様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　６ 月 ２０ 日現在

機関番号：３２２０２
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｈ０５３０２

研究課題名（和文）動脈硬化の新規治療標的の同定と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Identification of novel therapeutic targets for arteriosclerosis

研究代表者
黒尾　誠（Kuro-o, Makoto）

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：１０７１６８６４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　13,400,000円

研究成果の概要（和文）：動脈硬化には、粥状硬化と血管石灰化という二つの異なる病態が混在する。粥状硬化の治療標的はコレステロールであり、スタチンが治療薬として確立しているが、血管石灰化は治療標的も治療薬も確立されていない。最近、血中を流れるリン酸カルシウムのコロイド粒子（CPP）が血管石灰化と相関することが報告され、CPPが血管石灰化の治療標的となる可能性が示された。本研究では、CPPに作用する薬物Xを同定し、さらに薬剤Xの投与によって血管石灰化が抑制されることを動物実験で確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究の学術的意義は、ある特定の物性・組成を持つリン酸カルシウムのコロイド粒子CPPが血管石灰化の原因物質となり得ることを示したことである。本研究の社会的意義は、有効な治療薬が存在しない血管石灰化に対し、他の疾患の治療薬として既に広く使われている薬剤Xが有効である可能性を示したことである。したがって、薬剤Xが血管石灰化の治療薬として有効か検証する臨床治験はドラッグ・リポジショニングになるので、臨床応用へのロードマップは大幅に短縮・コストダウンできるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Two types of arteriosclerosis, atherosclerosis and vascular calcification, have distinct pathophysiology. It has been well established that atherosclerosis is caused by cholesterol and that statins that lowers serum cholesterol levels have been widely used as therapeutic reagents for atherosclerosis. In contrast, neither therapeutic targets nor effective reagents have not been identified for vascular calcification. Recent studies have demonstrated that the severity of vascular calcification are correlated with serum levels of calciprotein particles (CPP), colloidal particles containing calcium-phosphate precipitates. In this study, we have identified a compound that potentially alters physical properties of CPP to reduce the ability of CPP to induce cell damage and calcification. Using an animal model for vascular calcification, we have succeeded in showing that administration of the compound is effective in the treatment of vascular calcification.

研究分野：抗加齢医学

キーワード：動脈硬化　CPP　リン　カルシウム　Fetus-A

１．研究開始当初の背景

（1） 生体内コロイド粒子 CPP の発見：水に溶けない物質を血流に乗せて臓器間を運ぶ際、生体はそれを蛋白質に吸着させ、コロイド粒子にして血中に分散させて運ぶ。生体内の不溶性物質の代表に、脂質とリン酸カルシウムがある。脂質はアポ蛋白に吸着され、リポ蛋白というコロイド粒子となって血中に分散する。リン酸カルシウムは、母乳中では乳蛋白のカゼインに吸着され、カゼインミセルというコロイド粒子となって分散しているため、母乳には溶解度を遥かに超える量のリンとカルシウムが含まれており、乳児に効率良く骨の原料を与えることができる。血中では、リン酸カルシウムは血清蛋白 Fetuin-A に吸着され、CPP（Calciprotein particle）というコロイド粒子となって分散する。CPP は、食事で摂取したリンとカルシウムを消化管から骨へと運ぶ血中の担体と考えられている（**表1**）（Kuro-o M. *Nat Rev Nephrol* 9, 650, 2013）。脂質の貯蔵先は脂肪組織であり、リン酸カルシウムの貯蔵先は骨である。しかし、脂質が本来の貯蔵先である脂肪細胞ではなく血管に貯まると、粥状硬化という病態を呈する。リン酸カルシウムが本来の貯蔵先である骨ではなく血管に貯まると、血管石灰化という病態を呈すると考えられる。

表1：生体内コロイド粒子の生理と病理

不溶性物質	脂質	リン酸カルシウム（CaPi）	
蛋白	アポ蛋白	カゼイン	Fetuin-A
コロイド粒子	リポ蛋白	カゼインミセル	CPP
分布	血液	母乳	血液
貯蔵先	脂肪細胞	乳児	骨
病態	動脈硬化（粥状硬化）	－	動脈硬化（血管石灰化）

（2） CPP の形成と成熟の過程：血中のリンとカルシウムは過飽和の状態なので、食後の一過性の血中リン濃度上昇でもリン酸カルシウムが析出する危険がある。リン酸カルシウムは、結晶構造を取らない非晶質（amorphous）の形で析出するが、血中の Fetuin-A 蛋白に速やかに吸着され、naïve CPP（Fetuin-A 一分子と非晶質リン酸カルシウムからなる CPP）が形成されると考えられている。naïve CPP は、時間の経過とともに相互に凝集したり、リン酸カルシウムが非晶質から結晶へと相変換を起こしたりして、物性の異なる mature CPP へと変化していくものと考えられている（**図1**）。mature CPP を培養血管平滑筋細胞に作用させると石灰化が誘導されること、培養マクロファージに作用させると自然免疫反応が誘導されること、などが分かっている。

