

背景

血管病変の一つである石灰化 (Fig.1) は、血管壁の柔軟性と弾力を減少させ、最終的には血管脆弱性を招く。石灰化は虚血性心疾患、糖尿病患者、慢性腎不全患者などにしばしば認められ、それら疾患の予後を悪化させる。一方、これらの疾患をきたす共通因子のひとつとして高血圧(メカニカルストレス)が推定されている。

血管石灰化の研究としては、大動脈や冠動脈、腎動脈などの臨床報告がある。また、基礎的分野では、マウスやラットの血管平滑筋の石灰化などの報告が散見されるが、高血圧の石灰化への影響に関する報告はない。

目的

本研究では、メカニカルストレスとして高血圧が血管平滑筋の石灰化に与える影響を検討するため、正常血圧ラット(WKY)および、自然発症性高血圧ラット(SHR)の二つのモデルラットの血管平滑筋細胞を用い、骨化促進刺激による遺伝子発現変化を比較検討した。

実験方法

血管平滑筋

エーテル麻酔下で、10週令のWKYおよび、SHRから大動脈を摘出し、平滑筋細胞を酵素分散法により単離。

培養

80%コンフルエントで骨化促進培地(1%FBS+デキサメタゾン 最終濃度 10^{-7} M)に置換し、0~6日間継続培養。

アルカリフォスファターゼの活性染色

骨化促進培地(1%FBS+デキサメタゾン 最終濃度 10^{-7} M)に置換し、20日間継続培養。アルカリフォスファターゼの酵素活性を観察、検討。

総RNA抽出・精製

骨化促進培地で処理した細胞から総遺伝子を抽出・精製。

マイクロアレイ

細胞から採取したメッセンジャーRNAを網羅的に解析し、遺伝子の発現および変化率の頻度分布を測定。

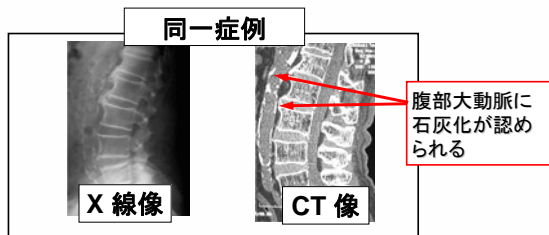


Fig.1 腹部大動脈の石灰化像

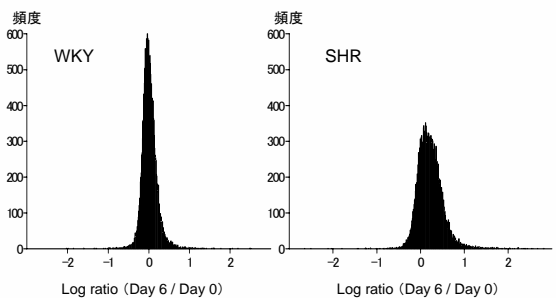


Fig.2 骨化促進培地による遺伝子発現変化の網羅的解析

骨化促進培地で6日間培養し、遺伝子発現変化をAgilent Rat oligo microarrayによって網羅的に解析し、変化率(対数)の頻度分布を示した。全体的に右よりで、ブロードであることから、SHRの遺伝子のほうが骨化促進刺激の影響が強く受け、発現が増加していることがわかる。(等分散性のF検定: 2.23 (P<=0.001) 有意差あり)

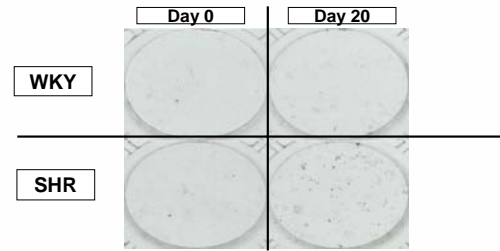


Fig.3 Alkaline phosphatase(ALP)の活性染色

骨化促進培地の20日間処理した後、ALPの染色を行った。ALPは、石灰化抑制因子を分解し、結果的に石灰化を進行させることから、石灰化の成り立ちに大きく関与しているタンパク質である。SHRの方は、骨化促進培地未処理(Day0)と比較して20日間培養(Day 20)では、ALPが多く発現していることが認められた。またWKYの20日間処理(Day 20)では、染色される細胞はほとんど見られなかった。この結果から、SHRの方が、ALPの活性が高いことが示唆される。

Table.1 骨化促進培地による石灰化関連遺伝子の発現変化(マイクロアレイ)

Gene Name	Ratio (Day 6 / Day 0)	
	WKY	SHR
ALP	0.85	1.91
Osteocalcin	1.49	3.41
Cbfa-1	1.09	2.32
BMP-2	0.87	1.63
PGI ₂ synthase	2.10	13.5
Osteonectin	0.69	0.91
BMP-4	0.37	0.71
BMP-2 receptor	0.44	2.65
Matrix-gla protein	4.14	2.85
Vit.D receptor	0.71	1.20

骨化促進培地6日間処理による石灰化に関係とされる遺伝子の発現変化を示す。SHRは、WKYよりもALPやOsteocalcin, cbfa-1などの発現が増えることが認められた。これらは強力な異所性骨形成の誘導因子であり、各々の遺伝子は骨芽細胞などの骨形成の重要な因子である

結語

ラット大動脈平滑筋培養細胞の骨化促進培地に対する遺伝子発現の応答をマイクロアレイで網羅的に解析したところ、変化はWKYよりSHRで顕著であった。このことは骨化促進刺激の感受性がSHRの方でより高いことを示唆する。変化のあった個々の遺伝子についてみると、骨化関連遺伝子の多くがWKYに比べて、SHRの方でより強く発現した。よってラットにおいて、高血圧と大動脈平滑筋の石灰化との間に密接な関連があることが示唆された。これらの遺伝子は薬物治療の標的になると期待される。

