

慢性腎臓病における平滑筋での慢性炎症と血管石灰化

吉田 理

慶應義塾大学医学部血液浄化・透析センター

key words : 慢性腎臓病, 血管石灰化, リン, 慢性炎症, NF- κ B

要 旨

慢性腎臓病における血管石灰化は、生命予後を左右する重要な合併症である。慢性腎臓病における高リン血症は、血管平滑筋細胞を骨様の細胞に形質変換させることで石灰化を進行させることが知られているが、慢性炎症に伴う NF- κ B 経路の持続的活性化も病態に関与している可能性がある。今回、我々は、血管平滑筋細胞特異的 NF- κ B 抑制マウスとコントロールマウスのそれぞれに慢性腎臓病を誘導して、血管石灰化の状態を検討した。大動脈の石灰化を検討したところ、コントロールマウスでは慢性腎臓病、かつ高リン食給餌時に血管石灰化が認められた。一方で、血管平滑筋細胞特異的 NF- κ B 抑制マウスでは、コントロールマウスと比較して血管石灰化が減弱していた。この変化は、平滑筋分化マーカー、骨分化マーカーの発現の変化としても確認された。これらの結果は、平滑筋細胞における NF- κ B 経路の活性化が血管石灰化に重要な役割を果たすことを示している。

1 目 的

慢性腎臓病では、メンケベルグ型と呼ばれる動脈中膜の石灰化が高頻度に認められ、心血管病の発症・進展に関与することが知られている¹⁾。動脈中膜における石灰化が血管壁の硬化をもたらすことで、血流の脈波速度は上昇し、また収縮期高血圧が生じる。これらの変化は左室肥大や心筋虚血を誘導し、結果として心

血管イベントが生じる。

これまでの研究によって、慢性腎臓病に伴う高リン血症は血管石灰化に重要な役割を果たすことが判明している^{2,3)}。高リン刺激が血管平滑筋細胞を骨様の細胞に形質変換させるメカニズムによって血管石灰化が進行する。

分子レベルで見ると、平滑筋細胞では高リン刺激によって、SM α -actin, SM22 α といった平滑筋分化マーカーの発現が低下し、代わりに Runx2, osteopontin, alkaline phosphatase といった骨分化マーカーの発現が誘導される。我々もこれらの変化を培養血管平滑筋細胞、および慢性腎臓病モデルのラットで確認しており、転写因子 KLF4 がこれらの変化に関与することを報告している³⁾。さらに、慢性腎臓病患者や動物モデルを対象とした研究によって、高リン血症治療薬は血管石灰化の進行を減弱させることが示されている^{4~6)}。

これらの知見は、慢性腎臓病において、高リン血症が血管石灰化の強力な促進因子であることを示している。しかし、高リン血症は末期腎不全にきわめて近い、高度に腎機能の低下した状態でようやく認められる⁷⁾。疫学的に、慢性腎臓病の早期段階から血管石灰化病変および心血管合併症が有意に多く認められる点を考慮すると、高リン血症以外の因子も石灰化病変形成に強く関与していることが推察される。

NF- κ B は、免疫系細胞だけでなく多くの種類の細胞に分布している転写因子である。tumor necrosis factor- α や interleukin-1 β といったサイトカインの刺激に

反応して炎症のシグナルを伝達する役割を果たしている。慢性腎臓病患者では、これらのサイトカインの血清濃度が高値を示すことが知られている⁸⁾。高サイトカイン血症がNF- κ B経路の持続的活性化を誘導することで、血管に慢性炎症状態をもたらしている可能性がある。しかし、血管局所におけるそのような慢性炎症と血管石灰化との関連については、これまでのところ報告がない。

最近、我々は、細胞特異的にNF- κ B経路を抑制することが可能なマウスを作製した^{9,10)}。例えば、このマウスを利用して血管平滑筋細胞特異的NF- κ B抑制マウスを作製すると、血管傷害に対して新生内膜形成が減少するという結果が得られた⁹⁾。これは、内膜肥厚型動脈硬化に対してNF- κ Bが重要な役割を果たすということを示唆している。また、腎臓のポドサイト特異的にNF- κ B経路を抑制したマウスでは、アドリアマイシン腎症におけるアルブミン尿が有意に抑制された¹⁰⁾。これらの結果は、細胞特異的なNF- κ B抑制マウスを用いることで、細胞局所におけるNF- κ Bの疾患への関与を解析できることを示している。

今回、我々は、血管平滑筋細胞特異的NF- κ B抑制マウスに慢性腎臓病を引き起こした場合、コントロールマウスと比較して、大動脈における血管石灰化がどのように変化するかを検討することとした。通常のマウスは血管石灰化に抵抗性を示すために、マウスのバックグラウンドをC57BL/6からDBA/2に変更することで検討を行った¹¹⁾。

