

腎不全の血管中膜石灰化における内膜機能の役割

溝渕正英

昭和大学医学部内科学講座腎臓内科学部門

key words : 血管石灰化, 血管透過性, ミネラル代謝異常

要 旨

慢性腎不全患者に特徴的な血管中膜の石灰化にはカルシウム (Ca) やリン (P) といったミネラルのストレスが促進因子として重要視されている。生体内では血管中膜は構造上、内膜と外膜に挟まれて存在しており、中膜への変化は内膜側もしくは外膜からのなんらかの刺激が到達しなければもたらされないと推定される。そのため、生体内における、内膜-中膜-外膜の連続的な構造を考慮したうえでの中膜の石灰化機序の解明が進められている。今回我々は、まず、*in vitro* 系の実験として、血管内皮細胞への高 Ca かつ高 P によるミネラルストレスの影響を検討し、さらにラット大動脈リングを用いた *ex vivo* 系におけるミネラルストレスの中膜石灰化への影響を検討した。*in vitro* 系の実験では、ミネラルストレスにより内皮細胞の血管透過性亢進が観察された。そのさいの血管内皮細胞における、内皮細胞マーカーである CD31, VE-cadherin, ZO5 の遺伝子発現が低下していた。また、*ex vivo* 系においては、ミネラルストレスによって中膜の石灰化促進が観察された。以上のことから、ミネラルストレスによる血管中膜の石灰化促進には内膜の透過性亢進が関与していることが示唆された。

1 目 的

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¹⁾。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。vascular smooth muscle cell (VSMC) に変化がもたらされるには、内膜もしくは外膜からなんらかのシグナルが VSMC に到達する必要がある。実際、近年では、血管内皮細胞 (endothelial cell; EC) が内皮間葉移行 (endothelial-to-mesenchymal transition; EndMT) により骨幹細胞の供給源となり、中膜石灰化に関与する報告²⁾や、外膜の間葉系幹細胞が中膜の骨芽細胞様細胞の供給源となり石灰化に関与する報告³⁾など、生体内における内膜-中膜-外膜の連続的な構造を考慮したうえでの中膜の石灰化機序の解明が進められている。

本研究では、腎不全病態下のミネラル代謝異常による血管内膜側から中膜にかけての連続的な石灰化プロセスを念頭に、中膜石灰化プロセスにおける内膜の機能と役割の解明を目的とした。

2 方 法

まず、*in vitro* の実験として、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を高 Ca (3.0 mM)、高 P (3.0 mM) の培地にて培養し、ミネラルストレス環境下における HUVEC の透過性を血管透過性アッセイキット (R&D Systems, Inc. 24 Well In Vitro Vascular Permeability Assay Kit, CultreCoat (24samples)) を用いて検討した。さらに、これらの HUVEC から mRNA を抽出し、

内皮細胞マーカーである CD31, VE-cadherin, ZO-1 の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法にて検討した。次に、正常ラットおよび 5/6 部分腎摘出腎障害ラットの 大動脈リングを用い、前述と同様のミネラルストレス培地にて培養し、石灰化の有無をアリザリン染色と組織内 Ca 含量測定により検討し、内皮細胞マーカーの遺伝子発現についても検討した。

3 結果と考察

血管透過性アッセイキットの検討からは、ミネラルストレス培地にて 48 時間培養後には HUVEC の透過性が約 2.5 倍に亢進した。また、これらの HUVEC における CD31, VE-cadherin, ZO-1 の遺伝子発現を検討したところ、いずれの遺伝子発現もコントロールと比べて有意に減少していた。これらの結果から、ミネラルストレスにより HUVEC に傷害が生じ、透過性が亢進することが示唆された。

さらに、大動脈リングの検討では、ミネラルストレス培地にて培養 3 日後には腎障害ラットのリングの石灰化と Ca 含量の有意な上昇がみられた (図 1, 2)。内皮マーカーの遺伝子発現も腎障害ラットのリングで減少傾向がみられた (図 3)。培養 5 日後では正常ラット、腎障害ラットいずれのリングも石灰化含量の増加がみられ、内皮マーカーの遺伝子発現は低下していた。また、石灰化部位は中膜に局在していた。

