

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790871

研究課題名(和文)血管石灰化におけるマトリックスGla蛋白の役割についての研究

研究課題名(英文)Role of Matrix Gla Protein in vascular calcification

研究代表者

菅野 康夫 (Sugano, Yasuo)

独立行政法人国立循環器病研究センター・病院・医長

研究者番号：00317124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：野生型と比較し、トランスジェニックマウスは6週令時点の雄マウスの死亡率、心臓、肺、大動脈、腎臓、肝臓の観察所見および病理組織学的所見に差を認めなかった。mRNAおよび蛋白の発現もGla mRNAおよび蛋白の発現亢進は認めなかった。細胞レベルでは機能していたトランスジーンが発現がin vivoでは無効になっていることが考えられた。

トランスジーンが発現が無効化されている可能性が考えられ、Tie-2プロモーターに変更し検出を試みた。しかし、一部クローンは細胞内での発現はあるものの、細胞外での検出が難しく、MGPIは細胞内でProcessingを受け、細胞内外に分泌されることが判明した。

研究成果の概要(英文)：No difference was observed between transgenic and wild-type mice in mortality, phenotypic characteristics (heart, lung, aorta, kidney, liver) as well as pathologic property at 6 weeks after birth. In addition, expression of mRNA and protein levels of GLA were not significantly increased in produced mice. The conclusion was that transgene expression was inactivated in vivo, although they were expressed in vitro.

The promoter was switched to Tie-2, which also provides vascular-specific transgene expression. However, there were some difficulties in detecting extracellular expression of Gla protein, despite ordinary expression of intracellular extract. Special unexpected processing and binding to other proteins in cells might explain this phenomenon.

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：血管石灰化 マトリックス蛋白

1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまで、大動脈および冠動脈の動脈硬化・炎症に着目し、臨床研究を通じて粥状動脈硬化と心血管リスクとの関係を明らかにした (International Journal of Cardiology 2005;102:39-45, Heart Vessels 2008;23:334-340, International Journal of Cardiology 2010;140:175-181 他)。動脈石灰化は、生命予後の独立した危険因子である (Heart 2001;85:13-17) が、現在のところ、血管の石灰化進行を防止する具体的な治療法が存在しない。これらの動脈石灰化は従来、動脈硬化の進行に伴ってカルシウムやリンが受動的に血管壁に付着することにより起こる粥状動脈硬化の終末像と考えられていたが、近年の研究で、骨代謝に関わる様々な分子が働く能動的なプロセスであることが明らかにされた。特に、中膜に存在する血管平滑筋が各種の刺激により骨芽細胞様に形質転換 (osteoblastic transition) することが血管石灰化の病態生理に深くかかわっていることが明らかにされた (Am J Physiol Heart Circ Physiol 2009;297:H 1673-84)。

Matrix Gla Protein (MGP) は、骨や血管に存在する分泌型蛋白質で、骨代謝の抑制、骨芽細胞への分化抑制作用を持つ。ビタミン K 依存性に活性化し、蛋白内の Gla 残基とカルシウムイオンとの結合促進、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化促進因子 Bone Morphogenetic Protein (BMP) 蛋白の抑制作用などが知られ、積極的に血管平滑筋の osteoblastic transition を抑え、血管石灰化を抑制する可能性が示唆されている (J Cell Biochem 2003;90:756-65)。実際、MGP のノックアウトマウスは動脈の高度な石灰化と顕著な脆弱化を呈し、生後 1-3 ヶ月で胸腹部大動脈の破裂により死亡する (Nature 1997;386:78-81)。同マウスでは血管平滑筋は中膜で chondrocyte に分化しており、MGP が血管平滑筋細胞の分化調節に関与する。

申請者は、Gene bank (NM_008597) の全コーディングシーケンスを含むマウス MGP のサブクローニングを行った。同遺伝子を pSectag ベクターに組み込み、上流に血管平滑筋アクチン (SMA) プロモーターを付加した後、マイクロインジェクション法により、血管平滑筋特異的にマウス MGP 蛋白を過剰発現する遺伝子改変マウス (MGP-TG) を作製、これを解析することで、MGP の血管石灰化に及ぼす病態生理学的意義を探究することが可能と考える。

