

機関番号：34438

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590981

研究課題名（和文）血管石灰化における形質転換因子同定とそのメカニズム解明

研究課題名（英文）Mechanism elucidation of calcification with phosphate-induced and endothelial injury in rat aortic tissue culture

研究代表者

畑村 育次 (HATAMURA IKUJI)

関西医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：80336883

研究成果の概要（和文）：心血管系の石灰化は透析患者の死因の第1位である心血管系合併症を引き起こす要因の1つであり、血管の石灰化を制御することが患者の合併症を予防し、死亡危険率を下げるのに必要不可欠であり、本研究に於いて透析患者の多くが罹患する高リン状態で石灰化が誘導されることと、さらには血管内膜障害で石灰化誘導が増強されることを証明した。冠動脈血管内膜剥離術後石灰化予防のためは、特に高リン状態を改善する必要があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The cardiovascular calcification is one of the factors to cause the cardiovascular complication that is the first place of the cause of death of the hemodialysis patients. Therefore to control the vascular calcification prevents the complication of the patient and becomes lower the death rate of the patients. In this study, it was confirmed that vascular calcification was more strongly induced in the high serum phosphorus that most of hemodialysis patients contracted a disease with endothelial injury. It was suggested that it was necessary for the calcification prevention after endarterectomy to improve hyperphosphatemia in patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科

キーワード：血管石灰化、高リン、血管内膜障害、血管培養

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 心血管系の石灰化は透析患者の死因の第1位である心血管系合併症を引き起こす原因の1つであり透析患者において血管の石灰化を制御することが患者の合併症を予防し、

死亡危険率を下げるのに必要不可欠である。

(2) 血管石灰化には末期腎不全患者や閉塞性動脈硬化症患者に認められるメンケベルグ型石灰化がある。これは動脈中膜の平滑筋にカルシウム・リンを含む hidroキシアパ

タイトが沈着して石灰化するタイプで、特に末期透析患者で高リン血症＋二次性副甲状腺亢進症を合併している患者には必発である。

(3) メンケベルグ型石灰化の主因は血管平滑筋細胞の骨芽細胞様細胞への形質転換にある。しかしメンケベルグ型石灰化における血管平滑筋細胞の骨芽細胞様細胞への形質転換因子の同定に関する知見は未だない。

## 2. 研究の目的

(1) カルシウム・リン酸塩沈着から分子レベルでの石灰化への解明

血管石灰化ということは古くから問題となっていたが病理学的には不明な点が多かった。血管の石灰化は高カルシウム、高リン血症による単なる物理的なカルシウムリン酸沈着によりできる異物的なものではなく、骨関連タンパクBMP-2(bone morphogenic protein)osteopontinやosteocalcinなどが石灰化部位にその存在が証明され(Shanahan GM, et al:circulation100:2168-2167, 1999)、次第に血管平滑筋細胞あるいは血管壁細胞の軟骨化・骨化メカニズムによる分子レベルでの生成物であることがわかってきた(Chertow GM, et al:J Am Soc Nephro 14(9)2003)血管石灰化現象は遺伝子レベルでの解明が進み病理学的に関心度が高まってきたと思われる。この石灰化のメカニズムの解明と末期透析患者の病態として多い高リン血症が血管石灰化に及ぼすメカニズムの解明を行う。

(2) 血管平滑筋細胞の骨芽細胞様形質転換  
血管石灰化周囲の血管平滑筋細胞が骨芽細胞のマーカーであるALPや骨芽細胞の分化に必須の因子cbfa-1を発現していることが報告され(Chen, NX et al:Nephrol Dial Transplant. 2006 Sep 27)、骨芽細胞様細胞に形質転換する原因や因子の同定が本研究の目的である。

(1)(2)より血管石灰化のメカニズム(特に高リンが及ぼす影響)の解明と骨芽細胞様細胞に形質転換する原因の究明が本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

(1) ラット血管培養系を用いた石灰化誘導実験(高リン負荷実験)

①コントロールとして雄性 Sprague-Dawley ラット(9週齢)より大動脈を摘出し、数ミリ長の切片とし培養液(DMEM:P 濃度 0.9mM)中にて10日間培養を行った。

②石灰化モデルとして①と同様にラット大動脈切片を用いて培養液中に1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>を添加し、培養液中のP濃度を3.8mMに上

昇させ石灰化を誘導させた。1,3,5,7,10日間培養を行った。

③組織学的および分子生物学的手法を用いた解析

①②で得られた切片を用いて、パラフィン固定切片を用いてH.E染色およびvon Kossa染色を行い石灰化の評価を行う。

また同様に①②で得られた血管を10%ギ酸にて溶解しo-cresolphthalein compleone method(C-test,WAKO)にてカルシウム含量を測定し石灰化の程度を定量化する。

