

Trichostatin A 及び 5-aza-2'-deoxycytidine の動脈石灰化に対する影響について

畦地 拓哉

星薬科大学 臨床化学教室

Effect of trichostatin A and 5-aza-2'-deoxycytidine on the development of vascular calcification

Takuya AZECHI

Department of Clinical Chemistry, Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences

はじめに

慢性腎臓病 (Chronic kidney disease: CKD) は透析や腎移植を必要とする末期腎不全のリスクファクターとして知られており、医療費の高騰や罹患率の増加、予後不良の観点から世界的な問題となっている。多くの臨床・疫学的研究から、心血管疾患 (Cardiovascular disease: CVD) が CKD 患者の主要な死因であることが明らかにされており¹⁻³⁾、透析患者 (CKD stage 5D) の死亡原因の約 50% が CVD であることが報告されている⁴⁾。CKD の主要な合併症である動脈石灰化は動脈組織への病的なカルシウム (Ca) 沈着を特徴とし、動脈の伸展性低下を招き、CVD 罹患率を増大させる^{5,6)}。実際に臨床においても、CKD 患者によく認められるメンケベルグ型血管中膜石灰化は多様な要因により生じ、CVD 発症や予後規定因子と位置付けられている。また、CKD の進行に伴い発症する高リン血症は動脈石灰化のリスクファクターとして知られ、血清リン濃度が CKD 患者の CVD 罹患率・死亡率と相関することが明らかとされている^{7,8)}。したがって、動脈石灰化の発症・進展を予防又は治療していくことは、CKD 患者の quality of life (QOL) 改善に直結すると考えられる。これらを含め、動脈石灰化の発症機序とその制御法に関する研究は極めて重要であるが、世界的に際立った進歩がみられず、未だその分子メカニズムは不明な点が多く残されている。

これまでに、動脈石灰化は動脈壁の変性・壊死過程で受動的に形成されるだけでなく、動脈平滑筋細胞 (Vascular smooth muscle cell: VSMC) が種々の因子を介して能動的に石灰化を引き起こすことが明らかにされつつある。この能動的な動脈石灰化過程は骨形成と非常に類似しており、無機リン (Pi) の細胞内過剰流入に伴う VSMC の骨芽細胞様細胞への表現型変化に起因すると

考えられている。実際に、外科的腎不全誘導及び高リン食飼育したマウス・ラットの動脈石灰化病変では骨形成関連因子の発現が認められること^{9,10)}、また、過剰な Pi 刺激により VSMC の骨芽細胞様細胞への表現型変化並びに石灰化が生じることが報告されている¹¹⁾。さらに、CVD リスクファクターとして知られる Tumor necrosis factor- α (TNF- α) や Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) が VSMC の表現型変化を促進し、動脈石灰化を悪化させることが報告されている^{12,13)}。したがって、VSMC の表現型変化のメカニズムを明らかにし、これを制御していくことは、動脈石灰化の予防・治療法の確立に有用であると考えられる。

近年、疾患とエピジェネティクスの関係性について注目が集まっている。エピジェネティクスはヒストン脱アセチル化酵素 [Histone deacetylase (HDAC): Class I-IV に分類される] や DNA メチル基転移酵素 [DNA methyltransferase (DNMT): 5 つのアイソフォームが存在] によるエピジェネティックな変化を介して DNA 塩基配列非依存的に遺伝子発現が制御される現象である。癌や精神疾患ではエピジェネティクス異常が関与する事例が既に報告されている^{14,18)}。遺伝子変異を伴わないエピジェネティックな変化は可逆的であることから、HDAC や DNMT を標的とした新たな治療法の確立が期待されている。これまでに、骨芽細胞分化においても HDAC の関与が示唆されており、HDAC1/7 の発現低下や Trichostatin A (TSA) などの HDAC 阻害剤 (HDIs) が骨形成関連遺伝子 (Alkaline phosphatase: ALP, Runt-related transcription factor 2: Runx2, Osteopontin: OPN など) の発現を増大させ、骨芽細胞分化を促進させることが報告されている^{19,23)}。また、DNMT 阻害剤である 5-azacytidine や 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) も骨芽細胞分化を促進させることから^{24,25)}、骨形成と類似した病態である動脈石灰化の発症・

進展にも HDAC や DNMT の関与が予想される。実際、Sirtuin-1 (SIRT1: Class III HDAC) の発現低下が動脈石灰化を悪化させ、動脈硬化の進展を招くことが報告されている²⁶⁾。したがって、HDAC や DNMT の阻害剤は VSMC の表現型変化とそれに伴う石灰化の発症・進展に影響を及ぼす可能性が考えられた。

そこで私は、エピジェネティクス制御酵素である HDAC 及び DNMT に着目し、動脈石灰化の発症・進展におけるこれら酵素の関与について解析を行ったのでここに述べる。

1. HDAC と骨芽細胞分化

エピジェネティックな変化の一つであるヒストンの翻訳後修飾はクロマチン構造を変化させ、遺伝子の転写制御に関与する。ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC: Class I-IV に分類される) はヒストン N 末端のリジン・アルギニン残基を脱アセチル化することにより、クロマチンの凝集化を引き起こし、転写を負に制御する。前述の通り、HDAC が癌を中心とした様々な疾患に関与することが明らかにされつつあり、新たな治療標的因子として期待されている^{14, 15)}。

また、近年の研究により骨芽細胞分化に対する HDAC の関与事例が示されている。HDAC1 (Class I) や HDAC7 (Class II) の発現低下は ALP などの骨形成関連遺伝子の発現増大を介して、骨芽細胞分化を促進することが報告されている^{20, 21)}。さらに、Trichostatin A (TSA) や Sodium butyrate などに代表される HDAC 阻害剤 (Histone deacetylase inhibitors: HDIs) も骨形成関連因子発現を増大させ、骨芽細胞分化を促進させることが見出されている^{22, 23)}。動脈石灰化は骨形成と類似した過程を経ると想定されていることから、HDIs が骨芽細胞と同様に VSMC の分化状態に影響を及ぼし、石灰化を悪化させる可能性が考えられた。

2. 動脈石灰化に対する Trichostatin A の影響

先述の通り、HDAC は Class I ~ IV に分類されている。このうち、Class III に分類される SIRT1 と石灰化の関係性については既に明らかにされており、SIRT1 の発現低下が *in vitro* 石灰化を促進することが報告されている²⁶⁾。しかしながら、これまでに HDAC Class I/II と動脈石灰化の関係性については不明であった。そこで、これら関係性を明らかにするため、HDAC class I/II を選択的に阻害する TSA の Pi 誘発石灰化 (*in vitro* 石灰化) への影響を検討した。

ヒト大動脈平滑筋細胞 (Human aortic smooth muscle cells: HASMCs) への TSA 処理により濃度依存的な HDAC 活性の低下が認められた (Fig. 1A)。一方、高濃度 (500 nM) の場合を除き、TSA 処理による

HASMCs への細胞毒性は認められなかった (Fig. 1B)。これらの結果から、以降の実験では、細胞毒性は示さず、HDAC 活性阻害効果を認める濃度である 100 nM を用いることとした。

