189　高リン血症誘発性血管石灰化におけるIhhシグナルの関与	天野　克比古

【目的】脊椎動物を基本とする生体はリン酸カルシウムを貯蔵させる骨形成により強固な骨格を形成し多彩な運動や防御を可能にする一方、他の組織では石灰化が生じないような制御が働いている。しかし、老化や動脈硬化、高血圧、糖尿病、慢性腎不全、透析などに伴い病的な血管石灰化が認められるようになり、血管の梗塞により重篤な合併症に関連する。カルシウム・リンの血中濃度は骨―腎臓―腸管というネットワークにより恒常性が保たれており、各臓器の間をホルモンが調節している。骨では骨吸収により、腎臓では再吸収と排泄により、腸管では吸収によりカルシウム・リン濃度を調節している。近年の研究より Fibroblast growth factor 23（FGF23）-Klotho はリン利尿ホルモンとその受容体として同定され、生体内におけるリンの恒常性維持に必須であることが報告された。そして *Klotho* 欠損マウスはリンの排泄障害を生じ、高リン血症由来の早老症や血管の石灰化という病態を呈するが、その詳細な分子機序は解明されていない。Indian hedgehog（Ihh）は生理的な骨軟骨形成において必須的役割を果たしている一方で、血管の形成や石灰化などの病態への関与や機能的役割は未だ解明されていない。そこで本研究では、まず Ihh を血管局所因子として仮設を立て血管平滑筋細胞特異的に遺伝子発現を欠損させたマウスを作製し表現型を検索することで、Ihh シグナルの血管形成や血管構造の維持への役割の有無を検討することを目的とした。さらに高リン血症に伴う血管石灰化については局所的因子の関与や相互作用については不明であったため、*Klotho* 欠損マウスの解析を進めることでこの病態における Ihh シグナルの関与や影響を検討することを目的とした。

【方法】過剰麻酔にて α-Klotho マウスを Sacrifice し、採血を行い、大動脈、心臓、両側の腎臓および肺組織を摘出し、各々を用途に応じて凍結保存もしくは 70%エタノールで固定した。大動脈は腎動脈分岐部より同定し、中枢側に剥離をすすめ大動脈弓基部で切離し、摘出した。

【結果】個体の尾の一部を採取し cDNA を精製し Genotyping PCR を実施した結果、WT および KO のバンドが検出されこれにより遺伝子型の解析方法の確立を行った。8 週齢における各個体の全長および体重の測定を行い、α-Klotho homo 変異体は発育障害を生じていることが見出された。臓器の評価として、大動脈と心臓を含む心血管系と腎臓に着目して microCT による評価を行った。その結果、α-Klotho homo 変異体において大動脈（弓部）および腎臓にて著明な石灰化の蓄積が観察された。交配における fertility が低かったため当初からの研究実施進度は遅れているが、今後も継続して高リン血症に由来する血管石灰化における Ihh シグナルの関与および役割について研究することを考えている。

血管石灰化の機序



189. 高リン血症誘発性血管石灰化における Ihh シグナルの関与

天野　克比古

大阪大学 大学院歯学研究科 第一口腔外科教室

Key words：高リン血症，血管の石灰化，Ihh シグナル，Klotho

緒　言

脊椎動物を基本とする生体はリン酸カルシウムを貯蔵させる骨形成により強固な骨格を形成し多彩な運動や防御を可能にする一方、他の組織では石灰化が生じないような制御が働いている。動脈は血管内皮細胞や血管平滑筋細胞を含む中膜、外膜から構成され、通常では石灰化しない柔軟な組織として拡張と収縮を行っている。しかし、老化や動脈硬化、高血圧、糖尿病、慢性腎不全、透析などに伴い病的な血管石灰化が認められるようになり、血管の梗塞により重篤な合併症に関連する。

血管平滑筋細胞のリプログラミングでは骨芽細胞分化に必須である Runt-related transcription factor 2（Runx2）、Muscle segment homeobox（Msx）、Osterix といった転写因子の関与が示唆されている。一方、主要電解質であるカルシウム・リンの血中濃度は骨―腎臓―腸管というネットワークにより恒常性が保たれており、各臓器の間をホルモンが調節している。骨では骨吸収により、腎臓では再吸収と排泄により、腸管では吸収によりカルシウム・リン濃度を調節している。近年の研究より Fibroblast growth factor 23（FGF23）-Klotho はリン利尿ホルモンとその受容体として同定され、生体内におけるリンの恒常性維持に必須であることが報告された。そして *Klotho* 欠損マウスはリンの排泄障害を生じ、高リン血症由来の早老症や血管の石灰化という病態を呈する［1］。類似する病態として、慢性腎不全では持続的な高リン血症から血管内膜から中膜にかけて高度な石灰化を生じ心血管イベントによる死亡率増加が認められる［2］。このように血管の石灰化に関連する機序を考えた場合、主に血管平滑筋細胞が骨形成能を獲得する分化やカルシウム・リンの電解質異常という全身的な要因の他には、リン酸カルシウムの結晶沈着を生じる微小環境における局所的要因が考えられている。

