

血管平滑筋細胞の石灰化に対する 25-ヒドロキシビタミン D₃ の影響

昭和大学医学部内科学講座（腎臓内科学部門）

荒井 典子 溝渕 正英

柴田 孝則 秋澤 忠男

昭和大学横浜市北部病院内科

緒方 浩顕 衣笠えり子

昭和大学藤が丘病院腎臓内科

小岩 文彦

（平成 25 年 12 月 28 日）

昭和学会雑誌第 73 巻第 6 号別刷

原 著

血管平滑筋細胞の石灰化に対する 25-ヒドロキシビタミン D₃ の影響

昭和大学医学部内科学講座 (腎臓内科学部門)

荒井 典子 溝渕 正英

柴田 孝則 秋澤 忠男

昭和大学横浜市北部病院内科

緒方 浩顕 衣笠えり子

昭和大学藤が丘病院腎臓内科

小岩 文彦

要約：慢性腎臓病患者において、心血管病にはミネラル代謝異常や炎症が強く関与している。ビタミンD受容体 (VDR) を活性化する、VDR アクティベーターは抗炎症効果などの多面的作用を有している。また、血中の内因性ビタミンD [25-ヒドロキシビタミン D₃: 25 (OH) D₃] 濃度と心血管系疾患との関連性が示されているが、血管組織内局所におけるビタミンD代謝は検討課題である。われわれは、リン (P) および炎症性サイトカイン刺激によるヒト大動脈血管平滑筋細胞 (VSMC) の石灰化への25(OH)D₃の影響を検討した。高Pおよび腫瘍壊死因子- α (TNF- α) で刺激したVSMCに、25(OH)D₃ ($10^{-6} \sim 10^{-8}$ M) を添加し、VSMCの石灰化、およびビタミンD代謝について検討した。高PおよびTNF- α によりVSMCの石灰化は促進し、25(OH)D₃は石灰化を抑制した。25(OH)D₃によりVDR mRNA 発現の上昇やオステオカルシン mRNA 発現低下が認められた。25(OH)D₃は高Pおよび炎症性サイトカインによるVSMCの石灰化プロセスを抑制した。

キーワード：血管石灰化、血管平滑筋細胞、25(OH)D₃、TNF- α

慢性腎臓病は、血管石灰化の発症・進展を促進する病態である。血管石灰化は動脈硬化の病態の一つであり、心血管病の発症・進展に寄与する。慢性腎臓病において血管石灰化が促進される背景には、高リン (P) 血症やミネラル調節異常、炎症および酸化ストレスなどの石灰化促進因子の上昇と石灰化抑制機構の障害が関与している¹⁾。

血管石灰化のプロセスは、ヒト大動脈血管平滑筋細胞 (VSMC) の骨芽細胞様細胞への形質転換が主として考えられている²⁾。炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子- α (TNF- α) は血管の石灰化を促進する因子であることが示されている³⁾。

ビタミンDは、ミネラル代謝を調節する全身性ホルモンとしての作用のみならず、あらゆる組織に発現しているビタミンD受容体 (VDR) を介し、局所で様々な生理機能を有している⁴⁾。ビタミンD

代謝が障害された慢性腎臓病患者においては、最大死因が心血管病であり、心血管組織にVDRや1 α 水酸化酵素 (CYP27B1) が存在している⁵⁾ことから、慢性腎臓病患者の生命予後とビタミンD代謝異常の間に密接な関連性が示唆されている。また、ビタミンD投与が保存期も含めて慢性腎臓病患者の予後改善と関連することを示した多くの観察研究がある⁶⁾。血中25(OH)D₃濃度を指標とするビタミンDと心血管病の発病、あるいは心血管疾患に起因する死亡率についてのコホート研究では、血中ビタミンD濃度低下は冠動脈石灰化および心血管疾患の有病率と関連することが示された^{7,8)}。

