

博士論文

血管石灰化形成の新たな実験モデルの構築

秋 好 沢 諭

目次

要旨	...	1
序文	...	2
目的	...	13
方法	...	14
結果	...	23
考察	...	47
結論	...	54
謝辞	...	55
引用文献	...	56

1 要旨

現在全死亡数の 1/5 を占める脳心血管系疾患には血管石灰化が大きく関与しているが、その研究は細胞実験による分子機序の探求と、動物実験による石灰化像の観察に二分されている。

本研究にて、5 mm 長のマウス胸部大動脈切片を細胞培養プレートで最長 10 日間培養し、2.6 mM の高リン濃度培養による作用を観察した結果、血管平滑筋層の石灰化像と血管平滑筋細胞の骨芽細胞様形質転換という分子機序が一つの実験系にて観察できた。

さらに、対照群と比較して、40～52 週齢の高齢マウスやストレプトゾシンによる糖尿病モデルマウス、Sirt1^{+/+}マウスにて石灰化が亢進することが認められた。

以上より、本研実験モデルが血管石灰化研究の発展に寄与するものと考えられた。

2 序文

【背景】

「A man is as old as his arteries. (William Osler, 1849-1919)」という言葉に示されるように全身臓器である血管は様々な疾患や病態に、延いてはヒトの死にも深く関わっており、血管石灰化は心臓血管死だけではなく、全死因死亡のリスクであることがメタ解析にて報告されている⁽¹⁾。

2011年の日本の人口推計の結果では、65歳以上の人口が総人口に占める割合が23.3%となり、全死亡数のおよそ1/5を脳心血管系疾患が占めている⁽²⁾。高齢化に伴う病態を考える上で、血管老化やアンチエイジングを避けて通ることはできず⁽³⁾、健康長寿を全うできるか否かの点において、血管石灰化の抑制、さらには治療改善についての探求は、血管石灰化に伴う疾患患者数の減少とともに、社会的には医療費の削減にもつながる。

心血管系組織には数多くの加齢変化が認められ、具体的には石灰沈着やコラーゲン沈着および架橋結合、弾性線維の主成分であるエラスチンの脱落・変性などの現象が認められ、血管壁硬化を呈するこれらの形態学的変化は加齢と共に顕著となり、その中でも大動脈における石灰化は大動脈のコンプライアンス低下を強く惹起し、高齢者に多い収縮期高血圧の原因となる。また、血管壁の石灰化が血管リモデリングの過程を障害する要因になるなど、高齢者の血行動態管理を難しくする理由の一つとして血管石灰化が大きく関わっており⁽⁴⁾、高齢者の動脈硬化性疾患を考える上で重要である(図1)。

細胞老化形質:テロメア短縮
SA-β陽性

Sir2/Sirt1 ↓

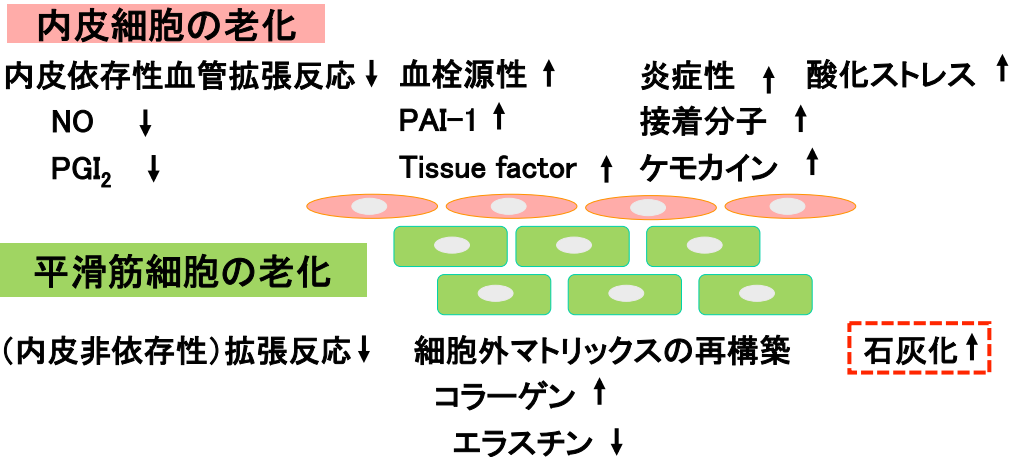


図1 血管老化とは

血管老化とは、細胞に普遍的な老化現象、また血管内皮細胞あるいは平滑筋細胞の機能的、器質的変化と捉えることができ、そのうち血管石灰化は主に血管平滑筋細胞が関与する器質的変化で、機能的にも動脈の壁硬化につながる血管老化の重要な表現型である。

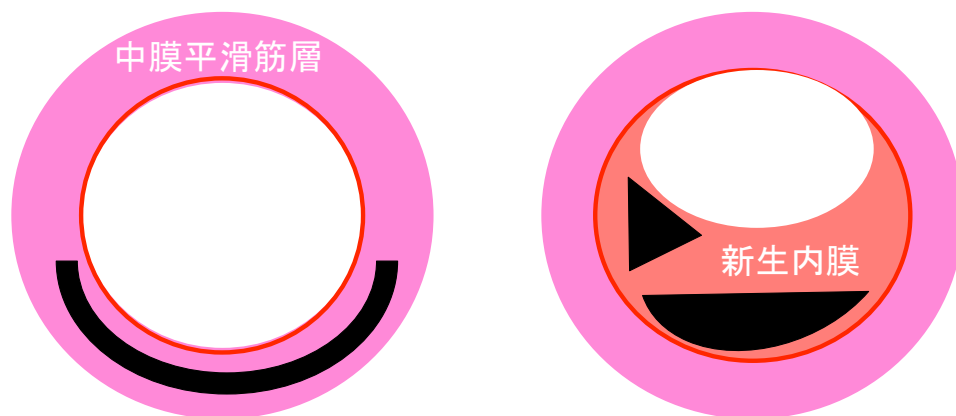
【血管石灰化の病理】

血管石灰化は病理学的に、粥状動脈硬化巣、新生内膜に生じる「アテローム硬化性内膜石灰化」と中膜平滑筋層を主座とする「メンケベルグ型血管中膜石灰化」の2種類に大別される^(5,6)(図2)。

「アテローム硬化性内膜石灰化」は粥状動脈プラークの中に石灰化病変が認められるものであり、冠動脈病変を中心としたプラークにおける脆弱性(破綻のしやすさ)と関係があると考えられている⁽⁷⁾。急性冠症候群(Acute coronary syndrome: ACS)は不安定プラークの破

綻が主たる機転であるが、そのプラーク内の石灰化が破綻に対してどのように影響しているかは、まだ不明な点が多い。

「メンケベルグ型血管中膜石灰化」は高齢者や腎不全患者⁽⁸⁾、糖尿病患者などによく認められ、ヒトにおいては内弾性板直下から中心に中膜石灰化を生じるとされている。高齢者高血圧症に特徴的な収縮期高血圧を惹起し、血圧変動の増大や起立性低血圧などの誘因にもなり、延いては心肥大を背景とする拡張不全型心不全や冠動脈疾患、脳卒中などの病態に対し大きな危険因子となり得る⁽⁹⁾。



A) メンケベルグ型石灰化
(中膜平滑筋層)
Medial calcification

B) アテローム性プラーク内石灰化
(新生内膜)
Atherosclerosis calcification

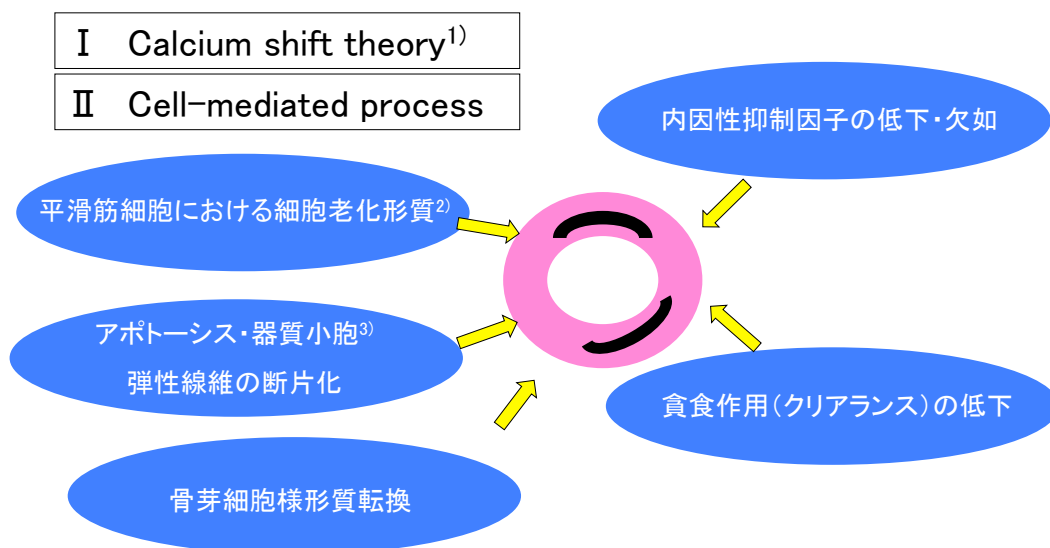
図2 血管石灰化の分類 (模式図)

血管石灰化は病理学的に、(A) 中膜平滑筋層を主座とする「メンケベルグ型石灰化」と (B) 粥状動脈硬化巣、新生内膜に生じる「アテローム性プラーク内石灰化」との2種類に大別される。

【血管石灰化研究の変遷と現状】

血管石灰化の分子機序に対する研究は以前より行われている。古くは、骨粗鬆症患者には大動脈石灰化の程度が強いという数多くの臨床疫学研究から、加齢に伴い骨組織から溶出したカルシウム成分が血流を介して血管という軟部組織に移動し、受動的にカルシウムが沈着するという「Calcium shift theory (カルシウム移動説)」⁽¹⁰⁾が長年に渡り主流であった。

しかし、近年では、血管壁を構成する間葉系細胞、主として血管平滑筋細胞が主体となり、骨・軟骨形成(骨化)と極めて類似した病態変化が生じているという「Cell-mediated process」が解明されてきた(図3)。



1) Orimo H et al. Ann N Y Acad Sci 598: 444-57, 1991.

2) Takemura A et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol 31: 2054-62, 2011.

3) Son BK et al. Circ Res 98: 1024-31, 2006.

図3 血管石灰化への関与が想定されている Cell-mediated process の一部

古くは、骨粗鬆症患者には大動脈石灰化が多いという疫学的調査の結果から、骨組織から溶出したカルシウム成分が血流を介して血管壁に受動的に沈着するという Calcium shift theory が唱えられていた。しかし、現在では血管を構成する細胞群が能動的に骨化するという Cell-mediated process が主流となっている。また、血管石灰化はこれらのうちどれか一つの機序によって生じる現象ではなく、互いに誘因・結果となり、そのバランスが破綻することで血管石灰化が進展すると考えられている。

その代表説として、血管石灰化部位に骨基質タンパクや骨代謝調節因子が強く発現していることから想定された、血管平滑筋細胞の骨芽細胞様形質変化説が挙げられる⁽¹¹⁾(図 4)。

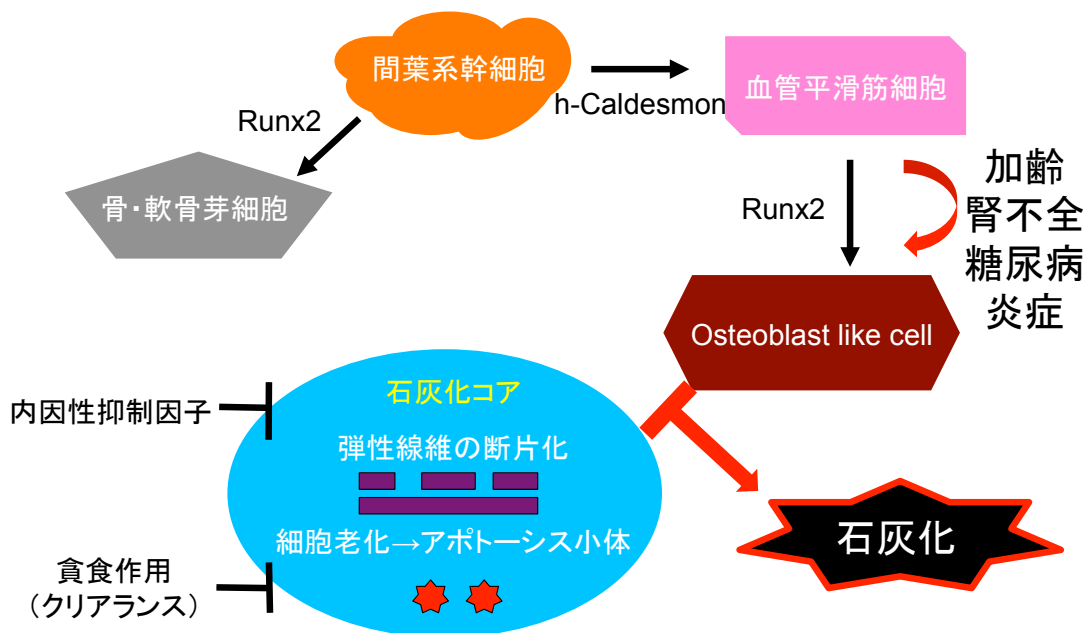


図 4 血管平滑筋細胞の骨芽細胞様形質転換

石灰化を誘導する因子には加齢や腎不全、糖尿病や炎症など様々あり、石灰化が生じる血管では、様々な石灰化抑制因子や、石灰化のコアとなる断片化した弾性線維の存在など様々な要素が関わっていると考えられているが、通常状態から石灰化へ移行する際には Runx2 による血管平滑筋細胞の骨芽細胞様形質転換が重要な契機となっていると考えられている。

近年、血管の動脈硬化あるいは石灰化に伴い、血管局所での骨形成分子の発現が上昇していることが明らかとなり、この骨関連分子が血管の石灰化に関連しているという多くの報告が出されている⁽¹²⁾。なかでも TGF- β スーパーファミリーに属する BMP-2 (Bone Morphogenic protein-2) はヒト動脈硬化病変に発現することが明らかとなり⁽¹³⁾、血管石灰化に関連する血管構成細胞(血管内皮細胞、平滑筋細胞、マクロファージなど)にも発現することがわかっている。⁽¹⁴⁾

最近では、この血管石灰化の分子機序として RANKL(receptor activator for Nuclear Factor Kappa B ligand)システムが主体となっていることが解明されてきている⁽¹⁵⁾。RANKL システムは骨粗鬆症病態形成の中心を成すシステムであり、主として骨芽細胞で産生されて破骨細胞を活性化し、骨粗鬆症に導く分子である。リガンドである RANKL に対し、RANK とデコイ型受容体の OPG(osteoprotegerin)の 2 つの受容体が存在し、その破骨細胞の活性化を調節していることが知られている。

血管細胞においても RANKL 関連分子は発現しており、石灰化した大動脈や、様々な刺激にて石灰化を誘導した培養系ヒト大動脈平滑筋細胞 (human aortic smooth muscle cells: HASMC) においても、骨芽細胞の分化マーカーである Alkaline Phosphatase (ALP)、Osteopontin (OPN)、Osteocalcin (OC)などの発現が上昇していることが明らかとなっている⁽¹⁶⁾。さらには、骨芽細胞の分化を調節する転写因子である Core binding factor α 1 (cbfa1)/Runt related transcription factor 2 (Runx2)や Msh homeo box homolog 2 (Msx2)、Osterix といった、BMPs シグナル下流の重要な標的転写因子が血管平滑筋の骨芽細胞様形質変化に関与していることが証明されている⁽¹⁷⁻²¹⁾。特に cbfa1/Runx2 を血管平滑筋特異的に欠損させたマウスでは、従来の石灰化誘導刺激に対しても石灰化を呈しないことが報告され⁽²²⁾、血管石灰化の最重要因子として研究が進められている。

以上に示したこれまで報告されている研究結果は、ヒト検体や血管石灰化を呈する疾患モデル動物の「石灰化した血管」や、石灰化を誘導した「培養系細胞」を用いて行われてきた。

しかし、動物実験でのメンケベルグ型石灰化の研究においては、ヒト検体では患者背景の多様性のため、群間の経時的変化などの観察が困難である。

また、実験動物としては、高血圧モデルマウスや糖尿病、肥満モデルマウスといった、いわゆる動脈硬化性疾患モデルマウスでは純粋なメンケベルグ型石灰化を再現することが困難

であることから、部分腎摘出術やアデニン過剰投与による腎不全モデルラットが用いられている⁽²³⁾。

当科における先行研究にて Takemura らは、アデニン過剰投与にて腎不全を発症させたラットには血管中膜平滑筋層を中心とした石灰化が認められ、石灰化に一致する老化形質の発現が認められることを報告した⁽²⁴⁾。

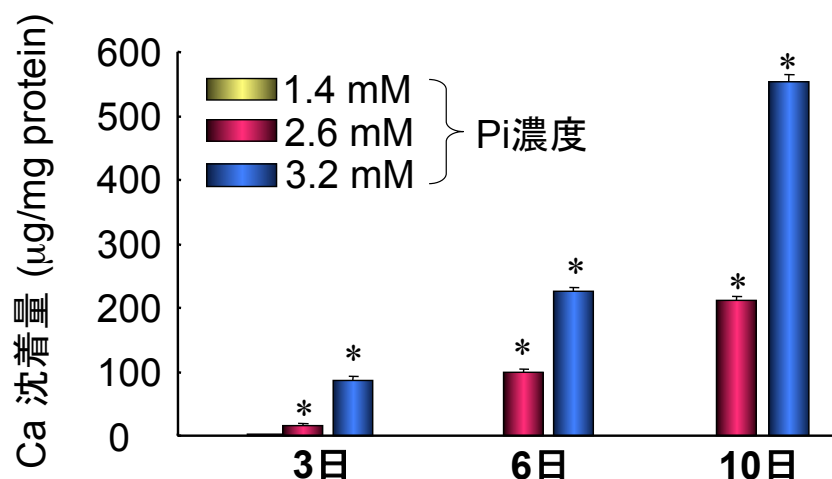
しかし、腎不全モデル動物は高血圧や脂質異常、高リン血症など様々な病態を呈しており、最終的には病理学的な血管石灰化が観察できるものの、分子生物学的な単一因子による作用機序の検討は困難である。

ゆえに、現状では細胞実験にて血管平滑筋石灰化の分子機序の研究は進められている。しかし、いわゆる cell line としての培養系平滑筋細胞は、例えば性差や年齢差など、どのような背景を持った血管から単離された細胞であるかの情報に乏しい。また、一般的に継代数が 7~8 を越えると形態学的な変異が見られることがあり、更に継代数が 12~13 を越えると血管平滑筋細胞としての遺伝子表現型に変異が生じることが知られている⁽²⁵⁾。また、当科の先行研究にて、Takemura らは、培養系ヒト大動脈生活筋細胞を繰り返し継代した結果、細胞老化が生じ、継代数の違いにより高リン刺激による石灰化に差違が生じることを報告した⁽²⁴⁾。しかし、生体臓器としての血管には血管内皮細胞や血管周囲脂肪組織が付随しているが、血管より単離された培養系血管平滑筋細胞には、血管石灰化に大きく関わっているとされる血管内皮細胞を欠いているなど、生体臓器としての血管構造からの乖離が認められる。

【血管石灰化と高リン刺激】

細胞実験にて血管平滑筋細胞に石灰化を誘導する実験系として、石灰化刺激として培養液中のカルシウム濃度を上昇させた高カルシウム刺激や⁽²⁶⁾、ワルファリンの添加⁽²⁷⁾による石灰化誘導法が報告されている。Jono らはメンケベルグ型血管石灰化を呈する病態の一つで

ある腎不全によって生じる高リン血症に注目し、培養系ヒト平滑筋細胞に高リン刺激を与えることにより石灰化を誘導できることを報告した⁽²⁸⁾。当科の先行研究にても、Sonらは高リン刺激による時間依存的、濃度依存的な培養系ヒト平滑筋細胞の石灰化亢進を報告している(図5)。



Son BK et al. Circ. Res. 98: 1024-1031, 2006.

