

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461255

研究課題名(和文)オートファジーは血管石灰化を抑制するか？

研究課題名(英文)Can autophagy attenuate vascular calcification?

研究代表者

鳥巢 久美子(Torisu, Kumiko)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20448434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Calciprotein particle (CPP)はヒト血管平滑筋細胞(SMC)のオートファジーを効率よく誘導した。Atg7をノックダウンしたSMCでは、高リン濃度やCPPによる石灰化が軽減していた。その機序の一つとして、骨芽細胞様の形質転換に関与する遺伝子の発現を調べたが、コントロールとノックダウンで変化はなかった。またマウス大動脈を剖出し、ex vivoで培養した際に高リン濃度になると、中膜の石灰化が誘導できた一方、CPPでは高率に外膜の石灰化が生じ、中膜の石灰化は起きなかった。現在平滑筋細胞特異的にAtg7を欠損したマウスを用いて、大動脈のex vivo培養を開始した。

研究成果の概要(英文)：Calciprotein particle (CPP) efficiently induced autophagy in human endothelial smooth muscle cells (SMC). Calcification induced by high phosphorus or CPP was attenuated in Atg7-knockdown SMCs. To explore the mechanism of attenuated calcification, we examined gene expression related with osteoblastic transformation of SMC. However, we were not able to find the change of gene expression in Atg7 knockdown SMC. Next, we dissected mouse aorta and incubated the piece of aorta ex vivo. In high phosphorus, calcification of media was observed, on the other hand, calcification of tunica adventitia was observed in CPP-added medium. We are going to start ex vivo culture of aorta derived from smooth muscle cell-specific Atg7 deleted mice.

研究分野：腎臓病学、分子生物学

キーワード：オートファジー 腎不全 血管石灰化 Calciprotein particle

1. 研究開始当初の背景

血管石灰化の発症機序は培養平滑筋細胞を用いて明らかにされている。高リン血症では血中にリン酸カルシウム結晶が形成されるが、径 300 nm 程度の比較的大きな複合体であるため、血管平滑筋が貪食した場合、通常のエンドサイトーシスでは運搬できない。オートファジーは細胞内の非選択的分解や分泌の仕組みである (Torisu K. *Nature Medicine* 2013)。特に大きなタンパク質はオートファジーを利用して輸送されるとの報告がある。また初期石灰化では基質小胞内でリン酸カルシウム結晶が形成、細胞外へ分泌されるが、基質小胞の由来については不明な点が多い。一方で高リン血症によってオートファジーが誘導され、オートファジーを抑制した血管平滑筋細胞は基質小胞の放出が亢進するとされている。

また血管の老化に伴い、オートファジーが低下することが予想されるが、血管平滑筋細胞におけるオートファジーの重要性は明らかにされていない。

2. 研究の目的

オートファジーはリン酸カルシウム結晶を分解し、血管石灰化を抑制する可能性、またリン酸カルシウム結晶の細胞内輸送にもオートファジーが関与する可能性を想定し、血管平滑筋細胞の石灰化の過程におけるオートファジーの役割を *in vitro*, *in vivo* の両方を用いて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞はヒト血管平滑筋培養細胞 (KURABO もしくは Lonza) を用いた。石灰化は高リン濃度培地 (3 mM) 下での培養 11 日間、もしくは Calciprotein particle (CPP) 0.25 mg/mL を添加した状態で培養 4 日間を誘導をした。CPP の調製は黒尾らの方法 (Kuro-o et al, *Nefrologia*, 2014) を用いた。

(2) 血管平滑筋細胞が石灰化する際のオートファジーの誘導を調べた。平滑筋細胞に CPP を添加し、LC3-II/I 比をウエスタンブロットで評価した。また LC3 免疫染色を行い、オートファゴソームの数を評価した。

(3) Fetuin を Alexa488 でラベルし、これを加えた状態で黒尾らの方法に従い、Alexa488-CPP を調製した。Alexa488-CPP を加えて培養した血管平滑筋細胞を用いて LC3 免疫染色を行い、CPP と LC3 の細胞内局在を調べた。

