

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 24 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591200

研究課題名(和文)慢性腎臓病の血管石灰化発症機序における転写調節因子の役割の解明と治療への応用

研究課題名(英文)The studies on the roles of transcriptional factors in pathogenesis of vascular calcification by chronic kidney disease and their application for the therapy

研究代表者

林 松彦(Hayashi, Matsuhiko)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：60129608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病患者にみられる動脈石灰化のメカニズム解明のために、本研究では、培養細胞およびモデル動物を用いて、動脈石灰化に関わる転写調節因子の役割を検討した。高リン血症による血管平滑筋細胞の骨様細胞への形質変換に転写因子KLF4が関与することを、in vivo、in vitroで同定した。また、同様の系で高血糖が血管石灰化の増悪因子として有意では無いことを示し、さらに血管平滑筋細胞特異的にNF- κ B活性を抑制するマウスでは血管傷害による内膜肥厚性動脈硬化形成が抑制されることを示した。現在、腎不全病態におけるNF- κ Bの血管石灰化への役割をこれらマウスで用いて検討中である。

研究成果の概要(英文)：To reveal the mechanisms which induce vascular calcification in the patients with chronic kidney disease, roles of transcriptional factors which are related to vascular calcification are studied in the present study. We found that Klf4, a transcriptional factor, plays important roles in transformation of vascular smooth muscle cells to osteocyte-like cells by hyperphosphatemia in the in vivo and in vitro experiments. It was also shown that by the same experimental system hyperglycemia is not a significant factor for worsening of vascular calcification. In addition, by vascular smooth muscle cell specific inactivation of NF- κ B activity in mouse, endothelial thickening arteriosclerosis by vascular injury was ameliorated. Currently, we are examining the roles of NF- κ B in the pathogenesis of vascular calcification by chronic renal failure, using these genetically modified mouse.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：血管石灰化 慢性腎臓病 NF κ B Klf4

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病の概念が提唱され、慢性腎臓病における腎機能低下が死亡率の上昇を生じ、心・血管系死亡の増加がその要因である可能性が示され、心・血管系障害の原因となる動脈硬化の発症・進展機序について多くの研究がなされて来た。最近の報告では、この慢性腎臓病患者死亡率の上昇には、心・血管系疾患の増加のみならず、感染症など全ての疾患の死亡率上昇が寄与している可能性が指摘されているが、心・血管系死亡が著しく高率であることは、依然として、临床上重要な問題となっている。この慢性腎臓病における動脈硬化の促進、accelerated atherosclerosis の概念は古くから認識されており、特に、末期腎不全にともなう血管石灰化が非常に重要であることが報告されている。この血管石灰化は、中膜、平滑筋細胞が病変の場となり、平滑筋細胞の骨芽細胞様細胞への分化、石灰沈着を生じることが示されている。しかし、これまでの報告では、単に、骨芽細胞のマーカー遺伝子発現が増加し、平滑筋細胞のマーカー遺伝子が減少するということが示されているに過ぎず、その詳細な機序は明らかとされていない。慢性腎臓病患者の予後改善には、この石灰化機序解明は極めて重要と考えられている。

2. 研究の目的

慢性腎臓病および、末期腎不全患者に見られる血管石灰化の発症機序を明らかとするために、本研究が立案された。本研究では、遺伝子操作動物、培養細胞を用いて、転写調節因子である nuclear factor κ B (NF κ B)を中心として、Krüppel-Like Factor 4 (Klf4)、種々の分化誘導因子、炎症性サイトカインの血管石灰化における役割と病変の場を明らかとして、その治療標的分子を同定し、治療法開発へと続く基礎的検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 高リン環境における血管石灰化機序の解明

慢性腎臓病では、早期からリン代謝異常を生じ、血管石灰化、さらには生命予後と密接な関係を有することが知られている。そこで、本研究では、培養細胞を用いた in vitro の研究と、遺伝子操作動物などを用いた in vivo の研究の双方から、高リン環境における血管石灰化発症機序と、その主たる病変の場を解明し、治療標的となる蛋白を同定することを試みた。

