

## 論文内容の要旨

Dysregulation of ossification related microRNAs in circulating osteogenic progenitor cells obtained from patients with aortic stenosis  
(石灰化大動脈弁疾患における血液中骨形成前駆細胞での骨芽細胞分化関連 microRNA 群の発現に関する研究)

(高橋 完, 佐藤 衛, 高橋祐司, 大崎拓也, 那須崇人, 玉田真希子, 岡林 均, 中村元行, 森野禎浩)

(Clinical Science 130 巻, 13 号, 平成 28 年 7 月掲載)

### I. 研究目的

大動脈弁狭窄症(AS)は、高齢化社会に伴い近年増加傾向にあり、突然死に陥るハイリスクな弁膜症であり、その発症のメカニズムの探求は急務である。近年、経カテーテル大動脈弁留置術(TAVI)の開発に伴いその手術適応範囲が拡大している。ASの発症には、弁組織を覆う内皮細胞障害を機転とする弁組織の石灰化が考えられ、骨髄より分化した骨芽前駆細胞がその重要な役割を果たしていると推測されている。また、20 から 25 塩基から構成される microRNA が、標的遺伝子の messenger RNA の相補的配列と結合し、その翻訳を抑制することで、その発現調節作用を発揮するとされ注目されている。

本研究では AS の血液中骨芽前駆細胞(COPC)での骨芽細胞分化関連 microRNA 群の発現について解析し、その発症メカニズムを探求する。さらに、これらの発現について TAVI および大動脈弁置換術(AVR)施行前後で比較検討し、その治療効果を反映する新たなバイオマーカーを探索する。

### II. 研究対象ならび方法

対 象：手術適応を有する AS 群 46 例(年齢  $78.7 \pm 7.9$  歳, 男性/女性 13/33 例) および AS 群と年齢・性差がマッチした弁膜症を有さない対照群 46 例(年齢  $77.4 \pm 8.1$  歳, 男性/女性 14/32 例)を対象とした。AS 群 29 例では大動脈弁置換術(AVR)を施行し、17 例では TAVI を施行し、術前、術後 2 週間および 12 週後に末梢血液を採取した。

COPC の測定：末梢血液から Ficol1 密度勾配遠心分離法を用いて、末梢血単核細胞(PBMC)を分離し、FITC 標識 CD133, PerCP 標識 CD34, PE 標識 KDR および APC 標識 osteocalcin 抗体で染色し、FACS により COPC (CD133+/CD34-/KDR+/osteocalcin+細胞)数を測定した。骨芽細胞分化関連 microRNA 群の発現：PBMC より、total RNA を抽出し、Real-time RT-PCR により miR-106a, miR-148a, miR-204, miR-211, miR-30a, miR-31, miR-424 を定量測定した。

大動脈弁の石灰化量の測定：多検出器コンピュータ断層撮影(MDCT)により AS 群での大動脈弁石灰化(AVC)率(大動脈弁輪の断面積に対する AVC 絶対量の比)を測定した。In vitro study: AS 群 5 例から分離した PBMC への骨芽細胞分化関連 microRNA 群の導入モデルを作成し、その機能解析を行った。

### III. 研究結果

COPC 数：血中 COPC 数は、AS 群で対照群より高値であった ( $55.0 \pm 14.7$  vs.  $16.8 \pm 10.8 / 10^6$  個,  $P < 0.01$ ). TAVI 群と AVR 群では有意差を認めなかった ( $P > 0.05$ ). 骨芽細胞分化関連 microRNA：AS 群での miR-30c の発現は、対照群と比較し高値であった ( $4.05 \pm 1.62$  vs.  $0.96 \pm 0.76$ ,  $P < 0.01$ ). 一方、AS 群での miR-106a, miR-148a, miR-204, miR-211, miR-31 および miR-424 の発現は、対照群と比較し低値であった (miR-106a;  $0.92 \pm 0.53$  vs.  $5.17 \pm 2.05$ ; miR-148a;  $0.94 \pm 0.61$  vs.  $4.93 \pm 2.44$ ; miR-204;  $0.95 \pm 0.53$  vs.  $4.07 \pm 1.68$ ; miR211;  $0.92 \pm 0.62$  vs.  $4.43 \pm 1.91$ ; miR-31;  $0.84 \pm 0.50$  vs.  $4.07 \pm 1.97$ ; miR-424;  $0.97 \pm 0.66$  vs.  $5.20 \pm 2.31$ , all  $P < 0.01$ ). AS 群での osteocalcin MFI は、対照群と比較し高値であった ( $17.59 \pm 3.52$  vs.  $14.53 \pm 2.89$ ,  $P < 0.01$ ). COPC 数および osteocalcin MFI は、miR-30c の発現と正の相関を認め (all  $P < 0.05$ ), miR-106a, miR-148a, miR-204, miR-211, miR-31 および miR-424 の発現と負の相関を認めた (all  $P < 0.05$ ). AVC 率は、miR-30c と正の相関を示し、miR-106a および miR-424 と負の相関を示した (all  $P < 0.05$ ).

