

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09290

研究課題名(和文)リン負荷がEPOに及ぼす影響(リン性貧血なる新概念の創出)

研究課題名(英文)The effects of phosphate load on EPO

研究代表者

濱野 高行 (HAMANO, TAKAYUKI)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：50403077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：短期リン負荷では腎のエリスロポエチン発現は減少するが、貧血は生じなかった。一方、長期負荷をかけると貧血は惹起されるが、腎線維化も惹起されていた。このことは、リン負荷が腎性貧血を惹起することを示しても、「腎機能を悪化させずに貧血を惹起する」というリン性貧血の概念は成立しないことを示す。

そこで当初の仮説を放棄し、長期リン負荷が寿命を短くすることがげっ歯類でも成立するか検証した。マウスにリン吸着薬を投与し2年間観察したところ、オスのみにおいて、3.0%炭酸ランタン追加群で寿命が延びていた。また腎機能に差があったので、低リン食が加齢による腎機能悪化を抑制することが一因と思われ、その機序を今後検証する。

研究成果の概要(英文)：Phosphate loading for short duration repressed EPO production in the kidney, however did not induce anemia. Phosphate loading for long duration induced anemia, but at the same time, brought about renal fibrosis. These findings might indicate that phosphate loading induce renal anemia, but does not support our hypothesis of “phosphate-driven anemia” that phosphate loading per se induce anemia not by worsening renal function.

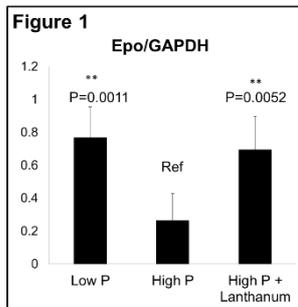
Abandoning our prior hypothesis, we moved on to the next question if phosphate loading shorten the lifespan of rodents. To address this question, we administered a phosphate binder, lanthanum carbonate, to mice for nearly two years. We found that adding 3.0% lanthanum carbonate to chow lengthened the survival time only in male mice. Observed better renal function of mice fed lanthanum carbonate might be the reason for improved survival. We will elucidate the mechanisms of renoprotection by phosphate restriction.

研究分野：腎臓内科

キーワード：腎性貧血 リン負荷 腎線維化 寿命 炭酸ランタン

1. 研究開始当初の背景

我々は、骨ミネラル代謝に関わる一連の実験の中で、6週齢雄性Wistarラットに低リン食、高リン食、高リン+ランタン食を1日だけ給餌し、リンが腎に与える影響を評価した。その結果、Periodic Acid Schiff (PAS)染色で評価した腎組織上は3群間に差を認めないにも関わらず、腎エリスロポエチン mRNA 発現量が低リン食ラットに比べ高リン食ラットで低下し、高リン+ランタン食ラットで回復することが明らかとなった(Figure 1)。また、前向きコホート研究においても、リン負荷の指標である血清 intact FGF23 値や whole PTH 値が高値の患者ほど、貧血の進行速度が速い事を見出している(data not shown)。これら予備検討の結果は、食事リン負荷が腎エリスロポエチン産生を抑制し貧血を惹起しうること、炭酸ランタンによりリン負荷による貧血(リン性貧血)が解除され得ることを示していると考えられた。



2. 研究の目的

我々は、慢性腎臓病患者の多施設コホート研究から、リン利尿ホルモンである線維芽細胞増殖因子(FGF23)と副甲状腺ホルモン(PTH)が腎機能の悪化とは独立して腎性貧血の進行(ヘモグロビンの低下速度)に関わることを、推算糸球体濾過量(eGFR)を時間依存性変数として補正することで明らかにした。これらのホルモンはリン負荷で上昇することから、リン負荷自体がエリスロポエチン(EPO)を低下させるという仮説を持った。実際、動物実験において腎不全を全く惹起させていなくても、経口リン負荷だけで EPO mRNA の発現が腎臓で落ち、それがリン吸着薬で改善することを確認している。この現象は「リン性貧血」という新たな疾患概念に繋がる。本研究の目的はリン負荷がいかなる機序で EPO 産生に影響するのかを明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

普通食、リン負荷食、リン負荷+炭酸ランタンの3つの群に瀉血をおこない、この食事を続けさせる。瀉血後の Hb 上昇速度を3群間で比較し、腎臓での EPO 産生を比較する。ここで EPO 発現の可視化に関しては、EPO-GFP transgenic mouse を使う。また同様なことを TPTX モデルや FGF23 KO mouse で行うことで、PTH と FGF23 の関与を明らかにする。

