

血管石灰化における平滑筋細胞での エピジェネティック調節機構

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, ヒストン, エピジェネティクス

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、石灰化過程におけるエピジェネティックな変化については未だ明らかではない。本研究では、培養血管平滑筋細胞に対して高リン刺激によって石灰化を誘導した際、平滑筋分化マーカー・骨分化マーカーそれぞれのプロモーター領域において、ヒストン修飾がどのように変化するのかを検討した。血管平滑筋細胞では、高リン刺激によって平滑筋分化マーカーの発現は低下し、骨分化マーカーの発現は亢進した。その際、平滑筋分化マーカーのプロモーター領域ではヒストン H3 および H4 のアセチル化レベル、ヒストン H3K4 のメチル化レベルが上昇していた。一方で、骨分化マーカーのプロモーター領域ではそれらのヒストン修飾レベルは低下していた。これらの結果は、血管石灰化の過程に平滑筋細胞におけるヒストン修飾の変化が関わっていることを示唆している。

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が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動物で確認しており、転写因子 KLF4 がこれらの変化に関与することや、転写因子 NF- κ B の活性化が高リン血症と協調して石灰化を進展させることなどを報告している^{3,4)}。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、高リン血症治療薬が血管石灰化の進行を減弱させることが示されている^{5~7)}。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、高リン血症が血管石灰化をもたらす過程におけるエピジェネティックな変化については、ほとんど知見がない。

エピジェネティクスの分野においては、ヒストン修飾による細胞機能の変化に注目が集まっている⁸⁾。ヒストンは、クロマチンを構成する主要な蛋白質であり、ヒストン H2A, H2B, H3, H4 のそれぞれ 2 分子ずつが合計 8 量体をつくり、DNA を巻きつけることでヌクレオソームを形成している。翻訳後修飾を受け

ることで遺伝子の発現調節に寄与する特徴があり、リン酸化、アセチル化、メチル化、ユビキチン化といった修飾を受ける。近年の研究から、遺伝子転写の亢進・減弱にかかわるヒストン修飾や、細胞のアイデンティティーに関わるヒストン修飾など、ヒストン修飾の様々な役割が徐々に判明してきた。

本研究では、高リン刺激が血管平滑筋細胞を骨様細胞に形質変換させる際に、平滑筋分化マーカーおよび骨分化マーカーそれぞれの遺伝子プロモーター領域で、ヒストン修飾がどのように変化するか検討を行った。

2 方法

Sprague-Dawley ラット大動脈由来の血管平滑筋細胞を、高リン培地 (4.5 mmol/L)、正リン培地 (0.9 mmol/L) のそれぞれで2日毎に培地交換を行いながら合計8日間培養した後、細胞を回収した。細胞の一部からはRNA抽出を行い、定量的RT-PCRを行うことでSM α -actin, SM22 α , Runx2, osteopontin の遺伝子発現を検討した。また、一部はホルムアルデヒドで固定した後に細胞を回収し、クロマチン免疫沈降法と定量的PCRを組み合わせた方法によってヒストン修飾レベルを定量的に測定した。方法の詳細については、

既報に記した^{2,4,9)}。

3 結果

培養血管平滑筋細胞を高リン濃度 (4.5 mmol/L) の培地、正リン濃度 (0.9 mmol/L) の培地で8日間培養した。8日後の遺伝子発現の変化を定量的RT-PCR法によって観察した。高リン刺激によって平滑筋分化マーカーであるSM α -actin, SM22 α の遺伝子発現はそれぞれ減弱していた (図 1A, B)。一方で、骨分化マーカーであるRunx2, osteopontin の発現は亢進していた (図 1C, D)。高リン刺激によって平滑筋細胞の骨様細胞への形質変換が確認された。

遺伝子発現を検討した条件と同様の処理を行った培養血管平滑筋細胞において、ヒストン修飾の変化を検討した。クロマチン免疫沈降法と定量的PCRを組み合わせた方法によって、SM α -actin, SM22 α , Runx2, osteopontin それぞれの遺伝子プロモーター領域におけるヒストン修飾の変化を検討した。高リン刺激によって、SM α -actin と SM22 α の遺伝子プロモーター領域において、ヒストン H3 および H4 のアセチル化は減弱していた (図 2A, B, D, E)。一方で、Runx2 と osteopontin の遺伝子プロモーター領域においては、ヒ

