

Vascular health に対する VDRA 作用の可能性

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 : VDRA, 血管内皮細胞, 血管石灰化

要 旨

これまでに我々は、高カルシウム (Ca) および高リン (P) 負荷によるミネラルストレスによって血管内皮細胞の透過性亢進と、大動脈中膜の石灰化の関連性を確認しており、本研究では抗動脈硬化作用を有するビタミン D 受容体アクティベーター (vitamin D receptor activators; VDRA) の、内膜保護作用の可能性に着目し、カルシトリオール、ミネラルストレスによる動脈中膜の石灰化と血管内皮細胞機能への影響を検討した。

雄性 Sprague-Dawley ラットの動脈リングを高 Ca および高 P 濃度培地にて培養しリングの中膜石灰化を促進する系に、カルシトリオールを 10^{-6} から 10^{-8} M に濃度を振り分けて添加し、石灰化へのカルシトリオールへの影響を検討した。カルシトリオール濃度依存性にリングの Ca 含有量は抑制されたが、低濃度では大きな変化はみられなかった。また、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human umbilical vein endothelial cell; HUVEC) を用いた実験系では、ミネラルストレスにより内皮細胞マーカー (VE-cadherin) の遺伝子発現が低下し、透過性が亢進したが、カルシトリオール添加 (10^{-6} M) によってこれらの変化が軽減される傾向がみられた。

以上のことから、カルシトリオールはミネラルストレスによる血管内皮細胞の透過性亢進を抑制することで、血管石灰化の進展を阻害する可能性が示唆された。

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。近年では、血管内皮細胞が中膜石灰化に関与することが報告されており²⁾、中膜の石灰化への内膜の関与が注目されている。一方で血管内皮細胞にはビタミン D 受容体が発現しており、VDRA の血管内膜保護効果が示されている³⁾。臨床的にもビタミン D 製剤と CKD 患者の動脈硬化抑制との関連が報告されている⁴⁾。本研究では、こうした VDRA による血管内膜保護作用の可能性に着目し、カルシトリオールの内皮細胞への作用と、ミネラルストレスによる血管石灰化との関連性について検討した。

2 方 法

正常ラットの動脈リングを用い、通常培地 (Ca 1.6 mM, P 0.5 mM; N 群) もしくは高 Ca (3.8 mM) 高 P (2.2 mM) のミネラルストレス培地 (MS 群) にカルシトリール 10^{-6} M を添加して3日間培養し、石灰化の程度を組織内 Ca 含量測定により検討した。また、In vitro の実験として、HUVEC を前述と同様に通

常もしくはミネラルストレス培地にて 48 時間培養し、HUVEC の内皮細胞マーカー (CD31, VE-cadherin, ZO-1) の遺伝子発現レベルをリアルタイム PCR 法により、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 (24 samples)] を用いて検討した。

3 結果と考察

大動脈リングを用いた実験系では、3 日間ミネラルストレス培地にてリングを培養すると、リング内の Ca 含有量が約 9 倍に有意に増加した (N 群: 0.5 ± 0.0 vs MS 群: 4.3 ± 1.7 , $p < 0.01$)。ミネラルストレス培地へのカルシトリオール添加により、リング Ca 含有量はカルシトリオール (C) 濃度依存性に減少傾向を示し、高濃度 MS+C10⁻⁶ 群では有意に減少した (MS+C10⁻⁸ 群: 2.88 ± 0.4 , MS+C10⁻⁷ 群: 2.5 ± 0.4 , MS+C10⁻⁶ 群: 2.2 ± 0.4 , $p < 0.05$ vs MS 群) (図 1)。HUVEC を用いた実験系では、内皮細胞マーカーである CD31, VE-cadherin, ZO-1 の遺伝子発現はミネラルストレスにより減少し、カルシトリオール添加によりその減少

は抑制される傾向がみられ、特に VE-cadherin でその傾向が顕著であった (図 2B)。また、透過性の実験系では、いずれの群でも HUVEC は脱落することなくインサート底部のフィルターに均一にしっかりと定着していることから透過性評価が適正に行われたことが裏付けられ (図 3A)、MS 群が N 群と比較して約 70% 有意に透過性が亢進し、統計学的な有意差はみられなかったもののカルシトリオール添加によりこの透過性亢進が抑制される傾向がみられた (図 3B)。