2 方法

血管平滑筋細胞特異的にCre recombinaseを発現するマウスとCre-LoxPシステムによりNF- κ Bを持続的に抑制可能なI κ B Δ Nを過剰発現するマウスのそれぞれを、8世代以上のバッククロスによって、遺伝的背景をC57BL/6からDBA/2に変更した。変更後にそれらを交配することで、血管平滑筋細胞特異的NF- κ B抑制マウスを作製した。同腹の陰性マウスをコントロールマウスとした。血管平滑筋細胞特異的NF- κ B抑制マウスとコントロールマウスのそれぞれに、慢性腎臓病を誘導し、そのうえで2%リン含有餌（高リン食）を給餌した。誘導から10週間後にマウスを屠殺し、血管の石灰化を検討した。

3 結果と考察

コントロールマウスにおいて慢性腎臓病を誘導しない場合、正リン食（1%リン含有餌）を投与しても、高リン食を投与しても、いずれにおいても血管石灰化は認めなかった。慢性腎臓病を引き起こした場合でも、正リン食の給餌では血管石灰化を認めなかった。しかし、慢性腎臓病を誘導して、かつ高リン食を給餌した場合、高度な血管石灰化が生じた（図1）。一方、血管平滑筋細胞特異的NF- κ B抑制マウスでは、慢性腎臓病を誘導して、かつ高リン食を給餌した場合、血管石灰化は認められたものの、石灰化の程度は有意に減弱するという結果が得られた。

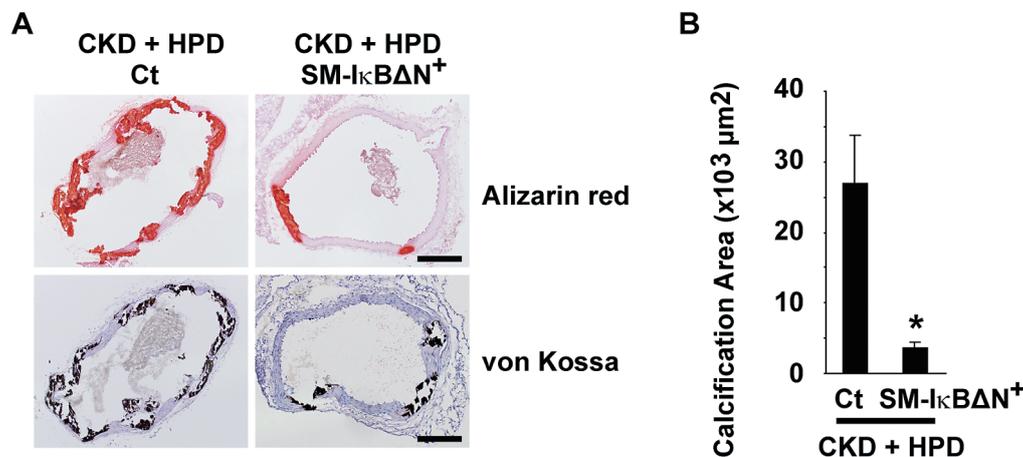


図1 高リン食を給餌した慢性腎臓病マウスにおける血管石灰化像

コントロールマウス (Ct) と血管平滑筋細胞特異的NF- κ B抑制マウス (SM-I κ B Δ N⁺) のそれぞれに、慢性腎臓病を誘導して高リン食を給餌した。A: 大動脈におけるAlizerin Red染色とvon Kossa染色を示す。Bar: 200 μ m。B: 大動脈の石灰化面積。*P<0.05, コントロールマウスと比較した。高リン食 (HPD)。