血管内膜の透過性を亢進させる因子には、炎症性因子のトロンピン⁴⁾やヒスタミン⁵⁾、ブラジキニン⁶⁾や血管新生因子の血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) などが知られている⁷⁾。今回の検討では、腎障害ラットの大動脈リングにおいて、ミネラルストレスによる石灰化の進行と内皮マーカー遺伝子発現低下が正常ラットのリングよりも早期にみられた。これは、腎障害ラットの血管ではすでに内皮細胞が障害されており、そこにミネラルストレスが加わ

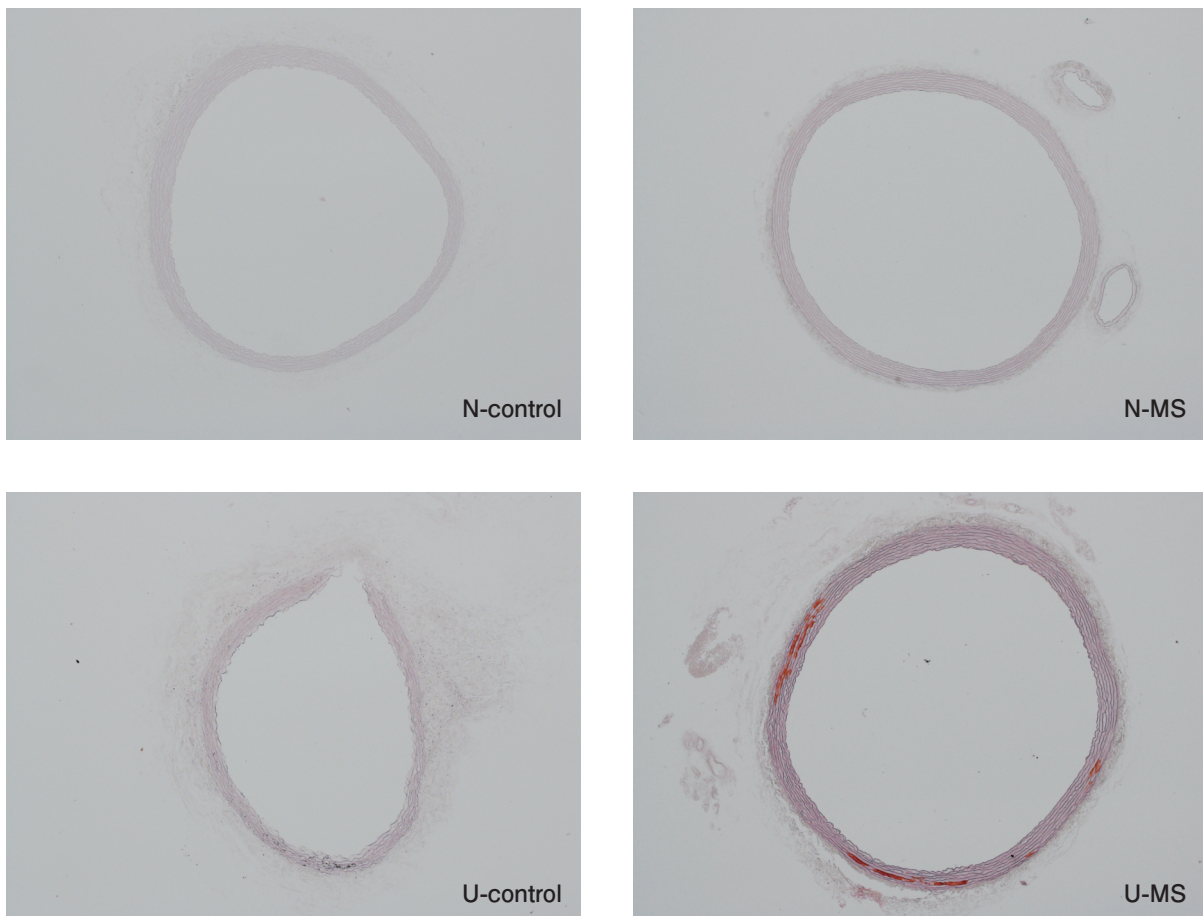


図 1 培養 3 日後のラット大動脈リングの石灰化所見 (アリザリン染色)

N-control: 正常ラット大動脈リングを通常培地で培養, N-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, U-control: 腎障害ラット大動脈リングを通常培地で培養, U-MS: 腎障害ラット大動脈リングをミネラルストレス培地で培養.

