

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08941

研究課題名(和文)慢性腎臓病における血中Calci-protein particle測定の臨床的意義

研究課題名(英文)Clinical significance of blood calci-protein particle in chronic kidney disease

研究代表者

岩津 好隆 (Iwazu, Yoshitaka)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：40424014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病においてリン過剰が血管石灰化を引き起こし、心血管疾患死の原因となる。リン過剰を反映する可能性のあるcalci-protein particle (CPP)を測定し、慢性腎臓病進行における臨床的意義を検討した。低比重CPPは全ての慢性腎臓病症例で認められ、腎機能低下だけではなく、加齢とともに増加した。高比重CPPは慢性腎臓病患者の一部で認められ、腎機能低下とともにその割合は増加した。CPPは慢性腎臓病の病態だけではなく、加齢の病態にも関与している可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高比重calci-protein particle (CPP)はより細胞毒性の強い形態であり、その有無で比較した結果、血清無機リン値の臨床判断値の見直し、つまり高リン血症の定義の見直しが必要であることが示唆された。血清無機リン値と血漿CPP値は異なる指標である可能性が示唆されるため、高リン血症の見直しだけではなく、毒性を直接反映する血漿CPP測定を臨床応用することで、慢性腎臓病患者だけではなく、全ての国民のリン過剰による生体への悪影響を予防できるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Excess phosphate causes vascular calcification in chronic kidney disease (CKD), leading to death of cardiovascular disease. We measured the calci-protein particles (CPP), which may reflect phosphate excess, and examined their clinical significance in the progression of CKD. Low-density CPP was found in all cases of CKD and not only decreased renal function but also increased with aging. High-density CPP was found in a part of patients with CKD, and its proportion was increased with decreased renal function. It is suggested that CPP may be involved not only in the pathogenesis of CKD but also in the pathogenesis of aging.

研究分野：臨床検査医学、腎臓病学、抗加齢医学

キーワード：Calci-protein particle リン過剰 慢性腎臓病 加齢

1. 研究開始当初の背景

(1)慢性腎臓病では心血管疾患死が多い

糸球体濾過量 (GFR: Glomerular Filtration Rate) 低下や蛋白尿が心血管疾患発症の強力な危険因子であり、慢性腎臓病 (CKD: Chronic Kidney Disease) では、心血管疾患が原因で腎代替療法に至る前に亡くなってしまふ。従って、CKD 診療 (慢性腎不全保存期) においては腎不全の進行を抑制するとともに、心血管疾患発症を未然に防ぐことが重要である。

(2)慢性腎臓病における心血管疾患発症にリン過剰が関与する

CKD にもなう骨ミネラル代謝異常 (CKD-MBD: mineral and bone disorder) は、血管石灰化を介した心血管疾患発症の独立した危険因子であり、心血管疾患発症を予測する血清無機リン (iP) 値と線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor: FGF) 23 である。CKD では FGF23 分泌促進などを介したリン利尿作用により代償されるため、末期まで血清 iP 値は上昇しないため、血清 FGF23 値が間接的にリン過剰を反映している。つまり、リン過剰を直接反映する指標はない。

(3)リン過剰 (毒性) を反映する指標は血中 calciprotein particle である可能性がある

基礎実験において、リン過剰が血管石灰化をきたす直接の原因は、リンの作用ではなくリン過剰により形成されたリン酸カルシウム結晶による影響であることが明らかとなっている。生体内においてリン酸カルシウム結晶は、血液中の Fetuin A という蛋白に吸着され、それが重合した calciprotein particle (CPP) と呼ばれるナノ粒子 (径 50-200nm) として存在している。CPP はコロイド状に液相に分散し、リン酸カルシウム結晶が成長して管腔を閉塞するのを防ぎ、P の Internal balance に関与する可能性が考えられるが、その役割や病的意義については不明な点が多い。

2. 研究の目的

以上の背景から、我々は血液中に含まれる無機リンの中で CPP として存在するリン酸カルシウム結晶がリン毒性の真犯人であり、血液中 CPP がリン過剰 (毒性) を反映する指標であるという仮説を提唱している。本研究は、ほとんど検討されていない CKD 保存期において、腎機能低下と CPP の関係を検討し、血清 iP 値に含まれる CPP の臨床的意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CPP の定量については、我々が開発した gel filtration 法を用いて測定した。gel filtration 法とは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 を定量する方法である。

