

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390194

研究課題名(和文)慢性腎臓病における骨・血管関連の分子メカニズムの解明と心血管リスク予測への応用

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of the association between t2DM and Tskotudo

研究代表者

倉林 正彦(Kurabayashi, Masahiko)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00215047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：FGF23は骨細胞が産生するリン利尿ホルモンである。腎臓でのFGF23/Klotho系の機能低下は、高リン血症、高カルシウム血症、高1,25(OH)2D血症、高FGF23血症が起こし、血管石灰化につながる。私たちは、FGF23の血管平滑筋細胞への直接作用を解析した。培養ヒト大動脈血管平滑筋細胞にリコンビナントFGF23を添加することによって骨芽細胞の分化マーカーの発現が抑制されて、逆に骨分化抑制作用をもつオステオプロテジェリン(OPG)の発現が増加した。FGF23は転写レベルでOPGの発現を誘導した。この効果はKlothoに依存することも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Both clinical and basic research demonstrated conflicting evidence regarding the pathophysiological role of Fibroblast growth factor 23 (FGF23) concentration in vascular calcification. We determine the effects of FGF23 on the osteoblastic gene expression in vascular smooth muscle cells (VSMC). HASMC transduced with adenovirus expressing human FGF23 (Ad-FGF23) exhibited a significant decrease in the expression of the osteoblast-marker genes. Of note, Ad-FGF23 increased mRNA and protein levels for osteoprotegerin (OPG), and human OPG promoter was activated by FGF23. FGF23 up-regulated OPG expression, whereas depletion of Klotho by siRNA attenuated FGF23-induced OPG expression. These results indicate that FGF23 suppresses osteoblastic gene expression and induces OPG expression in HASMC, and support the hypothesis that FGF23 counteracts the osteogenic conversion of vascular SMC as a component of compensatory mechanisms to mitigate the vascular calcification.

研究分野：循環器内科学

キーワード：血管石灰化 血管平滑筋細胞 リン Klotho オステオプロテジェリン

1. 研究開始当初の背景

(1)CKD と心血管疾患

慢性腎疾患 (CKD) 患者において心血管疾患 (CVD) の合併は非常に重要である。CKD 患者では冠動脈疾患や心不全の合併頻度は対照集団の 2 - 3 倍であり、動脈硬化の危険因子である高脂血症、高血圧の合併頻度も対照に比し、明らかに高い。糸球体濾過率 (GFR) が 60 ml/min/1.73m² 未満では、癌死亡を除けばほとんどは心血管疾患による死亡である。特に、透析患者における心血管疾患のリスクは、健康人の 20 倍以上であり、40~50% の患者は心血管死である。また、非透析患者では、有効であることが実証されている多くの治療が、透析患者では有効ではないこともあり、透析患者に特異的な病態が、予後に大きな影響を与えていると考えられる。したがって、CKD とりわけ透析患者の血管病態解明は喫緊の課題である。

(2)リンと血管病変

血管石灰化は、多くの因子によって促進あるいは抑制される。これらの中で、リンが最も重要であろう。無機リンが血管平滑筋細胞の石灰化を引き起こすメカニズムについて多くの知見が得られている。培養ヒト血管平滑筋細胞を高リン濃度 (>2.4mM) で培養すると細胞を取り囲む細胞外マトリックス中にヒドロキシアパタイトの蓄積がおこる。無機リンは、Na 依存性リン共輸送体 (Pit-1) を介して、血管平滑筋細胞が形質変換をおこし、血管平滑筋細胞特異的遺伝子の発現抑制、骨芽細胞特異的遺伝子 (オステオポンチン、オステオカルシン、Runx2) の発現亢進がおこり、

骨芽細胞へと変換する。早期の CKD では血清リンの濃度上昇は直接的および間接的に FGF23 の増加や PHT の増加を惹起し、血中リンの濃度の上昇は抑制されている。さらに腎機能が低下し続けると、尿中リンの排泄低下が起こり、高リン血症がおこる。

