

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08875

研究課題名(和文) 血管石灰化病変の退縮を目指した、骨細胞様細胞に着目した血管石灰化の病態解析

研究課題名(英文) Pathophysiological analysis of vascular calcification

研究代表者

藤田 俊一 (Fujita, Shunichi)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：30722607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性サイトカインによる血管石灰化への影響を評価するため、大動脈培養実験を行った。マウスより大動脈を摘出し、石灰化誘導培地で培養した。IL-1、IL-6、IL-17Aを加え、石灰化に及ぼす影響をマイクロCTおよび組織染色にて評価した。結果、IL-17Aが大動脈の石灰化を濃度依存的に促進することが分かった。IL-1、IL-6にも一部促進傾向が見られたが、統計学的有意差は認めなかった。本研究成果は、乾癬及び乾癬性関節炎患者において血管合併症リスクが増えることの機序の説明になると考える。また、本モデルは比較的簡便に血管石灰化を誘導できるモデルであり、治療候補薬剤の評価などにも応用可能と考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、IL-17Aが血管石灰化の促進に働くことを示している。乾癬および乾癬性関節炎は、その病態にIL-17Aが強く関与することが知られている。本研究成果は、乾癬及び乾癬性関節炎患者において血管合併症リスクが増えることの機序の説明になると考える。また、本モデルは比較的簡便に血管石灰化を誘導できるモデルであり、本モデルを用いて治療候補薬剤の評価などにも用いることが出来ると考える。

研究成果の概要(英文)：Aortic culture experiments were performed to evaluate the effects of inflammatory cytokines on vascular calcification. Aortas were excised from mice and cultured in calcification-inducing medium; IL-1, IL-6, and IL-17A were added, and their effects on calcification were evaluated by micro-CT and tissue staining. The results showed that IL-17A promoted calcification of the aorta in a concentration-dependent manner; IL-1 and IL-6 also showed some promotion tendency, but the difference was not statistically significant. The results of this study may explain the mechanism of increased risk of vascular complications in patients with psoriasis and psoriatic arthritis. In addition, this model is a relatively simple model for inducing vascular calcification, and we believe it can be applied to the evaluation of candidate drugs for treatment.

研究分野：炎症

キーワード：血管石灰化 炎症性サイトカイン 大動脈 IL-17A 慢性炎症

1. 研究開始当初の背景

長い間、血管石灰化は加齢に伴う受動的な変性プロセスと認識され、病態解析や治療の標的としてみなされていなかった。近年の研究で、血管石灰化は血管平滑筋細胞から骨芽細胞への形質変換が起こり、骨類似マトリックスが異所性に蓄積するという「能動的プロセス」であることが明らかにされた (Durham AL. Cardiovasc Res 2018, Osako MK. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2013)。更に最近、その血管石灰化組織中に骨細胞様細胞が存在し (Vasuri F. World J Stem Cells 2014)、骨細胞マーカーDMP1 (Dentin Matrix Protein 1) を発現していることが報告された (Sarah-Kim B. JBMM 2019)。しかし、この骨細胞様細胞が血管石灰化形成及び進展にどのように影響しているかは明らかでない。

骨細胞は骨基質中に存在し、メカニカルストレスを感知し、骨芽細胞・破骨細胞の機能を調節することで骨の石灰化を誘導する (Bonewald. Endocrinol Metab Clin North Am. 2017)。また、近年骨細胞自体に溶骨機能があることが報告された (Jahn K, et al. J Bone Miner Res 2017)。そのため、骨細胞様細胞の機能調節が血管石灰化抑制・退縮につながる可能性があると考えられる。また、関節リウマチなどでの慢性炎症、高安動脈炎などの血管局所の炎症は血管石灰化を促進する。しかしながら、炎症が石灰化を促進する機序の詳細は明らかでなく、特に骨細胞様細胞に着目した機序の解明はなされていない。

2. 研究の目的

本研究では、骨細胞様細胞に着目し血管石灰化の機序を遺伝子改変マウス、器官培養系を用いた多面的解析により明らかにする。その際に、炎症 (インフラマソーム・TNF・IL-6) と血管石灰化との関与に着目して解析を進める。