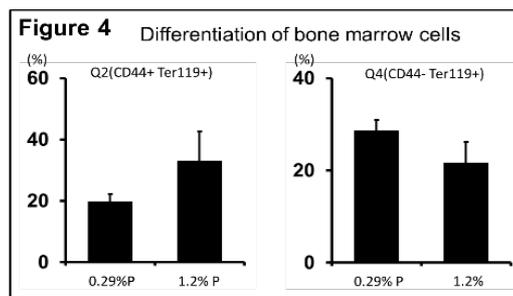
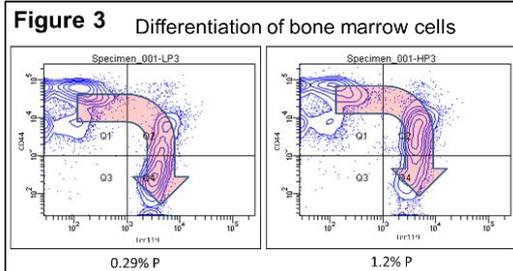
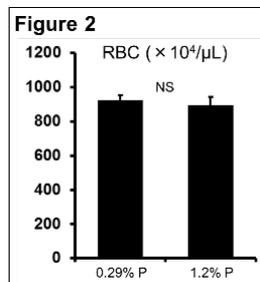
PTH や FGF23 持続注射モデルにおいて、EPO 産生が下がり貧血を呈するかを評価する。この時に GATA, HIF-2 の発現あるいはその安定性(ユビキチン化、プロテアソームによる

分解)に関して調べる。TPTX モデルや FGF23 KO mouse でリン負荷した場合にもこれらを調べる。

4. 研究成果

【2015年度の研究】

C57BL/6J マウスに0.29% Pあるいは1.2% Pを3週間負荷し、末梢血で貧血を評価したところ、1.2% P 負荷でやや RBC が低下傾向にあるものの有意差を認めなかった(Figure 2)。しかしながら、同マウスの骨髄における赤血球分化を評価したところ、1.2% P 負荷マウスにおいて赤血球の分化障害が認められた(Figures 3 and 4)。Figure 3 は骨髄細胞を CD44 と Ter119 で展開した FACS の結果である。骨髄における赤血球分化は赤矢印(Q1 Q2 Q4)の順番に進むことが知られている(Figure 3)。Figure 4 は Figure 3 の結果を定量評価したものであり、1.2% P 負荷群では Q2 (未分化赤血球)の割合が高く、Q4 (分化赤血球)の割合が低いことが確認できた。つまり、経口リン負荷により赤血球分化が抑制されることが明らかになった。



骨髄細胞の解析にて高リン食による赤血球分化抑制が明らかになったのに(Figures 3 and 4)、高リン食により貧血が認められなかったため(Figure 2)、更なる検討を行った。ヒト(成体)においては骨髄でのみ赤血球の造血が行われているが、マウスでは生体においても骨髄以外に脾臓で活発な造血が行われており、脾臓における造血はエリスロポエチン非依存性であることが知られている。このため、マウスでは脾臓におけるエリスロポエチン非依存性造血のため Figure 2 に示す結果になったのではないかと考え、脾摘+片

腎摘マウスに 0.29% P あるいは 1.2% P を 3 週間負荷した。その結果 1.2% P 負荷にて貧血が認められることが明らかになった (Figure 5)。

【2016 年度以降の研究】

2015 年度の
研究にて、脾摘 + 片腎摘マウスに 0.29% P あ

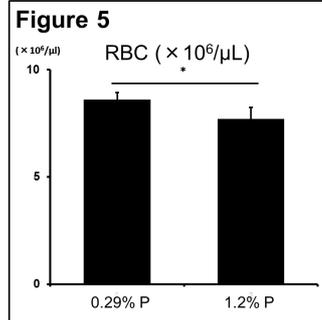
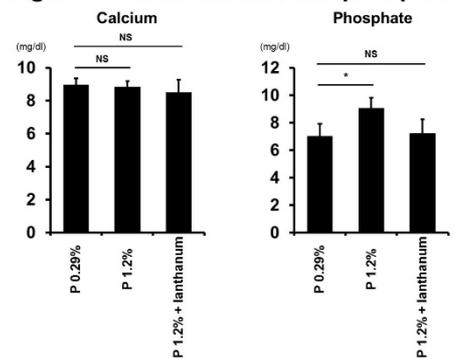
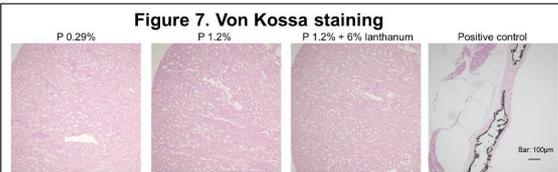


