

機関番号 : 24701

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008 年度 ~ 2010 年度

課題番号 : 20590982

研究課題名 (和文)

腎機能障害に伴うリン過剰に応答するリン感受性機構と石灰化を伴う血管障害の検討

研究課題名 (英文)

The analysis of phosphate sensing system with the relationship between phosphate overload and vascular calcification in chronic kidney disease.

研究代表者

重松 隆 (SHIGEMATSU TAKASHI)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 30187348

研究成果の概要 (和文) :

本研究は、腎臓を標的とした新規リン利尿因子である Fibroblast Growth Factor-23 (FGF-23) を指標としてリン感受性機構を検討し、リン感受性亢進の *in vivo* 表現系として血管石灰化を捉え、将来的な血管石灰化抑制法を創出し、血管保護と抗加齢の手段の研究の方向性を示すことを目標とする研究である。

腎障害に伴い進展するリン代謝異常として、血管石灰化を惹起する二次性副甲状腺機能亢進症モデルを採用確立した。このモデルを用いて、FGF-23 の産生臓器を骨芽細胞由来の OPG が骨組織が主として産生する Fibroblast Growth Factor-23 (FGF-23) の産生・分泌に関与していることを明らかにした。

同様にリン過剰を感受する機構の直接効果を検討するため、ラット血管器官培養法を試み成功し手法として確立し、血管中膜の異所性石灰化が高リン条件化で促進される事を観察した。さらにこの機序にはナトリウム-リン共輸送体 (Pit-1) が関与し、アポトーシスを伴う事を明らかにした。

研究成果の概要 (英文) :

This study is the analysis for the relationship between phosphate overload and vascular calcification in chronic kidney disease. We have performed the study using FGF-23 (Fibroblast Growth Factor-23) as a marker of the phosphate sensing system with novel phosphaturic factor. This study is also the trial of novel prophylaxis modality for vascular damage with vascular calcification and aging. We have established the model of secondary hyperparathyroidism with vascular calcification as a phosphate and bone disorder in chronic kidney disease. In this *in vivo* model, we have revealed that main place on phosphate and FGF-23 metabolism is bone. We have also established medial vascular calcification *in vitro* model using vessel organ culture model. Using the *in vitro* model, the medial vascular calcification is accelerated under the high phosphate condition via apoptosis and sodium phosphate Pit-1 co-transporter system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000円	450,000円	1,950,000円
2009年度	1,400,000円	420,000円	1,820,000円
2010年度	600,000円	180,000円	780,000円
総計	3,500,000円	1,050,000円	4,550,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：人工透析学、リン過剰、異所性石灰化、腎機能不全、血管障害

1. 研究開始当初の背景

血清リン濃度をはじめ生体内のリン代謝調節を司る臓器のうち、決定的な調節機構をしめすのは腎臓である。この腎臓が慢性的に障害され更なる腎機能喪失の危険性を有する病態が慢性腎臓病（CKD：Chronic kidney disease）である。この慢性腎臓病の存在や部分症状である蛋白尿は、最近では死亡や心血管障害の有力な危険因子であることが知られている。この慢性腎臓病（CKD）の典型例は末期腎不全患者である維持透析患者である。こうした患者群では多くはリン酸カルシウム（Ca）の沈着としての血管石灰化を伴い、死因の多くは心血管疾患であることは良く知られていた。しかも、このような患者群ではリン酸 Ca の結晶であるハイドロキシアパタイトを有する骨組織の骨量が減少していることが明らかにされている。即ち、生体全体ではリン酸 Ca の総量は変らなくても、分布が骨組織から血管を中心とする軟部組織に移行することが考えられ、リン排泄臓器である腎臓の進展がこの移動を促進すると考えられる。

このリンの調節機構として、低リン血症を呈する軟部腫瘍由来の低リン血症や低リン血症性くるぶの症例の解析から、FGF-23（Fibroblast Growth Factor-23）という腎臓を標的臓器とする新規のリン利尿因子が発見報告されていた。しかしながら、この FGF-23 が腎機能不全の病態にて、どのような動態を呈してリン代謝異常と異所性石灰化の一環としての血管石灰化を有する血管障害にどのように関与しているかは明らかではなかった。また FGF-23 の産生分泌部位は不明の点が多く、腎臓の関与も不明の点が多い状況であった。

2. 研究の目的

上記の背景から、今回の研究期間内に以下の諸点を明らかにすることを目標にした。

- 1) 腎障害の存在下のリン負荷が、FGF-23 産生を *in vivo* において亢進させることの確認。
- 2) 腎障害の存在下のリン負荷でどの臓器が FGF-23 を産生し調節されているかを明らかにする。
- 3) 腎障害の存在下にて血管石灰化を確実に観察できるモデルを *in vivo* と *in vitro* で確立する。
- 4) 石灰化部位・FGF-23 産生臓器構成細胞のうち、いかなる細胞が FGF-23 を産生しているかを証明する。
- 5) FGF-23 を対象として、リン負荷がどのようにして発現調節を行なっているかを検討する。
- 6) リン負荷による FGF-23 産生亢進阻害の方法を模索し、血管石灰化の抑制手段を考案する。

