

動脈石灰化に対する
エピジェネティクス制御酵素阻害剤の影響

Effect of epigenetics-regulated enzyme inhibitors on vascular calcification

D101 畦地 拓哉 (Azechi, Takuya)

論文内容の要旨

【背景】慢性腎臓病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、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、心血管疾患が慢性腎臓病患者の主要な死因であることが明らかにされており、透析患者（慢性腎臓病 stage 5D）の死亡原因の約 50%が心血管疾患であることが報告されている。動脈石灰化は慢性腎臓病の主要な合併症であり、動脈組織へのカルシウム (Ca) 沈着を特徴とする血管病変の一種である。血管壁の石灰化は動脈の伸展性低下を招き、心血管リスクを増大させることが知られており、慢性腎臓病患者の予後規定因子と位置付けられている。したがって、動脈石灰化の発症・進展を抑制することは、慢性腎臓病患者の生命予後改善に直結すると考えられている。

近年、動脈石灰化は動脈平滑筋細胞を中心とした血管壁細胞が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動脈平滑筋細胞から骨芽様細胞への表現型変化が病因であると想定されているが、詳細な機序については不明な点が多く残されている。したがって、動脈平滑筋細胞の表現型変化のメカニズムを明らかにし、これを制御することは、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。

エピジェネティクスはヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) や DNA メチル基転移酵素 (DNMT) 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

イクス異常が関与する事例が既に報告されている。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、これら疾患に対し 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 の関与が示されており、Trichostatin A (TSA) などの HDAC 阻害剤が骨芽細胞分化を促進することが報告されている。また、DNMT 阻害剤である 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) も骨芽細胞分化を促進することから、HDAC や DNMT の阻害剤は動脈平滑筋細胞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、本研究では、代表的な HDAC 及び DNMT 阻害剤である TSA 及び 5-aza-dC を用いて、各阻害剤の①骨形成関連遺伝子発現への影響、②Pi 誘発石灰化に対する影響を比較検討することにより、HDAC 及び DNMT の動脈石灰化への関与を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】本研究では、各阻害剤を処理した正常ヒト大動脈平滑筋細胞 (HASMCs) から全 RNA を抽出し、逆転写反応後、定量 PCR により骨形成関連因子の mRNA 発現変動を解析した。また、HASMCs の石灰化は Pi (3.0 mM) 処理により誘導し、Ca 沈着量の定量並びに von Kossa 染色により石灰化の評価を行った。さらに、RNA 干渉法により石灰化に対する ALP 又は DNMT1 発現抑制の影響を検討した。

1) 動脈石灰化に対する TSA の影響

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。また、TSA 処理により骨形成関連因子である ALP、Runx2、Pit-1 の mRNA 発現は有意に増加した。また、TSA 処理は ALP 活性を増加したことから、HASMCs の骨芽様細胞への表現型変化が生じていると考えられた。さらに、HASMCs への Pi 処理により石灰化が認められ、この石灰化は TSA 処理により促進された。これに加えて、Pi 流入阻害剤である PFA (phosphonoformic acid) の同時処理は、Pi 及び TSA 処理による石灰化を抑制した。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。また、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。この結果から、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。

2) 動脈石灰化に対する 5-aza-dC の影響

HASMCs への 5-aza-dC 処理は DNMT1 発現を抑制するとともに、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。これに加えて、5-aza-dC は ALP 活性を亢進したことから、TSA の場合と同様に HASMCs の骨芽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 処理による HASMCs の石灰化は、5-aza-dC 処理により促進された。さらに、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。したがって、TSA の場合と同様に 5-aza-dC も 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。また、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。この結果から、5-aza-dC による ALP 発現増大及び石灰化悪化には DNMT1 発現低下が関与する可能性が示唆された。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。したがって、5-aza-dC の石灰化亢進作用にも、ALP 発現増大が重要な役割を担うと考えられた。

3) ALP プロモーター領域における DNA メチル化率の変化

一般に、多くの遺伝子ではプロモーター領域における DNA メチル化率はその遺伝子発現と負の相関性を示す。また、5-aza-dC は DNMT 阻害を介して DNA メチル化率を低下させる。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。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 ALP プロモーター活性を抑制することを明らかとした。したがって、5-aza-dC 処理による ALP 発現増大には、DNA メチル化率の減少が関与していると考えられた。

