

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：37104
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2013～2016
課題番号：25461140
研究課題名(和文)慢性腎不全の血管石灰化と内皮機能異常の共通制御の機構解明と治療標的分子の同定

研究課題名(英文)The mechanism of vascular calcification and endothelial dysfunction in chronic kidney disease

研究代表者
梶本 英美 (KAJIMOTO, HIDEMI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：50349700
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)：BMP/Smad経路の活性化が、慢性腎不全において特徴的にみられる血管内皮機能障害と血管石灰化の両者を引き起こすことを明らかにした。さらに、BMP/Smad経路と血管内皮機能障害をつなげる分子が、腫瘍抑制因子であるPTENであることを発見した。本研究により、慢性腎不全による心血管病に対し、BMP/Smad経路をターゲットにした予防・治療の可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：BMP receptor signaling has a pivotal role in endothelial dysfunction, in addition to osteogenic differentiation of VSMCs, in the early stage of CKD without vascular remodeling. An increase in PTEN protein is involved in the mechanism by which BMP receptor activation inhibits Akt-eNOS signaling in CKD. Our observations suggest that BMP receptor signaling would be a promising target for the prevention and treatment of both endothelial dysfunction and vascular calcification in the early stage of CKD patients.

研究分野：血管生物学

キーワード：慢性腎不全 血管病 血管内皮機能 血管石灰化

1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国において透析療法を受けている患者数は 26 万人を超え、世界的にも増加傾向にある (Meguid et al, Lancet 2005)。慢性腎不全 (CKD) は心血管疾患の独立した危険因子であることが示され、末期腎不全患者の約 50% は心血管疾患により死亡すると報告されている (Sarnak et al, Circulation 2003)。「心腎連関」の概念として注目されているが、その分子機序は明らかでなく、腎不全において何が心血管病変を引き起こしているのか、その病態は解明されていない。通常の動脈硬化危険因子から予想される以上に、CKD 患者では心血管疾患の罹患率が高く、血管石灰化は心血管病変を引き起こす主な原因の一つと考えられている (Raggi et al, J Am Coll Cardiol 2002)。

(2) 血管石灰化は従来考えられてきた「細胞が壊死した状態でカルシウムが沈着するという受動的な過程」だけではなく、近年は「骨が形成される能動的な過程」つまり、健常状態では抑制されていた血管平滑筋細胞の骨芽細胞様への形質転換が、石灰化過程に傾くと考えられている。骨形成蛋白質である Bone Morphogenetic Protein (BMP)ファミリーは、膜貫通型 Serine/Threonine キナーゼ受容体に結合し活性化する。アテローム硬化型石灰化病変では BMP/Smad 経路の活性化が示されたが (Derwall et al, Arterioscler Thromb Vasc Biol 2012)、腎不全にみられる特徴的な血管石灰化 (メンケベルグ型)における BMP/Smad 経路の関与は不明である。

(3) CKD 患者では軽度腎機能障害であっても、血管内皮機能低下がみられ、心血管病の initial step であると考えられている (Stam et al, J Am Soc Nephrol 2006)。血管内皮機能の制御において、最も重要な生理活性物質は Nitric Oxide (NO) であると考えられている。NO 制御メカニズムの一つとして、内皮 NO Synthase (eNOS) シグナリングが知られている。最近申請者は、CKD モデルマウスの血管では、腎不全に

より増加した血中 Asymmetric dimethylarginine (ADMA) 自身が、eNOS タンパクの Ser1177 残基におけるリン酸化を抑制することにより NOS 活性を低下させ、血管内皮機能を低下させていることを発見した (Kajimoto et al, Kidney Int 2012)。一方、ヒト冠動脈内皮細胞に ADMA を投与し、網羅的遺伝子解析を行った結果では、BMP/Smad 系遺伝子の発現亢進が報告されている (Vallance et al, PLoS Med 2005)。BMP/Smad 経路は骨形成、脈管形成、家族性肺高血圧などの領域で注目を集めてきたが、内皮機能における役割は不明である。

