

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08430

研究課題名(和文)リン・カルシウム代謝異常による臓器線維化および血管石灰化の分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanism of organ fibrosis and vascular calcification due to metabolic abnormality of phosphate and calcium

研究代表者

村垣 泰光 (Muragaki, Yasuteru)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40190904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：体内のリン、カルシウムの代謝異常、特に高リン、高カルシウム状態は血管の石灰化と密接に関連している。本研究では高リン高カルシウム血症が血管石灰化を起こす分子機構について、特に酸化ストレスを介する血管石灰化機構との関連性について焦点を当てて研究を行った。培養平滑筋細胞を高リン培養液で7日間培養すると細胞内外に石灰化物質の沈着を起こすが、それと同時に細胞内酸化ストレス系シグナルであるKeap1/Nrf2が変動し、血管平滑筋細胞の石灰化に酸化ストレスが関係していることを見つけた。また細胞内に沈着した石灰化物質を除外するためのオートファジーと酸化ストレスシグナルとの関連性についても検索した。

研究成果の概要(英文)：Alteration of phosphate and calcium in the body, especially high phosphate and/or high calcium is closely related to vascular calcification. We investigated the molecular mechanism by which hyperphosphatemia or hypercalcemia causes vascular calcification, focusing on the association between oxidative stress and vascular calcification. We used cultured vascular smooth muscle cells (VSMCs) to examine calcification when they were cultured in the media with high phosphate. When the cultured VSMCs were cultured for 7 days in the medium with high phosphate, calcified materials were precipitated in and out of the cells. At the same time, we found that intracellular oxidative stress signals Keap1/Nrf2 were altered, indicating that oxidative stress is involved in the mechanism of vascular smooth muscle cell calcification. In addition, we examined the interrelationship between oxidative stress and autophagy, by which gets rid of calcification materials precipitated in the cells.

研究分野：病理学

キーワード：高リン血症 血管石灰化 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病においては尿中へのリンの排泄が低下し、血中リン濃度が上昇する高リン血症の状態になる。これは尿細管における Klotho が不活性化し血中へのリンの再吸収が亢進する結果生じる。我々は Klotho 欠損マウス (kl/kl マウス) において高リン血症が進行するにつれて血管、臓器の石灰化が亢進することを観察していた。ところが kl/kl マウスにおいて片側尿管結紮して腎間質線維化の程度をヘテロ欠損マウスと比較したところ、ホモの kl/kl マウスではヘテロマウスより線維化の程度が軽減していた。研究の結果、これは kl/kl マウスでは活性型ビタミン D レベルがヘテロ欠損マウスより高くなっており、そのことが TGF- β 誘導性 EMT (上皮間葉転換) を抑制することによって線維化を抑制することを証明した。これらのことから高リン血症で起こる石灰化と線維化の機序は異なることが分かった。このことから発展して、それではなぜ高リン血症または高カルシウム血症では血管の石灰化または臓器の線維化を生じるのかという分子機序に立ち返って考えることになった。

2. 研究の目的

本研究の目的は高リンおよび高カルシウムにより血管平滑筋細胞に石灰化または臓器間質組織に線維化を起こす分子機構を検索する事である。そしてその分子機構を解明することにより血管石灰化または臓器線維化の治療法へと発展させる事を目的とする。

3. 研究の方法

ヒト大動脈平滑筋細胞を石灰化培養液 (高リン、高カルシウム) で培養し、石灰化培養液で刺激後 3 日、7 日で細胞の石灰化の程度、酸化ストレスおよびオートファジーに関連する分子の免疫染色およびウエスタンブロット、定量的 PCR を行った。また、Nrf2 および p 62 に対する siRNA を処理してノックダウンによる効果を検索した。さらに Nrf2 のアクチベーター (tBHQ) の効果を検証した。また酸化ストレスと細胞遊走能との関係を見るため創傷治癒アッセイを行った。

4. 研究成果

- 1) 高リン、高カルシウム刺激による血管平滑筋細胞石灰化
培養血管平滑筋細胞を高リン、高カルシウム (3.0 mM, 2.7 mM) 培地で培養後 3 日、7 日、9 日で細胞の石灰化の程度を von Kossa 染色およびアリザリンレッド染色をすることにより石灰化の程度を測定した。図 1A、B に示す如く、時間経過とともに石灰化の程度は増加した。

