

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09661

研究課題名(和文) 動脈硬化進展における鉄の関与の解明

研究課題名(英文) Iron-induced calcification in human aortic vascular smooth muscle cells

研究代表者

木田 有利 (Kida, Aritoshi)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：30647516

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)：培養大動脈血管中膜細胞における鉄負荷による石灰化促進を確認できる実験系を確立した。また、マイクロアレイを用いた鉄負荷による石灰化促進に関与する遺伝子の網羅的解明を終えた。マイクロアレイは、鉄負荷・TGF- $\beta$ とそれぞれ単独・共刺激を行い、さらに刺激後day 1とday3を行うことで、IL-24が変化量が大きく血管細胞の石灰化の進行と非常に強い関係を持つことを見出した。さらに、マイクロアレイで確認された細胞内シグナルの遺伝子レベルあるいはタンパクレベルでの確認。これにより鉄負荷による石灰化促進のメカニズムを明らかにした。これらを論文や国際学会で報告を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

透析患者において腎性貧血の管理において鉄の投与は主要な治療法のひとつであるが、同時に酸化ストレスを増強することなどから、動脈硬化を促進する可能性が従来から指摘されている。慢性腎不全における石灰化の主要な場は血管中膜細胞(メンケベルグ型動脈硬化)である。鉄負荷が血管中膜細胞の石灰化を増強し、そのプロセスにTGF- $\beta$ に代表される炎症とIL-24が関わることを明らかにした。さらに、このプロセスは抗IL-24抗体で中和されることも見出した。この知見は、新規の動脈硬化抑制の治療法を確立に繋がっていくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：We established cultured human aortic medial cells which can demonstrate the calcification process induced by the stimulation of iron. We evaluated the gene expression comprehensively by microarray. The Microarray analysis detected that the IL-24 gene expression was enhanced by iron stimulation and TGF-beta stimulation. Moreover, we confirmed time course of gene expression change and protein level change.

We reported these results as article(Iron-induced calcification in human aortic vascular smooth muscle cells through interleukin-24 (IL-24), with/without TNF-alpha. Kawada S, Nagasawa Y, Kawabe M, Ohyama H, Kida A, Kato-Kogoe N, Nanami M, Hasuike Y, Kuragano T, Kishimoto H, Nakasho K, Nakanishi T. Sci Rep. 2018 Jan 12;8(1):658. doi: 10.1038/s41598-017-19092-1) and international meetings.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：石灰化 大動脈 透析 鉄 IL-24 腎性貧血 メンケベルグ型動脈硬化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

透析患者における動脈の石灰化は、生命予後を規定する重要な因子である。透析患者において腎性貧血の治療は重要な治療ターゲットであり、この治療に鉄の静脈内投与が日常的に行われている。しかしながら、鉄投与は、感染の頻度が増すなどの弊害が報告されている (Litton-E, et al, BMJ, 2013)。鉄負荷は酸化ストレスを惹起するなど、動脈硬化を増強する可能性があると考えられるが現在までの所、十分な研究は行われていない。我々の研究室では、血液透析により体内の貯蔵鉄の分布が大きくかわることを報告している (Kida-A et al, A J Physiol., 2014)。さらに血管の内皮細胞を用いて鉄負荷が石灰化を惹起することを見出し報告している (Nanami M, et al Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005)。しかしながら、透析患者における動脈硬化はメンケベルク型動脈硬化と言われる血管の中皮細胞における石灰化が特徴的であり、血管の中皮細胞を用いた研究は行なわれていない。我々のグループでは、既に培養大動脈血管中膜細胞 (血管平滑筋細胞) の培養液中に鉄を添加刺激と炎症状態を惹起するように TGF 刺激を行って石灰化を惹起できるかどうかの予備実験を行っている。この予備実験で、低濃度の鉄刺激と TGF 刺激の共刺激で石灰化は増強し、高濃度の鉄刺激では単独でも石灰化を惹起することを見出している。このことは、透析患者において鉄投与を安易に行うと石灰化を増強することを強く示唆している。この鉄による血管中膜細胞における石灰化促進に関して、既報が無いためにどの細胞内シグナルが寄与しているかを解明することは難しい。そのため、鉄刺激を行った Day1 と刺激を行っていないものとの比較をアジレント社の Microarray を用いて網羅的に検討を行った。これにより下表のように Fold Change45 倍以上でも、様々な遺伝子が動いていることが明らかになっている。これらを踏まえて、鉄負荷が血管中膜細胞の石灰化にどのような影響を与えるかを明らかにしていく。

