

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 25 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15314

研究課題名(和文)微小リン酸カルシウム結晶が心腎連関に及ぼす影響

研究課題名(英文)The effects of calciprotein particles on cardiorenal syndrome

研究代表者

金田 るり(KANEDA, Ruri)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70465029

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病と心血管病の密接な関与が“心腎連関”として注目されている。本研究では、腎臓病によるリン代謝異常の結果生じた微小なリン酸カルシウム結晶(Calcioprotein particle: CPP)が心筋細胞に及ぼす影響を検討した。ラット培養心筋細胞に合成CPPを添加すると、電子伝達系や筋収縮に関連する遺伝子群の発現が低下した。逆にMcp1遺伝子はCPP刺激により発現が亢進し、同遺伝子の転写開始点近傍では、発現量の変化とパラレルなエピジェネティック変化が認められた。本研究結果は、CPPが心腎連関増悪因子の一因であり、新規治療標的となり得る可能性を示唆する。

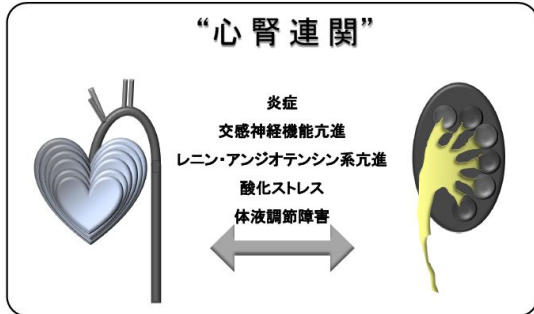
研究成果の概要(英文)：The bidirectional disorders between the heart and kidney are focused as “cardiorenal syndrome”. In this project, we investigated the effects of calciprotein particles (CPPs) on cultured cardiomyocytes. We incubated neonatal rat cardiomyocytes with or without synthesized CPPs and performed DNA microarray analysis. In the pathway analysis, CPPs reduced the expression of genes involved in the electron transport chain pathway or the striated muscle contraction pathway. Monocyte chemoattractant protein 1 (Mcp1) gene was up-regulated by CPP stimulation. The transcriptional start site of Mcp1 gene in cardiomyocytes with CPP stimulation was highly enriched with histone H3K4 trimethylation compared with that in cardiomyocytes without CPP. These data suggest that CPPs might be one of the causative agents for cardiac damage in chronic kidney disease patients and could be a target of therapeutic intervention in cardiorenal syndrome.

研究分野：医学 循環器内科学

キーワード：心腎連関 微小リン酸カルシウム結晶 CPP

1. 研究開始当初の背景

近年、慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease: CKD) と心血管病の密接な関与が“心腎連関”として注目されている。“心腎連関”は、心臓もしくは腎臓の一方の臓器に障害がおこると、他方の臓器にも機能障害が生じる悪循環を示す。介在する因子としては、炎症、交感神経機能亢進、レニン・アンジオテンシン系亢進、酸化ストレス、体液調節障害、カルシウム・リン代謝異常、貧血などが知られている。



このうち、カルシウム-リン代謝異常には、Klotho 遺伝子が深く関与する。正常な腎臓に発現する α -Klotho 蛋白は、fibroblast growth factor (FGF)受容体と複合体となり、FGF23 の受容体として機能し、尿中へのリン排泄を促進して、体内で不必要なリン蓄積を防ぐ。Klotho が欠損し、リンバランスが崩れると、血中や尿中で微小なリン酸カルシウム結晶 (Calciprotein particle: CPP) が出現する。近年、血清中 CPP 濃度は、腎障害や血管障害の程度と相関することが報告されているが、心臓組織 (心筋細胞や心臓線維芽細胞) への影響については、十分解明されていない。

一方、核膜裏打ち蛋白である lamin の変異を代表とした、核内構造蛋白の遺伝子変異が原因で生じる laminopathy と呼ばれる疾患群は、心筋症や神経筋疾患、早老症などを呈する。これら、laminopathy では、核内高次構造保持の破たん (核内クロマチン構造の変化) が遺伝子発現制御の恒常性に影響を及ぼし、表現型に繋がっている可能性を有する。Klotho 変異マウスは早老症様症状を呈するが、カルシウム・リン代謝異常の結果生じる CPP により、laminopathy 類似の核内クロマチンの高次構造変化が生じるか否かは明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、培養心筋細胞の系を用いて、CPP が心筋に及ぼす影響を検討する。