図 1A

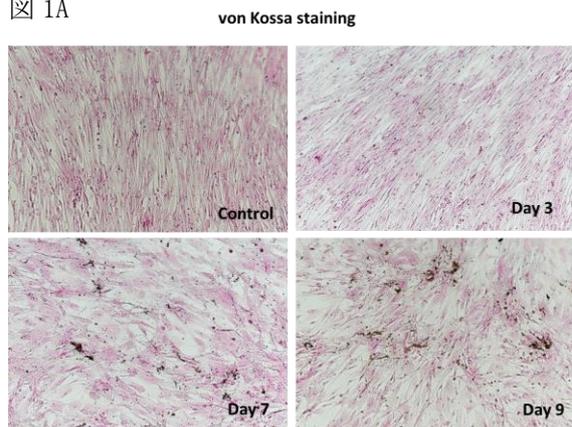
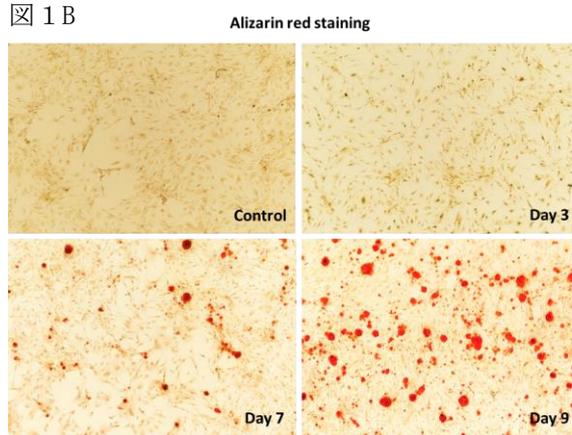


図 1B



2) 高リン、高カルシウムによる酸化ストレス分子 Keap1/Nrf2 の変動 (蛍光免疫組織) 高リン、高カルシウム刺激により細胞内で酸化ストレス分子である Keap1/Nrf2 が分解し Keap1 がユビキチン化され Nrf2 が遊離して核内に移行することが示された (図 2A、2B)。

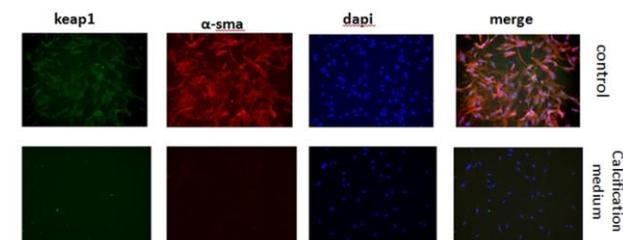


図 2A Keap1 の細胞内発現

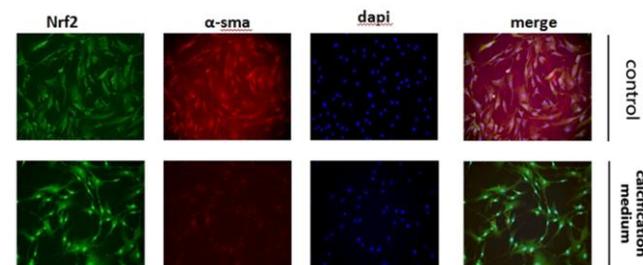


図 2B Nrf2 の核内移行

3) 高リン、高カルシウムによる酸化ストレス分子 Keap1/Nrf2 の変動 (ウエスタンブロット) 高リン、高カルシウム刺激を受けた培養平滑筋細胞から細胞質と核内成分を分離し、それ

それぞれの蛋白を用いて Keap1/Nrf2 のウエスタンブロットを行った (図 3A、図 3B)。

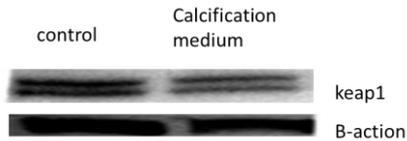


図 3A 細胞内 Keap1 の変動

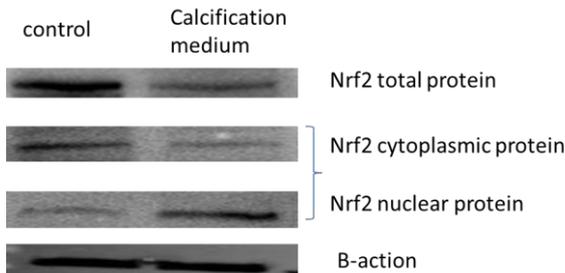


図 3B 細胞質、核それぞれの Nrf2 の変動

これらの結果より高リン、高カルシウム刺激により血管平滑筋細胞内の Keap1 は減少し、Nrf2 は核内に移行することが確かめられた。

4) 高リン、高カルシウム刺激により血管平滑筋細胞内でおこるオートファジー

高リン、高カルシウム刺激により血管平滑筋細胞内で微小石灰化が起こる時、それ石灰化に対してオートファジーが亢進するかどうかをオートファジー蛋白の蛍光免疫染色およびウエスタンブロットにより検証した。

