

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790254

研究課題名(和文) 糖尿病性血管石灰化におけるサイクロフィリンAの役割解明

研究課題名(英文) The role of cyclophilin A in diabetic vascular calcification

研究代表者

石澤 有紀 (ISHIZAWA, Yuki)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：40610192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：血管石灰化病変は糖尿病や腎不全患者において見られ、血管平滑筋細胞の骨芽細胞様細胞への分化が関与していると考えられている。糖尿病モデルマウスであるdb/dbマウスの大動脈壁において骨芽細胞マーカーであるRUNX2の発現増加が見られた。培養血管平滑筋細胞において無機リン刺激はサイクロフィリンAの自己分泌に必要であるRho-kinaseを活性化させ、Rho-kinase阻害剤の前処置により、無機リン刺激によるALP活性の上昇・Ca沈着の増加は抑制された。無機リンによるALP活性の上昇・Ca沈着には、Rho-kinase活性化およびサイクロフィリンAの自己分泌が介在している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Arterial calcification is accompanied by several cardiovascular diseases such as atherosclerosis, diabetes mellitus, and renal failure. Osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cell (VSMC) plays important role in vascular calcification. It was observed that the inorganic phosphate (Pi) increased rho-kinase activation which is reported to be involved in the autocrine of cyclophilin A, a alkaline phosphatase (ALP) activity, and calcium accumulation in cultured VSMCs. The pretreatment with rho-kinase inhibitor inhibited Pi-induced ALP activity and calcium accumulation. From these results, it was suggested that rho-kinase activation and the autocrine of cyclophilin A might be related with Pi-induced vascular calcification.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：心血管・血液 糖尿病 血管石灰化 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

- (1) 血管石灰化の形成には血管平滑筋細胞 (VSMC) の骨芽細胞様細胞への分化や、アポトーシスなどが関与する。高血糖や酸化ストレスなどによって VSMC の骨分化シグナルが活性化されることが明らかとなっているが、その詳細な分子メカニズムは明らかとなっていない。
- (2) Rho-kinase は酸化ストレスに感受性を示し、VSMC において細胞の収縮、遊走、細胞分裂等を惹起し、くも膜下出血後の血管攣縮や高血圧、動脈硬化など心血管疾患の病態に深く関与していることが報告されている。血管石灰化への作用としては、Rho-kinase 阻害剤が VSMC の石灰化を抑制し得ることが報告されている。
- (3) サイクロフィリン A (CypA) は Reactive oxygen species (ROS) に応答して VSMC から自己分泌される。in vitro および in vivo にて CypA は炎症・大動脈瘤形成・アテローム硬化症などに寄与することが報告されている。VSMC に CypA 阻害剤を処置すると、高血糖刺激によるオステオポンチン発現が抑制されることが報告されているが、現在までに CypA の血管石灰化における役割を検討した報告はまだない。

2. 研究の目的

糖尿病性血管石灰化・VSMC 骨分化シグナルにおける Rho-kinase および CypA の役割を明らかにすることを目的として実験を行った。

3. 研究の方法

- (1) 徳島大学病院病理部より得られた病理解剖検体の中から、動脈硬化患者より得られた動脈について CypA および Runx2 発現が増加しているか否かについて免疫染色法にて検討する。
- (2) 石灰化をきたしていることが報告されている、20 週齢の糖尿病モデル db/db マウスの大動脈壁における CypA, Runx2 蛋白発現について免疫染色法を用いて検討する。
- (3) 培養ラット大動脈平滑筋細胞(RASMC)において無機リン(Pi)刺激により石灰化を惹起させる。
- (4) Pi 刺激による石灰化誘導シグナルにおける Rho-kinase 活性化, CypA の関与について検討する。

4. 研究成果

- (1) 病理解剖された患者組織における CypA の発現について検討を行った。CypA は心筋、血球細胞に豊富にあることが知られているが、心組織および正常大動脈の免疫染色像より正常血管壁にはその発現は少ないことを確認した(図 1A, B)。一方著明な動脈硬化病変の形成を認める脳底動脈、大動脈にお