Indian hedgehog（Ihh）は生理的な骨軟骨形成において必須的役割を果たしている主要因子である。骨端軟骨部の成長を担う内軟骨性骨形成では Bone morphogenetic protein（BMP）シグナルから誘導される Runx2 や Msx2 が 前肥大化軟骨層で Ihh 発現を促進し、協調して X 型コラーゲンの産生や軟骨細胞の肥大化、石灰化を生ずることが報告されている［3］。しかしながら、血管の形成や石灰化などの病態における Ihh シグナルの関与や機能的役割、その制御機序について渉猟しうる限りでは未だ全く報告されていない。そこで本研究では、まず Ihh を血管局所因子として仮設を立て血管平滑筋細胞特異的に遺伝子発現を欠損させたマウスを作製し表現型を検索することで、Ihh シグナルの血管形成や血管構造の維持への役割の有無を検討することを目的とした。さらに高リン血症に伴う血管石灰化については局所的因子の関与や相互作用については全く検討されていないため、*Klotho* 欠損マウスの解析を進めることで、この病態における Ihh シグナルの関与や影響を検討することを研究計画として挙げた［4］。

方　法

α-Klotho KO（B6.129K l t m 1 Y i n/Jcl）マウスは MTA の同意の下、日本クレア（大阪）より購入した。α-Klotho KO はβ-geo（E.Coli（クラス 1）由来β-ガラクトシダーゼ遺伝子（*LacZ*）およびネオマイン耐性遺伝子（*neo*）の融合遺伝子）とバクテリオファージ P1（クラス 1）由来 loxP 配列を供与核酸として有している。過剰麻酔にてα-Klotho マウスを Sacrifice し、採血を行い、大動脈、心臓、両側の腎臓および肺組織を摘出し、各々を用途に応じて凍結保存もしくは 70%エタノールで固定した。大動脈は腎動脈分岐部より同定し、中枢側に剥離をすすめ大動脈弓基部で切離

し、摘出した。助成金開始後、本研究計画に基づき学内の遺伝子組換え実験計画書および動物実験計画書の更新を行い、2018 年 5 月に承認された。遺伝子組換え実験および動物実験は委員会が承認するプロトコールに基づいて行われた。

マウス Genotyping にはマウス尾もしくは耳部の組織を一部摘出し、Lysis Buffer で溶解した後、通法通り精製したゲノム DNA を使用した。Genotyping PCR は Taq polymerase（Takara）を用いた conventional PCR 法にて行った。マイクロ CT 撮影は、マウスから目的臓器を摘出し 70%アルコールに浸漬し、CT スキャン R_mCT-2（Rigaku）を用いてスキャンを行い、ソフトウェア TRI/3D-BON （RATOC system）を用いて構築を行った。

結果および考察

1. α-Klotho KO マウスラインの確立と表現型

kl/kl マウスはα-Klotho 挿入突然変異マウスであり、α-Klotho の遺伝子発現は極めて低く機能的には無視できるものの null mutation ではなく、また低リン食投与によりその発現が部分的に回復し変異表現型が改善することが報告されている。そのため、我々は日本クレアよりα-Klotho KO マウスを購入し null mutation を用いて研究を行うこととした。2018 年 11 月下旬より当研究室の動物実験施設内での飼育を開始し、まず始めに C57BL6 と交配を行い、ライン化を行った。当初、交配における fertility が低かったため、研究実施進度は遅れている。

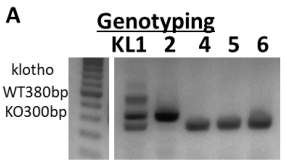
その後、α-Klotho Hetero の雌雄の交配グループをいくつか作製し、α-Klotho homo 個体の収集を行い表現型の評価を行った。図 1 に現在までのサンプリング可能であった個体情報とデータの一部を示している。個体の尾の一部を採取し cDNA を精製し Genotyping PCR を実施した結果、WT および KO のバンドが検出されこれにより遺伝子型の解析方法の確立を行った（図 1a）。8 週齢における各個体の全長および体重の測定を行い、α-Klotho homo 変異体は発育障害を生じていることが見出された（図 1bc）。

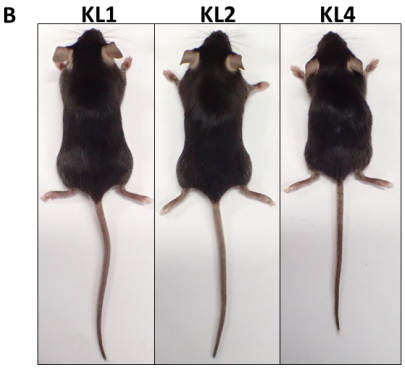
2. α-Klotho KO マウスの心血管系と腎臓の評価

臓器の評価として、研究計画に沿うように大動脈と心臓を含む心血管系と腎臓に着目して評価を行った。70%エタノールで固定後に microCT を撮影し、軟組織陰影と硬組織陰影に関して 3D 構築を行った。その結果、図 2 に示すようにα-Klotho homo 変異体において大動脈（弓部）および腎臓にて著明な石灰化の蓄積が観察された。

3. 考察

α-Klotho homo 変異体では以前の報告に一致するように著明な石灰化の蓄積が観察され、今後、心血管系と腎臓において Ihh がどのように関連しているかということを検討する。現在、心血管系と腎臓においてより特異的に石灰化部位を採取するための方法を模索しており、確立を出来次第、qPCR もしくは RNA Seq を用いてヘッジホッグシグナル関連因子の発現の変化について調べる予定である。緒言に述べたように本研究では血管石灰化におけるリン代謝異常が局所因子とどのように関係するか検討する計画である。すなわちα-Klotho homo マウスにおいて血管平滑筋特異的に *Ihh* を欠損させα-Klotho homo マウスの表現型が変化しうるかを検討する。α-Klotho homo マウスα-Klotho$^{-/-}$：SM22-Cre: Ihh $^{f/f}$両グループ間で主に Life Span、血中リン濃度、血管石灰化について差異が生じるかを評価する。これら *in vivo* における結果は、心血管系と腎臓において生ずる石灰化のメカニズムの理解に繋がると考えられる。





C

Clone NO.	aKlotho	Parents	Age at sampling	sex	weigh	total length
KL1	Het	E001/E003	8w	F	19.31g	15.65cm
KL2	WT	E001/E003	8w	F	18.43	15.47
~~KL3~~	~~none~~	~~E001/E003~~	~~8w~~	~~F~~	~~19.24~~	~~15.79~~
KL4	Homo	E001/E003	8w	F	10.77	14.5
KL5	Homo	E001/E003	6w	M	10.17g	
KL6	Homo	E001/E003	8w	M	12.3g	13.5

図 1.　α-Klotho KO マウスラインの確立と表現型

a）α-Klotho マウスの Genotyping の一例。WT380 bp と KO300 bp のバンドを示す。

b）8 週齢の Gross phenotype。左より KL1/Hetero、KL2/WT、KL4/Homo＝ α-KlothoKO マウスを示す。KL4 にて発育障害が見られる。

c）現在までのサンプリング可能であった個体情報について示す。

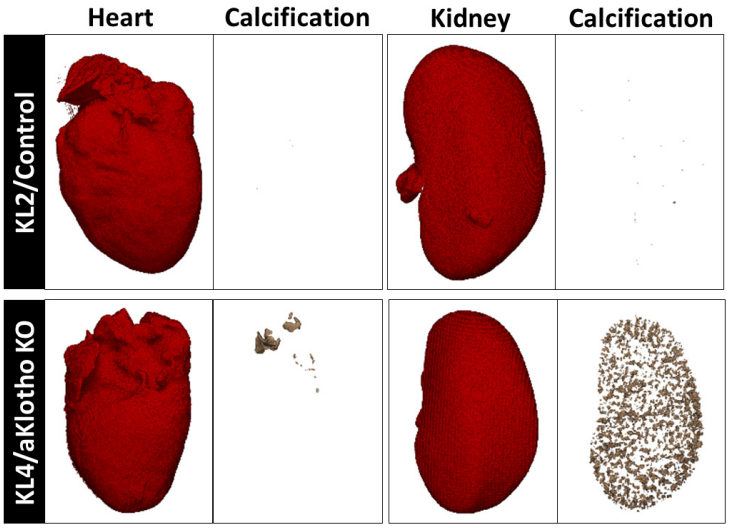


図 2.　α-Klotho KO マウスの心血管系と腎臓における石灰化

上段でKL2/WT、下段でKL4/Homoの各臓器のMicroCT画像を示す。各臓器の右側に検出された石灰化像を示している。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪大学大学院歯学研究科第一口腔外科教室の古郷幹彦教授、Beate Lansk 博士（Harvard School of Dental Medicine、教授→Radius Health、Executive Director）である。

文　献

1） Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. Nature. 1997 Nov 6;390(6655):45-51. PMID:9363890.

2） Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, Giachelli CM. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. Circ Res. 2011 Sep 2;109(6):697-711. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.234914. Review.PMID:21885837.

3） Amano K, Densmore M, Nishimura R, Lanske B. Indian hedgehog signaling regulates transcription and expression of collagen type X via Runx2/Smads interactions. J Biol Chem. 2014 Sep 5;289(36):24898-910. doi: 10.1074/jbc.M114.570507. Epub 2014 Jul 15. PMID:25028519.

4） Ohnishi M, Nakatani T, Lanske B, Razzaque MS. In vivo genetic evidence for suppressing vascular and soft-tissue calcification through the reduction of serum phosphate levels, even in the presence of high serum calcium and 1,25-dihydroxyvitamin d levels. Circ Cardiovasc Genet. 2009 Dec;2(6):583-90. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.108.847814. Epub 2009 Sep 21. PMID:20031638.