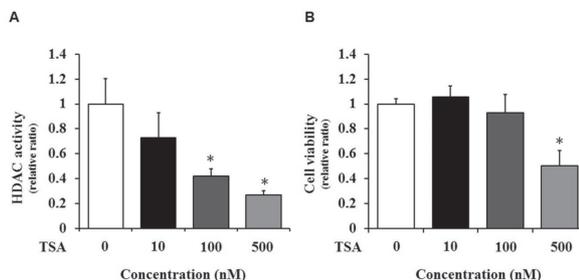


Fig.1 HASMCs に対する TSA の HDAC 活性阻害効果と細胞毒性

HASMCs を TSA (0 ~ 500 nM) で 6 日間処理し、HASMCs の HDAC 活性 (A) 及び細胞生存度 (B) を測定した。各データは TSA 未処理群を 1.0 とし、グラフに示した。A, HDAC 活性は TSA 濃度依存的に阻害された。B, 500 nM TSA 処理でのみ細胞生存度の有意な低下が認められた。

先述の通り、骨芽細胞への HDIs 処理が ALP や Runx2 などの骨形成関連因子発現を増大させ、骨芽細胞分化を促進することが明らかにされている¹⁹⁾。本研究においても、HASMCs への TSA 処理により、ALP 及び Runx2 (骨形成関連遺伝子) や type III sodium-dependent phosphate cotransporter (Pit-1: Pi の細胞内流入に関与) の mRNA 発現は有意に増加した (Fig. 2A)。また、TSA 処理は ALP 活性を亢進させたことから (Fig.2B)、TSA により HASMCs の骨芽細胞

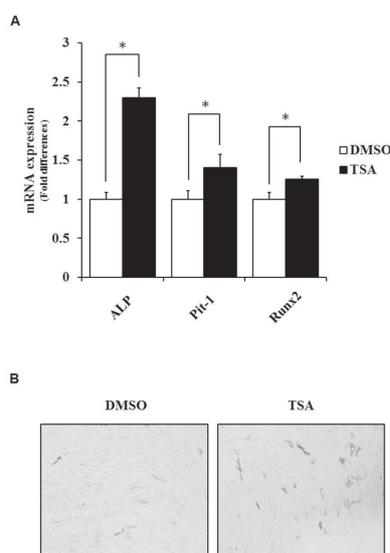


Fig.2 TSA 処理による骨形成関連因子の発現変動

HASMCs を 100 nM TSA で 6 日間処理した。A, total RNA を抽出し、RT-qPCR 法により各遺伝子発現変動を比較検討した。TSA 処理により骨形成関連遺伝子である ALP、Pit-1、Runx2 の mRNA 発現は有意に増加した。B, 各細胞の ALP 活性を ALP 染色により比較検討した。TSA 処理により ALP 活性の亢進 (紫色に呈色) が認められた。

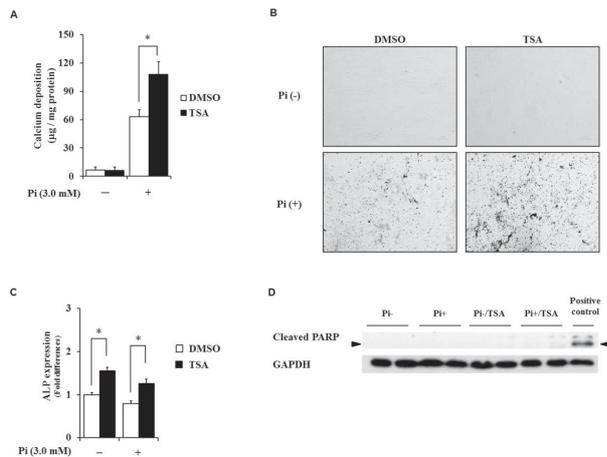


Fig. 3 *in vitro* 石灰化に対する TSA の影響

HASMCs を 3.0 mM Pi 及び 100 nM TSA で 6 日間処理し、Ca 沈着量の定量 (A)、von Kossa 染色 (B)、RT-qPCR (C) 及び Western Blot Assay (D) を行った。A, Ca 量及びタンパク量を測定し、タンパク量当たりの Ca 沈着量をグラフに示した。Pi 単独処理により Ca 沈着量の顕著な増加が認められ、この Ca 沈着量の増加は TSA 処理により有意に亢進した。B, Pi 単独処理により hydroxyapatite (黒色の粒子) の沈着が認められ、この沈着は TSA 処理により亢進した。C, total RNA を抽出し、RT-qPCR 法により ALP の mRNA 発現変動を比較検討した。Pi 処理の有無に関わらず、TSA 処理により ALP mRNA 発現が有意に増加した。D, 細胞内タンパク質を抽出し、Western Blot Assay により cleaved PARP (Arrowhead) の発現変動を比較検討した。しかしながら、Pi 及び TSA 処理の有無に関わらず、cleaved PARP の発現は認められなかった。Positive control として tunicamycin (5 µg/mL) で 48 時間処理した HASMCs より抽出した細胞内タンパク質を用いた。

様細胞への表現型変化が生じていると考えられた。ALP の発現増大は β -glycerophosphate を用いた非骨系細胞の石灰化を悪化させること、さらに、ALP 阻害剤が *in vitro* 石灰化を抑制することが報告されている^{27, 28)}。これらの報告と同様に、本研究では TSA は HASMCs の ALP 発現を増大させると共に *in vitro* 石灰化を悪化させた (Fig. 3A-C)。一方、石灰化の病態進行にアポトーシスの関与が示唆されていることから^{29, 30)}、TSA 及び Pi 処理に伴う cleaved PARP (アポトーシスマーカー) の発現変動を確認したが、これらの処理によるアポトーシス誘導は認められなかった (Fig. 3D)。また、石灰化の発症・進展には Pit-1 を介した Pi の細胞内過剰流入が重要であることが知られている。そこで、Pi 流入阻害剤である phosphonoformic acid (PFA) 処理による影響についても検討を行った。その結果、PFA 処理は TSA 処理の有無に関わらず、*in vitro* 石灰化を抑制した (Fig. 4)。したがって、TSA は Pi の細胞内過剰流入に伴う HASMCs の石灰化を悪化させることが明らかとなった。さらに、TSA 処理による石灰化の悪化が ALP 発現増大に起因するか否かを明らかにするため、

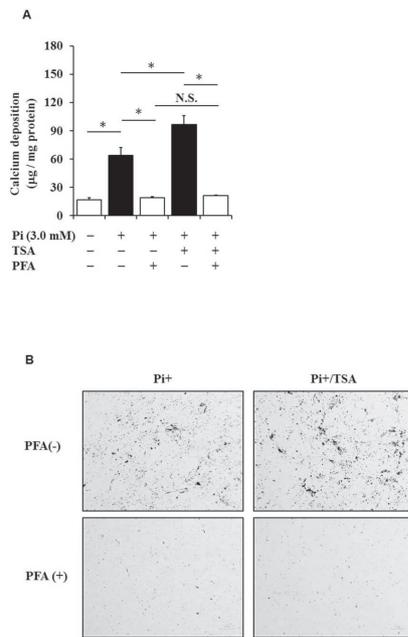


Fig. 4 Pi 及び TSA 処理により誘発した *in vitro* 石灰化に対する PFA の影響

HASMCs を 3.0 mM Pi、100 nM TSA 及び 100 µM PFA で 6 日間処理し、Ca 沈着量の定量 (A) 及び von Kossa 染色 (B) を行った。A, Ca 量及びタンパク量を測定し、タンパク量当たりの Ca 沈着量をグラフに示した。TSA 処理の有無に関わらず、Pi 処理による Ca 沈着量の増加は、PFA の同時処理により有意に抑制された。B, Pi 及び TSA 処理による hydroxyapatite の沈着は PFA 処理により抑制された。

siRNA を用いて ALP 発現抑制下における HASMCs の石灰化を検討した。その結果、siRNA による ALP 発現抑制は TSA 処理による石灰化亢進を抑制した (Fig. 5)。以上の結果から、TSA の石灰化亢進作用には ALP 発現増大が重要な役割を担うと考えられた。さらに、本研究により初めて、Class III HDAC と同様に Class I/II HDAC の阻害も動脈石灰化のリスクを増大させる可能性が示唆された。

