

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461255

研究課題名(和文) Ca負荷によるTRPVを介した血管石灰化メカニズムの解明と治療法の模索

研究課題名(英文) Ca Load Induces Vascular Smooth Muscle Cell Mineralization Partly Mediated by TRPV

研究代表者

溝渕 正英 (MIZBUCHI, MASAHIDE)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：90465203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：高カルシウム血症は血管石灰化のリスクファクターであるが、カルシウムによる血管石灰化への影響は十分には解明されていない。我々は血管平滑筋細胞培養実験にて、カルシウム負荷により、血管平滑筋細胞の石灰化が促進すること、その促進にはカルシウムチャネルであるTRPV2を介していることを確認した。カルシウムはリンとは別の機序によって血管石灰化を促進することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although hypercalcemia is a risk factor for vascular calcification, little is known about the involvement of calcium (Ca) in the process of vascular calcification. Human aortic VSMCs were incubated in a low Ca media (LCa), normal Ca media (NCa), and a high Ca media (HCa). VSMC mineralization, and gene expression of markers for osteogenic process and a Ca channel (TRPV-2) was determined. RNA interference for TRPV-2 was performed to study the effect of TRPV2 on the mineralization. VSMC mineralization was induced in a dose dependent manner with the induction of an osteogenic process which was confirmed by the increase in Runx2 mRNA and ALP mRNA expression. We confirmed the up-regulation of TRPV-2 in the HCa. When TRPV-2 mRNA was knocked-down, the mineralization was significantly suppressed in HCa. These results suggest that Ca load induced VSMC mineralization which is partly mediated by TRPV2. Thus Ca load is a considerable factor for the process of VSMC mineralization.

研究分野：血管石灰化

キーワード：血管石灰化 血管平滑筋細胞 カルシウム TRPVチャネル

1. 研究開始当初の背景

血管石灰化病変はその発症部位や粥状プラーク形成との関係から二種類に大別される。一つは粥状硬化性石灰化病変で、血管内膜にみられ、粥状硬化と関連している。粥状硬化性石灰化病変は血管内皮細胞壊死や炎症、脂肪沈着などにより惹起され、進行すると骨形成過程が誘導される。もう一つのメンケベルグ型石灰化病変は、中膜の弾性層板に沿って非晶質ミネラルが沈着する、中膜を主体とした病変であり、糖尿病やCKD患者に好発する。これまで血管石灰化病変の発症・進展メカニズムは、CaやPを主体としたミネラルが血液中で飽和状態になり溶解閾値を越える結果として引き起こされる受動的なプロセスと考えられてきた。しかし近年石灰化病変局所における骨形成関連因子の存在から、血管石灰化に骨形成過程の関与することが指摘されるようになり、血管石灰化には緻密に制御された能動的プロセスも発症・進展因子となることが示された(1)。この能動的プロセスは、血管平滑筋細胞 (VSMC: vascular smooth muscle cell) の骨芽細胞様細胞への形質転換、VSMCのアポトーシス、エラスチン分解、石灰化抑制因子活性や発現の低下など、いくつものメカニズムが複雑に関わりながら成立している。

この能動的プロセスの主たる促進因子にPがあげられる。PはVSMCのIII型Na/P共輸送体(Pit-1)を介してVSMC内に流入し、VSMCの骨芽細胞様細胞への形質転換を促進すると考えられている。また、近年ではFGF23(fibroblast growth factor-23)-klotho系の心血管病変への影響なども注目されている(2)。その一方で、細胞外Ca濃度の能動的プロセスへの影響についての詳細な検討は存在しない。TRPVチャネルはTRPV1から6の6つのサブタイプからなり、VSMCにはTRPV1から4の発現が報告されている(3)。

VSMCにおいて機能解析が進んでいるのはTRPV2およびTRPV4である。TRPV2は活性化されると、細胞外Ca²⁺の細胞内流入を誘導し、平滑筋細胞の伸展に関与すると考えられている。TRPV4が活性化されると、細胞内に流入したCa²⁺がセカンドメッセンジャーとして機能し、筋小胞体に発現しているryanodine receptorを活性化し、小胞体内にストアされているCa²⁺を細胞質内に放出する。高濃度のCaは細胞毒性を有しており、アポトーシスを含めた細胞死を誘導することも広く知られている。

(1) Mizobuchi M et al. J Am Soc Nephrol 20:1453-1464, 2009

(2) Martin A et al. Physiol Rev 92: 131-155, 2012

(3) Baylie RL et al. Acta Physiol 203: 99-116, 2011

2. 研究の目的

本研究では、TRPVチャネルの血管石灰化プロセスへの影響を解明することにより、CKD患者の生命予後に強く関連する血管石灰化病変の治療戦略を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