それでは、高リン血症はどのように血管平滑筋細胞に影響を与えるのだろうか。リンが細胞内に入るメカニズムとして NaPi 共輸送体が重要であり、1 型の NaPi 共輸送体は肝臓、腎臓、脳に豊富に存在し、2 型は腎臓、小腸、肺に豊富である。一方、3 型は、Pit-1, Pit-3 とも言われ、ほとんどの組織に発現しており、血管平滑筋細胞における主なものである。small hairpin RNA を用いて Pit-1 発現を低下させることによって、リンによる石灰化や骨芽細胞・軟骨細胞への分化が抑制される。また、リンによって DNA メチル化、活性酸素種 (ROS)、細胞外のマトリックス小胞 (matrix vesicle) の分泌、アポトーシス、細胞外マトリックスの分解 (MMP9 の活性化とそれによるエラスチンの分解) も重要である。リンによる ROS の産生亢進を仲介する受容体は明らかでない。

(3)Fibroblast growth factor-23 (FGF23) と血管石灰化

FGF23 は骨細胞が産生するリン利尿ホルモンである。保存期 CKD 患者や透析患者における血管石灰化のメカニズムの一つとして、腎臓での FGF23/Klotho 系の機能低下が重要である。腎臓での Klotho の発現低下に伴って腎尿細管細胞は FGF23 に抵抗性となり、尿中へのリン排泄が低下し、高リン血症を起こし、

血管石灰化につながる。しかし、FGF23/Klotho系が直接に血管石灰化に関与するかについて不明である。Limらは、健常人の血管平滑筋は、Klotho 蛋白を発現しているが、CKD 患者の血管中膜では Klotho の発現は低下していること、ヒト大動脈由来の培養血管平滑筋細胞にて、高リン濃度、高カルシウム濃度、高TNF α 濃度の培養条件で Klotho の発現が減少し、逆に Runx2 の発現が増加すること、siRNA で Klotho の発現を低下させると石灰化が促進すること、また、CKD 患者の血管の器官培養で、1,25(OH) $_2$ D $_3$ を添加すると Klotho の発現が増加することを示した。これに対して、Jimboらは、免疫染色で CKD ラット大動脈で腎不全モデルでも Klotho 発現は減少しないこと、Klotho を過剰発現させたラット血管平滑筋細胞に FGF23 を添加すると、培養液のリン濃度が高い場合、ERK1/2 のリン酸化が惹起され、細胞内にカルシウム沈着がおこると報告し、FGF23 は Klotho 存在下で、血管石灰化を促進すると主張している。さらに、FGF23 は血管石灰化には影響を与えないとの報告もある。Sciallaらは、CRIC 研究に登録患者のうちで登録時から 376 日以内に CT にて冠動脈石灰化スコアおよび胸部大動脈石灰化スコアを測定した 1501 人において、血清 FGF23 濃度、リン濃度がこれらの血管石灰化と関連があるかを検討した。その結果、血清リンは冠動脈石灰化スコアとは関連が認められたが、FGF23 値とは関連が認められなかった。また、培養ヒト、マウス血管平滑筋細胞で FGF23 と klotho の発現は RT-PCR にて確認できなかった。さらに、可溶性 Klotho 存在下で FGF23 を

添加してもマウス大動脈リング標本のリンによる石灰化や培養血管平滑筋細胞での Na 依存性リン輸送に変化はみられなかった。

このように FGF23 は CKD の血管病態にどのような影響を与えるのかについては議論がある。

2 . 研究の目的

本研究では、血管平滑筋細胞にて骨由来ホルモン FGF23 が直接的に骨芽細胞分化に関わる遺伝子群を調節するか否かを明らかにし、FGF23/Klotho axis の病態生理的役割を明らかにする。

3 . 研究の方法

(1) 培養ヒト大動脈由来血管平滑筋細胞 (HSMC) が FGF23 のシグナル伝達に必須な受容体 (FGF 受容体および Klotho) を発現するか否かを明らかにする。

(2) FGF23 が、腎尿細管細胞にて報告されている Egr1 の発現誘導を、血管平滑筋細胞に惹起するか否かについて HASMC を用いて検証する。

(3) リコンビナント FGF23 を添加することによって、Runx2, Msx2, BMP2, アルカリホスファターゼ (ALP)、オステオポンチン (OPN) およびオステオプロテジェリン (OPG) の遺伝子発現が変化するかを quantitative RT-PCR (qPCR) および ELISA (enzyme-linked immunosolvent assay) にて明らかにする。