本研究は、血管障害をリン過剰という点を主に据えて、その発症機序の分析を行った検討は少ない。その分析の key molecule に当研究は新規に発見された腎臓を標的臓器とする新規リン利尿因子である FGF-23 を取り上げている。特にこれまでに無い視点として、この FGF-23 をリン過剰状態における血管障害進展のリン感受性機構の可能性を想定し、*in vitro* における機能分析と *in vivo* における裏付けを試みた。

3. 研究の方法

- 1) 血管石灰化の *in vivo* モデルとして、高リン食飼育条件下にネフロン量減少慢性腎不全ラットを飼育し、二次性副甲状腺機能亢進症に伴う血管石灰化の形成と解析をおこなう。この血管石灰化と非石灰化部位から、発現遺伝子群を網羅的に検索する。これにより石灰化部位に特異的に発現が大きく変化する分子などを同定を行う。またこのモデルより、各種臓器から FGF-23 の遺伝子発現を検討する。また頭蓋骨を採取し骨組織培養系を確立し、高リン及び正リン条件下にて組織培養を行う。

一定期間を骨組織培養法にて培養後上清にて FGF-23 の濃度を測定し、骨組織の FGF-23 産生に対する関与を検討する。

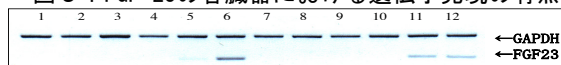
2) ヒトモデルとして、高リン血症を呈する慢性腎不全患者において腹部大動脈石灰化を CT 撮影にて定量化する方法を考案確立し、石灰化促進因子の同定を試みる。

3) リン負荷により確実に誘導される血管石灰化モデルを *in vitro* で確立する。SD ラット腹部大動脈を Lomashvili KA らの方法 [J Am Soc Nephrol 2004;15:1392-1401] に基づき組織培養を行い、Medium 中のリン濃度 1.0mM 以下と 3.5mM 以上の条件化の培養で *in vitro* 条件ですでに中膜石灰化を観察する。この血管石灰化モデルにて、石灰化部位と非石灰化部位を採取し、TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いた RNeasy MinElute cleanup kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) にて、RNA を精製し RNA 濃度を 260 nm 吸光度測定系にて調整後、1% agarose ゲルにて更に精製し、この RNA 試料を Filgen (Filgen Inc., Nagoya, Japan) システムを用いてマイクロアレイ解析を行う。実際には 2.0 μg の精製 RNA を RNA Transcript SureLABEL Core Kit (TaKaRa BIO Inc., Tokyo, Japan) にて標識し、アンチセンス RNAs を microarray chip (FilgenArray Rat 27k, Filgen Inc., Nagoya, Japan) と反応させハイブリダイズし、標識の強度を Array-Pro Analyzer Ver4.5 (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD, USA) にてカウントし、非石灰化部位をコントロールとして増減を検出する。今回、カウント 3 倍以上を陽性とし増加した遺伝子群のみならず減少した遺伝子群も検出し同定する。

4. 研究成果

1) 血管石灰化を伴う高リン血症と密接に関係する Fibroblast Growth Factor -23 (FGF-23) の産生臓器を骨組織であることを明らかにし報告した。更に骨芽細胞由来の Osteoprotegerin が、この FGF-23 の産生・分泌に関与していることを明らかにし報告した。【図 1】 FGF-23 遺伝子の各臓器発現：1) brain, 2) parathyroid/thyroid, 3) heart, 4) lung, 5) liver, 6) spleen, 7) kidney, 8) aorta, 9) small intestine, 10) large intestine, 11) calvarium, (12) tibia.

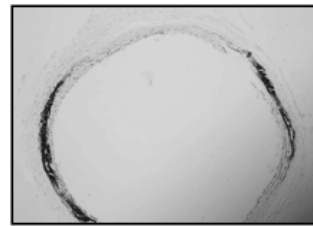
図 5 : FGF-23 の各臓器における遺伝子発現の有無



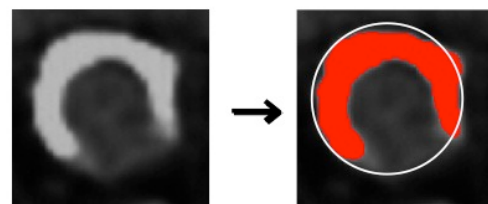
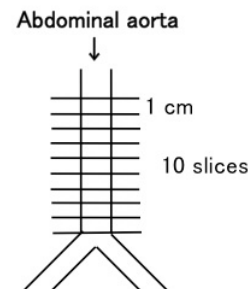
2) 1) の結果を受けて、骨を構成する細胞のうち骨芽細胞・破骨細胞・骨細胞のうちいずれの細胞が FGF-23 を産生するかどうかを検討し、骨細胞がその産生細胞であると示唆