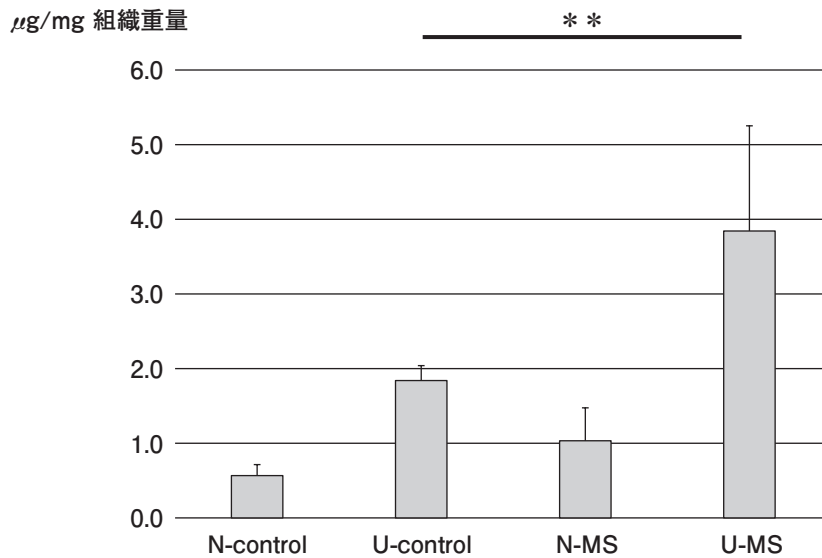


図2 大動脈リングのCa含有量

N-control: 正常ラット大動脈リングを通常培地で培養, N-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, U-control: 腎障害ラット大動脈リングを通常培地で培養, U-MS: 腎障害ラット大動脈リングをミネラルストレス培地で培養. 平均値±標準誤差で表示 (各群3検体). ## p<0.01

