

平成 21年 6月 1日現在

研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2007～2008
 課題番号： 19790528
 研究課題名(和文)
 血管局所でオステオプロテオグリタン制御系を標的とした既存石灰化血管の治療法の探求
 研究課題名(英文)
 Research for therapeutic regulation of vascular calcification by targeting osteo-proteoglycan

研究代表者 白木 里織 (SHIRAKI RIO)
 神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員
 研究者番号：50403259

研究成果の概要： 血管の石灰化、血管平滑筋へのカルシウム沈着のメカニズムは次第にあきらかになりつつあるが、一旦石灰化した病変から石灰化部位を除去するような治療法はないのが現状である。本研究では、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞などの培養細胞を用いて、その細胞外マトリックスに注目してカルシウム存在下での石灰化の機序を解明することを目標に研究をすすめた。この実験により、石灰化の形態学的な変化を血管関連培養細胞中でとらえることが非常に困難であることが分かり、培養系での実験系の確立は不成功に終わった。

動物実験での石灰化も、非常に長期に高コレステロール食を投与し、高脂血症の環境下で飼育することで、動脈硬化巣の深部から平滑筋層にかけて一部の骨化と石灰化の像が認められた。あまりに長期(1年半以上)の時間が必要であり、その詳細な解析を行う時間は今回の研究期間では困難であった。今回の研究成果を活かし、石灰化治療の候補遺伝子/候補蛋白を同定し、ひいては石灰化の除去治療につなげるための研究は継続していきたい。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学 循環器内科学

キーワード： 血管病態学

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化の一種の終末像である石灰化は、特に糖尿病性腎症で長期透析治療をされている患者で認められ、治療困難な冠動脈疾患となる。血管の石灰化、血管平滑筋へのカルシウム沈着のメカニズムは次第にあきらかになりつつあるが、一旦石灰化した病変から

石灰化部位を除去するような治療法はないのが現状である。

1997年にクローニングされたオステオプロテグリン(OPG)はreceptor activator of NF- κ B ligand(RANKL)、receptor activator of NF- κ B(RANK)とともに、これまで、骨吸収の制御因子として注目されていたが、近年になり、動脈石灰化との関連も報告される

ようになった。骨代謝に関連する破骨細胞は、動脈硬化巣での炎症細胞の主役である単球、マクロファージ細胞と系統が類似しており、血管石灰化との関連が強く考えられた。

動脈硬化の石灰化の病態を制御するためには、骨代謝との類似点と相違点を明らかにしながら、その方法を開発する必要があると考えられる。

2. 研究の目的

動脈石灰化の発症・進展に及ぼす単球、マクロファージ細胞系による osteoclastogenesis の役割・制御機構について研究し、更に臨床への応用をめざす目的で以下の研究を計画する。

1) 培養細胞系で石灰化状態の細胞を作成後、それを reverse する因子を同定する。

2) 1) で新しい因子を同定するとともに、これまでに判明している osteoclastogenesis をおこす因子を石灰化した細胞へ導入することで石灰化前の状態へ戻せるかどうか検討する。

3) 1), 2) で得られた結果を、klotho ノックアウトマウスに導入して、大動脈の石灰化病変の変化を観察し、vivo での応用が可能かどうかを検討する。

3. 研究の方法

1. 培養細胞を用いた可逆的石灰沈着病変の作成

1) これまでの報告より、動脈石灰化をきたす要因となる細胞として、流血中の単球系細胞と血管平滑筋細胞、血管内皮細胞周囲の細胞外マトリックスの諸条件が重要視されている。そこで、それらの細胞系であるヒト末梢血単球(monocytes)、THP-1細胞、ヒト動脈平滑筋細胞(HASMC)、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)などをカルシウム存在下で RANKL、OPG を添加し培養を行い、細胞の形質転換(=osteogenesis)が起こっていることを、顕微鏡学的に観察し、骨形成細胞系マーカーの発現量を mRNA レベル(Realtime-PCR 法)と蛋白量レベル(Western blott)で検討・確認する。

2) その後培養液中のカルシウム濃度、また、RANKL、OPG それぞれを抑制するとされている因子、osteoclastogenesis を促

進するといわれている物質を添加し、可逆的にミネラル沈着や、細胞の形質転換の変化がみられるかどうか、上述と同様の方法で確認する。

3) osteoclastogenesis を起こさせた細胞と osteogenesis を起こさせた細胞を共培養し、1) で述べた内容を検討し、細胞の変化が起これば、変化の原因(アポトーシスも含む)を検討し、共培養前後の細胞のタンパク質を抽出し二次元電気泳動法にてその因子を同定する。

4) 上記 1)~3)において細胞表面の Toll-like receptors の発現量を flow cytometry で評価し、高発現するものに焦点をあて、その ligand を添加した際に細胞に与える影響を検討する。

4. 研究成果

血管内皮細胞、血管平滑筋細胞などの培養細胞を用いて、その細胞外マトリックスに注目してカルシウム存在かでの骨形成に類似した形質転換を起こし、形態学的に観察すると同時に様々な遺伝子発現と蛋白発現がどのような制御をうけているのかを検討することを目標に研究をすすめた。この実験により、いくつかの候補遺伝子の発現と蛋白発現に一部の変化がとらえられたが、形態学的な変化をとらえることが非常に困難であり、この系の問題点などが明らかになってきた。さらに、条件を変えながら、実験遂行が用意な実験系の確立をめざして研究をすすめている。

細胞条件を変えた培養細胞の蛋白を二次元電気泳動にて展開し、出現するスポットの違いを検討して、その差異が認められるタンパクスポットを抽出し、質量分析にて解析する計画もすすめている。質量分析自体は平成20年度に設立される当神戸大学医学部の質量分析センターでの解析をすすめるべく、二次元電気泳動での実験をすすめた。

しかし、やはり石灰化そのものを in vitro の系で再現するのは非常に困難であり、モデルの set up が困難であった。

今後のこの研究を遂行するにあたり、動物モデルが必須であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

①Sasaki N, Yamashita T, Takaya T, Shinohara M, Shiraki R, Takeda M, Emoto N, Fukatsu A, Hayashi T, Ikemoto K, Nomura T, Yokoyama M, Hirata K, Kawashima S. Augmentation of vascular remodeling by uncoupled endothelial nitric oxide synthase in a mouse model of diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28: 1068-1076. (査読あり)

②Shinohara M, Hirata K, Yamashita T, Takaya T, Sasaki N, Shiraki R, Ueyama T, Emoto N, Inoue N, Yokoyama M, Kawashima S. Local overexpression of Toll-like Receptors at the vessel wall induces formation of atherosclerotic lesion: Synergism of Toll-like Receptor 2 and Toll-like Receptor 4. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27: 2384-2391. (査読あり)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白木 里織 (SHIRAKI RIO)

神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員

研究者番号：50403259

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者