(4) CKD 患者において血管石灰化と内皮機能低下が同時に観察されることは、臨床面ではしばしば遭遇する。冠動脈では、CT 上石灰化が多いほど内皮機能が低下していたという報告がある (Huang et al, Chest 2005)。しかし分子メカニズムにおいて、血管石灰化と内皮機能の関連については不明のままである。血清中の BMP2 値が腎機能低下とともに増加するという報告もある (Dalfino et al, Atherosclerosis 2010)。BMP/Smad 経路が慢性腎不全にみられる特徴的な血管石灰化と内皮機能障害の両方を制御する因子であるという仮説を立てた。

2. 研究の目的

- (1) 慢性腎不全の血管石灰化と内皮機能障害における分子イベントの解明
- (2) 内皮細胞における BMP/Smad 経路の機能解析
- (3) 慢性腎不全の血管石灰化と内皮機能障害における BMP/Smad 経路の意義

3. 研究の方法

(方法 1) 腎不全マウスとして、5/6 腎臓摘出マウス (CKD) を作成する。CKD マウスでは、血圧上昇を伴わずに、血清 BUN2.5 倍、クレアチニン 2 倍程度の中等度腎機能低下がみられることを示している (Kajimoto et al, Kidney Int 2012)。以下の項目を解析する。

方法 1-1: マウス大動脈を用いて免疫組織染色により、BMP/Smad 経路と eNOS シグナリングのリン酸化を含むタンパクの発現量を解析する。

方法 1-2: 石灰化: マウス大動脈を用いて、von Kossa 染色、アルカリフォスファターゼ染色、カルシウム含有量、骨形成マーカー (骨形成、骨代謝、細胞の成長と分化、細胞外マトリックス、細胞接着、転写因子と制御因子) を PCR array (SABiosciences) を用いて網羅的に調べる。

方法 1-3: 内皮機能: CKD マウスと Sham マウスの大動脈を用いて、等尺張力実験によりアセチルコリンによる内皮依存性血管拡張反応を評価する。

方法 1-4: NO 産生能: NO の代謝物である尿中 NOx を定量し、内皮機能のデータと比較する。

(方法 2) 内皮細胞における BMP/Smad 経路の機能解析

方法 2-1: BMP 受容体の一つである ALK3 をノックアウト (KO) したマウスにおける CKD モデルを作成する。内皮機能を調べることにより、BMP/Smad 経路の関与を証明できる。

方法 2-2: 腎不全マウスを作成し、2 週間後から BMP Type I 受容体を特異的に阻害する低分子化合物である LDN-193189 を 3mg/kg 1 日 2 回腹腔投与する。2 週間後、大動脈における内皮機能の保持効果があるか解析する。評価方法は、計画 1-1~4 と同様の方法を用いる。

方法 2-3: 培養内皮細胞にリコンビナントタンパクの BMP2 を投与し、細胞内 eNOS シグナリングの発現、培養液中への NOx の放出量を評価する。BMP/Smad 経路と eNOS シグナリングのクロストークについて検討する。

計画 2-4: 培養内皮細胞を用いて、BMP2 を添加した内皮細胞から RNA を抽出する。マイクロアレイを行い、計画 1-6 において抽出された遺伝子群と比較し、BMP/Smad 経路を介した内皮機能障害の分子メカニズムを検討する。

