

主論文の要旨

**Indoxyl Sulfate-induced Vascular Calcification is  
mediated through Altered Notch Signaling Pathway  
in Vascular Smooth Muscle Cells**

インドキシル硫酸による血管石灰化への  
Notch シグナルの関与に関する検討

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
病態内科学講座 循環器内科学分野

(指導：室原 豊明 教授)

山口 和才

## 【緒言】

インドキシル硫酸(Indoxyl Sulfate : IS)は慢性腎臓病(CKD)患者において血中に蓄積する主要な尿毒素であり、心血管疾患の発症率・致死率と関連する事が知られている。また、ISはCKD患者における血管石灰化にも関与している事が報告されているが、そのメカニズムは複雑であり、まだ完全には解明されていない。Notchシグナルは、多細胞生物において高度に保存されたシグナル伝達経路であり、細胞の分化や増殖を制御する。我々は以前、Notchシグナルが血管平滑筋にも高度に発現している事を報告した。今回、「ISにより誘発される血管石灰化にNotchシグナルが関与している」という仮説を立て、本研究を立案した。

## 【方法・結果】

食塩感受性高血圧ラットモデルであるダール食塩感受性ラットを、0.3%食塩水を負荷した群(DS群)、2%食塩水を32週負荷した群(DH群)、2%食塩水負荷とIS(200mg/kg/day)を32週負荷した群(DH+IS群)の3群に分け、検討を行った。大動脈のHE染色、von-kossa染色において、DH+IS群のみ中膜、及び冠動脈周囲の石灰化を認めた(Figure 1)。次に大動脈におけるNotchシグナルの発現を調べる評価するためにNotch1、Notch3、およびNotchの下流転写因子であるHes1の免疫染色を行った結果、Notch1、Notch3、Hes1ともに、DS、DH群では均一に発現を認めたが、DH+IS群では中膜の中心部、石灰化周囲において発現が低下していた(Figure 2)。また大動脈におけるnotch関連分子の発現を、RT-PCR法、ウェスタンブロット法にて検討したところ、DH+IS群では、Notchリガンド(Jagged1、DLL4)、Notch受容体(Notch1、Notch3)、Notch下部転写因子(Hes-1、Hey-1)の発現が有意に低下していた(Figure 3)。次に、RT-PCR法にて石灰化関連マーカーの評価を行った結果、DH+IS群では、骨形成マーカーであるRUNX2、OPN、OCN、ALP、OSX、MSX1、MSX2、BMPs2の上昇を認め、一方で平滑筋マーカーであるSM22の低下を認めた(Figure 4)。

次に、ISとNotchシグナルの関連を詳細に検討するために大動脈平滑筋細胞(aortic SMCs)を用いて検討した。Aortic SMCsにISを負荷し、ISの濃度によるNotch1、Notch3の発現を評価したところ、いずれも500 $\mu$ Mで最大となった(Figure 5b, d, f, h)。500 $\mu$ MのISを負荷し、負荷時間によるNotch1、Notch3の発現を評価したところ、いずれも一過性に発現が亢進したが、その後長時間(96h)の負荷により発現が抑制された(Figure 5a, c, e, g)。次に血管石灰化の重要なプロセスであるアポトーシスへのIS、Notchシグナルの影響をcaspase3/7活性、Tunel染色にて評価した。Aortic SMCsにISを負荷すると、濃度、時間依存的に、caspase3/7活性の上昇、Tunel陽性細胞の増加を認めた(Figure 6a-d)。Aortic SMCsにNotchシグナルの阻害剤であるDAPTを負荷しても同様の結果となり、IS、Notchシグナルの低下はいずれもアポトーシスを誘導する事が示唆された(Figure 6e-h)。

次にISの負荷、Notchシグナルの抑制が血管石灰化を促進するか検討するために、カルシウム沈着の評価を行った。Aortic SMCsへのISの負荷、DAPTによるNotchシ

グナルの抑制は、いずれもカルシウム沈着を増加させるが、アポトーシスの阻害剤である ZVAD を加えると、このカルシウム沈着の増加は解除された (Figure 7a,b)。これらの結果から、インドキシル硫酸の負荷、Notch シグナルの抑制によるアポトーシスの誘導は、大動脈の石灰化に関与している事が示唆された。最後に、Notch1、Notch3 のどちらが血管石灰化に関与しているかを検討するために siRNA を使用しそれぞれのノックダウンを行い、Notch 関連分子、石灰化関連分子の発現を評価した。Notch1、Notch3 をシングルノックダウンするとそれぞれ約 50%抑制され、redundancy を認めなかった (Figure 7c, d)。Notch1 をノックダウンすると、下流転写因子の Hes-1、Hey-1 が抑制され、Runx2、OPN の発現が亢進した (Figure 7e, f, g, i)。Notch3 をノックダウンすると、Hey-1 が抑制され、BMPs2 と OCN の発現が亢進した (Figure 7f, h, j)。一方 Notch1、Notch3 のノックダウンはいずれも SM22 の発現を抑制した (Figure 7k)。Notch1 と Notch3 のダブルノックダウンでは、それらの相乗効果を認めた (Figure 7e-k)。これらの結果から、Notch1 と Notch3 の阻害は協調的に血管平滑筋の分化転換を誘導していると考えられた。

### 【考察】

本研究における主要な知見は以下である。

- (1) IS は、高血圧ラットの大動脈における中膜石灰化を促進した。
- (2) IS は、高血圧ラットの大動脈中膜、及び冠動脈周囲での Notch シグナル活性を抑制した。
- (3) IS は、大動脈平滑筋細胞の骨芽細胞型への分化転換を促進した。
- (4) IS は、大動脈平滑筋細胞での Notch シグナル活性を一過性に亢進するが、長時間の負荷により抑制された。
- (5) IS は、大動脈平滑筋細胞におけるアポトーシスを誘導し、カルシウム沈着を亢進させた。薬剤的な Notch シグナルの阻害においても、同様の結果を示した。
- (6) Notch1 と Notch3 は、協調的に血管平滑筋の骨芽細胞型への分化誘導を促進した。これらの結果により、IS は大動脈における Notch シグナルを抑制し、大動脈平滑筋細胞の骨芽細胞型への分化誘導を行う事により、石灰化を促進する事が示された。またその機序として、IS による Notch シグナルの抑制がアポトーシスを亢進し、石灰化を誘導する事が示された。本研究により、インドキシル硫酸による Notch シグナルの抑制は、CKD 患者の重要な生命予後因子である血管石灰化において重要な役割を担う事が示された。

### 【結論】

IS は大動脈における Notch 活性を抑制し、骨分化およびアポトーシスを亢進する事により血管石灰化を促進する事が示唆された。Notch シグナルは CKD 患者における血管石灰化において、有効な治療標的となりうる事が期待される。