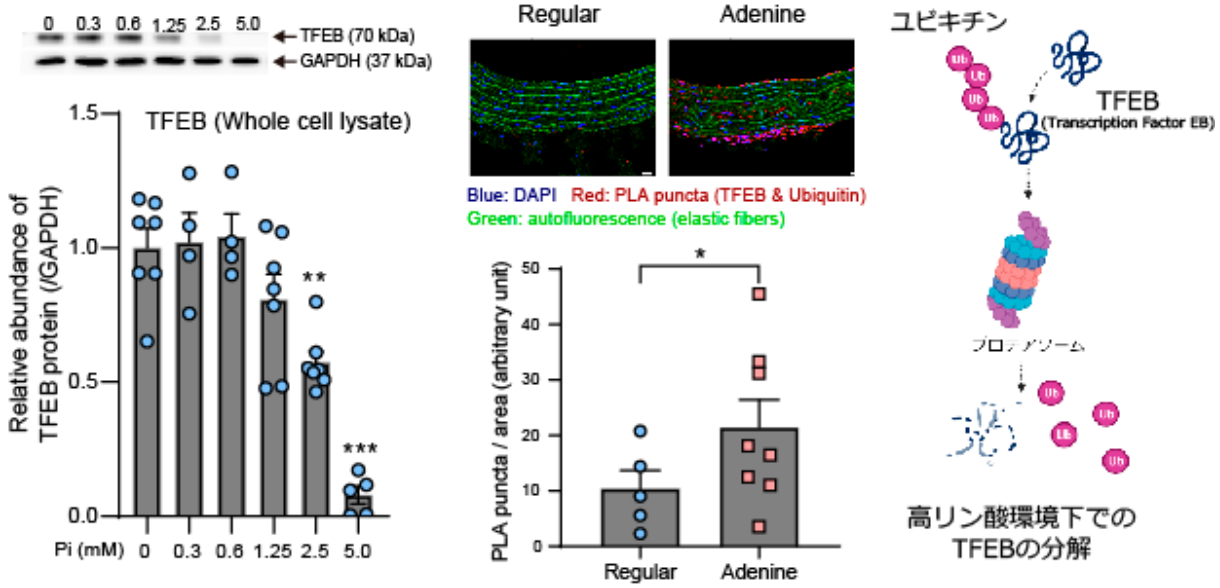
129　平滑筋ライソゾームを標的にした血管石灰化治療	石渡　遼

【目的】血管石灰化は、慢性腎不全の主要な合併症であり、慢性腎不全患者における心血管イベント関連死の危険因子である。高リン酸血症では、無機リン酸が石灰化基質の材料となるだけでなく、血管平滑筋細胞の形質転換を引き起こし、石灰化を誘導することが知られている。近年、高リン酸血症は血管平滑筋細胞におけるオートファジーーライソゾーム経路の機能不全を誘導することが示唆されたが、不全に至る機序は不明である。本研究では、ライソゾーム合成促進因子として注目されている転写因子 TFEB の機能不全が、血管石灰化の一因であるという仮説の基、TFEB の関与を明らかにし、潜在的な血管石灰化の治療戦略を見出すことを目的とし実験を行った。

【方法】ラットおよびヒトの大動脈平滑筋細胞、マウス大動脈器官培養系、ラット慢性腎不全モデルのそれぞれにおいて、高リン酸血症が血管平滑筋細胞における TFEB 発現に与える影響を検討した。ラットの慢性腎不全モデルはアデニン含有食の自由摂食により作製した。血管石灰化は、組織中のカルシウム沈着量の測定および、組織切片の Alizarin Red Stain（ARS）によって評価した。ユビキチン化 TFEB の定量は、Proximity Ligation Assay（PLA）によって行った。

【結果】高リン酸負荷下で、ラット、ヒトの大動脈平滑筋細胞およびマウス大動脈器官培養系において TFEB のタンパク質量はリン酸濃度依存性に低下した。一方、*Tfeb* の遺伝子発現はむしろ増加していた。ラット大動脈平滑筋細胞では、TFEB のノックダウンによってリン酸依存性の石灰化が増悪した。 ラット慢性腎不全モデルでは、5 週にかけて石灰化が亢進し、アデニン食中断後の 7 週では石灰化が退縮していた。 大動脈における TFEB のタンパク質量は、石灰化の形成期において減少し、石灰化の退縮期において増加する傾向にあった。 慢性腎不全ラットの大動脈組織では、タンパク質全体のユビキチン化が亢進すると共に、TFEB のユビキチン化が亢進していた。

