

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09304

研究課題名(和文)血管石灰化退縮治療の検討

研究課題名(英文)The examination on the regression treatment for vascular calcification

研究代表者

徳本 正憲 (Tokumoto, Masanori)

福岡歯科大学・口腔歯学部・准教授

研究者番号：80404010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：まず、慢性腎臓病の血管石灰化に対して最も重要な寄与因子である、リン負荷による血管平滑筋細胞の石灰化の進展と骨芽細胞様形質変化を抑制できる因子をメカニズムとともに探索した。カルシウム受容体刺激薬R568、チオ硫酸ナトリウム、エチドロネート、25水酸化ビタミンDの投与、リン制限、カロリー制限の石灰化および骨芽細胞様形質変化の抑制効果を調べたが、エチドロネート投与とリン制限が最も効果が高かった。しかしながら、ともに、石灰化を吸収するのに必要である単球の破骨細胞化に対しては抑制的で、今回試みた治療では石灰化を退縮させるのは困難であることが明らかとなった。今後、更なる石灰化退縮治療の探索が必要である。

研究成果の概要(英文)：Phosphate load is the most important contributor for vascular calcification in chronic kidney disease. First of all, I explored the treatments which can suppress phosphate-induced calcification and osteoblastic trans-differentiation in vascular smooth muscle cells. I examined the inhibitory effects of a calcimimetic agent R568, sodium thiosulphate, etidronate, 25-hydroxyvitamin D, phosphate restriction and caloric restriction on phosphate-induced calcification and osteoblastic trans-differentiation in vascular smooth muscle cells. The administration of etidronate and phosphate restriction were most effective. However, their effects on the differentiation of monocyte to osteoclastic cell, which is necessary for absorption of calcification, were also suppressive. These results revealed it is difficult that calcification inhibitors, which I examined, regress vascular calcification. In future, the further exploration for candidates of calcification regressor is necessary.

研究分野：CKD-MBD

キーワード：血管石灰化 慢性腎臓病 リン

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

我が国の慢性腎臓病患者はおよそ 1300 万人と非常に多いことに加え、慢性腎臓病は心臓血管病の発症や死亡の危険因子で、慢性腎臓病が進行すればするほど心臓血管病のリスクが高くなることが明らかにされている。実際、末期腎不全患者の死亡の主因は心臓血管病となっている。しかしながら、この理由として高血圧や高脂血症などの古典的リスクの増悪だけでは説明がつかず、慢性腎臓病に特有な合併症である慢性腎臓病に伴う骨ミネラル代謝異常(CKD-MBD)の関与が示唆されている。この CKD-MBD では、ミネラルバランスおよび骨代謝の長期的な異常に伴い、血管石灰化が進行し、心臓血管病の発症や死亡の危険度が高くなることが報告されてきた。したがって、慢性腎臓病における心臓血管病の発症・死亡を抑制するためには、血管石灰化の発症・進展を抑制することが重要となる。

これまで血管石灰化の進展因子について、リンの蓄積やカルシウムの負荷などが報告されており、リン負荷によって血管平滑筋細胞が骨芽細胞様細胞に形質変化することが明らかとなっている。したがって、血管石灰化の進展抑制治療として、食事によるリン摂取制限、非カルシウム含有リン吸着薬の投与による腸管からのリン吸収抑制などが行われているが、一旦形成された血管石灰化が退縮したという報告はほとんどなく、カルシウムイオンチャネル阻害剤を用いた治療として、カルシウム受容体刺激薬やビスフォスフォネート製剤、チオ硫酸ナトリウムの投与などが報告されているに過ぎない。

増悪刺激の中止により血管石灰化が退縮したとされる 2 つの動物実験では、血管石灰化の周辺部に単球が存在することが報告されており、血管石灰化の部位では、骨と同様に、骨芽細胞様細胞が石灰化を形成する機構に加え、破骨細胞様細胞によって石灰化が吸収される機構が存在し、両者のバランスで石灰化量が規定されていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、慢性腎臓病において発症頻度が高く、生命予後に悪影響を及ぼすが、治療法が明らかとなっていない血管石灰化を退縮させる治療およびそのメカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