培養細胞においては、ラット大動脈より採取した血管平滑筋細胞において、高リン培地存在下における血管石灰化で誘導される蛋白と、転写調節因子活性化の検討を行った。特に、血管平滑筋細胞の分化に重要な役割を果たす転写調節因子である Klf4 について検討を加えた。また、高リン血症による大動脈

石灰化における Klf4 の役割をさらに検討するために、adenine 誘導腎不全ラットを用いて同様に検討を行った。

(2) 血管石灰化増悪因子の検討

糖尿病腎症による慢性腎不全では、他の疾患による場合に比べ、血管石灰化がさらに進行することが临床上認められる。そこで、糖尿病腎症における血管石灰化の増悪機序を検討するために、adenine 誘導腎不全ラットに streptozotocin 糖尿病を誘導し、血管石灰化の変化を検討した。また、培養血管平滑筋細胞を用いて、高リン培地における平滑筋細胞の石灰化と、骨細胞分化マーカー発現に対する高グルコースの影響を検討した。

(3) 細胞特異的 IkB Δ N 発現マウスを用いた血管平滑筋細胞障害における NF κ B 活性化の役割の検討

NF κ B の腎不全における血管石灰化への影響を検討するために、現有するマウスは全てバックグラウンドが C57/BL6 系マウスであり、この系統が血管石灰化に抵抗性であることから、SM22 α -Cre マウス、後述の loxP-IkB Δ N マウスの両マウスを血管石灰化に感受性のある CBA/2 マウスに交配し、系統の変更を行った。

バックグラウンド変更と並行して、この系の確立を兼ねて、NF κ B の血管傷害における重要性を検討した。以前、我々の研究室では、NF κ B 活性化抑制因子である IkB のリン酸化部位を欠落し、恒常的に NF κ B と結合してその活性化を抑制する IkB Δ N の遺伝子を loxP で挟んだ construct を組み込んだ loxP-IkB Δ N マウスを作成した。このマウスと、cre-recombinase を血管平滑筋細胞にのみ発現する SM22 α -Cre マウスとを掛け合わせ、血管平滑筋特異的に NF κ B 活性を抑制したマウスを作成した。このマウスにおいて、頸動脈に機械的な血管障害を起こし、Klf4 と NF κ B の役割を検討した。

さらに、NF κ B の腎不全における血管石灰化への影響を検討するために、現有するマウスは全てバックグラウンドが C57/BL6 系マウスであり、この系統が血管石灰化に抵抗性であることから、SM22 α -Cre マウス、IkB Δ N マウスの両マウスを血管石灰化に感受性のある CBA/2 マウスに交配し、系統の変更を行った。

4. 研究成果

(1) 高リン環境における血管石灰化機序の解明

培養血管平滑筋細胞を用いた検討では、リン負荷による血管平滑筋細胞の骨様細胞への形質変換に転写因子 Klf4 が関与することを同定した。すなわち、高リン培地での血管平滑筋培養は、平滑筋分化マーカーである SM α -actin、SM22 α の発現を低下させ、骨細胞の分化マーカーである osteopontin、alkaline phosphatase、Runx2 の発現を亢進させることが示された。これら高リン培地による変化は、

Klf4 を siRNA により機能抑制すると、著明に抑制された。すなわち SM α -actin、SM22 α の発現低下は抑制され、osteopontin、alkaline phosphatase、Runx2 の発現亢進も抑制された。さらに、Klf4 は、高リン血症をきたすアデニン負荷慢性腎不全モデル動物においても動脈石灰化部位に発現亢進が認められ(図1)、慢性腎不全に伴う高リン血症が石灰化病変を形成するにあたって、重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