図5 高リン刺激による培養系ヒト平滑筋細胞の石灰化

培養系ヒト平滑筋細胞を正常リン濃度培地(1.4 mM)と高リン濃度培地(2.6 mM、3.2 mM)にて培養した結果、培養期間、リン濃度依存的なカルシウム沈着の亢進を認めた。

(Fisher's test, n=6, mean±Standard error, *: p<0.05)

高リン刺激、すなわち細胞外リン濃度の上昇は腎不全やリン過剰摂取、リン代謝調節異常といった病態で見られ、klotho 変異マウスや FGF23 欠損マウスの特徴的な表現型として認められる。

リンはナトリウム依存性リン酸トランスポーター (PiT1) を介して細胞内へ流入し、PiT1 は血管内皮細胞、血管平滑筋細胞両方に発現しており、血管内皮細胞に流入したリンは eNOS を介して酸化ストレスを生じ、血管内皮細胞傷害を経てアテローム型動脈硬化の誘因になることが知られている⁽²⁹⁾。

また、血管平滑筋細胞に流入したリンは Erk1/2 を介して骨芽関連因子である Msx2 や Runx2、Osterix を誘導し、血管平滑筋細胞の骨芽細胞様形質転換を惹起させるだけではなく、MMP-2, 9 を介したエラスチンの断片化による石灰化コア形成 (nucleation)、Bcl2 を抑制することで血管平滑筋細胞のアポトーシスを誘導するという報告もある⁽³⁰⁻³²⁾。

このようにリンは、血管平滑筋細胞の骨芽細胞様形質転換を介した血管石灰化を特異的に惹起させる因子ではないが、腎不全というヒトにおいて頻繁に認められる病態を模倣した単純な刺激因子として血管石灰化研究には有用であると考えられている。

【Streptozocin (STZ) 誘発性糖尿病モデルマウス】

STZ は糖構造を持っており、膵臓の GLUT2 により β 細胞に取り込まれることで β 細胞を破壊し、マウスに 1 型糖尿病を発症させる。本研究では、これを糖尿病モデルマウスとして使用した。血管石灰化に関しては、主にアテローム性プラーク内石灰化による動脈硬化を呈することが報告されているが⁽³³⁾、中膜平滑筋層石灰化の誘因とはならず、ラットを用いた研究では、STZ 投与による高血糖のみでは中膜平滑筋層の石灰化は生じず、アデニン過剰摂取による腎不全を併発させることで石灰化が生じることが報告されている⁽³⁴⁾。

【Sirt1 ヘテロノックアウトマウス】

NAD⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide) 依存性アセチル化酵素 Sir2 (silent information regulator 2) は、老化・寿命の重要な制御因子として注目されている。Sir2 は当初、寿命が延長する酵母株から同定され⁽³⁵⁾、現在では古菌類から哺乳類に至るまで高度に保存されていることがわかっている。Sir2 は哺乳類にも存在することがわかっており、そのホモログである Sirtuin ファミリーは現在 7 種類同定されている。その中でもっとも酵母 Sir2 と構造が類似している Sirt1 は NAD⁺ 依存性タンパク脱アセチル化酵素として機能している。Sirt1 遺伝子

欠損マウスは発生段階で心奇形を生じ、胎性致死あるいは生後間もなく絶命してしまう⁽³⁶⁾。本研究にて用いた Sirt1^{+/-}マウスは野生型と比較し、やや低体重となる傾向がある以外には特異的な表現型は示さないとされていた⁽³⁶⁾。しかし、現在では雌の Sirt1^{+/-}マウスに骨量の低下が認められ、Sirt1 が骨形成に関与することも報告されている⁽³⁷⁾。また、いくつかの臓器特異的 Sirt1 遺伝子欠損マウスが作製されており、脳特異的 Sirt1 欠損マウスは記憶障害を認め⁽³⁸⁾、血管平滑筋細胞特異的 Sirt1 欠損マウスでは血管石灰化亢進作用を示すなど⁽³⁹⁾、Sirt1 は幅広い病態にわたり恒常性を維持し、多くの役割を担っていることが想定され、本研究では、これを遺伝子改変モデルとして使用した。

【血管石灰化研究の課題と展望】

これまで様々な分子が最終的な血管石灰化、血管へのミネラル沈着に至るまでには関わっていることが報告されてきた。しかし、動物実験では分子生物学的な単一因子による作用機序の検討は困難であり、細胞実験では性差、年齢差といった背景、構造的、組織学的変化が検討できないという、動物実験と細胞実験の乖離が認められる。

臓器特性を保持したまま、その機能や組織学的変化を観察する実験系として以前より組織培養法が活用されており、血管研究においては人工血管置換術を施行した際の摘出血管切片を数週間にわたり培養できたという報告がある⁽⁴⁰⁾。そこで、この組織培養法を実験動物に応用し、特に病態モデルマウスや遺伝子改変マウスの摘出血管を用いることで、血管構造を維持しながら、その病態や特定遺伝子の作用を検討することができるのではと考え、本実験モデルを創案した(図 6)。

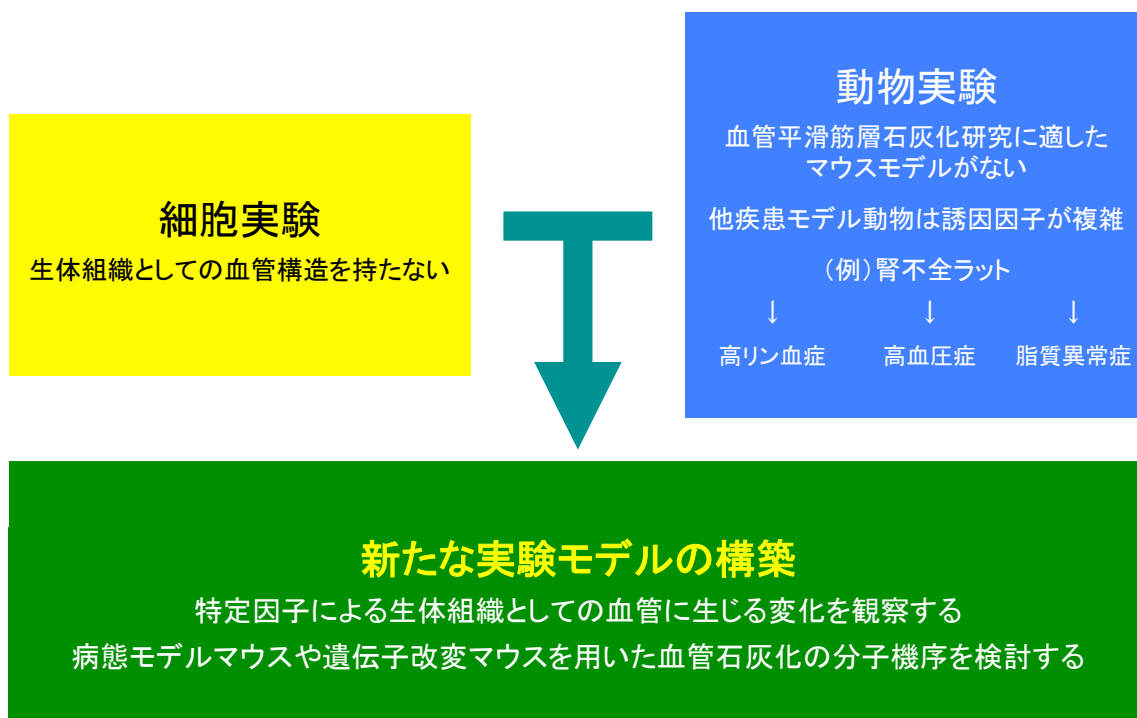


図 6 血管石灰化形成の新たな実験モデル

細胞実験では生体臓器としての血管機能や性差、年齢差といった背景、構造的、組織学的変化が確認できないという限界があり、動物実験では分子生物学的な単一因子による作用機序の検討は困難であるという限界が感じられる。そこで両者の橋渡しとなる新たな実験モデルを創案した。

3 目的

- 血管石灰化形成を観察するために、高リン刺激によるマウス大動脈切片の石灰化を検討する。
- 若齢マウスと高齢マウスの大動脈切片の石灰化と、それに伴う血管の骨芽細胞様形質転換を検討する。
- 病態モデルマウスとして糖尿病モデルマウスを用いて、本実験モデルを検討する。
- 遺伝子改変マウスとして Sirt1 ヘテロノックアウトマウスを用いて、本実験モデルを検討する。

4 方法

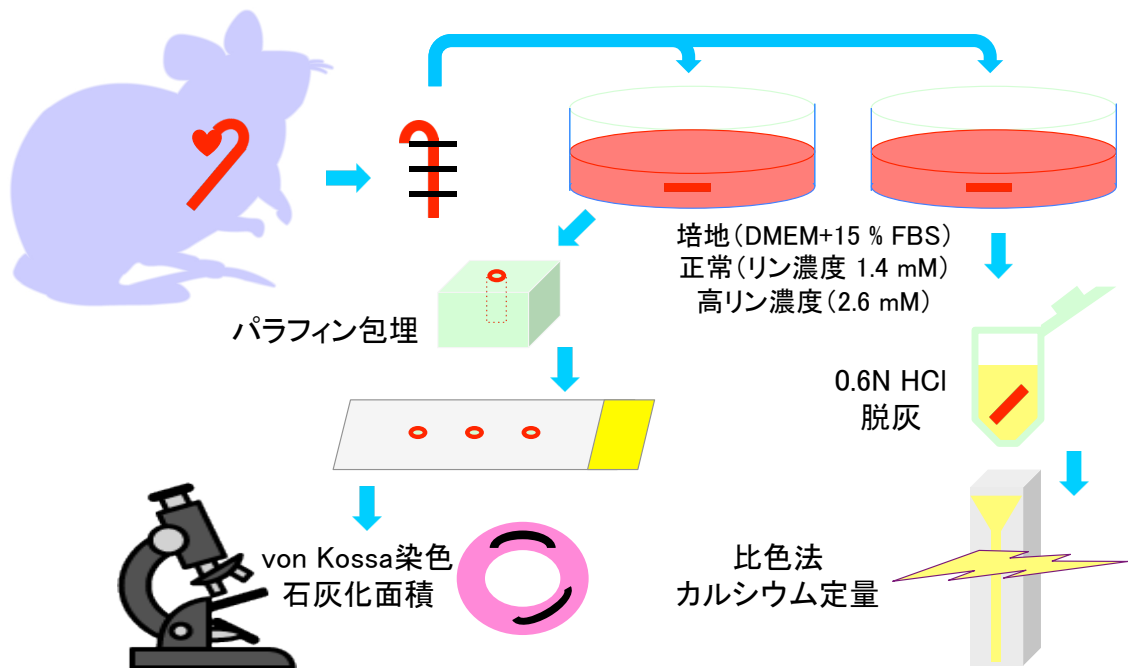


図7 方法概略図

マウスから摘出した大動脈を DMEM を基本培地とした培養液にて培養。正常リン濃度 1.4 mM を対照として、無機リンを加えた高リン濃度培養液にて石灰化を誘導した。石灰化を誘導した摘出血管はパラフィンブロックに包埋し、切片を von Kossa 染色後に鏡検、ImageJ にて von Kossa 染色面積を測定した。また、希塩酸(0.6 N)にて脱灰後、その溶液を o-cresolphthalein complexone 法 (OCPC 法) にてカルシウム沈着量を定量した。

1. 材料

マウス; C57BL/6j; 10 週齢オス (日本クレア株式会社, 東京, 日本)、C57BL/6j; 12~18 週齢オス (日本クレア株式会社, 東京, 日本)、C57BL/6j Retired; 40~52 週齢オス (日本クレア株式会社, 東京, 日本)。Sirt1 ヘテロノックアウトマウス; 三菱化学生命研究所より搬入 (Dr. F. W. Alt (Howard Hughes Medical Institute, Harvard Medical School, Boston, USA) Dr. Mitsutoshi Setou (Hamamatsu University School of Medicine, Department of Molecular

Anatomy, 1-20-1, Handayama, Hamamatsu, Shizuoka 431-3192, Japan)。C57BL/6j と 6 世代以上交配することで遺伝背景を C57BL/6j に揃えたものを使用した。

検体として使用したマウスは、動物飼育室(空調;約22℃、照明;12 時間 ON-12 時間 OFF)にて 2 週間以上飼育し、成育環境を揃えた後に使用した。

摘出大動脈は 24 well plate(MICROPLATE® 12 Well with Lid Flat Bottom; Well 直径 22 mm; Tissue Culture Treated, IWAKI/旭硝子株式会社, 東京, 日本)にて培養した。培養液として、15 % ウシ胎児血清と 100 unit/ml ペニシリン G (Invitrogen/Applied Biosystems, Inc., California, US)、100 μ g/ml ストレプトマイシン (Invitrogen/Applied Biosystems, Inc., California, US)を添加した 4500 mg/ml グルコースを含む DMEM 培地(化生研, 東京, 日本)を用い、37 °C、5 % CO₂ 条件下で培養した。

生理的リン濃度を 1.4 mM として、高リン刺激には無機リン(inorganic phosphate: Na₂H₂PO₄/NaH₂PO₄ 混合、pH 7.4)を DMEM に加えた、2.6 mM リン濃度培養液を使用した。石灰化のリン濃度依存性の確認には、DMEM 培地に無機リンを加えた各リン濃度培養液(1.4 mM, 1.8 mM, 2.2 mM, 2.6 mM, 3.0 mM)を用いた。培養液交換は 2 日毎に行ない、各時点(6 時間後、12時間後、1日後、2日後、3 日後、4 日後、5 日後、6 日後、10 日後)で検体を回収し、評価を行った。

全ての実験は東京大学の動物実験規則に基づいて行われた。

2. アッセイ

摘出血管培養後に石灰沈着量 (Ca deposition)を o-cresolphthalein complexone 法 (OCPC 法)にて測定し、パラフィンブロック切片の von Kossa 染色、抽出タンパクによる Western blotting (runt-related transcription factor 2 (Runx2), h-Caldesmon, Sirt1, beta-tubulin)、採取遺伝子を用いた Real time-PCR (Runx2, h-Caldesmon, Sirt1, GAPDH)の検討を行った。

3. 標本の作製と石灰化の誘導

東京大学動物実験規則を遵守し、安楽死させた実験動物を清潔環境下で解剖した。皮切開腹後に横隔膜下面から胸骨左縁を骨切剪刀にて開胸、虚脱した肺を避けて胸椎腹側に露出する胸部大動脈を臓器用ピンセットにて保持し、末梢側から血管周囲組織と共に大動脈背面を眼科用剪刀で剥離しながら大動脈弓部近傍まで摘出した。また、気管支ならびに食道も摘出した。

摘出した大動脈はリン酸緩衝生理食塩水(Phosphate buffered saline: PBS (-))に浸しながら血管周囲組織を除去し、内腔を 24 G 留置針外筒を用いて PBS(-)にて洗浄した。内皮細胞の除去は滅菌処理した長さ 5 cm の綿糸(株式会社大創産業, 東広島, 日本)を内腔に 1 回通過させ内腔を擦過した。摘出した気管支および食道も同様に周囲組織を除去し、内腔を洗浄した。

上記処理を行った大動脈を長さ 5 mm～10 mm に切断し、24 well plate に 1 検体/well にて 2 ml の培養液にて培養し、各項目の検討に用いた。なお、検体は 1.8 mM、2.2 mM、2.6 mM、3.0 mM とリン濃度を調整した各培養液にて石灰化を比較検討した上で、高リン刺激として 2.6 mM リン濃度を選択した。血管内皮細胞の同定については、特異抗体 PECAM-1(Platelet endothelial cell adhesion molecule)(Anti-CD31/PECAM-1 antibody (ab28364), abcam, Cambridge science park, UK)を用いた。

気管支と食道に関しては、長さ 5 mm～10 mm に切断後、2.6 mM リン濃度培養液にて同様に培養した。

4. タンパク抽出法

培養後の大動脈を 4℃の PBS(-)で洗浄後、濾紙で水分を取り除き、眼科用剪刀を用いて剪断。RIPA buffer (50 mmol/L Tris-HCl; pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 1 % Nonidet P-40,

0.5 % Deoxycholic acid, 0.1 % SDS) に Protease inhibitor cocktail 錠 (complete Mini®, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を加えた Lysis buffer (4 °C 以下) で均質化した。さらに 12,000 × g にて 30 分遠心分離後、その上清をタンパクサンプルとして回収した。検体のタンパク濃度は Bio-Rad protein assay® (Bio-Rad Laboratories, California, US) を用いて測定した。

5. SDS-PAGE および ウェスタンブロット法

1 サンプルあたりタンパク量として 5 μ g を使用し、sample buffer (0.05 mol/l Tris-HCl; pH 6.8, 2 % SDS, 6 % 2-Mercaptoethanol, 10 % glycerol, bromophenol blue) を加え、10 分間 96 °C で加熱処理後 5~20 % Gradient SDS-polyacrylamide gel (和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本) で 20 mA 定電流で電気泳動し、分離したタンパクを Polyvinylidene difluoride 膜 (FluoroTrans® 0.2 μ m, Pall Corporation, New York, USA) に転写した。その後、Blocking One® (ナカライテスク株式会社, 京都, 日本) にて室温で 1 時間ブロッキングを行った。Blocking One® で希釈した 1 次抗体 (Runx2 (M-70); sc-10758 rabbit polyclonal IgG; 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA, h-Caldesmon; c4562 mouse monoclonal IgG; 1:4000; SIGMA-ALDRICH, Missouri, USA, beta-tubulin; T4026 mouse monoclonal IgG; 1:5000; SIGMA-ALDRICH, Missouri, USA, Sirt1; H-300 rabbit polyclonal IgG; 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA, PiT-1(H-130); sc-98814 rabbit polyclonal IgG; 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) を振盪しながら 4 °C で一晩反応させた後、TBS-T で 20 分間 3 回洗浄を繰り返した。5 % Blocking One®-TBST で希釈した 2 次抗体; Horseradish-Peroxidase labeled Anti-rabbit IgG, Anti-mouse IgG (1:1000; Amersham, Buckinghamshire, Great Britain) を室温で振盪させながら 1 時間反応させ、TBS-T で 20 分間 3 回洗浄した。タンパクの発現は enhanced chemiluminescence detection system (ECL