Figure 6. Serum calcium and phosphate



るいは 1.2% P を負荷したところ、1.2%P 群にて貧血が認められたため、同様の実験を 1.2%P + 6% 炭酸ランタン群を追加して行った。血清カルシウム値は 3 群間に差を認めず、



血清リン値は 1.2% P 群で上昇、1.2% P + 6% 炭酸ランタン群で上昇は抑制されていた

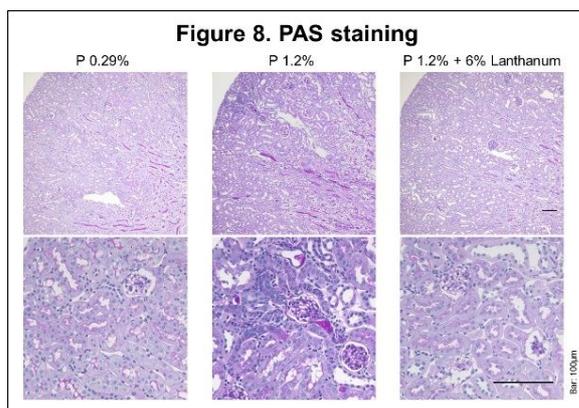
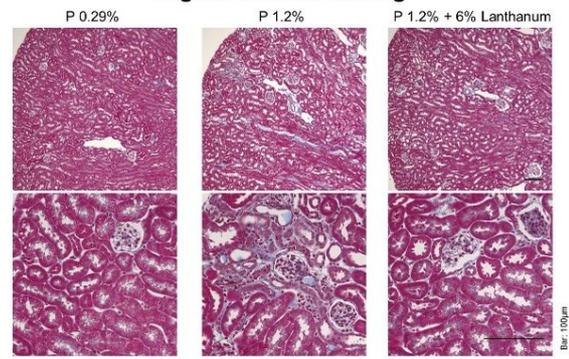


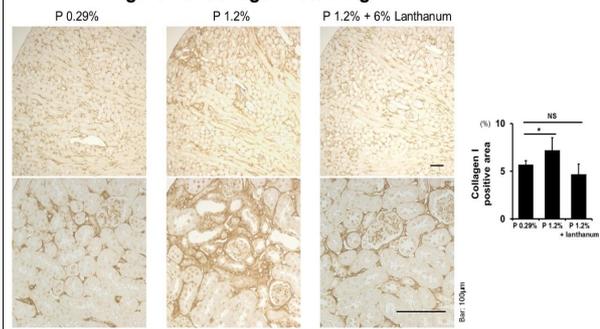
Figure 9. MTC staining



(Figure 6)。また、腎石灰化の有無を von Kossa 染色で調べたところ、3 群とも腎石灰化病変は認めなかった (Figure 7)。しかしながら PAS 染色、MTC 染色、collagen I 染色による評価においては、1.2% P 群で腎尿細管間質線維化病変が進行し、炭酸ランタンにて同病変の進行が抑制されることが明らかになった (Figure 8-10)。

このため、2015 年度の研究 Figure 5 で認められた貧血は腎傷害によるものであることが示唆された。

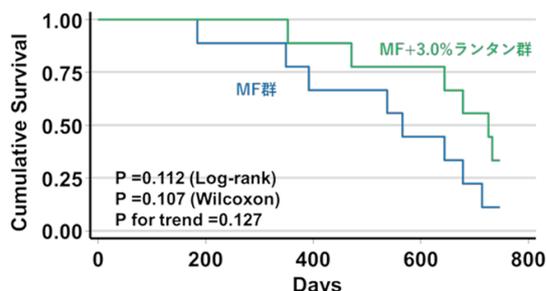
Figure 10. Collagen I staining



上記をまとめると、短期のリン負荷では腎におけるエリスロポエチン発現は減少するものの貧血までは生じなかった。一方、長期のリン負荷をかけることで貧血が惹起されることは確認できたものの、腎組織のコラーゲン組織の増生も見られ、結果的に腎線維化が惹起されていることが判明した。このことは、リン負荷が腎性貧血を惹起することを観察したことになっても、当初の仮説である、「リン負荷は腎機能を悪化させずに貧血を惹起する」というリン性貧血の概念が成立しないことを示す。