ヒト大動脈VSMCを、Ca濃度を以下の条件に調整した培地で培養し、VSMCの石灰化の程度を定量する。培養期間は5日(石灰化が顕著に観察される期間を選択)とする。

1)正Ca(1.8 mM)培地

2)低Ca(0.4 mM)培地

3)高Ca(5.0 mM)培地

石灰化は、コッサ染色および、o-cresolphthalein complexone methodにより評価、定量する。VSMCより、total RNAおよび蛋白を抽出し、TRPV(2および4)の発現をmRNA、蛋白レベルで検討する。mRNAはリアルタイムPCR法を、蛋白レベルはwestern blottingおよび免疫蛍光染色に

で検討する。また、細胞内 Ca 濃度の変化を、蛍光マイクロプレートリーダーを用いて測定する。細胞内 Ca 濃度の上昇による、形質転換の促進も確認する。形質転換は骨芽細胞マーカーである、Runx-2、オステオカルシン、I 型コラーゲン、アルカリホスファターゼなどの mRNA、蛋白レベルの発現により確認する。これらにより細胞外 Ca 濃度上昇による VSMC 石灰化への、TRPV を介した細胞内 Ca 濃度の上昇と形質転換との関連性が検証できる。さらに RNA 干渉により、VSMC の TRPV 発現をノックダウンした系においても同様に検討する。

4. 研究成果

VSMC の石灰化は低 Ca、正 Ca、高 Ca 培地の順に濃度依存性に促進した。

Ca による石灰化の促進とともに、Runx2 や ALP の mRNA 発現の有意な上昇がみられた。

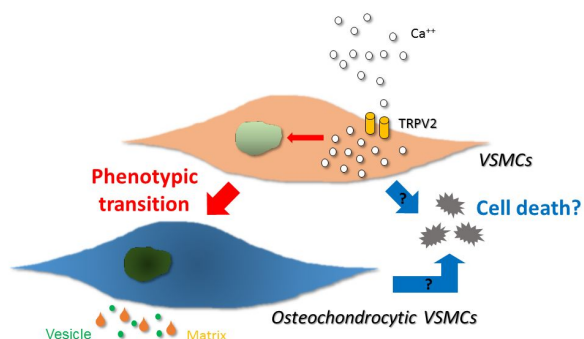
TRPV-2 mRNA の発現は高 Ca 培地で有意に上昇したのに対し、TRPV-4 mRNA 発現は変化しなかった。

TRPV-2 遺伝子のノックダウンにより、高 Ca 培地の VSMC の石灰化は有意に抑制された。

高 Ca 培地では、VSMC 内の Ca 濃度が上昇し、この上昇は TRPV-2 ノックダウンで抑制された。

以上の結果から、細胞外 Ca 濃度の上昇により VSMC の石灰化は形質転換を伴って促進し、その促進には TRPV-2 を介した細胞内 Ca 濃度の上昇が関与していることが示唆された。本研究結果から想定される Ca による VSMC 石灰化促進機序を図にまとめた。

Putative mechanism of VSMC mineralization induced by Ca load



細胞外 Ca 濃度の上昇により、VSMC の TRPV2 を介して細胞内に Ca が流入する、もしくは細胞内ストアから細胞質へ Ca が放出されると、VSMC の形質転換の促進を伴って VSMC の石灰化が促進する。また、細胞内 Ca 濃度上昇によりアポトーシスなどの細胞死が誘発されるとさらに石灰化が促進する可能性がある。

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 2 件)

Mizobuchi M, Inoue T, Ogata H, Koiwa F, Akizawa T, Shibata T. Ca load induces vascular smooth muscle cell mineralization partly mediated by TRPV. American Society for Nephrology Kidney Week 2014 (Philadelphia, 2014, 11)

井上隆、溝淵正英、濱田透眞、緒方浩題、小岩文彦、柴田孝則、衣笠えり子。Ca 負荷による血管平滑筋細胞の石灰化への TRPV の関与。第 26 回日本腎性骨症研究会 2015 年 2 月 21 日、東京

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝渕 正英 (MIZOBUCHI, Masahide)
昭和大学医学部内科学講座腎臓内科学部
門・講師
研究者番号：90465203

(2) 研究分担者

緒方 浩顕 (OGATA, Hiroaki)
昭和大学横浜市北部病院内科・准教授
研究者番号：30296959

(3) 連携研究者

()

研究者番号：