Prime®; GE Healthcare, Buckinghamshire, Great Britain) 法にて発光させ、Amersham Hyperfilm ECL® (GE Healthcare, Buckinghamshire, Great Britain) にて検出した。

6. RNA 単離、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応、定量的 real time PCR 法

培養後の大動脈を 4 °C の PBS(-) で洗浄し、RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit® (QIAGEN GmbH, Venlo, Netherlands) を用いて Total RNA の抽出を行った。Total RNA の 1 μ g を oligo dt primer および Omniscript first-strand synthesis system® (QIAGEN GmbH, Venlo, Netherlands) を用いて cDNA を合成した。得られた cDNA をテンプレートとして、Power SYBR Green PCR Master Mix® (Applied Biosystems, Inc., California, US) を溶媒に、7300 real-time PCR system® (Applied Biosystems, Inc., California, US) を用いて解析した。PCR の条件は 95 °C 10 分を 1 サイクル、95 °C 10 秒-60 °C 60 秒を 40 サイクル、最後に Dissociation Protocol を行なった。cDNA 量は、内在性コントロールである GAPDH にて補正した。Primer セットは下記のものを用いてそれぞれの cDNA を増幅した。

<Mus musculus runt related transcription factor 2 (Runx2), transcription variant 1>

AGAGTCAGATTACAGATCCCAGG (forward)

TGGCTCTTCTTACTGAGAGAGG (reverse)

<Mus musculus h-caldesmon>

ATGGTAGAGGAGAAAACACCAGA (forward)

CCATCCCCTTCTATTTTGGACTC (reverse)

<Mus musculus Sirt1>

CCTGACTTCAGGTCAAGGGATGGTA (forward)

CTGATTAAAAATATCTCCTCGTACAG (reverse)

7. パラフィン切片作製

大動脈を 10 % 中性緩衝ホルマリン溶液にて固定後、パラフィンに包埋しブロックを作製した(株式会社 新組織化学研究所に依頼)。マイクローム(Leica RM2125RT®, Leica MICROSYSTEMS GmbH, Wetzlar, Germany)にて 5 μ m で薄切し、FRONTIER-coated micro slide glass®(松浪硝子工業株式会社, 大阪, 日本)に接着させた。パラフィン切片が接着したスライドガラスをキシレン(和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本)に 2 分×3 回浸した後に、エタノール(和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本)(100 % → 100 % → 90 % → 70 %)にそれぞれ 2 分間浸して脱水した。脱水後超純水ですすぎ、24 時間以内に限り超純水に浸した状態で 4 °C で保存、組織染色に用いた。

8. von Kossa 染色法

脱パラフィン処理したスライドガラスをアルミホイル上に置き、スライドガラスに接着しているリング状の血管切片を覆うように 5 % 硝酸銀水溶液を 1 検体あたり 200 μ l 滴下し、紫外線灯下にて 30~60 分静置した。超純水で 3 回洗浄後、5 % チオ硫酸ナトリウム溶液を同様に滴下し、5 分間処理後再度超純水で洗浄した。一般的に対比染色として Nuclear fast red 染色を行なうが、後述の von Kossa 染色面積定量時に影響が生じるため本実験モデルでは行わず、一部サンプルに対して連続切片を用いて von Kossa 染色と Nuclear fast red 染色を別プレパラートにて行なった。染色後のプレパラートは、エタノール 70 % → 90 % → 100 % → 100 % に各 1 分間浸して段階的に脱水し、キシレンに 2 分×3 回浸して透徹後、ゲルマウントにてカバーガラスで封入した。

9. Nuclear fast red 染色法

脱パラフィン処理後のスライドガラスをケルンエヒロート液に 5 分間浸した後流水にて洗浄。その後脱水透徹し、封入した。

10. HE 染色法

脱パラフィン処理後のスライドガラスをマイヤーヘマトキシリン液(和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本)に 5 分間浸して核染色後、3 分間の流水水洗に続き、1 %エオシン Y 液(和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本)に 5 分間浸して細胞質を染色。その後前述同様脱水透徹後に封入した。

11. 石灰化の評価

von Kossa 染色後の切片は顕微鏡 (BZ-9000; 株式会社キーエンス, 大阪, 日本) にて×40 倍、シャッタースピード 1/500 秒でカラーデジタルイメージとして撮像した。そのイメージファイルを ImageJ (NIH, Maryland, US)^(41, 42) を用いて目的面積をトレースし、ピクセル数にて評価した。von Kossa 染色面積については、石灰化を誘導していない若齢マウス検体の Brightness を threshold として染色部位を判定し、その大動脈断面積を分母とした染色面積の割合にて評価した。1 検体から 30 μ m 以上の間隔で 3 枚の切片を作製し、その平均を以て検体の von Kossa 染色面積とした。

また、石灰化を誘導した大動脈を 0.6 mol/l の HCl で脱灰処理後、その HCl 溶液内 Ca 含量を OCPC 法 (C テストワコー®; 和光純薬株式会社, 大阪, 日本) によって測定、検体重量によって補正した。

12. アルカリフォスファターゼ活性測定法

前述タンパク抽出法にて回収したタンパク溶液を p-ニトロフェニルリン酸基質法(ラボアッセイ ALP®; 和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本)を用いて測定し、検体のタンパク濃度にて補正した。

13. STZ 誘発性糖尿病モデルマウスの作製

10 週齢および 40～50 週齢の C57BL/6j オスマウスに、PBS(-) で希釈した streptozocin (STZ) (SIGMA-ALDRICH, Missouri, USA) 60 mg/kg を、1 匹あたり 200 μ l 前後の投与量となるように調整して腹腔内投与した。対照群には PBS(-) を 200 μ l を同様に腹腔内投与した。1回目投与前、1回目投与後 3 日目および 5 日目に尾静脈採血にて血糖値を測定し、1回目投与後 5 日目に 2 回目の STZ 投与を行った。2 回目投与後 3 日目(1 回目投与から 8 日後)には血糖値 > 250 mg/dl 以上の高血糖を認め、その後1週間以上経過してから検体として使用した。なお、血糖値はワンタッチウルトラ (Johnson and Johnson, New Jersey, US) を用いて測定した。餌は自由に摂取させ、血糖の測定は午後 2 時から午後 4 時の間に行った。

14. 血液検査

マウスより採取した血液を 4°C にて静置後、12,000 \times g にて 30 分遠心分離後血清を回収し、株式会社エスアールエル(東京, 日本)にて尿素窒素(BUN)、クレアチニン(Cre)、リン(iP)の測定を行った。

15. 統計解析

本文および図表中のデータは一元配置分散分析、または二元配置分散分析を用いて解析し、二元配置分散分析における相互作用については $p < 0.05$ を有意とした。下位検定には Turkey 法を用い、数値は mean ± Standard deviation (SD) にて表示した。

5 結果

<高リン刺激によるマウス管腔平滑筋臓器の石灰化>

最初に高リン刺激による石灰化が血管に特徴的な現象であるか、大動脈以外の管腔平滑筋臓器における高リン刺激の作用を検討した。生体内では食道や気管支が一定期間高濃度のリンに曝露されるという状態は想定し得ないが、マウスから摘出した大動脈、食道、気管支に 2.6 mM の高リン刺激を与えた結果、大動脈($p<0.01$)と食道($p<0.05$)に有意な石灰化が認められた。気管支には有意な石灰化は認められなかった(図 8)。

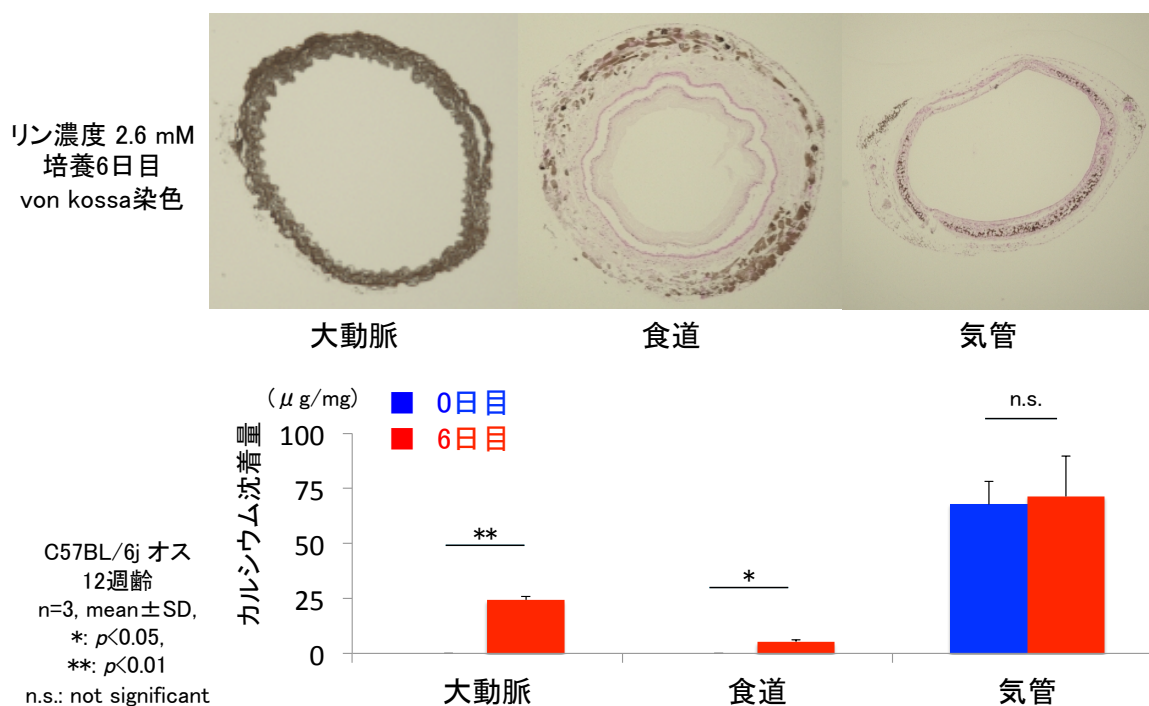


図 8 高リン刺激によるマウス摘出管腔平滑筋臓器の石灰化

2.6 mM の高リン濃度培養液にて 6 日間培養した結果、大動脈と食道には有意なカルシウム沈着量の増大が認められ、気管支には認められなかった。

(ANOVA, $n=3$, mean±SD, *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, n.s.: not significant)

<血管内皮細胞による石灰化への影響>

血管石灰化には平滑筋細胞のみならず、血管内皮細胞も大きく関与している可能性がある。本実験モデルにおいて、血管内皮細胞による血管平滑筋の石灰化への影響の有無について検討した。

まず、高リン刺激による血管内皮細胞への影響を、切片免疫染色にて観察した。血管内皮細胞については特異抗体である PECAM-1 にて同定を行った。図 9 上段に示すように、少なくとも 3 日目までは血管内皮細胞は残存しているが(図 9 上段濃緑矢印)、経時的には血管内皮細胞は死滅する傾向が認められた(図 9 上段薄緑矢印)。

次に、図 9 下段に示すように、大動脈内腔を滅菌した綿繕り糸(ほぐしたタコ糸)にて擦過し、血管内皮細胞を除去した。大動脈内腔を綿糸で擦過した結果、分枝血管の血管内皮細胞は残存しているのに対し(図 9 下段濃青矢印)、大動脈内腔の血管内皮細胞は除去されていることを確認した(図 9 下段薄青矢印)。

anti-PECAM1 (CD31)

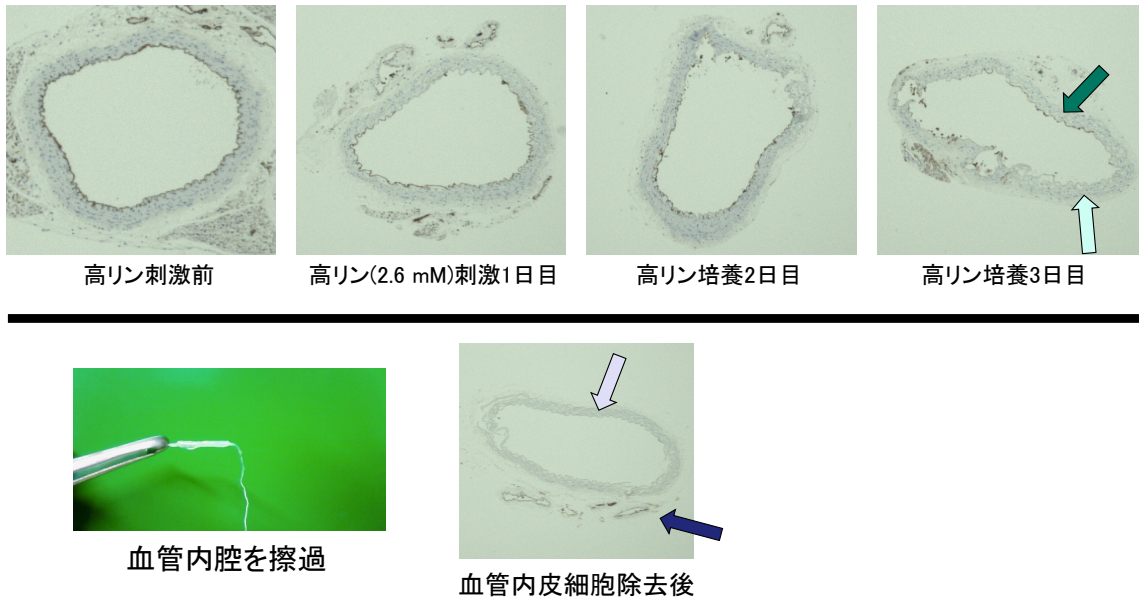


図9 血管内皮細胞の除去と石灰化への影響

パラフィンブロックより作製した大動脈切片を血管内皮細胞特異的マーカーである PECAM1 (CD31) にて染色した。上段：高リン刺激前にて大動脈内腔に一層の血管内皮細胞が確認され、高リン (2.6 mM) 刺激後では、経時的に血管内皮細胞の脱落が認められた (薄緑矢印)。下段：大動脈内腔を滅菌した綿糸で擦過した結果、大動脈内腔の血管内皮細胞は除去された (薄青矢印) のに対し、未処理である大動脈分枝の血管内皮細胞は残存していた (濃青矢印)。

続いて、血管内皮細胞の有無による石灰化への影響を比較したところ、von Kossa 染色面積およびカルシウム沈着量ともに有意な差は認められなかった (図 10)。

以上の結果より、本実験モデルにおいて、血管内皮細胞の影響はほとんど無いと判断した。さらに、大動脈内腔を擦過することによっていわゆる shear stress が生じ、局所の炎症から石灰化を惹起させる可能性を考慮、また、血管という生体臓器の構造を保存することを重視し、本実験モデルにおいては血管内腔を洗浄するにとどめることとした。

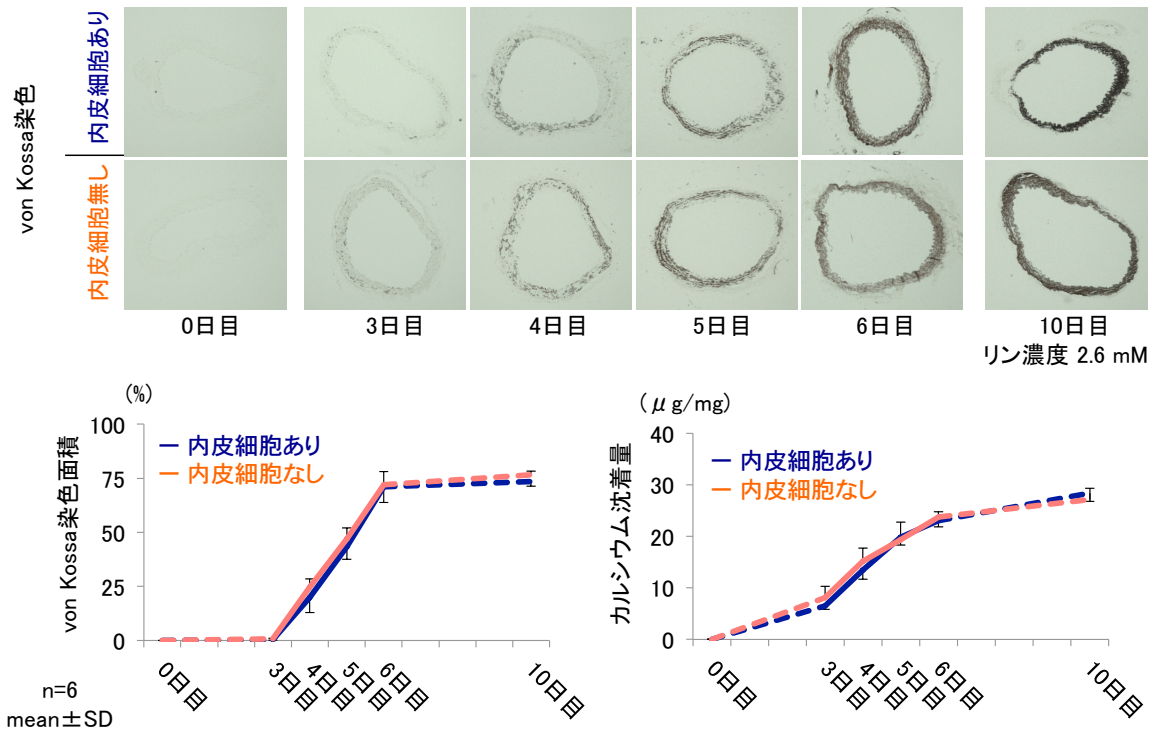


図 10 血管内皮細胞の除去と石灰化への影響

摘出した大動脈内腔を滅菌した綿糸で擦過し、血管内皮細胞を除去した群と、内腔をPBS(-)で洗浄のみ行なった群では高リン刺激による石灰化に差は認めなかった

(ANOVA, n=6, mean ± SD, n.s.: not significant)

<各リン濃度によるマウス摘出血管の石灰化>

前述にて確認された高リン刺激によるマウス摘出大動脈の石灰化について、正常リン濃度(1.4 mM)から高リン濃度(3.0 mM)まで段階的にリン濃度を変化させ、6日間培養して石灰化を評価した。各リン濃度刺激による結果について、石灰化を von Kossa 染色面積およびカルシウム沈着量にて比較したところ、正常リン濃度(1.4 mM)と比較し、各高リン濃度(1.8, 2.2, 2.6, 3.0 mM)にて有意な石灰化が認められた。更に、1.4 mM から 2.6 mM までは濃度依存的に石灰化の亢進を認めたが、2.6 mM と 3.0 mM では有意な差が得られなかった(図 11)。以降本実験モデルにおいては高リン濃度を 2.6 mM と設定し、検討を行うこととした。