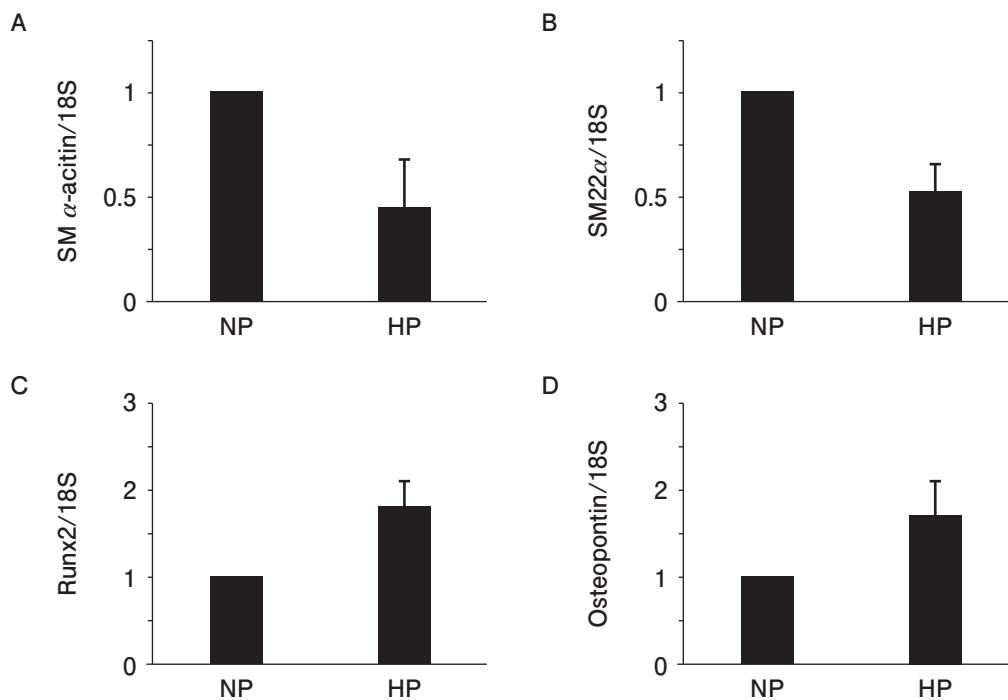


図1 培養血管平滑筋細胞における高リン刺激による遺伝子発現の変化

血管平滑筋細胞を高リン培地 (4.5 mmol/L; HP) あるいは正リン培地 (0.9 mmol/L; NP) で8日間培養した後の遺伝子発現の変化を定量的RT-PCR法によって測定した。それぞれの遺伝子発現レベルを18SrRNAで補正して表した。A: SM α -actin, B: SM22 α , C: Runx2, D: osteopontin