外科的治療：AVR 群および TAVI 群での COPC 数および osteocalcin MFI は、術後 2 週間および 12 週後に低下した (all  $P < 0.05$ ). AVR 群での miR-30c の発現は、術後 2 週間および 12 週後に低下し、一方、miR-106a, miR-148a, miR-204, miR-211, miR-31 および miR-424 の発現は増加した (all  $P < 0.05$ ). TAVI 群での miR-30c の発現は、術後 2 週後に低下し、miR-106a, miR-148a, miR-204, miR-211, miR-31 および miR-424 の発現は増加した (all  $P < 0.05$ ). しかし、術後 12 週間、いずれの発現にも変化がなかった。また、これらの変化率は AVR 群で TAVI 群と比較し高度だった。

In vitro study: 骨芽細胞分化関連 microRNA トランスフェクションモデルでは、miR-106a, miR-148a, miR-204, miR-211, miR-30a, miR-31 および miR-424 の発現が、osteocalcin の発現を制御することを立証した。

### IV. 結 語

AS では、COPC 数の増加、骨芽細胞分化関連 microRNA 群の発現異常および osteocalcin の発現亢進を認めた。In vitro study では、これらの microRNA 群が、osteocalcin の発現を制御することを立証した。さらに、外科的治療により、COPC 数、骨芽細胞分化関連 microRNA 群および osteocalcin の発現が変化した。以上より、COPC での骨芽細胞分化関連 microRNA 群の発現異常は、AS 発症に関与していることが示唆された。また、外科的治療による骨芽細胞分化関連 microRNA 群の変化は、治療効果の指標としての有用性が推測された。

## 論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 有賀 久哲 (放射線腫瘍学科)

副査 講師 石田 大 (内科学講座：循環器内科学分野)

副査 准教授 房崎 哲也 (内科学講座：循環器内科学分野)

大動脈弁狭窄症の発症には、内皮細胞障害を機転とする弁組織の石灰化が関与し、骨髄より分化した骨芽前駆細胞が重要な役割を果たしていると考えられる。本研究論文は、骨芽細胞の分化・発現に関与する microRNA に着目して、AS 患者における発現程度・病態との相関、外科的治療による影響、また形質移入細胞を用いた骨芽細胞の誘導を検討した論文である。AS 群において、骨芽細胞分化関連 microRNA は発現が有意に変化し、骨芽前駆細胞数、大動脈弁の石灰化程度との相関を認めた。弁置換術によりこれら因子は正常化傾向がみられたが、経カテーテル治療では外科的置換術と比べその変化率は小さかった。

本論文は、大動脈弁狭窄症発症のメカニズム解明や、その治療効果指標の開発に役立つ有益な知見を示した研究といえる。学位に値する論文である。

## 試験・試問結果の要旨

大動脈弁狭窄症の病態、発症メカニズム、microRNA の関与、臨床応用などについて試問を行い、適切な回答を得た。学位に値する学識を有していると考えられる。

## 参考論文

- 1) Circular and molecular mechanisms of statins: an update on pleiotropic effects (スタチンの細胞および分子機序：多面発現効果の上の最新版) (高橋 完 他 7 名と共著) Clinical Science, 129 巻, 2 号 (2015) : p93-105
- 2) Circulating Toll-like receptor 4-responsive microRNA panel in patients with coronary artery disease: results from prospective and randomized study of treatment with renin-angiotensin system blockade (冠動脈疾患の末梢血単核細胞での Toll 様受容体 4 および microRNA の発現についてーレニン・アンギオテンシン系阻害薬を用いたランダム化比較試験による結果) (高橋 完 他 7 名と共著) Clinical Science, 128 巻, 8 号 (2015) : p483-491