VDRA の血管内皮機能保護作用に関する知見は近年集積されつつある。血管内皮細胞への直接的な保護作用は、①内皮一酸化窒素合成酵素活性化による一酸化窒素産生亢進作用、②抗酸化ストレス作用、③ NF- κ B (nuclear factor-kappa B) 経路阻害による抗炎症作用が示されている³⁾。また、間接的な保護作用は、 α Klotho による血管内膜保護の増強作用⁵⁾などが報告されている。さらにパリカルシトールが、HUVEC の VE-cadherin 発現上昇を介して内皮のバリアー機能を改善させることが示されており⁵⁾、本研究でもカルシトリオールによる HUVEC の VE-cadherin 遺伝子発現の上昇

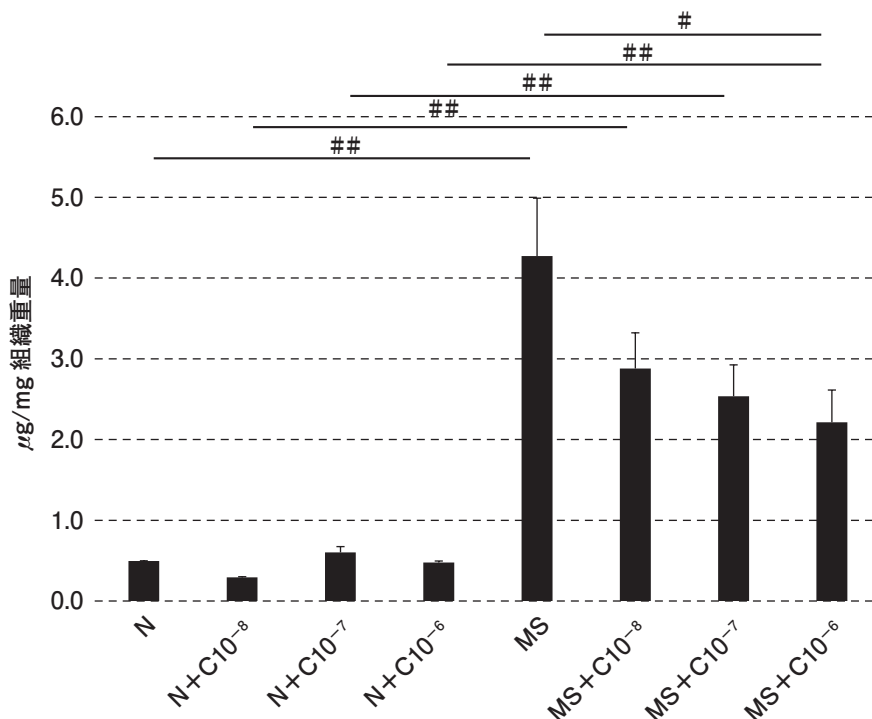


図 1 正常ラット大動脈リングの Ca 含有量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 組織重量)

N, 正常ラット大動脈リングを通常培地で培養; N+C, 正常ラット大動脈リングを通常培地に濃度を振り分けたカルシトリオール ($10^{-6} \sim 10^{-8}$ M) を添加して培養; 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; MS+C, 正常ラット大動脈リングをミネラルストレス培地に濃度を振り分けたカルシトリオール ($10^{-6} \sim 10^{-8}$ M) を添加して培養。平均値 \pm 標準誤差で表示 (各群 3 検体)。## $p < 0.01$, # $p < 0.05$ 。

