究内容を英語で明確に発表した後に、審査委員から本研究に関して、弁間質細胞の大血管における局在、低酸素培養による stemness 維持に関する特異性、HIF1 α の弁間質細胞増殖への関与、弁間質細胞の採取起源、低酸素培養以外の最適条件の探索の有無、通常酸素培養による老化マーカー出現の有無、他の細胞系統への分化誘導性の有無、病的動脈弁から検出される歯周病菌と大動脈弁疾患の因果関係、通常酸素培養条件下での増殖停止時期、低酸素条件下で培養された弁間質細胞の他の実験への応用計画、血管石灰化メカニズムとの関係性、大動脈弁狭窄症モデル動物に関する現状、大動脈弁狭窄症と弁間質細胞培養研究との関連性、病的弁間質細胞における stemness の評価、石灰化分子機構への今後のアプローチ、低酸素培養と組織内での酸素濃度の関係性、今後どのように創薬研究に活かすのか、など多くの質問が多面的になされ、それらに対して日本語で的確に応答した。

審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。