

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591239

研究課題名(和文)リン負荷による血管石灰化におけるヒストンメチル化修飾異常の役割解明

研究課題名(英文)Role of KLF4 on phosphate-induced vascular calcification and cardiovascular diseases

研究代表者

吉田 理 (Yoshida, Tadashi)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：00306713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病、高血圧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ている。末期腎不全患者に頻発する合併症として血管石灰化があるが、その発症メカニズムは十分に明らかになっていない。今回我々は、メカニズムの解明のための研究を行った。高リン刺激による血管石灰化には、転写因子KLF4が関与することを見出した。また、この転写因子KLF4はNF- $\kappa$ Bと相互作用すること、血管石灰化だけでなく内膜が狭窄するタイプの動脈硬化や心肥大の発症にも関わることを発見し、報告した。

研究成果の概要(英文)：Vascular calcification is frequently seen in patients with end-stage kidney disease. Clarification of the mechanisms for vascular calcification is of significant importance, because it is closely related to the mortality in these patients. We studied the molecular mechanisms of vascular calcification in renal disease. We found that KLF4, a transcription factor, contributed to high phosphate-induced phenotypic switching of vascular smooth muscle cells into osteogenic cells, thereby affecting vascular calcification. We also found that KLF4 interacted with NF- $\kappa$ B, a critical factor for inflammation, and that KLF4 was involved in the formation of atherosclerosis and cardiac hypertrophy.

研究分野：心腎血管疾患

キーワード：血管石灰化 動脈硬化 慢性腎臓病 心肥大

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病、高血圧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ている。2009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29万人を超えている。とくに長期慢性透析患者が増加しており、最近問題として顕在化してきたのが合併症としての動脈硬化症である。動脈硬化病変の進展のために心筋梗塞や閉塞性動脈硬化症を併発する患者は数多く、腎不全患者の生命予後に強く影響している。動脈硬化性病変の研究はこれまで、動脈の中膜に存在する平滑筋が内膜に遊走し増殖するタイプの内膜肥厚型動脈硬化巣に関する研究が多かったが、慢性腎不全病態のそれは異なっており、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。近年の研究では、石灰化のメカニズムとして血管平滑筋細胞が骨様細胞となり石灰化を進行させることが明らかとなってきた。つまり、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 SMa-actin や SM22a といった平滑筋分化マーカーの発現を低下させ、代わりに osteopontin や alkaline phosphatase などといった骨分化マーカーを新たに獲得することで骨様細胞となり、血管石灰化病変を形成・進行させるのである。これらの知見は、平滑筋細胞から骨様細胞への形質変換を抑制することが、動脈硬化性病変の形成を制御することにつながる可能性を示唆している。しかし、その分子メカニズムの解明は未だ不十分である。

### 2. 研究の目的

本研究では平滑筋細胞から骨様細胞への形質変換の分子メカニズムを解明することを目的とした。将来的に、腎不全における動脈の石灰化予防に寄与する治療薬の開発への分子基盤となることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 高リン刺激が平滑筋細胞を骨様細胞に形質変換する際に転写因子 KLF4 が関与するかを検討した。培養血管平滑筋細胞を高リン培地で培養した際の、KLF4 の発現変化について検討した。また、KLF4 の発現を抑制した際、高リン刺激に対する血管平滑筋細胞の石灰化がどのように変化するかを検討した。また、腎不全モデルラットの石灰化した血管における KLF4 の発現を検討した。

(2) 高リン刺激による平滑筋細胞の骨様細胞への形質変換にブドウ糖濃度が関与するかどうか培養平滑筋細胞において検討した。さらに、腎不全モデルラットに糖尿病を併発させた際の石灰化の程度の変化を観察した。

(3) 転写因子 KLF4 と炎症反応に重要な NF- $\kappa$ B との関係について頸動脈傷害モデルを用いて検討した。KLF4 が血管石灰化に関与するこ