(4) ヒト血管平滑筋培養細胞をオートファジー阻害薬 (3-methyladenine; 3-MA, hydroxychloroquine; HCQ) や Atg7 siRNA によるノックダウンでオートファジーの抑制を行い、血管石灰化を調べた。石灰化は高リン濃度培地 (3 mM) 下での培養 11 日間、もしくは CPP 0.25 mg/mL を添加した状態で培養 4 日間を誘導をした。CPP の調製は黒尾らの方法 (Kuro-o et al, *Nefrologia*, 2014) を

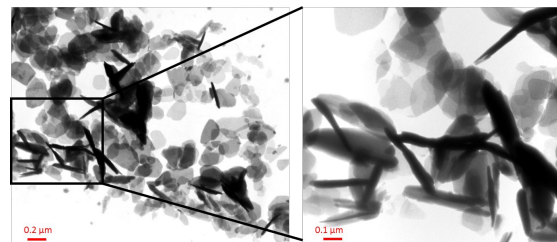
用いた。石灰化は von Kossa 染色を行い、染色強度を生細胞数で補正した。

(5) オートファジーの抑制によって、石灰化の関与する遺伝子群 (促進遺伝子; RUNX2, BMP2, ALP, 抑制遺伝子; MGP) の発現が変化するかを調べた。

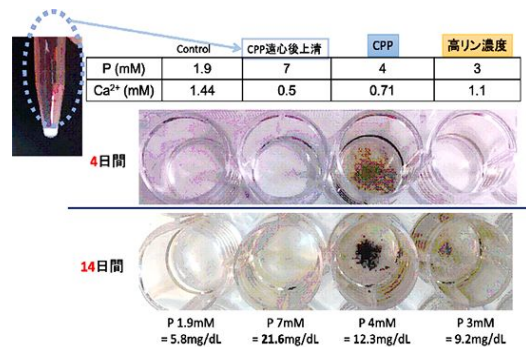
(6) また平滑筋細胞特異的 (SM22alpha-Cre) Atg7 ノックアウトマウスを購入しコロニーを樹立した。予備実験として、C57BL/6J マウスの大動脈を剖出し、*ex vivo* で高リン濃度 (3 mM) もしくは CPP 2.5 mg/mL 下で培養し、中膜石灰化を調べた。

4. 研究成果

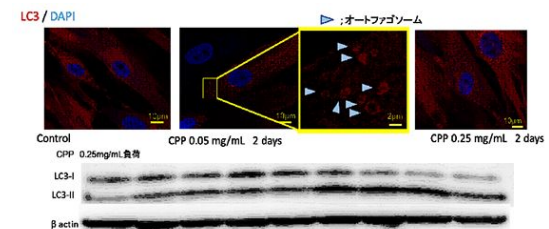
(1) 我々は既報に従いカルシウムリン結晶 (CPP) を作成することに成功し、電子顕微鏡で確認した。



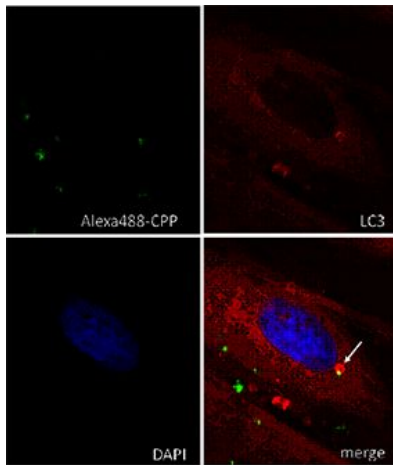
(2) 高リン濃度の培地で作成した CPP を遠心により取り除くと、残った上清のリン濃度は高いにも関わらず、石灰化は起きなかった。