リン濃度

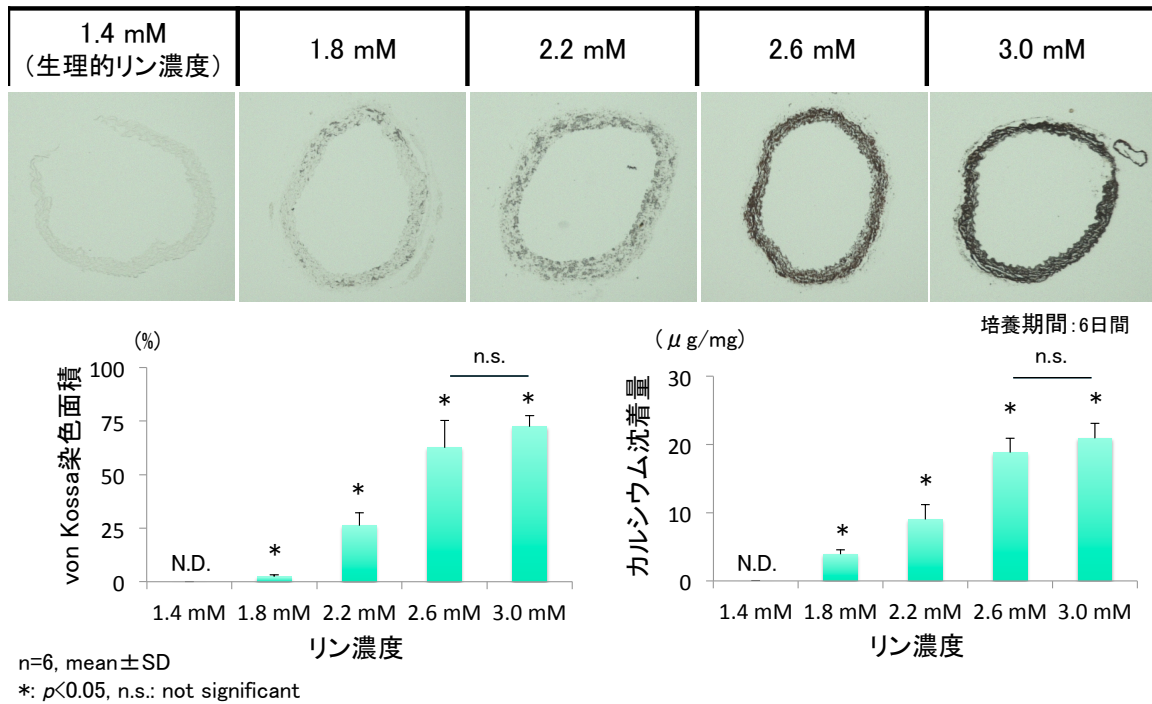


図 11 各種リン濃度による石灰化

正常リン濃度培地 (1.4 mM) から高リン濃度培地 (3.0 mM) まで段階的にリン濃度を変化させ、6 日間培養後石灰化を評価した。von Kossa 染色面積、カルシウム沈着量共に、正常リン濃度と比較して濃度依存的な亢進を認めた。2.6 mM と 3.0 mM との間には有意な差を認めなかった。

(ANOVA, n=6, mean \pm SD, *: $p < 0.05$, n.s.: not significant)

< 高リン刺激による血管への影響 >

高リン刺激による摘出大動脈への影響、特に血管構造が維持されているかを確認するため、高リン濃度 (2.6 mM) にて 10 日間培養した大動脈の連続切片を、von Kossa 染色、Nuclear fast red 染色および HE 染色にて染色を行なった結果、核の残存と血管としての組織構造が維持されていることが観察された (図 12)。

高リン(2.6 mM)刺激10日目

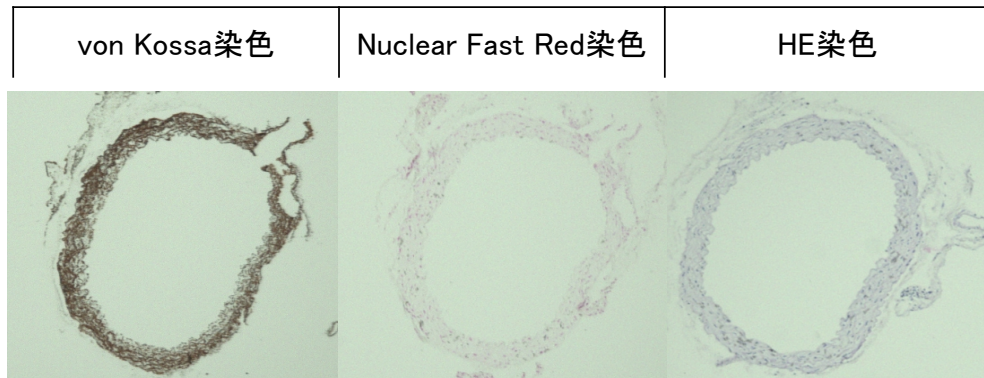


図 12 高リン(2.6 mM)刺激による血管への影響

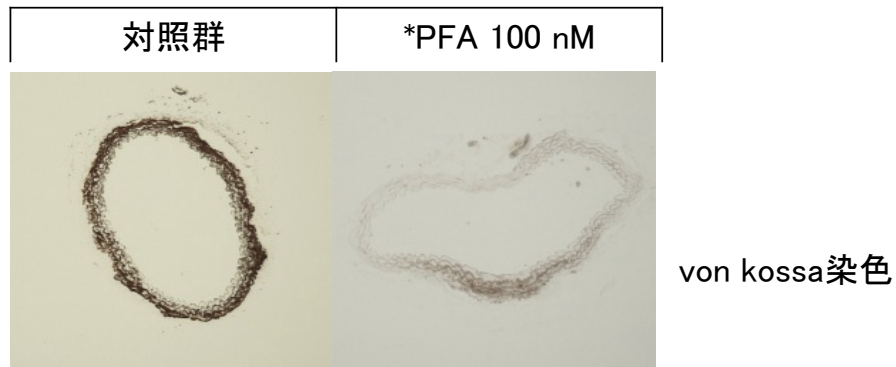
高リン(2.6 mM)濃度にて10日間培養した大動脈の連続切片を、von Kossa 染色、Nuclear fast red 染色および HE 染色にて染色を行なったところ、核の残存と血管としての組織構造が維持されていることが観察された。

<高リン刺激によるマウス摘出大動脈の能動的石灰化の確認>

本実験モデルが、いわゆる Calcium sift theory に代表される受動的なカルシウム沈着ではなく、高リン刺激によって生じる能動的な石灰化であることを示すために、ナトリウム依存性リン酸トランスポーター1(Sodium-dependent phosphate transporter 1: PiT1)に対する阻害剤である phosphonoformic acid (PFA)を添加して細胞内へのリンの流入を阻害したところ、PFA によって高リン刺激による石灰化が抑制されることが認められた。

つまり、数日間における高リン刺激によって、臓器としての大動脈が能動的に石灰化していることが確認された(図 13)。

高リン(2.6 mM)刺激6日目



*PFA: phosphonoformic acid
ナトリウム依存性リン酸トランスポーター(PiT1)に対する阻害剤

図 13 PFA によるマウス摘出大動脈石灰化の抑制効果

ナトリウム依存性リン酸トランスポーター1(Sodium-dependent phosphate transporter 1: PiT1)に対する阻害剤である phosphonoformic acid (PFA)を前処理して細胞内へのリンの流入を阻害したところ、PFA によって高リン刺激によるマウス摘出大動脈の石灰化が抑制された。

< von Kossa 染色とカルシウム沈着量の相関 >

同一個体から摘出した大動脈に高リン刺激を加え、石灰化を誘導した結果における von Kossa 染色面積と OCPC 法にて測定したカルシウム沈着量の相関を検討した結果、von Kossa 染色面積とカルシウム沈着量には正の相関($R^2=0.89638$)が認められた(図 14)。

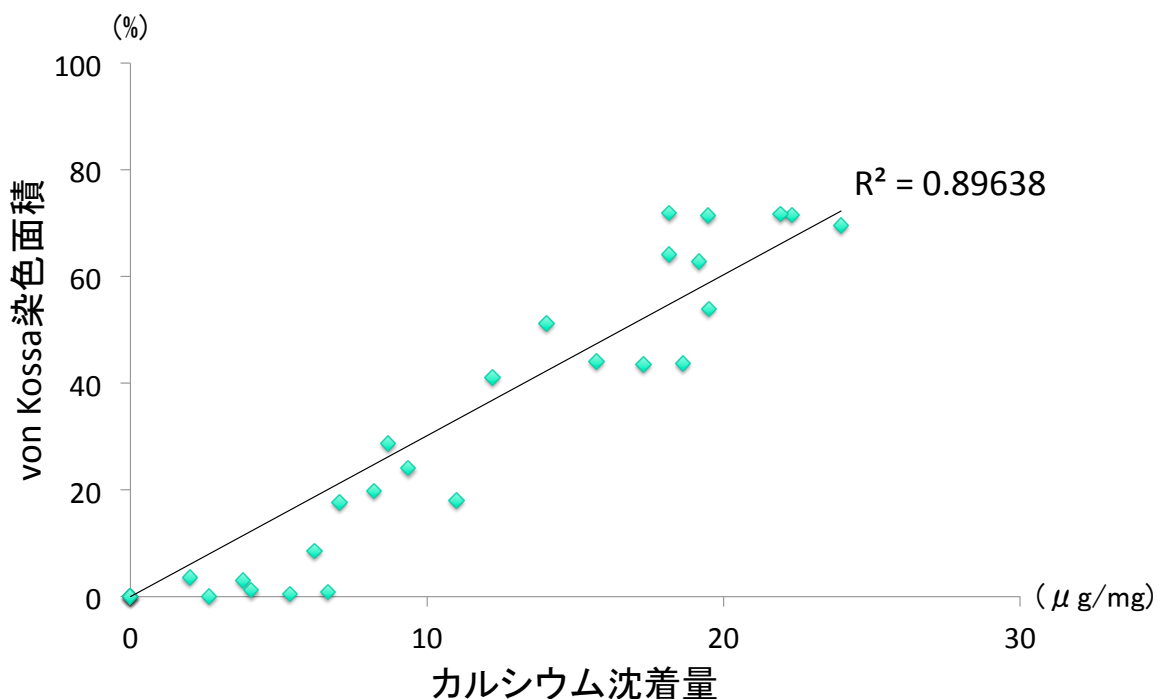


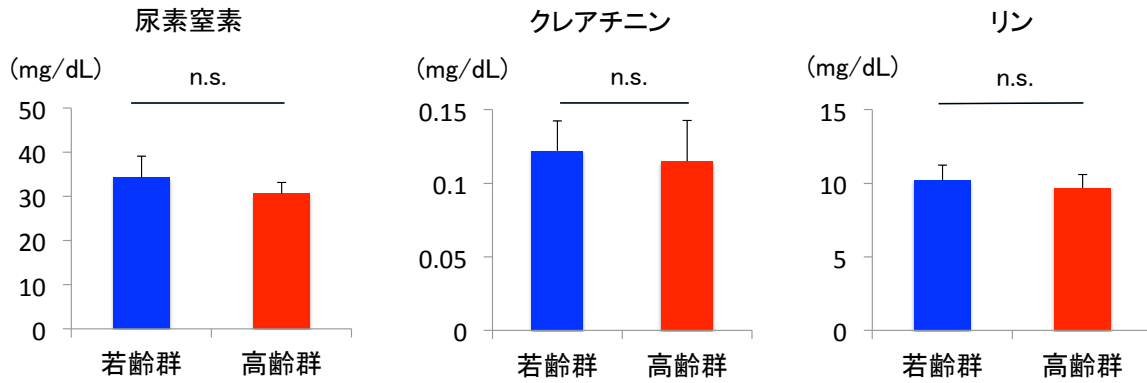
図 14 石灰化面積とカルシウム沈着量の相関

同一個体から摘出した大動脈を2つに分割し、リン濃度 2.6 mM、1～10 日間 培養後、それぞれの石灰化を von Kossa 染色面積と OCPC 法によるカルシウム沈着量にて評価し、横軸をカルシウム沈着量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)、縦軸を von Kossa 染色面積 (%) としてグラフ上にプロットした (n=27)。von Kossa 染色面積とカルシウム沈着量には強い相関が認められた。

(n=27, $R^2=0.89638$)

<若齢マウスと高齢マウスから摘出した大動脈の石灰化>

序文で述べたように、ヒトにおいては加齢によって石灰化が亢進するが知られているが、マウスにおいても同様であるか週齢の異なるマウス(若齢:12～18 週齢、高齢:40～52 週齢)を用いてその差を比較した。血液検査所見上、若齢マウス群と高齢マウス群には腎機能 (BUN、Cre)、血中リン濃度に有意な差を認めず(図 15)、それぞれの大動脈切片における PiT-1 の発現も有意な差は認めなかった(図 16)。

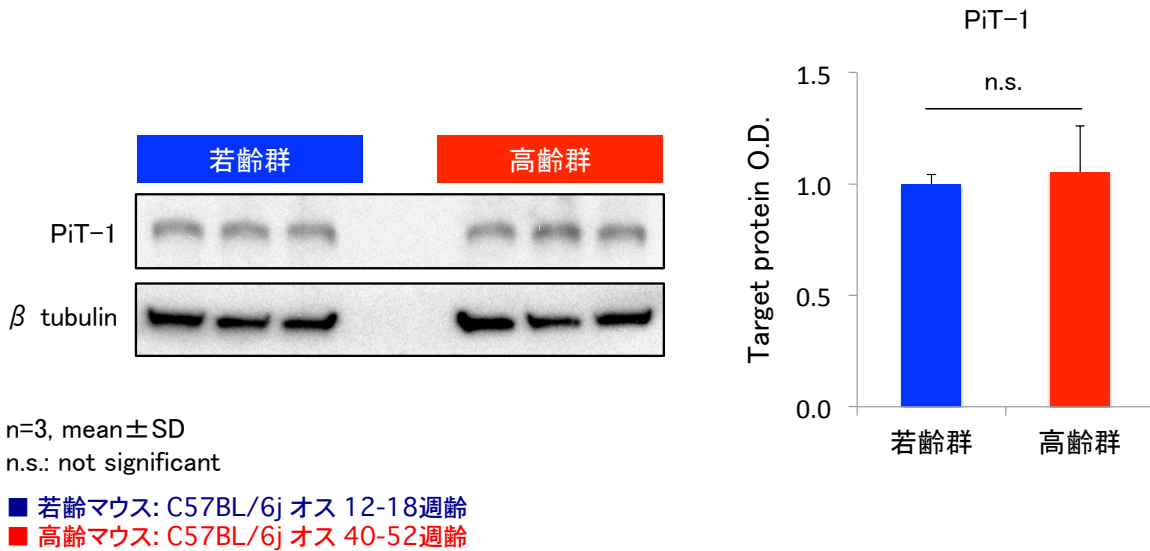


n=10, mean±SD
n.s.: not significant
■ 若齢マウス: C57BL/6j オス 12-18週齢
■ 高齢マウス: C57BL/6j オス 40-52週齢

図 15 若齢マウスと高齢マウスの血液検査所見

若齢マウス群と高齢マウス群の血液検査所見上、腎機能(BUN、Cre)、血中リン濃度に有意な差は認めなかった。

(ANOVA, n=10, mean±SD, n.s.: not significant)



n=3, mean±SD
n.s.: not significant
■ 若齢マウス: C57BL/6j オス 12-18週齢
■ 高齢マウス: C57BL/6j オス 40-52週齢

図 16 若齢マウスと高齢マウスの大動脈切片における PiT-1 の発現

若齢マウス群と高齢マウス群それぞれの大動脈切片において、PiT-1 の発現量に有意な差は認めなかった。

(ANOVA, n=3, mean±SD, n.s.: not significant)

若齢マウスの摘出大動脈においては3日目から von Kossa 染色にて確認できる程度の石灰化が認められ、以降6日目まで時間依存的な von Kossa 染色面積の亢進が認められた(図 17 上段)。一方、高齢マウスから摘出した大動脈には、リン刺激を加える前に生理的な石灰化がすでに認められ、さらに2日目には石灰化面積の亢進が認められた(図 17 下段)。

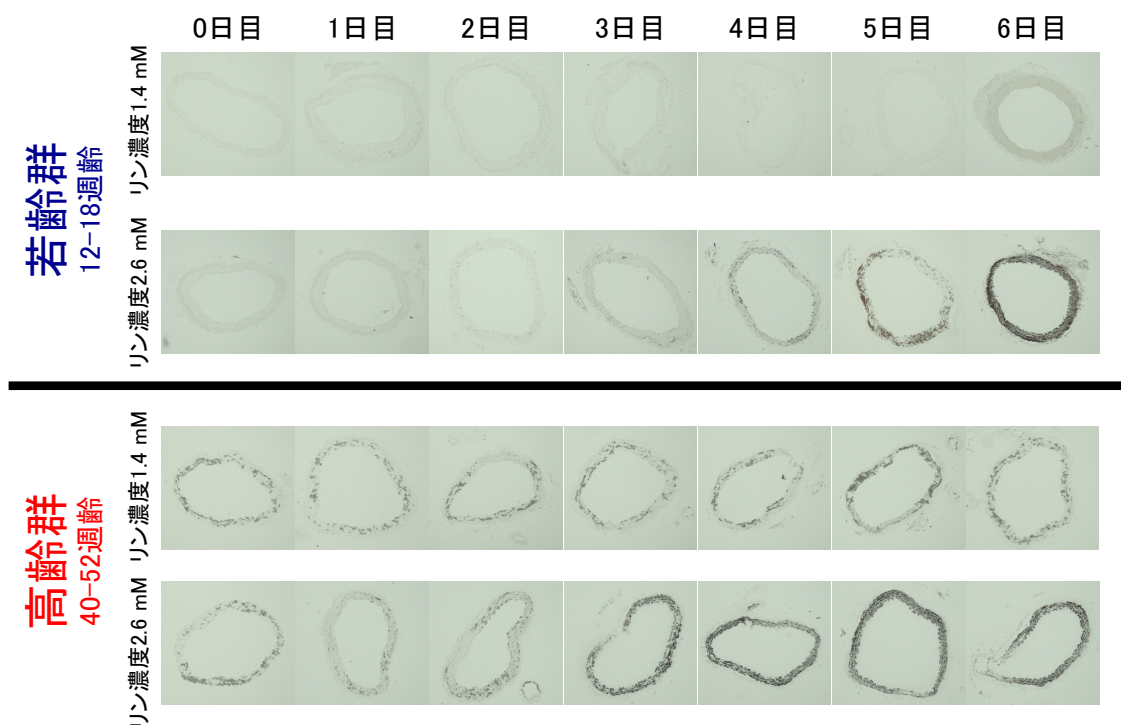


図 17 高リン刺激による若齢マウスと高齢マウスの摘出大動脈の石灰化

高リン刺激による、若齢マウス(12~18 週齢)と高齢マウス(40~52 週齢)から摘出した大動脈の石灰化を比較した。上段:若齢マウスの摘出大動脈では高リン刺激後3日目には von Kossa 染色にて確認できる程度の石灰化を認め、以降6日目まで時間依存的な von Kossa 染色面積の亢進を認めた。下段:高齢マウスの摘出大動脈では高リン刺激を加える前に生理的な石灰化をすでに認め、高リン刺激後2日目には von Kossa 染色面積の亢進を認めた。