計画 2-5: 培養内皮細胞によるバイオアッセイ
培養血管内皮細胞に、腎不全患者から採取した血清により刺激を加える。BMP/Smad-NOS 経

路について定量評価する。

(方法 3) CKD における血管石灰化と内皮機能障害を共に制御する BMP/Smad 経路の意義

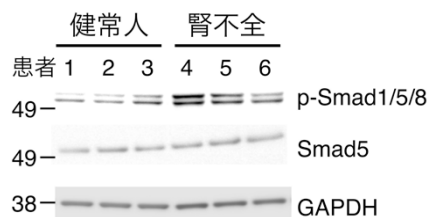
方法 3-1: ALK3 ノックアウトマウス

WT (wild type)+Sham, WT+CKD, ALK3 KO+Sham, KO+CKD マウスの 4 群における大動脈石灰化の評価を計画 1-2 にしたがって行う。BMP/Smad 経路の関与を証明できる。

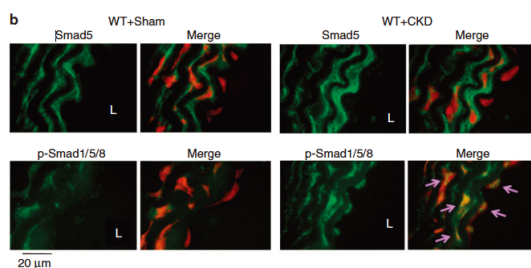
方法 3-2: 腎不全マウスにおいて LDN-193189 3mg/kg 1 日 2 回を腹腔投与する。2 週間後、大動脈における血管石灰化の予防効果があるか解析する。

4. 研究成果

(1) 腎不全患者から採取した血清を培養内皮細胞に投与したところ、BMP/Smad 経路の活性が亢進した (p-Smad1/5/8 / Smad5 ratio が増加した)。



(2) CKD マウスでは、血管内皮細胞と血管平滑筋細胞において、BMP/Smad 経路が活性化していた (p-Smad1/5/8 の発現が核内へ移行した。ピンク矢印)。

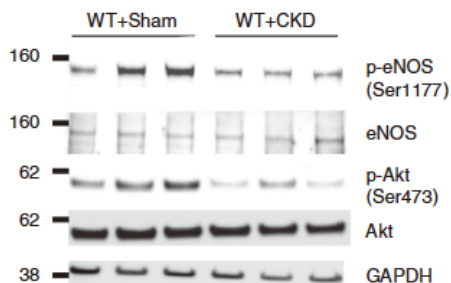


緑色=Smad5 or リン酸化 Smad1/5/8 (活性化)
赤色=核

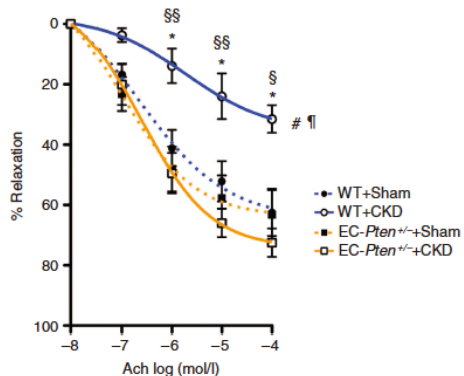
(3) 培養血管内皮細胞において、BMP2 を投与することにより BMP/Smad 経路を活性化させると、phosphatase-and-tensin homolog (PTEN) の発現を増加させることにより Akt-eNOS 経路を抑制し

た。PTEN に対する siRNA を用いて証明した。

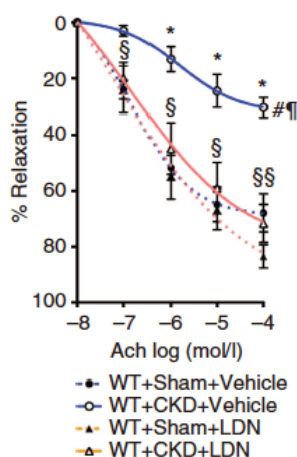
(4) CKD マウスでは、血管内皮細胞と血管平滑筋細胞において、PTEN の発現が増加し、Akt-eNOS 経路が抑制されていた。



