

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09816

研究課題名(和文) クロマチンと遺伝子発現の網羅的解析の併用による組織特異的石灰化機序の同定

研究課題名(英文) Identification of tissue-specific mechanisms of calcification using a combined analysis of transcriptome and chromatin accessibility

研究代表者

河野 尚平 (Kohno, Shohei)

広島大学・医系科学研究科(歯)・助教

研究者番号：00868391

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞膜透過型イノシトール6リン酸(IP6-AM)の血管平滑筋細胞特異的な石灰化抑制効果とその機序を検討した。その結果、IP6-AMは骨芽細胞の石灰化を阻害することなく血管平滑筋細胞の石灰化のみを抑制すること、IP6-AMは血管平滑筋細胞においてIP6とは異なる遺伝子発現変動をもたらすこと、細胞内ではIP6の代謝産物ではなくIP6が石灰化抑制効果を発揮することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟部組織である血管の異所性石灰化は、しばしば硬組織の石灰化不全を伴う。それゆえ、血管異所性石灰化に対しては、血管の石灰化を抑えつつ、硬組織の石灰化は抑制しない治療戦略が求められる。本研究は、IP6-AMが血管平滑筋特異的に石灰化抑制効果を発揮することを示した。今後、そのメカニズムのさらなる解析と個体レベルでの治療効果の検証を遂行することで、血管石灰化治療法確立につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the specific inhibitory effect of cell membrane-permeable inositol 6-phosphate (IP6-AM) on vascular smooth muscle cell calcification and its mechanism. The results showed that 1) IP6-AM inhibits only vascular smooth muscle cell calcification without inhibiting osteoblast calcification, 2) IP6-AM induces distinct gene expression changes in vascular smooth muscle cells compared to IP6, 3) IP6, but not IP6 metabolites, exerts its inhibitory effect within cells.

研究分野：解剖学

キーワード：慢性腎臓病 骨 血管 イノシトールリン酸 トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

一般的に、歯や骨などの硬組織の石灰化と軟部組織石灰化は逆相関を示すことが知られている。すなわち、軟部組織である血管異所性石灰化が見られる病態においては、硬組織である骨の石灰化抑制が観察される。それゆえ、血管異所性石灰化に対しては、血管の石灰化を抑えつつ、硬組織の石灰化は抑制しない治療戦略が求められる。これまでにヒドロキシアパタイト結晶に結合することで異所性石灰化を阻害し得る物質が報告されている。具体的には、ピロリン酸、ビスフォスフォネート、pASARM ペプチド、IP6 などが挙げられる。そのなかで、血管石灰化治療薬として、IP6 は実用化に最も近いといえる。しかしながら、硬組織の石灰化抑制作用に関しては知見が定まっていない。IP6 は骨髄由来前駆細胞に対して骨芽細胞分化・石灰化を抑制しないという報告がある一方で、骨芽細胞や象牙芽細胞の石灰化を抑制する報告もある。また、我々の得た知見と一致して、大動脈器官培養モデルにおいて IP6 投与が平滑筋特異的遺伝子の発現減少を防ぐことも報告されているが、予想外の結果であるとしてそれ以上の考察はなされていない。研究代表者は、IP6 が血管平滑筋細胞の石灰化抑制にはたらく際に骨芽細胞とは異なる遺伝子発現変動を示すことを見出した。IP6 の細胞透過性は非常に低いものの、エンドサイトーシスにより細胞内へと取り込まれることが明らかとなっており、細胞内の IP6 がタンパク質と相互作用することで生物学的活性を発揮することも報告されている。これらの知見から、IP6 による血管石灰化抑制作用には血管平滑筋細胞に特有の細胞内メカニズムを介していると仮定した。

2. 研究の目的

血管異所性石灰化、特に動脈中膜石灰化は骨の膜性骨化に類似すると理解されている。実際、血管平滑筋が骨芽細胞様細胞に形質転換する際には、Msx2 や Runx2 などの骨芽細胞分化への転写因子が活性化している。しかしながら、硬組織の石灰化を抑制することなく血管石灰化抑制するためには、血管平滑筋細胞に固有の石灰化シグナルを同定することは不可欠である。研究代表者は、IP6 が血管平滑筋細胞の石灰化抑制にはたらく際に、細胞内シグナル伝達経路を介した遺伝子発現に影響を及ぼすことを見出した。これまでの IP6 と血管石灰化に関する研究は、HA 結晶の成長阻害をメカニズムとすることを前提として、応用研究に重点が置かれてきた。しかしながら、IP6 は平滑筋細胞の骨芽相棒様細胞への形質転換を抑制できる知見が得られつつある。本研究は、血管(軟部組織)石灰化に特有の細胞内メカニズムの同定を目的とする。研究代表者が作製した膜透過型の IP6 である IP6-アセトキシメチルエステル (IP6-AM) は、細胞外ではリン酸基が AM 基でマスクされて不活性であるが、細胞内に存在するエステラーゼにより加水分解を受けることで AM 基が除去される。それゆえ細胞内ではじめて活性型の IP6 となる。IP6-AM を用いることで、細胞内での作用のみを特異的に観察することが可能となる。