2. 研究の目的

(1) MGP-TG マウスの解析

MGP-TG マウスの基本的プロファイル(体重、各主要臓器の重量、形態・肉眼的解剖所見での特異的なフェノタイプ異常等)を観察

する。また、血管における MGP 蛋白の発現をウェスタンブロット法で定量し、安定した血管特異的な MGP の発現量を mRNA レベルおよび蛋白レベルで測定する。また、同マウスの体重、血圧、脈拍数などの基本的な身体パラメーター、心・腎・肝・肺・大動脈・骨など各臓器の肉眼的および顕微鏡的所見の観察、大動脈エコーを用いた脈波パターン解析を行い、MGP-TG マウスの生理学的特徴を同定する。

(2) ApoE^{-/-}石灰化マウスとの交配と解析

石灰化モデルマウス (ApoE^{-/-}; 高カルシウム・高リン食負荷) と MGP-TG マウスを交配により、MGP による血管石灰化の抑制効果を検討する。交配マウスを。生後 8 週から高カルシウム・高リン食負荷を行い石灰化を誘導し、その表現形を 1) と同様の方法で解析する。また、生存解析 (Survival Study) を行い死因の同定を行う。生後 16 週に胸部～腹部大動脈を摘出し、肉眼所見および von Kossa 染色から石灰化の定量評価を行い、MGP 蛋白の石灰化抑制効果を調べる。

(3) 石灰化とその抑制メカニズムの解明

摘出動脈のホモジェネートを用いて、BMP-2、RUNX2、ALP、I 型コラーゲン、骨シアロ蛋白 (BSP)、オステオカルシン (OCN)、オステオプロテゲリン (OPG) などの石灰化関連因子の mRNA および蛋白発現を、リアルタイム PCR およびウェスタンブロットで解析する。またアルカリフォスタファアーゼ活性による組織染色を行うことにより、平滑筋の骨芽細胞様変化について評価する。

3. 研究の方法

(1) MGP 発現の定量評価

F1 産仔の PCR 解析をすることにより、Germ line の伝達を確認する。Germ line 伝達の確認後、F2 産仔を作出し、血管特異的な mRNA および蛋白レベルでの MGP 遺伝子の発現を定量する。mRNA レベルでは RT-PCR 法を、蛋白レベルでは抗マウス MGP モノクローナル抗体 (Enzo Life Sciences) を用いたウェスタンブロット法で発現を確認する。

(2) MGP-TG マウスのフェノタイプ解析

MGP-TG マウスの形態・肉眼的解剖所見を確認する。生後 8 週における体重および血圧・脈拍数などの基本データを測定した後、塩化カリウム溶液の心腔内投与で心停止させる。心臓、肺、大動脈、腎臓、肝臓の各臓器を摘出し、それぞれの肉眼所見を観察し、重量を計測する。各臓器は液体窒素にて凍結

後、-80 で保存するが、一部はホルマリン中、または免疫組織化学的検討のために OCT コンパウンドに包埋後、-80 で保存する。また、MGP-TG マウスの血液を採取し、サンドイッチ ELISA 法にて血清 MGP 濃度を測定する。-80 で保存した各臓器は、ホモジェネートを作製した後、RNA および蛋白を精製し、定量 RT-PCR 法およびウェスタンブロット法で MGP の mRNA ならびに蛋白レベルでの発現を確認し、野生型マウスと比較検討する。

(3) MGP-TG マウスの血管機能の解析

MGP-TG マウスの大動脈エコーを行うことにより、脈波パターンの変化を観察する。血管機能についてはマウスの摘出大動脈の等尺性張力を測定することにより評価する。各種血管収縮・弛緩促進剤で負荷することにより、MGP-TG マウスの大動脈の生理学的血管機能の評価する。