④培養血管石灰化のメカニズムの解析

石灰化誘導モデルにおいてナトリウム依存性リントランスポーター阻害剤(PFA)を添加し、細胞内へのリンの取り込みを阻害し、その効果を検討した。

⑤血管石灰化とアポトーシスの関係

Tunel染色を行い、経時的なアポトーシスの誘導を検討した。

次にカスパーゼ阻害剤(ZAVD)を石灰化誘導モデルに添加しその効果の検討を行った。

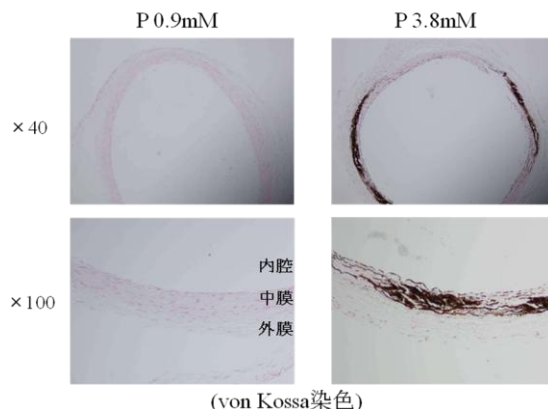
(2) 血管内膜障害が血管石灰化に及ぼす影響の検討

摘出した大動脈内にバルーンカテーテルを挿入し、1気圧30秒間で内膜障害を誘導し、血管石灰化に与える影響を組織学的、分子生物学的に検討した。

## 4. 研究成果

(1) ラット血管培養系を用いた石灰化誘導は以下の図に示すとおり、高リン負荷で10日間培養すると、血管中膜に石灰化の誘導を強く認めた。また血管に含まれるカルシウム含量を定量化するとコントロールに比べて明らかに有意に増加していた(data not shown)。培養血管において、高リン負荷で石灰化の誘導が示された。

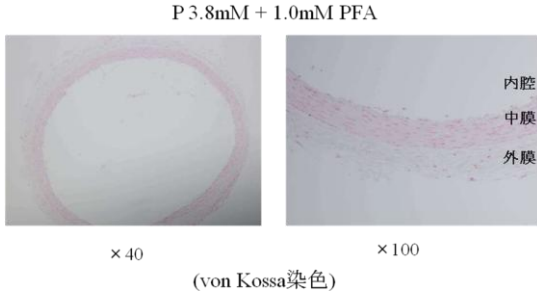
### リン負荷による石灰化の誘導



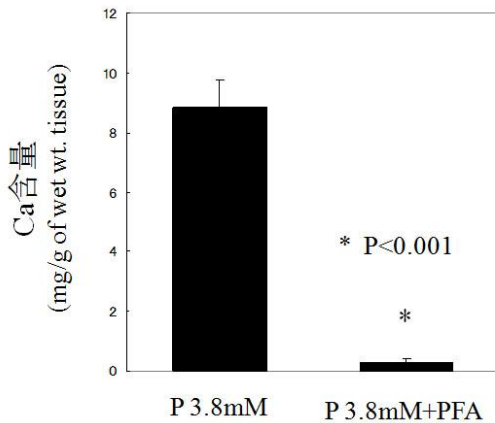
(2) リン負荷の誘導のメカニズムとしてリントランスポーター(Pit-1)のmRNAの増加が高リン負荷で認められたため、この阻害剤

であるPFAを添加し細胞内へのリンの取り込みを阻害することで培養血管の石灰化を改善することが可能であった。以下図に示しますように組織内の石灰化同様にカルシウム含量も有意に減少した。

### PFAによる石灰化の抑制



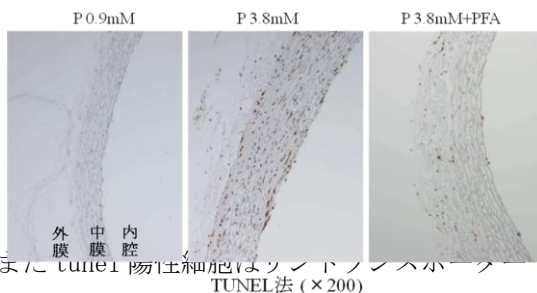
### PFAによる石灰化の抑制



(3) 以上より細胞内リンの吸収で石灰化が誘導されることが証明されたが、石灰化がどのようにして生じるか検討をした。論文等で議論されている血管平滑筋細胞が骨芽細胞様に形質転換されているか骨関連遺伝子のmRNA (cbfa-1, OCN, OPN) の発現を検討したが有意な差を認めなかった。

次に tunel 染色を行い、アポトーシスが石灰化に関与しているかを検討した。以下の図に示すように、石灰化を誘導した血管中膜層に tunel 陽性細胞の増加を認めた。

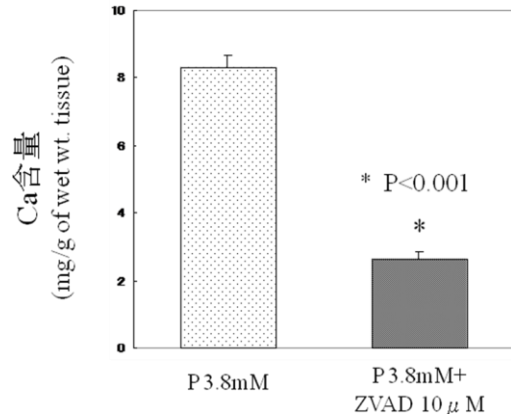
### TUNEL法によるアポトーシスの検索 (培養6日目)