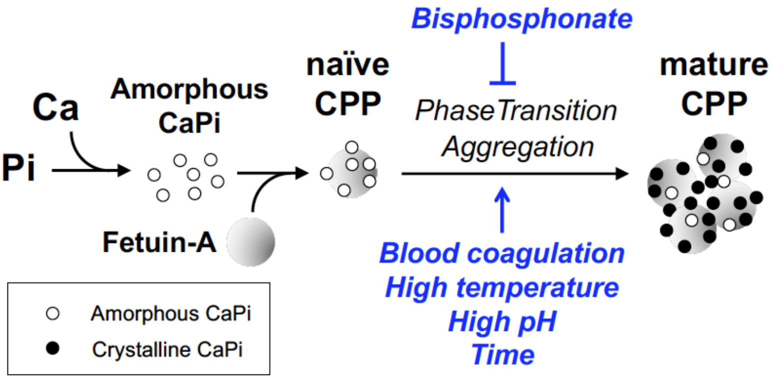


図1：CPP の形成・成熟過程
naïve CPP の相転換や凝集を促進する因子として血液凝固、高温、高 pH 等が、相転換を抑制する薬剤としてビスホスホネート（Bisphosphonate）が同定されている。

（3） 血中 CPP レベルと血管石灰化・非感染性慢性炎症の相関：最近の臨床研究で、血中 CPP レベルと冠動脈石灰化スコアや大動脈脈波速度など動脈硬化の臨床指標、および血中の炎症マー

カー値が相関することが明らかとなった。上述の *in vitro* での CPP の活性を考えると、この相関関係は実は因果関係である可能性が指摘されている。

２．研究の目的

以上の背景から導かれた仮説が「CPP 病原体説」である。すなわち、naïve CPP が食事で摂取したリンとカルシウムを骨へと運ぶ血中の担体として生理的な役割を担うのに対し、mature CPP は、あたかも病原体のように慢性炎症を誘導するとともに、血管石灰化の原因物質として機能する、という仮説である。この CPP 病原体説を検証するため、本研究では、先ず血中 CPP の物性・組成を測定する系を開発して naïve CPP と mature CPP を識別する方法を確立し、次にマウスの血管石灰化モデルを用いて、naïve CPP が mature CPP へと変化する過程を抑制すると想定される薬剤を投与することで血管石灰化が治療可能か検討することを目的とした。

３．研究の方法

（1） CPP の物性・組成を測定する系の開発：ピロリン酸の誘導体であるビスホスホネート（Bisphosphonate）は、破骨細胞を傷害する生物学的活性があることから、骨粗鬆症の治療薬として広く使われている薬剤である。一方、ビスホスホネートにはリン酸カルシウム結晶に結合する性質があり、リン酸カルシウムの非晶質から結晶への相転換を阻害する物理化学的活性がある（**表2**）。したがって、ビスホスホネートの存在下では naïve CPP が mature CPP へ変化できないと考えられる。mature CPP は、リンとカルシウムと Fetuin-A を含む溶液を放置すると自動的に形成されるが、ビスホスホネート存在下ではどのような CPP が形成されるのか、X 線小角散乱法（small angle X-ray scattering; SAXS）を用いて検討した。SAXS とは、サンプルに X 線を照射した時に発生する散乱 X 線のうち、散乱角が数度以下のものを観察することによって 1~100 nm の構造情報を得る手法である。最大の特長はサンプルを結晶化する必要がないことで、CPP のようなコロイド粒子を液相に分散させたままの状態で解析可能であり、CPP の粒子径や形状などの物性についての情報を得ることができる。CPP の量については、我々が開発した gel filtration 法を用いて測定した（**図2**）。

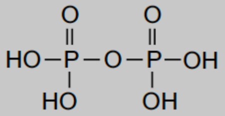
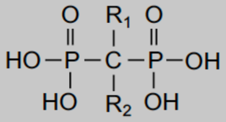
	ピロリン酸	ビスホスホネート
構造		
In vitro	• リン酸カルシウム結晶に結合 • 結晶の成長を阻害 • リン酸カルシウムの相転換の阻害	• リン酸カルシウム結晶に結合 • 結晶の成長を阻害 • リン酸カルシウムの相転換の阻害
In vivo	• 細胞外に分泌される。 • 石灰化を抑制する。 • TNALPで加水分解されてリン酸の供給源となる。	• 骨に沈着する。 • 破骨細胞に対する毒性を発揮し、骨粗鬆症の治療薬として用いられている。

表2：ピロリン酸とビスホスホネートの構造・活性

図2：CPP の定量（gel filtration 法）

近赤外線蛍光色素で標識したビスホスホネート（OsteoSense）を血漿に加え、リン酸カルシウム結晶を含む CPP に結合させた後、ゲル濾過スピンカラムで CPP に結合しなかった OsteoSense を分離し、CPP を含む濾液の蛍光強度を近赤外線スキャナーで測定し、CPP を定量する。

すなわち、gel filtration 法ではリン酸カルシウム結晶を含む mature CPP のみが測定できるのに対し、SAXS では naïve CPP と mature CPP の両者が測定できる。gel filtration 法と SAXS を組み合わせることで、異なる物性を持つ CPP の識別が可能となった。