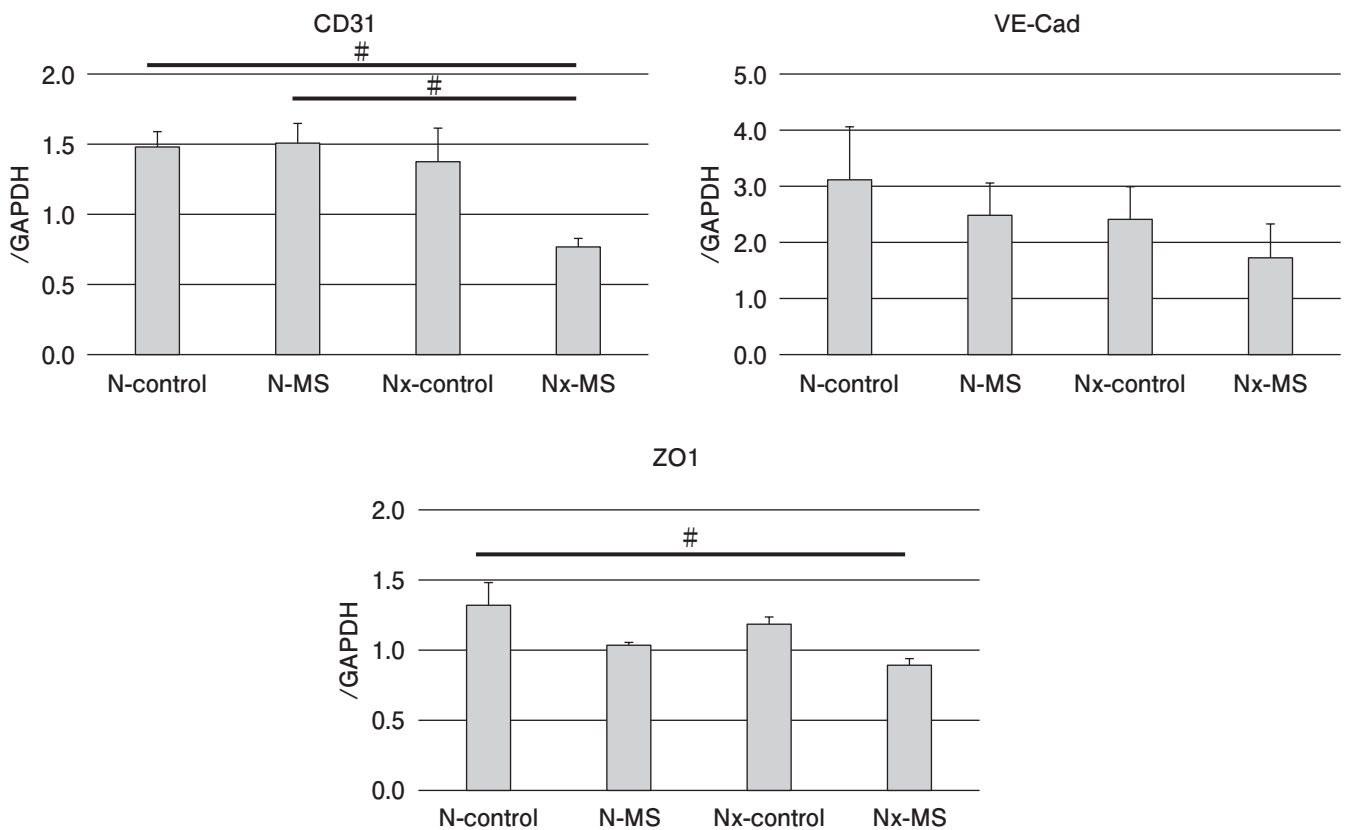


図3 大動脈リングの血管内皮マーカー遺伝子発現

各遺伝子の発現レベルは 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<0.05

ったために内皮細胞障害が促進し, バリアー機能が破綻することで, 石灰化が早期に進展したと推察された. 腎障害による血管内皮障害が中膜石灰化進展の素地と

なっている可能性があり, 今後は腎障害時の血管内皮細胞機能と透過性亢進の関連についての詳細な検討が必要である.

4 結 語

これらの結果から、ミネラルストレスによる血管中膜の石灰化には、血管内皮細胞の傷害による血管透過性の亢進が関与していることが示唆された。

本研究は平成 28 年度日本透析医会公募研究助成によって行われ、成果は原著論文として英文誌に投稿予定であり、重複掲載を避けるために概要を記した。

本研究内容に関連し、開示すべき利益相反関係にある企業などはありません。

文 献

- 1) Mizobuchi M, Towler D, Slatopolsky E : Vascular calcification : the killer of patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20(7) : 1453-1464.
- 2) Yao Y, Jumabay M, Ly A, et al. : A role for the endothelium in vascular calcification. *Circ Res* 2013; 113(5) : 495-504.
- 3) Kramann R, Goettsch C, Wongboonsin J, et al. : Adventitial MSC-like Cells Are Progenitors of Vascular Smooth Muscle Cells and Drive Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *Cell Stem Cell* 2016; 19(5) : 628-642.
- 4) Komarova YA, Mehta D, Malik AB : Dual regulation of endothelial junctional permeability. *Sci STKE* 2007; 2007(412) : re8.
- 5) Pober JS, Sessa WC : Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol* 2007; 7(10) : 803-815.
- 6) Marceau F, Regoli D : Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3(10) : 845-852.
- 7) Bates DO, Harper SJ : Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vascul Pharmacol* 2002; 39(4-5) : 225-237.