

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591241

研究課題名(和文)慢性腎臓病の血管合併症における細胞接着斑蛋白HIC-5の機能解析

研究課題名(英文) Roles of hydrogen peroxide-inducible clone-5 on vascular disease in chronic kidney disease

研究代表者

本田 浩一 (Hirokazu, Honda)

昭和大学・医学部・准教授

研究者番号：70297000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病(CKD)患者は高率に心血管病を合併する。本研究課題では腎不全環境において血管病変の発症・進展過程における細胞接着斑蛋白質hydrogen peroxide-inducible clone-5(Hic-5)の役割について検討した。

CKD患者剖検標本の動脈壁の検討では、腎機能正常患者に比べHIC-5の発現が血管平滑筋細胞および血管内膜病変内で亢進していた。培養実験では血管平滑筋細胞の石灰化、細胞変性過程でHIC-5の発現が亢進し、また、血管内皮細胞への単球の接着に関与した。マウス動脈硬化モデルでの検討では、HIC-5が動脈硬化病変形成に関与することが確認された。

研究成果の概要(英文)：Chronic kidney disease (CKD) is a risk factor for cardiovascular disease. Purpose of the study was to assess roles of hydrogen peroxide-inducible clone-5 (HIC-5) on vascular disease in CKD.

Expressions of HIC -5 were increased at vascular smooth muscles cells (VSMC) and on endothelial lesions of carotid arteries at autopsy samples from patients with CKD. HIC-5 was over expressed in process of VSMC calcification in cell culture with phosphate overload and was associated with interaction between macrophages and vascular endothelial cells in vitro model. Moreover, HIC-5 was associated with development and progression of atherosclerotic lesions of animal model.

研究分野：腎臓病学

キーワード：細胞接着斑蛋白質 血管石灰化 動脈硬化 慢性腎臓病

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (CKD) は心血管病変発症・進展の重要な危険因子であり、CKD 患者の予後は心血管病の合併と密接に関連する。CKD 患者の動脈硬化性病変の特徴は、古典的動脈硬化進展因子とカルシウム・リン代謝や血管石灰化調節因子の異常、酸化ストレス・慢性炎症などの新規動脈硬化促進因子とが複雑に関連する。

CKD、特に透析期患者で特徴的な血管病変に中膜石灰化病変がある。その要因にはカルシウム・リン代謝異常と血管平滑筋細胞の質的変性が関係することが明らかにされている。炎症や酸化ストレス環境でのリン負荷は血管平滑筋細胞の骨芽細胞様細胞への形質転換を誘導する。これまで血管平滑筋細胞の形質転換には老化関連遺伝子など幾つかの血管平滑筋細胞の骨芽細胞様細胞への形質転換誘導因子が報告されているが、その詳細は未だ十分には解明されていない。

進行性の内膜肥厚や石灰化プラーク形成過程において細胞成分が必要となる。主な構成細胞は浸潤マクロファージ由来の泡沫化細胞であるが、内膜過形成肥厚や石灰化プラークの形成には平滑筋細胞の存在が必須である。動脈硬化進行の過程で平滑筋細胞は、収縮能に富む高分化型から収縮蛋白発現が低い未分化型に形質が変換して中膜から内膜へ遊走し、内膜内で増殖した結果、過形成性肥厚が形成される。石灰化プラークは遊走平滑筋細胞が変性・アポトーシスし、細胞外基質に放出された膜様小包へのカルシウム沈着が一因であり、さらにプラーク内で平滑筋細胞が骨芽細胞様細胞へ形質転換し、マクロファージと協調しながら骨・軟骨様組織を形成する。CKD 患者では、過形成性肥厚とともにコラーゲン線維が減少して石灰化に富んだ、不安定かつ脆弱性な石灰化プラークが形成される。これまでの CKD と血管石灰化病変に関する研究は、平滑筋細胞と中膜石灰化病変に関する事項が大部分である。一方、内膜病変進行あるいは異常石灰化プラーク形成のメカニズムにおける平滑筋細胞の挙動や役割に踏み込んだ研究は十分に行われていない。