各培養期間において、高リン刺激にて石灰化を誘導した若齢マウスと高齢マウスの摘出大動脈の von Kossa 染色面積およびカルシウム沈着量を、Day 0 からの亢進量をもって比較

したところ、高齢マウスは高リン刺激初期において有意に石灰化が亢進することを認めた (図 18)。

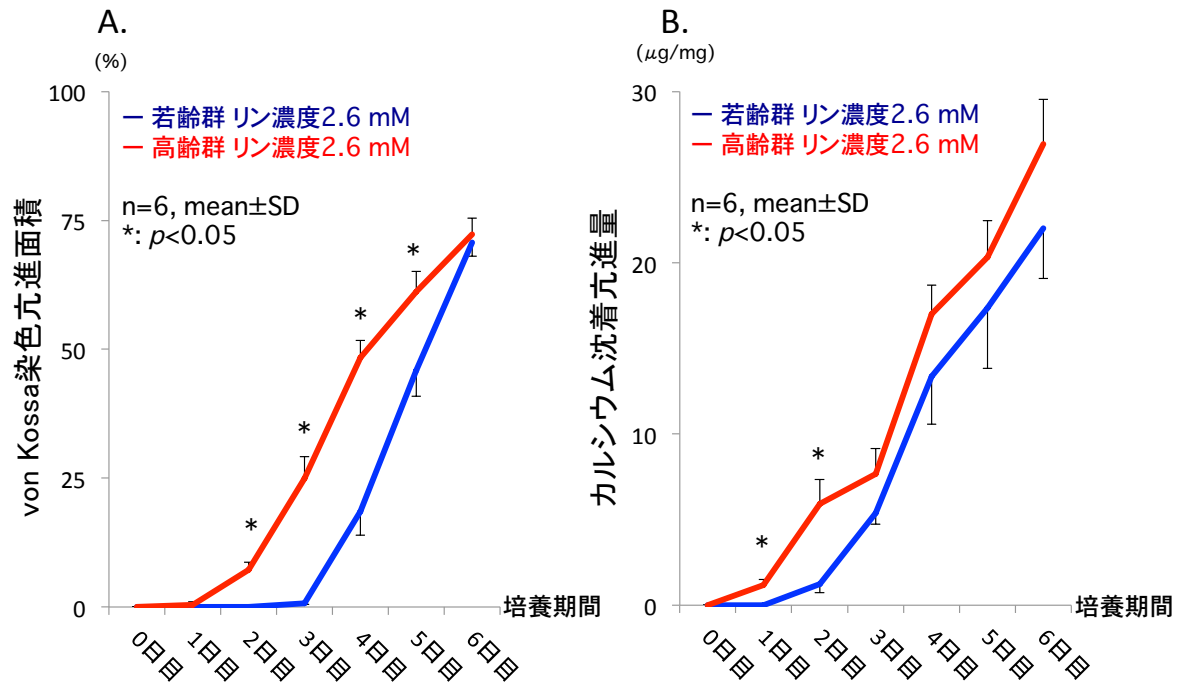


図 18 高リン刺激による若齢マウスと高齢マウスの摘出大動脈の石灰化

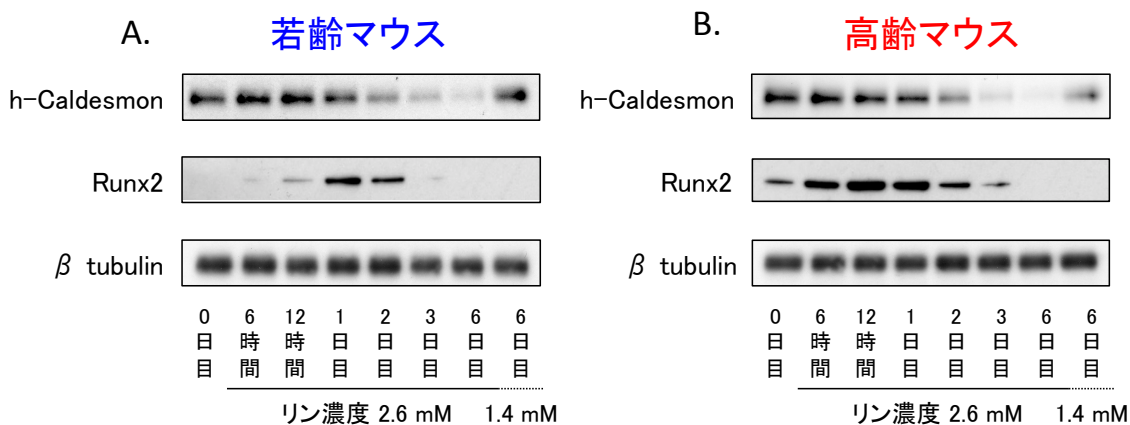
高リン刺激による若齢マウスと高齢マウスの摘出大動脈の石灰化を0日目からの亢進量にて比較した結果、von Kossa 染色面積は2日目に、カルシウム沈着量は1日目という早期の時点で、高齢マウスにおける石灰化の亢進を認めた。

(ANOVA, n=6, mean±SD, *: p<0.05)

<高リン刺激によるマウス摘出大動脈の骨芽細胞様形質転換に関する検討>

血管平滑筋細胞の骨芽細胞様形質転換は、血管石灰化における重要な機序の一つとして知られている。その形質転換を司る因子の一つである Runx2 に注目し、本実験モデルにおけるその、発現変化を検討した。また、血管平滑筋細胞に形質転換が生じたという結果を確認するため、分化型血管平滑筋細胞特異的に発現する h-Caldesmon の発現変化を検討した。

各培養期間における摘出大動脈サンプルからタンパクを抽出し、ウェスタンブロット法を用いて評価した。若齢マウスの摘出大動脈では高リン刺激後より Runx2 の発現上昇が認められ、Day 1～Day 2 をピークに以降減衰する傾向が認められた(図 19.A)。一方、高齢マウスの摘出大動脈においては、Day 0 の時点にて Runx2 の発現は上昇しており、さらにはその発現ピークも高リン刺激後 12 時間後に認められる傾向が得られた(図 19.B)。また、h-Caldesmon は、若齢、高齢マウスの摘出大動脈共に、Runx2 の発現上昇以後、発現が低下することが認められた(図 19.A, B)。



若齢マウス: C57BL/6j オス 12-18週齢
 高齢マウス: C57BL/6j オス 40-52週齢

図 19 高リン刺激によるマウス摘出大動脈の骨芽細胞様形質転換

(A)若齢マウスの摘出大動脈は高リン刺激後より Runx2 の発現が上昇し、刺激後 1 日目をピークに減衰を認めた。h-Caldesmon は Runx2 の発現ピーク以降に減衰を認めた。(B)高齢マウスの摘出大動脈では高リン刺激による石灰化誘導以前に Runx2 の発現を認めた。高リン刺激後 Runx2 の発現はさらに上昇し、刺激後 12 時間をピークに減衰を認めた。h-Caldesmon は若齢マウスの摘出大動脈と同様に、Runx2 の発現ピーク以降に減衰を認めた。

次に、若齢と高齢、それぞれ高リン刺激後の摘出大動脈から得たタンパクサンプルを用いて、両者の比較を行った(図 20.A, B, C)。h-Caldesmon の発現は時間経過と共に低下を認

め(図 20.A, B)、Runx2 の発現は若齢マウスと比較して高齢マウスでは高リン刺激初期に急峻な上昇を認めた(図 20.A, C)。次に、骨化マーカーとしての ALP 活性について比較を行った。若齢マウス、高齢マウス共に ALP 活性は、時間経過とともに亢進を認め、高リン刺激後 3 日目においては若齢マウスと比較して、高齢マウスにおいて有意な亢進を認めた(図 20.D)。

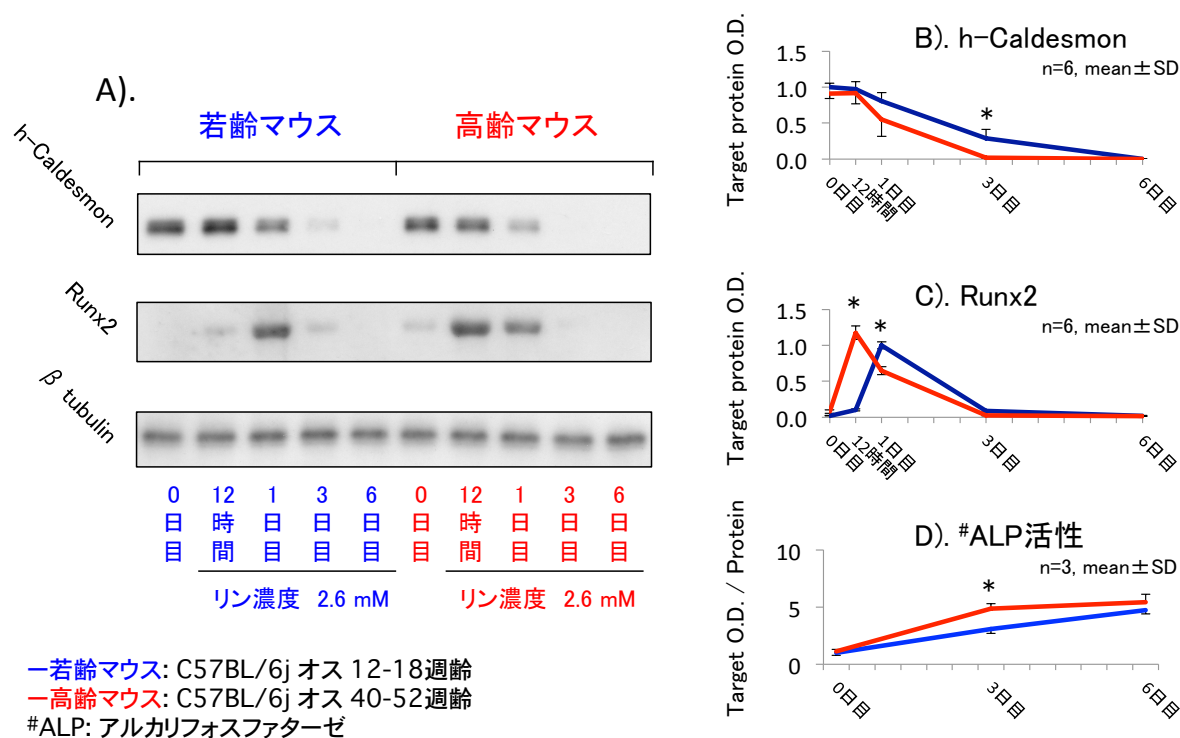


図 20 若齢、高齢マウスから抽出した大動脈の骨芽細胞様形質転換

(A)若齢マウスの抽出大動脈と比較し、高齢マウスの抽出大動脈では Runx2 の発現ピークを早期に認め、その発現量にも有意な差を認めた。また、h-Caldesmon は、高齢マウスの抽出大動脈において、高リン刺激後早期からの発現の減少を認めた。(B, C)(A)をグラフ化したもの。(D)骨化マーカーである ALP 活性は、若齢、高齢マウスの抽出大動脈共に、時間経過とともにその上昇を認めた。高リン刺激後 3 日目の時点では、若齢マウスの抽出大動脈と比較して高齢マウスの抽出大動脈は有意に骨化していることを認めた。

(ANOVA, A-C: n=6, D: n=3, mean \pm SD, *: $p < 0.05$)

mRNA の発現においても同様の傾向が認められるのか、RT-PCR を用いて確認を行った。

mRNA レベルでは h-Caldesmon も Runx2 もタンパク発現と同様の傾向を示した。更に、

mRNA Runx2 においては、若齢マウス、高齢マウスの摘出大動脈共に、タンパク発現のピークより早期に発現のピークを認め、若齢マウスの摘出大動脈と比較して、高齢マウスの摘出大動脈では、高リン刺激によって早期に mRNA Runx2 の発現上昇が認められた(図 21)。

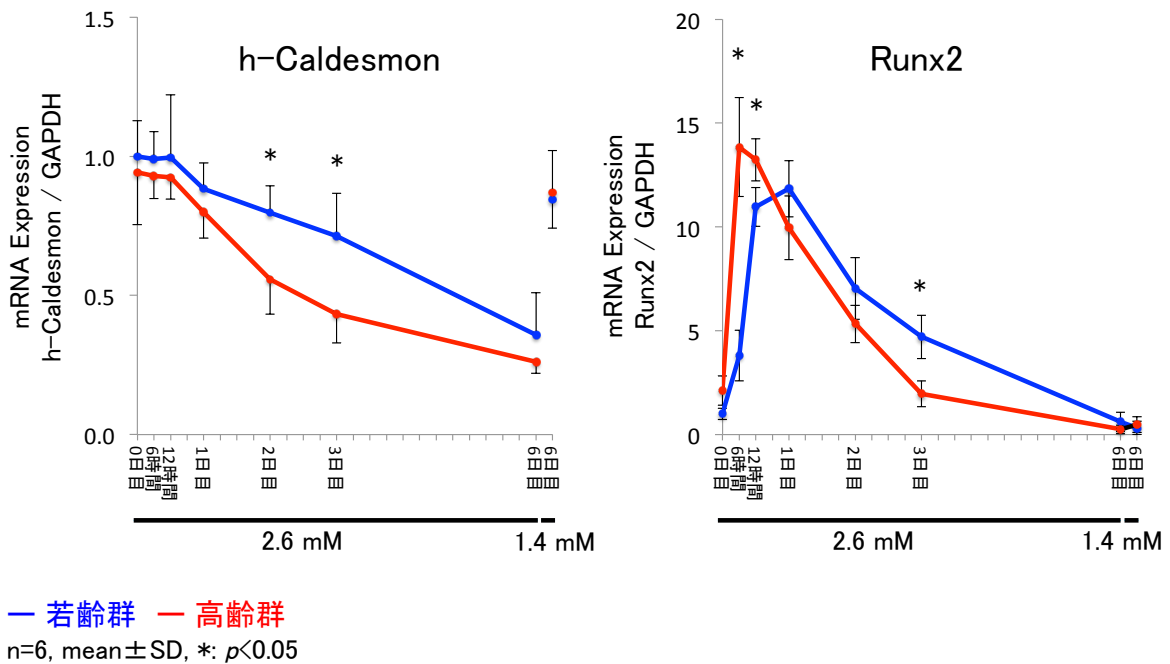


図 21 高リン刺激によるマウス摘出大動脈の Runx2、h-Caldesmon mRNA の発現変化
若齢マウスの摘出大動脈と比較して、高齢マウスの摘出大動脈は早期に mRNA Runx2 の発現上昇し、mRNA h-Caldesmon の発現は低下した。

(ANOVA, n=6, mean±SD, *: p<0.05)

<病態モデルマウス、STZ 誘発性糖尿病マウスへの応用>

STZ は糖構造を持っており、膵臓の GLUT2 により β 細胞に取り込まれることで β 細胞を破壊し、マウスに 1 型糖尿病を発症させる。STZ 誘発性糖尿病マウスの作成法に関しては様々なプロトコルが報告されており、高用量を単回投与することで膵 β 細胞を広範に破壊し、急激な血糖上昇を発症させる方法や、低用量を複数回投与することで緩徐な血糖上昇を生じさせる方法がある。本実験では高齢者における病態も考慮し、緩徐な血糖上昇を生じさせることとした。

若齢マウス、高齢マウス共に、STZ 60 mg/kg を初回投与したところ血糖上昇が認められ、2 回目を投与することにより血糖値は 250 mg/dl 以上に上昇し、糖尿病を発症した。糖尿病発症後 1 週間自由行動にて経過後、検体として使用した(図 22)。それぞれ、コントロール群(PBS 投与)と STZ 投与群には腎機能(BUN、Cre)、血中リン濃度に有意な差は認められなかった(図 23)。

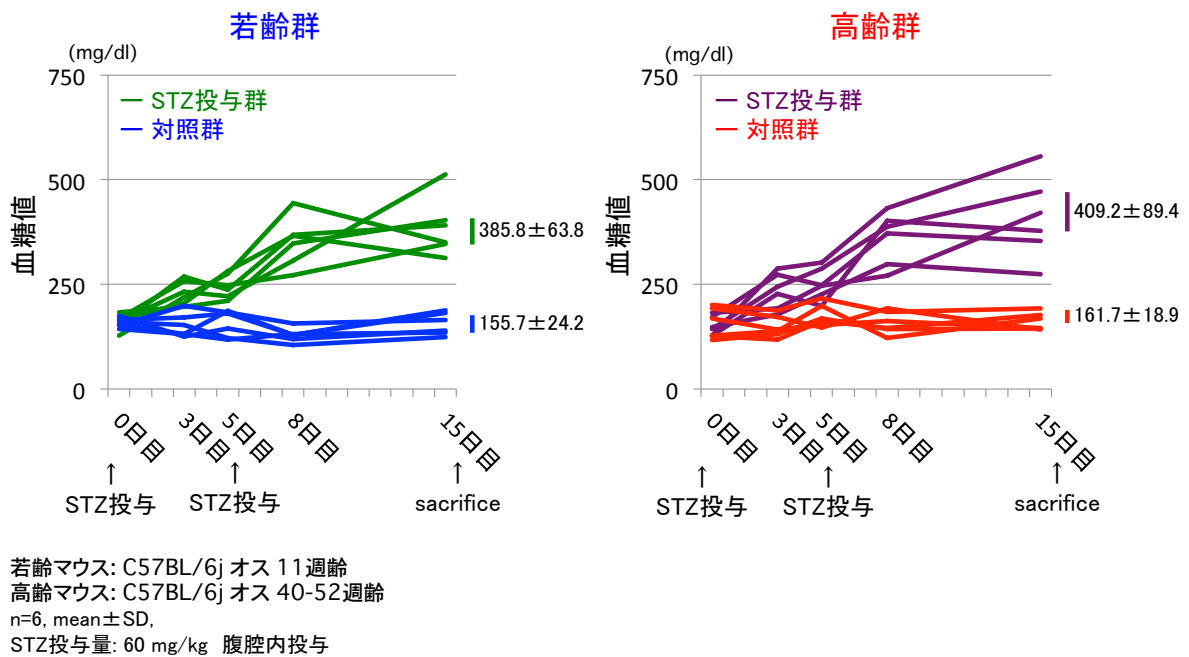
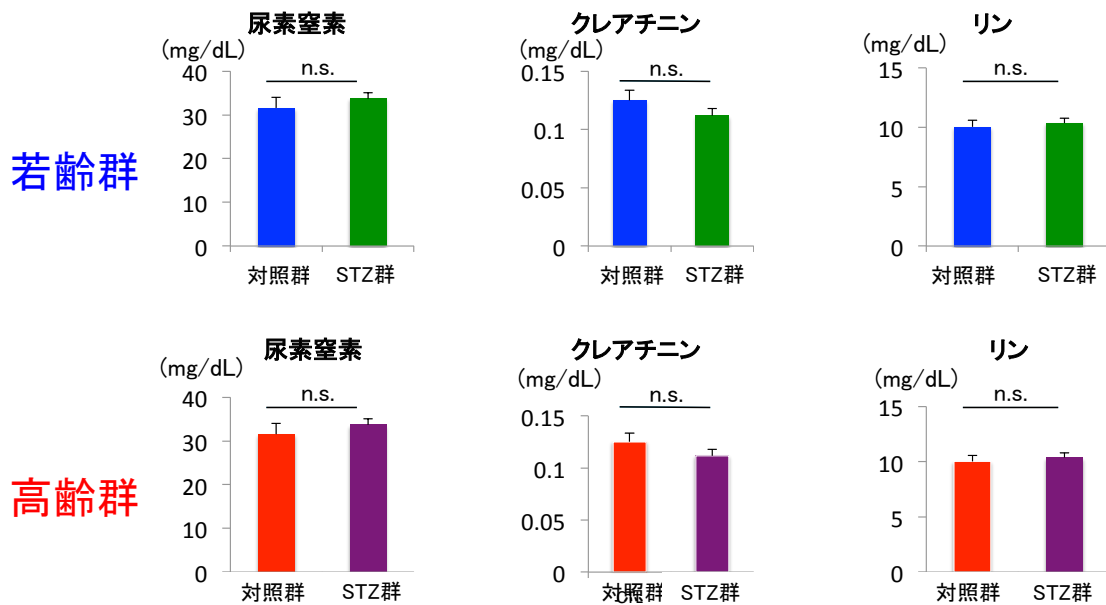