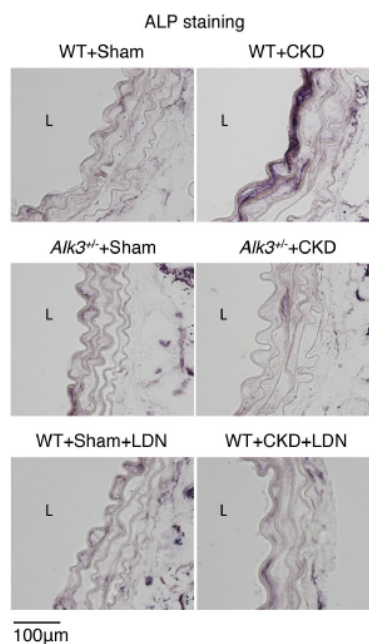
(5) CKD マウスと Sham マウスの大動脈を用いて、等尺張力実験によりアセチルコリンによる内皮依存性血管拡張反応を評価すると、Wild type の CKD マウスでは血管内皮機能が低下するが、内皮特異的 PTEN-KO マウスの大動脈では、CKD を行っても、血管内皮機能は保たれた。



(6) ALK3 KO マウスの大動脈では、CKD においても、eNOS 経路の活性化は保たれ、血管内皮機能も保たれた。さらに、wild type の CKD マウスを作成し、2 週間後から BMP Type I 受容体を特異的に阻害する低分子化合物である LDN-193189 を 3mg/kg 1 日 2 回腹腔投与したところ、血管内皮機能が保たれた。



(7) Wild type では、CKD により、大動脈における転写因子 Msx2 の増加と、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性が増加し、骨形成分化が増加した。しかし、ALK3 KO マウスでは、CKD においても ALP 活性の増加は見られなかった。さらに、wild type の CKD マウスに BMP Type I 受容体 LDN-193189 を投与したところ、ALP 活性の亢進は抑制された。



以上から、BMP/Smad 経路の活性化が、腎不全において特徴的にみられる血管内皮機能障害と血管石灰化の両者を引き起こすことを明らかにした。さらに、BMP/Smad 経路と血管内皮機能障害をつなげる分子が、腫瘍抑制因子である PTEN であることを発見した。本研究により、腎不全による心血管病に対し、BMP/Smad 経路をターゲットにした予防・治療の可能性を示すことが

できた。

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 7 件)

- (1) Chibana H, Kajimoto H, Ueno T, Yokoyama S, Sasaki K, Ohtsuka M, Koiwaya H, Nakayoshi T, Mitsutake Y, Itaya N, Sasaki M, Fukumoto Y. Interleukin-1 β is associated with coronary endothelial dysfunction in patients with mTOR inhibitor-eluting stent implantation. *Heart and Vessels*, 2017 Jan 23. (査読あり)
doi: 10.1007/s00380-017-0947-x. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28116487.
- (2) Kajimoto H, Kai H, Aoki H, Uchiwa H, Aoki Y, Yasuoka S, Anegawa T, Mishina Y, Suzuki A, Fukumoto Y, Imaizumi T. BMP type I Receptor Inhibition Attenuates Endothelial Dysfunction in Mice with Chronic Kidney Disease. *Kidney International*, 87(1):128-36, 2015. (査読あり)
doi:10.1038/ki.2014.223
- (3) Nakayoshi T, Sasaki K, Kajimoto H, Koiwaya H, Ohtsuka M, Ueno T, Chibana H, Itaya N, Sasaki M, Yokoyama S, Fukumoto Y, Imaizumi T. FOXO4-knockdown suppresses oxidative stress-induced apoptosis of early pro-angiogenic cells and augments their neovascularization capacities in ischemic limbs. *PLoS One*, 24;9(3):e92626, 2014 (査読あり) doi: 10.1371/journal.pone.0092626. eCollection 2014.
- (4) Aoki Y, Kai H, Kajimoto H, Kudo H, Takayama N, Yasuoka S, Anegawa T, Iwamoto Y, Uchiwa H, Fukuda K, Kage M, Kato S, Fukumoto Y, Imaizumi T. Large Blood Pressure Variability Aggravates Arteriosclerosis and Cortical Sclerotic Changes in the Kidney in Hypertensive Rats. *Circ. J*, 78(9):2284-2291, 2014. (査読あり) doi:10.1253/circj.CJ-14-0027

