

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09294

研究課題名(和文)慢性腎臓病におけるCPP病原体説の臨床的検証

研究課題名(英文)Clinical evaluation of the hypothesis of CPP as a pathogen in chronic kidney disease

研究代表者

庄司 哲雄(Shoji, Tetsuo)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：40271192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病におけるリン毒性の病原体と想定されるcalci-protein particle (CPP)と、CPPがより細胞障害性の強い形態であるsecondary CPPに形質変換するまでの時間(T50)を測定した。血清CPP濃度は健常ボランティアに比較し血液透析患者で低値であった。透析患者でCPP濃度とT50は相関しなかった。透析患者コホートにおいて、T50が短いほど総死亡リスクが高かったが、CPP濃度は総死亡と関連しなかった。これらの結果は、慢性腎臓病患者においてCPPが生体内で変化することで病原体に変貌し、寿命の短縮に悪影響を与えていることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the role of calci-protein particle (CPP) as a pathogen in chronic kidney disease, we measured serum concentration of CPP and T50, the latter being the time for CPP to transform in vitro to more cytotoxic form secondary CPP. Serum concentration of CPP was not increased in hemodialysis patients than healthy volunteers, and no correlation was found between CPP level and T50. In a cohort of hemodialysis patients, a shorter T50 predicted a higher risk of mortality, but CPP did not. These results support the hypothesis that CPP, following transformation in vivo, could play a pathological role in chronic kidney disease.

研究分野：腎臓病

キーワード：リン毒性 CKD-MBD 心血管疾患 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

(1)慢性腎臓病の心血管疾患・死亡高リスク：慢性腎臓病(CKD)においては心血管疾患(CVD)リスクや死亡率が高く、その機序としてミネラル・骨代謝異常(CKD-MBD)が想定されていた。CKD-MBDは死亡率を高める全身性疾患と考えられ、特に「リン毒性」が注目されていたが、リンがどのように毒性を発揮するのかはよくわからなかった。

(2)CPP 病原体説：

リンはカルシウムとリン酸カルシウム結晶を形成し、これは血清蛋白 Fetuin-A に結合し calciprotein particle (CPP) というナノ粒子を形成する。自治医科大学の黒尾らはリン毒性の本体は CPP であるという「CPP 病原体説」を提唱した(Kuro-o M, *Nat Rev Nephrol* 9:650, 2013)。CPPには小型で球形の primary CPP と大型で不整形の secondary CPP の形態が知られていた。Primary CPP はリン・カルシウムの生理的な担体として機能し、リン毒性は secondary CPP によると考えられるようになった。Primary CPP は一定条件で secondary CPP に変化し、強い細胞障害性・炎症惹起性を獲得するものと考えられていた。この primary CPP と secondary CPP の関係は、コレステロールの担体である LDL とそれが変性した酸化 LDL との関係と類似している。

(3)慢性腎臓病における CPP の意義(仮説)：

これらの背景から、慢性腎臓病により CVD リスクや死亡率が高まる機序として、血清 CPP 濃度の上昇、特に secondary CPP の上昇であるとの仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、慢性腎臓病あるいは糖尿病において「CPP 病原体説」を臨床的、臨床疫学的に検証することであった。具体的には次の4点を明らかにすることを目標とした；

検討(A)：CPP と血管内皮機能の関連(横断研究 N=200)

検討(B)：CPP と動脈壁硬化度・肥厚度の関連(横断研究 N=200)

検討(C)：CPP と CVD 発症リスクの関連(コホート研究 N=518、5年)。

検討(D)：CPP と脳微小血管障害との関連(横断研究 N=200)。

CPP の指標としては血清 CPP 濃度(および大型/小型 CPP の割合)を測定したが、CPP が primary から secondary に変化する傾向を in vitro で測定する T50 測定も併せて検討した。

3. 研究の方法

(1) 血清 CPP 濃度測定には三浦・黒尾らにより開発された新規 CPP 定量法を用いた(Miura Y, *Sci Rep* 8:1256, 2018)。サンプル中の primary CPP(小型)と secondary CPP(大型)を分別定量するためにゲル透過スピンカラムを組み合わせた。

(2) Primary から secondary CPP に in vitro

で変化させるのに要する時間(T50)を Paschらの方法(Pasch A, *J Am Soc Nephrol* 23:1744-1752, 2012)にて測定した。

(3) 臨床データ・血清は研究目的で使用することに同意を得て取得した既存の情報と試料を用いた。凍結血清は - 30 保存のものとして - 80 保存のものがあった。