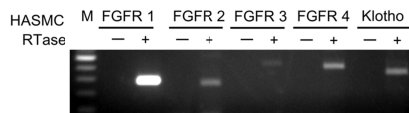
(4) OPG と冠動脈石灰化スコア、および OPG と FGF23 の濃度が関連するか否かをヒト血清にて検討する。

4. 研究の成果

(1) HASMC における FGF23 受容体の発現

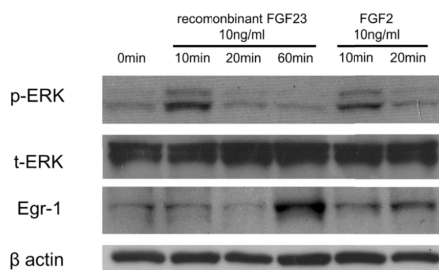
qPCR にて FGFR1-4 および Klotho が発現することが示された。

図 1



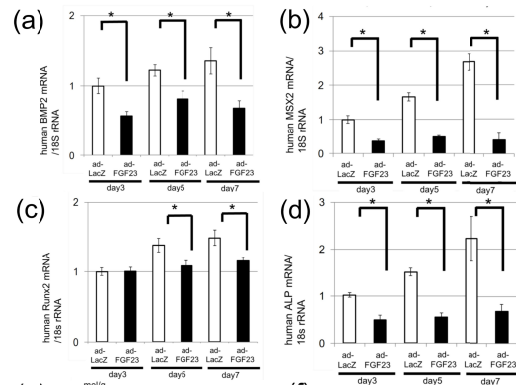
(2) HASMC における FGF23 誘導性 Egr-1 の発現

FGF23 は HASMC にて Egr-1 の発現を誘導し、そのメカニズムとして ERK のリン酸化が関与していると考えられる。



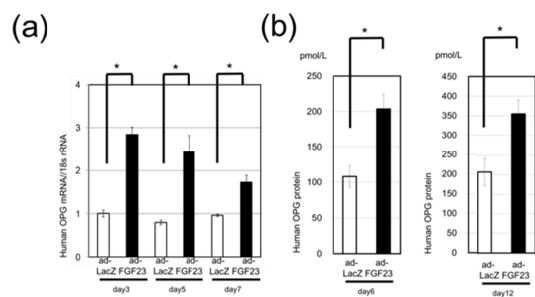
(3) FGF23 発現アデノウイルスによる骨芽細胞遺伝子の発現変化

HASMC に FGF23 を発現するアデノウイルスを感染させ、一定時間後に各遺伝子の発現を qPCR にて検討した結果、FGF23 は BMP2, Msx2, Runx2, ALP の mRNA レベルを抑制することが明らかになった。



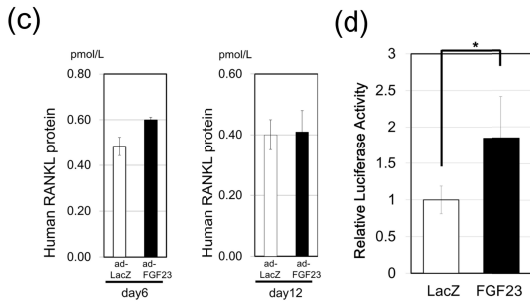
(4) FGF23 発現アデノウイルスによる OPG 蛋白の発現変化

ELISA 法にて、OPG の蛋白発現の増加が認められた(b)。OPG は破骨細胞分化を抑制し、血管石灰化を抑制する機能をもつ蛋白である。



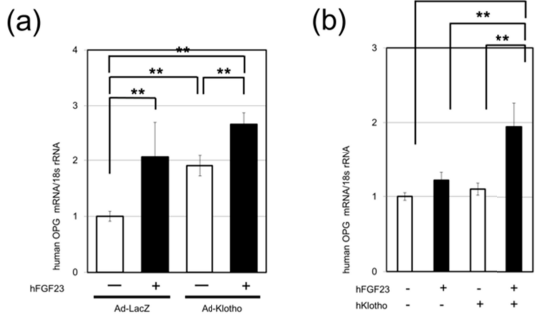
(5) FGF23 発現アデノウイルスによる RANKL 遺伝子の発現変化と OPG プロモーター活性化