(4) 石灰化モデルマウスとの交配と解析

ApoE 遺伝子の欠失マウス (8 週令) を 0.98% カルシウムおよび 0.65% リンを混じた食事を摂取させると、大動脈内膜および中膜に石灰化を来たす (Circulation 2009;119:306-13)。石灰化マウスと MGP-TG マウスを交配し、Survival Study を行うとともに、生後 16 週時にマウスを sacrifice し、心、大動脈、腎、肝、肺などの各臓器について、肉眼的、組織学的 (H-E 染色) 所見を観察する。

(5) 交配マウスの評価

同マウスの石灰化沈着を von Kossa 染色で形態学的に比較検討するとともに、大動脈内カルシウム・リン含有量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$) の測定、石灰化関連因子として知られる、RUNX2、BMP-2、ALP、I 型コラーゲン、骨シアロ蛋白 (BSP)、オステオカルシン (OCN)、オステオプロテゲリン (OPG) などの mRNA および蛋白の発現を、リアルタイム PCR およびウェスタンブロットでの解析を行う。

4. 研究成果

(1) トランスジェニックマウスの解析

作製したトランスジェニックマウスは、野生型と比較し、形態的な異常を認めなかった。6 週令時点の雄マウス (C57BL/6 バックグラウンド) の死亡率は <5%、心臓、肺、大動脈、腎臓、肝臓の観察所見および病理組織学的所見は、両者に明らかな差を認めなかった。mRNA および蛋白の発現を確認したが、図 1 のように特異的な大動脈壁での Gla mRNA の発現亢進は認めなかった。また、ウェスタンブロット法での Gla 発現の有意な発現増加

が認められず、細胞レベルでは機能していたトランスジーンが発現が in vivo レベルでは無効になっていることが考えられた。

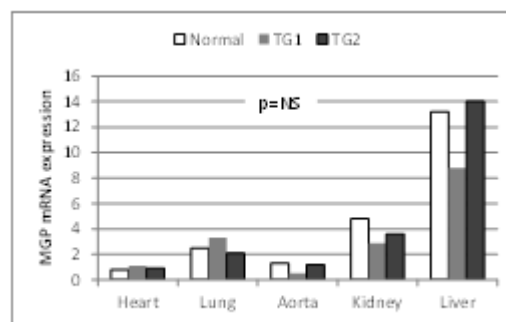


図 1 各臓器の MGP mRNA 発現

(2) MGP 遺伝子発現のための工夫

生体における遺伝子発現の複雑な機構により、トランスジーンが発現が無効化されている可能性が考えられた。プロモーターの問題も考えられたため、SMA 部を Tie-2 プロモーターに変更し、検出を試みた。

しかしながら、図 2 に示されるように、MGP は細胞内で Processing を受け、細胞内外に分泌されることが判明した。つまり、クローン #1 では細胞内に trapping され細胞外に分泌されないが、クローン #2 では細胞内外で同様の発現がある。また、通常の MGP が検出されずに、その分解産物として検出された。活性に関しては不明だが、わずかな構造的変化で、分泌形態が変化し、このような結果を得るに至ったと考えられた。

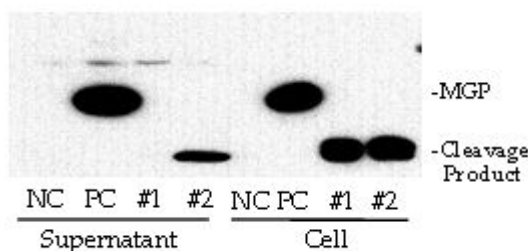


図 2 MGP の発現

(3) 今後の課題

今回の研究では、MGP-TG がフェノタイプおよびジェネティックとして有効で安定なラインを獲得することができなかった。しかし、MGP の細胞内の動態などの情報が得られた。今後はまずは、MGP の分解産物が活性を持つか否かを検討し、そのうえで、in vivo でアンタゴニストなどを用い、活性および表現型の影響が出るかを組織学的ならびに血行動態的に評価する必要がある。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野 康夫 (SUGANO, Yasuo)
独立行政法人国立循環器病研究センター
病院・医長
研究者番号：00317124

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし