

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390216

研究課題名（和文）慢性腎疾患に合併する血管石灰化の分子機構の解明

研究課題名（英文）

Molecular mechanism of vascular calcification in chronic kidney disease

研究代表者

倉林 正彦（KURABAYASHI MASAHIKO）

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00215047

研究成果の概要（和文）：

慢性腎臓病患者（CKD）は心血管イベント（CVD）のハイリスク群である。本研究では、AGE (advanced glycation end product)/RAGE (receptor for AGE) の相互作用による血管石灰化の誘導について解析した。石灰化病変には RAGE, Notch, Jagged1, Msx2 が発現していた。培養ヒト大動脈血管平滑筋細胞に RAGE を過剰発現させると、石灰化が認められ、骨芽細胞の分化調節因子である Msx2、Notch1 および Jagged1 の発現増加が認められた。また、RAGE による Msx2 と ALP の誘導は、 γ セクレターゼ阻害剤である DAPT によって完全に抑制された。したがって、RAGE の活性化→Notch の活性化→Msx2 の発現誘導→ALP の発現誘導→骨芽細胞へ分化というメカニズムが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Background—Vascular calcification is prevalent in patients with diabetes and chronic kidney disease. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) and its multiple ligands have been implicated in the pathogenesis of accelerated atherosclerosis.

Methods and Results—Cultured rat and human aortic smooth muscle cells (HASMC) were transduced with adenovirus expressing RAGE. Expression of myocardin and the SMC-marker genes was significantly repressed in these cells. Interestingly, RAGE activation induced alkaline phosphatase (ALP) expression, calcium deposition, and Msx2 expression, a crucial transcription factor for osteogenic differentiation, in HASMC. RAGE-induced osteogenic differentiation was significantly inhibited by endogenous secretory RAGE. RAGE-induced ALP and Msx2 expression was completely abrogated by DAPT, an inhibitor for Notch signaling pathway. Simultaneous stimulation with bone morphogenetic protein 2 (BMP2) and RAGE signaling synergistically induced expression of Msx2 and ALP in HASMC. Immunohistochemistry revealed that the human calcifying atherosclerotic plaque expressed RAGE, Notch components and Msx2. The ALP activity induced in RAGE-overexpressing HASMCs by human serum was positively correlated with serum creatinine level, but not with phosphate and hemoglobin A1c levels. *Conclusions*—These results indicate that activation

of RAGE not only inhibits myocardin-dependent SMC gene expression, but also induces osteogenic differentiation of vascular SMC through Notch/Msx2 induction. These results provide the novel insight into a role of RAGE axis in vascular calcification.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	10,300,000	3,090,000	13,390,000
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：血管医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：

- (1) 骨芽細胞 (2) 血管石灰化 (3) 血管平滑筋細胞 (4) Notch
 (5) AGE (6) 慢性腎不全 (7) FGF23 (8) Klotho

1. 研究開始当初の背景

慢性腎疾患(CKD)患者において心血管疾患の合併、特に動脈硬化性疾患の合併は非常に重要である。CKD患者では冠動脈疾患や心不全の合併頻度は対照集団の2-3倍であり、動脈硬化の危険因子である高脂血症、高血圧、糖尿病の合併頻度も対照に比し、明らかに高い。糸球体濾過過率(GFR)が60 ml/min/1.73m²未満では、癌死亡を除けばほとんどは心血管疾患による死亡である。また、末期腎不全(ESRD)患者における心血管疾患のリスクは健常人の20倍以上であり、40~50%の患者は心血管死である。CKD患者における心血管リスクとして、合併する糖尿病、高血圧、高脂血症などの他、冠動脈、頸動脈、大動脈に高頻度に見られる石灰化が重要である。血管石灰化は動脈コンプライアンスの低下をきたし、脈圧の増大、心臓左室後負荷の増加、冠血流の低下をきたすだけでなく、点状の石灰化はプラークの不安定化を惹起する。したがって、血管石灰化を抑制することが可能であれば、CKD患者の予後改善のために有効な

戦略となる。長い間、血管石灰化は血管細胞の変性過程におこるカルシウム結晶の受動的な沈着であり、加齢に伴う生理的な現象と考えられていたため、ほとんど研究の対象とならなかった。1990年代に入り骨形成に関わるタンパク質の発現が血管石灰化部分に確認されたことを契機に病態生理を解明する基礎研究が進み、現在では骨形成に類似した能動的な過程と考えられるようになった。そして、血管石灰化は、粥状硬化の強力な指標であり、石灰化の程度は全粥状硬化病変量と直接関係することから、血管石灰化の分子機序の解明は現在の臨床血管医学の主要課題として注目されつつある。

