

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09271

研究課題名(和文)慢性腎臓病における血管・弁膜石灰化分子病態ネットワークの解明と治療標的分子探索

研究課題名(英文)Studies on molecular pathological network of vascular and valvular calcification in CKD and survey for therapeutic target

研究代表者

林 松彦 (Hayashi, Matsuhiko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：60129608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病において、血管石灰化を生じることが様々な合併症に関与することが知られている。そこで、動物実験を通してこの機序を解明するために、慢性腎臓病の状態を再現したマウスで血管石灰化を生じるモデルを作成した。この時、大動脈の平滑筋細胞が本来の性質を失い、骨を形作る骨芽細胞様細胞への形質変換を生じていることが分子レベルで示され、多くの炎症を起こす疾患で重要な役割を果たすNF- $\kappa$ Bという蛋白が血管特異的に働かなくなるようにしたマウスでは、血管石灰化が改善することを明らかとした。以上の結果は、NF- $\kappa$ B抑制薬が慢性腎臓病で見られる血管石灰化抑制薬として有用である可能性を示唆する極めて重要な知見と言える。

研究成果の概要(英文)：In the patients with chronic kidney diseases (CKD), it is well known that vascular calcification induces various complications. In this study, we developed a mouse model to reveal the mechanisms of vascular calcification. In this model mouse, vascular smooth muscle cells in the aorta were shown to lose its phenotype and gain the characteristics of osteogenic cells in molecular level. In addition, this phenomenon was ameliorated in the mouse which lost NF $\kappa$ B activity (important protein for various inflammatory diseases). From these findings, it is strongly suggested that inhibitor for NF $\kappa$ B will be a good candidate for the prevention of vascular calcification in CKD.

研究分野：腎臓病学

キーワード：慢性腎臓病 血管石灰化 NF $\kappa$ B

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病患者、特に末期腎不全患者において、心・血管疾患合併は予後決定因子として非常に重要であり、この心・血管疾患には、血管中膜平滑筋細胞が病変の場として示唆されている血管石灰化が中心的役割を果たすと考えられている。さらに、リン代謝障害がこの石灰化と密接な関係にあり、高リン濃度自体と酸化ストレスが、平滑筋細胞を骨芽細胞様細胞に形質変換させ、macrophage の動員とともに最終的に血管の石灰化にいたる機序が提起されている。この形質変換に際し、転写調節因子と、様々な分子との相互関係による複雑な分子ネットワークの関与により血管石灰化を生じると考えられているが詳細は明らかになっていない。この血管石灰化機序の解明は慢性腎臓病患者の合併症予防、予後改善に不可欠である。

2. 研究の目的

これまで研究代表者は、転写調節因子である NF $\kappa$ B が、慢性腎臓病進展と血管障害に非常に重要な役割を果たすことを明らかとし、さらに、KLF4 が NF $\kappa$ B と共調して作用することも証明してきた。しかし、臨床の場における血管・弁膜石灰化予防と治療に有用な標的分子同定にはいたっていない。そこで、転写調節因子と、これまでに報告された骨芽・破骨細胞分化誘導因子、そして特定の標的細胞との分子ネットワークを解明し、臨床応用可能な標的分子を探索することを目的として本研究を立案した。

3. 研究の方法

遺伝子操作動物を用いた in vivo の研究と、培養細胞を用いた in vitro の研究の補助により、血管石灰化の発症の場を確定すると共に、その発症機構に関わる転写調節因子を中心とする複雑な分子ネットワークの全容を明らかとし、治療標的分子を同定することを目的としている。すなわち、既に当研究室が保有する種々の遺伝子改変マウスにより病変の場となる細胞を明らかとして、その細胞における転写調節因子と骨芽・破骨細胞分化誘導因子との分子ネットワークを細胞特異的に解明する。慢性腎臓病による血管石灰化研究において、C57BL/6 系のマウスは血管石灰化を生じにくく、これまでは遺伝子操作動物による研究が進展しなかったが、これら遺伝子操作マウスのバックグラウンドを、血管石灰化を生じやすい DBA/2 系に変更して、アデニン投与または 5/6 腎摘による慢性腎臓病 (CKD) モデルの研究を行うことにより、当分野研究の飛躍的な進展が期待される。具体的な検討項目としては、石灰化の範囲を von Kossa 染色により観察し、miRNA array により microRNA の変化を、NF B 活性、NFAT 活性 (RANKL 下流にある転写調節因子)、KLF4 発現、VSMC マーカー、骨・軟骨マーカーの発現量を real-time PCR、gel shift assay な