いては平滑筋層あるいは新生内膜を中心に CypA 発現の著大な増加を認めた(図 1C, D)。同様に、病変血管では Runx2 の発現も正常血管に比べ増加していることを明らかにした。

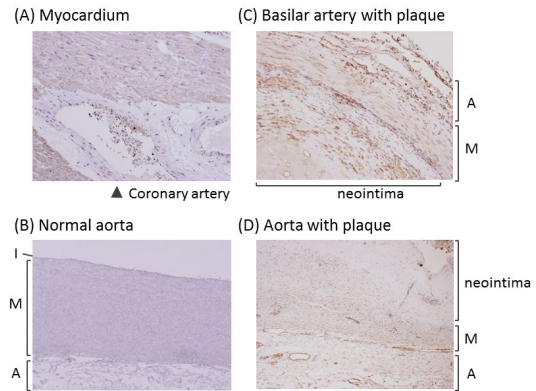


図 1: CypA (I:intima, M:media, A:adventitia)

- (2) 20 週齢の db/db マウスおよびコントロールマウスの大動脈の組織学的検討を行った。2 型糖尿病モデルマウスである db/db マウスの大動脈では、非糖尿病のコントロールマウスに比べ RUNX2, CypA とともに陽性部位が増加していた(図 2)。また、組織の溶解液を用いたウエスタンブロッティング法でも、同様に db/db マウスで RUNX2 蛋白発現量が増加していることを確認した。

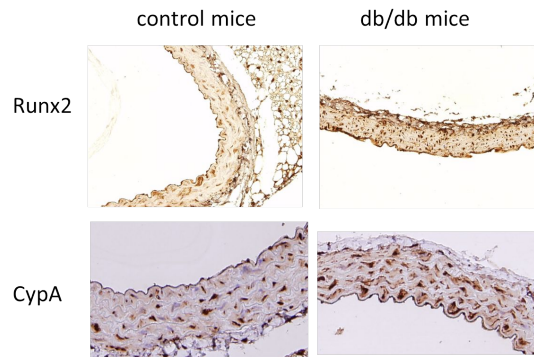


図 2: db/db マウス大動脈

- (3) RASMC は 8 週齢の SD ラットから単離し、10%FBS を含む D - MEM 中で培養した。Pi 刺激によるアルカリフォスファターゼ(ALP)活性およびカルシウム沈着を、それぞれ Lab assay ALP (Wako), Ca E-test (Wako)を用いて検討した。その結果、RASMC において Pi の濃度依存的、時間依存的に ALP 活性が上昇し、カルシウムの沈着が増加することを確認した。

(4)

3 mM の Pi で刺激した結果、刺激後速やかに ERK1/2 のリン酸化および Rho-kinase の内在性基質である MYPT のリン酸化の上昇が認められ、刺激後 10 分でピークを示した。このことより、Pi 刺激は RASMC において ERK1/2 および Rho-kinase を活性化させるこ

とが明らかとなった。また、Pi 刺激後 12 時間において RUNX2 の蛋白発現は約 2 倍の増加が見られた。

続いて、Pi 刺激による ERK1/2 および Rho-kinase の活性化に対する Rho-kinase 特異的阻害剤である Y-27632 の影響を検討した。Y-27632 (0, 0.1, 1, 10 μ M) を 30 分前処置後、Pi (3 mM) にて 10 分間刺激をしたところ、Pi にて上昇した ERK1/2 および MYPT のリン酸化は、Y-27632 の用量依存的に有意に抑制された。このことより、Pi による ERK1/2 の活性化には Rho-kinase の活性化が関与している可能性が示唆された。