阻害剤で有意に減少した。

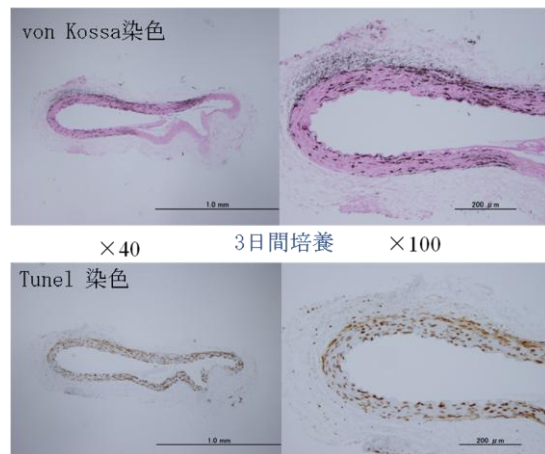
(4) アポトーシスを抑制することで血管石灰化に与える影響を検討するために、カスパーゼ阻害剤 (ZVAD) を添加して検討した。以下の図に示すように石灰化の抑制を認めた。

### caspase阻害剤による石灰化の抑制



(1) ~ (4) より血管培養系において高リン負荷は血管中膜の石灰化を誘導し、そのメカニズムの一つとして細胞内のリン流入がアポトーシスを引きおこし、石灰化に何らか関与していることが示された。

(5) 血管内膜障害が血管石灰化に及ぼす影響の検討についてはバルーンカテーテルを挿入し、内膜障害を誘導することで血管石灰化を促進することがわかった。以下に図に示すように内膜障害3日目でアポトーシスが誘導され、石灰化が高リン負荷のみでは10日で誘導されていたのが、3日目で誘導されるようになった。



ラット大動脈血管培養系において、高リン負荷は血管石灰化を誘導し、そのメカニズムとしてはリンの細胞内に流入することで細胞内で何らかのシグナル伝達が生じ、カスパー

ぜ活性を引きおこしアポトーシス誘導し石灰化を引きおこすと考えられる。以前から想像していた血管平滑筋細胞の骨芽細胞様形質転換は本研究のプロトコールでは確認できなかった。今回研究目的の骨芽細胞様形質転換因子を同定するためには培養系での血管平滑筋細胞の骨芽細胞様に形質転換する実験系の開発が待たれる。

次にバルーンによる内膜障害で血管中膜でのアポトーシスが誘発され、石灰化が促進されたことは、内膜障害により何らかの細胞内シグナルが生じアポトーシスを誘導したと考えられる。このことは臨床の現場に於いては特に透析患者さんではPTA治療後には、十分石灰化誘導がおこりうると考えられ、高リン状態の是正が重要となることを示唆している。

#### 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6件)

1. Development of a technique for introduction of an expressed complementary deoxyribonucleic acid into parathyroid cells by direct injection. Shiizaki K, Hatamura I, Fukagawa M, Kusano E et al. Endocrinology. 2010Aug ;151(8):4031-8.

2. Reduced expression of perlecan in the aorta of secondary hyperparathyroidism model rats with medial calcification. Shibata M, Shigematsu T, Hatamura I, Saji F, Mune S, Kunitomo K, Hanba Y, Shiizaki K, et al. Ren Fail. 2010 Jan;32(2):214-23.

3. Trps1 functions downstream of Bmp7 in kidney development. Gai Z, Zhou G, Itoh S, Hatamura I, Muragaki Y et al. 2009 Nov; 20(11):2403-11

4. Mechanism of phosphate-induced calcification in rat aortic tissue culture : possible involvement of Pit-1 and apoptosis. Mune S, Hatamura I, Saji et al. Clin Exp Nephrol. 2009, 111(4) :p59-66

5. Improvement of impaired calcium and skeletal homeostasis in vitamin D receptor knockout mice by a high dose of calcitriol and maxacalcitol. Shiizaki K, Hatamura I, Akizawa T, Kusano E. et al. Bone. 2009 Nov; 45(5):964-71.

6. Direct injection of calcitriol or its analog abnormal gene expression in the hyperplastic parathyroid gland in uremia. Shiizaki K, Hatamura I, Akizawa T, et al. 2008, Am J Nephrol 28: 59-66

[学会発表] (計 1件)

Shiizaki K, Hatamura I et al. Functional

induction of target genes in parathyroid cell by direct injection technique.

41th Annual Meeting of American Society of Nephrology. 2008. 11. 4-9 Philadelphia.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等  
無

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

畑村 育次 ( HATAMURA IKUJI )

関西医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号 : 80336883

(2) 研究分担者

椎崎 和弘 ( SHIIZAKI KAZUHIRO )

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 10423930

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :