

機関番号：24402

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591082

研究課題名 (和文) 血管石灰化の進展における Wnt シグナル経路の役割に関する研究

研究課題名 (英文) Roles of Wnt signaling pathway in progression of vascular calcification

研究代表者

塩井 淳 (SHIOI ATSUSHI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：90260801

研究成果の概要 (和文)：動脈硬化・血管石灰化の発症・進展における Wnt シグナル経路の役割について検討した。Wnt シグナル経路が動脈硬化・血管石灰化病変部で活性化されると共に血管平滑筋細胞の骨芽細胞への形質転換に関与していることが明らかにされた。また、炎症刺激が血管壁における Wnt シグナル経路の活性化に重要な役割を果している可能性が示唆された。さらに、細胞老化が動脈硬化・血管石灰化病変の成り立ちに関与している可能性も示された。

研究成果の概要 (英文)：We investigated the roles of Wnt signaling pathway in the development of atherosclerosis and vascular calcification. This study clarified that Wnt signaling pathway is activated in atherosclerotic plaques including calcified lesions and that this pathway plays an important role in acquisition of osteoblastic phenotype of vascular smooth muscle cells. Activation of Wnt signaling pathway in vascular lesions may be induced by inflammatory stimuli. Moreover, cellular senescence may also contribute to the development of atherosclerosis and vascular calcification.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：骨・カルシウム代謝異常

1. 研究開始当初の背景

血管石灰化は動脈硬化症の重要な病態のひとつと理解されており、冠動脈疾患の重症度を反映するだけでなく、心血管イベントおよび心血管系死亡の危険因子となることが明らかにされている。また、冠動脈インター

ベンションの妨げになることは以前から指摘されている。したがって、血管石灰化の発症・進展機構を明らかにすることは、動脈硬化性疾患（冠動脈疾患、脳梗塞、閉塞性動脈硬化症など）の治療上きわめて重要な課題である。

我々は、*in vitro* での研究により、血管平滑筋細胞(VSMC)が骨芽細胞様の性格を獲得し、血管石灰化の発症・進展に關与することを明らかにした。また、*in vivo* での研究により、動脈硬化性石灰化の発症・進展に軟骨化生が重要な役割を果たしていることを示した。したがって、血管石灰化の発症・進展には、血管壁に存在する間葉系細胞（主として血管平滑筋細胞）が骨・軟骨形成細胞に分化し、中膜平滑筋層やプラーク病変に石灰化を引き起こすものと理解される。

Wnt シグナル伝達経路は線虫からヒトにいたるまで広く保存されたシグナル伝達機構であり、発生・形態形成や細胞増殖・分化に重要な役割を果たしている。Wnt は 350~400 個のアミノ酸からなる分泌蛋白で、23~24 個のシステイン残基が分子内の共通した位置に保存されている。現在、脊椎動物では 19 種類の Wnt が知られている。Wnt タンパク質は、細胞膜上の 7 回膜貫通型受容体 Frizzled と 1 回膜貫通型受容体 LRP (low-density lipoprotein receptor-related protein) に結合する。脊椎動物では、LRP5 または LRP6 が Frizzled と共働受容体(Co-receptor)を形成し、細胞内へシグナルを伝達する。細胞内での主な伝達経路は 4 種類知られているが、そのうちβ-カテニンの細胞内蓄積を介して転写因子 TCF/LEF (T cell factor/lymphoid enhancing factor)を活性化する Wnt/β-カテニン経路が種々の疾患との関連で注目されている。最近の研究により、この Wnt シグナルが骨代謝に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。Wnt シグナル伝達経路に関わる LRP5 の loss of function 型の mutation により骨粗鬆症が引き起こされることがヒトおよびマウスで確認されている。一方、LRP5 の gain of function 型の mutation により高骨量形質 (high bone mass trait) を示すことが報告され

ている。さらに、Wnt シグナルは骨芽細胞および軟骨細胞の分化調節に關与することも示されている。

以上のことから、血管石灰化において血管平滑筋細胞が軟骨細胞あるいは骨芽細胞に分化する過程に Wnt シグナルの活性化が關与している可能性が推測される。ごく最近、老化促進モデルマウスである *klotho* マウスにおいて Wnt シグナルが老化を促進する可能性が明らかにされている (Liu et al, Science, 2007)。さらに、*klotho* が Wnt と結合し、その作用を抑制することも示されている。このことから、加齢とともに血管壁において Wnt シグナルが活性化し、血管石灰化を促進するという仮説が導かれる。