ERK1/2 阻害剤である PD98059 (10 μ M) 存在下で 3mM の Pi 刺激を 7 日間行い、ALP 活性の上昇に対する効果を検討した。PD98059 存在下では、Pi 刺激による ALP 活性の上昇は抑制された。このことから、Pi による ERK1/2 の活性化が ALP 活性の上昇、すなわち石灰化に必要であることが RASC において確認された。

7 日間の Pi (3 mM) 刺激により ALP 値、Ca 値は増加したが、Y-27632 (10 μ M) 存在下では、ALP 値、Ca 値は抑制された。Rho-kinase の活性化が Pi による石灰化シグナルに関与している可能性が示された(図 3)。

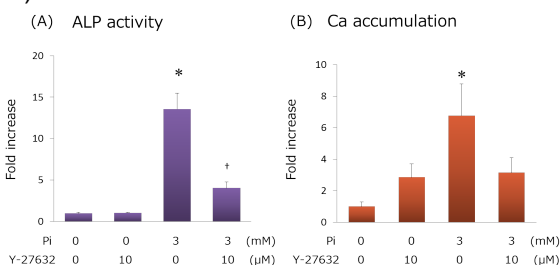


図 3 : Y-27632 の ALP 活性, Ca 蓄積への影響

RASC に Pi (3 mM) の刺激を行った後、培養液を回収し ELISA 法にて培地中への CypA 分泌量を測定した。3mM の Pi 刺激にて 10 分をピークに CypA 分泌量が増加していることが明らかとなった。また、Y-27632 (0, 0.1, 1, 10 μ M) の前処置は、Pi 刺激による CypA の分泌を抑制した。

更に、CypA 阻害剤 (0, 1, 10, 30 nM) を 30 分前処置後に Pi 刺激を行ったところ、RASC における Pi による ERK1/2 の活性化は濃度依存的に抑制された(図 4)。これらの結果から、RASC において、Pi による石灰化誘導シグナルには Rho-kinase - ERK1/2 活性化経路が関与しており、Rho-kinase が CypA の自己分泌を仲介することで ERK1/2 の活性化を引き起こしている可能性が明らかとなった。

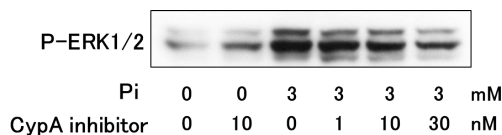


図 4 : CypA 阻害剤の ERK1/2 活性化に対する影響

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 11 件)

Izawa-Ishizawa Y (他 13 名, 9 番目), Deletion of hypoxia-inducible factor-1 in adipocytes enhances glucagon-like Peptide-1 secretion and reduces adipose tissue inflammation. PLoS One. 査読あり 9(4):e93856 (2014) DOI: 10.1371/journal.pone.0093856.

Izawa-Ishizawa Y (他 9 名, 6 番目), Smooth muscle cell-specific Hif-1 deficiency suppresses angiotensin II-induced vascular remodelling in mice. Cardiovasc Res. 査読あり 102(3):460-468 (2014) DOI: 10.1093/cvr/cvu061.

Izawa-Ishizawa Y (他 10 名, 6 番目), Iron chelation by deferoxamine prevents renal interstitial fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction. PLoS One. 査読あり 9(2):e89355 (2014) DOI: 10.1371/journal.pone.0089355.

Izawa-Ishizawa Y (他 14 名, 2 番目), Nitrosonefipine Ameliorates the Progression of Type 2 Diabetic Nephropathy by Exerting Antioxidative Effects. PLoS One 査読あり 9(1):e86335 (2014) DOI: 10.1371/journal.pone.0086335.

Izawa-Ishizawa Y (他 8 名, 4 番目), Dietary iron restriction inhibits progression of diabetic nephropathy in db/db mice. Am J Physiol Renal Physiol. 査読あり 1;304(7):F1028-1036 (2013) DOI: 10.1152/ajprenal.00473.2012.