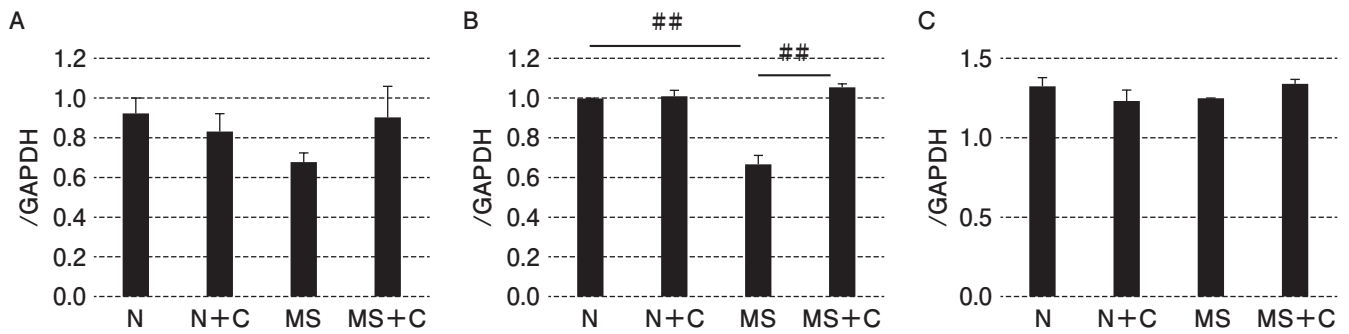


図2 大動脈リングの血管内皮マーカー遺伝子発現

N, 正常ラット大動脈リングを通常培地で培養; N+C, 正常ラット大動脈リングを通常培地にカルシトリオール (10^{-6} M) を添加して培養; 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; MS+C, 正常ラット大動脈リングをミネラルストレス培地にカルシトリオール (10^{-6} M) を添加して培養. 各遺伝子の発現レベルは GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 発現量で補正 (A: CD34, B: VE-cadherin, C: ZO-1). 平均値 \pm 標準誤差で表示 (各群 3 検体). ## $p < 0.01$.

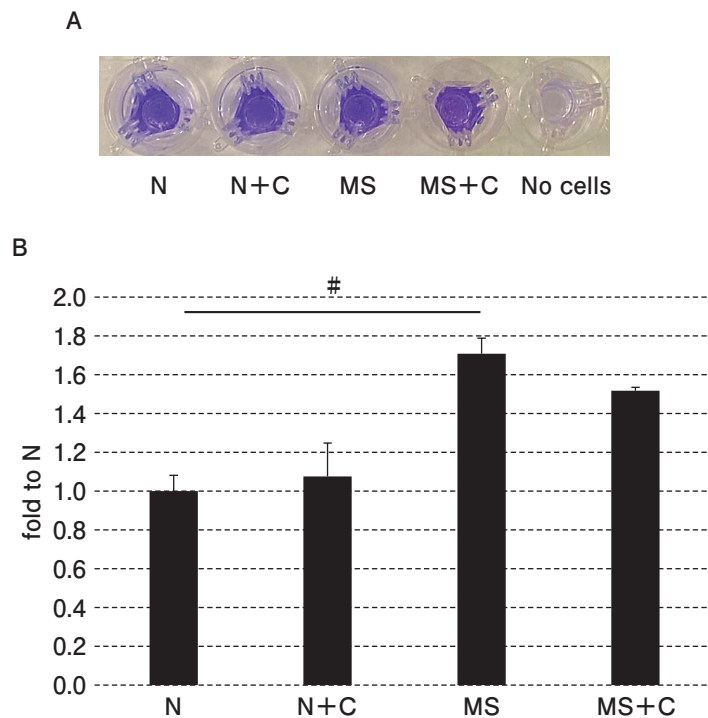


図3 ミネラルストレスによる HUVEC の透過性

N, 通常培地; N+C, 通常培地にカルシトリオール (10^{-6} M) 添加; MS, ミネラルストレス培地; MS+C, ミネラルストレス培地にカルシトリオール (10^{-6} M) 添加. A: 各群の HUVEC がインサート底部のフィルターに均一に単層形成している. B: 透過性は N 群を 1 とした場合の比率を, 平均値 \pm 標準誤差で表示 (各群 3 検体). # $p < 0.05$.

と透過性亢進の抑制がみられ, 既報を支持する結果が得られた. P の負荷による血管平滑筋細胞の石灰化への酸化ストレスの関与も報告されており⁶⁾, 今後は, ミネラルストレスによる血管内皮細胞障害の機序や, カルシトリオールが前述のような血管内皮細胞への直接作用を有しているのかなどの検討が課題である.

4 結語

カルシトリオールはミネラルストレスによる血管内皮細胞の透過性亢進を抑制することで, 血管石灰化の進展を阻害する可能性が示唆された.

本研究は平成 29 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。

利益相反自己申告：申告すべきものなし。

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 : 1453-1464.
- 2) Yao Y, Jumabay M, Ly A, et al. : A role for the endothelium in vascular calcification. *Circ Res* 2013; 113 : 495-504.
- 3) Kim DH, Meza CA, Clarke H, et al. : Vitamin D and Endothelial Function. *Nutrients* 2020; 12.
- 4) Lundwall K, Jacobson SH, Jorneskog G, et al. : Treating endothelial dysfunction with vitamin D in chronic kidney disease : a meta-analysis. *BMC Nephrol* 2018; 19 : 247.
- 5) Vila Cuenca M, Ferrantelli E, Meinster E, et al. : Vitamin D Attenuates Endothelial Dysfunction in Uremic Rats and Maintains Human Endothelial Stability. *J Am Heart Assoc* 2018; 7 : e008776.
- 6) Wei R, Enaka M, Muragaki Y : Activation of KEAP1/NRF2/P62 signaling alleviates high phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells by suppressing reactive oxygen species production. *Sci Rep* 2019; 9 : 10366.