

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

鈴木 寛俊

専攻分野：外科学

コース：心臓血管外科

指導教授：宮入 剛

主論文の題目：

Aberrant Glycosylation of Lumican in Aortic Valve Stenosis Revealed by a Proteomic Analysis

(プロテオミクス解析で見出された大動脈弁狭窄症におけるルミカンの糖鎖異常)

共著者：

Masahide Chikada, Michiyo K. Yokoyama, Manae S. Kurokawa, Takashi Ando, Hiroshi Furukawa, Mitsumi Arito, Takeshi Miyairi, Tomohiro Kato

緒言

大動脈弁狭窄症 (Aortic Stenosis, AS) は高頻度に認められる心血管疾患であり、弁膜症の中では最も頻度が高い。高齢化に伴い AS の罹患率はさらに上昇するものと考えられている。AS における大動脈弁変性の原因や病態形成には不明の部分が多い。本研究ではそれらを明らかにする一助として、AS を有する患者の大動脈弁から、石灰化や肥厚の強い部分と比較的健常に近い部分とを別々に採取し、発現タンパク質の比較解析を行った。その結果、石灰化や肥厚の強い部分で変化しているタンパク質を検出同定することができたので報告する。

方法・対象

本研究では、7 人の AS 患者から治療としての弁置換術の際に採取された大動脈弁を検体とした。個々の AS 弁検体において、石灰化と肥厚

の強い部分 (AS-C) とそれらの無い健常様の部分 (AS-N) から別々にタンパク質を抽出した。抽出タンパク質を2次元電気泳動で展開し、スポット強度(すなわち発現量)に差のあるタンパク質スポットを抽出した。一部のタンパク質スポットについては、そのスポットに相当する2次元電気泳動ゲル部分を回収し、トリプシンによるゲル内消化後、質量分析を行った。その結果を用いてタンパク質データベースを検索し、タンパク質を同定した。ルミカンについては、さらにウェスタンブロットを用いて解析した。本研究は本学倫理委員会の承認(第1460号)を得ている。

結果

7例のAS患者において2次元電気泳動でAS-C領域とAS-N領域とのタンパク質の比較を行った結果、発現量に有意な差のあるタンパク質スポットが57個認められた。このことからAS-C領域とAS-N領域とでは、タンパク質プロファイルが異なることが明らかになった。その中でスポット強度が ± 1.5 倍以上異なるスポットに焦点をあて、タンパク質の同定を試みた。その結果、17個のタンパク質を同定した。同定されたタンパク質の中で、複数のスポットから同定されており、過去に石灰化との関連やASとの関連が報告されているルミカンについてウェスタンブロットを用いて解析した。その結果、ルミカンは80kDa、75kDa、65kDa、53kDaの分子量を示す4つのバンドとして検出された。その中で80kDaと75kDaのルミカンはAS-C領域でAS-N領域と比較して有意に減弱していた($p=0.01$)。また、65kDaと53kDaのルミカンはAS-C領域とAS-N領域で有意な強度差は認められなかった。なお、脱糖鎖処理によりこれらの4種のルミカンのバンドは消失し、約40kDaのバンド1本が出現したことから、4種のルミカンは付加糖鎖の違いによると考えられた。また、脱糖鎖後出現したルミカンのバンド強度はAS-C領域でAS-N領域とで有意差が無かったことから、AS-C領域においては糖鎖付加量の多いルミカンが減少していると結論づけた。

考察

本研究では、ASの肥厚石灰化の強い領域とそうでない領域とではタンパク質プロファイルが異なることを示した。特にルミカンは肥厚石灰化の強い領域で糖鎖(ケラタン硫酸)付加が十分でないことが示された。ASの病態と炎症の関係について、ASの大動脈弁にはマクロファージが浸潤しているとの報告がある。マクロファージに関しては大動脈壁へ浸潤し、その石灰化に関係していると報告されている。ルミカンは炎症部位のマクロファージや好中球の集積に関与するとの報告がある。過去

に、ルミカンからケラタン硫酸を除去すると、マクロファージの浸潤が促進されるという報告があり、本研究の結果と合わせると、肥厚石灰化の強い領域ではルミカンに含まれる KS 鎖が減少しており、大動脈弁組織へのマクロファージの浸潤を促進させていると推測された。慢性炎症の結果として大動脈弁が石灰化に至る可能性を示していると言える。

また、以前に 70kDa のルミカン（すなわちケラタン硫酸の豊富なルミカン）の減少が、メタロプロテアーゼ 9（MMP-9）の産生を増加させること、MMP-9 が大動脈壁の石灰化に関与することが報告されている。本研究結果と合わせると、大動脈弁でケラタン硫酸の豊富なルミカンの減少が MMP-9 産生を増加させ、石灰化につながる可能性が示された。

結論

AS の大動脈弁の肥厚石灰化の強い領域ではそうでない領域と比べ、ケラタン硫酸が豊富なルミカンが減少しており、炎症と石灰化の促進に関与している可能性が示された。