Izawa-Ishizawa Y (他 8 名, 3 番目), Bovine milk-derived lactoferrin exerts proangiogenic effects in an Src-Akt-eNOS-dependent manner in response to ischemia. J Cardiovasc Pharmacol. 査読あり 61(5):423-429 (2013) DOI:

10.1097/FJC.0b013e318287d526.
Izawa-Ishizawa Y (他 14 名, 4 番目),
Nitrosonifedipine ameliorates
angiotensin II-induced vascular
remodeling via antioxidative effects.
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.
査読あり 386(1):29-39 (2013) DOI:
10.1007/s00210-012-0810-7.
Izawa-Ishizawa Y (他 12 名, 1 番目),
Angiotensin II receptor blocker
improves tumor necrosis
factor- α -induced cytotoxicity via
antioxidative effect in human
glomerular endothelial cells.
Pharmacology 査読あり 90(5-6):324-331
(2012) DOI: 10.1159/000343244.
Izawa-Ishizawa Y (他 14 名, 6 番目),
Heparin cofactor II, a serine protease
inhibitor, promotes angiogenesis via
activation of the AMP-activated
protein kinase-endothelial
nitric-oxide synthase signaling
pathway. J Biol Chem 査読あり
287(41):34256-34263 (2012) DOI:
10.1074/jbc.M112.353532.
Izawa-Ishizawa Y (他 7 名, 3 番目),
Estrogen regulates hepcidin
expression via GPR30-BMP6-dependent
signaling in hepatocytes. PLoS One
査読あり 7(7):e40465 (2012) DOI:
10.1371/journal.pone.0040465.
Izawa-Ishizawa Y (他 12 名, 8 番目),
Iron reduction by deferoxamine leads
to amelioration of adiposity via the
regulation of oxidative stress and
inflammation in obese and type 2
diabetes KKAY mice. Am J Physiol Renal
Physiol. 査読あり 302(1):E77-86
(2012) DOI:
10.1152/ajprenal.00473.2012.

[学会発表](計 23 件)

Yuki Izawa-Ishizawa,
Anti-inflammatory effects of statins
and anti-malarial agents via
endothelial ERK5 activation
第 87 回 日本薬理学会年会 仙台国際
センター (宮城県) 2014 年 3 月 19-21
日
Nhat-Tu Le, A HMG-CoA Reductase
Inhibitor (statin) Directly Activates
Endothelial Erk5 And Prevents
Endothelial Dysfunction And Acute
Cardiac Allograft Rejection
American Heart Association Scientific
Sessions 2013, Dallas Convention
Center (Texas, USA) November 16-20,
2013
Yuki Izawa-Ishizawa, Y-27632, a
rho-kinase inhibitor, inhibits

inorganic phosphate-induced ERK1/2
phosphorylation and ALP activity in
vascular smooth muscle cells
World Biotechnology Congress 2013,
John B. Hynes Memorial Convention
Center (Boston, USA) June 3-6, 2013
Yuki Izawa-Ishizawa, Y-27632, a
rho-kinase inhibitor, inhibits
inorganic phosphate-induced ERK1/2
phosphorylation and ALP activity in
vascular smooth muscle cells
第 86 回 日本薬理学会 2013 年 3 月
21-23 日 福岡国際会議場 (福岡県)
伊藤麻里, 腸管 L 細胞からの
glucagon-like peptide-1 分泌に対する
低酸素の影響
第 86 回 日本薬理学会 2013 年 3 月
21-23 日 福岡国際会議場 (福岡県)
池田康将, Bovine lactoferrin
stimulated angiogenesis in response
to ischemic hindlimb
第 86 回 日本薬理学会 2013 年 3 月
21-23 日 福岡国際会議場 (福岡県)
大園伊織, The Effects of Iron
chelation against Renal Fibrosis in
Unilateral Ureteral Obstruction Mice
Model
第 86 回 日本薬理学会 2013 年 3 月
21-23 日 福岡国際会議場 (福岡県)
田島壮一郎, The influence of
angiotensin II on duodenal iron
absorption
第 86 回 日本薬理学会 2013 年 3 月
21-23 日 福岡国際会議場 (福岡県)
山野範子, 内皮細胞障害を伴う糖尿病
性腎症に対するニトロソニフェジピン
の効果
第 86 回 日本薬理学会 2013 年 3 月
21-23 日 福岡国際会議場 (福岡県)
今西正樹, 血管平滑筋細胞の
hypoxia-inducible factor-1 α は
angiotensin II 誘発血管リモデリング
において AT1 受容体発現に關与する
第 86 回 日本薬理学会 2013 年 3 月
21-23 日 福岡国際会議場 (福岡県)
山野範子, 内皮細胞障害を伴う糖尿病
性腎症に対するニトロソニフェジピン
の効果
第 86 回 日本薬理学会 2013 年 3 月
21-23 日 福岡国際会議場 (福岡県)
土肥紗希子, 無機リン刺激による血管
平滑筋細胞石灰化における Rho-kinase
の關与
第 42 回 日本心脈管作動物質学会
2013 年 2 月 8-9 日 奈良県立新公会堂
(奈良県)
石澤有紀, ニトロソニフェジピンは血
管内皮細胞障害を伴う糖尿病性腎症の
進展を抑制する
第 42 回 日本心脈管作動物質学会