### 2. 研究の目的

透析患者において腎性貧血の管理において鉄の投与は主要な治療法のひとつであるが、同時に酸化ストレスを増強することなどから、動脈硬化を促進する可能性がある。我々は、鉄が血管内皮細胞の石灰化の因子となりうることを見出している。しかしながら、慢性腎不全における石灰化の主要な場は血管中膜細胞 (メンケベルク型動脈硬化) である。すでに予備的な解析で、鉄負荷が血管内皮細胞に石灰化を炎症ストレスと共に誘導し、マイクロアレイにて様々なサイトカイン等がこのプロセスに関わっていることを見出している。そこで、この鉄負荷が血管中膜細胞の石灰化に影響を与えるかどうか、またどのような機序で血管中膜細胞に石灰化を惹起させるかを明らかにし、新規の動脈硬化抑制の治療法を確立して くことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### A) 鉄負荷による血管中膜細胞における石灰化促進の細胞培養系の確立

鉄負荷と炎症を惹起する TGF との単独・共刺激により培養血管内皮細胞に石灰化を引き起こす細胞培養系の確立を行う。この細胞培養系の樹立には当教室で培養血管内皮細胞系で行った方法を応用する (Nanami M, et al Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005)。鉄としては、トランスフェリン鉄など細胞毒性の弱いものを使用していく。すでに石灰化培地に変更後、鉄負荷をすることや TGF との共刺激によって石灰化を誘導することは確認している。石灰化そのものはアリザリン染色で確認を行っている。この刺激の初期段階を検討するために刺激後 Day1, Day3 また、後半の石灰化に関する因子を検討するために Day14 前後の細胞の mRNA を回収した。鉄負荷の刺激の初期段階としてはフェロポエチンなどの鉄のくみ出しにかかわる遺伝子や、細胞内輸送に関わるトランスフェリン受容体などの遺伝子の変化が予想されこれらを確認していった。細胞の石灰化には BMP2 や Msx2 (Shimizu-T et al, J boil Chem, 2011) などが関与していることが報告されており、石灰化が実際におこる段階としてはこれらの遺伝子発現の変化を確認した。

#### B) 鉄負荷による血管中膜細胞石灰化における遺伝子発現変化のマイクロアレイ法による網羅的解析

鉄負荷と TGF の単独・共刺激後の Day1 と Day3 の遺伝子発現変化をアジレント社の全遺伝子マイクロアレイ法により網羅的に解析を行う。その後、これらの結果の Pathway 解析を行い、どの細胞内シグナルが重要であるかを検討する。Day1, Day3 を比較することで細胞内シグナルのより持続し重要と考えられるものを選択していく。

すでに Day1 の部分についてのマイクロアレイは実施し、多数の候補遺伝子と同時に近年ポストゲノム時代の研究ターゲットとして注目されている non-coding RNA が多数遺伝子発現の大きな変化があることがわかった。これらの non-coding RNA についても解析を行っていく。

Day1 における鉄負荷で、20 倍以上の Fold Change があるものはおよそ 50 種、10 倍以上の Fold change のあるものはおよそ 140 種の遺伝子が上昇している。これらの遺伝子のおよそ 3 割がこの non-coding RNA となり、7 割が一般的な遺伝子である。これらのうち、TGF の刺激ではあがっていないものは、より鉄負荷特異的な石灰化にかかわる因子と予

想され、こらを中心にして次の検討を行っていった。  
 また、Day1 から Day3 にむけて同じ細胞内シグナル Pathway のなかで変化が持続しているものは、より重要な細胞内シグナルであると予想され、かつそのマイクロアレイの結果はより確かなことがわかる。そこで、Day 1 と Day 3 の遺伝子発現の中で同じ細胞内シグナルの中で変化があるものを選択していた。