これらの結果より、我々は当初の仮説を放棄して、長期的なリン負荷が腎機能を悪化させ寿命を短くすることがげっ歯類でも成立する可能性を探求することに方針を変えた。このことを証明するために、正常食摂取マウスにリン吸着薬を投与することで、寿命延長が見られるかを長期の実験で調べることにした。具体的には、C57BL/6 マウスのオス 27 匹、メス 27 匹に対して、6 週例から MF diet, MF diet+1.5%炭酸ランタン、MF diet+3.0%炭酸ランタンの 3 種類の食事を投与し、2 年間に

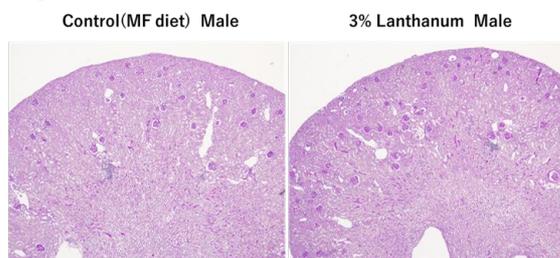
Figure. 11



渡って調べた。その結果、メスでは寿命に差が全く見られなかった。一方オス群では、1.5%炭酸ランタン追加をしても寿命は延びていなかったが、3.0%炭酸ランタン追加群で寿命が延びている傾向が認められた (Figure 11)。

メス群では、閉経によって血清リン値が上昇するために、リン摂取量に寿命が依存していなかったのかもしれない。オス群において、リン制限でなぜ寿命に差が見られたのかを現在検証中であるが、腎機能に差があったこ

Figure. 12



とから、低リン食が加齢による腎機能の悪化を抑制することで、寿命を延ばした可能性がある。また腎病理組織の検討では、オスにおいてのみ加齢による糸球体数の減少がランタンの投与で抑制されていた (Figure.12)。今後さらに詳細にメカニズムも含め研究を続行していく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計76件)

1) Matsui I, Oka T, Kusunoki Y, Mori D, Hashimoto N, Matsumoto A, Shimada K, Yamaguchi S, Kubota K, Yonemoto S, Higo T, Sakaguchi Y, Takabatake Y, Hamano T, Isaka Y. Cardiac hypertrophy elevates serum levels of fibroblast growth factor 23. *Kidney Int.* in press

2) Mori D, Matsui I, Shimomura A, Hashimoto N, Matsumoto A, Shimada K, Yamaguchi S, Oka T, Kubota K, Yonemoto S, Sakaguchi Y, Takahashi A, Shintani Y, Takashima S, Takabatake Y, Hamano T, Isaka Y. Protein carbamylation exacerbates vascular calcification. *Kidney Int.* in press

3) Hamano T. Mineral and Bone Disorders in

Conventional Hemodialysis: Challenges and Solutions *Semin Nephrol.* in press

4) Oka T, Hamano T, Sakaguchi Y, et al. Proteinuria-associated Renal Magnesium Wasting Leads to Hypomagnesemia: A Common Electrolyte Abnormality in CKD. *Nephrology Dial Transplant* in press

5) Obi Y, Kalantar-Zadeh K, Shintani A, Kovesdy CP, Hamano T. Estimated glomerular filtration rate and the risk-benefit profile of intensive blood pressure control amongst nondiabetic patients: a post hoc analysis of a randomized clinical trial. *J Intern Med.* 2018 Mar;283(3):314-327.

6) Hamano T. Vitamin D and renal outcome: the fourth outcome of CKD-MBD? Oshima Award Address 2015. *Clin Exp Nephrol.* 2018 Apr;22(2):249-256.

7) Sakaguchi Y, Hamano T, Wada A, Hoshino J, Masakane I. Magnesium and Risk of Hip Fracture among Patients Undergoing Hemodialysis. *J Am Soc Nephrol.* 2018 Mar;29(3):991-999.