するデータを得ている。この調節機構を更に検討するため、ラット頭蓋骨の左右別の組織培養確立を試み手法としては確立した。現在は培養条件を種々に変化させつつ、FGF-23 産生調節機構を検討している。この結果、FGF-23 の産生には従来考えられていたような副甲状腺ホルモン (PTH) ではなく、腎臓で活性化される活性型ビタミン D (1α, 25 dihydroxyvitamin D₃) である事を明らかにした。

3) リン過剰を感受する機構の直接効果を検討するため、ラット SD ラット腹部大動脈の血管器官培養法を試み成功し手法として確立した。このラット大動脈器官培養の *in vitro* 条件に高リン 3.8mM と正リン medium にて培養を行う事で、血管中膜の異所性石灰化が高リン条件化で促進される事を観察した。さらにこの機序にはナトリウム-リン共輸送体 (Pit-1) が関与し、アポトーシスを伴う事が判明し報告した【図 2】



4) 高リン血症を呈する慢性腎不全患者において腹部大動脈石灰化を CT 撮影にて定量化する方法 (ACAI : Aortic Calcification Area Index) を考案し報告した。今後は石灰化促進因子の同定を行っている。【図 3 と 4】



$$ACAI = \frac{\sum_{i=1}^{10} \frac{\text{The area of calcification (i)}}{\text{The cross-sectional area (i)}}}{10} \times 100(\%)$$

5) 上記の3)の血管石灰化モデルにて、石灰化部位と非石灰化部位を採取し、TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いた RNeasy MinElute cleanup kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)にて、RNAを精製しRNA濃度を260 nm吸光度測定系にて調整後、1% agarose ゲルにて更に精製した。その後、このRNA試料を Filgen (Filgen Inc., Nagoya, Japan) システムを用いてマイクロアレイ解析を行った。石灰化部位を非石灰化部位をコントロールとしてカウント3倍以上を陽性とし増減を検出した。今回、カウント3倍以上を陽性とし増加した遺伝子群のみならず減少した遺伝子群も検出し同定し報告した。

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11件)

1. Calcium oxalate crystal deposition in metabolic syndrome model rat kidneys.
Okamoto M, Kohjimoto Y, Iba A, Saji F, Hara I, **Shigematsu T.**
Int J Urol. 2010 ; 17(12):996-1003 (査読有り)
2. Improved assessment of aortic calcification in Japanese patients undergoing maintenance hemodialysis.
Ohya M, Otani H, Kimura K, Saika Y, Fujii R, Yukawa S, **Shigematsu T.**
Intern Med. 2010 ; 49 (19):2071-5 (査読有り)
3. Fibroblast growth factor 23 production in bone is directly regulated by 1{alpha},25-dihydroxyvitamin D, but not PTH.
Saji F, **Shigematsu T.**, **Sakaguchi T.**, Ohya M, Orita H, Maeda Y, Ooura M, Mima T, Negi S.
Am J Physiol Renal Physiol. 2010 ; 299(5):F1212-7 (査読有り)
4. Reduced expression of perlecan in the aorta of secondary hyperparathyroidism model rats with medial calcification.
Shibata M, **Shigematsu T.**, Hatamura I, Saji F, Mune S, Kunimoto K, Hanba Y, Shiizaki K, **Sakaguchi T.**, Negi S.
Ren Fail. 2010 ; 32(2):214-23 (査読有り)
5. CKD-MBD (Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder). Lanthanum carbonate and new phosphate binders in patients with chronic kidney disease].
Negi S, **Shigematsu T.**
Clin Calcium. 2010, 20(7):1096-102 (査読有り)

6. Mechanism of phosphate-induced calcification in rat aortic tissue culture: possible involvement of Pit-1 and apoptosis.

Mune S, Shibata M, Hatamura I, Saji F, Okada T, Maeda Y, **Sakaguchi T.**, Negi S, **Shigematsu T.**
Clin Exp Nephrol. 2009, 13(6):571-7 (査読有り)

7. Clinical aspect of recent progress in phosphate metabolism. Management of hyperphosphatemia.

Sakaguchi T., **Shigematsu T.**
Clin Calcium. 2009, 19(6):844-51 (査読有り)

8. Regulation of fibroblast growth factor 23 production in bone in uremic rats.

Saji F, Shiizaki K, Shimada S, Okada T, Kunimoto K, **Sakaguchi T.**, Hatamura I, **Shigematsu T.**
Nephron Physiol. 2009 ; 111(4):p59-66 (査読有り)

9. Long-term cinacalcet HCl treatment improved bone metabolism in Japanese hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism.

