

令和元年5月22日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09655

研究課題名(和文) 血管平滑筋細胞の表現型制御による血管石灰化治療法の開発

研究課題名(英文) Novel Therapeutics for Vascular Calcification

研究代表者

吉田 理 (Tadashi, Yoshida)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：00306713

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)：腎臓病があると、心血管イベントの発症率が有意に高いことが知られている。両者の関係は「心腎連関」という言葉で表現される。とくに慢性腎臓病においては血管石灰化病変の形成・進行が、心血管イベントの発症に大きく関与している。本研究では、慢性腎臓病における血管石灰化の分子機構の解明と治療標的分子の同定を目的として、培養細胞およびモデル動物を用いて検討を行った。慢性腎臓病においては、血管平滑筋におけるNF- κ B活性が血管石灰化に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病における血管石灰化は、心血管イベントを引き起こす原因となる。しかし、現在のところ血管石灰化の有効な治療薬は存在しない。今回の研究では、慢性腎臓病においては、血管平滑筋におけるNF- κ B活性が血管石灰化に重要な役割を果たしていることを明らかにした。血管平滑筋においてNF- κ Bを制御することが、新たな治療法となる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Vascular calcification is highly prevalent in patients with chronic kidney disease. The aim of the present study was to determine the role of pro-inflammatory nuclear factor- κ B signaling for vascular calcification in chronic kidney disease. We found that the nuclear factor- κ B signaling in vascular smooth muscle cells plays an important role in phosphate-induced vascular calcification in chronic kidney disease.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管石灰化 慢性腎臓病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高血圧、糖尿病といった生活習慣病に罹患する患者の増加に伴い、末期腎不全に至る患者も年々増加し、2013年における日本透析医学会の統計によれば、慢性透析患者数は31万人を超えている。同学会は、慢性透析患者の長期生存率についても統計調査を行っているが、残念ながら10年生存率、15年生存率などは近年ほぼ横這いの状況が続いている。死亡原因を見てみると心筋梗塞や脳血管障害など動脈硬化性疾患による合併症が、透析患者の長期生存率に大きく関与していることが分かる。このように疫学調査からは、腎不全患者の生命予後改善には、動脈硬化性合併症の管理・予防が重要であることが強く認識される。

慢性腎不全病態における動脈硬化性病変は、メンケベルグ型といわれる中膜平滑筋の石灰化を中心とした病理像を呈している。近年の研究によれば、腎不全に伴う高リン血症といった刺激が、平滑筋細胞においてSM α -actin や SM-myosin heavy chain (SM-MHC)、SM22 α といった平滑筋分化マーカーの発現を消失させ、代わりにosteopontin や alkaline phosphatase、Runx2 といった骨分化マーカーを新たに誘導することで骨様細胞へと形質変換させて、血管石灰化病変を形成・進行させるというメカニズムが判明している (Shanahan et al., Circ Res., 2011)。酸化ストレスや慢性炎症、Advanced Glycation End products 等、様々な因子が血管石灰化を誘導することが知られているが、腎不全病態においては、リンが最も強力な石灰化誘導因子である。培養血管平滑筋細胞や動物モデルを用いた我々の研究でも、リン負荷は平滑筋細胞を骨様細胞に形質変換させて血管石灰化をもたらした一方で、厳格なリン摂取の制限は、腎不全病態においても血管石灰化を完全に抑制することが示された (Yoshida et al., J Biol Chem., 2012; 吉田ら、第60回日本透析医学会学術集会、2015)。しかしながら臨床の場面においては、リン制限は蛋白制限と直結するため、しばしば困難が伴う。実際に、炭酸カルシウムをはじめとして種々のリン吸着薬が現在使用できるが、石灰化制御の達成には至っていない。これらの事実は、リンコントロール以外の機序を利用した石灰化管理の必要性を示している。

2. 研究の目的

今回我々は、血管平滑筋細胞の分化型形質の維持あるいは脱分化の抑制が、リン負荷による骨様細胞への形質変換を抑制し、さらには血管石灰化を抑制できないかと仮定し検討を行うこととした。平滑筋細胞の分化誘導因子としては、転写調節因子のMyocardinが知られている。Myocardinは、我々を含むいくつかの研究グループにより発見された分子であるが (Yoshida et al., Circ Res., 2003 など)、平滑筋の収縮に必要な一連の平滑筋分化マーカーの発現を正に制御している。これを強制的・恒常的に発現させた場合、平滑筋細胞の骨様細胞への形質変換が抑制されるかどうかは、興味があるところである。一方で、転写因子KLF4やNF- κ Bは平滑筋細胞の脱分化誘導因子である。近年、KLF4はiPS細胞を誘導するのに必要な4因子の一つとして注目を集めているが、平滑筋細胞においてはSM α -actin や SM-MHC、SM22 α といった平滑筋分化マーカーの発現を抑制する因子として報告されている。血管平滑筋細胞特異的にKLF4を欠損させた場合、平滑筋の脱分化が抑制される結果、分化型としての機能が維持されて、血管石灰化が抑制される可能性がある。また、NF- κ Bについても同様である。今回は、特にNF- κ Bに焦点を当てて、血管平滑筋細胞特異的にNF- κ Bシグナルを抑制した場合、慢性腎不全に伴う血管石灰化がどのように変化するかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウスにおける慢性腎不全に伴う血管石灰化モデルの作製

動物実験に一般的に用いられるC57BL/6マウスは血管石灰化に抵抗性がある。マウスにおいて慢性腎不全に伴う血管石灰化モデルを樹立するため、DBA/2マウスを用いる。DBA/2マウスにアデニン投与による慢性腎不全を誘導し、その後高リン食を5週間給餌する。その後血管石灰化の状態を組織学的に検討する。