(2) 血漿 CPP [total CPP (T-CPP)], 16000g2 時間遠心分離した上清中の CPP [low density-CPP (L-CPP)] を gel filtration 法で測定した。T-CPP から L-CPP を引いた値が 5000 以上を high density-CPP (H-CPP) とした。

(3) 同意を得た CKD 症例 (n=223) から、臨床情報と血液・尿を得た。血漿 CPP 値は -80 までの凍結時間、血漿の凍結融解の回数や保存方法などに大きく影響されるため、血液は採取をただちに分離し、血漿 CPP 値測定まで -80 で保存し、CPP 値測定には凍結融解していない血漿検体を使用した。血漿 CPP 値を測定する以外に、年齢、性別、既往歴、血圧、推算 GFR、血清カルシウム (Ca)、iP、マグネシウム、副甲状腺ホルモン (iPTH)、fibroblast growth factor (FGF) 23、1,25(OH)₂D₃ (ビタミン D) 値、炎症反応、肝検査や尿検査の情報を得た。

(4) 対象者にはインフォームド・コンセントを行い、研究を実施した。研究は、自治医科大学倫理審査委員会の承認を得た (受付番号: 臨大 17-043)。

4. 研究成果

収集したデータを解析し、下記の知見を得た。

(1) 承諾を得た 148 症例を使用し、CKD のステージまたは推算 GFR ごとの血漿 T-CPP 値、血漿 L-CPP 値、血漿 T-CPP 値、血漿 L-CPP 値に影響すると予想される因子との関連について検討した。CKD ステージ 1、2、3、4、5 はそれぞれ 11、30、63、29、15 症例であり、ステージの進展とともに血漿 T-CPP 値は増加した。単相関では、血漿 T-CPP 値は年齢、血清 iP、FGF23 値と正の相関を認め、推算 GFR や活性型ビタミン D 値とは負の相関を認めた。重回帰分析の結果では、年齢と血清 iP 値が関連した。血漿 L-CPP 値は血漿 T-CPP 値、年齢、血清 FGF23 や iP 値と正の相関関係を認め、特に血漿 T-CPP 値と強い相関を認めた ($r = 0.981$)。また、推算 GFR や血清活性型ビタミン D 値とは負の相関を認めた。重回帰分析の結果では、年齢と血清 iP、FGF23 値が

関連した。

血漿 H-CPP は 148 症例中 49 症例で検出され、検出されない症例と比較し、有意に推算 GFR や血清活性型ビタミン D 値が低値で、血清 iP、FGF23、iPTH 値、血漿 T-CPP、L-CPP 値が高値であった。

(2) CKD ステージ 5 の 28 症例（透析症例は含まない）において、リン吸着剤内服の有無による血清 iP 値と血漿 T-CPP 値の違いについて検討した。その結果、リン吸着剤内服の有無により血清 iP 値に有意差は認めなかったが、リン吸着剤内服群では血漿 T-CPP 値は低下していたため、血漿 T-CPP 値は血清 iP 値とは異なる指標となる可能性がある。

(3) H-CPP 陽性群と陰性群の血清 iP 値を CKD ステージ毎に比較検討した。血液透析を含めた腎代替療法導入前（保存期）の症例では血清 iP 値が 3.5mg/dL 以上（文献 ）、血液透析患者では 5mg/dL 以上（文献 ）で死亡リスクが増大すると報告されているが、H-CPP 陽性となる血清 iP 値もほぼ同じ値であった。CPP の中でも、比重が高く粒子径が大きい H-CPP は石灰化を誘導する活性が高く、死亡リスク増大に寄与しているため、保存期の高リン血症の定義を再検討する必要がある。

(4) 腎サルコイドーシス症例の血清 T-CPP 値を測定した結果、活動期には著明高値であったが、治療後速やかに低下し、寛解期には上昇を認めなかった。腎サルコイドーシスの病態への CPP の関与が示唆された。