Shigematsu T., Akizawa T, Uchida E, Tsukamoto Y, Iwasaki M, Koshikawa S; KRN1493 Study Group.
Am J Nephrol. 2009 ; 29(3):230-6 (査読有り)

10. Multicenter prospective randomized, double-blind comparative study between lanthanum carbonate and calcium carbonate as phosphate binders in Japanese hemodialysis patients with hyperphosphatemia.

Shigematsu T.; Lanthanum Carbonate Group.
Clin Nephrol. 2008 ; 70(5):404-10 (査読有り)

11. Osteoprotegerin affects the responsiveness of fibroblast growth factor-23 to high oral phosphate intake.

Kagami S, Ohkido I, Yokoyama K, **Shigematsu T.**, Hosoya T.
Clin Nephrol. 2008 ; 70(4):306-11 (査読有り)

〔学会発表〕（計 12 件）

1. Negi S, **Shigematsu T**, the Japan COLC Study Group
Combined Therapy with Lanthanum Carbonate and Calcium Carbonate for Hyperphosphatemia Decreases Serum FGF-23 Level Independently of Calcium and PTH

7th, international Society of Uremic Toxin Research, 2011.5.14-16, Nagoya

2. **Shigematsu T**, Ueki H, Arima H, **Sakaguchi T**, et al.

The evaluation of affecting factors for phosphate removal during hemodialysis session using direct measurement of dialysate phosphate.

7th, international Society of Uremic Toxin Research, 2011.5.14-16, Nagoya

3. Negi S, **Shigematsu T** : Combination therapy with cinacalcet for patients with secondary hyperparathyroidism (SHPT) during intravenous vitamin D treatment-a randomized controlled trial comparing dose escalation of vitamin D pharmaceutical infusion and dose escalation of calcium carbonate-. 43rd Annual Meeting of American Society of Nephrology. 2010.11.16-21, Denver

4. **Shigematsu T**, Negi S: Sevelamer hydrochloride can improve the patients' survival in secondary hyperparathyroidism (2HPT) patients undergoing maxacalcitol therapy. International Society of Blood Purification 28th Annual Meeting. 2010.9.24-26, California

5. **重松隆** : モーニングセミナー5 「CKD 患者におけるリンとカルシウムのコントロール」 第 53 回 日本腎臓学会学術総会 2010. 6. 16-18. 神戸

6. 根木茂雄・**重松隆** : シンポジウム 2 「リン吸着薬の効果的な使用」 第 55 回 (社) 日本透析医学会学術集会・総会 2010. 6. 18-20. 神戸

7. 藤田寿実子・北林豊文・半羽慶行・**重松隆** : ワークショップ 4 「生命予後改善には透析量増大を併用した血清リン値低減と血清アルブミン値維持が重要である」 第 55 回 (社) 日本透析医学会学術集会・総会 2010. 6. 18-20. 神戸

8. **Shigematsu T**: Session 1 「Hemofiltration and sorbent: Experience in Japan」 The 3rd Indonesian Nephrology Forum(INF) . 2010.5.20-23, Jakarta

9. Ohya M, Otani H, Kimura K, Saika Y, Fujii R, Yukawa S, **Shigematsu T**: Vascular calcification estimated by aortic calcification area index is significant predictive parameter of cardiovascular mortality in hemodialized patients. ISN NEXUS Symposium. 2010.4.15-18, Kyoto

10. Saji F, **Sakaguchi T**, Ohya M, Negi S, **Shigematsu T**: Fibroblast growth factor 23 synthesis in bone is directly regulated by 1 α ,25-dihydroxyvitaminD, but not PTH. ISN NEXUS Symposium. 2010.4.15-18, Kyoto

11. **Sakaguchi T**, **Shigematsu T**: How early should be the referral to the nephrologist to ameliorate the condition of CKD patients at the time of hemodialysis initiation? ISN NEXUS Symposium. 2010.4.15-18, Kyoto

12. **Shigematsu T**: Sevelamer hydrochloride can improve the CKD-5D patients survival in secondary hyperparathyroidism (2HPT) patients undergoing maxacalcitol therapy. ISN NEXUS Symposium. 2010.4.15-18, Kyoto

〔その他〕

和歌山県立医科大学 腎臓内科・血液浄化センター

「<http://www.wakayama-med.ac.jp/med/nephrology/index.html>」

日本腎臓病研究会

「<http://jbbk.mitsuihosp.or.jp/>」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

重松 隆 (SHIGEMATSU TAKASHI)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：30187348

(2) 研究分担者：

坂口 俊文 (SAKAGUCHI TOSHIFUMI)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：70343423