(3) CPP を添加した血管平滑筋細胞ではオートファジーが活性化することを証明した。

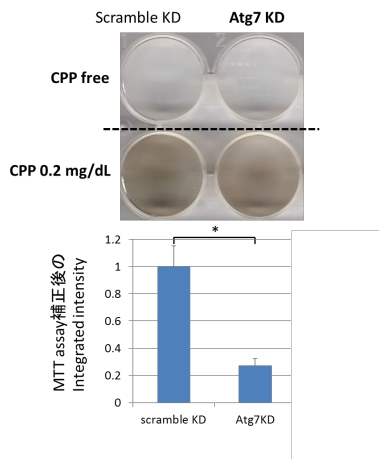
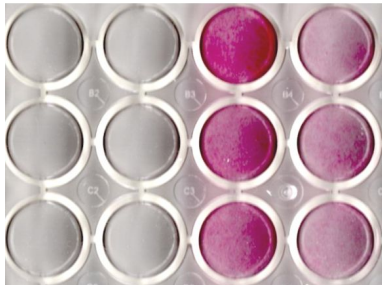


(4) 蛍光ラベルをした CPP は平滑筋細胞に取り込まれた後、一部はオートファゴソーム内に局在した。



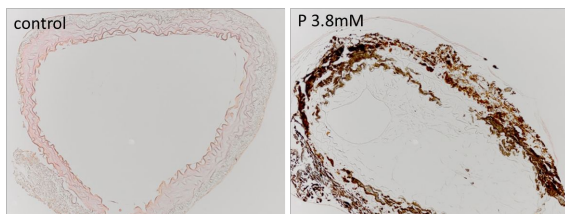
(5) オートファジー阻害薬やオートファジー必須遺伝子である Atg7 をノックダウンした血管平滑筋細胞では、高リン濃度や CPP によって生じる石灰化が軽減していた。

control 3-MA 5mM CPP 0.2mg/mL 3-MA 5mM CPP 0.2mg/mL



(6) その原因を探るため、骨芽細胞様に形質転換する時に誘導される遺伝子群(RUNX2, BMP2)などの発現変化を調べたが、コントロールとノックダウンで変化はなかった。

(7) マウス大動脈を剖出し、ex vivo で培養した際に高リン濃度にすると、中膜の石灰化が誘導できた。この ex vivo 培養系に CPP を加えると、高率に外膜の石灰化が生じ、中膜の石灰化が誘導できなかった。



オートファジーの抑制により血管石灰化が抑制される結果(5)は既報(Dai XY et al, Kidney Int. 2013)と異なる。原因として、培養細胞に石灰化を起こすときの培地中の血清濃度が異なるため、培地中での CPP の産生量が異なる可能性があること、オートファジーを抑制するタイミングが異なることを想定している。血管石灰化の過程は長いため、オートファジーの活性化が必要な時期、また抑制すべき時期があるのではないかと予想している。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1) 長谷川祥子、鳥巢久美子、鶴屋和彦、Calciprotein particle 及びリンにより誘導される血管石灰化におけるオートファジーの役割、第7回日本腎臓リハビリテーション学会(つくば市、2017年2月)

2) 長谷川祥子、鳥巢久美子、四枝龍佑、川井康弘、鶴屋和彦、北園孝成、Calciprotein particle による血管石灰化におけるオートファジーの役割、第59回日本腎臓学会学術総会(横浜市、パシフィコ横浜)

3) Shoko Hasegawa, Kumiko Torisu, Masahiro Eriguchi, Kazuhiko Tsuruya, Takanari Kitazono, Role of calciprotein particle-induced autophagy in calcification of human smooth muscle cells. American Society of Nephrology, Kidney Week 2014, Philadelphia, PA, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.kcu.med.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

鳥巢 久美子 (TORISU, Kumiko)
九州大学病院・腎・高血圧・脳血管内科・助教

研究者番号：20448434

(2)研究分担者 H27.4.30 まで

山田 俊輔 (YAMADA, Shunsuke)
福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：10419608

長谷川 祥子 (HASEGAWA, Shoko)
九州大学・医学研究院・病態機能内科学・大学院生

研究者番号：10622089

鶴屋 和彦 (TSURUYA, Kazuhiko)
九州大学・医学研究院・包括的腎不全治療学・教授

研究者番号：20372740

升谷 耕介 (MASUTANI, Kosuke)
九州大学病院・腎・高血圧・脳血管内科・助教

研究者番号：30419593

(3)連携研究者

なし

()

研究者番号：

(4)研究協力者

なし

()