(5) 外来維持血液透析症例 80 名を用いた解析で、単相関では、血漿 T-CPP は血清 iP、Ca、ナトリウム(Na)および FGF23 値と正の相関を、血清 FGF19 値とは負の相関を認め、血漿 L-CPP 値は血清 iP、Ca、C 反応性蛋白 (CRP) および FGF23 値と正の相関を認め、血漿 H-CPP 値は血清 iP、Na、クロライドおよび FGF23 値と正の相関を認めた。重回帰分析の結果では、血漿 T-CPP 値は血清 iP、Ca と FGF-19 値、血漿 L-CPP 値は血清 iP、Ca と CRP 値、血漿 H-CPP 値は血清 iP 値が関連した。このことから血漿 CPP 値は血清 iP 値がこれまでの研究結果同様に共通の影響因子でしたが、血漿 T-CPP、L-CPP や H-CPP ごとに影響因子が異なることが明らかとなった。特に L-CPP が CRP と関連したことは、CPP が非感染性慢性炎症の原因物質である可能性を示している。

腎機能低下とともに血漿 L-CPP 値は増加し、血漿中に H-CPP を認める症例の割合は増加した。L-CPP は年齢とも関連し、加齢に関与している可能性が示唆され、今後の検討課題であると考えられる。

血漿 CPP 値は血清 iP 値とは異なる指標である可能性があるが、どのような臨床的な意義があるかについては引き続き検討していく予定である。

CPP が非感染性慢性炎症に関与している可能性があり、サルコイドーシス（慢性炎症）以外に関与する病態についても検索していく必要がある。

< 引用文献 >

Kestenbaum B, Sampson JN, Rudser KD, Patterson DJ, Seliger SL, Young B, Sherrard DJ, Andress DL. Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. J Am Soc Nephrol.16(2),2005,520-8.

