

論文題目 血管石灰化形成の新たな実験モデルの構築

氏名 秋好 沢諭

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。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、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。

現在、血管石灰化に関する研究は、細胞実験による分子生物学的な探求と、動物実験による病態病理学的な石灰化像の観察とで二分されている。

細胞実験では、培養系ヒト血管平滑筋細胞に様々な刺激因子を与えることで石灰化を誘導する実験系が報告されている。その一例として、通常培養液(DMEM、リン濃度 1.4 mM)に無機リンを加えた高リン濃度培養液(2.6 mM)にて培養する、いわゆる高リン刺激によって培養細胞にカルシウムが沈着することが報告されている。

動物実験では、ヒト検体や様々な病態モデル動物が血管石灰化の研究に利用されており、その一例として、臨床的にも血管石灰化の危険因子として知られる高リン血症を呈する腎不全モデルラットには、血管平滑筋層の石灰化、いわゆるメンケベルグ型血管石灰化が生じることが知られている。しかし、腎不全によって現れる病態は高リン血症だけではなく、高血圧や脂質異常といった他の血管石灰化危険因子も認められる。

以上のように、培養細胞では、特定因子による作用という石灰化の起点および機序の探求は可能であるものの、臓器としての血管に生じた石灰化像という結果の観察が困難であり、

実験動物あるいはヒト検体を用いた場合は、血管に生じた石灰化像という結果は観察できるものの、その起点、特定因子による分子機序の探求が困難であるという限界が考えられた。

よって、本研究にて、特定の因子を起点とする血管石灰化の分子機序から石灰化像の観察まで、一連の研究が可能となる新たな実験モデルを創案した。

まず、野生型マウスから摘出した 5 mm 長の胸部大動脈切片を、細胞培養プレートにて、リン濃度 1.4 mM の DMEM に無機リンを添加して 2.6 mM に調整した高リン濃度培養液で培養した結果、胸部大動脈切片平滑筋層の石灰化が von Kossa 染色にて同定された。

本実験モデルが高リン刺激による大動脈平滑筋層の石灰化を惹起できたことから、腎不全と同様にメンケベルグ型血管石灰化を特徴の一つとする血管の加齢性変化について、野生型の若齢マウス(12~18 週齢)と高齢マウス(40~52 週齢)の胸部大動脈切片を用い、それぞれ高リン刺激による石灰化を観察した。

若齢マウスと比較して、高齢マウスの胸部大動脈切片は、同一の高リン刺激にて石灰化の程度が亢進していた。以上より、加齢が血管石灰化の危険因子である可能性が示唆された。

また、血管石灰化の過程において、その機序のひとつである血管平滑筋細胞の骨芽細胞様形質転換が、本実験モデルにおける Runx2、h-Caldesmon の発現動態より分子生物学的に認められた。以上より、本実験モデルが、石灰化像の観察だけにとどまらず、血管で生じている血管石灰化の分子機序をも探求できる可能性が示された。

次に、本実験モデルが病態モデルマウスにも適用できるかを検討するため、血管石灰化を呈する臨床病態として、Streptozocin 腹腔内投与による糖尿病モデルマウスを用いた。対照群と比較して、糖尿病を発症したマウスから摘出した胸部大動脈は、高リン刺激を加えると、より石灰化しやすいという Legacy effect が示唆され、本実験モデルが病態モデルマウスにも適用できる可能性が示された。

更に、本実験モデルの遺伝子改変マウスへの適用を検討するために、Sirt1 ヘテロノックアウトマウス(Sirt1<sup>+/-</sup>マウス)を用いた。Sirt1 は老化制御遺伝子として知られており、HASMCを用いた研究にて、Sirt1 が血管石灰化に対する保護作用を有していることが報告されている。

Sirt1<sup>+/+</sup>マウスと比較して、Sirt1<sup>+/-</sup>マウスから摘出した胸部大動脈では高リン刺激による石灰化が亢進し、本実験モデルにおいても Sirt1 の血管石灰化に対する保護作用が認められたことから、本実験モデルが遺伝子改変マウスにも適用できる可能性が示された。

以上より、本研究にて創案した、高リン刺激にて胸部大動脈切片に石灰化を誘導するという新たな実験モデルが、加齢や病態といった血管の背景を反映した石灰化像を観察できるだけでなく、血管石灰化で生じている血管平滑筋細胞の骨芽細胞様形質転換といった分子機序をも再現しており、さらには遺伝子改変マウスにも適用できることから、分子生物学的な研究にも利用できる可能性が示唆され、本研究が今後の血管石灰化研究の発展に寄与すると考えられた。