(2) 血管平滑筋選択的NF- κ B抑制マウスにおける血管石灰化の検討

Cre-LoxPシステムを用いて血管平滑筋選択的NF- κ B抑制マウスを作製し、対照マウスとともに前述の血管石灰化を誘導する。血管平滑筋においてNF- κ Bシグナルを抑制したマウスでは血管石灰化がどのように変化するか明らかにする。

(3) 腎臓におけるNF- κ Bの役割の検討

NF- κ Bの役割を腎臓においても明らかにするため、Cre-LoxPシステムを用いて腎臓系球体特異的NF- κ B抑制マウスを作製し、そのマウスにアドリアマイシン腎症および腎虚血再灌流障害を引き起こして、系球体におけるNF- κ Bの役割を明らかにする。

4. 研究成果

(1) マウスにおける慢性腎不全に伴う血管石灰化モデルの作製

DBA/2マウスにアデニンを5週間投与して慢性腎不全を誘導し、その後高リン食をさらに5週間給餌したところ、大小様々なサイズの血管に石灰化が認められた。この石灰化は、慢性腎不全を誘導しただけでは認められず、また慢性腎不全でないマウスに高リン食を給餌しただけでも認められなかった。腎不全状態で、且つ高リン血症がある場合に、著明な血管石灰化を来

すモデルを樹立できた。石灰化した血管では、血管平滑筋層において SM α -actin や SM22 α の発現低下と osteopontin や Runx2 の発現亢進が認められ、血管平滑筋の形質変換を伴うことが判明した。

(2) 血管平滑筋選択的 NF-kB 抑制マウスにおける血管石灰化の検討

血管平滑筋選択的 NF-kB 抑制マウスおよび対照マウスに対して、前述のプロトコルを用いて血管石灰化を誘導した。対照マウスでは著明な血管石灰化が認められたが、血管平滑筋選択的 NF-kB 抑制マウスでは石灰化が有意に抑制されていた。また、血管平滑筋の形質変換も抑制されていた。これらの結果は血管平滑筋における NF-kB の活性化が、慢性腎不全による高リン血症に伴う血管石灰化に重要な役割を果たしていることを示している。

これらの成果は血管石灰化の制御に関して、リンコントロール以外の新たな治療ターゲットを提供するものである。この点において、本研究は血管石灰化の管理・予防に関して、新たな戦略を与えうる分子基盤となる研究であったといえる。

(3) 腎臓における NF-kB の役割の検討

腎臓系球体特異的 NF-kB 抑制マウスを作製し、マウスにアドリアマイシン腎症および腎虚血再灌流障害を引き起こして、系球体における NF-kB の役割を検討した。アドリアマイシン腎症を引き起こしたところ、腎臓系球体特異的 NF-kB 抑制マウスでは、対照マウスと比較して蛋白尿が減少していた。この結果は腎臓系球体における NF-kB は蛋白尿の発症に重要な役割を果たしていることを示している。一方で、腎臓系球体特異的 NF-kB 抑制マウスに腎虚血再灌流障害を引き起こしても対照マウスと腎障害の程度は同様であった。虚血再灌流障害には腎臓系球体における NF-kB は関与していないことを示唆した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

- (1) Tadashi Yoshida, Maho Yamashita, Chihiro Horimai, Matsuhiko Hayashi. Smooth muscle-selective nuclear factor-kB inhibition reduces phosphate-induced arterial medial calcification in mice with chronic kidney disease. *Journal of the American Heart Association*. 2017, 6: e007248. 査読あり
DOI: 10.1161/JAHA.117.007248
- (2) Maho Yamashita, Tadashi Yoshida, Sayuri Suzuki, Koichiro Homma, Matsuhiko Hayashi. Podocyte-specific NF-kB inhibition ameliorates proteinuria in adriamycin-induced nephropathy. *Clinical and Experimental Nephrology*. 2017, 21: 16-26. 査読あり
DOI: 10.1007/s10157-016-1268-6
- (3) Tadashi Yoshida, Matsuhiko Hayashi. Pleiotropic effects of statins on acute kidney injury: involvement of Kruppel-like factor 4. *Clinical and Experimental Nephrology*. 2017, 21: 175-181. 査読あり
DOI: 10.1007/s10157-016-1286-4
- (4) Maho Yamashita, Tadashi Yoshida, Matsuhiko Hayashi. Podocyte NF-kB is dispensable for the pathogenesis of renal ischemia-reperfusion injury. *Physiological Reports*. 2016, 4: e12912. 査読あり
DOI: 10.14814/phy2.12912

〔学会発表〕(計2件)

- (1) Tadashi Yoshida, Maho Yamashita, Matsuhiko Hayashi. NF-kB in smooth muscle cells plays a key role in arterial medial calcification in chronic kidney disease. ISN Frontiers Meeting 2018. 2018.
- (2) Tadashi Yoshida, Maho Yamashita, Matsuhiko Hayashi. Smooth muscle-selective NF-kB inhibition reduces phosphate-induced vascular calcification in mice with chronic kidney disease. 54th ERA-EDTA (European Association-European Dialysis and Transplant Association) Congress. 2017.

〔図書〕(計1件)

- (1) Tadashi Yoshida. Springer. *Encyclopedia of Signaling Molecules*, 2nd Edition. 2018, 2777-2781.

〔産業財産権〕

- 出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
keio-apheresis-dialysis.jp/

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：林 松彦

ローマ字氏名：HAYASHI, Matsuhiko

研究協力者氏名：山下 真帆

ローマ字氏名：YAMASHITA, Maho

研究協力者氏名：堀米 ちひろ

ローマ字氏名：HORIMAI, Chihiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。