一般に、ヒストンのアセチル化状態は転写活性と正の相関性を示し、ヒストンアセチル化酵素 (Histone acetyltransferase: HAT) 及び HDAC により制御されている。したがって、HDIs による HDAC 阻害はヒストンのアセチル化を招き、様々な遺伝子の転写を促進する。しかしながら、本研究において、TSA 処理は ALP プロモーター領域におけるヒストンのアセチル化状態には影響を及ぼさなかった (Fig. 6)。一方、ALP の上流遺伝子である Runx2 のアセチル化及び転写活性は HDAC 阻害により促進することが報告されている³¹⁾。したがって、本研究では Runx2 のアセチル化状態については検討していないが、TSA 処理による ALP 発現増大には Runx2 のアセチル化が関与している可能性が考えられる。

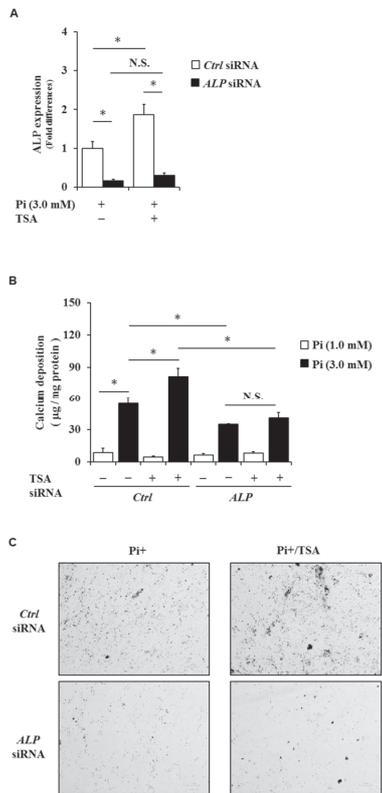


Fig. 5 siRNAを用いたALP発現抑制の*in vitro*石灰化に対する影響

HASMCs に対して ALP 又は Ctrl siRNA を導入した。24 時間後、Pi 及び TSA で 6 日間処理し、RT-qPCR (A)、Ca 沈着量の定量 (B) 及び von Kossa 染色 (C) を行った。A, total RNA 抽出及び RT-qPCR 法により ALP の mRNA 発現変動を比較検討した。Pi 及び TSA 処理の有無に関わらず、ALP siRNA の導入により ALP mRNA 発現は有意に抑制された。B, Ca 量及びタンパク量を測定し、タンパク量当たりの Ca 沈着量をグラフに示した。TSA 処理の有無に関わらず、Pi 処理による Ca 沈着量の増加は、ALP 発現抑制により有意に抑制された。また、ALP 発現抑制下では TSA による Ca 沈着量の亢進は認められなかった。C, Pi 及び TSA 処理による hydroxyapatite の沈着は ALP 発現抑制により抑制された。

Pi と HDAC の関係性については不明ではあるが、Takemura らにより VSMC に対する Pi 処理はヒストン H3 のアセチル化を招くことが示されている²⁶⁾。本研究ではヒストンのアセチル化状態を検討していないが、TSA による HDAC 阻害はヒストンアセチル化を招いていると考えられる。しかしながら、TSA は高 Pi 濃度では *in vitro* 石灰化を悪化させたのに対し、正常な Pi 濃度では TSA 単独処理により VSMC の石灰化を誘発しなかった。これらの結果から、動脈石灰化の発症・進展に対して HDAC 及びヒストンアセチル化は間接的に関与している可能性が考えられる。

以上より、TSA による HDAC 活性低下は VSMC の骨芽細胞様細胞への表現型変化を招き、動脈石灰化を悪化させる可能性が示唆された。また、他の報告と同様に、

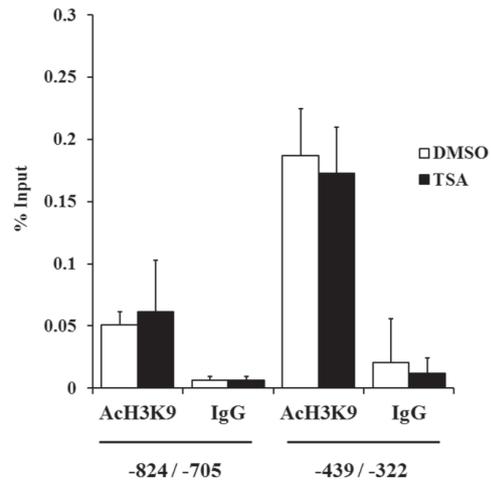


Fig. 6 ALP プロモーター領域におけるヒストンアセチル化状態の変化

HASMCs を 100 nM TSA で 6 日間処理した。その後、ALP プロモーター領域 (-824/-705 及び -439/-322: 転写開始点を 0 とする) におけるヒストン H3 の 9 番目のリジン残基 (H3K9) のアセチル化状態を、抗アセチル化 H3K9 (AcH3K9) 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法及び qPCR 法により比較検討した。その結果、各領域における H3K9 のアセチル化状態に有意な変化は認められなかった。なお、ネガティブコントロールとして Normal Mouse IgG を使用した。

ALP 発現を制御することが動脈石灰化の予防・治療に有用であることを示した。

3. DNMT と骨芽細胞分化

DNA メチル化はヒストン翻訳後修飾と同様にエピジェネティックな変化の一つであり、遺伝子発現制御やクロマチン構造変化、ゲノムインプリティングなどの様々な遺伝現象に関わる。一般に、ヒトや他の哺乳類では DNA メチル化は CpG 配列のシトシンで生じ、各遺伝子のプロモーター領域における DNA メチル化レベルは転写活性と負の相関性があることが知られている。また、DNA メチル化は DNA methyltransferase (DNMT) ファミリーにより制御されており、癌などの種々の疾患の発症・進展に寄与する³²⁻³⁵⁾。さらに、幹細胞からの骨芽細胞を含む多様な細胞への分化にも DNA メチル化が関与することが報告されている³⁶⁾。実際に、間葉系幹細胞 (MSCs) の骨芽細胞分化に際し、DNA メチル化状態と骨形成関連因子の遺伝子発現は逆相関することが知られている³⁷⁾。これに加えて、DNMT 阻害剤である 5-azacytidine や 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) は骨形成関連因子の遺伝子発現を増大させ、MSCs の骨芽細胞分化を促進させることが報告されている^{38, 39)}。以上の報告から、HDAC 阻害剤の場合と同様に、DNMT 阻害剤が VSMC の分化状態に影響を及ぼし、石灰化を悪化させる可能性を考えた。

4. 動脈石灰化に対する 5-aza-2'-deoxycytidine の影響

動脈石灰化に対する DNMT 阻害の影響を明らかにするため、代表的な DNMT 阻害剤である 5-aza-dC を用いて、HASCs における 5-aza-dC の骨形成関連因子の遺伝子発現及び *in vitro* 石灰化に対する影響を明らかにすることを目的とし、各種検討を行った。