VDRアクティベーター (VDRA) が高Pおよび炎症性サイトカインによる血管石灰化を抑制することが明らかにされているが⁹⁾、25(OH)D₃の血管組織での作用は不明である。このため、今回われわれ

は、25(OH)D₃ の、高 P や炎症性サイトカイン TNF- α により惹起される石灰化や細胞増殖などへの役割について、VSMC の石灰化プロセスとビタミン D 代謝への影響に着目し検討した。

研究方法

細胞培養

ヒト大動脈 VSMC (Lonza, Walkersville, MD) を用い、以前に報告した方法⁹⁾と同様に、10%のウシ胎児血清 (FBS)、ペニシリン、ストレプトマイシンを混注した DMEM 培地で、37°C、5%二酸化炭素濃度下で培養した。その後、VSMC を通常の P 濃度 0.9 mM である DMEM 培地 (NP)、2.5 mM の高 P に TNF- α を 1 ng/ml 加えた培地 (HP + TNF- α)、2.5 mM の高 P に TNF- α (1 ng/ml) と 25(OH)D₃ (10^{-6} ~ 10^{-8} M) を加えた培地 [25D (10^{-8}), 25D (10^{-7}), 25D (10^{-6})] に分けて計 6 日間培養した。各培地は 2 日ごとに交換した。

カルシウム (Ca) 含量定量

石灰化を定量分析するため、細胞を 0.6 N 塩酸を用いて脱灰させ、上澄みの Ca 濃度を、O-CPC 法 (E-Test; Wako, Tokyo, Japan) を用いて測定した。脱灰後の残存 VSMC のタンパク量を定量し (Bio-Rad protein assay; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)、Ca 濃度を、蛋白量で補正し、 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein として示した。

定量リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (定量 RT-PCR)

Cbfa1/Runx2, osteocalcin (OC), VDR, CYP27B1, の遺伝子発現を、RT-PCR によって測定した。VSMC から、TRIzol 試薬 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて、Total RNA を抽出した。1 μg の total RNA から、逆転写酵素 (Superscript II, Invitrogen) を用いて一本鎖 cDNA を生成した。cDNA は Cbfa1/Runx2, OC, VDR, CYP27B1 (Qiagen, Germantown, MD; assay ID for Cbfa1/Runx2: Hs_RUNX2_1_SG, OC: Hs_BGLAP_1_SG, VDR: Hs_VDR_1_SG and CYP27B1: Hs_CYP27B1_3_SG) のヒト特異的プライマーを用いて SYBR Green 法 (SYBR Green Jump Start Taq Ready Mix, Sigma, St. Louis, MO) にて増幅した。また、内在性コントロールとして GAPDH (Qiagen, assay ID: Hs_GAPDH_2_SG) を用いた。PCR の条件は、95°C で 10 分間のプレイン

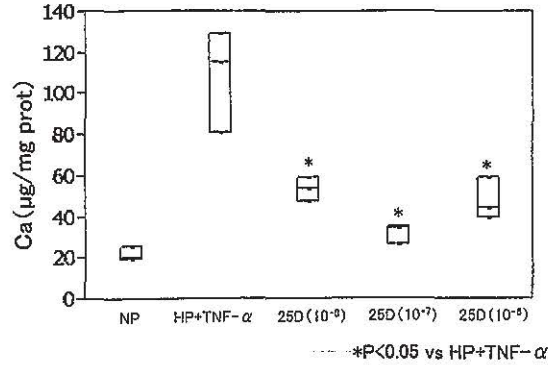


Fig. 1 Effect of high phosphate and TNF- α on VSMC mineralization and suppressive effect of 25(OH)D₃ on VSMC mineralization induced by HP + TNF- α . Total calcium (Ca) was extracted from the cell layers, which was quantified and normalized to VSMC protein content. N = 5 per group. P < 0.001 by analysis of variance. *P < 0.05 versus HP + TNF- α by post hoc Scheffe test.