図 22 STZ 腹腔内投与による糖尿病発症までの血糖値推移

若齢マウス、高齢マウス共に、STZ 60 mg/kg を腹腔内投与後 3 日目には血糖値の上昇を認め、2 回の STZ 腹腔内投与にて血糖値 250 mg/dl 以上の高血糖を認めた。PBS を腹腔内投与した対照群に血糖値の変化は認めなかった。

(n=6, mean ± SD)。



若齢マウス: C57BL/6j オス 11週齢
 高齢マウス: C57BL/6j オス 40-52週齢
 n=6, mean±SD, *: $p < 0.05$, n.s.: not significant

図 23 STZ 腹腔内投与による糖尿病発症後のマウス血液検査所見

若齢マウス、高齢マウス共に、STZ 投与群と PBS 投与群の血液検査所見上、腎機能 (BUN、Cre)、血中リン濃度に有意な差は認めなかった。

(ANOVA, n=6, mean±SD, n.s.: not significant)

前述(図 17)若齢マウス摘出大動脈にて認められた、von Kossa 染色にて高リン刺激による石灰化が確認できる時期である 3 日目を評価点として、各群の石灰化を比較したところ、若齢マウス(図 24)、高齢マウス(図 25)共に、STZ 投与群において、von Kossa 染色面積、カルシウム沈着量に有意な亢進が認められた。

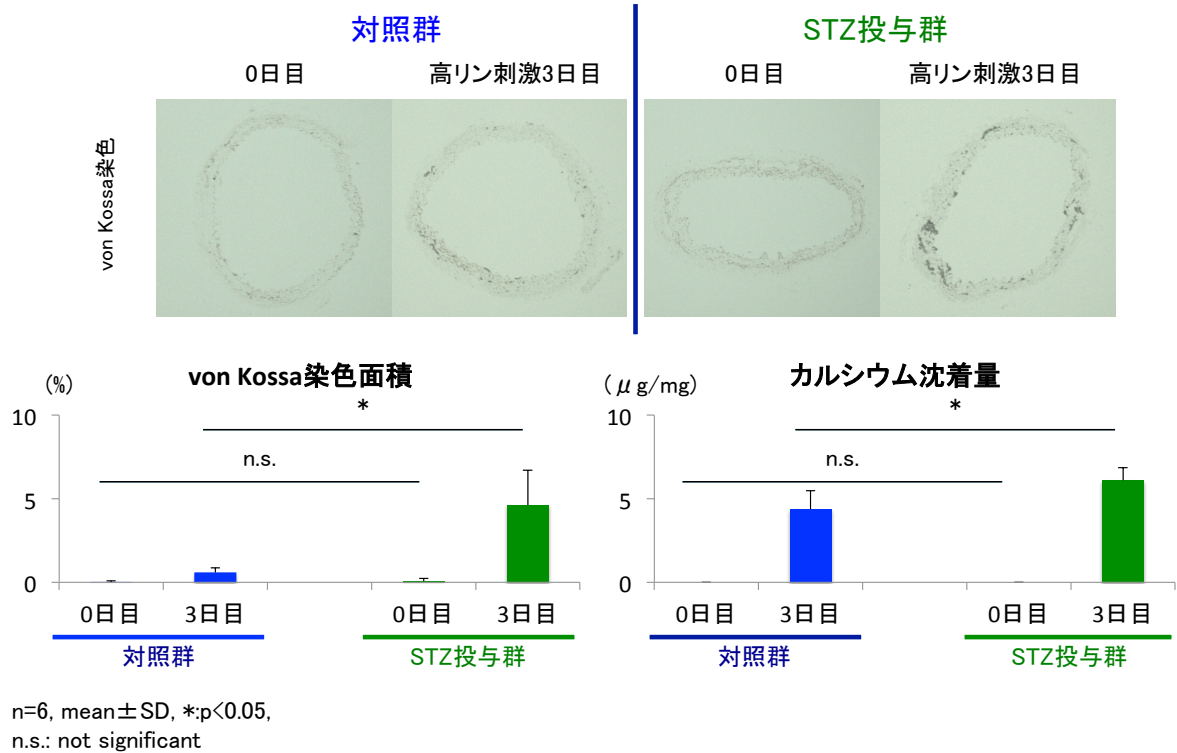


図 24 若齢糖尿病マウス摘出大動脈の石灰化

若齢マウスにおいて、PBS を腹腔内投与したコントロール群と比較し、STZ 腹腔内投与により糖尿病を発症したマウスでは、高リン刺激後 3 日目の時点で、von Kossa 染色面積、カルシウム沈着量共に有意な亢進を認めた。

(ANOVA, n=6, mean±SD, * : $p<0.05$, n.s.: not significant)

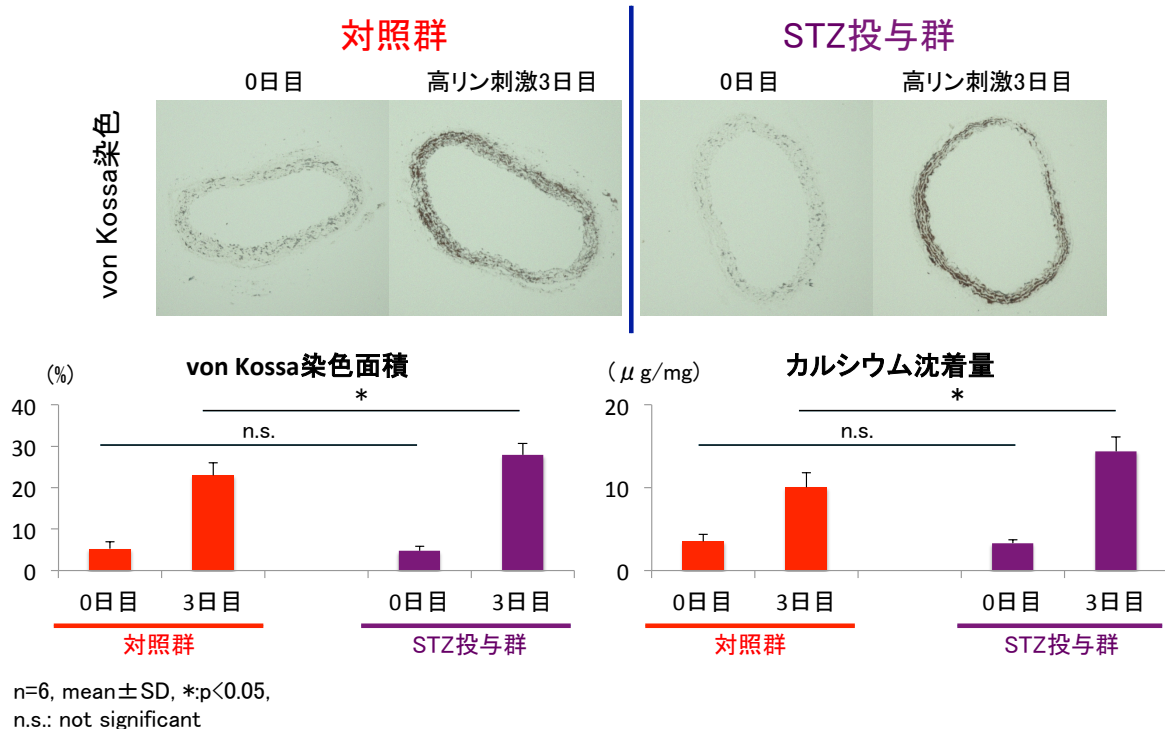


図 25 高齢糖尿病マウス摘出大動脈の石灰化

高齢マウスにおいて、PBSを腹腔内投与したコントロール群と比較し、STZ腹腔内投与により糖尿病を発症したマウスでは、高リン刺激後3日目の時点で、von Kossa染色面積、カルシウム沈着量共に有意な亢進を認めた。

(ANOVA, n=6, mean±SD, * : $p<0.05$, n.s.: not significant)

次に、それぞれの群におけるRunx2の発現変化を観察した。3日目の時点で有意な石灰化が認められたことから、高リン刺激0日目、1日目、2日目の検体を用いた。高リン刺激後1日目の時点で、コントロール群と比較してSTZ投与群におけるRunx2の有意な発現上昇が認められた(図26)。

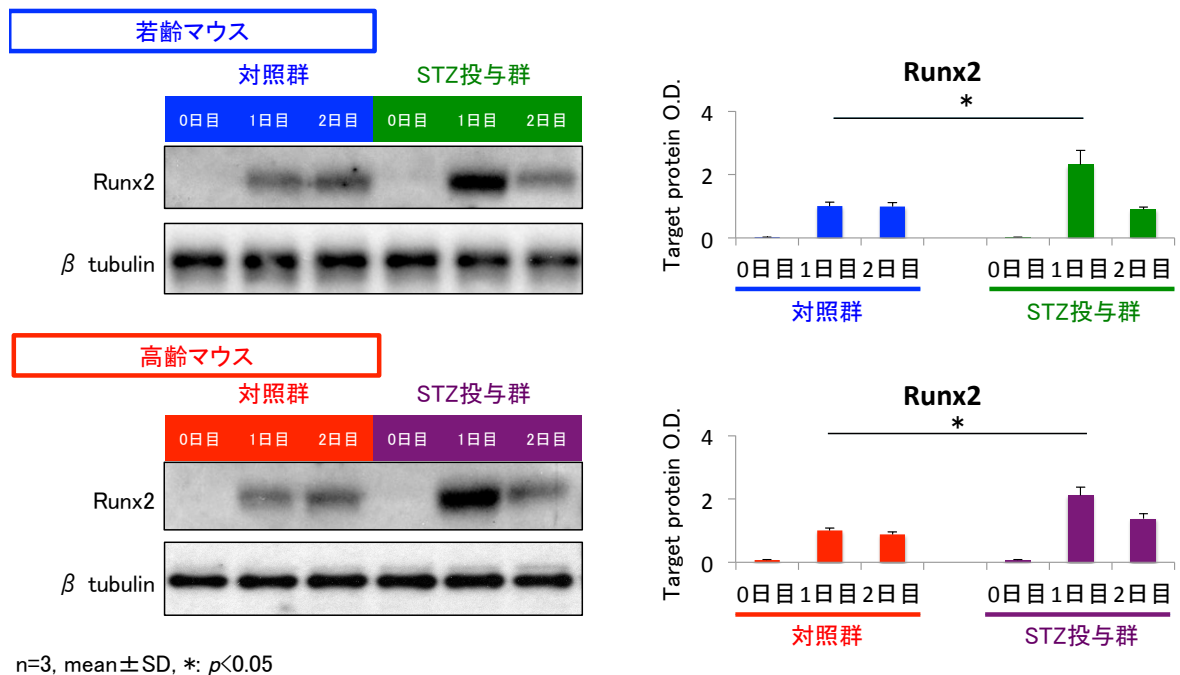


図 26 高リン刺激による糖尿病マウス摘出大動脈の Runx2 発現変化

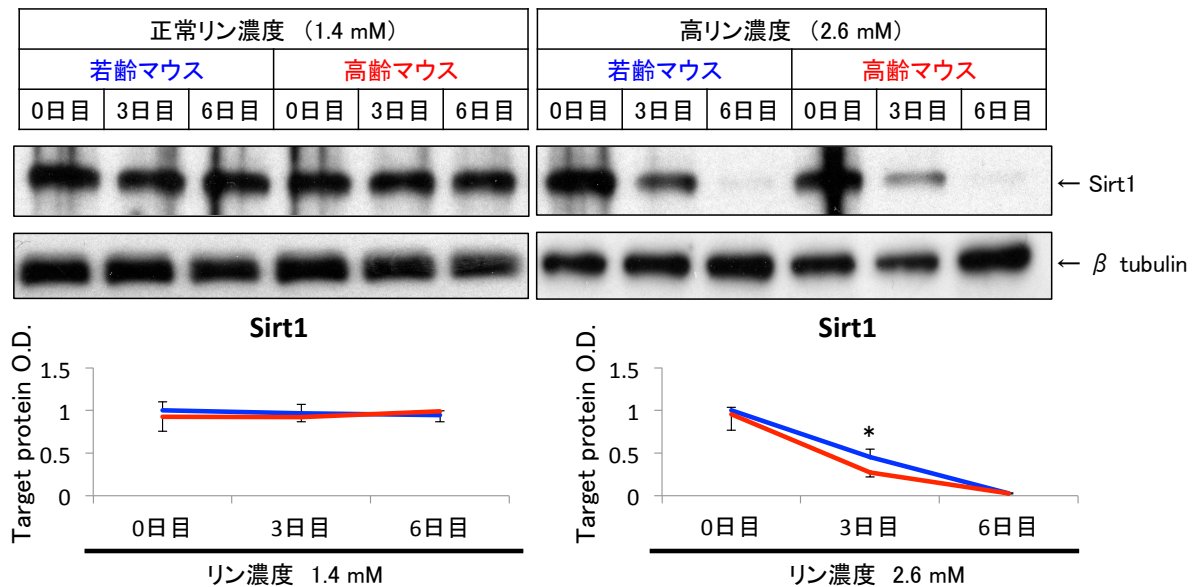
高リン刺激 0 日目、1 日目、2 日目と、早期における、若齢マウス、高齢マウス、それぞれの群の Runx2 の発現を観察した。若齢マウス、高齢マウス共に、高リン刺激後 1 日目の時点で、対照群と比較して STZ 腹腔内投与にて糖尿病を発症した群の摘出大動脈における Runx2 の有意な発現上昇を認めた。

(ANOVA, n=3, mean±SD, *: p<0.05)

< 遺伝子改変マウス、Sirt1^{+/-}マウスへの応用 >

これまでの結果より、加齢は血管石灰化を促進させるということが示唆された。Takemura らは、長寿遺伝子として知られる Sirt1 に関して、培養系ヒト平滑筋細胞を高リン刺激にて石灰化させると Sirt1 の発現が有意に低下、また、継代を繰り返して細胞老化を誘導することで Sirt1 が低下すると報告している⁽²⁴⁾。

本実験モデルにて高リン刺激による Sirt1 の発現変化を検討したところ、本研究にて用いた若齢マウスと高齢マウスの週齢差では、Sirt1 の発現量に有意な差は認められなかったが、高リン刺激を与えることにより、若齢マウスと比較して高齢マウスでは早期に Sirt1 の発現が低下することが認められた(図 27)。



若齢マウス: C57BL/6j オス 12-18週齢
 高齢マウス: C57BL/6j オス 40-52週齢
 n=3, mean±SD, *, $p<0.05$

図 27 高リン刺激による摘出大動脈 Sirt1 発現への影響

若齢マウスと高齢マウスの摘出大動脈には Sirt1 発現に差を認めず、正常リン濃度での培養経過においても変化を認めなかった。高リン刺激により摘出大動脈の Sirt1 発現は低下し、刺激後 3 日目の時点では、若齢マウスと比較し、高齢マウスの摘出大動脈では有意な Sirt1 の発現低下を認めた。

(ANOVA, n=3, mean±SD, * : $p<0.05$)

更に、若齢マウスにおいて、Sirt1 活性阻害剤である Sirtinol にて前処理後の石灰化を、高リン刺激後 3 日目の時点で評価したところ、Sirtinol によって有意に石灰化が亢進することが認められた(図 28)。