ヒト血管平滑筋細胞を DMEM +10%FCS で培養し、リンを 1 週間あるいは 2 週間負荷することによって石灰化を誘導した。

まず、この *in vitro* 血管石灰化モデルに対して、石灰化の発症・進展を抑制することが報告されている、カルシウム受容体刺激薬 R-568 10^{-9} ~ 10^{-5} M やチオ硫酸ナトリウム 1 ~ 100 μ M、ビスフォスフォネート製剤であるエチドロネート 1 ~ 10 μ M を投与し、石灰化および血管平滑筋細胞の骨芽細胞様形質転換の抑制効果を確認した。

次に、1 週間リンを負荷することによって石灰化および骨芽細胞様形質転換を誘導した後に、リン負荷を継続したままか、あるいは中止をして、石灰化の発症抑制効果が強かったエチドロネート 1 ~ 10 μ M の投与をし、石灰化の進展抑制効果、血管平滑筋細胞の骨芽細胞様形質転換の reversibility を検討した。

さらに、ヒト末梢血単球を培養し、RANKL および M-CSF を添加して破骨細胞様細胞に誘導した。P 負荷および P 負荷の中止、石灰化の発症抑制効果が強かったエチドロネートの投与が、破骨細胞様細胞の活性に及ぼす影響を検討した。

最後に、培養液中の糖濃度の変化や 10^{-10} ~ 10^{-6} M の 25 水酸化ビタミン D 濃度がリン負荷による血管平滑筋細胞の石灰化および骨芽細胞様形質転換に及ぼす影響をメカニズムとともに検討した。

4. 研究成果

まず初めに、ヒト血管平滑筋細胞を用い、リン負荷により石灰化が誘導され、血管平滑筋細胞が骨芽細胞様細胞に形質変化することを確認した。

次に、血管石灰化を退縮させる可能性が示唆されているエチドロネート、チオ硫酸ナトリウム、カルシウム受容体刺激薬 R568 のリン負荷による血管平滑筋細胞の石灰化に対する発症・進展抑制効果を調べた。エチドロネートと 10^{-6} M のカルシウム受容体刺激薬 R568 には、リン 2.0mM 負荷による血管平滑筋細胞の石灰化に対する発症・進展抑制効果が認められたが、カルシウム受容体刺激薬 R568 の石灰化に対する発症・進展抑制効果は軽度で、チオ硫酸ナトリウムには石灰化の発症・進展抑制効果は認められなかった。エチドロネートの石灰化抑制効果は濃度依存的で、BMP2、RUNX2 などの骨形成性マーカーの発現抑制、SM22 などの血管平滑筋細胞マーカーの発現亢進を伴っており、血管平滑筋細胞の骨芽細胞様形質変化も抑制されているものと考えられた。このメカニズムを検討するために、エチドロネート投与 1 日後の石灰化促進因子や石灰化抑制因子の発現を調べたが、変化は認められず、培養液の Ca-P クリスタル中のカルシウム含量が減少しており、エチド

ロネートのピロリン酸様の石灰化抑制作用が、石灰化の発症・進展、骨芽細胞様形質変化の抑制に寄与しているものと考えられた。

この結果を元に、リン制限あるいはエチドロネートの投与によって、リン負荷により一旦形成された血管平滑筋細胞の石灰化および骨芽細胞様形質変化が元に戻るかを検討した。ヒト血管平滑筋細胞をDMEM+10%FBSでサブコンフルエントに至るまで培養した後、リン2.0mMを負荷して1週間培養すると、血管平滑筋細胞の石灰化および骨芽細胞様形質変化が認められた。この状態から、リン2.0mM負荷を継続したままエチドロネート10 μ Mを投与すると、1週間後の石灰化の進展 ($p < 0.01$) および骨形成性転写因子であるMSX2の発現 ($p < 0.05$) が抑制された。しかしながら、石灰化の退縮には至らなかった。同様にリン2.0mMを負荷して1週間培養し、血管平滑筋細胞の石灰化および骨芽細胞様形質変化を誘導した後に、リン負荷を解除すると同時にエチドロネートを5あるいは10 μ M投与すると、1週間後の石灰化が退縮 ($p < 0.01$) し、軟骨細胞様細胞の転写因子であるSOX9の発現が抑制された ($p < 0.01$)。