2. 研究の目的

Notchシグナルは隣接する細胞の細胞膜に存在するリガンド(Jagged1, Delta4)とNotch受容体との結合によって活性化する。これまで、骨分化におけるNotch分子の役割についての基礎的な研究はいくつかあるが血管石灰化におけるNotchの役割についての研究はほとんど皆無である。本申請研究では、慢性

腎臓病による血管石灰化のメカニズムを解明するため、主に Notch シグナルの役割を明らかにする。

3. 研究の方法

本申請研究では、血管平滑筋細胞から骨芽細胞への分化を引き起こす生理的な刺激因子として、AGE/RAG を中心に研究する。

(1) RAGE を発現するアデノウイルス (Ad-RAGE) を作製し、株化したヒト血管平滑筋細胞 (ヒト大動脈由来: HASMC) に感染させることによって RAGE シグナルを過剰に血管平滑筋細胞に導入する実験系を構築する。

(2) Ad-RAGE を感染させた HASMC において、AGE あるいは HMBG1、または血清を添加し、骨芽細胞に特異的な遺伝子 (アルカリホスファターゼ、オステオポンチン、オステオカルシン) および骨芽細胞分化因子 (Msx2, Cbfa1/Runx2, Osterix) の発現を RT-PCR 法によって解析する。可能なものについてはウエスタンブロットを行なう。

(3) Ad-RAGE を感染させた HASMC において上記の遺伝子群の発現誘導が認められた場合、血管平滑筋遺伝子 (平滑筋アクチン、ミオシン重鎖、SM22 \cdot) の発現が抑制されるかを検討する。Ad-RAGE の感染によって平滑筋の遺伝子発現が抑制される場合、そのメカニズムの解析として転写コファクター myocardin による SRF 依存性転写への影響を解析する。

(4) γ セクレターゼ阻害薬 DAPT により (2) において観察された発現誘導が抑制されるかを検討する。

(5) Notch のシグナリングを仲介する転写因子 RBPJk の欠損細胞にて (2) が起こらないことを確認する。

(6) RAGE の過剰発現細胞では AGE あるいは HMBG1、または血清刺激にて Notch シグナル

の活性化を介して骨芽細胞分化が起こることが明らかになれば、これまで私たちが明らかにした Notch シグナル活性化 \rightarrow Msx2 遺伝子の転写活性化 \rightarrow 骨芽細胞遺伝子の発現、という一連の経路が RAGE によって活性化されることと結びつき、その意義は大きい。

(7) RAGE によって Notch シグナルが活性化するメカニズムの解析は以下の方法で行なう Ad-RAGE を過剰発現させた HASMC での Notch リガンドの発現を検討する。また、種々のリン酸化酵素阻害薬によって Ad-RAGE による Notch リガンドの発現増加が抑制されるかを解析する。

4. 研究成果

培養血管平滑筋細胞に RAGE を過剰発現させると、石灰化が認められ、ALP の発現誘導が観察された。Real-time PCR にて、RAGE の過剰発現は、血管平滑筋細胞に特異的な遺伝子

(平滑筋ミオシン重鎖 SM-MHC や SM22 \cdot) の発現を抑制し (図 1)、骨芽細胞の分化調節因子である Msx2、Notch1 および Jagged1 の発現を増加させた (図 2)