RANKL の発現には影響を及ぼさなかった(c)。また、ヒト OPG プロモーターの活性化をルシフェラーゼアッセイ法で解析した結果、FGF23 は OPG 遺伝子の転写活性を増加させることが判明した(d)。



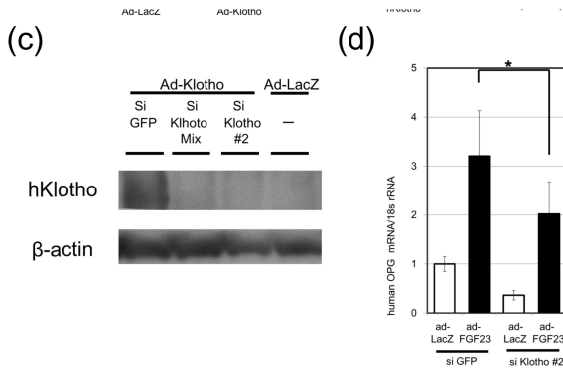
(6) FGF23 による OPG 発現誘導

FGF23 添加は OPG mRNA 発現を増加させた。Klotho 蛋白との共発現によって FGF23 による OPG 発現増加作用は増強した (a, b)。



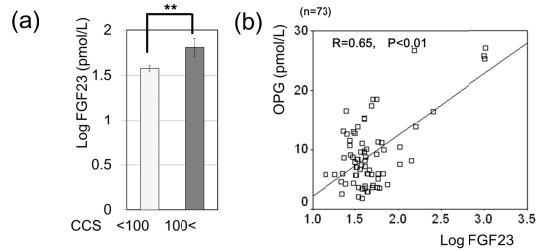
(7) Klotho 枯渇による FGF23 の効果の減弱

siRNA を用いて HASMC における Klotho 発現を枯渇させた (c)。この細胞では FGF23 誘導性 OPG の発現は減少した (d)。



(8) 血清 FGF23 レベルと冠動脈石灰化スコア

同意の得られた糖尿病患者で冠動脈 CT を行った。その結果、冠動脈カルシウムスコア (CCS) が 100 以上の群は、100 未満の群と比較して有意に FGF23 濃度が高値であった (a)。また、これらの患者で血清 FGF23 と OPG 濃度との間に有意な相関が認められた (b)。



引用文献

- 1 Lim K, Lu TS, Molostvov G, *et al.* Vascular Klotho deficiency potentiates the development of human artery calcification and mediates resistance to fibroblast growth factor 23. *Circulation* 2012; **125**: 2243-2255.
- 2 Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, *et al.* osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes & development* 1998; **12**: 1260-1268.
- 3 Bennett BJ, Scatena M, Kirk EA, *et al.* Osteoprotegerin inactivation accelerates advanced atherosclerotic lesion progression and calcification in older ApoE^{-/-} mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2006; **26**: 2117-2124.

5. 主な発表論文

【雑誌論文】(計1件)

1 Kageyama A, Matsui H, Ohta M, Sambuichi K, Kawano H, Notsu T, Imada K, Yokoyama T, Kurabayashi M.

Palmitic acid induces osteoblastic differentiation in vascular smooth muscle cells through ACSL3 and NF- κ B, novel targets of eicosapentaenoic acid.

PLoS One. 査読有、2013;8(6):e68197. doi: 10.1371/journal.pone.0068197.

【学会発表】(計2件)

Nakahara T, Kowase K, Matsui H, Iso T, Utsugi O, Tomono S, Ogawa A, Kurabayashi M. Evidence for a protective role of FGF23 against vascular calcification. 第78回日本循環器学会学術集会 2014.3.11. (東京)

Murata M, Aihara K, Adachi H, Uehara D, Ishibashi Y, Kikuchi S, Musuda K, Sano H, Matsuo Y, Funada R, Koitabashi N, Yokoyama T, Kurabayashi M. Difference in serum FGF23 levels between the patients with stable angina pectoris and acute coronary syndrome. 第78回日本循環器学会学術集会 2014.3.11. (東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉林 正彦(KURABAYASHI, MASAHIKO)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00215047

(2) 研究分担者

磯 達也 (ISO, TATSUYA)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：10400756