

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790666

研究課題名(和文)閉経における慢性腎臓病が血管石灰化を助長する分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of a vascular calcification in post menopausal women with chronic kidney disease.

研究代表者

打和 大幹 (uchiwa, hiroki)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：30624506

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)：慢性腎臓病(CKD)による血管内皮障害と血管石灰化に注目した。慢性腎臓病を有する閉経女性の血管石灰化及び骨粗鬆症に関連する分子機序を解明するために雌C57BL/6Jマウスに5/6腎臓摘出と卵巣摘出を行い検討したが、血管石灰化は認めなかった。RAA系を活性化や高リン血症を伴うモデルを用いて血管石灰化の追加検討を行う必要があると考えた。

研究成果の概要(英文)：We focused on vascular endothelial dysfunction to study the mechanism of vascular calcification in CKD patient. We would like to clarify to the molecular mechanism of a vascular calcification in post menopausal women with CKD. We investigated vascular calcification in female C57BL/6J mice which underwent 5/6 nephrectomy (NX) and ovariectomy(OVX). Experiments included the following four groups: sham operation; NX; OVX; NX+OVX. Four group did not show calcification in the aorta. We thought that it was necessary to examine in the model of RAS system activation or the model with a high level of serum phosphate.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 内科学一般 老年医学

キーワード：慢性腎臓病 閉経 血管石灰化

1. 研究開始当初の背景

(1) 腎障害は心血管病の増悪因子である。多くの疫学研究および大規模試験を含めた臨床研究から慢性腎機能障害(CKD)が心血管疾患の独立した危険因子であると報告されており、「心腎連関」の概念が提唱されて久しい。閉経女性においては、腎機能低下は軽度～中程度であっても心血管イベントの独立した危険因子であることが、HERS (the Heart and Estrogen/progestin Replacement Study)にて示されている (Shlipak et al J Am Coll Cardiol 38:705-71,2001)。しかし、腎障害が、特に閉経女性において心血管病を引き起こす分子機序は未だに解明されていない。

(2) 血管石灰化の心血管病危険因子としての意義。約2000人の血管石灰化を有する症例の予後を平均13年間の前向き疫学調査では血管石灰化は死亡率及び心血管死の有意な危険因子であった(Rodondi et al. J Intern Med 281:238-244,2007)。腎機能低下に伴い、冠動脈石灰化は増加する(Go et al. N Engl J Med 351:296-1305,2004)。一方、閉経女性では結果石灰化が急激に進むことが疫学研究にて示されている。近年、血管石灰化は単なる高度動脈硬化による血管障害の結果としてのカルシウム沈着ではなく、血管壁構成細胞、特に血管平滑筋細胞の骨形成フェノタイプへの形質転換が関与していることが明らかとなった。したがって、申請者は血管石灰化は単なる「血管障害」のマーカーではなく、「血管機能異常」のマーカーとして捉えらるると考えた。

(3) 骨粗鬆症と血管石灰化は共通の分子機序で形成される。骨粗鬆症と血管石灰化は閉経女性に同時に認められる。また、骨粗鬆症を有する平成女性では心血管病の発症リスクが高まることが知られている(Tanko LB et al, J Bone Miner Res 20:1912-1920,2005)。近年、両疾患の病態形成に共通する分子機序としてRANK(receptor activator for Nuclear Factor Kappa B)-RANK Ligand(RANKL)systemの関与が注目されている。RANK-RANKL systemは破骨細胞の分化誘導に関わる調節因子であり、骨芽細胞で主として生成され破骨細胞を活性化して骨粗鬆症に導く分子である。一方で、ApoE/高脂肪食マウスに卵巣摘出を行うと動脈硬化巣の石灰化が増加するが、これにはRANK-RANKL systemを介した骨分化作用が関与する(Osako et al. Circ Res 107:466-475,2010)。すなわち、RANK-RANKL systemは骨粗鬆症と血管石灰化の共通した分子基盤であると考えられる。

(4) 腎機能障害はRANK-RANKL systemをターゲットとして閉経後の骨粗鬆症と血管石灰化を増悪させるのかもしれない。申請者らのグループは5/6腎臓摘出CKDモデルマウス

において、RANK-RANKL systemの上流シグナルであるSmad1/5/8が活性化されることを見出した(Kajimotoら 第74回日本循環器学会で報告)。閉経および腎機能障害はこれまでそれぞれ独立した血管石灰化および心血管病のリスクと考えられてきたが、両者は共通の分子機序で骨粗鬆症と血管石灰化を相乗的に増悪させるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、CKDを有する閉経女性における血管石灰化増悪を主徴とする血管障害が進展する機序を明らかにすることである。