2. 研究の目的

本研究では、血管石灰化の発症・進展における Wnt シグナルの意義特に細胞老化との関連を明らかにすることにより、老化プロセスにおける血管石灰化の意義を解明することを目的とする。

(1) 動脈硬化・血管石灰化における Wnt シグナル活性化の役割を明らかにする。

(2) 培養血管平滑筋細胞を用いた石灰化実験系において Wnt シグナルの役割を明らかにする。

(3) 動脈硬化・血管石灰化における細胞老化の役割を明らかにする。

(4) 培養血管平滑筋細胞を用いた石灰化実験系における細胞老化の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) apoE ノックアウト (apoEKO) マウスと TOPGAL マウスとの交配により apoEKO- TOPGAL マウスを作製し、動脈硬化性プラークおよび血管石灰化病変における Wnt シグナルの活性化を x-gal 染色により評価する。

(2) ヒト血管平滑筋細胞 (HVSMC) における Wnt およびその受容体の発現を RT-PCR 用により検討すると共に HVSMC に対する Wnt3a の作用 (石灰化の促進作用、アルカリホスファターゼ (ALP) の誘導作用) を検討する。さらに、HVSMC における Wnt シグナル活性化

を TCF/LEF の転写活性により評価する。

また、TOPGAL マウス大動脈由来の血管平滑筋細胞における Wnt シグナルの活性化および ALP の発現誘導に対する lipopolysaccharide (LPS) の作用について検討する。さらに、apoEKO マウスに LPS を間歇投与し、血管石灰化に対する作用を検討する。

(3) apoEKO マウスの動脈硬化性プラークおよび血管石灰化病変部における細胞老化マーカーである senescence-associated β -galactosidase (SA β -gal) の発現を検討する。

(4) ヒト血管平滑筋細胞 (HVSMC) を用いた石灰化実験系における SA β -gal の発現を解析する。

4. 研究成果

(1) 40 週齢以上の apoE-TOPGAL マウスの大動脈プラーク病変に x-gal 染色陽性細胞が認められ、石灰化病変部ではその周囲に x-gal 陽性細胞が確認された。

(2) HVSMC において Wnt5a, Wnt5b, LRP5 の発現が確認された。また、HVSMC に対する Wnt3a の作用を検討したところ、Wnt3a の単独添加では ALP 活性に影響を及ぼさなかったが、活性型ビタミン D との同時添加では、活性型ビタミン D 単独に比して有意に ALP 活性を上昇させた。また、Wnt3a と活性型ビタミン D の同時添加においてのみ in vitro での石灰化が von Kossa 染色により確認された。また、HVSMC における Wnt シグナルを TCF/LEF の転写活性で検討したところ、Wnt3a の添加により TCF/LEF の転写活性はコントロールに比し有意に上昇したが、活性型ビタミン D の同時添加では転写活性に対する増強硬化は認められなかった。以上の検討により、血管平滑筋細胞の石灰化形質獲得に Wnt シグナルが重要な役割を果たしていることが示唆された。

LPS の添加により TOPGAL マウス由来の血管平滑筋細胞において x-gal 陽性細胞がコントロールに比して有意に増加した。また、LPS の添加により ALP 活性が有意に上昇した。したがって、LPS はマウス血管平滑筋細胞において Wnt シグナルを活性化することにより ALP の発現を誘導する可能性が示唆された。

22 週齢の apoEKO マウスに LPS 50 mg を週 1 回間歇投与し、10 週後にプラーク石灰化に対する作用を検討したところ、LPS によるプラーク石灰化の促進作用は認められなかった。

(3) apoEKO マウスの動脈硬化および血管石灰化病変における SA β -gal の発現を検討したところ、プラーク内に SA β -gal 陽性の細胞が

認められた。また、SA β -gal 陽性領域と ALP 活性陽性領域とが一部重なることから、SA β -gal 陽性細胞が同時に ALP を発現する可能性が示唆された。