本研究で得られた結果の概要



129. 平滑筋ライソゾームを標的にした血管石灰化治療

石渡　遼

防衛医科大学校 生理学講座

Key words：血管石灰化，慢性腎不全，高リン酸血症，ライソゾーム，TFEB

緒　言

血管石灰化は血管組織において異所性にリン酸カルシウムが蓄積する病態を指す。血管石灰化は慢性腎不全の主要な合併症であり、心血管イベント関連死の危険因子である。重症度の高い慢性腎不全患者では、GFR の低下に伴い高リン酸血症が発症する。無機リン酸は石灰化基質の材料となるだけでなく、血管平滑筋の形質転換を促し、血管石灰化を進行させることが知られているが、血管石灰化の詳細な発症メカニズムには不明な部分が多い。これまで種々のリン吸着剤が開発されてきたが、血管石灰化に対して効果の認められたものはない。また、血管中膜の石灰化に対する血管内治療の効果は限定的である。

近年、石灰化の発症に細胞内の分解経路であるオートファジーーライソゾーム経路が関わることが示唆されている［1］。これまで、オートファゴソームの形成阻害が血管石灰化を増悪させることが示されてきたが、ライソゾームの機能不全については報告が限られている。

Trascription Factor EB（TFEB）は、microphthalmia／transcription factor E（iT／TFE）ファミリーに属する転写因子である。Sardiello らによって TFEB がライソゾームの生合成に関わる遺伝子群の転写促進に関与することが示されて以来［2］、TFEB の機能が多く検討され、TFEB がライソゾーム生合成のマスター因子であると認識されるようになった。特に、神経科学の分野で TFEB の機能解析が進んでおり、ライソゾーム機能不全を原因とする種々の神経変性疾患に対する治療標的として TFEB が期待されている。近年、心血管病変でも TFEB が関与する可能性が示唆されており、血管内皮細胞の TFEB がアテローム性動脈硬化に対して保護的に働く旨の報告がある［3］。一方、血管平滑筋細胞における TFEB の機能は不明であり、血管石灰化との関連についても報告がない。本研究では、血管平滑筋細胞における TFEB が血管石灰化に対して保護的に働くという仮説の基、TFEB の関与を検討すると共に、TFEB が血管石灰化の潜在的な治療標的たりうるか明らかにすることを目的として実験を行った。

方　法

1. ラット血管平滑筋細胞の初代培養とリン酸による石灰化の誘導

生後 1 日目の Wistar ラットの新生仔より大動脈平滑筋細胞を採取し、初代培養を行った。初代培養にはコラゲナーゼを用いた酵素分散法を適用した。12 ウェルプレートに播種した平滑筋細胞を、リン酸バッファー（$Na_2H_2PO_4$／NaH_2PO_4、pH 7.4）を任意の濃度で添加した培養液中で 7 日間培養し、石灰化を誘導した。培養液は 2 日に一度交換した。

2. マウス大動脈組織の器官培養とリン酸による石灰化の誘導

野生型のマウス（C57/BL6、8 週齢、オス）から、胸部大動脈組織を採取し、1.7 mmol/L のリン酸バッファーを添加した培養液中で、1 日あるいは 5 日間培養した。培養液は 2 日に一度交換した。

3. ラット慢性腎不全モデルの作製と評価

野生型の Wistar ラット（10 週齢、オス）を通常食群とアデニン食群にランダムに振り分けた。通常食群には、日本クレア社から購入した通常試料（CE-2）を自由摂食させ、アデニン食群には、CE-2 に 0.75%のアデニンを添加し

たアデニン食を自由摂食させた。アデニン食群では、顕著な体重減少が認められたため、倫理面への配慮から、4 週以降は通常食に切り替えた。

4. 石灰化の評価

組織や細胞における石灰化の評価は、O-Cresolphtalein Complexone（OCPC）を用いたカルシウム量の定量によって行った。測定したカルシウム量をタンパク質の質量で補正したものをカルシウム蓄積量とした。組織切片における石灰化の評価には、Alizarin Red Stain（ARS）による染色で評価した。

