

論文内容要旨

Transcriptomic profiling of mouse vascular smooth muscle cells: Insights into calciprotein particle-induced calcification (マウス血管平滑筋細胞のトランスクリプトーム解析：カルシプロテイン粒子による石灰化への洞察)

広島大学歯学雑誌, 2023, in press.

主指導教員：谷本 幸太郎 教授

(医系科学研究科 矯正歯科学)

副指導教員：内藤 真理子 教授

(医系科学研究科 口腔保健疫学)

副指導教員：寺山 隆司 教授

(医系科学研究科 顎顔面解剖学)

大城 理紗子

(医系科学研究科 博士課程医歯薬学専攻)

【目的】

心血管疾患は慢性腎臓病（CKD）の一般的な臨床合併症であり、進行した CKD 患者の 50% が心血管疾患に罹患すると推定されている。CKD では、腎機能障害により血清リン濃度が上昇し、活性型ビタミン D の減少により血清カルシウム濃度が低下するため、骨塩代謝が障害され、骨粗鬆症などの腎性骨症が引き起こされる。それとは対照的に軟組織である血管では、血管平滑筋細胞（VSMCs）の異所性石灰化が引き起こされる。VSMCs の異所性石灰化は、血中カルシウム-リン積の上昇により惹起されるが、このとき骨形成関連遺伝子の発現が誘導され、VSMCs は骨芽細胞様細胞へと分化する。最近の研究では、循環コロイド凝集体であるカルシプロテイン粒子（CPP）が CKD における血管石灰化の中心的な担い手であることが明らかにされつつある。この CPP は、カルシウムイオンおよびリン酸イオンからなるリン酸カルシウム結晶と肝臓由来の血中タンパク質であるフェツイン A で構成される。CPP は、モノマーが互いに凝集し一次カルシプロテイン粒子（CPPI）を形成する。この CPPI は、さらに二次カルシプロテイン粒子（CPPII）に凝集する。CPPI は非結晶リン酸カルシウムを含む小さな球状のコロイドナノ粒子であるのに対し、CPPII はそのコアに結晶性リン酸カルシウムを含み、CPPI よりも大きく針状構造を有する。この CPPII は VSMCs の石灰化誘導能を有し、CKD 患者の血清での高値を示す。

MOVAS 細胞は、血管石灰化の研究に汎用される細胞株である。本研究では、この MOVAS 細胞から CPPII に対する反応性の異なるクローンを樹立し、網羅的遺伝子発現解析することにより、CPPII による石灰化のメカニズム解明のための基盤データ取得を目的とした。

【方法】

マウス血管平滑筋細胞株である MOVAS 細胞から、限界希釈によって得られた単一クローンを培養し、サブクローンを単離した。各サブクローンを 48 ウェルプレートに播種 24 時間後、20 μ g Ca/mL の CPPII と 1mM の CaCl₂ (CPPII-Ca) を培地に添加し、石灰化誘導を開始した。石灰化誘導後 6 日にアリザリンレッド S 染色と細胞外基質中カルシウム含量の定量により高石灰化株と低石灰化株を選別した。また高石灰化株と低石灰化株から RNA を単離し、RNA-シーケンシング（RNA-Seq）を行った。高石灰化株と低石灰化をそれぞれ石灰化誘導群とコントロール群、さらに高石灰化株と低石灰化株のコントロール群同士で比較し、FDR < 0.05、log₂ Fold-Change (FC) < -1、または > 1 の基準を満たす発現差遺伝子 (DEGs) を同定した。この DEGs のエンリッチメント解析を行った。また高石灰化株と低石灰化株をカルセインで標識した CPPII で石灰化誘導し、CPPII 取り込み能を評価した。

【結果】

MOVAS 細胞親株の限界希釈により、34 個のサブクローンを得た。各クローンの石灰化能を評価したところ、MOVAS 細胞は石灰化能の異なる細胞集団の混合物からなることが示された。サブクローンのうち、クローン 28 (c28) と 16 (c16) をそれぞれ高石灰化株と低石灰化株として選択した。次に、石灰化誘導後の c28 と c16 における石灰化関連遺伝子の発現変化を評価した。c28 と c16 を CPPII-Ca で処理し、3 日間培養後、RNA-Seq から得たデータを、それぞれの石

灰化非誘導群 (NC) と比較した。c28CPP-Ca vs c28NC だけで発現が変動した遺伝子は 267 個、c16CPP-Ca vs c16NC だけで発現が変動した遺伝子は 310 個であり、DEGs として同定された。c28NC-c28CPP で発現が変動した遺伝子をエンリッチメント解析して、分子機能に関して濃縮された遺伝子オントロジー (GO) 用語を同定したところ、c28 で発現が上昇した遺伝子は、増殖因子、走化性誘導因子、サイトカイン、ケモカイン、スペクトリンに濃縮されていた。さらに我々は、CPPII の取り込み能の違いが、VSMCs の石灰化の違いの原因である可能性があるとして仮定し、c28 と c16 をカルセイン標識した CPPII で培養し、CPPII 取り込み能を評価した。カルセイン標識 CPPII を定量したところ、c28 の CPPII 取り込み能は c16 のそれよりも 17 倍近く高いことが示された。次に c28 と c16CPPII 取り込み能の違いを検証するため、石灰化誘導前の遺伝子発現の変化を調べた。c28 で特異的に発現が上昇した 1308 遺伝子のエンリッチメント解析では、細胞構成要素に関して、細胞結合、細胞質、側底膜、細胞外基質、共生生物含有液胞膜の GO 用語の濃縮が確認された。

【考察、結論】我々は MOVAS 細胞の CPPII 高反応性株と低反応性株のトランスクリプトーム解析を行い、高反応性クローンは損傷した血管内皮細胞や VSMCs の増殖や遊走を促進する遺伝子に富んでいることを見出した。さらに、高反応性クローンは CPPII 取り込み能が高く、石灰化を誘導する前の状態において、膜タンパクや細胞外基質に関連する GO 用語が濃縮されていた。これらの知見は、CPPII による VSMC 石灰化誘導のメカニズムを解明する端緒となり、CKD に合併する血管異所性石灰化の治療につながるものである。