種々の細胞に対する 5-aza-dC 処理は、DNMT1 発現を抑制することが知られている^{40, 43)}。本研究においても、HASCs への 5-aza-dC 処理は DNMT1 発現を抑制した (Fig. 7)。また、RT-qPCR 法により各種 mRNA 発現変動を比較検討したところ、5-aza-dC 処理は骨形成関連因子 (ALP、Msx2、BMP-2、Pit-1) の mRNA 発現を有意に増加した (Fig. 8A)。これに加えて、5-aza-dC は ALP 活性を亢進したことから (Fig. 8B)、5-aza-dC による HASCs の骨芽細胞様細胞への表現型変化が生じていると考えられた。また、Pi 処理下においても、5-aza-dC 処理は ALP 発現を増加させ、*in vitro* 石灰化を悪化させた (Fig. 9A-C)。一方、5-aza-dC 及び Pi 処理による cleaved PARP の発現変動は認められず、アポトーシスの関与は認められなかった (Fig. 9D)。これに加えて、PFA の同時処理は Pi 及び 5-aza-dC 処理による石灰化を抑制した (Fig. 10)。以上の結果から、TSA の場合と同様に、5-aza-dC も HASCs の表現型変化を招き、Pi の細胞内過剰流入に伴う石灰化を悪化させることが明らかとなった。

先述の通り、5-aza-dC 処理は DNMT1 発現を抑制する。そこで、shRNA を用いた DNMT1 発現抑制が *in vitro* 石灰化に与える影響を検討した。RT-qPCR 法に

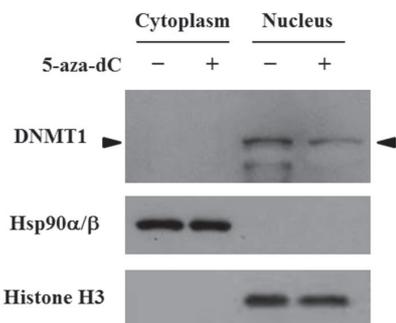


Fig. 7 HASCs の DNMT1 発現に対する 5-aza-dC 処理の影響

HASCs を 10 μ M 5-aza-dC で 2 日間処理後、細胞質 (Cytoplasm) 及び核内 (Nucleus) タンパクを分画し、Western Blot Assay により DNMT1 発現を比較検討した。その結果、5-aza-dC 処理により DNMT1 (Arrowhead) 発現の低下が認められた。なお、Hsp90 α/β 及び Histone H3 は、それぞれ Cytoplasm 及び Nucleus のマーカーとして使用している。

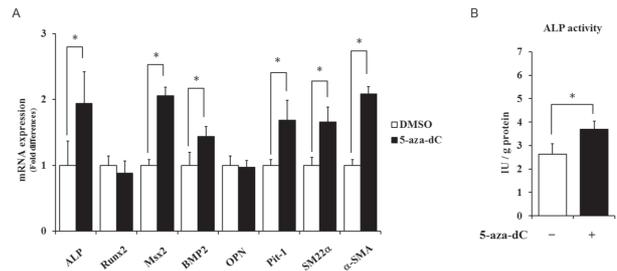


Fig. 8 5-aza-dC 処理による骨形成関連因子の発現変動

HASCs を 10 μ M 5-aza-dC で 2 日間処理し、RT-qPCR (A) 及び ALP 活性測定 (B) を行った。A, total RNA を抽出し、RT-qPCR 法により各遺伝子発現変動を比較検討した。5-aza-dC 処理により骨形成関連遺伝子である ALP、Msx2、BMP-2、Pit-1、SM22 α 及び α -SMA の mRNA 発現は有意に増加した。B, ALP 活性及びタンパク量を測定し、タンパク量当たりの ALP 活性をグラフに示した。5-aza-dC 処理により HASCs の ALP 活性は有意に増加した。

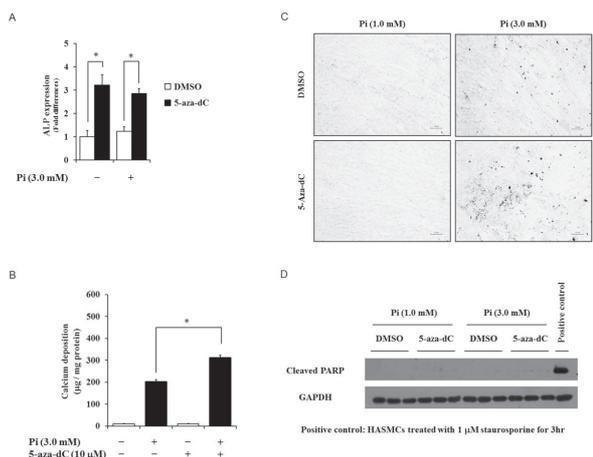


Fig.9 *in vitro* 石灰化に対する 5-aza-dC の影響

HASCs を 10 μ M 5-aza-dC で 2 日間前処理し、3.0 mM Pi で処理した後、Ca 沈着量の定量 (A)、von Kossa 染色 (B)、RT-qPCR (C) 及び Western Blot Assay (D) を行った。A, Ca 量及びタンパク量を測定し、タンパク量当たりの Ca 沈着量をグラフに示した。Pi 単独処理により Ca 沈着量の顕著な増加が認められ、この Ca 沈着量の増加は 5-aza-dC 前処理により有意に亢進した。B, Pi 単独処理により hydroxyapatite の沈着が認められ、この沈着は 5-aza-dC 前処理により亢進した。C, total RNA を抽出し、RT-qPCR 法により ALP の mRNA 発現変動を比較検討した。Pi 処理の有無に関わらず、5-aza-dC 前処理は ALP 発現を有意に増加した。D, 細胞内タンパク質を抽出し、Western Blot Assay により cleaved PARP の発現変動を比較検討した。しかしながら、Pi 及び 5-aza-dC 処理の有無に関わらず、cleaved PARP の発現は認められなかった。Positive control として、staurosporine (1 μ M) を 3 時間処理した HASCs より抽出した細胞内タンパク質を用いた。

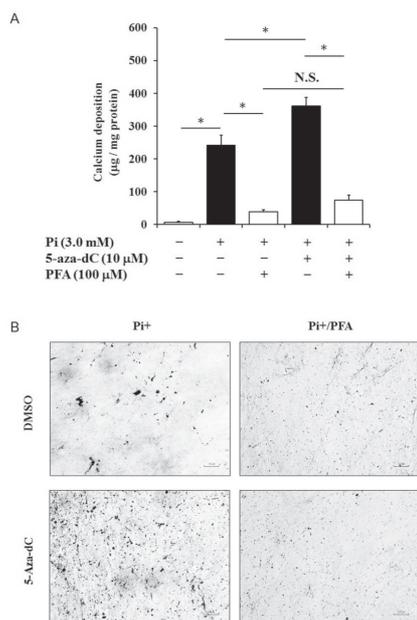


Fig. 10 Pi 及び 5-aza-dC 処理により誘発した *in vitro* 石灰化に対する PFA の影響

HASMCs を 10 μM 5-aza-dC で 2 日間前処理し、3.0 mM Pi 及び 100 μM PFA を 14 日間処理した後、Ca 沈着量の定量 (A) 及び von Kossa 染色 (B) を行った。A, Ca 含量及びタンパク量を測定し、タンパク量当たりの Ca 沈着量をグラフに示した。5-aza-dC 前処理の有無に関わらず、Pi 処理による Ca 沈着量の増加は、PFA の同時処理により有意に抑制された。B, Pi 及び 5-aza-dC 処理による hydroxyapatite の沈着は PFA 処理により抑制された。