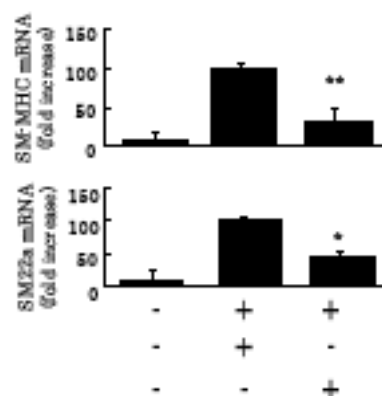


図 1 RAGE による SMC 遺伝子の発現抑制

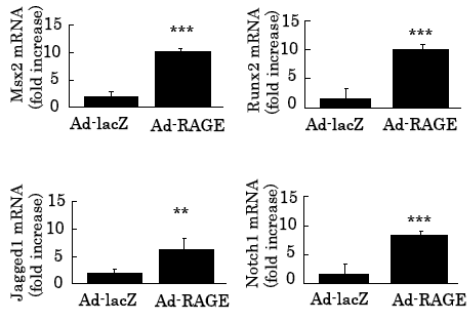


図2 RAGEによる骨芽細胞遺伝子と Notch, Jagged1 の発現増加

また、RAGEによる Msx2 と ALP の誘導は、 γ セクレターゼ阻害剤である DAPT によって完全に抑制された (図3)。

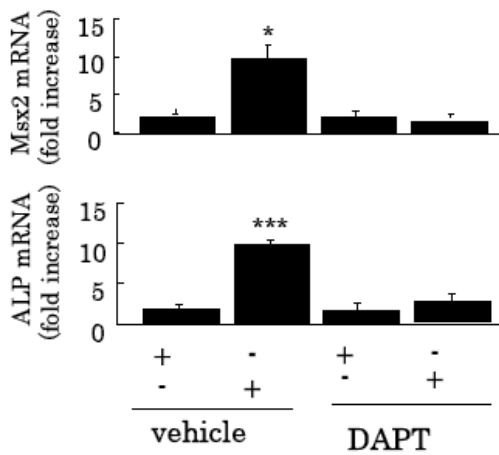


図3 γ セクレターゼ阻害薬による骨芽細胞遺伝子の発現抑制

したがって、RAGEの活性化 \rightarrow Notchの活性化 \rightarrow Msx2の発現誘導 \rightarrow ALPの発現誘導 \rightarrow 骨芽細胞へ分化というメカニズムが明らかになった。また、BMP2添加はRAGEによる骨芽細胞への分化を顕著に促進した(図4)。そして、Msx2遺伝子プロモーターの解析によってBMP2シグナルとRAGEシグナルは相乗的にMsx2プロモーターを活性化させることを明らかにした。

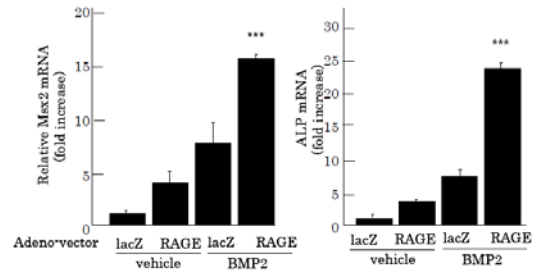


図4 BMP2とRAGEによる骨芽細胞分化の相乗効果

この結果は、血管平滑筋細胞は、RAGE/Msx2遺伝子の発現誘導によって、骨芽細胞に分化することを示したものである。

また、RAGEを過剰発現した培養平滑筋細胞に糖尿病性腎症の患者の血清を添加することによって血管平滑筋細胞におけるALPのmRNAレベルを増加させることが明らかになった(図5)。また、ALP mRNAの誘導作用は血清クレアチニン濃度と相関し、HbA1Cとは関連していなかった(図6)。このことは、RAGEリガンドは腎機能低下患者で高濃度に存在することを示している。

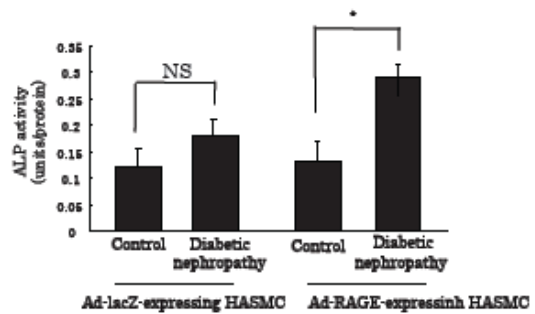


図5 糖尿病性腎症患者の血清によるALP発現誘導

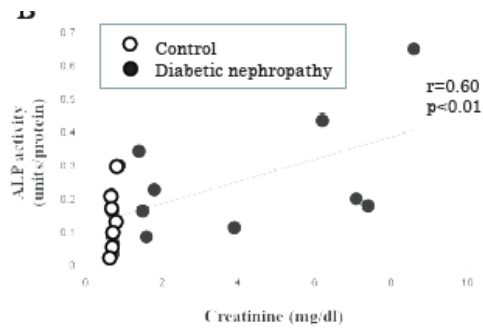


図6 血清クレアチニンとALPmRNAレベルの関係

さらに、透析患者では、リン排泄因子 FGF23 の血清濃度が高く、FGF23 の血清濃度と心エコーで評価した左室肥大の程度が相関することを明らかにした。血管平滑筋細胞に Notch を過剰発現させると、FGF23 の mRNA の発現が増加することが増加することも見出した。

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 7 件)

1. Suga T, Iso T, Shimizu T, Tanka T, Yamagishi S, Takeuchi M, Imaizumi T, Kurabayashi M.

Activation of receptor for AGE induces osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells.

J. Atheroscler Thromb. 査読有 In Press.

2. Nakahara T, Sato H, Shimizu T, Tanaka T, Matsui H, Kawai-Kowase K, Sato M, Iso T, Arai M, Kurabayashi M.

Fibroblast growth factor-2 induces osteogenic differentiation through a Runx2 activation in vascular smooth muscle cells. Biochem Biophys Res Commun. 査読有

2010, 394:243-248

3. Negishi K, Kobayashi M, Ochiai I, Yamazaki Y, Hasegawa H, Yamashita T, Shimizu T, Kasama S, Kurabayashi M.

Association Between Fibroblast Growth Factor 23 and Left Ventricular Hypertrophy in Maintenance Hemodialysis Patients.