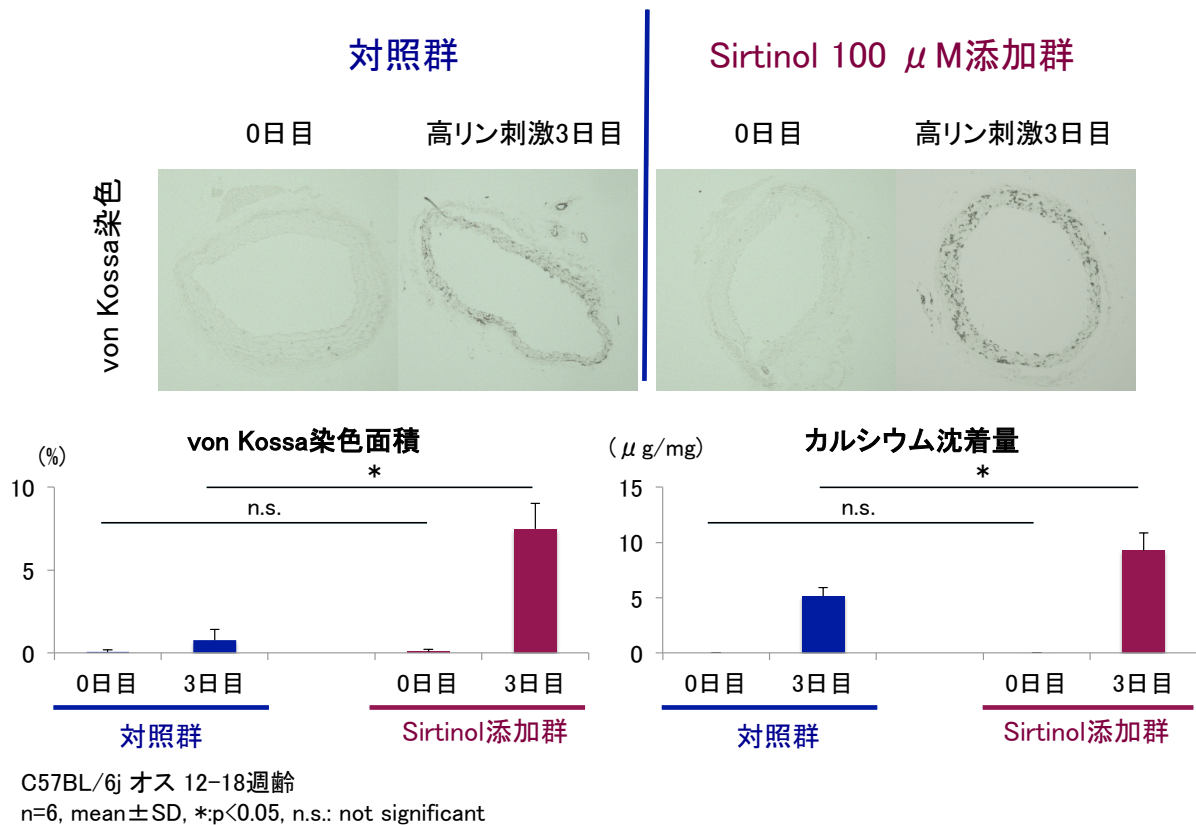


図 28 Sirt1 活性阻害による若齢マウス摘出大動脈石灰化への影響

対照群と比較して、Sirtinol 前処理によって Sirt1 活性を阻害した群では、高リン刺激後 3 日目の時点で、von Kossa 染色面積、カルシウム沈着量共に有意な亢進を認めた。

(ANOVA, n=6, mean±SD, *: p<0.05, n.s.: not significant)

次に Sirt1^{+/-}マウスを用いて Sirt1 の血管石灰化への影響について検討した。Sirt1^{+/-}マウスは胎生期に心奇形を生じ、胎性致死あるいは生後間もなく絶命してしまうため、Sirt1^{+/-}マウスを用いた。大動脈切片における Sirt1 の発現は、Sirt1^{+/-}マウスにて有意に低下を認めた (図 29)。

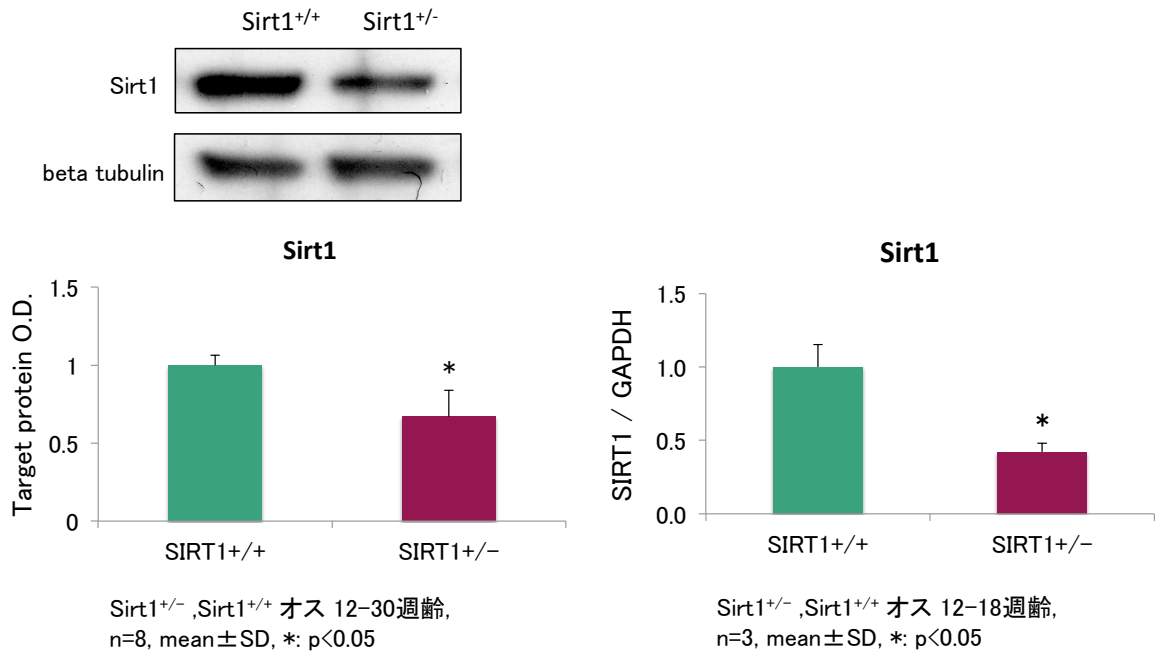


図 29 Sirt1^{+/-}および Sirt1^{+/+}マウス大動脈切片における Sirt1 発現量

Sirt1^{+/+}マウスと比較して、Sirt1^{+/-}マウス大動脈切片では、Sirt1 の有意な発現量低下を認めた。

(ANOVA, mean±SD, * : p<0.05)

Sirt1^{+/-}マウスを用いて、高リン刺激後 3 日目を評価点として Sirt1^{+/+}群との石灰化を比較したところ、Sirt1^{+/-}群において von Kossa 染色面積、カルシウム沈着量共に有意な亢進を認めた(図 30)。

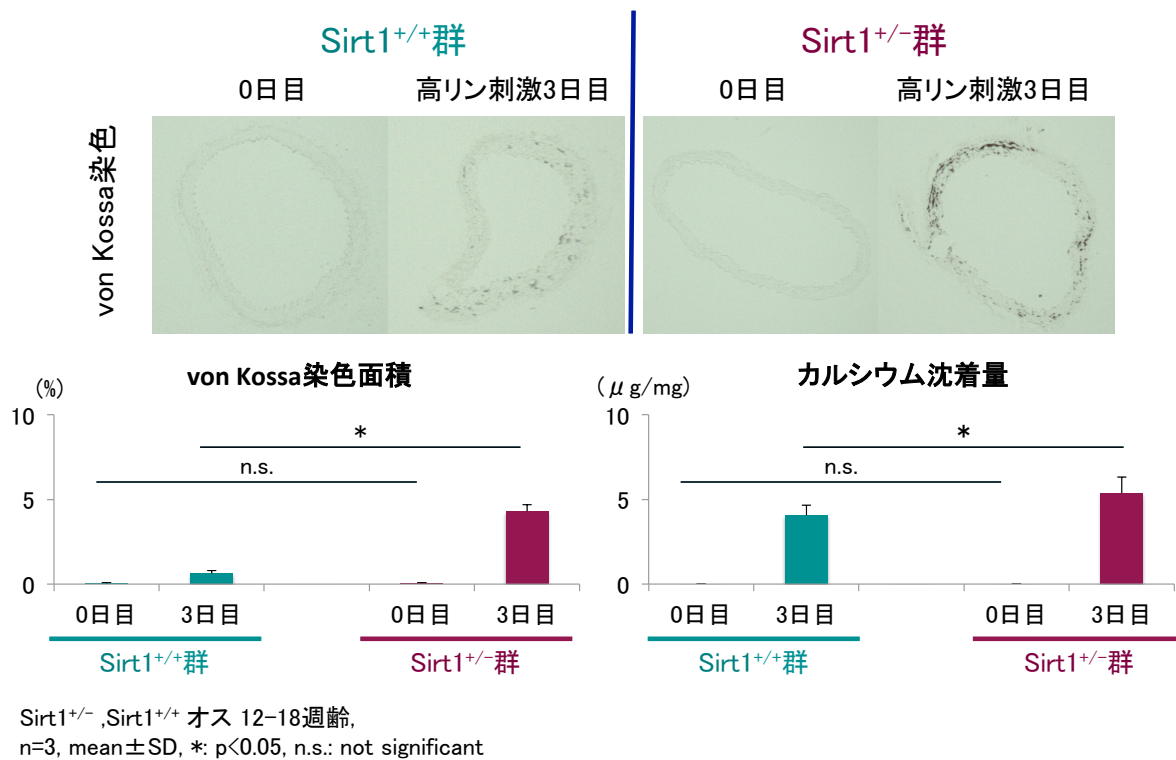


図 30 高リン刺激による *Sirt1*^{+/-}マウス摘出大動脈の石灰化

Sirt1^{+/+}マウス摘出大動脈と比較して、*Sirt1*^{+/-}マウス摘出大動脈では、高リン刺激後 3 日目の時点で、von Kossa 染色面積、カルシウム沈着量共に有意な亢進を認めた。

(ANOVA, n=3, mean±SD, *: $p < 0.05$, n.s.: not significant)

また、高リン刺激 0 日目、1 日目、2 日目と、早期における、*Sirt1*^{+/+}マウスと *Sirt1*^{+/-}マウスから摘出した大動脈における Runx2 の発現を観察したところ、高リン刺激後 1 日目の時点で *Sirt1*^{+/-}群における Runx2 の有意な発現上昇が認められた(図 31)。

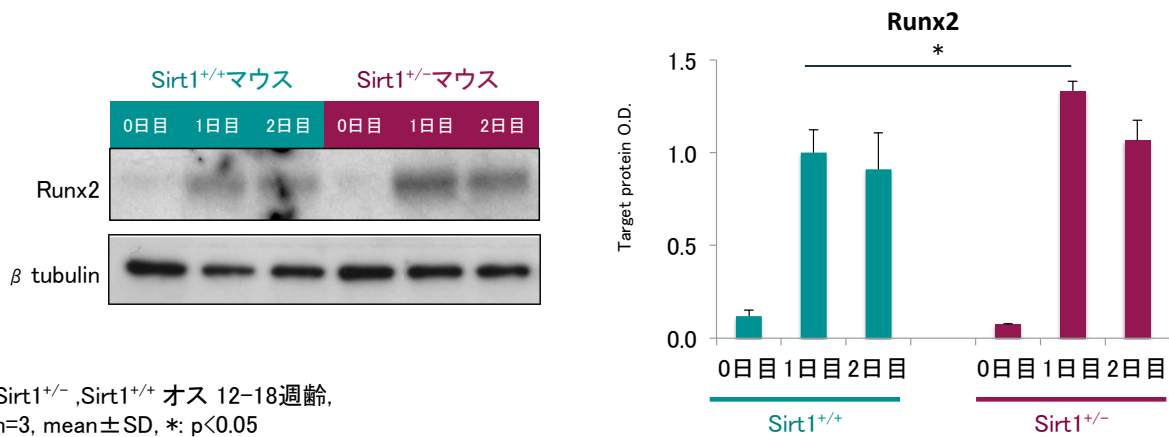


図 31 高リン刺激による Sirt1^{+/-}マウスにおける Runx2 発現変化

高リン刺激 0 日目、1 日目、2 日目の Sirt1^{+/+}マウスと Sirt1^{+/-}マウスから抽出した大動脈における Runx2 の発現変化を観察したところ、高リン刺激後 1 日目の時点で Sirt1^{+/-}マウス抽出大動脈における Runx2 の有意な発現上昇を認めた。

(ANOVA, n=3, mean±SD, *: p<0.05)。

6 考察

本研究にて細胞実験と動物実験それぞれの特徴を補強する新たな実験モデルを創案した。実験動物が成長していく過程で、培養細胞のように短期間で表現型が変化することは無く、生体臓器としての血管をそのまま用いることで、その臓器としての変化を観察することができるという細胞実験には無い利点がある。また、培養液という調整された環境に単一因子を刺激として加えることや、遺伝子改変マウスを用いることで、その刺激因子や標的遺伝子の作用を検討することが可能であり、個体背景も年齢差や性差に留まらず、生育環境、遺伝子的にも背景が統一された群間での経時的な変化を観察できるという細胞実験には無い利点がある。

本実験モデルにおいて、血管平滑筋層の石灰化に対して、血管内皮細胞はほとんど影響しないという結果が得られた(図 10)。その理由として、血管内皮傷害は主にアテローム型動脈硬化の誘因となり、メンケベルグ型血管石灰化には大きく関与しないことや、アテローム型動脈硬化の形成過程に重要なマクロファージなどが、本実験モデルの培養環境下には存在しないことが原因と考えられる⁽⁴³⁾。また、大動脈内腔を擦過し、血管内皮細胞を除去する手技は shear stress による局所の炎症を惹起し、NF- κ B の活性化など炎症性サイトカインが動員され血管石灰化を促進させることが想定され⁽⁴⁴⁾、血管内皮細胞を除去するという手技が血管内皮細胞を介した石灰化促進に影響すると考えられた。

PFA は PiT1 阻害によってリンの流入を抑制することで血管石灰化を抑制する。図 13 に示すように、PFA の処理により高リン刺激による摘出大動脈の石灰化が抑制された。つまり、本実験モデルはリンの流入による能動的石灰化を再現したものであり、培養液中のカルシウムが受動的に沈着した結果ではないと考えられた。また、大動脈切片における PiT1 の発現量は週齢によって有意な差は認めなかった。

高リン刺激による摘出大動脈の石灰化を経時的に観察したところ、若齢マウスでは3日目に von Kossa 染色にて石灰化が確認された。また、高齢マウスでは当初より生理的な石灰化を認め、2日目には石灰化面積の亢進が確認された(図 17, 18)。このことから、遺伝子背景や生育環境が統一されたマウスにおいて、加齢が生理的な石灰化の誘因となっている可能性が考えられた。また、若齢マウスと高齢マウスを比較した結果、高リン刺激初期に高齢マウスにおいて石灰化が亢進することが確認され(図 18)、臨床的には知られている、加齢が血管石灰化の危険因子であることを本実験モデルにて再現した。

今回は、血管石灰化の重要因子のひとつである Runx2 の発現に注目した。若齢マウス高齢マウスともに、高リン刺激後からその発現上昇を認め(図 19)、それぞれ von Kossa 染色にて確認できる程度の石灰化が現れる時点より早期にその発現ピークを認めた。また、以降も石灰化は亢進するのに対し、Runx2 の発現は低下することが確認された。このことは、Runx2 が石灰化あるいは骨芽細胞の指標というよりも、骨芽細胞様形質転換のイニシエーターとしての役割を担っているものと考えられる⁽²²⁾。

h-Caldesmonは血管平滑筋特異的に発現し、分化型血管平滑筋細胞のマーカーとして頻用され、未分化から分化型への形質転換、あるいは脱分化に伴いその発現は変化する⁽⁴⁵⁾。アテローム型動脈硬化巣の形成には血管平滑筋の脱分化による増殖能の再獲得が関与していると考えられているが⁽⁴⁶⁾、本実験モデルでは明らかな内膜肥厚は認めなかった。本研究の結果では、Runx2の発現上昇と血管石灰化形成に遅れてh-Caldesmonの発現は経時的に低下し、骨化マーカーであるALPは経時的に上昇していることから(図20)、血管平滑筋細胞がRunx2により骨芽細胞様形質転換をすることで、血管平滑筋細胞としての特性を失い、石灰化が進行していくという経過が考えられた。

病態モデルマウスへの適用を検討するために、STZ腹腔内投与による糖尿病モデルマウ

スを用いた。糖尿病患者は臨床的に大動脈といった大血管では動脈硬化が亢進することが知られているが、内胸動脈といった中小動脈においては血管石灰化が亢進することが報告されている⁽⁴⁷⁾。よって、本実験モデルにて糖尿病による血管石灰化の亢進が再現できるかを、糖尿病モデルマウスを用いて検討した結果、糖尿病モデルマウスの摘出大動脈が石灰化しやすいことが示された(図24, 25)。

Glucoseは血管内皮細胞においてRunx2を活性化させ、血管内皮細胞増殖、血管新生を促進させることで動脈硬化を惹起させることが報告されている^(48, 49)。しかし、培養系ヒト平滑筋細胞(図5)および、本実験モデルにおける正常リン濃度の対照群では、培養液中のGlucose (450 mg/dL)では石灰化が惹起されなかった。また、STZ腹腔内投与にて血糖上昇後、1週間という期間高血糖に曝露されただけでは摘出大動脈に明らかな石灰化の亢進は認めなかった(図24, 25)。しかし、高リン刺激によって糖尿病マウスの摘出大動脈は石灰化が亢進することから、いわゆるLegacy effect⁽⁵⁰⁾との関連が示唆された。

また、若齢糖尿病マウスと比較し、高齢糖尿病マウスでは石灰化が亢進することから、加齢と糖尿病の二重の危険因子が想定され、高齢者診療における病態管理の重要性が示唆された。しかし、今研究においては、高リン刺激を加えた若齢糖尿病マウスと高齢糖尿病マウスの摘出大動脈に、明らかなRunx2発現の差が認められず、結果として生じている石灰化の違いの原因については不明であり、今後より詳細な検討を必要とする。

次に、遺伝子改変マウスにおいても本実験モデルが適用できるかを検討するにあたり、長寿遺伝子として知られるSirt1に注目し、Sirt1ヘテロノックアウトマウスを用いた。

当科の先行研究にて、Takemuraらは、培養系ヒト平滑筋細胞において、継代を繰り返して細胞老化を誘導するとSirt1の発現が低下し、高リン刺激によって石灰化を誘導すると、時

間依存的に Sirt1 発現量は低下し、Sirt1 を siRNA にてノックダウンすると Runx2 の発現が上昇すると報告した⁽²⁴⁾。

ヒストン脱アセチル化酵素である Sirt1 は Runx2 のアセチル化にも関与していることが報告されており、培養系ヒト平滑筋細胞にて、Resveratrol による Sirt1 の化学的活性化によって Runx2 のアセチル化は抑制され、Sirt1 をノックダウンすると Runx2 のアセチル化は亢進する⁽⁵¹⁾。本研究にて用いた高齢マウスの大動脈には有意な Sirt1 発現の低下は認められなかったが、高リン刺激によってその発現低下に有意な差を認めた(図 27)。また、Resveratrol にて Sirt1 を活性化させると血管老化は抑制され⁽⁵²⁾、抗炎症作用を示す⁽⁵³⁾ことから Sirt1 は血管保護機能を有していることが報告されており、Sirtinol による Sirt1 の化学的阻害、Sirt1^{+/+}マウスにて有意な石灰化亢進が認められることから(図 28, 30)、血管の老化には Sirt1 の発現量だけではなく、その活性化も大きく関わっており、その結果 Runx2 の活性も変化する可能性が考えられた。

Sirt1 はストレス依存性に応答する遺伝子である。加齢を長期にわたる慢性的なストレスとするならば、そのストレス蓄積によってその発現は低下し、高リン刺激や高血糖など、急性かつ強力なストレス曝露初期には、その活性低下を以て応答し、その後のストレス蓄積によって発現が低下する可能性が考えられた⁽⁴⁶⁾。その結果、今研究における週齢差や STZ 投与による Runx2 の発現に差が生じた可能性が考えられた。