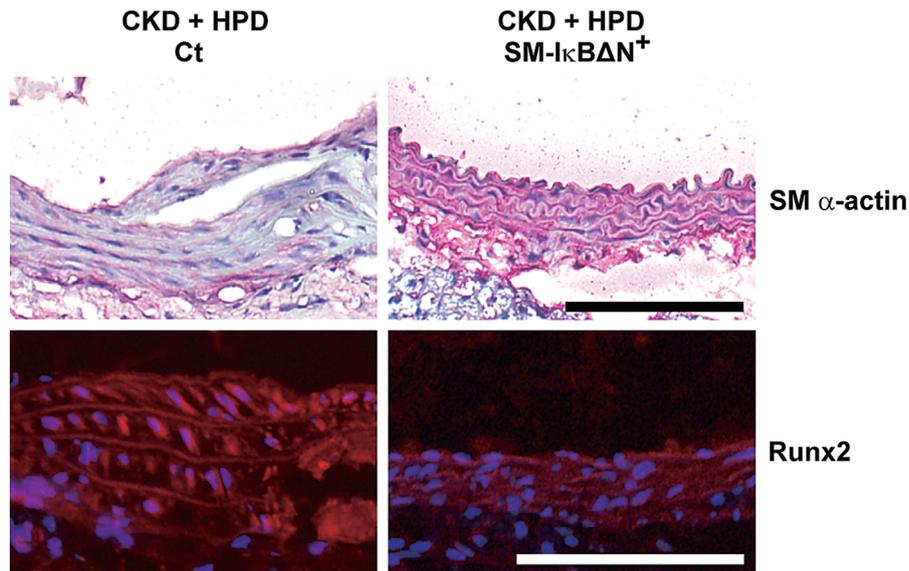


図2 高リン食を給餌した慢性腎臓病マウスにおける平滑筋分化マーカーと骨分化マーカーの発現

コントロールマウス (Ct) と血管平滑筋細胞特異的 NF- κ B 抑制マウス (SM-I κ B Δ N⁺) のそれぞれに、慢性腎臓病を誘導して高リン食を給餌した。SM α -actin の発現 (赤色) と Runx2 の発現 (赤色) を免疫染色で検討した。Bar : 100 μ m.

さらに、血管における平滑筋分化マーカーの変化、骨分化マーカーの変化を検討した。慢性腎臓病を誘導して、かつ高リン食を給餌したコントロールマウスでは、平滑筋分化マーカーである SM α -actin と SM22 α の発現が低下しており、骨分化マーカーである Runx2, osteopontin の発現が亢進していたが、慢性腎臓病を誘導して、かつ高リン食を給餌した血管平滑筋細胞特異的 NF- κ B 抑制マウスでは、これらの変化は減弱していた (図2)。

これらの結果は、高リン食が慢性腎臓病において血管石灰化を誘導する重要な因子であることを再確認する結果であるが、同時に血管平滑筋局所における NF- κ B による炎症経路も、血管石灰化に重要な役割を果たしていることを示している。平滑筋における炎症病態をコントロールすることで、慢性腎臓病における血管石灰化を制御できる可能性を示唆した。

平成28年度日本透析医会公募研究助成により得られた成果の一部は、原著論文として「Journal of the American Heart Association」に投稿したため、二重投稿となることを避け、本報告書ではその概要を総説的に記載した。なお、原著論文は平成29年11月に下記論文¹¹⁾として公表された。

文 献

- 1) Hruska KA, Mathew S, Lund R, et al. : Hyperphosphatemia of chronic kidney disease. *Kidney Int* 2008; 74 : 148-157.
- 2) Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, et al. : Arterial calcification in chronic kidney disease : key roles for calcium and phosphate. *Circ Res* 2011; 109 : 697-711.
- 3) Yoshida T, Yamashita M, Hayashi M : Krüppel-like factor 4 contributes to high phosphate-induced phenotypic switching of vascular smooth muscle cells into osteogenic cells. *J Biol Chem* 2012; 287 : 25706-25714.
- 4) Chertow GM, Burke SK, Raggi P, et al. : Sevelamer attenuates the progression of coronary and aortic calcification in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2002; 62 : 245-252.
- 5) Toussaint ND, Lau KK, Polkinghorne KR, et al. : Attenuation of aortic calcification with lanthanum carbonate versus calcium-based phosphate binders in haemodialysis : a pilot randomized controlled trial. *Nephrology* 2011; 16 : 290-298.
- 6) Katsumata K, Kusano K, Hirata M, et al. : Sevelamer hydrochloride prevents ectopic calcification and renal osteodystrophy in chronic renal failure rats. *Kidney Int* 2003; 64 : 441-450.
- 7) Kuro-o M : Klotho and the aging process. *Korean J Intern Med* 2011; 26 : 113-122.
- 8) Pereira BJ, Shapiro L, King AJ, et al. : Plasma levels of IL-1 β , TNF α and their specific inhibitors in undialyzed chronic renal failure, CAPD and hemodialysis patients. *Kidney Int* 1994; 45 : 890-896.
- 9) Yoshida T, Yamashita M, Horimai C, et al. : Smooth muscle-selective inhibition of nuclear factor- κ B attenuates smooth muscle phenotypic switching and neointima formation follow-

- ing vascular injury. *J Am Heart Assoc* 2013; 2 : e000230.
- 10) Yamashita M, Yoshida T, Suzuki S, et al. : Podocyte-specific NF- κ B inhibition ameliorates proteinuria in adriamycin-induced nephropathy in mice. *Clin Exp Nephrol* 2017; 21 : 16-26.
- 11) Yoshida T, Yamashita M, Horimai C, et al. : Smooth muscle-selective nuclear factor- κ B inhibition reduces phosphate-induced arterial medial calcification in mice with chronic kidney disease. *J Am Heart Assoc* 2017; 6 : e007248.