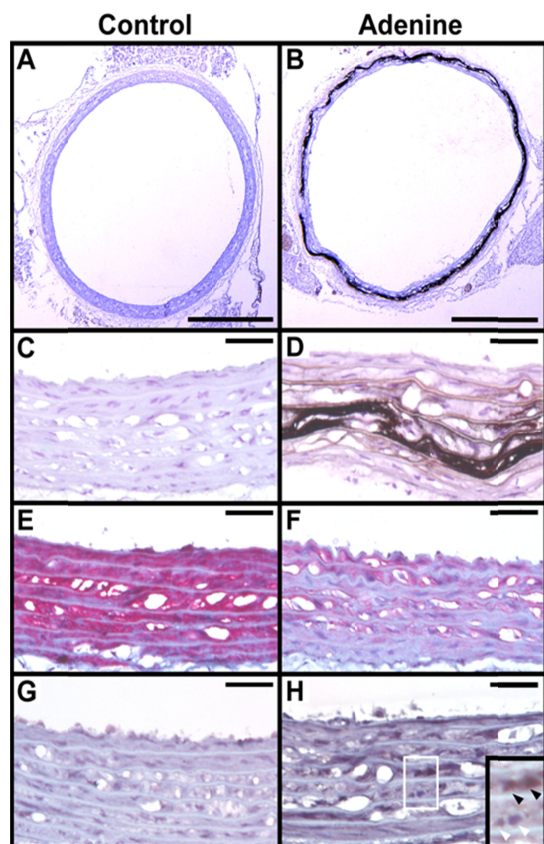


図1
A-D: ラット大動脈 von Kossa 染色
A, C 対照ラット、B, D, adenin 誘導腎不全ラット
E, F: SM α -actin、G, H: Klf4
E, G: 対照ラット、F, H: adenin 誘導腎不全ラット
Adenine 誘導腎不全ラットでは血管石灰化が著明に認められ、さらに SM α -actin の発現低下、Klf4 発現亢進が明らかに見られる。

(2) 血管石灰化増悪因子の検討

糖尿病腎症による慢性腎不全では、他の疾患による場合に比べ、血管石灰化がさらに進行することが臨床的に認められる。そこで、糖尿病腎症における血管石灰化の増悪機序を検討するために、adenin 誘導腎不全ラットに streptozotocin 糖尿病を誘導し、血管石灰化の変化を検討した。Adenine 誘導腎不全ラットにおいては、糖尿病の有無にかかわらず、高度の大動脈石灰化が見られたが、糖尿病の有無では差異を認めなかった。また、培養血管平滑筋細胞を用いて、高リン培地における平滑

筋細胞の石灰化と、骨細胞分化マーカー発現に対する高グルコースの影響を検討した。高リン培地により、血管平滑筋細胞は、(1) の検討と同様に明らかな石灰化を認めたが、培地の糖濃度は、この高リン培地による変化に有意の差異を生じなかった。この結果より、糖尿病腎症にみられる、血管石灰化促進は、血糖自体の影響は少ないと考えられた。

(3) 細胞特異的 I κ B Δ N 発現マウスを用いた血管平滑筋細胞障害における NF κ B 活性化の役割の検討

NF κ B の腎不全における血管石灰化への影響を検討するために、現有するマウスは全てバックグラウンドが C57/BL6 系マウスであり、この系統が血管石灰化に抵抗性であることから、SM22 α -Cre マウス、loxP- I κ B Δ N マウスの両マウスを血管石灰化に感受性のある CBA/2 マウスに交配し、系統の変更を行い、新たに CBA/2 マウスをバックグラウンドとする SM22 α -Cre マウスと loxP- I κ B Δ N マウスの作成に成功した。現在これらマウスを用いて adenin 誘導腎不全マウスにおける血管石灰化を検討中である。