とを示唆する知見が得られたために、KLF4 と炎症機転に重要な NF- $\kappa$ B との関係を検討した。頸動脈傷害モデルにおける両者の役割や、平滑筋分化マーカーの発現を協調して制御するメカニズムについて分子レベルで検討した。

(4) 転写因子 KLF4 が心血管病の発症・進展に果たす役割を検討した。様々な心血管病の病態における KLF4 の役割を細胞レベルでの解明するため、心筋特異的 KLF4 ノックアウトマウスを用いて、心肥大における KLF4 の役割を検討した。また、血管内皮細胞特異的 KLF4 ノックアウトマウスを用いて、内膜肥厚型動脈硬化に対する KLF4 の役割を検討した。

### 4. 研究成果

(1) 高リン刺激が平滑筋細胞を骨様細胞に形質変換する際に転写因子 KLF4 が関与することを証明した。高リン刺激で、培養血管平滑筋細胞における KLF4 発現が増加すること、また、KLF4 の抑制により高リン刺激による培養血管平滑筋細胞の形質変換および石灰化が減弱することを示した。また、腎不全モデルラットの石灰化した血管には、KLF4 の発現が亢進していることを示した。本研究により血管石灰化のメカニズムに新たな因子が関与することを報告できた。

(2) 糖尿病でも血管石灰化が認められることからブドウ糖濃度とリン濃度の相互関係が、血管石灰化にどのように影響を与えるか検討した。高リン刺激による血管石灰化はブドウ糖濃度に影響を受けないことが培養血管平滑筋細胞およびモデル動物を用いた検討から判明した。

(3) KLF4 が血管病変の形成・進行に影響する分子メカニズムを解明するにあたり、炎症機転に重要な分子である NF- $\kappa$ B との関連について検討した。モデルとして、頸動脈傷害モデルを用いたところ、KLF4 は動脈硬化の形成に抑制的に、NF- $\kappa$ B は動脈硬化の形成に促進的に働くことが示された。とくに分子レベルでは、両者が結合し、相互作用することが判明した。

(4) KLF4 が心血管病でいかなる作用を持つか検討した。心臓特異的 KLF4 ノックアウトを用いた検討では、KLF4 欠損マウスでは交感神経刺激に過剰に反応し、心肥大が亢進することが示された。KLF4 は、ヒストン脱アセチル酵素阻害薬のターゲット分子となることが示された。一方、血管内皮細胞にも KLF4 が発現することが示された。血管内皮細胞特異的 KLF4 ノックアウトマウスを用いた検討では、血管内皮の KLF4 も動脈硬化病変の形成に保護的に働き、とくに NF- $\kappa$ B の働きを阻害することが示された。このように転写因子

KLF4 が心血管病の形成・進展の分子機構に重要な役割を果たすことが証明された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

Homma Koichiro, Yoshida Tadashi, Yamashita Maho, Hayashida Kei, Hayashi Matsuhiko, Hori Shingo, Inhalation of hydrogen gas is beneficial for preventing contrast-induced acute kidney injury in rats、Nephron Experimental Nephrology、査読有、128 巻、2014、116-122

DOI: 10.1159/000369068

Yoshida Tadashi, Yamashita Maho, Horimai Chihiro, Hayashi Matsuhiko, Kruppel-like factor 4 protein regulates isoproterenol-induced cardiac hypertrophy by modulating myocardin expression and activity、Journal of Biological Chemistry、査読有、289 巻、2014、26107-26118

DOI: 10.1074/jbc.M114.582809

Yoshida Tadashi, Yamashita Maho, Hayashi Matsuhiko, Protective effects of Kruppel-like factor 4 against cardiovascular disease、Annals of Vascular Medicine & Research、査読有、1 巻、2014、1002

URL:

<http://www.jscimedcentral.com/VascularMedicine/vol1issue1.php>

Yoshida Tadashi, Hayashi Matsuhiko, Role of Kruppel-like factor 4 and its binding proteins in vascular disease、Journal of Atherosclerosis and Thrombosis、査読有、21 巻、2014、402-413

URL:

[https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jat/21/5/\\_contents](https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jat/21/5/_contents)