キュベーションの後、95°C 15 秒間のインキュベーションによる鋳型 DNA の変性、58°C 1 分間のアニーリングを 40 サイクル行った。

統計分析

結果はすべて、平均値 \pm 標準誤差で示した。一元配置分散分析、ポストホックテスト多重比較検定を用いて検定し、P 値 < 0.05 を有意とした。

結果

25(OH)D₃ は、VSMC の HP + TNF- α 刺激による石灰化を抑制した (図 1)。

HP + TNF- α 群 ($108.3 \pm 14.4 \mu\text{g}/\text{mg protein}$) では、NP 群 ($21.6 \pm 2.0 \mu\text{g}/\text{mg protein}$) に比し石灰化が有意に促進された。一方で、25D (10^{-8}), 25D (10^{-7}), 25D (10^{-6}) を加えると、石灰化がいずれの濃度でも HP + TNF- α 群に比し有意に抑制された (10^{-8} M: $53.5 \pm 3.3 \mu\text{g}/\text{mg protein}$, 10^{-7} M: $31.7 \pm 2.7 \mu\text{g}/\text{mg protein}$, 10^{-6} M: $47.6 \pm 6.1 \mu\text{g}/\text{mg protein}$)。ただし、25(OH)D₃ 濃度依存性はみられなかった。

25(OH)D₃ は、石灰化に伴う骨関連因子 mRNA 発現上昇を抑制した (図 2a, b)。

HP + TNF- α 群では、Cbfa1/Runx2 (1.15 ± 0.37), OC (1.28 ± 0.24) などの石灰化に伴う骨関連因子 mRNA の発現が、NP 群 (Cbfa1/Runx2: 0.86 ± 0.04 ,

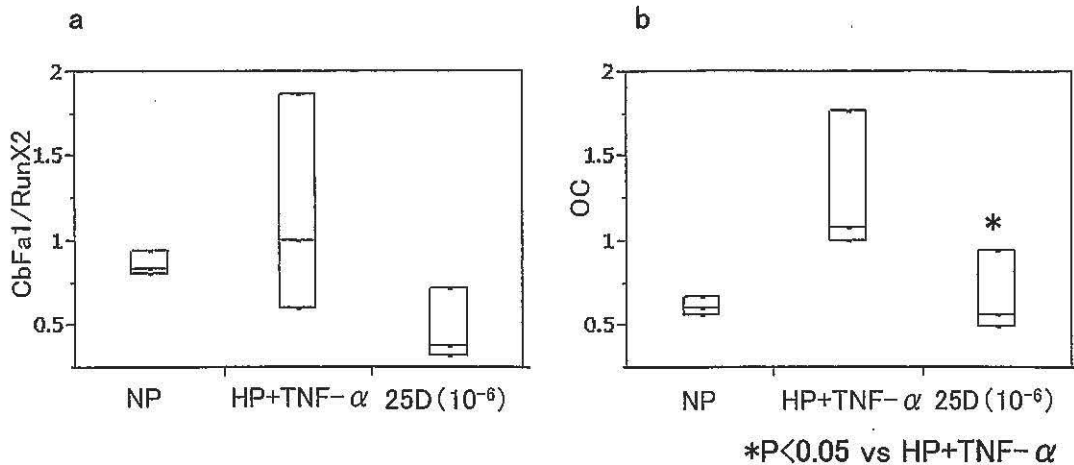


Fig. 2 Expression of genes associated with the osteogenic process. Cbfa1/Runx2 (a) and osteocalcin (OC: b), in the NP, HP + TNF- α , and HP + TNF- α + 25D₃ (10⁻⁶ M) groups, as determined by RT-PCR. N = 3 per group. P = 0.187 by analysis of variance for Cbfa1/Runx2 and P = 0.048 by analysis of variance for OC. *P < 0.05 versus HP + TNF- α by post hoc Scheffe test.