結　果

1.　高リン酸環境下では血管平滑筋細胞における TFEB のタンパク質量が減少した

高リン酸環境が TFEB の発現に与える影響を検討するために、マウス大動脈組織の器官培養実験［4］を行った。野生型マウスの胸部大動脈組織を、1.7 mmol/L のリン酸バッファーを添加した培養液中で 1 日、あるいは 5 日培養したところ、顕著な大動脈組織中のカルシウム沈着が観察され、石灰化が生じていることが示唆された（図 1a）。大動脈組織中の TFEB のタンパク質量を Western Blot により検討したところ、培養 1 日でわずかに増加したが、培養 5 日では顕著な減少を示した（図 1b）。大動脈組織から作製したパラフィン組織切片に対して組織学的検討を行った結果を（図 1c）。に示す。培養 5 日目の大動脈組織では、ARS によって赤色に染まる石灰化部位において TFEB の減少が観察された。

次に、血管平滑筋細胞への直接的な影響を検討する目的で、ラット大動脈平滑筋細胞を様々な濃度のリン酸バッファーを添加した培養液中で 7 日間培養した。その結果、リン酸濃度依存性の石灰化の亢進が認められ（図 1d、e）、TFEB のタンパク質量はリン酸濃度依存性に低下していた（図 1f）。TFEB は核内で機能する転写因子であるため、核分画中の TFEB 発現も同様に検討した。核分画中の TFEB も同様にリン酸濃度依存性の減少を示した（図 1g）。これらの結果から、高リン酸環境下では、血管平滑筋細胞における TFEB タンパク質量が減少することが示唆される。次に、TFEB の減少が遺伝子発現レベルで生じている可能性を検討するために、定量的 Real Time PCR によりラット大動脈平滑筋細胞中の、Tfeb mRNA の発現を検討した。タンパク質の挙動とは逆で、*Tfeb* の遺伝子発現はむしろリン酸濃度依存性に増加していた（図 1h）。この結果から、TFEB の減少はタンパク質レベルで生じていることが示唆された。次に、ヒト大動脈平滑筋細胞でも同様の検討を行った。ヒト大動脈平滑筋細胞においても、リン酸濃度依存性の石灰化の亢進（図 1i、j）と、TFEB タンパク質の減少が認められた（図 1k）。

2.　TFEB のノックダウンによりリン酸依存性の石灰化が増悪した

TFEB が石灰化に対して保護的に働く可能性を検討するために、siRNA を用いたノックダウン実験を行った。ラット大動脈平滑筋細胞において、siRNA のトランスフェクションにより *Tfeb* の mRNA 発現は 0.15 倍に低下し、タンパク質発現は 0.41 倍に低下した（図 2a、b）。TFEB のノックダウン後に、5 日間 2.5 mmol/L のリン酸を添加した培養液中で培養したところ、TFEB ノックダウン群において、石灰化の程度が優位に増加していた（図 2c）。この結果から、TFEB はリン酸依存性の石灰化に対して保護的に働く可能性が示唆される。

3.　TFEB 発現は、ラット慢性腎不全モデルにおいて石灰化の段階に応じて変動した

慢性腎不全の臨床病態に則した実験系において、TFEB が減少するか、石灰化との相関があるか、検討するためにアデニン食摂取による慢性腎不全モデル［5］を作製し、検討を行った。このモデルでは、飼料中のアデニの代謝物の結晶が腎尿細管に蓄積することで腎不全が発症する。アデニン食群では、顕著な体重減少が見られたため、アデニン食を 4 週で中断し、その後は通常食を与えた。図 3a に、実験群をまとめた。これまで、3 週の通常食群、3 週のアデニン食群、5 週の通常食群、5 週のアデニン食群、7 週のアデニン食群について検討を行っている。各実験群のエンドポイントにおける血漿の検査を行ったところ、通常食とアデニン食群の間で血漿カルシウム濃度には差を認めなかったのに対して、血漿リン酸濃度はアデニン食群で有意に増加していた。

アデニン食群において、大動脈組織中のカルシウム沈着量は、3 週から徐々に増加し、5 週で顕著な増加を認めた（図 3c）。一方、7 週においては 5 週と比較し低下しており、アデニン食を中止した後に石灰化の退縮が起きているこ

