

令和 3 年 4 月 25 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08253

研究課題名(和文)腎不全病態下におけるvascular healthとビタミンD

研究課題名(英文)Vascular health and vitamin D under uremic condition

研究代表者

溝淵 正英 (MIZOBUCHI, MASAHIDE)

昭和大学・医学部・准教授

研究者番号：90465203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：正常ラットの大動脈リングを用い、通常培地もしくは高Ca高Pのミネラルストレス培地にカルシトリオールを添加して石灰化の程度を検討した。またヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を同様に通常もしくはミネラルストレス培地にて培養後、HUVECの内皮細胞マーカーの遺伝子発現と、透過性を検討した。さらに、血管平滑筋特異的VDR遺伝子欠損マウスへのカルシトリオール投与による血管石灰化への影響も検討した。カルシトリオールはミネラルストレスによる血管内皮細胞の透過性亢進を抑制することで、血管石灰化の進展を阻害した。またカルシトリオールの投与による血管石灰化促進にVSMCのVDRは関与していない可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、活性型ビタミンDのカルシトリオールは、CaやPのミネラル負荷による血管内皮細胞障害の抑制作用を有し、また、VDRを介した血管石灰化促進作用はみられなかったことから、ミネラル代謝異常を引き起こさないように適切に使用することにより、血管保護作用が期待されることから、動脈硬化対策の選択肢のひとつとなり得る。

研究成果の概要(英文)：Rat aortic rings and HUVECs were incubated in the normal or the high Ca/high P media. Aortic Ca content, and mRNA levels of endothelial cell markers (CD31, VE-cadherin, and ZO-1) and permeability were studied, respectively. Also, the effect of calcitriol on vascular calcification was studied by using vascular smooth muscle cell-specific VDR conditional knockout mice. Calcitriol inhibited exacerbation of vascular calcification by the suppression of HUVEC hyperpermeability. Moreover, calcitriol-VDR axis could not be involved in the progression of vascular calcification induced by high doses of calcitriol.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：血管石灰化 カルシトリオール VDR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性腎不全患者の血管石灰化は生命予後悪化と密接に関連しており、その対策は重要かつ喫緊の課題となっている。慢性腎不全患者の血管石灰化は中膜にみられるのが特徴であるが(メンケベルグ型) この中膜の石灰化進展に深く関与しているのがカルシウム(Ca)やリン(P)といったミネラルの代謝異常である。血管中膜は構造上内膜と外膜により挟まれており、血液や血管外組織と接することなく存在している。近年では、血管内皮細胞(EC)が中膜石灰化に関与することが報告されており、中膜の石灰化への内膜の関与が注目されている。一方でECにはビタミンD受容体が発現しており、ビタミンDの血管内膜保護効果が示されている。臨床的にもビタミンD製剤とCKD患者の動脈硬化抑制との関連が報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、ビタミンDによる血管内膜保護作用の可能性に着目し、カルシトリオール(1,25(OH)₂D₃)の血管石灰化との関連性について invitro および in vivo 系にて検討した。

3. 研究の方法

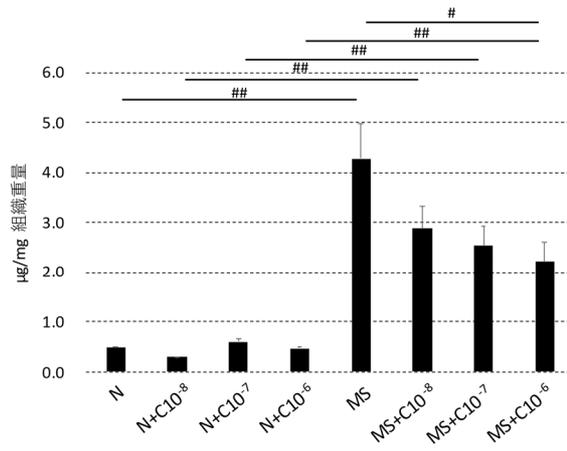
正常ラットの大動脈リングを用い、通常培地(Ca1.6mM, P 0.5mM)もしくは高Ca(3.8 mM)高P(2.2 mM)のミネラルストレス培地にカルシトリオール 10⁻⁶M を添加して3日間培養し、石灰化の程度を組織内Ca含量測定により検討した。また、In vitro の実験として、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を前述と同様に通常もしくはミネラルストレス培地にて48時間培養し、HUVECの内皮細胞マーカー(CD31、VE-cadherin、ZO-1)の遺伝子発現レベルをリアルタイムPCR法により、透過性を血管透過性アッセイキットを用いて検討した。また、SMMHC-CreERT2 マウス(Nature Med 14: 64-68)と floxed+/+VDR マウスを交配させて生まれた8週齢の雄性マウスにタモキシフェン1mgを連日5日間腹腔内投与して、血管平滑筋特異的VDR遺伝子欠損マウス(VSMC VDR-CKO マウス)を作製し、同マウスを高P食飼育しながら、カルシトリオール10ngもしくは100ngを週3回4週間腹腔内投与した後に、マウスの大動脈を採取し、Ca含有量を測定し、タモキシフェン非投与マウスに同量のカルシトリオールを投与したコントロール群と比較した。