3. 研究の方法

(1) マウス血管石灰化モデルでの血管石灰化評価

血管石灰化の解析のため、血管石灰化モデルマウスを用いる。中膜石灰化を呈する Klotho 欠損マウスモデルおよび、Adenine 負荷血管石灰化モデルを用いる。血管石灰化の評価にはマイクロCT解析および組織学的解析を行った。

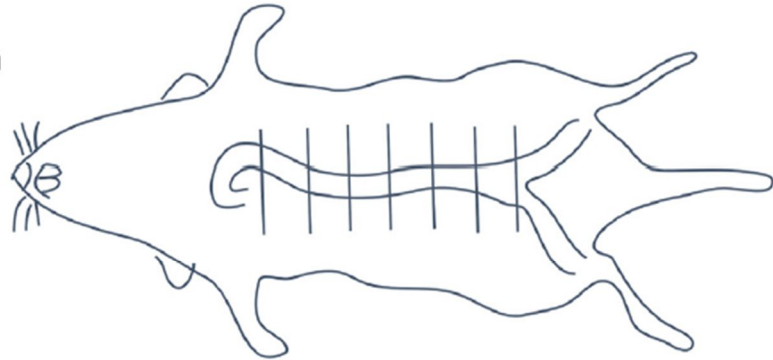
Adenine による石灰化誘導は 0.2% Adenine 混合飼料を 8 週 ~ 20 週齢まで投与することで行った。

(2) 大動脈 ex vivo 培養系を用いた血管石灰化評価

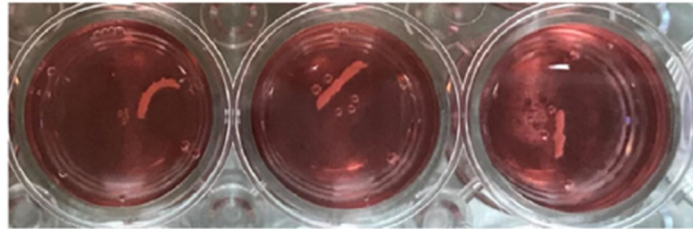
摘出大動脈組織を高濃度リン存在下で培養することで石灰化を誘導できる ex vivo 血管石灰化モデルが報告されている (Akiyoshi T. Atherosclerosis 2016)。このモデルを用い、炎症性サイトカインが石灰化の程度にどのように影響を及ぼすかを評価した。培養大動脈中の石灰化は、経時的なマイクロ CT 撮像、および組織染色により定量評価した。

A

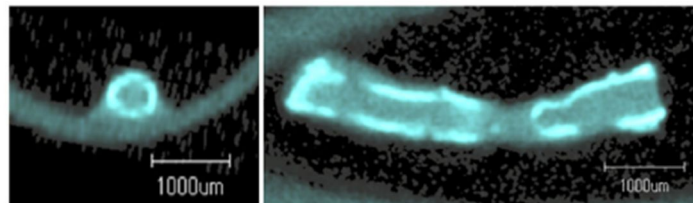
Tissue collection



Tissue culture

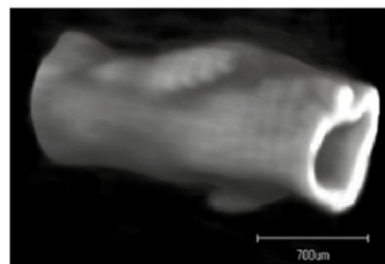
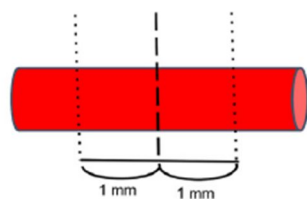


Micro-CT analysis

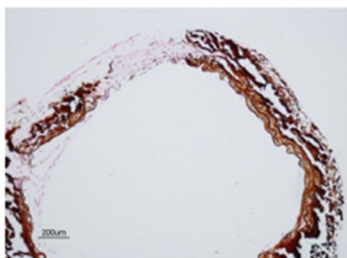


B

Designation of 2-mm length at the center



C

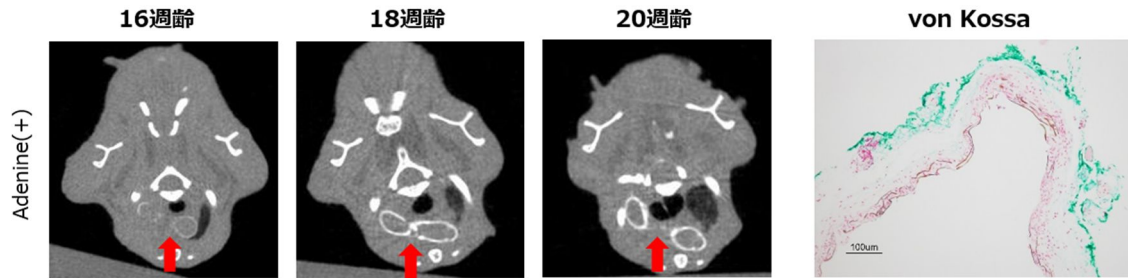


von Kossa stained area (%)
= cross sectional area of von Kossa stained (μm^2)
/ cross sectional area of the aorta (μm^2)

4. 研究成果

(1) 血管石灰化モデルマウスの解析

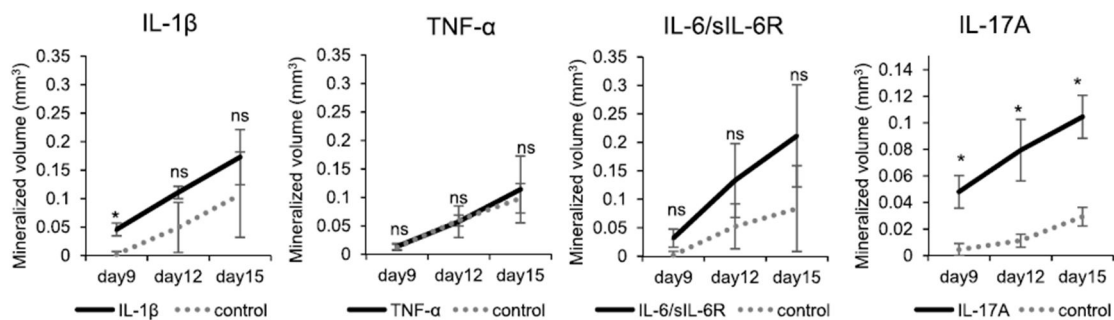
Adenine 負荷により下図のごとく大動脈の石灰化(赤矢印)を誘導することができた。



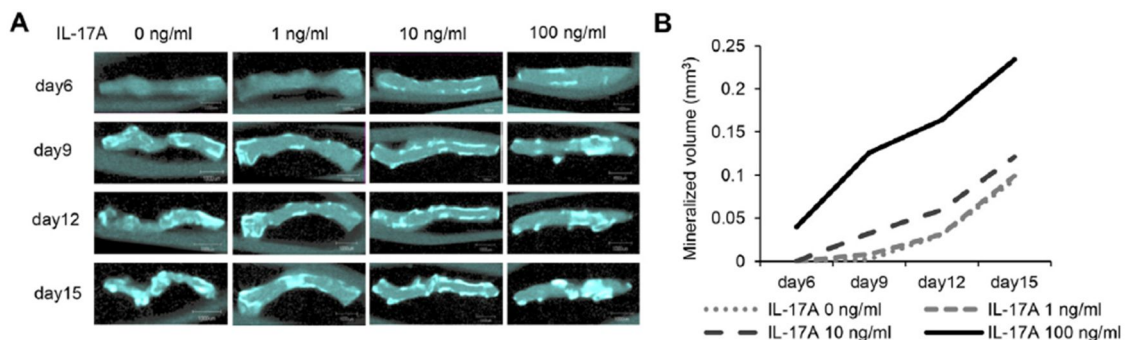
しかしながら、問題点として、石灰化の進行・程度には個体差が大きく、また石灰化出現後すぐに致死経過をたどった。そのため、本モデルを用いて石灰化の解析、また薬剤を用いるような介入実験は困難と考えた。

(2) 炎症性サイトカインによる血管石灰化の促進効果 (ex vivo 大動脈培養系)