（2） マウス血管石灰化モデルの治療：血管石灰化の動物モデルとしては、Klotho マウスを用いる。Klotho マウスは申請者が樹立した突然変異マウスで、早老症を呈する（Kuro-o M *et al. Nature* **390**, 45, 1997）。多彩な老化様症状の一環として、4～5 週齢頃から血管内皮障害、中膜石灰化（**図3**）、慢性炎症を呈し、8 週齢前後で死亡する。このマウスで欠損している遺伝子（Klotho 遺伝子）は、リン利尿ホルモン FGF23 の受容体をコードする。Klotho マウスでは FGF23 が作用できないため尿中へリンを排泄できず、血中リン濃度が上昇し、CPP の形成が亢進する。ちなみに、Klotho マウスに低リン食を与えて血中 CPP を減らすと早老症も改善する。血管石灰化を改善する可能性のある薬剤を Klotho マウスに 4 週齢から餌に混ぜて経口投与した。8 週齢で解剖して大動脈の血管石灰化が軽減するか、組織学的レベルおよび遺伝子発現レベルで検討する。

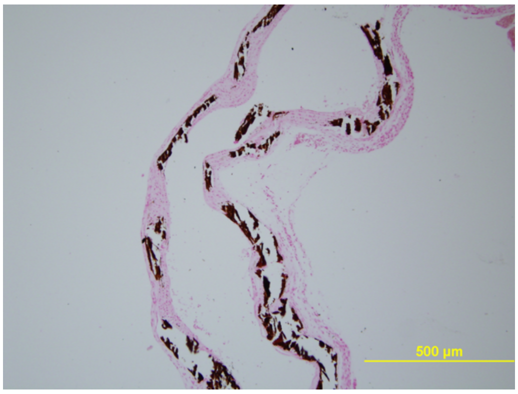


図3：Klotho マウスの血管石灰化
Klotho マウスの大動脈の von Kossa 染色。中膜の石灰化が黒く描出されている。Bar = 0.5 mm。

４．研究成果

（1） naïve CPP と mature CPP の物性解析：リンとカルシウムと Fetuin-A を一定濃度含む溶液を作成して 37℃で 24 時間インキュベートした後に SAXS で解析すると、粒子径数十 nm の CPP が形成されていた。この CPP は gel filtration 法で測定可能であり、リン酸カルシウム結晶を含む mature CPP であることが分かった。一方、同様の実験をビスホスホネート存在下で行うと、粒子径約 9 nm の小さな CPP が形成されていることが分かった。Fetuin-A 分子の直径が約 7 nm、非晶質リン酸カルシウムの直径が約 1 nm であることを考えると、この CPP は Fetuin-A 一分子に非晶質リン酸カルシウムが付着した naïve CPP であると考えられる。このように、gel filtration 法と SAXS を組み合わせれば、naïve CPP から mature CPP への変化を抑制する薬剤をスクリーニングすることができることが分かった。

（2） マウス血管石灰化モデルの治療：naïve CPP から mature CPP への変化を抑制する「薬剤 X」を Klotho マウスに投与した群（治療群）と投与しなかった群（対照群）を比較した。その結果、対照群よりも治療群の方が、①組織学的に血管石灰化が軽度で、②大動脈における炎症および骨芽細胞様形質変換のマーカー遺伝子の発現が低かった。すなわち、薬剤 X が血管石灰化に対して治療効果があることが動物モデルで証明された。

薬剤 X の物質名および数値データの詳細は、論文発表前であるため現時点では公表できないが、近い将来、原著論文として発表する。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　４件）

① Miura Y, Iwazu Y, Shiizaki K, Akimoto T, Kotani K, Kurabayashi M, Kurosu H and Kuro-o M (2018) Identification and quantification of plasma calciprotein particles with distinct physical properties in patients with chronic kidney disease. Sci Rep 8:1256. doi: 10.1038/s41598-018-19677-4（査読有）

② Kuro-o M (2018) Klotho and endocrine fibroblast growth factors: marker of chronic kidney disease progression and cardiovascular complications? Nephrol Dial Transplant 34:15-21. doi: 10.1093/ndt/gfy126（査読有）

③ Stenvinkel P, Painer J, Kuro-o M, Lanaspa M, Arnold W, Ruf T, Shiels PG and Johnson RJ (2018) Novel treatment strategies for chronic kidney disease: insights from the animal kingdom. Nat Rev Nephrol 14:265-284. doi: 10.1038/nrneph.2017.169（査読有）

④ Kuro-o M (2019) The Klotho proteins in health and disease. Nat Rev Nephrol 15:27-44. doi: 10.1038/s41581-018-0078-3（査読有）

〔学会発表〕（計　　０件）

〔図書〕（計　　０件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　　０件）

○取得状況（計　　０件）

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（８桁）：

(2)研究協力者
研究協力者氏名：小林修三
ローマ字氏名：KOBAYASI, syuzo

研究協力者氏名：苅尾七臣
ローマ字氏名：KARIO, kazuomi

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。