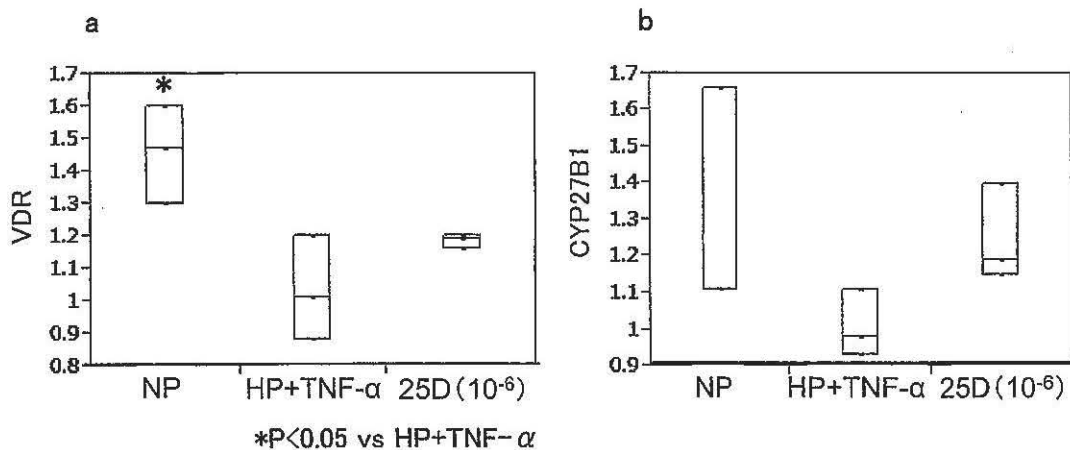


Fig. 3 VDR (a) and CYP27B1 (b) mRNA expressions in NP, HP + TNF- α , and HP + TNF- α + 25D₃ (10⁻⁶ M) groups, as determined by RT-PCR. N = 3 per group. P = 0.017 by analysis of variance for VDR and P = 0.265 by analysis of variance for CYP27B1. *P < 0.05 versus HP + TNF- α by post hoc Scheffe test.

OC: 0.61 ± 0.03) と比較し上昇した。25D (10⁻⁶) 群では、CbFa1/Runx2, OCの発現が抑制された (CbFa1/Runx2: 0.47 ± 0.12 , OC: 0.66 ± 0.14)。特にOCはHP + TNF- α 群に比し、25D (10⁻⁶) 群では有意に抑制された。

25(OH)D₃は、石灰化に伴い低下したVDRやCYP27B1のmRNA発現を回復させる傾向がみられた (図3a, b)。

HP + TNF- α 群 (VDR: 1.03 ± 0.85 , CYP27B1: 1.01 ± 0.05) では、NP群 (VDR: 1.46 ± 0.09 , CYP27B1: 1.29 ± 0.18) に比較し、VDRやCYP27B1のmRNAの発現の低下がみられた。統計学的有意差はないものの、25D (10⁻⁶) 群では、HP + TNF- α 群と比較し、VDRやCYP27B1 mRNAの発現を回復させる傾向がみられた (VDR: 1.18 ± 0.01 , CYP27B1: 1.25 ± 0.08)。

考 察

慢性腎臓病患者では、ビタミンD代謝が障害¹⁰⁾され、血中25(OH)D₃濃度は心血管病や死亡率と関連することが示されている¹¹⁻¹³⁾。これらのアウトカムは血中1,25-ジヒドロキシビタミンD₃ [1,25(OH)₂D₃]濃度よりも25(OH)D₃濃度が強い関連性を有している¹⁴⁾。その理由として、腎外組織の機能や構造維持には、各局所において、基質となる血中の25(OH)D₃が代謝を受けた結果産生される1,25(OH)₂D₃がVDRを活性化し生理機能を発揮する、autocrine/paracrine作用が重要な役割を担っていることが示唆されている¹¹⁾。このautocrine/paracrine作用のひとつに、抗炎症作用があり、動脈硬化を主体とした血管病変に対する保護効果が期待されている¹⁵⁾。