3. 研究の方法

両側卵巣摘出(OVX)を5/6腎臓摘出CKDモデルマウスに追加施行する。本モデルマウスを用いて以下の点を検討する。

(1) OVXによりCKDマウスの血管、大動脈起始部の石灰化が助長されるか。骨粗鬆症が促進されるか(骨粗鬆症・血管石灰化CKDモデルの開発)

(2) OVXによってCKDマウスの血管に発現誘導、活性化される細胞内シグナルを網羅的に解析する。

具体的には、C57BL6J female mouseを使用し実験する。骨粗鬆症・血管石灰化CKDモデルマウス作成のため、マウスに両側卵巣摘出術と2期的な5/6腎臓摘出処置を行う(2/6腎臓摘出+3/6腎臓摘出)10週齢で卵巣摘出、2週後に2/6腎臓摘出(12週齢)さらに1週後に3/6腎臓摘出(13週齢)。

卵巣摘出+5/6腎臓摘出群(OVX+NX)

卵巣摘出群(OVX)

腎臓摘出群(NX)

sham手術群(sham) の4群で比較検討を行う。

各手術後4週間毎にバイタルサインとして体重・血圧・脈拍を測定。各群ともに12週間観察後にSacrificeを行う。

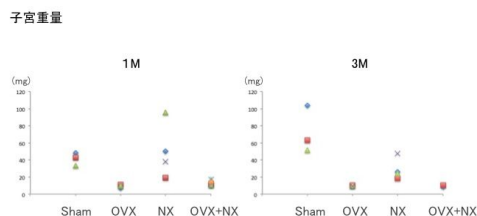
閉経の評価および影響として子宮重量、心臓重量、エスロトゲン(EIA)、コレステロール(T.chol、HDL、TG)を測定する。腎機能低下の評価としてBUN、Crea、Ca、P、畜尿Creの測定を行う。心臓、大動脈の細胞切片を光学顕微鏡で組織観察を行う。石灰化評価のため、心臓、大動脈のHE・AZAN・Von Kossa・ALP染色を施行する。心臓・大動脈のWestern blotting、免疫染色を施行する。骨粗鬆症の評価として、mouseの大腿骨を摘出し、MBD(bone mineral density 骨塩量):定量的CT(QCT)計測、骨組織のHE染色。尿中DPD(デオキシピリジノリン)測定。

4. 研究成果

(1) 骨粗鬆症・血管石灰化 CKD モデルマウス作成を行った。予備実験として両側卵巣摘出および腎臓摘出後 1 ヶ月間観察モデルと 3 ヶ月間観察モデルを作成し、腎機能を観察した。青が 1 ヶ月観察モデル群、緑が 3 ヶ月観察モデル群。血圧、脈拍の平均をとっているが、1 ヶ月群、3 ヶ月群で有意な差は認められなかった。腎機能評価として BUN、Crea を測定したところ、5/6 腎臓摘出において Sham 手術群、卵巣摘出群と比較して腎機能の増悪が認められた。1 ヶ月群と比較すると 3 ヶ月群でより腎機能の増悪が認められた。

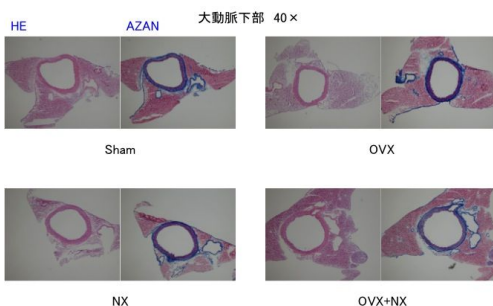


閉経の評価として子宮重量測定をおこなった。以下の表で示されるように両側卵巣摘出術によって子宮萎縮による子宮重量の低下が認められた。この影響は 1 ヶ月群ですでに認められ、3 ヶ月群においても同様であり、1 ヶ月群と 3 ヶ月群で子宮重量に有意な差は認めなかった。

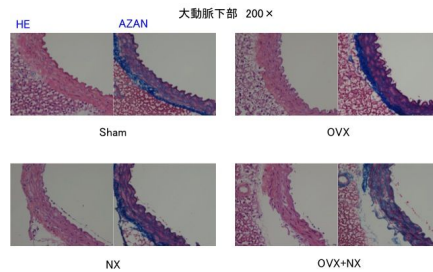


(2) 病理学的検討

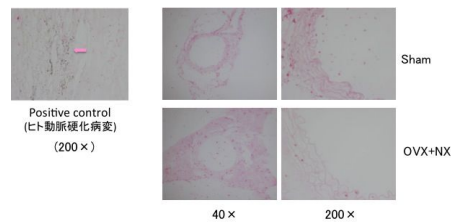
大動脈での形態学的評価を行った。HE、AZAN 染色において大動脈では血管中膜、内膜の肥厚、線維化など明らかな変化は認めなかった。



