

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22790806

研究課題名（和文）腎不全病態下における新たな血管石灰化プロセス：エラスチン分解の意義
研究課題名（英文）Role of elastin degradation in the process of vascular calcification in uremic milieu

研究代表者

溝渕 正英 (MIZOBUCHI MASAHIDE)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：90465203

研究成果の概要（和文）：5/6 部分腎摘出ラットを高リンおよび乳酸負荷食にて飼育すると大動脈中膜に石灰化がみられ、MMP-2 を介したエラスチン分解の関与が示唆された。血管平滑筋細胞の高リンおよび TNF- α 刺激による石灰化促進は、活性型ビタミン D 製剤により抑制された。さらに同刺激による MMP-2 遺伝子発現や MMP-2 分泌の促進も、活性型ビタミン D 製剤により抑制された。高リンおよび TNF- α による石灰化を活性型ビタミン製剤は MMP-2 阻害を介して抑制することが示唆された。以上より、腎不全病態下の血管石灰化にはエラスチン分解の関与が示され、活性型ビタミン D 製剤による MMP-2 抑制がエラスチン分解を阻害する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Vascular calcification is the most important cause of cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease (CKD). Medial layer vascular calcification, which is recognized to be an active process (i.e., the transformation of vascular smooth muscle cells into osteoblast-like cells), is common in CKD patients. We have recently reported the possibility of an interaction between elastin degradation and medial layer vascular calcification. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), which induces the degradation of elastin, has been implicated in the elastic calcification in arteries of dialysis patients. However, the precise mechanisms by which elastin degradation interacts with the development of vascular calcification remain to be studied. To clarify the mechanisms by which elastin degradation is involved in the development of medial layer vascular calcification in the uremic milieu, we induced aortic medial layer calcification in 5/6 nephrectomized uremic rats (male Sprague-Dawley rats) fed a diet containing high phosphate (1.2%) and lactate (20%). After 10 weeks, the rats were euthanized for the measurement of serum chemistry profiles and histological analyses. The uremic rats showed significant increases in blood pressure, serum creatinine, phosphate, and parathyroid hormone levels compared with normal rats. von Kossa staining showed medial layer aortic calcification in the uremic rats. In calcified lesions, thin elastic lamellae were observed by elastin staining, indicating that elastin degradation could occur in the area. Furthermore, MMP-2 expression determined by immunohistochemistry was also observed in the same area. Elastin degradation accompanied by MMP-2 expression might be involved in the development of medial layer vascular calcification in uremic rats.

In the next step we focused on anti-inflammatory effect of vitamin D receptor activators

(VDRAs) on vascular smooth muscle cell (VSMC) mineralization induced by phosphate and TNF- α since inflammatory cytokines induce MMP-2 which contributes to elastin degradation. Human VSMCs were treated with either vehicle, maxacalcitol (10^{-9} M to 10^{-7} M), or calcitriol (10^{-9} M to 10^{-7} M) in 2.5 mM of phosphate media with TNF- α (1 ng/ml) for 9 days. VSMC mineralization was determined and expression of genes associated with the osteogenic process was examined by real-time RT-PCR. Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) mRNA in VSMCs and MMP-2 protein in media were also analyzed. Vehicle-treated VSMCs exhibited massive mineralization, which was inhibited by maxacalcitol in a concentration-dependent manner. Calcitriol also inhibited the mineralization. While vehicle-treated VSMCs exhibited increased mRNA expression of genes associated with the osteogenic process (Cbfa1/Runx2 and osteocalcin) compared with VSMCs grown in normal media without TNF- α (control), maxacalcitol and calcitriol suppressed the increase in mRNA species. Furthermore, vehicle-treated VSMCs exhibited increased MMP-2 mRNA and protein in the media that were suppressed notably by maxacalcitol. Both of the VDRAs abrogated the acceleration of the osteogenic process induced by phosphate and TNF- α in VSMCs, which was linked to inhibition of mineralization in VSMCs. MMP-2 blockade by VDRAs may contribute to an inhibitory effect on vascular calcification.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、腎臓内科学

キーワード：血管石灰化、エラスチン分解、MMP-2、慢性腎臓病

1. 研究開始当初の背景

近年、血管石灰化病変における Runx2 やオステオカルシン、アルカリホスファターゼなどの骨形成関連因子の存在から、血管石灰化と骨形成過程の関連性が指摘されるようになり、血管石灰化は能動的なプロセスによっても発症・進展することが示されるようになった。血管石灰化の能動的プロセスは複数の分子メカニズムが複合的にリンクしながら成立していると考えられている。主要な分子メカニズムには 1) 異所性骨形成過程(ectopic osteogenesis)、2) エラスチン分解、3) アポトーシスなどがあげられる。これまで、研究代表者は動物実験による腎