Nakai S, Akiba T, Kazama J, Yokoyama K, Fukagawa M, Tominaga Y, Iseki K, Tsubakihara Y; Patient Registration Committee of the Japanese Society for Dialysis Therapy, Tokyo, Japan. Effects of serum calcium, phosphorous, and intact parathyroid hormone levels on survival in chronic hemodialysis patients in Japan. Ther Apher Dial. 12(1),2008:49-54.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Iwazu Y, Muto S, Ioka T, Watanabe Y, Iwazu K, Kusano E, Nagata D	4. 巻 72
2. 論文標題 Multiple sclerosis drug fingolimod induces thrombotic microangiopathy in deoxycorticosterone acetate/salt hypertension Hypertension	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hypertension	6. 最初と最後の頁 776-784
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10655.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miura Yutaka, Iwazu Yoshitaka, Shiizaki Kazuhiro, Akimoto Tetsu, Kotani Kazuhiko, Kurabayashi Masahiko, Kurosu Hiroshi, Kuro-o Makoto	4. 巻 8
2. 論文標題 Identification and quantification of plasma calciprotein particles with distinct physical properties in patients with chronic kidney disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1256
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-19677-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kotani Kazuhiko, Yamada Shingo, Takahashi Hirokazu, Iwazu Yoshitaka, Yamada Toshiyuki	4. 巻 20
2. 論文標題 The Ratio of Oxidized Lipoprotein(a) to Native Lipoprotein(a) and the Endothelial Function in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4909 ~ 4909
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20194909	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirano Yoshitaka, Kurosu Hiroshi, Shiizaki Kazuhiro, Iwazu Yoshitaka, Tsuruoka Shuichi, Kuro o Makoto	4. 巻 10
2. 論文標題 Interleukin 36 as a potential biomarker for renal tubular damage induced by dietary phosphate load	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 894 ~ 903
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.12845	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Iwazu Yoshitaka, Kuro-o Makoto, Miura Yutaka, Takeda Shin-ichi, Yamada Toshiyuki, Nagata Daisuke	4. 巻 -
2. 論文標題 Calciprotein particles and fibroblast growth factor 23 contribute to the pathophysiology of hypercalcemia in a patient with renal sarcoidosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Kidney Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1093/ckj/sfz086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計13件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Iwazu Y, Muto S, Miura Y, Ioka T, Watanabe Y, Iwazu K, Kusano E, Nagata D
2. 発表標題 Long term FTY720 treatment induced renal arteriole endothelial injury in deoxycorticosterone acetate (DOCA)/salt hypertensive rat
3. 学会等名 The 27th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩津好隆, 三浦 裕, 黒尾 誠, 小谷和彦, 長田太助, 山田俊幸
2. 発表標題 慢性腎臓病におけるリン毒性マーカーとしての血漿Calciprotein particle
3. 学会等名 第58回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三浦 裕, 黒須 洋, 岩津 好隆, 小谷 和彦, 山田 俊幸, 黒尾 誠
2. 発表標題 血中CPPの新規測定法の確立
3. 学会等名 第58回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩津 好隆, 小谷 和彦, 黒尾 誠, 長田 太助, 山本 さやか, 鯉淵 晴美, 紺野 啓, 谷口 信行, 山田 俊幸
2. 発表標題 慢性腎臓病におけるリン吸着薬が血清無機リン値と血漿CPP値に与える影響を比較する
3. 学会等名 第65回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 食事性のリン摂取は、摂取後のFGF23分泌の増加から恒常的な高FGF23血症を誘導する
2. 発表標題 秋山 健一, 椎崎 和弘, 藤田 実希, 小原 麻里奈, 中野 寿洋, 三浦 裕, 岩津 好隆, 黒須 洋, 黒尾 誠
3. 学会等名 第62回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木村 貴明, 椎崎 和弘, 岩津 好隆, 黒須 洋, 清水 俊洋, 黒澤 明, 新里 高広, 久保 太郎, 南木 浩二, 黒尾 誠, 八木澤 隆
2. 発表標題 腎機能が正常でも腎臓でのKlotho遺伝子の発現低下は腎障害に関連する
3. 学会等名 第60回日本腎臓学会学術集会・総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木村 貴明, 椎崎 和弘, 岩津 好隆, 清水 俊洋, 黒澤 明, 南木 浩二, 秋山 健一, 小原 麻里菜, 黒尾 誠, 八木澤 隆
2. 発表標題 リン制限はCKDステージ3で開始すべきである
3. 学会等名 第59回日本腎臓学会学術集会・総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 岩津 好隆、小谷 和彦、長田 太助、黒尾 誠、谷口 信行、山田 俊幸
2. 発表標題 慢性腎臓病における尿沈査と尿細管障害の関連性 予備的検討
3. 学会等名 第63回日本臨床検査医学会学術集会・総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 岩津 好隆、黒尾 誠、椎崎 和弘、三浦 裕、金田 るり、黒須 洋、小藤田 篤、小谷 和彦、山田 俊幸、長田 太助
2. 発表標題 血漿Calciprotein particle値から慢性腎臓病の高リン血症を再考する
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩津 好隆、武藤 重明、三浦 裕、岩津 加奈、椎崎 和弘、黒尾 誠、山田 俊幸、谷口 信行、長田 太助
2. 発表標題 DOCA/食塩高血圧ラットにおける腎障害に対するフィンゴリモドの短期投与の効果 .
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩津 好隆、長田 太助、小谷 和彦、山田 俊幸
2. 発表標題 FTY720短期投与はミネラルコルチコイド/食塩高血圧ラットにおいて血圧を上昇させるが腎障害は軽減する .
3. 学会等名 第59回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩津 好隆, 黒尾 誠, 小谷 和彦, 長田 太助, 山本 さやか, 鯉淵 晴美, 紺野 啓, 谷口 信行, 山田 俊幸
2. 発表標題 慢性腎臓病における尿細管リンおよび尿酸排泄と尿細管障害の関係 結晶化と腎障害の関係
3. 学会等名 第66回日本臨床検査医学会学術集会・総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 岩津好隆	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 6
3. 書名 医学のあゆみ【老化の分子基盤】 リンと老化	

1. 著者名 秋山健一、岩津好隆	4. 発行年 2016年
2. 出版社 日本メディカルセンター	5. 総ページ数 1
3. 書名 【高齢化のなかでのCKD-MBDにどう対応するか?】 Calciprotein particle(CPP)とは	

1. 著者名 岩津好隆	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 7
3. 書名 尿定量検査はどう利用されているか.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	黒尾 誠 (Kuro-o Makoto) (10716864)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	
研究分担者	山田 俊幸 (Yamada Toshiyuki) (50211636)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	
研究分担者	小谷 和彦 (Kotani Kazuhiko) (60335510)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	