さらに、心筋細胞へ CPP 刺激をした際に、laminopathy や早老症で呈するような核内高次構造の変化が生じるか否かについても検討を加える。

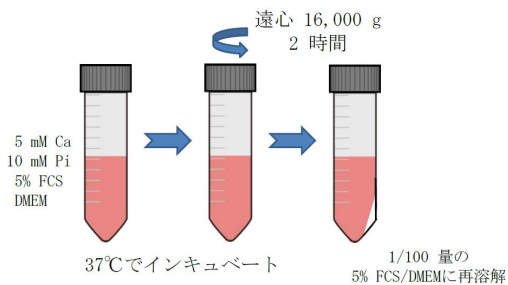
これらの研究を通じて、CPP の除去もしくは、低分子化合物による核内高次構造保持が

心腎連関進展抑制の治療標的となり得るか、明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 合成 CPP が心臓臓器障害に寄与する影響を心筋細胞への直接障害と心臓線維芽細胞を介した間接障害に分けて解析する。心筋細胞での直接障害がみられた場合には、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現変化や核内クロマチンの局在変化について解析する。

合成CPPの作成法

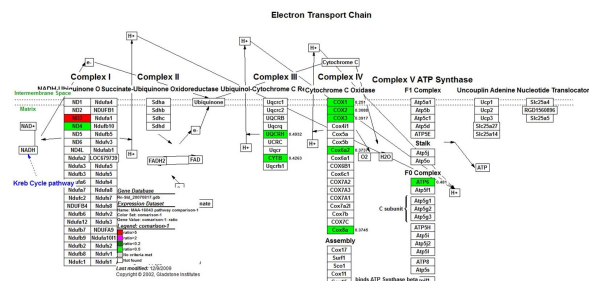


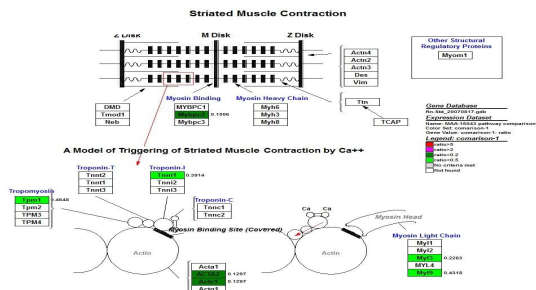
(2) 直接障害あるいは間接障害により心筋細胞の核内クロマチン高次構造に著明な変化が観察された場合には、核内クロマチン高次構造保持に寄与することで知られる低分子化合物 “remodelin” やヒストン修飾酵素阻害薬が、CPP 誘導性心筋障害を救済可能か否か検討を深める。

4. 研究成果

(1) CPP によるラット心筋細胞への直接障害

新生仔ラット心筋細胞に対する CPP の直接障害を検討した。心臓リモデリングの際に重要と考えられる monocyte chemoattractant protein 1 (*Mcp1*) や osteopontin (*Opn*) などの遺伝子発現変化を指標に CPP の至適濃度と刺激時間を決定した。CPP 5 μ l/ml, 24 時間刺激で、*Mcp1*, *Opn* 遺伝子の発現亢進が認められたため、同条件下で DNA マイクロアレイ解析を施行した。その結果、CPP 刺激で 1/2 以下に発現が低下する遺伝子で有意とされるパスウェイとして、“electron transport chain” や “striated muscle contraction” が抽出された。





当該実験結果は、腎臓病の際のリン代謝異常が原因で生じる CPP が心筋細胞の電子伝達系や筋収縮に影響を及ぼす結果、心臓臓器障害を進展させる機序を示唆する。同時に、CPP を除去することが、心筋における電子伝達系や筋収縮関連遺伝子の発現保持につながり、心臓臓器障害抑制に寄与する可能性を示す。