3. 研究の方法

(1) IP6-AM による血管平滑筋選択的な石灰化抑制効果の検討

まず、IP6-AM が IP6 と同様に石灰化抑制効果を有するかどうかを検討した。具体的には、マウス血管平滑筋細胞株である MOVAS 細胞を高リン負荷により石灰化誘導し、IP6-AM 添加による石灰化抑制作用を評価した。石灰化物はアリザリンレッド S (ARS) で染色し、石灰化度を判定した。さらに、マウス間葉系幹細胞株である KUSA-A1 細胞を骨芽細胞に分化誘導し、IP6-AM 添加による石灰化抑制作用も評価した。石灰化は von Kossa 染色を用いて評価した。

(2) IP6-AM 特異的なターゲット遺伝子群の探索

MOVAS 細胞の石灰化誘導時に、IP6-AM あるいは IP6 を添加し 3 日間培養した。その細胞から RNA を抽出、RNA シークエンシングを実施しトランスクリプトーム解析を行った。石灰化誘導時に発現が増加する遺伝子群のうち、それぞれの化合物で発現が抑制されるターゲット遺伝子群を同定した。さらに、IP6-AM 特異的に抑制される遺伝子群を探索した。

(3) 石灰化抑制効果を発揮する IP6 代謝産物の同定

IP6-AM は細胞内で IP6 に変換後、リン酸基の付加あるいは除去により、リン酸基の数の異なるイノシトールリン酸へと代謝される。石灰化阻害に関与する代謝物を同定するため、IP6 リン酸化酵素である IP6K1/2 および脱リン酸化酵素である MINPP1 に対する siRNA を用いてノックダウンし、IP6-AM の石灰化阻害作用における影響を検討した。石灰化物を ARS 染色し、石灰化度を判定した。

4. 研究成果

研究代表者が新規に作製した膜透過型の IP6-AM は IP6 と同様に石灰化阻害作用を示した (図 1. A)。IP6-AM は細胞外ではその石灰化抑制を担う OH 基が AM 基でマスクされているため活性を持たず、細胞内に移行した後に細胞内エステラーゼにより AM 基が切断され本来の IP6 に

戻る。従って、この結果は細胞内における IP6 依存性の血管平滑筋細胞石灰化機序の存在を強く示唆している。次に、硬組織の石灰化における IP6-AM の影響を検討した。KUSA-A1 細胞はアスコルビン酸とβ-グリセロールリン酸存在下で培養すると骨芽細胞様に分化・石灰化するが、IP6 はその石灰化を顕著に阻害した (図 1. B)。一方、IP6-AM は KUSA-A1 の石灰化を全く阻害しなかった (図 1. B)。このことは、IP6 は血管と骨両方の石灰化を抑制するが、IP6-AM は血管平滑筋の石灰化のみを抑制していることを強く示唆している。

IP6 と IP6-AM の石灰化抑制機序の相違を明らかにするために、それぞれを添加した MOVAS 細胞から RNA を抽出しトランスクリプトーム解析を実施した。石灰化誘導により発現が増加した遺伝子 (発現量 2 倍以上、FDR0.01 未満) は 375 個であった。それらの遺伝子のうち、IP6 で発現増加が有意に抑制されたのは 199 遺伝子、IP6-AM で発現増加が有意に抑制されたのは 195 遺伝子であった。それらのうち、IP6-AM でのみ発現増加が抑制される遺伝子を 16 個同定した (図 2)。

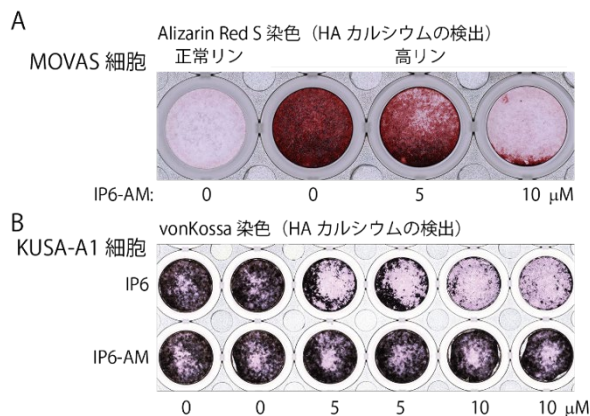


図 1. IP-6AMによる血管平滑筋特異的な石灰化阻害

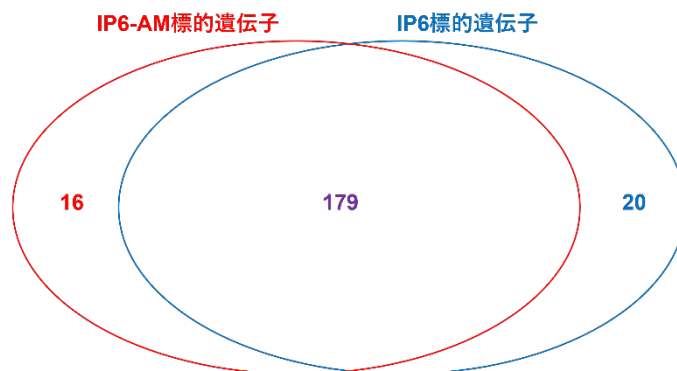


図 2. トランスクリプトーム解析を用いたIP-6AMにより発現増加が抑制される遺伝子群の探索

IP6 は細胞内の酵素によりリン酸基の数が増減し各種イノシトールリン酸へと代謝される。IP6 のリン酸化酵素 IP6K1/2、脱リン酸化酵素 MINPP1 をノックダウンし血管平滑筋細胞の石灰化を比較したが、いずれのノックダウンも IP6-AM の石灰化抑制効果を阻害しなかった (図 3)。この結果は IP6 の代謝産物ではなく、IP6 が石灰化抑制効果を持つことを示唆している。

以上の結果をまとめると、IP6-AM 由来の IP6 は、細胞外の IP6 とは異なる遺伝発現変動への影響を及ぼし、血管平滑筋特異的に石灰化抑制効果を発揮していると考えられる。今後は具体的なターゲット遺伝子の同定と個体レベルでの影響をさらに解析していく必要がある。

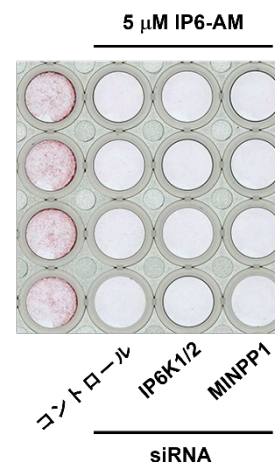


図 3. 石灰化抑制IP6代謝産物の同定

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kharaghani Davood, Kohno Shohei, Minamizaki Tomoko, Hoshino Tomonori, Yoshiko Yuji	4. 巻 50
2. 論文標題 2,3-Diphospho-D-glyceric acid inhibits calciprotein particle growth and calcification in MOVAS cells but not in MC3T3-E1 cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Colloid and Interface Science Communications	6. 最初と最後の頁 100668 ~ 100668
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.colcom.2022.100668	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hoshino Tomonori, Kharaghani Davood, Kohno Shohei	4. 巻 -
2. 論文標題 Extracellular histones promote calcium phosphate-dependent calcification in mouse vascular smooth muscle cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvae011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Davood Kharaghani, Eben Bashir Kurniawan, Shohei Kohno, Tomonori Hoshino, Tomoko Minamizaki, Yuji Yoshiko
2. 発表標題 4 : Calciprotein particles play a role in bone formation and vascular calcification
3. 学会等名 6th Joint Scientific Meeting in Dentistry (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Davood Kharaghani, Tomoko Minamizaki, Shohei Kohno, Tomonori Hoshino, Yuji Yoshiko
2. 発表標題 6 : MEPE-derived ASARM, an inhibitor of calciparticle protein formation, suppresses vascular calcification but not bone formation
3. 学会等名 ASBMR 2021 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	新飯田 俊平 (Niida Shumpei) (10137630)	国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・研究所 研究推進基盤センター・センター長 (83903)	
研究分担者	吉子 裕二 (Yoshiko yuji) (20263709)	広島大学・医系科学研究科(歯)・教授 (15401)	
研究分担者	南崎 朋子 (Minamizaki Tomoko) (30452593)	広島大学・医系科学研究科(歯)・助教 (15401)	
研究分担者	吉岡 広陽 (Yoshioka Hirotaka) (50523411)	国際医療福祉大学・医学部・講師 (32206)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------