- (5) Kajimoto M, Ledee D, Xu C, Kajimoto H, Isern N, Portman M. Triiodothyronine activates lactate oxidation without impairing fatty acid oxidation and improves weaning from extracorporeal membrane oxygenation. *Circ J*, 78(12):2867-2875, 2014. (査読あり)
doi:10.1253/circj.CJ-14-0821
- (7) Yasuoka S, Kai H, Kajimoto H, Kudo H, Takayama N, Anegawa T, Koga M, Miyamoto T, Mifune H, Kage M, Hirooka Y, Imaizumi T. Blood Pressure Variability Activates Cardiac Mineralocorticoid Receptor and Induces Cardiac Remodeling in Hypertensive Rats. *Circ J*, 77(6): 1474-1481, 2013. (査読あり)
doi:10.1253/circj.CJ-12-1253
- (7) Anegawa T, Fukuda K, Kai H, Sakima H, Yasaka M, Kajimoto H, Iwamoto Y, Yasuoka S, Aoki Y, Uchiwa H, Okada Y, Imaizumi T. Modified transoral carotid ultrasonography with micro-convex probe. *Jpn J Stroke*, 35: 1-4, 2013 (査読あり)

[学会発表] (計 14 件)

- (1) Kajimoto H, Oyama K, MacLellan WR: H3k9me3 Depletion Induces Cardiomyocyte Proliferation And Extends The Heart Regeneration Window In Mice. (poster presentation, American Heart Association's Scientific Sessions 2016, New Orleans, USA, 11/2016)
- (2) Kajimoto H. 海外留学セミナー (oral presentation, 第 80 回日本循環器学会, Sendai, 3/2016) Travel Award for Women Cardiologists from Japanese Circulation Society (TAW/JCS)
- (3) Kajimoto H, Oyama K, MacLellan WR. Regulation of cell cycle genes in neonatal mouse heart regeneration. (poster presentation, International Society for Heart Research-North American Section, Seattle, USA, 6/2015)
- (4) Kajimoto H, Kai H, Imaizumi T: Increased

Phosphatase and Tensin Homolog Causes
Endothelial Dysfunction in Mice with Renal
Failure. (state of the art, oral presentation, 49th
Annual Meeting of the Japanese Society of
Pediatric Cardiology and Cardiac Surgery, Tokyo,
Japan, 7/2013)

(5) Kajimoto H, Kai H, Aoki H, Uchiwa H, Aoki
Y, Iwamoto Y, Imaizumi T: Bone Morphogenetic
Protein Receptor Activation Plays a Crucial Role
in Endothelial Dysfunction and Osteogenic
Differentiation in Mice with Chronic Kidney
Disease. (poster presentation, ESC Congress
2013, Amsterdam, The Netherlands, 9/2013)

(6) Kajimoto H, Kai H, Aoki H, Uchiwa H, Aoki
Y, Iwamoto Y, Anegawa T, Fukuda K, Imaizumi
T: BMP type I Receptor Inhibition Reduces
Endothelial Dysfunction and Vascular
Osteogenic Differentiation in Mice with Chronic
Kidney Disease. (oral presentation, American
Heart Association's Scientific Sessions 2013,
Dallas, USA, 11/2013)

6. 研究組織

(1)研究代表者

梶本 英美 (KAJIMOTO HIDEMI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号: 50349700

(2)研究分担者

岩元 美子 (YOSHIKO IWAMOTO)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号: 30597422

打和 大幹 (UCHIWA HIROKI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号: 30624506

甲斐 久史 (KAI HISASHI)

久留米大学・その他部局等・教授

研究者番号: 60281531