以上のことから、現在、血管石灰化退縮の可能性が示唆されている治療の中で、リン制限をすると同時に10 μ Mのエチドロネートを投与する方法が血管石灰化退縮に関して最も効果的である可能性が示唆された。

次に、単球の破骨細胞誘導に対するリン制限やエチドロネートの効果を検討したが、ともに単球の破骨細胞誘導を抑制した。このように、リン制限およびエチドロネートの投与は、血管石灰化の進展抑制には期待が持てるが、退縮には顕著な効果を発揮できない可能性が示唆された。したがって、*in vivo*でのリン制限およびエチドロネート投与の石灰化退縮実験は施行せず、他のより良い候補を探索することとした。

リン負荷による血管石灰化には細胞老化の関与が示唆されているため、カロリー制限によって抗老化遺伝子サーチュインが活性化され、リン負荷による血管平滑筋細胞の石灰化が抑制されるかを検討した。

単純にグルコース濃度が低いDMEM(100mg/dL)で培養すると、リン負荷による血管平滑筋細胞の石灰化が増悪したが、通常のDMEMで培養した後、グルコース濃度が低いDMEMに変更してリン負荷を開始すると、血管平滑筋細胞の石灰化が抑制されることが明らかとなった。これは、グルコース負荷後のグルコース制限により抗老化遺伝子SIRT1が活性化されて、血管平滑筋細胞の骨芽細胞様形質転換が抑制され、石灰化抑制因子であるオステオプロテジェリンの発現が亢進して石灰化が抑制されたものと考えられた。

また、25-水酸化ビタミンDの血中濃度が高いと心臓血管病の発症や心臓血管病死が少ないことが報告されているため、25-水酸

化ビタミンD投与によりリン負荷による血管平滑筋細胞の石灰化が抑制されるか否かを検討した。

10⁻¹⁰~10⁻⁶Mの25-水酸化ビタミンDの投与により2.0mMのリン負荷による血管平滑筋細胞の石灰化は抑制され、この効果は低濃度であるほど強かった。メカニズムとしては、リン酸トランスポーターであるPiT2の発現抑制を介した、細胞外基質分解酵素であるMMP2の発現抑制および培養液中Ca-Pクリスタルの形成抑制であると考えられた。

ともに、リン負荷が強い状態では、石灰化の進展抑制が十分ではないため、石灰化の進展は抑制できるが、カロリー制限や25水酸化ビタミンDの投与によって石灰化を退縮させるのは難しいと考えられるが、今後、単球の破骨細胞誘導に対するカロリー制限や25水酸化ビタミンD投与の効果を検討する予定である。

血管石灰化を退縮させるためには、今後、更なる検討が必要である。

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 3 件)

Masanori Tokumoto, The precedence of the reduced osteopontin expression and the increased calcium phosphate nanoparticle to the calcification by phosphate load with normal fasting glucose level in human vascular smooth muscle cells, American Society of Nephrology Kidney Week 2015, 2015

Masanori Tokumoto, The protective effects of caloric restriction on phosphate-induced calcification via the up-regulation of SIRT1 in human vascular smooth muscle cells, American Society of Nephrology Kidney Week 2016, 2016

Masanori Tokumoto, Direct inhibition of phosphate-induced vascular smooth muscle cell calcification via suppression of PiT2 expression by 25-hydroxyvitamin D, American Society of Nephrology Kidney Week 2017, 2017

[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：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
取得年：
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

徳本 正憲 (TOKUMOTO, Masanori)
福岡歯科大学・口腔歯学部・准教授
研究者番号： 80404010

(2) 研究分担者 なし

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号：

(4) 研究協力者 なし

()