一方で、慢性腎臓病患者の組織内でのビタミンD代謝については十分に解明されておらず、1) 25(OH)D₃がいかに腎外組織に取り込まれるのか、2) 組織内(細胞内)での代謝酵素活性に異常があるのか(CYP27B1活性障害、CYP24A1活性亢進など)、3) VDRの発現異常や機能異常に起因する活性化障害があるのか、4) VDRAによる作用との違いがあるのか、などの検討課題があげられる。

本研究では、活性型ビタミンDの前駆物質である25(OH)D₃の、Pや炎症性サイトカインにより惹起される石灰化進展への役割を、VSMC内の局所的なビタミンD代謝に着目し検討した。これまでにわれわれの検討では、VDRAはPのみによるVSMCの石灰化促進には影響が見られず、PおよびTNF- α による石灰化を抑制したことから、TNF- α に対する抗炎症作用の発揮により石灰化が抑制される可能性を報告している⁹⁾。今回われわれはPおよびTNF- α によるVSMC石灰化促進プロセスにおいて、まずVSMC内のビタミンD代謝が障害されていることを見出した。さらにVDRAと同様に、25(OH)D₃は、PおよびTNF- α により誘導された血管石灰化(血管平滑筋細胞の骨芽細胞様細胞への形質転換)を抑制し、石灰化に伴い低下したVDRやCYP27B1のmRNA発現を回復させる傾向を確認した。

VSMC内には、CYP27B1やVDRが存在し、局所での1,25(OH)₂D₃産生が可能であることが示されている^{14, 16, 17)}。本研究でも、PおよびTNF- α 刺

激によりVSMC内の障害されたビタミンD代謝系を25(OH)D₃が調節して、石灰化プロセスを抑制することが示唆された。基質となる25(OH)D₃が、VSMC内のビタミンD代謝を調節して1,25(OH)₂D₃産生を促進することで、もしくは直接的にVDRを活性化させて石灰化抑制作用を発揮し、その石灰化抑制作用にはVDR活性化による抗炎症作用が関与していると考えられた。

Pおよび炎症性サイトカインのTNF- α によるVSMCの石灰化促進プロセスにおいて、VSMC内のビタミンD代謝が障害されていた。活性型ビタミンDの前駆物質である25(OH)D₃は、このVSMC内の障害されたビタミンD代謝を調節することにより、石灰化の促進を抑制した。この石灰化抑制機序には、VDR活性化による抗炎症作用の関与などが示唆されたが、その詳細には今後の検討を要する。

利益相反

本研究に関し開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 塩井 淳. 血管石灰化の分子病態. 腎と透析. 2011;71:791-795.
- 2) Mizobuchi M, Towler D, Slatopolsky E. Vascular calcification: the killer of patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2009; 20:1453-1464.
- 3) Tintut Y, Patel J, Parhami F, et al. Tumor necrosis factor-alpha promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. *Circulation*. 2000;102:2636-2642.
- 4) Jones G. Expanding role for vitamin D in chronic kidney disease: importance of blood 25-OH-D levels and extra-renal 1alpha-hydroxylase in the classical and nonclassical actions of 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D(3). *Semin Dial*. 2007; 20:316-324.
- 5) O'Connell TD, Simpson RU. Immunochemical identification of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor protein in human heart. *Cell Biol Int*. 1996;20:621-624.
- 6) Mizobuchi M, Ogata H, Koiwa F, et al. Vitamin D and vascular calcification in chronic kidney disease. *Bone*. 2009;45(Suppl 1):S26-S29.
- 7) Watson KE, Abrolat ML, Malone LL, et al. Active serum vitamin D levels are inversely correlated with coronary calcification. *Circulation*. 1997;96:1755-1760.