より、各 DNMT1 shRNA の導入が DNMT1 発現を有意に抑制することを確認した。一方、これら shRNA は同じファミリーに属する DNMT3a 及び 3b の遺伝子発現には影響を及ぼさなかった (Fig. 11A)。また、5-aza-dC 処理の場合と同様に、shRNA による DNMT1 発現抑制は、ALP 発現を増大させるとともに HASMCs の石灰化を悪化させた (Fig. 11A-C)。これに加えて、siRNA による ALP 発現抑制は、5-aza-dC 処理による石灰化亢進を抑制した (Fig. 12)。以上の結果から、5-aza-dC の石灰化亢進作用には DNMT1 発現低下と ALP 発現増大が重要な役割を担うと考えられた。

また、5-aza-dC 処理は平滑筋細胞マーカーである SM22α 及び α-SMA の発現も有意に増加した (Fig. 8A)。平滑筋細胞マーカーと動脈石灰化の関係については議論の余地があるが、SM22α 及び α-SMA の上流遺伝子である Myocardin の発現レベルは *in vitro* 石灰化の発症・進展には影響を及ぼさないことが報告されている⁴⁴⁾。したがって、本研究において、5-aza-dC 処理による石灰化亢進作用には平滑筋細胞マーカーの発現増大は関与していないと考えられる。今後の研究を通じて、動脈石灰化の発症・進展における平滑筋細胞マーカーの役割が解

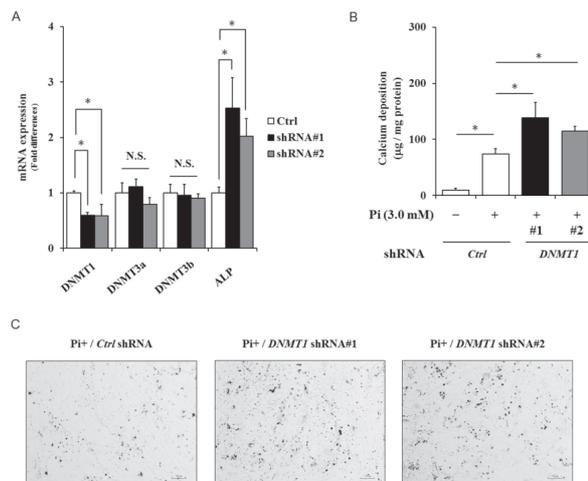


Fig. 11 shRNA を用いた DNMT1 発現抑制の *in vitro* 石灰化に対する影響

HASMCs に DNMT1 shRNA (#1, #2) 及び Ctrl shRNA を導入した。A, Total RNA を抽出し、RT-qPCR 法により各遺伝子発現変動を比較検討した。各 DNMT1 shRNA の導入により、DNMT1 の mRNA 発現は有意に抑制された。一方、各 DNMT1 shRNA は DNMT3a 及び DNMT3b の mRNA 発現に影響を及ぼさなかった。また、DNMT1 発現の抑制は ALP mRNA 発現を有意に増加させた。

次に、導入した各細胞に対して 3.0 mM Pi を 4 日間処理した後、Ca 沈着量の定量 (B) 及び von Kossa 染色 (C) を行った。B, Ca 量及びタンパク量を測定し、タンパク量当たりの Ca 沈着量をグラフに示した。DNMT1 発現の抑制により、Pi 処理による Ca 沈着量の増大は有意に促進された。C, Pi 処理による hydroxyapatite の沈着は DNMT1 発現の抑制により亢進した。

明されることが期待される。

以上より、TSA の場合と同様に、5-aza-dC 及び DNMT1 発現低下は VSMC の骨芽細胞様細胞への表現型変化を介して動脈石灰化を悪化させる可能性が示唆された。また、DNMT1 発現異常を伴う動脈石灰化に対しても、ALP 発現を制御することが有用である可能性を示した。

5. ALP プロモーター領域における DNA メチル化率の変化

近年、骨芽細胞系細胞への 5-aza-dC 処理により ALP 発現が増大することが示されている⁴³⁾。また、これまでに述べたように、5-aza-dC は哺乳類細胞における DNMT1 発現を低下させることが知られている⁴⁰⁻⁴²⁾。本研究においても、HASMCs への 5-aza-dC 処理は ALP 発現増大と共に DNMT1 発現低下を示した。さらに、shRNA を用いた DNMT1 発現抑制も ALP 発現を増大させたことから、5-aza-dC 処理による ALP 発現増大には DNMT1 発現低下が関与していると考えられる。

