

論文の内容の要旨

論文題目

血管石灰化の分子機序における血管平滑筋細胞の老化形質転換の関与

-長寿遺伝子 Sirt1 による血管石灰化抑制機序-

指導教員 大内尉義 教授

東京大学医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

生殖発達加齢医学専攻

竹村 彩

高齢者循環器疾患を考える上で血管石灰化は大きな問題であり、特に血管中膜に起こるメンケベルグ型石灰沈着は脈圧増大や血圧変動を惹起し、高齢者高血圧の特徴を呈する。最終的に相対的臓器虚血を誘発し、心血管イベント発症に大きく関与する。従来、血管石灰化は動脈硬化の終末像として受動的カルシウム沈着により形成されると考えられていたが、最近になり血管壁細胞、特に血管平滑筋細胞（SMC）が能動的に石灰化促進方向へと作動し、骨化と極めて類似の機構による病態、いわゆる「cell-mediated process」が主体であると考えられている。一方、動脈硬化の形成過程において、近年、血管構成細胞の細胞老化形質の存在が確認されている。細胞老化は 2 つの現象がある。細胞分裂を経ずストレス刺激により誘導される老化（premature senescence）と、細胞分裂を重ねたことによる分裂寿命を意味する老化（replicative senescence）で

ある。ほとんどの細胞は細胞分裂数に限りがあり、細胞分裂を経て老化する。

実際、動脈硬化巣の形成において、血管構成細胞である内皮細胞と平滑筋細胞の両細胞での老化形質の存在（Senescence associated β -gal 染色による陽性細胞）は報告されている。しかし、血管平滑筋細胞における細胞老化の形質転換に関しては比較的報告が少なく、特に血管石灰化現象における細胞老化の関わりについての研究はほとんどされていない。よって本研究は血管石灰化の形成過程において血管平滑筋細胞の細胞老化形質転換がどのように関与しているのか解明することを目的とした。特に、長寿遺伝子として知られている NAD 依存性脱アセチル化酵素 Sir2 のヒトホモログである Sirt1 の関与に注目し実験を進めた。

血管石灰化の発症機序の一つとして腎不全における高リン血症に注目し、0.75%アデニン含有餌によるラット腎不全モデルを用いた。腎不全誘導 8 週間の時点において、sacrifice する直前にレントゲン側面像を確認したところ、広範にわたる大動脈の石灰化像を認めた。アデニン投与により腎不全を引き起こし、血清クレアチニンの著明な上昇（腎不全群 3.0 ± 0.9 mg/dL vs. コントロール群 0.3 ± 0.0 mg/dL）を認め、尿中アルブミン排泄の著明な上昇（腎不全群 49.9 ± 21.8 mg/g・Cre vs. コントロール群 0.0 ± 0.0 mg/g・Cre）を認め、さらに高リン血症（腎不全群 18.9 ± 4.7 mg/dL vs. コントロール群 9.8 ± 0.9 mg/dL）を認めた。開胸後にも著明な石灰化が再確認された。大動脈切片の von Kossa 染色において、全周性の中膜の石灰化を認め、病理学的にメンケベルグ型を呈していた。また老化形質

をとった細胞の存在および局在を調べるために、SA β -gal 染色を行った。石灰化を起こした周囲に老化形質をとった細胞が増加していた。そこで細胞老化形質の誘導と石灰化の出現を時系列で観察するために、2週間毎のサンプルに対して、SA β -gal 染色と Von Kossa 染色を行った。von Kossa 染色から同定できる石灰沈着は、腎不全誘導開始後4週目において、ごく微小の石灰沈着（microscopic calcification）が一部認められたが、全体的に4週目では明らかな石灰化は認めなかった。一方、8週目の時点になると、全周性に中膜に著明な石灰化が誘導されていることが判明した。腎不全誘導におけるSA β -gal 陽性細胞の出現する時期を比較してみると、細胞老化形質（SA β -gal 陽性細胞）が2週目ごろから出現し始め、時間依存性に増加し、4週目および8週目にはより多くの老化形質細胞が確認できた。以上より、高リン血症を伴った腎不全モデルにおいては、大動脈中膜の細胞老化形質が、石灰化の出現する時期よりも明らかに早期から誘導されていることが判明した。そこで、大動脈における Sirt1 蛋白の発現を検討したところ、2週目から減少し始め、4週目以降は著明な発現低下を示した。また、p21 の発現は2週目から上昇し始め、4週以降は漸増した。すなわち、腎不全を背景とした大動脈石灰化形成には Sirt1 発現低下および p21 上昇を伴った細胞老化現象が大きく関与していることが示唆される。

培養系での石灰化誘導モデルとして、ヒト大動脈平滑筋細胞（HASMC）に高濃度の無機リン（2.6mM）を添加し石灰化誘導を行った。高リン刺激により、細胞老化形質（SA β -gal 陽性）が増加した。その老化形質誘導は Na 依存性リン