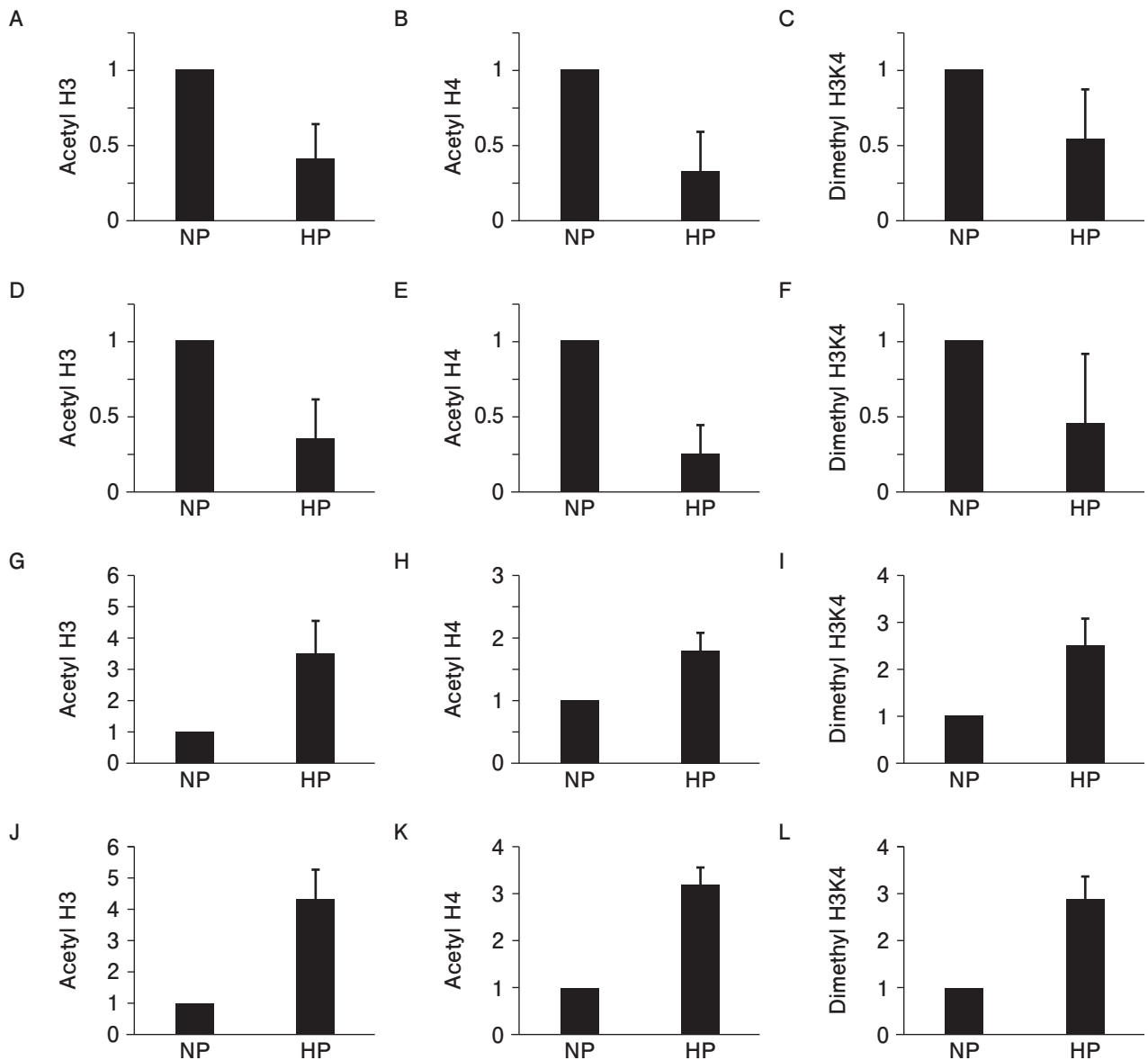


図2 培養血管平滑筋細胞における高リン刺激によるヒストン修飾の変化

血管平滑筋細胞を高リン培地 (4.5 mmol/L; HP) あるいは正リン培地 (0.9 mmol/L; NP) で8日間培養した後の SM α -actin 遺伝子プロモーター (A-C), SM22 α 遺伝子プロモーター (D-F), Runx2 遺伝子プロモーター (G-I), osteopontin 遺伝子プロモーター (J-L) におけるヒストン修飾の変化をクロマチン免疫沈降法と定量的 PCR を組み合わせて測定した。A, D, G, J: ヒストン H3 のアセチル化, B, E, H, K: ヒストン H4 のアセチル化, C, F, I, L: ヒストン H3K4 のメチル化

ストン H3 および H4 のアセチル化はいずれも亢進していた (図 2G, H, J, K)。次にヒストン H3 のリジン残基 H3K4 のメチル化について検討した。高リン刺激によって、SM α -actin と SM22 α の遺伝子プロモーター領域における H3K4 のメチル化は減弱していた (図 2C, F)、一方で、Runx2 と osteopontin の遺伝子プロモーター領域においては H3K4 のメチル化は亢進していた (図 2I, L)。このように、血管平滑筋細胞において、石灰化に伴う遺伝子発現の亢進・減弱に伴ってヒストン修飾も変化することが示された。

4 考察

本研究では血管平滑筋細胞において、高リン刺激によって平滑筋分化マーカーの発現が低下し骨分化マーカーの発現が亢進する際に、それぞれの遺伝子プロモーター領域ではヒストンアセチル化、メチル化の修飾変化が随伴していることを示した。遺伝子発現が亢進する際には、ヒストン H3, H4 のアセチル化およびヒストン H3K4 のメチル化が亢進し、遺伝子発現が低下する際には、ヒストン H3, H4 のアセチル化およびヒ

ストン H3K4 のメチル化が減弱していた。これらの結果は、高リン血症に伴う血管石灰化にヒストン修飾の変化が関与している可能性を示唆するものである。

遺伝子の転写は、プロモーター領域やエンハンサー領域といったシスエレメントと転写因子などのトランス因子だけで制御されるものではなく、クロマチン構造そのものも大きく転写活性に影響する。ヒストン修飾は、ユークロマチンやヘテロクロマチンといったクロマチン構造の変化に関与し、遺伝子転写さらには細胞のアイデンティティーなどに影響していると考えられている⁸⁾。本研究では、血管平滑筋細胞から骨様細胞への変化の過程におけるヒストン修飾の変化を明らかにしたが、ヒストン修飾変化に対する介入は行っていない。ヒストン修飾を gain-of-function 実験や loss-of-function 実験によって制御した場合、高リン刺激に伴う平滑筋分化マーカー、および骨分化マーカーの遺伝子発現の変化がどのようになるのか興味のあるところである。また、それぞれのヒストン修飾変化に対しては、それらを引き起こす修飾酵素が存在する。平滑筋細胞におけるヒストンアセチル化酵素、ヒストン脱アセチル化酵素、ヒストンメチル化酵素、ヒストン脱メチル化酵素を同定し、それらを制御することでも血管石灰化をコントロールできる可能性がある。今後の検討が期待される。

今回の検討では、ヒストン H3 および H4 のアセチル化、ヒストン H3K4 のメチル化のみを検討したが、ヒストン修飾にはまだほかに多くの修飾が知られている。それら修飾の個々の役割を検討することで、血管石灰化のエピジェネティック機構をさらに明らかにし、血管石灰化の制御につなげたい。

5 結 論

血管石灰化にエピジェネティックな変化が関与している可能性が示唆された。

平成 29 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投稿中であり、二重投稿となることを避けるため、本報告書ではその概要を総説的に記載した。

利益相反申告：申告すべきものなし

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) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Natoli G : Maintaining cell identity through global control of genomic organization. *Immunity* 2010; 33 : 12-24.
- 9) Yoshida T, Gan Q, Owens GK : Krüppel-like factor 4, Elk-1, and histone deacetylases cooperatively suppress smooth muscle cell differentiation markers in response to oxidized phospholipids. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 295 : C1175-C1182.