

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 竹村 彩

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ため、0.75%アデニン含有餌によるラット腎不全モデルと培養系での高リン刺激によるヒト平滑筋細胞石灰化誘導モデルにて、老化形質の有無と、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 の発現の検討を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 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。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、高リン血症を認めた。開胸後にも著明な石灰化が再確認され、大動脈切片の von Kossa 染色において、全周性に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。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 染色を行うと、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。
2. 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）が一部認められるのみであった。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た。SA β -gal 染色では2週目から陽性細胞が認められており、先行して起こっていることが示された。
3. 腎不全ラットの大動脈における 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。
4. 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、石細胞老化形質（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。
5. 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。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示された。その課程において 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。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。

6. 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。
7. 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示された。
8. 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。骨芽細胞マーカーである runt-related transcription factor 2 : Runx2 と Alkaline phosphatase : 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。
血管平滑筋細胞の石灰化において、アポトーシスも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 chemical inhibitor である Sirtinol を添加し、Sirt1 の siRNA を用いて Sirt1 をノックダウン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、siRNA 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。
9. 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。

以上、本論文は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。本研究は、石灰化と老化の関係を解明することにより今後の血管石灰化の予防、治療法の解明に繋がる可能性があると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。