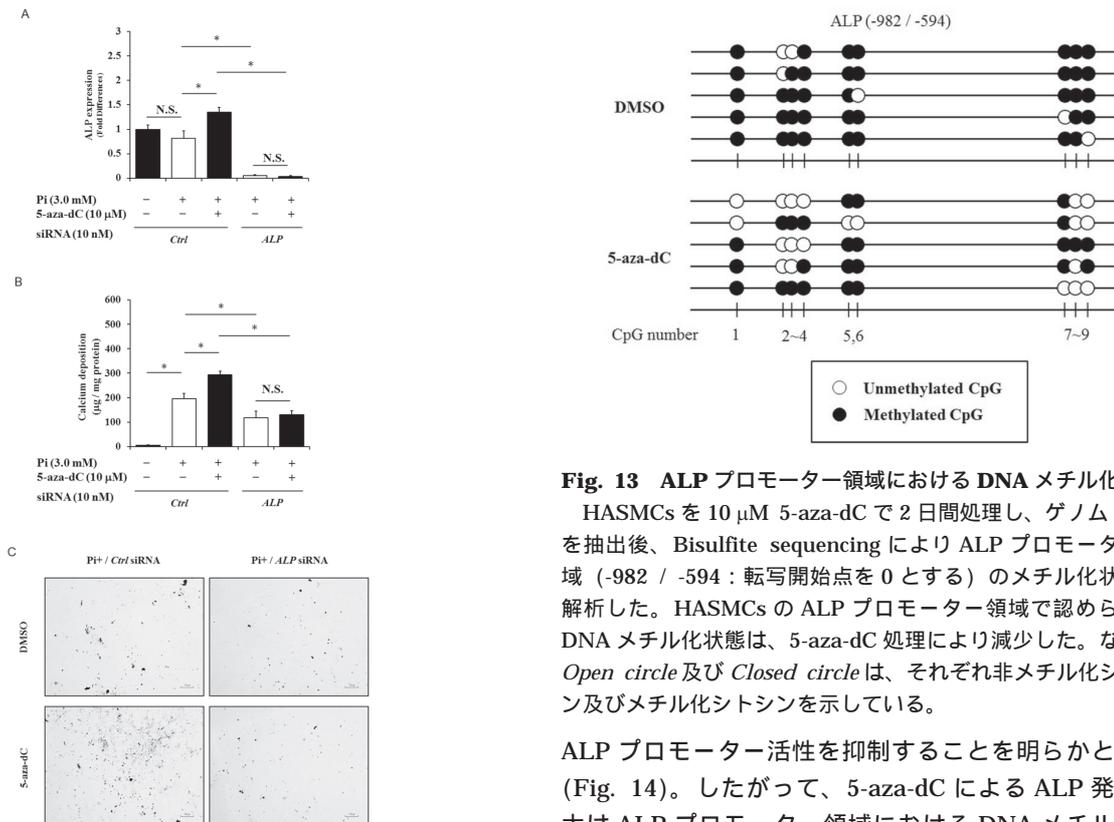


Fig. 12 ALP 発現に対する 5-aza-dC 処理及び siRNA 導入の影響

HASMCs に対して 5-aza-dC 前処理を 48 時間行った後、ALP 又は Ctrl siRNA を導入した。siRNA 導入後、3.0 mM Pi で処理し、RT-qPCR (A)、Ca 沈着量の定量 (B) 及び von Kossa 染色 (C) を行った。A, total RNA 抽出及び RT-qPCR 法により ALP の mRNA 発現変動を比較検討した。Pi 及び 5-aza-dC 処理の有無に関わらず、ALP siRNA の導入により ALP 発現は有意に抑制された。B, Ca 量及びタンパク量を測定し、タンパク量当たりの Ca 沈着量をグラフに示した。5-aza-dC 前処理の有無に関わらず、Pi 処理による Ca 沈着量の増加は、ALP 発現抑制により有意に抑制された。また、ALP 発現抑制下では 5-aza-dC による Ca 沈着量の亢進は認められなかった。B, Pi 及び 5-aza-dC 処理による hydroxyapatite の沈着は ALP 発現抑制により抑制された。

DNA メチル化はメチル基維持酵素である DNMT1 及び *de novo* メチル化酵素である DNMT3a/3b により制御されており^{45, 46)}、DNMT 阻害剤は DNA メチル化レベルを低下させる。一般に、ALP を含め多くの遺伝子では、プロモーター領域における DNA メチル化レベルはその遺伝子発現と負の相関性を示す^{43, 47)}。そこで、ALP プロモーター領域の DNA メチル化率を Bisulfite sequencing により解析した。その結果、5-aza-dC 処理により ALP プロモーター領域の DNA メチル化率は減少した (Fig. 13)。さらに、ルシフェラーゼレポーター解析から、プロモーター領域特異的な DNA メチル化は

Fig. 13 ALP プロモーター領域における DNA メチル化変動

HASMCs を 10 μM 5-aza-dC で 2 日間処理し、ゲノム DNA を抽出後、Bisulfite sequencing により ALP プロモーター領域 (-982 / -594 : 転写開始点を 0 とする) のメチル化状態を解析した。HASMCs の ALP プロモーター領域で認められた DNA メチル化状態は、5-aza-dC 処理により減少した。なお、Open circle 及び Closed circle は、それぞれ非メチル化シトシン及びメチル化シトシンを示している。

ALP プロモーター活性を抑制することを明らかとした (Fig. 14)。したがって、5-aza-dC による ALP 発現増大は ALP プロモーター領域における DNA メチル化レベルの低下によるものと考えられた。また、骨芽細胞系細胞と同様に VSMC においても、ALP 発現は DNA メチル化の影響を受ける可能性が示唆された。

おわりに

これまでに、CKD の主病変である腎線維化に対するエピジェネティクスの関与事例が示されてきた。腎不全モデルの腎組織では HDAC1/2 の発現が増大していることや HDIs 及び DNMT 阻害剤が腎線維化を抑制することが報告されており、これら阻害剤が CKD の治療薬として有用であると考えられている⁴⁸⁻⁵²⁾。しかしながら、HDIs や DNMT 阻害剤が CKD 患者に全身性に投与されることを踏まえると、動脈石灰化などの CKD 合併症に対するこれら阻害剤の影響を明らかにすることが必須である。本研究では、TSA 及び 5-aza-dC は高 Pi 濃度で誘発される VSMC の石灰化を悪化させたが、正常な Pi 濃度では石灰化を誘導しなかった。一般に、CKD 患者では早期ステージ (stage 1-3) と比べて後期ステージ (stage 4/5) において、血清中の Pi 濃度が高いことが知られている^{53, 54)}。したがって、動脈石灰化が CVD のリスクファクターであることを考慮すると、CKD 患者への HDIs や DNMT 阻害剤の投与は、早期ステージでは CVD リスクに影響を及ぼさないが、後期ステージでは CVD リスクを増大させる可能性が考えられる。すなわち、早期の CKD 患者に対しては HDIs や DNMT

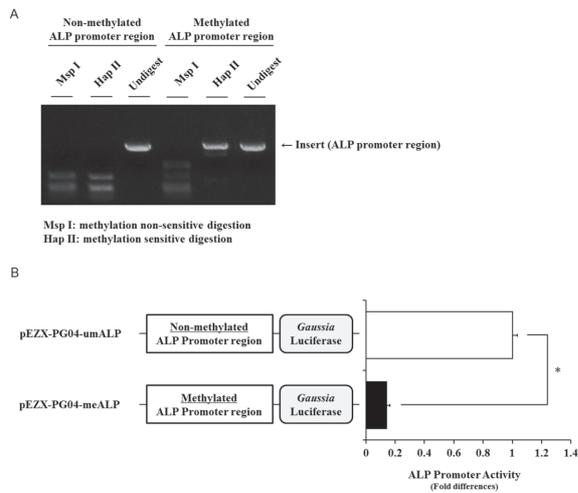


Fig. 14 DNA メチル化が ALP プロモーター活性に与える影響

A, ALP プロモーター領域を SssImethylase によりメチル化処理後、Msp I 及び Hpa II 処理を行った。Msp I はメチル化処理の有無に関わらず、ALP プロモーター領域を切断したのに対し、Hpa II 処理はメチル化されていない ALP プロモーター領域のみを切断した。B, ALP プロモーター領域をメチル化処理した luciferase vector (pEZX-PG04-meALP) 又はメチル化処理していない luciferase vector (pEZX-PG04-umALP) を *Escherichia coli* で増幅せず、直接 HEK293FT 細胞に遺伝子導入し、luciferase assay を行った。Luciferase 活性は Secreted Alkaline Phosphatase (SEAP) 活性で補正した後、pEZX-PG04-umALP を 1.0 とし、グラフに示した。プロモーター領域特異的な DNA メチル化により、ALP プロモーター活性の有意な抑制が認められた。

阻害剤は有用であるが、後期の CKD 患者に対するこれら阻害剤の投与は望ましくないと考えられる。

また、CVD とエピジェネティクスの関係性についても研究が盛んに進められている。Apolipoprotein E (Apo E) 欠損マウスやヒトの動脈硬化病変ではゲノムワイドな DNA 低メチル化状態にあること⁵⁵⁾ や、TSA が low-density lipoprotein receptor (LDLR) 欠損マウスの動脈硬化病変を悪化させることが報告されてい

る⁵⁶⁾。一方で、他の研究者により、HDI が CVD の一つである血管新生病変を改善することが明らかにされている^{57, 58)}。これら報告の矛盾点は、エピジェネティクス制御が一概に CVD の治療ターゲットとなり得ないことを示唆している。動脈石灰化とエピジェネティクスの関係性についてはほとんど明らかにされていないが、先に述べたように、SIRT1 (HDAC Class III) の抑制は動脈石灰化を悪化させることが報告されている²⁶⁾。また、本研究において、TSA による HDAC 阻害や 5-aza-dC による DNMT 阻害も動脈石灰化を悪化させることが明らかとなった。これらの結果を踏まえ、HDAC や DNMT 阻害を介したエピジェネティクス制御は動脈石灰化の発症・進展を悪化させる可能性が考えられる。今後、エピジェネティクスやそれらを制御する各種制御酵素の観点から動脈石灰化に関する研究を進めていくことが、新たな治療・予防法の確立に繋がるものと期待される。