Yoshida Tadashi, Yamashita Maho, Horimai Chihiro, Hayashi Matsuhiko, Deletion of Kruppel-like factor 4 in endothelial and hematopoietic cells enhances neointimal formation following vascular injury、Journal of the American Heart Association、査読有、3 巻、2014、e000622

DOI: 10.1161/JAHA.113.000622

Yoshida Tadashi, Yamashita Maho, Horimai Chihiro, Hayashi Matsuhiko, Smooth muscle-selective inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B attenuates smooth muscle phenotypic switching and neointima formation following vascular

injury、Journal of the American Heart Association、査読有、2 巻、2013、e000230  
DOI: 10.1161/JAHA.113.000230

Yoshida Tadashi, Yamashita Maho, Horimai Chihiro, Hayashi Matsuhiko, High glucose concentration does not modulate the formation of arterial medial calcification in experimental uremic rats、Journal of Vascular Research、査読有、50 巻、2013、512-520  
DOI: 10.1159/000355263

Yoshida Tadashi, Yamashita Maho, Hayashi Matsuhiko, Kruppel-like factor 4 contributes to high phosphate-induced phenotypic switching of vascular smooth muscle cells into osteogenic cells、Journal of Biological Chemistry、査読有、287 巻、2012、25706-25714

DOI: 10.1074/jbc.M112.361360

[学会発表](計 12 件)

吉田 理 他、転写因子 KLF4 は心房性ナトリウム利尿ペプチドの発現および心肥大を抑制する、2014 年 11 月 22 日、第 18 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、横浜市開港記念会館、神奈川県横浜市

吉田 理 他、血管内皮細胞における転写因子 KLF4 の腎臓虚血再灌流障害に対する役割、第 57 回日本腎臓学会学術総会、2014 年 7 月 4 日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

Tadashi Yoshida 他、Kruppel-like factor 4 regulates atrial natriuretic factor expression and isoproterenol-induced cardiac hypertrophy、16th International Congress of Endocrinology / 96th Annual Meeting of The Endocrine Society Joint Meeting、2014 年 6 月 23 日、シカゴ、アメリカ

Tadashi Yoshida 他、Kruppel-like factor 4 in endothelial cells protects mice from renal ischemia-reperfusion injury、46th Annual Meeting of the American Society of Nephrology、2013 年 11 月 9 日、アトランタ、アメリカ

吉田 理 他、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総会、2013 年 6 月 23 日、福岡国際会議場、福岡県福岡市

Tadashi Yoshida 他、High glucose does not modulate the formation of vascular calcification in experimental uremic

rats、50th European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association Congress、2013年5月20日、イスタンブール、トルコ

吉田 理 他、腎・血管病態形成におけるヒストン蛋白修飾の変化、第56回日本腎臓学会学術総会、2013年5月12日、東京国際フォーラム、東京都千代田区

Tadashi Yoshida 他、High glucose may not directly affect high phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells、45th Annual Meeting of the American Society of Nephrology、2012年11月1日、サンディエゴ、アメリカ

Tadashi Yoshida、Role of Klf4 in cardiovascular development and disease. FASEB Summer Research Conference、2012年8月8日、スノーマス、アメリカ

吉田 理 他、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総会、2012年6月22日、ロイトン札幌、北海道札幌市

吉田 理 他、リン負荷による血管石灰化におけるKlf4の役割、第55回日本腎臓学会学術総会、2012年6月3日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

Tadashi Yoshida 他、Krüppel-like factor 4 contributes to high phosphate-induced phenotypic switching of vascular smooth muscle cells into osteogenic cells. 49th European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association Congress、2012年5月25日、パリ、フランス

〔図書〕(計0件)

〔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

<http://www.dialysis.med.keio.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 理 (YOSHIDA, Tadashi)

慶應義塾大学・医学部・専任講師

研究者番号：00306713

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

林 松彦 (HAYASHI, Matsuhiko)

山下 真帆 (YAMASHITA, Maho)

堀米 ちひろ (HORIMAI, Chihiro)