4. 研究成果

(1)血清 CPP 濃度定量法のセットアップ：

自治医大黒尾教授のラボが開発した CPP 定量法を本学でも実施できるように直接指導を受けセットアップしようとした。しかし測定結果が不安定であった。また CPP をサイズで分画することを試みたが secondary CPP に相当する大型 CPP は分離できなかった。これは超遠心法で大型 CPP を沈殿させる方法でも成功しなかった。黒尾ラボでも測定系の変更が行われ、2018年1月に論文化され、この方法を本学でも採用することになった。その結果、- 80 保存の血清には大型 CPP は含まれていないとの結論に至った。その後はゲル透過スピンカラムを組み合わせたサイズによる分画は行わず、血清中の Total CPP 濃度の測定を行うことにした。

本測定には検体の保存状況が極めて大きく影響することが判明し(Miura Y, *Sci Rep* 8:1256, 2018)、- 30 で凍結保存していた血清は測定には不適切と判断し、目的欄で記載した検討(A)、(B)は一旦見送ることとし、新たに - 80 保存の血清を集めて実施するように計画を変更した。また、検討(D)については - 80 で凍結した保存血清を用いて現在測定と解析を進めている。

(2)血液透析患者の血清 CPP 濃度と T50：

検討(C)については - 80 で凍結保存していた血清を用い、血清 CPP 濃度(N=513)と T50(N=448)を測定することができた。血清 CPP 濃度は中央値(四分位間値)で 8.7(7.2-10.7)(AU, arbitrary unit)であり、T50 値は 172 (138-217)分であった(図1)。

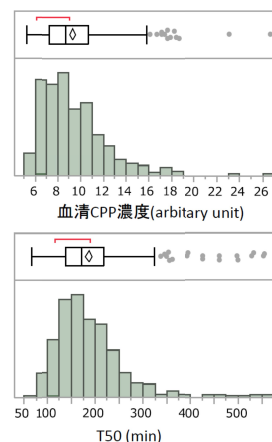


図1. 透析患者における血清 CPP 濃度と T50 の分布

血清 CPP 濃度と T50 との間には相関関係は認められなかった (図 2)。

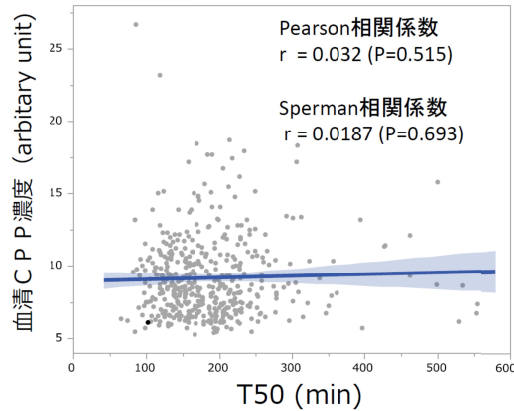


図 2 . 透析患者における血清 CPP 濃度と T50 の関係

血清 CPP 濃度や T50 値に関連する因子を Spearman の単相関で検討した。T50 値は年齢と負、透析年数と正、血清 Ca と正、血清 P と負、血清 Mg と正、血清 intact PTH と負、血清アルブミンと正、CRP と負、dROMs と負の関連を示した。一方、血清 CPP 濃度は dROMs と負の関連を示すのみであった (表 1)。

表 1 . 血清 CPP 濃度・T50 値と関連する因子

パラメータ	血清 CPP 濃度	T50
年齢	- 0.028	- 0.119*
透析年数	0.058	0.094*
血清 Ca	0.018	0.133*
血清 P	- 0.013	- 0.251*
血清 Mg	- 0.082	0.134*
Intact PTH	- 0.061	- 0.095*
血清 Albumin	0.052	0.160*
血清 CRP	- 0.007	- 0.275*
血清 dROMs	- 0.115*	- 0.136*

表の数字は Spearman 相関係数 (* P < 0.05)