共輸送担体 Na-dependent phosphate cotransporter (NPC)の阻害薬により打ち消され、細胞内へのリン取り込み上昇がこの細胞老化形質の誘導に関わっていることが判明した。また、細胞老化は高リン刺激 1 日目から HASMC に見られ (27% vs.コントロール 3%)、3 日目、6 日目と進むにあたり 35%、67%と時間依存性に増加した。一方、石灰沈着は高リン刺激 1 日目には明らかな上昇は認められず、3 日目には 25 μ g/mg、6 日目に 104 μ g/mg に上昇した。このことにより、高リン刺激による培養系血管平滑筋細胞石灰化モデルにおいても、老化形質は明らかな石灰沈着の出現よりも早期の段階から誘導されていることが判明した。

高リン刺激により Sirt1 発現は時間依存性に抑制され、Sirt1 によって脱アセチル化される Histone3 や p53 のアセチル化も増加し、Sirt1 活性の低下が裏付けられた。面白いことに Cyclin dependent kinases (CDKs)の inhibitor である p21 発現も高リン刺激により増加していた。そこで Sirt1 活性を調節することにより細胞老化現象だけでなく、石灰化現象までどのように影響を受けるのか検討した。Sirt1 阻害薬である Sirtinol の添加、または siRNA による Sirt1 のノックダウンにより、SA β -gal 陽性細胞が増加し、石灰化はさらに惹起された。逆に Sirt1 活性薬である Resveratrol の添加により老化細胞は減少し、最終的に石灰化抑制につながった。さらにアデノウイルスベクターにより Sirt1 を過剰発現させたところ、老化形質だけでなく石灰化も抑制された。細胞老化への形質転換を示唆する代表的な遺伝子発現として p21 があり、高リン刺激による石灰化と p21 の関係について調べるため、p21 siRNA を用いた。p21 のノックダウンにより高リン刺激によ

り誘導される老化形質だけでなく、石灰沈着までも著明に抑制された。このことにより、高リン血症を背景とする血管平滑筋細胞の石灰化に大きく関わる老化形質には p21 が関与していることが判明した。

血管石灰化で重要な分子機序の一つとして骨芽細胞様形質転換がある。その形質転換を調べるものとして骨・軟骨細胞分化に必須の転写因子 runt-related transcription factor 2 : Runx2 、 Alkaline phosphatase (ALP) がある。骨芽細胞マーカーである Runx2 と ALP は高リン刺激により上昇傾向を見せ、Sirt1 のノックダウンによりさらに著明に上昇した。一方、血管平滑筋細胞特異的分化マーカーである Caldesmon は高リン刺激により低下し、Sirt1 のノックダウンによりさらなる発現低下が認められた。以上より、高リン刺激による培養系平滑筋細胞石灰化モデルにおける分子機序として、Sirt1 の発現が著明に低下することにより、血管平滑筋細胞の分化状態が抑制され、むしろ骨芽細胞様の形質への転換が誘導されることが判明した。

血管平滑筋細胞の石灰化において、nucleation の現象が起こるためにアポトーシスは重要な役割を担っており、Sirt1 とアポトーシスの関係について検討した。Sirt1 の活性を抑制する目的で Sirt1 の chemical inhibitor である Sirtinol を添加するとアポトーシスは増加し高リン刺激により増加したアポトーシスは Sirtinol によりさらに増加した。Sirt1 の chemical activator である Resveratrol を添加すると高リン刺激によるアポトーシス誘導は有意に減少した。Sirt1 の siRNA を用いて Sirt1 をノックダウンすると、Sirtinol 添加のときと同じ様にアポトーシスは増加

し、高リン刺激によるアポトーシス誘導に対してもさらに増悪した。よって、**Sirt1** を低下させることによりアポトーシスが増加することが分かった。

今までの実験は高リン刺激による老化 (**premature senescence**) を見てきたが、前述した動脈硬化のもう一つの老化 (**replicative senescence**) の観点からも検討を進めた。若い細胞 (**passage 7**) に比べて、老化した細胞 (**passage 18**) は同濃度の高リン刺激(**Pi:2.6mM**)に対して過剰な石灰沈着を呈した。今まで検討してきたそれぞれの蛋白発現を比較してみると、**replicative senescence** 自体により **Sirt1** の発現が低下し逆に **p21** が上昇していた。そこに高リン刺激が加わると、さらに **Sirt1** 発現は著明に低下し、**p21** 発現はさらに上昇した。このことから、細胞分裂を重ねた老化 **HASMC** においては **Sirt1** が減少しており、同程度の高リン刺激によって石灰化がより過剰に亢進しやすい状態になっていることが分かった。

高リン血症を伴う腎不全を背景とした血管石灰化形成の分子機序において、長寿遺伝子として知られる **Sirt1** が血管平滑筋細胞の老化形質を抑制し、最終的に石灰化を抑制することを示した。その過程には、平滑筋分化マーカーの低下と骨芽細胞マーカーの上昇などから裏付けられる形質転換が起こっており、**Sirt1** が抑制的な調節因子として大きな役割を担っていることが解明された。血管石灰化を抑制するためには「いかに **Sirt1** の活性を増加・維持できるか」が非常に重要であり、今後の血管石灰化の治療戦略に繋がる可能性がある。