つまり、Sirt1 は血管石灰化に対する保護作用を有しており、その活性低下により血管石灰化は亢進し、さらにはその発現低下によって石灰化は加速するという可能性が考えられた。今後の課題として、さらなる加齢や高リン刺激、高血糖による Sirt1 活性の変化を検討する必要があると考えられた。

以上より本実験モデルが、細胞実験で解明されてきた分子機序や動物実験で観察されてきた病態病理学的所見を再現できる可能性が示された。しかしながら、今研究を通じて、本実験モデルの課題も認められた。

今回使用したマウスは、野生型として実験対照群に頻用される C57BL/6j マウスである。今研究にて高齢群として使用した 40～52 週という、ヒトに換算すると壮年期から高齢期にあたるマウス大動脈には、生理的な石灰化が生じている個体が大半であったが、なかには石灰化が生じていない個体も存在し、遺伝子的な背景や生育環境が統一されていても成長過程における個体差が存在する可能性があった。また、石灰化の評価指標としての von Kossa 染色面積は、血管断面積に対する割合で評価するため、0%～100%の限定された範囲での数値評価である。つまり、統計解析上の限界のため、von Kossa 染色が鏡頭上確認される時点から、断面積あたりの石灰化が飽和する時点までの限定された期間での評価となっている。それを補うため、今回は細胞実験における石灰化評価法であるカルシウム沈着量測定も行なった。しかし、石灰化誘導初期においてカルシウム沈着量の増大が認められるものの、von Kossa 染色では染色面積の亢進が認められないことから、血管石灰化の検出法としては von Kossa 染色の感度が弱いという限界も認められた。

また、病理学的には、ヒトにおける血管中膜平滑筋層の石灰化は、血管内膜と中膜平滑筋層の境界に存在する内弾性板直下から生じるとされている⁽⁵⁴⁾。しかし、マウス大動脈には血管内膜としては薄い一層の内皮細胞層しか存在せず、その内膜と外膜の間を平滑筋層が占めており、内弾性板という構造が無い。本実験モデルにおいて、どこから石灰化が生じるかについては、培養液と接する部位である血管内縁または外縁から生じる傾向が観察されたが、細胞内における局在というミクロの観点からは観察できなかった。

血管平滑筋細胞の石灰化については、その起源として、アポトーシス小体や断片化されたエラスチンを核とする nucleation も考えられている⁽³²⁾。当科における先行研究にて、培養系ヒト平滑筋細胞に高リン刺激を加えることでアポトーシスが誘導されることを報告しており⁽⁵⁵⁾、本実験モデルにても石灰化初期に、アポトーシスを誘導する Cleaved-Caspase-3 の発現が上昇することを認めている。また、Bcl-2/Bax は Runx2 を介してアポトーシスを誘導するという報告もあり⁽⁵⁶⁾、単に Runx2 による血管平滑筋細胞の骨芽細胞様形質転換という機序だけではなく、本実験モデルは血管石灰化という現象を全般的に検討できる可能性があると考えられた。

若齢マウスの摘出大動脈において、von Kossa 染色で確認できる石灰化は高リン刺激後 3 日目より確認された。これは高リン血症という病態を考えた時に、血管に石灰化が生じるまでの期間としてはとても短い。その原因として、前述のように血管外縁からも石灰化が現れることから、生体内では存在しない血管外膜からの刺激流入が影響している可能性が考えられる。実験動物に動脈硬化を生じさせる実験系として、カフ留置による血管傷害モデルがあるが⁽⁵⁷⁾、これも数日間のカフ留置にて分子生物学的にも動脈硬化の表現型を示すことが知られている。このように本実験モデルの時間経過については、いわゆる病態における経過を再現していないとも考えられる。

以上より、本研究において、細胞実験と動物実験それぞれの特徴を補強する新たな実験モデルを確立し、高リン刺激を加えることでマウス摘出大動脈にメンケベルグ型血管石灰化を再現した。さらには、Runx2、h-Caldesmon といった血管石灰化における分子指標も病態を反映するような形で変化を認めたことから、本実験モデルによる分子生物学的な探求の可能性が示唆された。また、本実験モデルが病態モデルマウスや遺伝子改変マウスにも応用

できることが示唆されたことにより、本実験モデルが血管石灰化に関する研究の発展に寄与するものと考えられた。

また、本実験モデルを用いることで、年齢差だけではなく、性別による石灰化への影響をも検討できると期待される。さらに、石灰化の評価だけではなく、血管機能維持、血管老化という観点から、弾性評価など血管機能研究への発展も期待でき、今後の課題としたい。

7 結論

本研究にて、細胞実験と動物実験それぞれの特徴を補強する、血管石灰化形成の新たな実験モデルの可能性を示した。

マウスから摘出した大動脈に高リン刺激を加えることで石灰化が誘導され、その過程において血管平滑筋細胞の骨芽細胞様形質転換が生じている事を示した。

本実験モデルが、病態モデルマウスや遺伝子改変マウスにも応用できる可能性を示し、本実験モデルが、血管石灰化形成の研究の発展に寄与すると考えられた。

8 謝辞

東京大学大学院医学系研究科加齢医学講座

秋下 雅弘

小川 純人

小島 太郎

大田 秀隆

野村 和至

石井 伸弥

竹村 彩

本多 正幸

柴崎 孝二

矢可部 満隆

田宮 寛之

七尾 道子

石田 友紀

石川 里紗

斉藤 久美子

国家公務員共済組合連合会虎の門病院院長 大内 尉義 先生

東京大学高齢社会総合研究機構准教授 飯島 勝矢 先生

東京大学大学院医学系研究科循環器内科学講座 孫 輔卿 先生

旧東京大学大学院医学系研究科漢方生体防御機能学講座 喻 静 先生

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター研究所

老年病態研究チーム運動器医学研究部長 重本 和宏 先生

9 引用文献

1. Rennenberg RJMW, Kessels AGH, Schurgers LJ, van Engelshoven JMA, de Leeuw PW, Kroon AA. "Vascular calcifications as a marker of increased cardiovascular risk: a meta-analysis." *Vasc Health Risk Manag* 5: 185-197, 2009.
2. 総務省統計局
3. Leopold JA. "Vascular calcification: an age-old problem of old age." *Circulation* 127: 2380-2382, 2013.
4. Patrianakos AP, Karakitsos DN, de Groot E, Parthenakis FI, Daphnis EK, Vardas PE. "Alteration of proximal aorta biophysical properties in patients with end stage renal disease." *Heart* 92: 228-232, 2006.
5. Iribarren C, Sidney S, Sternfeld B, Browner WS. "Calcification of the aortic arch: risk factors and association with coronary heart disease, stroke, and peripheral vascular disease." *JAMA* 283: 2810-2815, 2000.
6. Chen NX, Moe SM. "Vascular calcification: pathophysiology and risk factors." *Curr Hypertens Rep* 14: 228-237, 2012.
7. Ehara S, Kobayashi Y, Yoshiyama M, Shimada K, Shimada Y, Fukuda D, Nakamura Y, Yamashita H, Yamagishi H, Takeuchi K, Naruko T, Haze K, Becker AE, Yoshikawa J, Ueda M. "Spotty calcification typifies the culprit plaque in patients with acute myocardial infarction: an intravascular ultrasound study." *Circulation* 110: 3424-3429, 2004.
8. Shanahan CM. "Mechanisms of vascular calcification in CKD-evidence for premature ageing?" *Nat Rev Nephrol* 9: 661-670, 2011.
9. Dart AM, Lacombe F, Yeoh JK, Cameron JD, Jennings GL, Laufer E, Esmore DS. "Aortic distensibility in patients with isolated hypercholesterolaemia, coronary artery disease, or cardiac transplant." *Lancet* 338: 270-273, 1991.

10. Orimo H, Ouchi Y. "The role of calcium and magnesium in the development of atherosclerosis. Experimental and clinical evidence." *Ann N Y Acad Sci* 598: 444-457, 1991.
11. Hayashi K, Saga H, Chimori Y, Kimura K, Yamanaka Y, Sobue K. "Differentiated phenotype of smooth muscle cells depends on signaling pathways through insulin-like growth factors and phosphatidylinositol 3-kinase." *J Biol Chem* 273: 28860-28867, 1998.
12. Hofbauer LC, Brueck CC, Shanahan CM, Schoppet M, Dobnig H. "Vascular calcification and osteoporosis--from clinical observation towards molecular understanding." *Osteoporos Int* 18: 251-259, 2007.
13. Boström K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. "Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions." *J Clin Invest* 91: 1800-1809, 1993.
14. Haarhaus M, Arnqvist HJ, Magnusson P. "Calcifying human aortic smooth muscle cells express different bone alkaline phosphatase isoforms, including the novel B1x isoform." *J Vasc Res* 50: 167-174, 2013.
15. Panizo S, Cardus A, Encinas M, Parisi E, Valcheva P, López-Ongil S, Coll B, Fernandez E, Valdivielso JM. "RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway." *Circ Res* 104: 1041-1048, 2009.
16. Liaw L, Skinner MP, Raines EW, Ross R, Cheresch DA, Schwartz SM, Giachelli CM. "The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins. Role of alpha v beta 3 in smooth muscle cell migration to osteopontin in vitro." *J Clin Invest* 95: 713-724, 1995.

17. Shimizu T, tanaka T, Iso T, Doi H, Sato H, Kawai-Kowase K, Arai M, Kurabayashi M.
"Notch signaling induces osteogenic differentiation and mineralization of vascular smooth muscle cells: role of Msx2 gene induction via Notch-RBP-Jk signaling."
Arterioscler Thromb Vasc Biol 29: 1104-1111, 2009.
18. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G.
"Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein." *Nature* 386: 78-81, 1997.
19. Speer MY, McKee MD, Guldberg RE, Liaw L, Yang HY, Tung E, Karsenty G, Giachelli CM. "Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo." *J Exp Med* 196: 1047-1055, 2002.
20. Schäfer C, Heiss A, Schwarz A, Westenfeld R, Ketteler M, Floege J, Müller-Esterl W, Schinke T, Jahnke-Dechent W. "The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification." *J Clin Invest* 112: 357-366, 2003.
21. Byon CH, Sun Y, Chen J, Yuan K, Mao X, Heath JM, Anderson PG, Tintut Y, Demer LL, Wang D, Chen Y. "Runx2-upregulated receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in calcifying smooth muscle cells promotes migration and osteoclastic differentiation of macrophages." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 1387-1396, 2011.
22. Sun Y, Byon CH, Yuan K, Chen J, Mao X, Heath JM, Javed A, Zhang K, Anderson PG, Chen Y. "Smooth muscle cell-specific runx2 deficiency inhibits vascular calcification." *Circ Res* 111: 543-552, 2012.

23. Kohzuki M, Kamimoto M, Wu XM, Xu HL, Kawamura T, Mori N, Nagasaka M, Kurosawa H, Minami N, Kanazawa M, Saito T, Yoshida K. "Renal protective effects of chronic exercise and antihypertensive therapy in hypertensive rats with chronic renal failure." *J Hypertens* 19: 1877-1882, 2001.
24. Takemura A, Iijima K, Ota H, Son BK, Ito Y, Ogawa S, Eto M, Akishita M, Ouchi Y. "Sirtuin 1 retards hyperphosphatemia-induced calcification of vascular smooth muscle cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 2054-2062, 2011.
25. Kubin T, Vogen S, Wetzell J, Hein S, Pipp F, Herold J, Heil M, Kampmann A, Hehlhans S, von der Ahe D, Schaper W, Zimmermann R. "Porcine aortic endothelial cells show little effects on smooth muscle cells but are potent stimulators of cardiomyocyte growth." *Mol Cell Biochem* 242: 39-45, 2003.
26. Shioi A, Nishizawa Y, Jono S, Koyama H, Hosoi M, Morii H. "βglycerophosphate accelerates calcification in cultured bovine vascular smooth muscle cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:2003–2009, 1995
27. Beazley KE., Deasey S., Nurminskaya FL and MV. "Transglutaminase 2-mediated activation of beta-catenin signaling has a critical role in warfarin-induced vascular calcification." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32: 123-130, 2012.
28. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H, Giachelli CM. "Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification." *Circ Res* 87: E10-17, 2000.
29. Huang MS, Sage AP, Lu J, Demer LL, Tintut Y. "Phosphate and pyrophosphate mediate PKA-induced vascular cell calcification." *Biochem Biophys Res Commun* 374: 553-558, 2008.

30. Lau WL, Festing MH, Giachelli CM. "Phosphate and vascular calcification: Emerging role of the sodium-dependent phosphate co-transporter PiT-1." *Thromb Haemost* 104: 464-470, 2010.
31. Villa-Bellosta R, Levi M, Sorribas V. "Vascular smooth muscle cell calcification and SLC20 inorganic phosphate transporters: effects of PDGF, TNF-alpha, and Pi." *Pflugers Arch* 458: 1151-1161, 2009.
32. Sage AP, Lu J, Tintut Y, Demer LL. "Hyperphosphatemia-induced nanocrystals upregulate the expression of bone morphogenetic protein-2 and osteopontin genes in mouse smooth muscle cells in vitro." *Kidney Int* 79: 414-422, 2010.
33. Kunjathoor VV, Wilson DL, LeBoeuf RC. "Increased atherosclerosis in streptozotocin-induced diabetic mice." *J Clin Invest* 97: 1767-1773, 1996.
34. Yoshida T., Yamashita M., Horimai C., Hayashi M., "High glucose concentration does not modulate the formation of arterial medial calcification in experimental uremic rats." *J Vasc Res* 50: 512-520, 2013.
35. Blander G., Guarente L., "The Sir2 family of protein deacetylases." *Annu Rev Biochem* 73: 417-435, 2004.
36. Cheng HL, Mostoslavsky R, Saito S, Manis JP, Gu Y, Patel P, Bronson R, Appella E, Alt FW, Chua KF. "Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10794-10799, 2003.
37. Cohen-Kfir E, Artsi H, Levin A, Abramowitz E, Bajayo A, Gurt I, Zhong L, D'Urso A, Toiber D, Mostoslavsky R, Dresner-Pollak R. "Sirt1 is a regulator of bone mass and a repressor of Sost encoding for sclerostin, a bone formation inhibitor." *Endocrinology* 152: 4514-4524, 2011.

38. Cohen DE., Supinski AM., Bonkowski MS., "Neuronal SIRT1 regulates endocrine and behavioral responses to calorie restriction." *Genes Dev* 23: 2812-2817, 2009.
39. Gorenne I., Kumar S., Gray K., Figg N., Yu H., Mercer J., Bennett M., "Vascular smooth muscle cell sirtuin 1 protects against DNA damage and inhibits atherosclerosis." *Circulation* 127: 386-396, 2013.
40. Valente S, Panarese N, Buzzi M, Alberghini M, Stella A, Pasquinelli G. "The emerging issue of human resident arterial progenitors: the contribution of organ culture." *Ultrastruct Pathol* 36: 117-123, 2012.
41. Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ. "Image Processing with ImageJ". *Biophotonics International* 11: 36-42, 2004.
42. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis." *Nat Methods* 9: 671-675, 2012.
43. Miyoshi T, Tian J, Matsumoto AH, Shi W. "Differential response of vascular smooth muscle cells to oxidized LDL in mouse strains with different atherosclerosis susceptibility." *Atherosclerosis* 189: 99-105, 2006.
44. Shao JS, Cai J, Towler DA. "Molecular mechanisms of vascular calcification: lessons learned from the aorta." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1423-1430, 2006.
45. Ueki N, Sobue K, Kanda K, Hada T, Higashino K. "Expression of high and low molecular weight caldesmons during phenotypic modulation of smooth muscle cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 9049-9053, 1987.
46. Smolock EM, Trappanese DM, Chang S, Wang T, Titchenell P, Moreland RS. "siRNA-mediated knockdown of h-caldesmon in vascular smooth muscle." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H1930-1939, 2009.

47. Sakata N., Takeuchi K., Noda K., Saku K., Tachikawa Y., Tashiro T., Nagai R., Horiuchi S., "Calcification of the medial layer of the internal thoracic artery in diabetic patients: relevance of glycooxidation." *J Vasc Res* 40: 567-74, 2003.
48. Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeyer HK, Arita Y, Hansen BC, Matsuzawa Y. "Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys." *Diabetes* 50: 1126-1133, 2001.
49. Pierce AD, Anglin IE, Vitolo MI, Mochin MT, Underwood KF, Goldblum SE, Kommineni S, Passaniti A. "Glucose-activated RUNX2 phosphorylation promotes endothelial cell proliferation and an angiogenic phenotype." *J Cell Biochem* 113: 282-292, 2012.
50. Chalmers J, Cooper ME. "UKPDS and the legacy effect." *N Engl J Med* 359: 1618-20, 2008.
51. Shakibaei M, Shayan P, Busch F, Aldinger C, Buhrmann C, Leuders C, Mobasheri A. "Resveratrol mediated modulation of Sirt-1/Runx2 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: potential role of Runx2 deacetylation." *PLoS One* 7: e35712, 2012.
52. Tang Y, Xu J, Qu W, Peng X, Xin P, Yang X, Ying C, Sun X, Hao L. "Resveratrol reduces vascular cell senescence through attenuation of oxidative stress by SIRT1/NADPH oxidase-dependent mechanisms." *J Nutr Biochem* 23: 1410-1416, 2012.
53. Csiszar A, Sosnowska D, Wang M, Lakatta EG, Sonntag WE, Ungvari Z. "Age-associated proinflammatory secretory phenotype in vascular smooth muscle cells from the non-human primate *Macaca mulatta*: reversal by resveratrol treatment." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 67: 811-820., 2012.

54. Blumenthal HT, Lansing AI, Wheeler PA. "Calcification of the Media of the Human Aorta and Its Relation to Intimal Arteriosclerosis, Ageing and Disease." *Am J Pathol* 20: 665-687, 1944.
55. Son BK, Kozaki K, Iijima K, Eto M, Kojima T, Ota H, Senda Y, Maemura K, Nakano T, Akishita M, Ouchi Y. "Statins protect human aortic smooth muscle cells from inorganic phosphate-induced calcification by restoring Gas6-Axl survival pathway." *Circ Res* 98: 1024-1031, 2006.
56. Eliseev RA, Dong Y-F, Sampson E, Zuscik MJ, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Rosier RN, Drissi MH. "Runx2-mediated activation of the Bax gene increases osteosarcoma cell sensitivity to apoptosis." *Oncogene* 27: 3605-3614, 2008.
57. Lardenoye JHP, Delsing DJM, de Vries MR, Deckers MM, Princen HMG, Havekes LM, van Hinsbergh VWM, van Bockel JH, Quax PHA. "Accelerated atherosclerosis by placement of a perivascular cuff and a cholesterol-rich diet in ApoE*3Leiden transgenic mice." *Circ Res* 87: 248-253, 2000.