Circ J. 査読有、2010, 74(12):2734-2740

4. Shimizu T, Tanaka T, Iso T, Doi H, Sato H, Kawai-Kowase K, Arai M, Kurabayashi M.

Notch signaling induces osteogenic differentiation and mineralization of vascular smooth muscle cells: role of Msx2 gene induction via Notch-RBP-Jk signaling.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 査読有 2010, 29(7): 1104-11.

5. Kawai-Kowase K, Ohshima T, Matsui H, Tanaka T, Shimizu T, Iso T, Arai M, Owens GK, Kurabayashi M.

PIAS1 mediates TGFbeta-induced SM alpha-actin gene expression through inhibition of KLF4 function-expression by protein sumoylation.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 査読有 2009; 29(1):99-106.

6. Doi H, Iso T, Shiba Y, Sato H, Yamazaki M, Oyama Y, Akiyama H, Tanaka T, Tomita T, Arai M, Takahashi M, Ikeda U, Kurabayashi M.

Notch signaling regulates the differentiation of bone marrow-derived cells into smooth muscle-like cells during arterial lesion formation.

Biochem Biophys Res Commun. 査読有, 2009, ;381(4):654-65 9.

[学会発表] (計 11 件)

1. 倉林正彦
血管平滑筋細胞の分化調節と血管石灰化
第28回日本骨代謝学会学術集会
2010年7月21日、京王プラザホテル(東京)
2. Kurabayashi M.
Diabetes and vascular calcification
XXth World Congress of International Society for Heart Research.
2010年5月16日、京都国際会議場(京都)

3. Suga T., Iso T., Shimizu T., Tanaka T., Yamaguchi S., Arai M., Imaizumi T., Kurabayashi M.
Receptor for advanced-glycation end products (RAGE) induces Notch-Msx2-dependent osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells.
The 72th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society
2010年3月28日、福岡国際会議場 (福岡)
4. Shimizu T., Tanaka T., Iso T., Arai M., Kurabayashi M. Notch and BMP2 Signaling converge at the Msx2 promoter to
Induced osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells.
The 72th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society
2010年3月28日、福岡国際会議場 (福岡)
5. Tanaka T., Shimizu T., Ohyama Y., Matsui H., Sato H., Iso T., Arai M., Kurabayashi M.
Osteogenic transcription factor Runx2 represses connective tissue growth factor gene expression and TGFbeta signaling in vascular smooth muscle cells.
The 72th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society
2010年3月28日、福岡国際会議場 (福岡)
6. Shimizu T., Tanaka T., Iso T., Arai M., Kurabayashi M. Insulin accelerates osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells through an induction of notch ligand jagged-1 in adjacent monocytes/macrophages.
The 72th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society
2010年3月28日、福岡国際会議場 (福岡)
7. Matsui H., Yokoyama T., Sekiguchi K., Gotoh Y., Iso T., Arai M., Kurabayashi M.
Stearoyl-coa Desaturase-1 Protects Against Saturated Fatty Acids-Induced Osteogenic Differentiation and Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells.
Annual meeting of American Heart Association 2008年11月11日、(New Orleans)
8. Shimizu T., Tanaka T., Iso T., Kurabayashi M.
Notch Signaling Directly Targets Msx2: Possible Role of Notch Signaling in Osteogenic Conversion of Vascular Smooth Muscle Cells and Vascular Calcification.
Annual meeting of American Heart Association 2008年11月11日、(New Orleans)
9. Iso T., Suga T., Matsui H., Arai M., Kurabayashi M. Notch Signaling Induces Expression of Fatty Acid Binding Protein 4 via Induction of PPAR- γ 2 in Capillary Endothelial Cells in Heart.
Annual meeting of American Heart Association 2008年11月8日、(New Orleans)
10. Suga T., Iso T., Shimizu T., Tanaka T., Arai M., Yamagishi S., Kurabayashi M. Activation of Receptor for Advanced-Glycation End Products (Rage) Induces Notch-msx2-Dependent Osteoblastic Differentiation of Vascular Smooth Muscle Cells.
Annual meeting of American Heart Association 2008年11月7日 (New Orleans)
11. 倉林正彦、清水岳久、田中 亨、磯 達也、須賀俊博、大山善昭、佐藤浩子、新井昌史
血管石灰化とプラークの破綻
第8回日本抗加齢医学会総会
2008年6月7日 京王プラザホテル(東京)
6. 研究組織
(1) 研究代表者
倉林 正彦 (KURABAYASHI MASAHIKO)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00215047
(2) 研究分担者
新井 昌史 (ARAI MASASHI)
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：60270857