- 8) Scragg R, Jackson R, Holdaway IM, *et al.* Myocardial infarctions is inversely associated with plasma 25-hydroxyvitamin D3 levels: a community-based study. *Int J Epidemiol.* 1999;19:559-563.
- 9) Aoshima Y, Mizobuchi M, Ogata H, *et al.* Vitamin D receptor activators inhibit vascular smooth muscle cell mineralization induced by phosphate and TNF- α . *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27:1800-1806.
- 10) Al-Badr W, Martin KJ. Vitamin D and kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3:1555-1560.
- 11) Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H, *et al.* Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med.* 2008;168:1340-1349.
- 12) Wolf M, Shah A, Gutierrez O, *et al.* Vitamin D levels and early mortality among incident hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2007;72:1004-1013.
- 13) Ravani P, Malberti F, Tripepi G, *et al.* Vitamin D levels and patient outcome in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2009;75:88-95.
- 14) Merke J, Hofmann W, Goldschmidt D, *et al.* Demonstration of 1,25(OH)₂ vitamin D3 receptors and actions in vascular smooth muscle cells in vitro. *Calcif Tissue Int.* 1987;41:112-114.
- 15) Wu Wong JR. Potential for vitamin D receptor agonists in the treatment of cardiovascular disease. *Br J Pharmacol.* 2009;158:395-412.
- 16) Rajasree S, Umashankar PR, Lal AV, *et al.* 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor is upregulated in aortic smooth muscle cells during hypervitaminosis D. *Life Sci.* 2002;70:1777-1788.
- 17) Somjen D, Weisman Y, Kohen F, *et al.* 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase is expressed in human vascular smooth muscle cells and is upregulated by parathyroid hormone and estrogenic compounds. *Circulation.* 2005; 111:1666-1671.

EFFECT OF 25-HYDROXYVITAMIN D₃ ON VASCULAR
SMOOTH MUSCLE CELL MINERALIZATION

Noriko ARAI-NUNOTA, Masahide MIZOBUCHI,
Takanori SHIBATA and Tadao AKIZAWA

Division of Nephrology, Department of Medicine, Showa University School of Medicine

Hiroaki OGATA and Eriko KINUGASA

Department of Internal Medicine, Showa University Northern Yokohama Hospital

Fumihiko KOIWA

Division of Nephrology, Department of Medicine, Showa University Fujigaoka Hospital

Abstract — Vascular calcification is a highly regulated process. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) has been shown to accelerate the highly regulated osteogenic process in vascular smooth muscle cells (VSMCs). Vitamin D receptor activators have been associated with beneficial cardiovascular outcomes in patients with chronic kidney disease. Vitamin D deficiency, especially low circulating concentrations of 25-hydroxyvitamin D₃ [25(OH)D₃] are associated with increased risks for cardiovascular disease and death. We examined whether 25(OH)D₃ exhibits a suppressive effect on VSMC mineralization induced by phosphate and TNF- α . Human VSMCs were treated with either vehicle or 25(OH)D₃ (10^{-8} to 10^{-6} M) in 2.5 mM of a high phosphate media with TNF- α (1 ng/ml) for 6 days. VSMC mineralization was determined and the expression of genes associated with the osteogenic process and vitamin D metabolism was examined by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. Vehicle-treated VSMCs exhibited massive mineralization, which was inhibited by 25(OH)D₃. While the vehicle-treated VSMCs exhibited the increase in mRNA expressions associated with the osteogenic process (Cbfa1/Runx2 and osteocalcin) compared with VSMCs with a normal phosphate media, 25(OH)D₃ suppressed the increase in these mRNA expressions. Furthermore, the vehicle-treated VSMCs exhibited the decrease in vitamin D receptor and 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase mRNA expressions which were marginally rescued by 25(OH)D₃. 25(OH)D₃ abrogated the acceleration of the osteogenic process induced by phosphate and TNF- α in VSMCs, which was linked to the inhibition of VSMC mineralization.

Key words: vascular calcification, vascular smooth muscle cell, 25-hydroxyvitamin D₃, tumor necrosis factor- α

〔受付：11月14日，受理：12月4日，2013〕