とが示唆された（図 3c）。大動脈組織中の TFEB 発現の比較を行ったところ、通常食群では、3〜5 週にかけて安定していたのに対して、アデニン食群では偏差の大きい分布を示した（図 3d）。特に 5 週においては、アデニン食群で通常食群に対して有意に偏差が大きく（P=0.01、F test）、TFEB 発現量は二峰性の分布を示した（図 3d）。石灰化の退縮が進行していると思われる 7 週のアデニン食群では、TFEB 発現はむしろ通常食群よりも高くなっていた（図 3d）。これらの結果から、慢性腎不全における石灰化の進行段階に合わせて TFEB の発現が変動する可能性が示唆された。図 3e は、大動脈組織中のカルシウム沈着量を横軸に、TFEB 発現を縦軸プロットしたものである。アデニン食群について近似曲線を取ると、石灰化の程度の低い初期段階において TFEB が減少し、石灰化が形成された後期の段階においては TFEB 発現が増加している傾向があった（図 3e）。

4. 慢性腎不全ラットの大動脈組織では、TFEB のユビキチン化が亢進していた

高リン酸環境下において、TFEB の mRNA 発現はむしろ増加していたことから、TFEB の減少はタンパク質レベルの現象であることが示唆された。ユビキチンープロテアソーム系は、タンパク質分解の主要な経路の一つである。この経路では、ユビキチンと呼ばれるペプチドが結合したタンパク質がプロテアソームにより認識され、分解を受ける。慢性腎不全を発症した 5 週のアデニン食群の大動脈組織では、タンパク質全体のユビキチン化が亢進しており（図 4a）、ユビキチンープロテアソーム系が活性されていることが示唆された。さらに、免疫染色により、アデニン食群の大動脈組織では、TFEB とユビキチンが共染色された（図 4b）。TFEB のユビキチン化を定量的に評価する目的で、Proximity Ligation Assay（PLA）を行った結果を図 4c に示す。このアッセイでは、2 分子が十分近い距離にある時にシグナルが検出され、ここでは、ユビキチン化された TFEB がドット状のシグナルとして検出される。単位面積あたりのユビキチン化 TFEB の数は 5 週のアデニン食群において通常食群に対して有意に多く（図 4c）、慢性腎不全ラットの大動脈組織では、TFEB のユビキチン化が亢進していることが示唆された。

考　察

本研究では、ライソゾーム合成促進因子である TFEB が高リン酸血症下で減少することが、血管石灰化の一因であること、TFEB の分解にはユビキチンープロテアソーム系が関与する可能性のあることを示した。これまで、TFEB と血管石灰化との関連を報告した研究はなく、本研究は、石灰化の発症メカニズムの一端を埋めるものである。

血管石灰化とユビキチンープロテアソーム系との関与を示唆している報告は少ない。Kwon らの報告により、MDM2 というタンパク質の分解が石灰化の一因であることが報告されている［6］。本研究では、さらに慢性腎不全ラットの大動脈においてタンパク質全体のユビキチン化が亢進している可能性を示した。

本研究は、TFEB が血管石灰化の潜在的な治療標的となり得ることを示唆している。今後は、TFEB の過大発現および TFEB の分解抑制により血管石灰化の治療が可能か検討していき、血管石灰化の内科的治療の実現につなげてゆきたい。