【総括】本研究結果より、各阻害剤による HDAC や DNMT 阻害は骨形成関連因子の発現を増大することを示し、Pi により誘発される動脈平滑筋細胞の石灰化を悪化させることを明らかとした。この石灰化の悪化には、Pi の細胞内過剰流入と ALP 発現増大が寄与する可能性を示していた。また、動脈平滑筋細胞において、ALP 発現は HDAC や DNMT を介したエピジェネティックな制御を受けている可能性が示唆された。以上より本研究では、HDAC や DNMT 阻害を介したエピジェネティクス制御は動脈平滑筋細胞の表現型に影響を及ぼし、動脈石灰化の発症・進展を悪化させる可能性を示した。これらの知見から、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・予防法を確立する手掛かりになると期待される。

学位授与機関	星薬科大学
氏名（本籍）	<small>アセチ タカヤ</small> 畦地 拓哉 （北海道）
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	甲 第167号
学位授与年月日	平成26年3月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者
学位論文の題名	動脈石灰化に対するエピジェネティクス制御酵素阻害剤の影響

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名	畦地 拓哉		
論文審査担当者	主 査	学 長	田中 隆治 
	副 査	教 授	辻 勉 
	副 査	教 授	成田 年 
	副 査	准教授	輪千 浩史 
題 目	動脈石灰化に対するエピジェネティクス制御酵素阻害剤の影響		
<p>慢性腎臓病は、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、透析患者の死亡原因の約半数が心血管疾患であることが報告されている。動脈石灰化は動脈組織へのカルシウム沈着を特徴とする慢性腎臓病の主要血管病病変の一種である。血管壁の発症・進展を抑制する事は、慢性腎臓病患者の生命予後改善に重要であると考えられる。近年、動脈石灰化は動脈平滑筋細胞を中心とした血管壁細胞が能動的に石灰化を引き起こすことが明らかとなりつつある。この能動的な動脈石灰化過程は、動脈平滑筋細胞から骨芽細胞への表現型変化が原因であり、骨形成と非常に類似していることが報告されているが、その詳細な機序に不明な点が多い。ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) や DNA メチル基転移酵素 (DNMT) による DNA 塩基配列非依存的な修飾はエピジェネティクスとよばれ、遺伝子発現は制御されることで注目されている。骨芽細胞分化においても HDAC や DNMT の関与が報告されていることから、動脈平滑筋細胞の表現型変化にも影響することが推測される。そこで本研究では、エピジェネティクスと動脈平滑筋細胞の表現型変化に着目し、代表的な HDAC および DNMT 阻害剤を用いて、骨形成関連遺伝子発現への影響と無機りん (Pi) 誘発石灰化に対する影響を多角的に検討した。</p>			

その結果、動脈平滑筋細胞へ HDAC 阻害剤である Trichostatin A (TSA) 及び DNMT 阻害剤である 5-aza'-2-deoxycytidine (5-aza-dC) の処理により、骨形成関連因子である ALP, Runx2, Pit-1 の各 mRNA 発現は有意に増加し、Pi 誘発石灰化も顕著に亢進し、することを明らかにした。さらに、それら阻害剤の処理では、ALP mRNA 発現と酵素活性の亢進が顕著に増加したことから、siRNA による ALP の遺伝子発現を抑制したところ、TSA 処理および 5-aza-dC 処理による石灰化亢進を抑制ことも見出した。一般に、多くの遺伝子ではプロモーター領域における DNA メチル化率は、その遺伝子発現を負に調節することが知られていることから、動脈平滑筋細胞に 5-aza-dC 処理し ALP プロモーター領域の DNA メチル化率を検討したところ、5-aza-dC 処理は、DNMT1 の発現を抑制し ALP プロモーター領域の DNA メチル化率を低下することを明らかにした。これらの研究成果は、HDAC や DNMT 阻害を介したエピジェネティクス制御は、動脈平滑筋細胞の骨芽細胞様への表現型の変化に影響し、動脈石灰化の発症・進展を悪化させる、特に、ALP 発現には HDAC や DNMT を介したエピジェネティクスな制御を受けている可能性を見出した。近年、HDAC や DNMT 阻害剤の開発・臨床応用が行われ、慢性腎障害への臨床応用も期待されている。しかし、慢性腎障害の進行程度に伴い血中リン濃度は上昇することが知られていることから、その使用に注意を払う必要がある。エピジェネティクスを制御する修飾酵素の観点から動脈石灰化の新たな治療と予防に関して、本研究は重要な知見を与えた。本論文は、全体にわたり正確に表現されており、まとまりある論文構成となっている。したがって、博士（薬学）に相応しい内容であると判断する。