(4) 炎症性メディエーターの添加により HVSMC における ALP の発現が誘導されたが、SA β -gal 活性は有意な変化を認めなかった。また、Wnt3a および活性型ビタミン D の添加でも HVSMC における SA β -gal 活性の上昇は確認できなかった。

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 12 件)

- ① Mori K, Ikari Y, Jono S, Emoto M, Shioi A, Koyama H, Shoji T, Ishimura E, Inaba M, Hara K, Nishizawa Y Fetuin-A is associated with calcified coronary artery disease. Coron Artery Dis 査読有 21, 2010, 281-285
- ② Ueno H, Koyama H, Shoji T, Monden M, Fukumoto S, Tanaka S, Otsuka Y, Mima Y, Morioka T, Mori K, Shioi A, Yamamoto H, Inaba M, Nishizawa Y Receptor for advanced glycation end-product (RAGE) regulation of adiposity and adiponectin is associated with atherosclerosis in apoE-deficient mouse. Atherosclerosis 査読有 211, 2010, 431-436
- ③ Jono S, Otsuki S, Higashikuni Y, Shioi A, Mori K, Hara K, Hashimoto H, Ikari Y Serum osteoprotegerin levels and long-term prognosis in subjects with stable coronary artery disease. J Thromb Haemost 査読有 8, 2010, 1170-1175
- ④ Mori K, Ikari Y, Jono S, Shioi A, Ishimura E, Emoto M, Inaba M, Hara K, Nishizawa Y Association of serum TRAIL level with coronary artery diseases. Thromb Res 査読有 125, 2010, 322-325
- ⑤ Mori K, Jono S, Emoto M, Kawagishi T, Yasumoto H, Konishi T, Furumitsu Y, Shioi A, Shoji T, Inaba M, Nishizawa Y Effects of pravastatin on serum osteoprotegerin levels in patients with hypercholesterolemia and type 2 diabetes. Angiology 査読有 61, 2010, 86-91
- ⑥ 塩井 淳. 血管石灰化の分子機構. CLINICAL CALCIUM 査読無 20, 2010,

- 1611-1619
- ⑦ 塩井 淳. 血管石灰化・リモデリングと糖尿病. 脈管学 査読無 50, 2010, 561-567
 - ⑧ 塩井 淳. 血管石灰化の分子機構. 血管医学 査読無 11, 2010, 141-148
 - ⑨ Okazaki H, Shioi A, Hirowatari K, Koyama H, Fukumoto S, Ishimura E, Nishizawa Y Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway regulates inflammatorymediators-induced calcification of human vascular smooth muscle cells. Osaka City Med J 査読有 55, 2009, 71-80
 - ⑩ Shioi A, Nishizawa Y Vascular calcification in chronic kidney disease: pathogenesis and clinical implications. J Ren Nutr 査読無 19, 2009, 78-81
 - ⑪ Motoyama K, Koyama H, Moriwaki M, Emura K, Okuyama S, Sato E, Inoue M, Shioi A, Nishizawa Y Atheroprotective and plaque-stabilizing effects of enzymatically modified isoquercitrin in atherogenic apoE-deficient mice. Nutrition 査読有 25, 2009, 421-427
 - ⑫ 塩井 淳、西沢良記. 血管石灰化におけるリンの役割. CLINICAL CALCIUM 査読無 19, 2009, 180-185

[学会発表] (計3件)

- ① 塩井 淳、森 克仁、西沢良記. 血管石灰化の調節機構. 第28回日本骨代謝学会学術集会、平成22年7月21日、東京
- ② Shioi A, Okazaki H, Koyama H, Ishimura E, Nishizawa Y Chronic proteinuric nephropathy induced by immune-mediated glomerular injury accelerates atherosclerosis in apoE-deficient mice. European Renal Association-European Dialysis Transplantation Association, June 26, 2010, Munich
- ③ 塩井 淳、森 克仁、岡崎博一、西沢良記. 血管石灰化の分子機構. 第74回日本循環器学会総会、平成22年3月5日、京都

[図書] (計1件)

- ① 塩井 淳、西沢良記. 血管石灰化とその調節機構. 日本メディカルセンター、CKD-MBDハンドブック、2009, 253 (47-53)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩井 淳 (SHIOI ATSUSHI)
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：90260801

(2) 研究分担者
福本 真也 (FUKUMOTO SHINYA)
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：90381996

(3) 連携研究者
なし