Hydrogen peroxide-inducible clone-5 (Hic-5) はインテグリン直下に存在する細胞接着斑蛋白質であり、過酸化水素などの酸化ストレス環境で発現が亢進する。これまでの報告では、Hic-5 は平滑筋細胞の運動性を制御し、遊走に関係することや RCT-1 細胞の骨芽細胞への分化に関与すること、myoblast や系球体硬化でのメサンジウム細胞のアポトーシス誘導に関与すること、さらにはインテグリンからのシグナルを受けながら細胞の運動性を制御するが、酸化ストレス下では細胞質から核へ移行し、

細胞老化関連遺伝子、ECM 遺伝子などの発現に関与することなどが明らかにされている。

CKD 患者は酸化ストレスが亢進し、酸化ストレスの亢進が内膜肥厚・プラーク形成、中膜石灰化病変の重要な促進因子となる。以上のことを統合すると、酸化ストレスが亢進した CKD 患者では Hic-5 の発現が亢進し、平滑筋細胞の遊走能やアポトーシス、さらには骨芽細胞様細胞へ形質転換に関与して過形成性内膜肥厚・石灰化プラーク病変、中膜石灰化病変を発症・進行させる一連のメカニズムが考えられる。

2. 研究の目的

今回の研究課題では、CKD が酸化ストレス環境にあり Hic-5 の発現が亢進しやすいことに着目し、CKD で出現しやすい過形成性内膜肥厚や石灰化プラーク病変、血管中核石灰化病変の発症・進展過程における Hic-5 の役割について検討する。

Hic-5 と平滑筋細胞の遊走・アポトーシス・骨芽細胞様細胞へ形質転換の関係や Hic-5 と動脈硬化病変の発生過程での血管内皮細胞との関係を明らかにすることは、CKD 患者に高率に血管合併症の解明に直結し、新規治療戦略につながる事項と考える。

3. 研究の方法

本研究課題では以下の項目を検討した。

1) ヒト血管病変と Hic-5

維持透析患者剖検病理標本より採取した頸動脈および大動脈血管壁を用い、動脈硬化病変や血管中膜石灰化病変上の血管平滑筋細胞 (および骨芽細胞様細胞) や血管内皮細胞にける Hic-5 の局在を検討

2) 血管平滑筋細胞および血管内皮細胞と Hic-5

血管平滑筋細胞の石灰化や骨芽細胞様細胞への形質転換と Hic-5 との関係を、リン負荷およびリン負荷 Hic-5 ノックダウン環境で検討

動脈硬化病変形成過程での血管内皮細胞を用いた Hic-5 の役割についての検討

3) 動脈硬化モデルでの Hic-5 の検討

Hic-5 欠損動脈硬化マウスにおける動脈硬化性病変形成過程での Hic-5 の役割および Hic-5 と血管内皮細胞、血管平滑筋細胞との関係について検討した。

4. 研究成果

1) ヒト血管病変と Hic-5

糖尿病患者、CKD 患者（含む透析患者）、腎機能正常患者から剖検組織標本を採取し、頸動脈および大動脈組織における Hic-5 の局在を検討した。

CKD、特に透析患者では血管中膜の平滑筋細胞数が減じていたが、抗 Hic-5 抗体を用いた免疫組織化学法で各血管組織を染色したところ、Hic-5 が血管平滑筋細胞の壁面に偏在する形で染色された。その染色性は腎機能正常患者組織と比べて有意であり、保存期と透析期 CKD とともに染色性が亢進していた。特に透析患者では中膜石灰化病変を認める症例で血管平滑筋細胞内の Hic-5 発現が亢進していた。以上の結果から Hic-5 は CKD 患者血管(内膜)中膜での血管平滑筋細胞で有意に発現し、血管中膜石灰化に関係する可能性が考えられた。

CKD 患者での血管内皮細胞内 Hic-5 の発現に関する検討では、血管内膜病変が有意な症例において内膜肥厚部管腔側上の血管内皮細胞内で Hic-5 の発現が亢進していることが明らかとなった。血管内膜病変を認めない症例では EC の Hic-5 発現は明らかではなかった。

非 CKD 患者剖検組織の大動脈病変においても血管内皮細胞内での Hic-5 の局在を検討した。血管内皮細胞は正常～軽度の動脈硬化例に比べて中等度以上の動脈硬化病変を有する患者において、内膜病変返縁に局在する血管内皮細胞内で Hic-5 の発現が亢進していた。一方、粥腫内の血管内皮細胞には発現していなかった。