### C) 鉄負荷による血管中膜細胞石灰化の遺伝子変化の確認

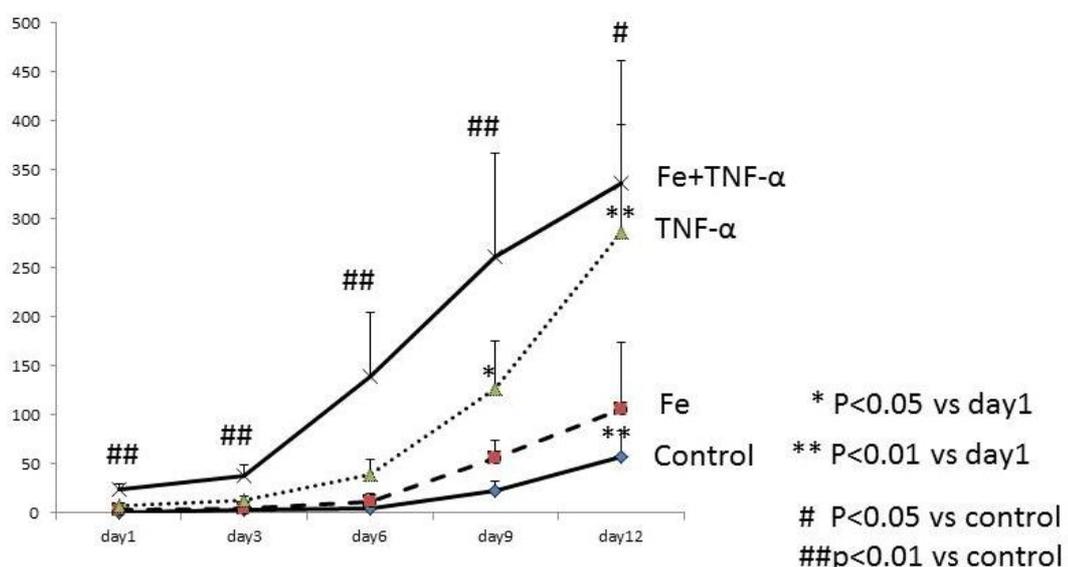
マイクロアレイの結果の Pathway 解析などを中心に、鉄負荷の刺激により石灰化を惹起するのに重要と予想される遺伝子について real-timePCR を用い遺伝子発現レベルで、WesternBlot 法を用いてタンパクレベルで検討を行って行く。この段階で確認がとれた遺伝子については、その上流あるいは下流の遺伝子発現の確認も行っていく。  
 マイクロアレイは時相的に多段階とすることは難しいので、遺伝子発現の変化が day1,day3 において検証できた遺伝子については、Day7,14,21 と石灰化の採取段階に向けて変化があるかどうかの検討を行っていった。

現在の所、石灰化の確認は主としてアリザリン染色でおこなったが、BMP2 や Msx2 など石灰化の最終段階のシグナルを用いて石灰化確認することも合わせて行っていった。

### 4. 研究結果

透析患者において腎性貧血の管理において鉄の投与は主要な治療法のひとつであるが、同時に酸化ストレスを増強することなどから、動脈硬化を促進する可能性がある。我々は、鉄が血管内皮細胞の石灰化の因子となりうることを見出している。しかしながら、慢性腎不全における石灰化の主要な場は血管中膜細胞(メンケベルグ型動脈硬化)である。鉄負荷が血管内皮細胞に石灰化を炎症ストレスと共に誘導し、マイクロアレイにて様々なサイトカイン等がこのプロセスに関わっていることを見出した。そこで、この鉄負荷が血管中膜細胞の石灰化に影響を与えるかどうか、またどのような機序で血管中膜細胞に石灰化を惹起させるかを明らかにした。培養大動脈血管中膜細胞における鉄負荷による石灰化促進を確認できる実験系の確立をまず行った。次にマイクロアレイを用いた鉄負荷による石灰化促進に関与する遺伝子の網羅的解明。マイクロアレイは 鉄負荷・TGF とそれぞれ単独・共刺激を行い、さらに刺激後 day 1 と day3 を行うことで、より確かなものを拾い出していった。さらに、マイクロアレイで確認された細胞内シグナルの遺伝子レベルあるいはタンパクレベルでの確認。これにより鉄負荷による石灰化促進のメカニズムを明らかにした。また、石灰化に関連する遺伝子群 MSX2,OSTEOPONTIN や RANKL などの遺伝子変化の推移を検討し、細胞内のシグナルについても明らかにした。この主要な遺伝子の推移は下記の図の通りである。これらの結果を Iron-induced calcification in human aortic vascular smooth muscle cells through interleukin-24 (IL-24), with/without TNF-alpha. Sci Rep. に報告した。また、国際学会でも報告を行った。