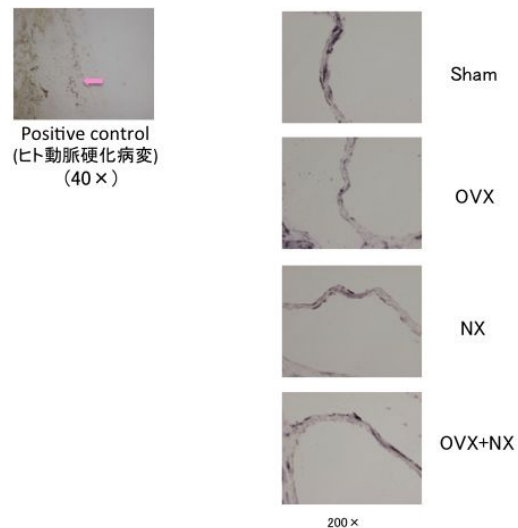
さらに強拡大の観察においても、血管や血管周囲に明らかな炎症細胞浸潤などの変化は 4 群いずれにおいても認められなかった。



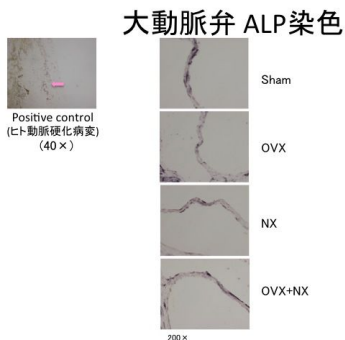
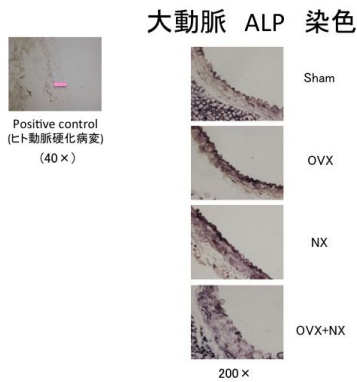
つぎに血管石灰化の評価として Von Kossa 染色を施行した。Positive control としてヒト大動脈瘤石灰化病変部に Von Kossa 染色陽性を確認した上で、OVX+NX3 ヶ月モデルにおいて 4 群を比較したが有意な差は認めなかった。



比較的動脈硬化を来しやすい大動脈弁周囲の観察も行ったが 4 群で有意差は認めなかった。

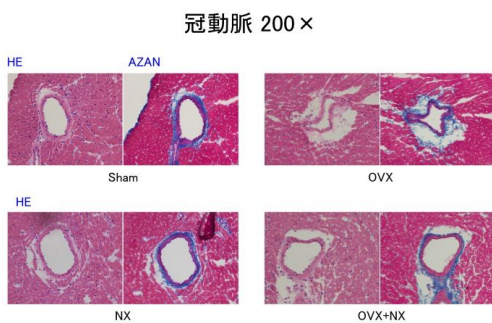


血管平滑筋細胞の石灰化型へのフェノタイプ転換を評価するために ALP 染色を行った。OVX+NX においてもフェノタイプの転換は認められず、4 群で有意差は認めなかった。



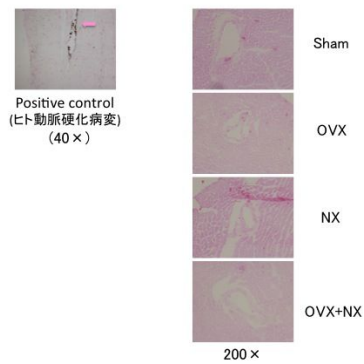
以上より大動脈および大動脈弁において明らかな血管石灰化や平滑筋の石灰化型へのフェノタイプ転換（骨芽細胞などへの転換）は認めないという結果であった。

冠状動脈の病理学的評価。冠状動脈においても同様に検討を行った。



手術後3ヶ月観察群において、血管内膜、中膜の肥厚、増殖、血管周囲炎症細胞浸潤等は4群間で有意差は認めなかった。冠状動脈での血管石灰化を評価するためにVon Kossa染色を施行した。しかし、大動脈の結果と同様にOVX+NX群においても明らかな石灰化領域の増大は認めなかった。

冠状動脈 Von Kossa



以上より、両側卵巣摘出（OVX）を5/6腎臓摘出CKDモデルマウスに追加施行したモデルマウスでは、大動脈血管石灰化および冠状動脈の血管石灰化は認めないということが明らかになった。

血管石灰化が起こらない理由としては、ヒトとマウスという種別間の影響も考えられる。今後腎機能障害と閉経による血管石灰化を評価するためには本モデルのような野生型のマウスを使用するのではなく、遺伝子改変マウスの使用、リン酸を負荷し石灰化を惹起させたモデルの使用、よりRAA系を活性化させたモデルの使用を検討して実験を行う必要性があると考えられた。

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)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
打和 大幹 (uchiwa hiroki)
久留米大学・医学部・助教

研究者番号：30624506

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：