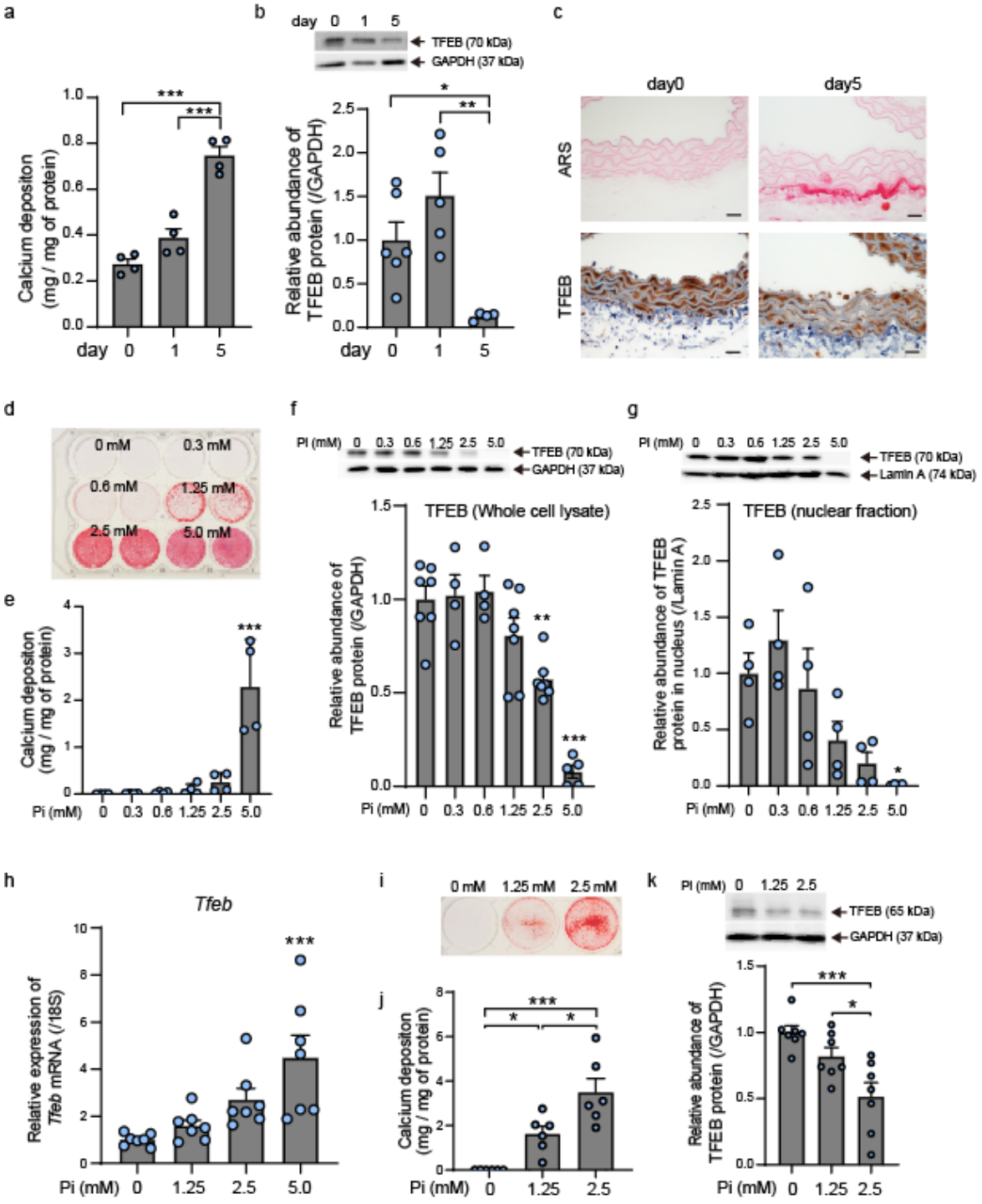


図 1. 高リン酸環境における血管石灰化と TFEB の減少

a～c） マウス器官培養系における a）カルシウム沈着、b）TFEB発現、c）ARSによる石灰化の評価と免疫染色によるTFEB発現の評価（スケールバー：20 μm）。

d～h）ラット大動脈平滑筋細胞における d、e）石灰化の形成、f）細胞溶解液中のTFEB発現、g）核分画中のTFEB発現、h）TfebのmRNA発現。

i～k） ヒト大動脈平滑筋細胞における i、j）石灰化の形成、k）TFEB発現。

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests.

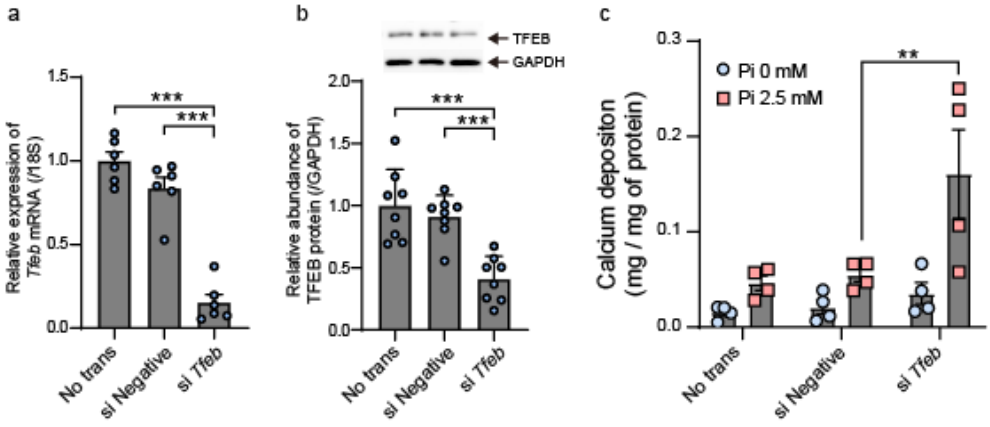


図 2. TFEB のノックダウンによるリン酸依存性の石灰化の増悪

a、b）siRNA トランスフェクション後のラット大動脈平滑筋細胞における a）Tfeb の mRNA 発現、b）TFEB のタンパク質発現。

c） siRNA トランスフェクション後にリン酸添加を 5 日間行った後のカルシウム蓄積。

$^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests.

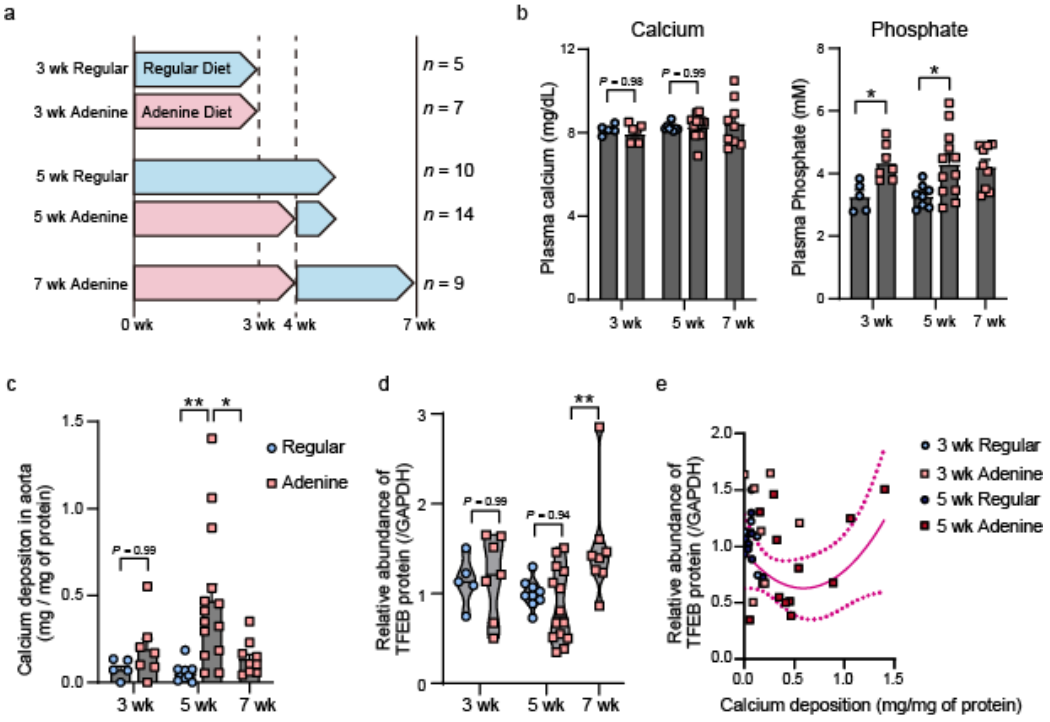


図 3. ラット慢性腎不全モデルにおける石灰化と TFEB 発現の相関

a） 検討を行った実験群のまとめ。

b～d）各実験群のエンドポイントにおける b）血漿カルシウム濃度と血漿リン酸濃度の比較、c）カルシウム沈着量、d）大動脈組織中の TFEB 発現。

e） 3 週および 5 週の実験群の大動脈組織中のカルシウム沈着量と TFEB 発現の相関。アデニン食群について近似曲線（実線）と 95%信頼区間（点線）を記載した。

$^{*}P<0.05$ and $^{**}P<0.01$ by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests (b~e).

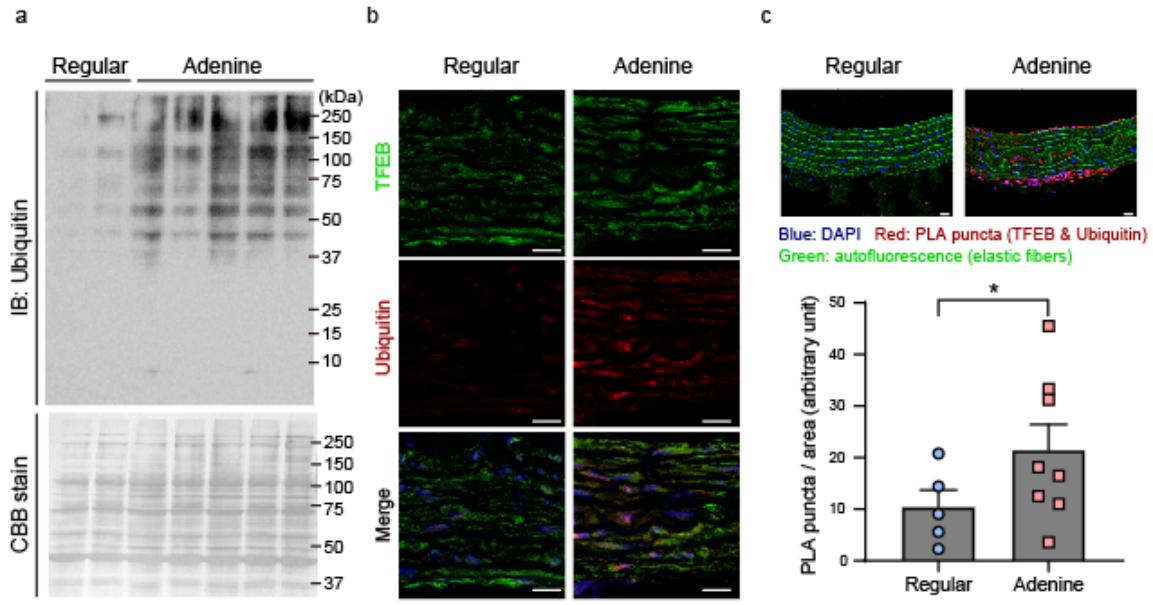


図 4. 慢性腎不全ラットの大動脈組織における TFEB のユビキチン化の亢進。

a) 5 週の大動脈組織におけるタンパク質のユビキチン化の検討。上は、抗ユビキチン抗体によるウェスタンブロットを表し、下は同じメンブレンの CBB 染色を表す。

b、c) 5 週の大動脈組織切片の b) 免疫染色（緑：TFEB、赤：ユビキチン）、c) PLA assay（赤：ユビキチン化 TFEB、下：単位面積あたりのシグナル数の比較）。*P＜0.05 by unpaired t-test with Welch's correction. スケールバーは 20 μ m。

文 献

1) Dai XY, Zhao MM, Cai Y, Guan QC, Zhao Y, Guan Y, et al. Phosphate-induced autophagy counteracts vascular calcification by reducing matrix vesicle release. Kidney Int. 2013;83(6):1042-51. Epub 2013/02/01. doi: 10.1038/ki.2012.482. PubMed PMID: 23364520.

2) Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, Medina DL, Valenza M, Gennarino VA, et al. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. Science (New York, NY). 2009;325(5939):473-7. Epub 2009/06/27. doi: 10.1126/science.1174447. PubMed PMID: 19556463.

3) Fan Y, Lu H, Liang W, Garcia-Barrio MT, Guo Y, Zhang J, et al. Endothelial TFEB (Transcription Factor EB) Positively Regulates Postischemic Angiogenesis. Circ Res. 2018;122(7):945-57. Epub 2018/02/23. doi: 10.1161/circresaha.118.312672. PubMed PMID: 29467198; PubMed Central PMCID: PMCPMC5918429.

4) Akiyoshi T, Ota H, Iijima K, Son BK, Kahyo T, Setou M, et al. A novel organ culture model of aorta for vascular calcification. Atherosclerosis. 2016;244:51-8. Epub 2015/11/20. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.11.005. PubMed PMID: 26584139.

5) Diwan V, Brown L, Gobe GC. Adenine-induced chronic kidney disease in rats. Nephrology (Carlton). 2018;23(1):5-11. Epub 2017/10/17. doi: 10.1111/nep.13180. PubMed PMID: 29030945.

6) Kwon DH, Eom GH, Ko JH, Shin S, Joung H, Choe N, et al. MDM2 E3 ligase-mediated ubiquitination and degradation of HDAC1 in vascular calcification. Nat Commun. 2016;7:10492. Epub 2016/02/03. doi: 10.1038/ncomms10492. PubMed PMID: 26832969; PubMed Central PMCID: PMCPMC4740400.