どにより検討を加える。さらに、高リン食摂取下で比較するとともに、同定された病変の場に基づいて、血管平滑筋特異的、macrophage 特異的、または心線維芽細胞特異的 I B N 発現マウス・KLF4 ノックアウトマウスにおいて同様の検討を行い、NF B、KLF4 活性化と諸因子の血管膜石灰化における相互の役割を明らかとすることができる。これらの研究成果により、慢性腎臓病における血管石灰化の分子病態を明らかとして、治療標的を探索し、最終的にその有用性を CKD モデル動物により検証していく。

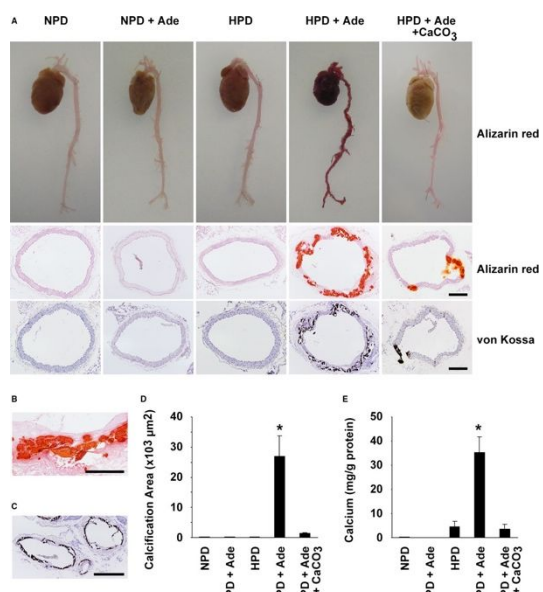
4. 研究成果

先ず、実験計画に沿って、既に保有していた NF B 活性化の dominant negative な抑制蛋白、I B N を Cre-recombinase 発現下で細胞特異的に発現するマウス、すなわち、細胞特異的に NF B 活性化が抑制されるマウスである I B N マウスのバックグラウンドを C57BL/6 から DAB/2 へと変更を行った。同時に、TagIn-Cre マウス、すなわち SM22 を発現する細胞、すなわち血管平滑筋特異的に Cre-recombinase を発現するマウスのバックグラウンドも同様に DAB/2 への変更を行った。バッククロスを 8 回以上繰り返すことにより最終的に両マウスのバックグラウンドを DAB/2 へと変換することに成功した。

次いで、この I B N マウスと TagIn-Cre マウスを交配することにより、血管平滑筋特異的に NF B 活性化が抑制されるマウスを作成した。この交配過程で作成される

I B N<sup>+/+</sup>/TagIn-Cre<sup>-/-</sup>マウス、  
I B N<sup>-/-</sup>/TagIn-Cre<sup>+/+</sup>マウス、  
I B N<sup>-/-</sup>/TagIn-Cre<sup>-/-</sup>マウス、  
を対照マウスとして使用した。

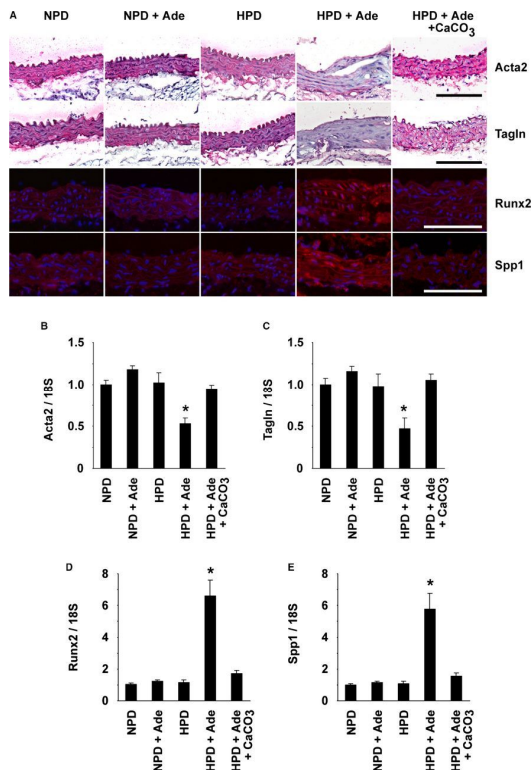
先ず、DAB/2 マウスにおいてアデニン・高リン負荷が血管石灰化を生じることを確認した。