バックグラウンド変更と並行して、この系の確立を兼ねて、NF κ B の血管傷害における重要性を検討した。loxP- I κ B Δ N マウスと、cre-recombinase を血管平滑筋細胞にのみ発現する SM22 α -Cre マウスとを掛け合わせ、血管平滑筋特異的に NF κ B 活性を抑制したマウスを作成することに成功した。このマウスと野生型マウスにおいて、頸動脈に機械的な血管障害を起こしたところ、野生型マウスでは局所での NF κ B の著明な活性化と、内膜肥厚性動脈硬化が誘導された。これに対して、血管平滑筋特異的に NF κ B 活性を抑制したマウスでは、内膜肥厚性動脈硬化の形成は有意に抑制された。この結果から血管平滑筋障害における NF- κ B の重要性が生体内で明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

- (1) Yoshida T, Hayashi M. Role of Krüppel-Like Factor 4 and its Binding Proteins in Vascular Disease. *J Atheroscler Thromb.* 査読有り, in press, <http://dx.doi.org/10.5551/jat.23044> 2014
- (2) Yoshida T, Yamashita M, Horimai C, Hayashi M. Deletion of Krüppel-like factor 4 in endothelial and hematopoietic cells enhances neointimal formation following vascular injury. *J Am Heart Assoc.* 査読有り, 3, 2014: e000622. doi: 10.1161/JAHA.113.000622.
- (3) Yoshida T, Yamashita M, Horimai C, Hayashi M. High glucose concentration does not modulate the formation of arterial medial calcification in experimental uremic rats. *J Vasc Res.* 査読有り, 2013;50, 2013: 512-20. doi: 10.1159/000355263.

(4) Yoshida T, Yamashita M, Horimai C, Hayashi M. Smooth muscle-selective inhibition of nuclear factor- κ B attenuates smooth muscle phenotypic switching and neointima formation following vascular injury. J Am Heart Assoc. 査読有り, 2, 2013:e000230. doi: 10.1161/JAHA.113.000230. [学会発表](計 7 件)

(1) Tadashi Yoshida, Maho Yamashita, Matsuhiko Hayashi, “Krüppel-like factor 4 in endothelial cells protects mice from renal ischemia-reperfusion injury” the 46th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2013, November 8, Atlanta, USA

(2) 吉田 理、山下 真帆、林 松彦、「腎不全ラットの血管石灰化形成におけるグルコース濃度の影響」第 58 回日本透析医学会学術集会・総会、2013 年 6 月 23 日、福岡市

(3) Tadashi Yoshida, Maho Yamashita, Matsuhiko Hayashi, “High Glucose May Not Directly Affect High Phosphate-Induced Calcification of Vascular Smooth Muscle Cells.” the 45th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2012, November 3, San Diego, USA

(4) 吉田 理、山下真帆、堀米ちひろ、林 松彦、「リン負荷による血管石灰化におけるグルコース濃度の影響」第 57 回日本透析医学会学術集会・総会、2012 年 6 月 22 日、札幌市

(5) 林 松彦、高松一郎、堀米ちひろ、吉田 理、「リポポリサッカライドは血管平滑筋細胞石灰化を促進する」第 55 回日本腎臓学会学術総会、2012 年 6 月 2 日、横浜市

(6) Tadashi Yoshida, Maho Yamashita, Matsuhiko Hayashi, “Kruppel-Like Factor 4 Mediates High Phosphate-Induced Conversion of Vascular Smooth Muscle Cells into Osteoblast-Like Cells.” the 44th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2011, November 11, Philadelphia, USA

(7) “Lipopolysaccharide and TNF- α Aggravate Calcification in Vascular Smooth Muscle Cells by High Inorganic Phosphate and High Calcium Concentration Media.” Matsuhiko Hayashi, Ichiro Takamatsu, Chihiro Horimai, Tadashi Yoshida, Toshifumi Wakamatsu, the 44th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2011, November 11, Philadelphia, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 松彦 (Hayashi Matsuhiko)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：60129608

(2) 研究分担者

吉田 理 (Yoshida Tadashi)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：00306713

(3) 連携研究者

なし