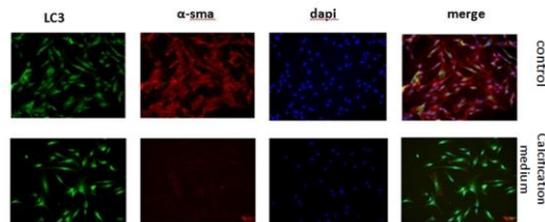


図 4A 石灰化を起こした血管平滑筋細胞における LC3 の局在 (蛍光免疫染色)

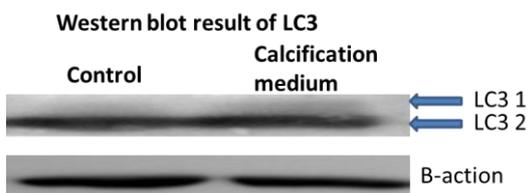


図 4B 石灰化を起こした血管平滑筋細胞における LC3 のウエスタンブロット

図 4A の蛍光免疫染色ではやや細胞質に反応性の増加がみられると思われるが顕著な変化ではない。また図 4B に示すウエスタンブロットでも石灰化メディウムにおいて若干の LC3 の増加がみられるものの明らかな増加は認められなかった。再検討を要するものと考ええる。

5) 選択的オートファジー蛋白 p 6 2 の変動

石灰化培地により刺激された培養平滑筋細胞内の p 6 2 の細胞内局在とタンパク量をそれぞれ蛍光免疫染色 (図 5A) とウエスタンブロット (図 5B) により検索した。

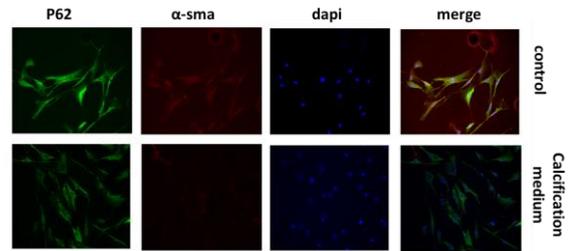


図 5A 石灰化血管平滑筋細胞における p62 の変動 (蛍光免疫染色)

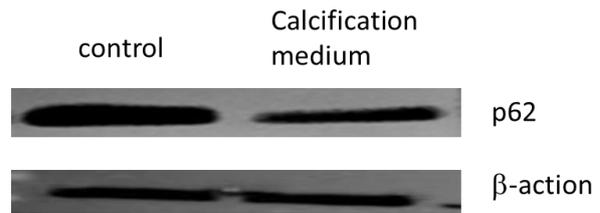


図 5B 石灰化血管平滑筋細胞における p62 の変動 (ウエスタンブロット)

以上の結果より高リン、高カルシウム刺激により血管平滑筋細胞内の p 6 2 蛋白は減少するということが示された。これは選択的オートファジーにより Keap1 と共に分解される結果減少すると考えられる。

6) 高リン、高カルシウム刺激された血管平滑筋細胞に対する tBHQ の作用

tBHQ は Keap1 の抑制を介した Nrf2 の安定化を促進することによる抗酸化作用を有する薬剤であり、Nrf2 促進剤として使用した時の細胞の石灰化に及ぼす効果を検索した。

まず定量的 PCR において、tBHQ で処理した高リン、高カルシウム刺激血管平滑筋細胞内の Nrf2 の発現は亢進し、Nrf2 の下流の酸化ストレス遺伝子の発現も亢進していた。それに伴って骨原性遺伝子の発現は抑制し、alpha SMA の発現は回復した。次に Nrf2 蛋白の発現をウエスタンブロットにおいて検索した (図 6A)。