2013年2月8-9日 奈良県立新公会堂
(奈良県)
木平孝高, 脂肪細胞特異的低酸素誘導
因子欠損マウスに観察される耐糖能の
改善には glucagon-like peptide-1 が関
与する
第42回 日本心脈管作動物質学会
2013年2月8-9日 奈良県立新公会堂
(奈良県)
田島壮一郎, 鉄制限食によって db/db マ
ウスの糖尿病性腎症進展は抑制される
第42回 日本心脈管作動物質学会
2013年2月8-9日 奈良県立新公会堂
(奈良県)
今西正樹, 血管平滑筋細胞の
hypoxia-inducible factor-1 が
angiotensin 誘発血管リモデリング形
成に寄与するメカニズムの解析
第22回 日本循環薬理学会 2012年11
月30日 富山国際会議場(富山県)
池田康将, 鉄吸収機構における
Angiotensin の効果の検討
第122回 日本薬理学会近畿部会 2012
年11月16日 千里ライフサイエンスセ
ンター(大阪府)
今西正樹, 血管平滑筋細胞における
HIF-1 の angiotensin 誘発血管リモ
デリング形成および AT1 受容体発現へ
の関与; 平滑筋特異的 HIF-1 遺伝子欠
損マウスを用いた検討
第35回 日本高血圧学会総会 2012年
09月20-22日 ウェスティンナゴヤキ
ャッスル・名古屋能楽堂(愛知県)
布あさ美, 糖尿病性腎症進展に対する
ニトロソニフェジピンの抑制作用
次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウ
ム2012 2012年09月01日 神戸学院
大学ポートアイランドキャンパス(兵庫
県)
今西正樹, Angiotensin 誘発血管リモ
デリングにおける血管平滑筋細胞内 HIF
シグナルの解析
次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウ
ム2012 2012年09月01日 神戸学院
大学ポートアイランドキャンパス(兵庫
県)

21 前田悠作, 血管傷害モデルに伴う血管
リモデリング形成過程には, 傷害部位
に動員される骨髄由来細胞の HIF が関与
する
第121回 日本薬理学会近畿部会 2012
年6月29日 あわぎんホール(徳島県)

22 今西正樹, 平滑筋特異的
hypoxia-inducible factor-1 欠損が
angiotensin II 誘発血管リモデリング
形成に及ぼす影響
第121回 日本薬理学会近畿部会 2012
年6月29日 あわぎんホール(徳島県)

玉置俊晃他, 東京医学社, 腎とフリー
ラジカル 第11集 2013年1月10日第
1版第1刷発行, 178(155-159)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石澤 有紀 (ISHIZAWA Yuki)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研
究部・助教

研究者番号: 40610192