4. 研究成果

3日間ミネラルストレス培地にて大動脈リングを培養すると、リング内のCa含有量が約9倍に有意に増加した(N群: 0.5±0.0 vs MS群: 4.3±1.7, p<0.01)。ミネラルストレス培地へのカルシトリオール添加により、リングCa含有量はカルシトリオール濃度依存性に減少傾向を示し、高濃度MS+C10⁻⁶群では有意に減少した(MS+C10⁻⁸群: 2.88±0.4、MS+C10⁻⁷群: 2.5±0.4、MS+C10⁻⁶群: 2.2±0.4, p<0.05 vs MS群)(図1)。HUVECを用いた実験系では、内皮細胞マーカーであるCD31、VE-cadherin、ZO-1の遺伝子発現はミネラルストレスにより減少し、カルシトリオール添加によりその減少は抑制される傾向がみられ、特にVE-cadherinでその傾向が顕著であった(図2)。また、透過性の実験系では、いずれの群でもHUVECは脱落することなくインサート底部のフィルターに均一にしっかりと定着していることから透過性評価が適正に行われたことが裏付けられ(図3A) MS群がN群と比較して約70%有意に透過性が亢進し、統計学的な有意差はみられなかったもののカルシトリオール添加によりこの透過性亢進が抑制される傾向がみられた(図3B)。VSMC-VDR-CKOマウスにカルシトリオールを投与すると、大動脈のCa含量は有意に増加したが、投与量による差はみられなかった。コントロールマウスでも同様の結果であり、大動脈Ca含量に両群間での差はみられなかった。カルシトリオール投与による血中CaやP濃度の変化は見られず、各群同様であった。

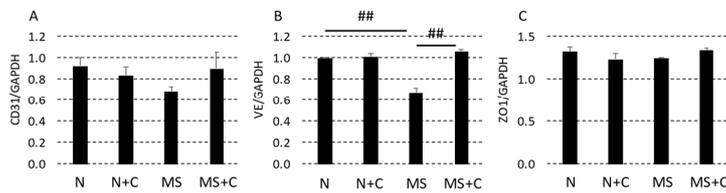
以上より、カルシトリオールはミネラルストレスによる血管内皮細胞の透過性亢進を抑制することで、血管石灰化の進展を阻害した。また腎機能正常時では、高用量カルシトリオールの投与による血管石灰化促進にVSMCのVDRは関与していない可能性が示唆された。

図1



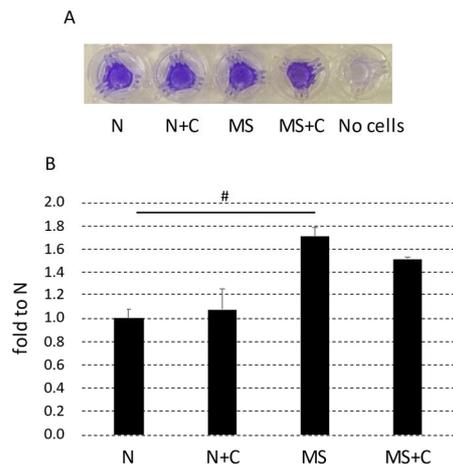
正常ラット大動脈リングのCa含有量 (µg/mg組織重量)。N、正常ラット大動脈リングを通常培地で培養；N+C、正常ラット大動脈リングを通常培地に濃度を振り分けたカルシトリオール 10^{-6} ~ 10^{-8} M)を添加して培養；MS、正常ラット大動脈リングをミネラルストレス培地で培養 MS+C、正常ラット大動脈リングをミネラルストレス培地に濃度を振り分けたカルシトリオール 10^{-6} ~ 10^{-8} M)を添加して培養。平均値±標準誤差で表示 (各群3検体)。## p<0.01、# p<0.05。

図2



大動脈リングの血管内皮マーカー遺伝子発現。各遺伝子の発現レベルをGAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 発現量で補正。平均値±標準誤差で表示 (各群3検体)。## p<0.01。

図3



ミネラルストレスによるHUVECの透過性。N、通常培地；N+C、通常培地にカルシトリオール (10^{-6} M) 添加；MS、ミネラルストレス培地 MS+C、ミネラルストレス培地にカルシトリオール (10^{-6} M) 添加。透過性はN群を1とした場合の比率を、平均値±標準誤差で表示 (各群3検体)。# p<0.05。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	緒方 浩顕 (OGATA HIROAKI) (30296959)	昭和大学・医学部・教授 (32622)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関