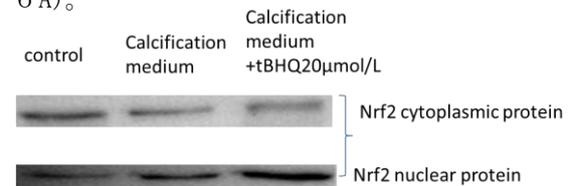


図 6A tBHQ 処理石灰化血管平滑筋細胞内の Nrf2 蛋白の変動

図 6 に示す如く血管平滑筋細胞内の Nrf2 は高リン、高カルシウム刺激により亢進するが、tBHQ 処理によってさらに更新して核内移行することが示された。この現象と血管平滑筋細胞内の石灰化との関連を見るためにアリ

ザリン染色により石灰化の程度を比較した (図 6B)。

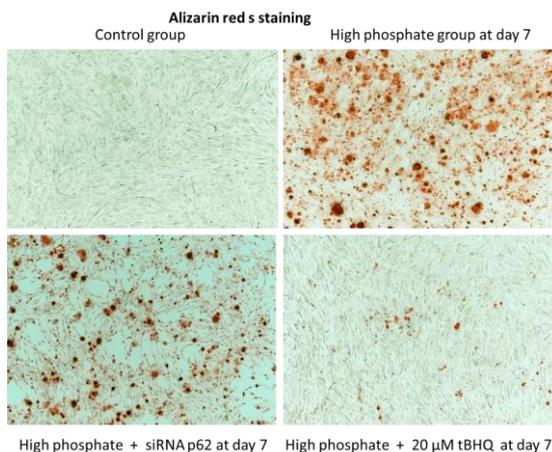


図 6B tBHQ 処理および p63 に対する siRNA ノックダウン処理においてアリザリンレッド染色による血管平滑筋細胞の石灰化の程度の比較

tBHQ 処理により高リン、高カルシウム刺激により起こる血管平滑筋細胞の石灰化の程度は顕著に抑制された。

また siRNA により p62 をノックダウンして同様に血管平滑筋細胞の石灰化の程度を見たところ明らかな効果は認められなかった。p62 のノックダウンに関しては今後条件を変えて検討する必要があると考える。

7) 高リン、高カルシウム刺激により血管平滑筋細胞内の遊走能に関する検索

高リン、高カルシウム刺激により血管平滑筋細胞内には α SMA が減少し、骨芽細胞様に形質転換が起こると考えられているが、細胞遊走能に関しては報告がない。本研究では血管平滑筋細胞石灰化と細胞遊走能および酸化ストレスとの関連性について創傷治癒アッセイを用いて検討した (図 7)。

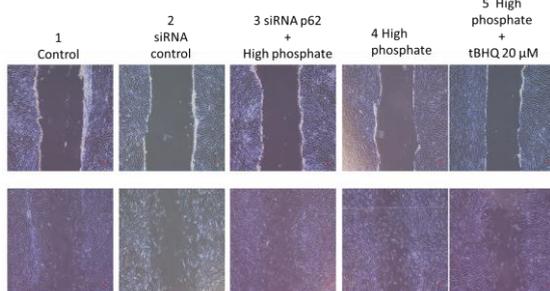


図 7 創傷治癒アッセイによる高リン、高カルシウム刺激および tBHQ 処理と p62 siRNA の細胞遊走能に及ぼす効果の比較

細胞遊走能は高リン、高カルシウム刺激により促進し、その遊走能亢進は p62 ノックダウンおよび tBHQ 処理により抑制された。細胞遊走能と石灰化との関連性は現在のところ不明であるが、今後重要な発展性がある

可能性があり、詳細を検討する予定である。

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 9 件)