(3)透析患者の CPP, T50 と死亡リスク：
血清 CPP 濃度は 5 年間追跡中の総死亡リスクと何ら関連を示さなかった (図 3)。

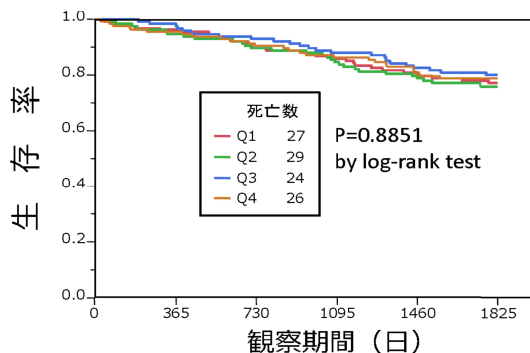


図 3 . 血清 CPP 濃度と透析患者の死亡リスク

一方、T50 は値が小さいほど総死亡リスクが高いことが Kaplan-Meier 法で示され、統計学的にも有意であった (図 4)。

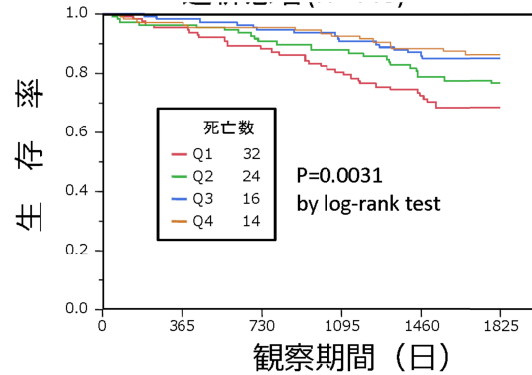


図 4 . T50 と透析患者の死亡リスク

T50 と死亡リスクとの関連を多変量 Cox 比例ハザードモデルを用いて解析した。年齢、性別、透析年数、原疾患 (糖尿病腎症)、CVD 既往の有無で調整後のハザード比 (95% 信頼区間) を図 5 に示す。

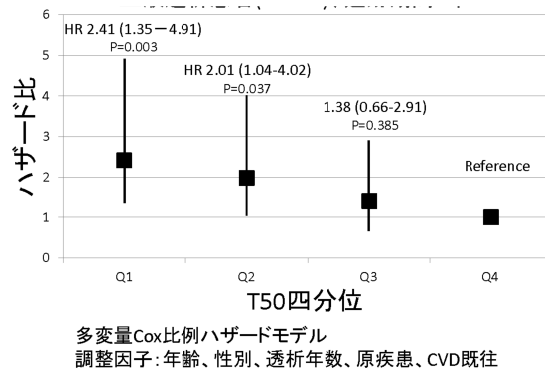


図 5 . 透析患者の T50 四分位と死亡リスク

これらの結果は、血液中の CPP の濃度が重要であるという当初の仮説とは異なるものの、病原体となる secondary CPP に変化しやすい CPP を有することが寿命の短縮に悪影響を与えていることを示唆しており、「CPP 病原体説」を支持するものであった。

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 5 件)

1. Miura Y, Iwazu Y, Shiizaki K, Akimoto T, Kotani K, Kurabayashi M, Kurosu H, and **Kuro-o M**. Identification and quantification of plasma calciprotein particles with distinct physical properties in patients with chronic kidney disease. *Sci Rep* 8:1256, 2018 (査読有)
2. Wanner C, Amann K, and **Shoji T**. The heart and vascular system in dialysis. *Lancet* 388: 276-284, 2016 (査読有)
3. **庄司哲雄** CKD と動脈硬化. *Total Vascular Management* 1: 33-36, 2016 (査読なし)

4. **庄司哲雄**. 活性型ビタミンD製剤. 腎と透析 79:469-474, 2015 (査読なし)
5. **Shoji T**, Marubayashi S, Shigematsu T, Iseki K, and Tsubakihara Y. Use of vitamin D receptor activator, incident cardiovascular disease and death in a cohort of hemodialysis patients. *Ther Apher Dial* 19: 235-244, 2015 (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. **Tetsuo Shoji**. Effects of vitamin D receptor activators (VDRAs) on survival and CVD in CKD patients. The 18th Congress on Nutrition and Metabolism in Renal Disease, 2016年
2. **庄司哲雄**. C K Dにおける脂質管理. 第59回日本腎臓学会総会, 2016年
3. **庄司哲雄**. 慢性腎臓病における心血管病変と脂質管理. 第46回日本腎臓学会西部学術大会, 2016年
4. **庄司哲雄**. ビタミンDの心血管系に対する多面的作用の可能性: 観察研究から介入研究へ. 第34回腎と骨代謝研究会学術集会, 2015年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/departments/rounen-geriatrics-vascular.shtml>

6. 研究組織

(1)研究代表者

庄司 哲雄 (SHOJI, Tetsuo)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 40271192

(2)研究分担者

森 克仁 (MORI, Katsuhito)
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 60382040

絵本 正憲 (EMOTO, Masanori)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 90275248

黒尾 誠 (KURO-0, Makoto)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10716864

(3)連携研究者

(4)研究協力者

仲谷 慎也 (NAKATANI, Shinya)
上殿 英記 (UEDONO, Hideki)