IL-24mRNA/GAPDHmRNA



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kuragano T, Kida A, Yahiro M, Nakanishi T.	4. 巻 198
2. 論文標題 Clinical Benefit of an Adsorptive Technique for Elderly Long-Term Hemodialysis Patients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Contrib Nephrol.	6. 最初と最後の頁 94-102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1159/000496527.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagasawa Y, Kida A, Hasuike Y, Kuragano T, Nakanishi T.	4. 巻 41
2. 論文標題 White-coat hypertension and albuminuria; lessons from the Hisayama and Ohasama studies.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hypertens Res.	6. 最初と最後の頁 483-485.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1038/s41440-018-0036-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawada S, Nagasawa Y, Kawabe M, Ohyama H, Kida A, Kato-Kogoe N, Nanami M, Hasuike Y, Kuragano T, Kishimoto H, Nakasho K, Nakanishi T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Iron-induced calcification in human aortic vascular smooth muscle cells through interleukin-24 (IL-24), with/without TNF-alpha.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 658-669
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1038/s41598-017-19092-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawada S, Nagasawa Y, Kawabe M, Ohyama H, Kida A, Kato-Kogoe N, Nanami M, Hasuike Y, Kuragano T, Kishimoto H, Nakasho K, Nakanishi T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Iron-induced calcification in human aortic vascular smooth muscle cells through interleukin-24 (IL-24), with/without TNF-alpha.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-19092-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto A, Nagasawa Y, Yamamoto R, Shinzawa M, Hasuike Y, Kuragano T, Isaka Y, Nakanishi T, Iseki K, Yamagata K, Tsuruya K, Yoshida H, Fujimoto S, Asahi K, Moriyama T, Watanabe T.	4. 巻 40
2. 論文標題 The association of alcohol and smoking with CKD in a Japanese nationwide cross-sectional survey.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Hypertens Res	6. 最初と最後の頁 771-778
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/hr.2017.25.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagasawa Y, Okuzaki D, Muso E, Yamamoto R, Shinzawa M, Iwasaki Y, Iwatani H, Nakanishi T, Isaka Y and Nojima H	4. 巻 -
2. 論文標題 IFI27 Is a Useful Genetic Marker for Diagnosis of Immunoglobulin A Nephropathy and Membranous Nephropathy Using Peripheral Blood.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Plos One	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) . doi: 10.1371/journal.pone.0153252. eCollection 2016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nagasawa Y, Yamamoto R, Shoji T, Shinzawa M, Hasuike Y, Nagatoya K, Yamauchi A, Hayashi T, Kuragano T, Moriyama T, Isaka Y and Nakanishi T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Serum Uric Acid Level Predicts Progression of IgA Nephropathy in Females but Not in Males.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Plos One	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1371/journal.pone.0160828.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nagasawa Y., Kida A, and Nakanishi T.	4. 巻 39
2. 論文標題 Effect of cigarette smoking cessation on CKD: is it a cancer-suppression-like effect or a CVD-suppression-like effect?	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Hypertension Research ,	6. 最初と最後の頁 690-691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1038/hr.2016.62.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagasawa Y, Yamamoto R, Shinzawa M, Hasuike Y, Kuragano T, Isaka Y, Nakanishi T, Iseki K, Yamagata K, Tsuruya K, Yoshida H, Fujimoto S, Asahi K, Moriyama T and Watanabe T.	4. 巻 23
2. 論文標題 Body Mass Index Modifies an Association between Self-Reported Regular Exercise and Proteinuria	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 J Atheroscler Thromb.	6. 最初と最後の頁 402-412
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.5551/jat.29009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yasuyuki Nagasawa, Sayuri Kawada, Mutsuki Kawabe, Aritoshi Kida, Mana Yahiro, Masayoshi Nanami, Yukiko Hasuike, Takahiro Kuragano, Keiji Nakasho, Hideki Ohyama, Takeshi Nakanishi
2. 発表標題 Iron induced calcification in human aortic vascular smooth muscle cells through interleukin-24 (IL-24)
3. 学会等名 55th ERA-EDTA Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuyuki Nagasawa <sup>1</sup> , Eri Muso, Ryohei Yamamoto, Maki Shinzawa, Yukako Iwasaki, Hirotsugu Iwatani, Takeshi Nakanishi, Yoshitaka Isaka <sup>1</sup>
2. 発表標題 IFI27/ ISG12A in peripheral white blood cells is a useful marker for IgA nephropathy
3. 学会等名 Annual Meeting of American Society of Nephrology, Nov,19, 2016 Chicago, USA (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	長澤 康行  (Nagasawa Yasuyuki)  (10379167)	兵庫医科大学・医学部・講師     (34519)	