以上より血管動脈硬化病変の進展過程において Hic-5 の発現亢進が病巣の進行に関係する可能性が考えられた。

2) 血管平滑筋細胞および血管内皮細胞と Hic-5

血管平滑筋細胞を用いてリン負荷による石灰化と骨芽様細胞への形質転換を誘導し、Hic-5 の発現について検討した。リン負荷後 day6 から von-Kossa 染色陽性の石灰化が有意となり、RT-PCR でのメッセージ解析でオステオカルシンの発現が亢進することを確認した。オステオカルシンの発現に遅れて runt-related transcription factor の発現が亢進(day6-9)し、同時期より Hic-5 の発現も亢進した。現在、Hic-5 をノックダウンした血管平滑筋細胞においてリン負荷による石灰化や骨芽様細胞への形質転換の過程について検討を進めている。

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用い TNF および酸化 LDL で刺激すると細胞表面上に微絨毛様構造物の発現が促進されることが明らかとなった。Adenovirus で HUVEC の Hic-5 を過剰発現させると微絨毛

様構造物の発現が亢進することを確認した。一方、Hic-5 をノックダウンし、TNF や酸化 LDL するとその発現は抑制されたままであった。

ApoE^{-/-}、LDL-R^{-/-}、ApoE^{-/-}Hic-5^{-/-}、LDL-R^{-/-}Hic-5^{-/-}マウス大動脈壁組織培養で単球の接着能を検討すると、Hic-5^{-/-}マウス由来の大動脈壁との接着は有意に悪い結果であった。血管内皮細胞と単球の接着に関し検討を進めたところ、Hic-5 過剰発現により単球の接着が促進され、Hic-5 ノックダウンにより接着が抑制された。接着因子との関係を検討するために抗 intracellular adhesion molecule-1 (ICAM) 抗体、抗 vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 抗体を共培養して単球の接着能を検討したところ、接着因子の作用が減弱した環境では Hic-5 を過剰発現させても単球の接着が抑制される結果であった。このことから血管内皮への単球の接着には Hic-5 による EC 膜表面への微絨毛様構造物の発現が必要だが、その作用は接着因子に依存することが明らかとなった。

3) 動脈硬化モデルでの Hic-5 の検討

ApoE^{-/-}および ApoE^{-/-}Hic-5^{-/-}マウス、あるいは ApoE^{-/-}および LDL-R^{-/-}Hic-5^{-/-}マウスを用いて Hic-5 の動脈硬化に対する作用を検討した。各マウスを抗コレステロール食餌下で 10 日間飼育し、動脈硬化の程度を評価した。その結果、ApoE^{-/-}および ApoE^{-/-}に比べて ApoE^{-/-}Hic-5^{-/-} と LDL-R^{-/-}Hic-5^{-/-}マウスの動脈硬化病変は 60% 減少しており、Hic-5 欠損が動脈硬化病変を有意に減少させることが明らかとなった。以上より Hic-5 は、動脈硬化病変の発症・進展過程に関与することが示唆された。

以上に結果より、CKD が進行した病態や透析環境では酸化ストレスを促進するため Hic-5 の発現が亢進し易く、単球・マクロファージの接着能などを促進した結果、血管内膜病変の進展に寄与すること、また、血管中膜石灰化病変の形成に関係する可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)
Shigeko Arita-Okubo, Joo-ri Kim-Kaneyama, Xiao-Feng Lei, Wen-Guang Fu, Koji Ohnishi, Motohiro Takeya, Aya Miyauchi, Hirokazu Honda, Hiroyuki Itabe, Takuro Miyazaki, Akira Miyazaki. Role of Hic-5 in the formation of microvilli-like structures and the monocyte-endothelial interaction that

accelerates atherosclerosis. Cardiovasc
Res. 105: 361-371, 2015 (査読有り)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

本田浩一 (Hirokazu Honda)

昭和大学医学部内科学講座腎臓内科学部門・
准教授

研究者番号 : 70207000

(2)研究分担者

宮崎章 (Akira Miyazaki)

昭和大学医学部生化学教室・教授

研究者番号 : 70253721