本研究は、動脈石灰化の発症・進展機序の解明に新しい知見を与えると考えられ、CKD 治療において問題となる CVD リスクの低減に繋がる新規治療法の確立に役立つものと期待する。

謝 辞

本研究に対し、平成 26 年度星薬科大学大谷記念研究助成金を賜り、深く御礼を申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、終始御指導、御協力頂きました臨床化学教室 輪千浩史准教授並びに薬剤師職能開発研究部門 里史明講師に深く御礼を申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、御協力いただきました日本大学歯学部解剖学第二講座 磯川桂太郎教授、本田雅規准教授、山崎洋介助教、鳥海拓助手、湯口眞紀助手並びに星薬科大学創制構築研究室 米谷芳枝名誉教授、米持悦生教授、服部喜之准教授、川野久美助教に心より感謝申し上げます。最後に本研究を遂行するにあたり、御協力頂きました臨床化学教室の皆様にも深く御礼を申し上げます。

参考文献

- 1) Keith DS, Nichols GA, Gullion CM, Brown JB and Smith DH: Longitudinal follow-up and outcomes among a population with chronic kidney disease in a large managed care organization. Arch Intern Med, 2004; 164:659-663
- 2) Kannel WB, Stampfer MJ, Castelli WP andVerter J: The prognostic significance of proteinuria: the Framingham study. Am Heart J, 1984; 108:1347-1352
- 3) Ninomiya T, Kiyohara Y, Kubo M, Tanizaki Y, Doi Y, Okubo K, Wakugawa Y, Hata J, Oishi Y, Shikata K, Yonemoto K Hirataka H and Iida M: Chronic kidney disease and cardiovascular disease in a general Japanese population: the Hisayama study. Kidney Int, 2005; 68:228-236
- 4) Foley RN, Parfrey PS and Sarnak MJ: Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. Am J Kidney Dis, 1998; 32:S112-119
- 5) London GM, Guérin AP, Marchais SJ, Métivier F, Pannier B and Adda H: Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. Nephrol Dial Transplant, 2003; 18:1731-1740

- 6) Sigrist M, Bungay P, Taal MW and McIntyre CW: Vascular calcification and cardiovascular function in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*, 2006; 21:707-714
- 7) Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, Yoon C, Gales B, Sider D, Wang Y, Chung J, Emerick A, Greaser L, Elashoff RM and Salusky IB: Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Engl J Med*, 2000; 342:1478-1483
- 8) Kestenbaum B, Sampson JN, Rudser KD, Patterson DJ, Seliger SL, Young B, Sherrard DJ and Andress DL: Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 2005; 16:520-528
- 9) El-Abbadi MM, Pai AS, Leaf EM, Yang HY, Bartley BA, Quan KK, Ingalls CM, Liao HW and Giachelli CM: Phosphate feeding induces arterial medial calcification in uremic mice: role of serum phosphorus, fibroblast growth factor-23, and osteopontin. *Kidney Int*, 2009; 75:1297-1307
- 10) Pai A, Leaf EM, El-Abbadi M and Giachelli CM: Elastin degradation and vascular smooth muscle cell phenotype change precede cell loss and arterial medial calcification in a uremic mouse model of chronic kidney disease. *Am J Pathol*, 2011; 178:764-773
- 11) Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A and Giachelli CM: Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. *Circ Res*, 2011; 109:697-711
- 12) Tintut Y, Patel J, Parhami F and Demer LL: Tumor necrosis factor- α promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. *Circulation*, 2000; 102:2636-2642
- 13) Dalfino G, Simone S, Porreca S, Cosola C, Balestra C, Manno C, Schena FP, Grandaliano G and Pertosa G: Bone morphogenetic protein-2 may represent the molecular link between oxidative stress and vascular stiffness in chronic kidney disease. *Atherosclerosis*, 2010; 211:418-423
- 14) Feinberg AP: Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature*, 2007; 447:433-440
- 15) Natarajan R: Drugs targeting epigenetic histone acetylation in vascular smooth muscle cells for restenosis and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011; 31:725-727
- 16) Issa JP, Garcia-Manero G, Giles FJ, Mannari R, Thomas D, Faderl S, Bayar E, Lyons J, Rosenfeld CS, Cortes J and Kantarjian HM: Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood*, 2004; 103:1635-1640
- 17) Kan PX, Pependikyte V, Kaminsky ZA, Yolken RH and Petronis A: Epigenetic studies of genomic retroelements in major psychosis. *Schizophr Res*, 2004; 67:95-106
- 18) Kato C, Petronis A, Okazaki Y, Tochigi M, Umekage T and Sasaki T: Molecular genetic studies of schizophrenia: challenges and insights. *Neurosci Res*, 2002; 43:295-304
- 19) Westendorf J: Histone deacetylases in control of skeletogenesis. *J Cell Biochem*, 2007; 102:332-340
- 20) Lee HW, Suh JH, Kim AY, Lee YS, Park SY and Kim JB: Histone deacetylase 1-mediated histone modification regulates osteoblast differentiation. *Mol Endocrinol*, 2006; 20:2432-2443
- 21) Jensen ED, Schroeder TM, Bailey J, Gopalakrishnan R and Westendorf J: Histone deacetylase 7 associates with runx2 and represses its activity during osteoblast maturation in deacetylation-independent manner. *J Bone Miner Res*, 2008; 23:361-372
- 22) Schroeder TM and Westendorf JJ: Histone deacetylase inhibitors promote osteoblast maturation. *J Bone Miner Res*, 2005; 20:2254-2263
- 23) Chen TH, Chen WM, Hsu KH, Kuo CD and Hung SC: Sodium butyrate activates ERK to regulate differentiation of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007; 355:913-918
- 24) Zhou GS, Zhang XL, Wu JP, Zhang RP, Xiang LX, Dai LC and Shao JZ: 5-Azacytidine facilitates osteogenic gene expression and differentiation of mesenchymal stem cells by alteration in DNA methylation. *Cytotechnology*, 2009; 60:11-22
- 25) Zhang RP, Shao JZ and Xiang LX: GADD45A protein plays an essential role in active DNA demethylation during terminal osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Biol Chem*, 2011; 286(47):41083-41094
- 26) Takemura A, Iijima K, Ota H, Son BK, Ito Y, Ogawa S, Eto M, Akishita M and Ouchi Y: Sirtuin 1 retards hyperphosphatemia-induced calcification of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011; 31:2054-2062
- 27) Hui M, Li SQ, Holmyard D and Cheng P: Stable transfection of nonosteogenic cell line with ALP enhances mineral deposition in the presence and absence of β -glycerophosphate: possible role for alkaline phosphatase in pathological mineralization. *Calcif Tissue Int*, 1997; 60:467-472
- 28) Narisawa S, Harmey D, Yadav MC, O'Neill WC, Hoylaerts MF and Millán JL: Novel inhibitors of alkaline phosphatase suppress vascular smooth muscle cell calcification. *J Bone Miner Res*, 2007; 22:1700-1710
- 29) Schoppet M, Al-Fakhri N, Franke FE, Katz N, Barth PJ, Maisch B, Preissner KT and Hofbauer LC: Localization of osteoprotegerin, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand in Mönckeberg's sclerosis and atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89:4104-4112
- 30) Son BK, Akishita M, Iijima K, Eto M and Ouchi Y: Mechanism of pi-induced vascular calcification. *J Atheroscler Thromb*. 2008; 16:63-68
- 31) Jeon EJ, Lee KY, Choi NS, Lee MH, Kim HN, Jin YH, Ryoo HM, Choi JY, Yoshida M, Nishino N, Oh BC, Lee KS, Lee YH and Bae SC: Bone morphogenetic protein-2 stimulates Runx2 acetylation. *J Biol Chem*, 2006; 281:16502-16511