(2) CPP による心筋細胞障害へ心臓線維芽細胞培養上清が及ぼす影響

心臓線維芽細胞の培養上清を添加した心筋細胞では、CPP 刺激前から *Opn* や transforming growth factor β など、心臓リモデリングに寄与すると考えられる遺伝子発現に変化が認められた。心臓線維芽細胞の培養上清は、心筋細胞における CPP 刺激に伴う遺伝子発現変化にも影響を及ぼし、心臓リモデリング過程に複雑に関与していることが示唆された。

(3) 心筋細胞株 (H9C2 細胞) に対する酸化ストレス刺激時の remodelin による細胞死救済効果

過酸化水素による酸化ストレス刺激時の細胞死を remodelin が救済可能か否か、H9C2 細胞を用いて予備的に検討した。使用濃度の範囲では、一部の細胞数と薬剤濃度でのみ、わずかな救済効果を認めたものの、濃度依存性を有するような有意な救済効果は認めなかった。

(4) ラット心筋細胞への CPP 刺激に伴う核内クロマチン局在変化

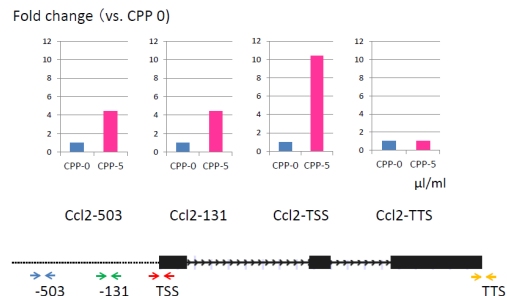
CPP による心筋細胞の核のクロマチン構造変化については、ヒストン H3 リジン K9 トリメチル化の免疫染色 (ヘテロクロマチンの核内局在変化) で検討した。検討範囲内では、特定のパターンを検出するには至らなかった。

(5) 心筋細胞において CPP 刺激に伴い発現亢進する遺伝子 *Mcp1* 近傍のヒストン修飾変化

上記(4)の実験において、CPP 刺激により核内ヘテロクロマチンの明らかな局在変化が検出できなかったため、研究課題申請時の計画を一部変更した。CPP 刺激に伴い発現変化する遺伝子近傍に焦点を当て、ChIP-PCR によりエピジェネティック変化を解析した。CPP 刺激で発現亢進する *Mcp1* (*Ccl2*) 遺伝子近傍

の H3K4 トリメチル化 (H3K4me3) 変化を検討した結果、発現変化に一致して、転写開始点近傍 (TSS) およびその上流で H3K4me3 レベルが亢進していた。

Mcp1 遺伝子近傍における H3K4 トリメチル化変化



本研究課題では、微小リン酸カルシウム結晶が心腎連関の一介在因子となり、心臓臓器障害に寄与する可能性を示すことができた。特に、CPP が心筋細胞で電子伝達系関連遺伝子群や筋収縮関連遺伝子群の発現低下を来すことは、心腎連関の一機序を提示する重要な知見と考える。これまでの他施設からの臨床研究によれば、血清中 CPP 濃度は、推定糸球体濾過量 (eGFR) の低下と相関し、脈波伝播速度やカルシウムスコアで示される血管の硬化度や石灰化とも正相関があることから、CPP の除去は、腎機能低下抑制や血管硬化に対する治療標的として有望と思われる。本研究成果は、さらに心臓臓器障害に対しても CPP 除去が有望である可能性を示唆するものである。

上記、研究成果(2),(3),(4)については、研究期間内における条件検討が十分でなかったために、重要な知見を得るに至らなかった可能性が否定できない。今後、本研究成果を基盤に、更なる検討を加える価値があると考えられる。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計1件)

Ruri Kaneda, Makoto Kuro-o.

The Damage on Cardiomyocytes by Calciprotein Particles. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Epigenetics and Human Disease: Progress from Mechanisms to Therapeutics (A9). January 29, 2017 - February 2, 2017 - Seattle, Washington, USA.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

金田 るり (KANEDA, Ruri)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70465029

(2)研究協力者

黒尾 誠 (KURO-O, Makoto)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：10716864