この図に示すように、DAB/2 マウスは重度の血管石灰化を生じることが示されたが、同時に高リン血症と腎機能低下を示すことも確

認められた。さらに図にあるように炭酸カルシウム投与は血管石灰化を抑制し、血清リン濃度も正常化するが、腎機能低下には影響を及ぼさないことが確認された。この実験により、慢性腎臓病における血管石灰化モデルが初めて作成された。

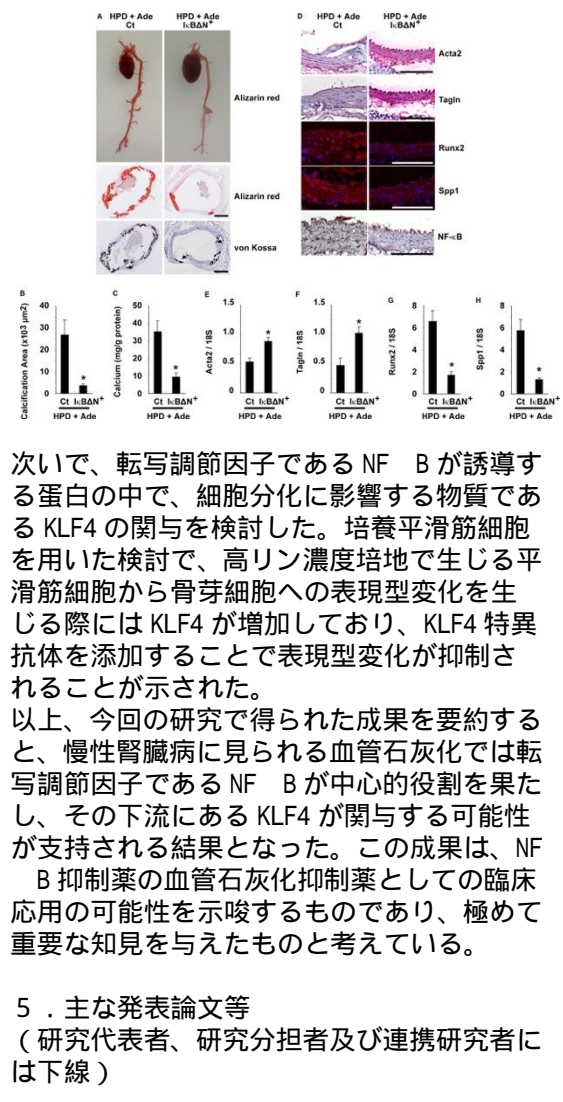
次いでこのマウス大動脈を用いて、骨代謝関連遺伝子の発現を検討した。その結果、下図にあるように、大動脈において、平滑筋細胞のマーカである Acta2、Tagln の発現は著しく低下し、骨芽細胞マーカである Runx2、Spp1 の発現が著増していることが示された。



この結果から、平滑筋細胞が骨芽細胞に表現型を変化させることが高リン血症による血管石灰化に重要な役割を果たすことが示唆された。さらに、アデニン・高リン負荷の心筋を病的に検討したところ、心筋細胞の線維化が見られることが明らかとなり、弁膜石灰化への影響も考慮された。また、アデニン・高リン負荷マウスに NF- $\kappa$ B 抑制薬を投与すると、これらの変化が非常に軽減することも示された。

この NF- $\kappa$ B の血管石灰化への関与を細胞特異的に証明するために、今回作成した I- $\kappa$ B $\alpha$ <sup>N<sup>+/+</sup>/Tagln-Cre<sup>+/-</sup></sup>マウス、すなわち、血管平滑筋特異的 NF- $\kappa$ B 抑制マウスを用いて、同様の検討を行った。その結果、次図に示すように、平滑筋細胞における NF- $\kappa$ B 活性化抑制は、著しく血管石灰化を抑制することが明らかとなった。さらに、平滑筋細胞マーカである Acta2、Tagln の発現は著増し、骨芽細胞マーカである Runx2、Spp1 は減少することが示された。これらの結果を総合すると、アデニン・高リン負荷で生じる血管石灰化におい