1. In vivo optical coherence tomography imaging and histopathology of healed coronary plaques. Shimokado A, Matsuo Y, Kubo T, Nishiguchi T, Taruya A, Teraguchi I, Shiono Y, Orii M, Tanimoto T, Yamano T, Ino Y, Hozumi T, Tanaka A, Muragaki Y, Akasaka T. *Atherosclerosis*. 2018 May 21;275:35-42.
2. Potential Roles of Dec and Bmal1 Genes in Interconnecting Circadian Clock and Energy Metabolism. Sato F, Kohsaka A, Bhawal UK, Muragaki Y. *Int J Mol Sci*. 2018 Mar 8;19(3). pii: E781. Review.
3. Impact of heart-specific disruption of the circadian clock on systemic glucose metabolism in mice. Nakao T, Kohsaka A, Otsuka T, Thein ZL, Le HT, Waki H, Gouraud SS, Ihara H, Nakanishi M, Sato F, Muragaki Y, Maeda M. *Chronobiol Int*. 2018 Apr;35(4):499-510.
4. Levels of serum-circulating angiogenic factors within 1 week prior to delivery are closely related to conditions of pregnant women with pre-eclampsia, gestational hypertension, and/or fetal growth restriction. Nanjo S, Minami S, Mizoguchi M, Yamamoto M, Yahata T, Toujima S, Shiro M, Kobayashi A, Muragaki Y, Ino K. *J Obstet Gynaecol Res*. 2017 Dec;43(12):1805-1814.
5. Smad3 and Bmal1 regulate p21 and S100A4 expression in myocardial stromal fibroblasts via TNF- α . Sato F, Kohsaka A, Takahashi K, Otao S, Kitada Y, Iwasaki Y, Muragaki Y. *Histochem Cell Biol*. 2017 Dec;148(6):617-624.

6. PRG4 expression in myxoid liposarcoma maintains tumor cell growth through suppression of an antitumor cytokine IL-24. Oikawa K, Mizusaki A, Takanashi M, Ozaki T, Sato F, Kuroda M, Muragaki Y. Biochem Biophys Res Commun. 2017 Mar 25;485(1):209-214.
7. Rhythmic expression of DEC2 protein in vitro and in vivo. Sato F, Muragaki Y., Kawamoto T, Fujimoto K, Kato Y, Zhang Y. Biomed Rep. 2016 Jun;4(6):704-710.
8. Acidic microenvironments induce lymphangiogenesis and IL-8 production via TRPV1 activation in human lymphatic endothelial cells. Nakanishi M, Morita Y, Hata K, Muragaki Y. Exp Cell Res. 2016 Jul 15;345(2):180-9.
9. An Autopsy Case of Fulminant Amebic Colitis in a Patient with a History of Rheumatoid Arthritis. Kawabe N, Sato F, Nagasawa M, Nakanishi M, Muragaki Y. Case Rep Rheumatol. 2016;2016:8470867.

[学会発表] (計 8 件)

- Kosuke Oikawa, Masakatsu Takanashi, Fuyuki Sato, Masahiko Kuroda, Yasuteru Muragaki. Analysis of tumor-related molecular pathways in TLS-CHOP-expressing myxoid liposarcoma cells. 日本癌学会学術総会 横浜 2016 年 10 月
- Fuyuki Sato, Kosuke Oikawa, Yasuteru Muragaki, Yanping Zhang. DEC1 negatively regulates AMPK activity via LKB1. 日本癌学会学術総会 横浜 2016 年 10 月
- 及川恒輔、高梨正勝、尾崎敬、佐藤冬樹、黒田雅彦、村垣泰光. 粘液型脂肪肉腫における IL-24 発現抑制機構の検討. 日本分子生物学会年会 横浜 2016 年 12 月
- 尾崎 敬、田伏克惇、渡邊雄也、中西雅子、佐藤冬樹、及川恒輔、覚道健一、村垣泰光. マイクロ波効果で誘導された生存細胞の検討—甲状腺癌細胞株を使用して—. 和歌山悪性腫瘍研究会 和歌山 2016 年 12 月
- 中西雅子、是近彩香、山川はるか、川辺直子、村垣泰光: 癌の悪性化における酸性微小環境の関与、第 105 回日本病理学会、仙台、2016 年 5 月

- Masako Nakanishi and Yasuteru Muragaki: Acidic microenvironment contributes the development of cancer malignancy via IL-8 production. 第 75 回日本癌学会、横浜、2016 年 10 月
- Sato F, Oikawa K, and Muragaki Y. BHLH transcription factor DEC1 and DEC2 play important roles in cancer cell metabolism. 第 76 回日本癌学会、横浜、2017 年 9 月
- Sato M, Nakanishi M, Muragaki Y. Keratin 17 expression suppressed by p53 is closely associated with cell proliferation, migration, and adhesion in OSCC. 第 76 回日本癌学会、横浜、2017 年 9 月

[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

6. 研究組織
- (1) 研究代表者
村垣 泰光 (Muragaki Yasuteru)
和歌山県立医科大学 医学部 教授
研究者番号: 40190904
- (2) 研究分担者 ()
研究者番号:
- (3) 連携研究者 ()
研究者番号:
- (4) 研究協力者
魏 冉 (Wei Ran)