- 32) Robertson KD: DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*, 2005; 6:597-610
- 33) Issa JP: Aging, DNA methylation and cancer. *Crit Rev OncolHematol*, 1999; 32(1):31-43
- 34) Wilson AS, Power BE and Molloy PL: DNA hypomethylation and human diseases. *BiochemBiophysActa*, 2007; 1775(1):138-162
- 35) Lorenzen JM, Martino F and Thum T: Epigenetic modification in cardiovascular disease. *Basic Res cardiol*, 2013; 107(2):245
- 36) Eslaminejad MB, Fani N and Shahhoseini M: Epigenetic regulation of osteogenic and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in culture. *Cell J*, 2013; 15(1):1-10
- 37) Teven CM, Liu X, Hu N, Tang N, Kim SH, Huang E, Yang K, Li M, Gao JL, Liu H, Natale RB, Luther G, Luo Q, Wang L, Rames R, Bi Y, Luo J, Luu HH, Haydon RC, Reid RR and He TC: Epigenetic regulation of mesenchymal stem cells: a focus on osteogenic and adipogenic differentiation. *Stem Cells Int*, 2011; 2011:201371
- 38) Zhou GS, Zhang XL, Wu JP, Zhang RP, Xiang LX, Dai LC and Shao JZ: 5-Azacytidine facilitates osteogenic gene expression and differentiation of mesenchymal stem cells by alteration in DNA methylation. *Cytotechnology*, 2009; 60:11-22
- 39) Zhang RP, Shao JZ and Xiang LX: GADD45A protein plays an essential role in active DNA demethylation during terminal osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *J BiolChem*, 2011; 286(47):41083-41094
- 40) Patel K, Dickson J, Din S, Macleod K, Jodrell D and Ramsahoye B: Targeting of 5-aza-2'-deoxycytidine residues by chromatin-associated DNMT1 induces proteasomal degradation of the free enzyme. *Nucleic Acids Res*, 2010; 38:4313-4324
- 41) Ghoshal K, Datta J, Majumder S, Bai S, Kutay H, Motiwala T and Jacob ST: 5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal. *Mol Cell Biol*, 2005; 25:4727-4741
- 42) Laurenzana A, Petrucci LA, Pettersson F, Figueroa ME, Melnick A, Baldwin AS, Paoletti F and Miller WH Jr: Inhibition of DNA methyltransferase activates tumor necrosis factor alpha-induced monocytic differentiation in acute myeloid leukemia cells. *Cancer Res*, 2009; 69:55-64
- 43) Delgado-Calle J, Sañudo C, Sánchez-Verde L, García-Renedo RJ, Arozamena J and Riancho JA: Epigenetic regulation of alkaline phosphatase in human cells of the osteoblastic lineage. *Bone*, 2011; 49:830-838
- 44) Speer MY, Li X, Hiremath PG, Giachelli CM: Runx2/Cbfa1, but not loss of myocardin, is required for smooth muscle cell lineage reprogramming toward osteochondrogenesis. *J Cell Biochem*, 2010; 110:935-947
- 45) Bestor TH: The DNA methyltransferase of mammals. *Hum Mol Genet*, 2000; 9:2395-2402
- 46) Jeltsch A: Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *ChemBiochem*, 2002; 3:274-293
- 47) Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, Cui H, Gabo K, Rongione M, Webster M, Ji H, Potash JB, Sabuncyan S and Feinberg AP: The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet*, 2009; 41:178-86
- 48) Marumoto T, Hishikawa K, Yoshikawa M, Hirahashi J, Kawachi S and Fujita T: Histone deacetylase modulates the proinflammatory and fibrotic changes in tubulointerstitial injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010; 298:F133-F141
- 49) Pang M and Zhuang S: Histone deacetylase: a potential therapeutic target for fibrotic disorders. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010; 335:266-272
- 50) Kinugasa F, Noto T, Matsuoka H, Urano Y, Sudo Y, Takakura S and Mutoh S: Prevention of renal interstitial fibrosis via histone deacetylase inhibition in rats with unilateral ureteral obstruction. *Transpl Immunol*, 2010; 23:18-23
- 51) Sun CY, Chang SC and Wu MS: Suppression of Klotho expression by protein-bound uremic toxins is associated with increased DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation. *Kidney Int*, 2012; 81:640-650
- 52) Bechtel W, McGoohan S, Zeisberg EM, Miller GA, Kalbacher H, Salant DJ, Miller CA, Kalluri R and Zeisberg M: Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat Med*, 2010; 16:544-550
- 53) Westerberg PA, Linde T, Wikström B, Ljunggren O, Stridsberg M and Larsson TE: Regulation of fibroblast growth factor-23 in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*, 2007; 22:3202-3207
- 54) Ambrus C, Molnar MZ, Czira ME, Rosivall L, Kiss I, Rempert A, Szathmari M and Mucsi I: Calcium, phosphate and parathyroid metabolism in kidney transplanted patients. *Int Urol Nephrol*, 2009; 41:1029-1038
- 55) Glier MB, Green TJ and Devlin AM: Methyl nutrients, DNA methylation, and cardiovascular disease. *Mol Nutr Food Res*, 2013
- 56) Choi JH, Nam KH, Kim J, Baek MW, Park JE, Park HY, Kwon HJ, Kwon OS, Kim DY and Oh GT: Trichostatin A exacerbates atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005; 25:2404-2409
- 57) Okamoto H, Fujioka Y, Takahashi A, Takahashi T, Taniguchi T, Ishikawa Y and Yokoyama M: Trichostatin A, an inhibitor of histone deacetylase, inhibits smooth muscle cell proliferation via induction of p21(WAF1). *J Atheroscler Thromb*, 2006; 13:183-191
- 58) Findeisen HM, Gizard F, Zhao Y, Qing H, Heywood EB, Jones KL, Cohn D and Bruemmer D: Epigenetic regulation of vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation by histone deacetylase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011; 31:851-860

Effect of trichostatin A and 5-aza-2'-deoxycytidine on the development of vascular calcification

Takuya AZECHI

Department of Clinical Chemistry, Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences

In the present study, we investigated the effect of trichostatin A, a histone deacetylase (HDAC) inhibitor, and 5-aza-2'-deoxycytidine, a DNA methyltransferase (DNMT) inhibitor, on the inorganic phosphorus (Pi)-induced mineralization of human aortic smooth muscle cells (HASMCs). We showed that these inhibitors increased the expression of osteogenic gene including alkaline phosphatase (ALP) and promoted the Pi-induced mineralization of HASMCs. Moreover, both treatment with phosphonoformic acid, a sodium-dependent phosphate transporter inhibitor, and suppression of the ALP expression inhibited these inhibitors-promoted mineralization of HASMCs. These data suggest that inhibition of HDAC or DNMT enhances the mineralization of HASMCs with Pi stimulation via upregulation of the ALP expression.