不全病態下において、血管中膜石灰化に異所性骨形成過程が関与することを報告してきた。その後同様の報告が続き、慢性腎臓病患者の血管中膜石灰化病変に異所性骨形成過程が誘導されていることは共通の認識となっている。その一方で、腎不全病態下における他の分子メカニズムの関連性についてはほとんど検討されていない。

2. 研究の目的

エラスチン分解は中膜石灰化の初期段階において重要な役割を担っていると想定されるが、腎不全病態下の血管石灰化におけるエラスチン分解の関与については近年注目を集めつつあるとはいえ、ほとんど解明

されていない。本研究の主たる目的は、エラスチン分解の血管石灰化への関連性を明らかにすることにより、血管石灰化治療への応用をはかり、慢性腎臓病患者の生命予後を改善させることである。

3. 研究の方法

A) 5/6 部分腎摘出ラットを高リン(1.2%)および乳酸(20%)を含有した飼料にて 10 週間飼育したのち、これらラットの大動脈組織を分子生物学および組織学的に検討した。

B) ヒト血管平滑筋細胞を高リン(2.5mM)および TNF- α (10 ng/ml)にて石灰化を促進させる培養系において、活性型ビタミン D 製剤のマキサカルシトールおよびカルシトリオール(10^{-7} ~ 10^{-9} M)を添加した際の血管平滑筋細胞の石灰化への影響を検討した。

4. 研究成果

A) 1) 血圧や血中 Cre、P、PTH 値が著明に上昇していた。2) Von Kossa 染色により、大動脈中膜に石灰化病変が確認された。3) エラスチン染色により、石灰化部位での弾性層板の細小化と断裂が確認され、エラスチン分解の存在が示唆された。4) 同部位において MMP-2 の発現が免疫組織学により確認された。

B) 1) 血管平滑筋細胞は高リン(2.5 mM)および TNF- α (10ng/ml)添加培地による 9 日間の培養にて骨芽細胞様細胞への形質転換を伴って石灰化が促進した。2) マキサカルシトールおよびカルシトリオールは濃度依存性(10^{-7} ~ 10^{-9} M)にこの石灰化を抑制した。3) 高 P および TNF- α 刺激により血管平滑筋細胞の MMP-2 遺伝子発現や MMP-2 分泌が促進した。4) 2 つの活性型ビタミン D 製剤は MMP-2 を抑制し、その抑制はマキサカルシトールで顕著であった。

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 2 件)

- 1) Kumata C, Mizobuchi M, Ogata H, Koiwa F, Kondo F, Kinugasa E, Akizawa T. Involvement of matrix metalloproteinase-2 in the development of medial layer vascular calcification in uremic rats. Ther Apher Dial 15 Suppl 1:18-22, 2011
- 2) Aoshima Y, Mizobuchi M, Ogata H, Kumata C, Nakazawa A, Kondo F, Ono N, Koiwa F, Kinugasa E, Akizawa T. Vitamin D receptor activators inhibit vascular

smooth muscle cell mineralization

induced by phosphate and TNF- α .

Nephrol Dial Transplant 27: 1800-1806, 2012

[学会発表] (計 4 件)

- 1) Aoshima Y, Mizobuchi M, Kumata C, Nakazawa A, Kondo F, Ono N, Ogata H, Kinugasa E, Akizawa T : A vitamin D analog inhibits VSMC mineralization induced by TNF- α and phosphate . American Society for Nephrology Kidney Week 2010 (Denver, 2010, 10)
- 2) Kumata C, Mizobuchi M, Ogata H, Koiwa F, Kondo F, Kinugasa E, Akizawa T : Involvement of matrix metalloproteinase-2 in the development of medial layer vascular calcification in uremic rats . American Society for Nephrology Kidney Week 2010 (Denver, 2010, 10)
- 3) Kumata C, Mizobuchi M, Ogata H, Koiwa F, Kondo F, Kinugasa E, Akizawa T : Involvement of matrix metalloproteinase-2 in the development of medial layer vascular calcification in uremic rats. NEXUS Symposium Kyoto (Kyoto, 2010, 4)
- 4) Aoshima Y, Mizobuchi M, Ogata H, Kumata C, Nakazawa A, Kondo F, Ono N, Koiwa F, Kinugasa E, Akizawa T. Vitamin D receptor activators inhibit vascular smooth muscle cell mineralization induced by phosphate and TNF- α . 49th ERA-EDTA Congress (Paris, 2012, 5)

[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・講師
研究者番号：90465203

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：