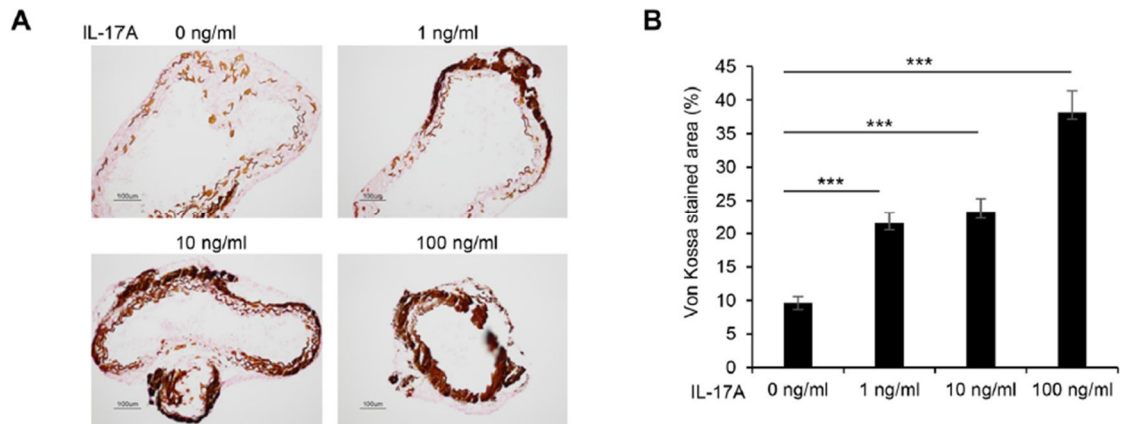
炎症性サイトカインによる血管石灰化への影響を評価するため、マウス大動脈組織を用いた ex vivo での大動脈培養実験を行った。マウスより大動脈を摘出し、石灰化誘導培地で培養した。その培養系に炎症性サイトカインとして IL-1、IL-6、IL-17A を加え、石灰化に及ぼす影響をマイクロ CT および組織染色にて評価した。結果、IL-17A が大動脈の石灰化を濃度依存的に促進することが分かった。IL-1、IL-6 にも一部促進傾向が見られたが、統計学的有意差は認めなかった。



IL-17A による用量依存的な石灰化誘導 (下図)



Von Kossa 染色による石灰化の評価（下図）



(本研究成果の意義)

本研究成果は、IL-17A が血管石灰化の促進に働くことを示している。乾癬および乾癬性関節炎は、その病態に IL-17A が強く関与することが知られている。本研究成果は、乾癬及び乾癬性関節炎患者において血管合併症リスクが増えることの機序の説明になると考える。また、本モデルは比較的簡便に血管石灰化を誘導できるモデルであり、本モデルを用いて治療候補薬剤の評価などにも用いることが出来ると考える。

現在までの研究成果は、下記の論文として報告した。

IL-17A promotes vascular calcification in an ex vivo murine aorta culture.
Hiramatsu-Asano S, Mukai T, Akagi T, Uchida HA, Fujita S, Nakano K, Morita Y.
Biochem Biophys Res Commun. 2022 May 14;604:83-87.
doi: 10.1016/j.bbrc.2022.03.051. Epub 2022 Mar 10.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sumie Hiramatsu-Asano, Tomoyuki Mukai, Takahiko Akagi, Haruhito A Uchida, Shunichi Fujita, Kazuhisa Nakano, Yoshitaka Morita.	4. 巻 604
2. 論文標題 IL-17A promotes vascular calcification in an ex vivo murine aorta culture	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 83～87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.03.051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takahiko Akagi, Tomoyuki Mukai, Takafumi Mito, Kyoko Kawahara, Shoko Tsuji, Shunichi Fujita, Haruhito A. Uchida, Yoshitaka Morita.
2. 発表標題 Excessive Angiotensin II exacerbates bone erosion in a murine tumor necrosis factor-mediated arthritis model
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

川崎医科大学 リウマチ・膠原病学教室 教室紹介 https://m.kawasaki-m.ac.jp/classroom/course.php?id=447
--

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	向井 知之 (Mukai Tomoyuki) (00454421)	川崎医科大学・医学部・教授 (35303)	

6. 研究組織（つづき）

	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	内田 治仁 (Haruhito Uchida) (00550857)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	
研究分担者	小畑 淳史 (Atsushi Obata) (10771298)	川崎医科大学・医学部・特任研究員 (35303)	
研究分担者	守田 吉孝 (Yoshitaka Morita) (50346441)	川崎医科大学・医学部・教授 (35303)	
研究分担者	金藤 秀明 (Hideaki Kaneto) (80448034)	川崎医科大学・医学部・教授 (35303)	

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
---------	---------