ては、NF- $\kappa$ B 活性化を介する細胞表現型の変換が極めて重要であることが初めて証明された。



次いで、転写調節因子である NF- $\kappa$ B が誘導する蛋白の中で、細胞分化に影響する物質である KLF4 の関与を検討した。培養平滑筋細胞を用いた検討で、高リン濃度培地で生じる平滑筋細胞から骨芽細胞への表現型変化を生じる際には KLF4 が増加しており、KLF4 特異抗体を添加することで表現型変化が抑制されることが示された。

以上、今回の研究で得られた成果を要約すると、慢性腎臓病に見られる血管石灰化では転写調節因子である NF- $\kappa$ B が中心的役割を果たし、その下流にある KLF4 が関与する可能性が支持される結果となった。この成果は、NF- $\kappa$ B 抑制薬の血管石灰化抑制薬としての臨床応用の可能性を示唆するものであり、極めて重要な知見を与えたものと考えている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

- Yoshida T, Yamashita M, Horimai C, Hayashi M. Smooth muscle-selective nuclear factor- $\kappa$ B inhibition reduces phosphate-induced arterial medial calcification in mice with chronic kidney disease. *J Am Heart Assoc* 6 (11), 2017, doi: 10.1161/JAHA.117.007248
- Yamashita M, Yoshida T, Suzuki S, Homma K, Hayashi M. Podocyte-specific NF- $\kappa$ B inhibition ameliorates proteinuria in adriamycin-induced nephropathy in mice. *Clin Exp Nephrol* 21(1): 16-26, 2017
- Yamashita M, Yoshida T, Hayashi M. Podocyte NF- $\kappa$ B is dispensable for the pathogenesis of renal ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rep* 4(16) pii: e12912, 2016, doi: 10.14814/phy2.12912
- Yoshida T, Yamashita M, Iwai M, Hayashi M. Endothelial Krüppel-Like

Factor 4 Mediates the Protective Effect of Statins against Ischemic AKI. J Am Soc Nephrol 27(5):1379-88, 2016

〔学会発表〕(計 6件)

“Inhibition of NFκB signaling in neural crest-derived fibroblasts attenuates renal fibrosis” Tadashi Yoshida, Maho Yamashita, Matsuhiko Hayashi, the 50th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, November 4, 2017, New Orleans

“Smooth muscle-selective NF-κB inhibition reduces phosphate-induced vascular calcification in mice with chronic kidney disease.” Tadashi Yoshida, Maho Yamashita, and Matsuhiko Hayashi, the 53rd European Renal Association - European Dialysis and Transplant Association Congress, June 4th 2017, Madrid, Spain

「ポドサイトのNF-κB活性はアドリアマイシン腎症における蛋白尿を制御する」吉田理、山下真帆、岩井美恵子、林松彦、第59回日本腎臓学会学術総会、2016年6月19日、横浜市

“Podocyte-specific NFκB inhibition ameliorates proteinuria in Adriamycin-induced nephropathy in mice” Tadashi Yoshida, Maho Yamashita, Matsuhiko Hayashi, the 53rd European Renal Association - European Dialysis and Transplant Association Congress, May 23 2016, Vienna, Austria

“Inhibition of NF-κB Signaling in Podocytes Ameliorates Albuminuria in Adriamycin-induced Nephropathy” Tadashi Yoshida, Maho Yamashita, Matsuhiko Hayashi, the 48th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, November 2015, San Diego

“Endothelial Kruppel-Like Factor 4 Mediates the Protective Effect of Statins against Ischemic Acute Kidney Injury” Tadashi Yoshida, Maho Yamashita, Matsuhiko Hayashi, the 48th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, November 2015, San Diego

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

林 松彦 (HAYASHI, Matsuhiko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号: 60129608

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

吉田 理 (YOSHIDA, Tadashi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号: 00306713

(4)研究協力者

なし