8) Sakaguchi Y, Hamano T, Kubota K, Oka T, Yamaguchi S, Matsumoto A, Hashimoto N, Mori D, Obi Y, Matsui I, Isaka Y. Anion Gap as a Determinant of Ionized Fraction of Divalent Cations in Hemodialysis Patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2018 Feb 7;13(2):274-281.

9) Hamano T, Sakaguchi Y, Fujii N, Isaka Y. Clinical features of CKD-MBD in Japan: cohort studies and registry. *Clin Exp Nephrol.* 2017 Mar;21(Suppl 1):9-20.

10) Obi Y, Hamano T, Wada A, Tsubakihara Y; Committee of Renal Data Registry of the Japanese Society for Dialysis Therapy. Vitamin D Receptor Activator Use and Cause-specific Death among dialysis Patients: a Nationwide Cohort Study using Coarsened Exact Matching. *Sci Rep.* 2017 Jan 31;7:41170.

11) Sakaguchi Y, Hamano T, Nakano C, Obi Y, Matsui I, Kusunoki Y, Mori D, Oka T, Hashimoto N, Takabatake Y, Takahashi A, Kaimori JY, Moriyama T, Yamamoto R, Horio M, Sugimoto K, Yamamoto K, Rakugi H, Isaka Y. Association between Density of Coronary Artery Calcification and Serum Magnesium Levels among Patients with Chronic Kidney Disease. *PLoS One.* 2016 Sep 23;11(9):e0163673.

12) Kusunoki Y, Matsui I, Hamano T, Shimomura A, Mori D, Yonemoto S, Takabatake Y, Tsubakihara Y, St-Arnaud R, Isaka Y, Rakugi H. Excess 25-hydroxyvitamin D3 exacerbates tubulointerstitial injury in mice by modulating macrophage phenotype. *Kidney*

Int. 2015 Nov;88(5):1013-29.

13) Hamano T. Klotho upregulation by rapamycin protects against vascular disease in CKD. *Kidney Int.* 2015 Oct;88(4):660-2.

14) Sakaguchi Y, Iwatani H, Hamano T, Tomida K, Kawabata H, Kusunoki Y, Shimomura A, Matsui I, Hayashi T, Tsubakihara Y, Isaka Y, Rakugi H. Magnesium modifies the association between serum phosphate and the risk of progression to end-stage kidney disease in patients with non-diabetic chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2015 Oct;88(4):833-42.

15) Hamano T, Fujii N, Hayashi T, Yamamoto H, Iseki K, Tsubakihara Y. Thresholds of iron markers for iron deficiency erythropoiesis-finding of the Japanese nationwide dialysis registry. *Kidney Int Suppl* (2011). 2015 Jun;5(1):23-32.

〔学会発表〕(計 104 件)

1) Hamano T. Japanese Strategy for Iron and Anemia Management. 18th ICRNM & World Renal Nutrition Week, Okinawa, 2016.4.23.

2) Hamano T. FGF23 and vitamin D status in CKD. Korean Society of Nephrology (KSN), Seoul, 2016.6.3.

3) 濱野 高行. ESA 低反応性の原因と治療. 第 61 回日本透析医学会学術集会・総会, 大阪市, 2016.6.11.

4) 濱野 高行. 鉄の評価と補充方法. 第 62 回日本透析医学会学術集会・総会, 横浜市, 2017.6.17.

〔図書〕(計 21 件)

1) 濱野 高行. 多尿「今日の診断指針 第 7 版 TODAY'S DIAGNOSIS 7th EDITIONS」 p408-411 医学書院、東京、2015

2) 濱野 高行. 慢性腎臓病に伴う骨ミネラル代謝異常(高リン血症、血管石灰化を含む) chronic kidney disease-mineral bone disorder (CKD-MBD) p607-609 今日の治療方針 2017 年 私はこう治療している

3) 濱野 高行. 「高リン血症、低リン血症」 p628-630 今日の治療方針 2018 年版 - 私はこうして治療している

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 1 件)

名称：腎不全の予後判定方法
発明者：濱野高行、松井功、猪阪善隆
権利者：
種類：
番号：特許第 6012108 号
出願年：2012 年
取得年：2016 年
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.ckdr.med.osaka-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者 濱野 高行
(HAMANO Takayuki)
大阪大学大学院医学系研究科
寄附講座准教授
研究者番号：50403077

(2) 研究分担者 松井功
(Matsui Isao)
大阪大学大学院医学系研究科 助教
研究者番号：60456986