

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591222

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リンセンサーの探索

研究課題名(英文)The search trial of phosphorus sensing system or sensing molecule for phosphorus overload in chronic kidney dysfunction

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：リンは必須であるが過剰では毒性を発揮する。腎機能障害ではリン毒性として血管障害が起きる。本研究はリン毒性克服を目指す基礎研究である。

高リン条件10日間の血管組織培養にてex vivoによる血管中膜石灰化を伴う障害の再現に成功した。次に血管のリン感受性機構もしくはリン感受性分子の探索を試みた。そのうちの一つにリン輸送体であるPit-1があり、リン感受性機構を有すると思われる部位を明らかにした。リン毒性誘発性の血管障害性には骨に由来する線維芽細胞増殖因子23(FGF23)が強く関連することが明らかになり、FGF23産生を指標としてリン感受性機構を有すると思われる部位を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Phosphorus is essential, but its excess shows the toxicity. This study is fundamental researches aiming at phosphorus toxicity conquest.

Firstly, I have estimated vascular calcification as the phosphorus toxicity in clinical study with hemodialysis patients. Secondly, I have tried to establish the phosphorus induced vascular calcification model in vitro to know the detail mechanism of vascular disorder by phosphorus. We have succeeded ex vivo vascular medial calcification model by the aortic tissue culture under high phosphorus condition 3.8mM for ten days. Next, I have made a research the phosphorus sensing system and/or phosphorus induced molecules. Fibroblast growth factor 23 (FGF23) derived from a bone has been explicated to play key role in phosphorus toxicity-induced vascular dysfunction. I am progressing the research to know the detail phosphorus sensing mechanism by FGF23 production and by the vascular medial calcification.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床学・腎臓内科学

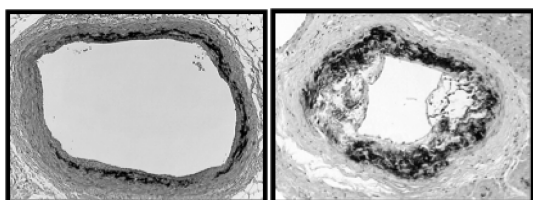
キーワード：リン FGF-23 骨 リン吸着剤 血管石灰化 リン感受性

1. 研究開始当初の背景

我が国における慢性維持透析患者は 2010 年度末で 30 万人弱に達していた。これらの患者の主たる死因は、一般人口例の悪性新生物等ではなく心血管障害が多くを占め全く異なった結果を示しており、この傾向は 2013 年度末でも同様に続いている。この原因としては慢性腎臓病 (CKD: Chronic Kidney Disease) が血管障害の高リスクになっている事があげられる。この一つの特徴として、非慢性腎臓病患者の粥状動脈硬化症に認められる肥厚した血管内膜石灰化とは異なり、狭窄を伴わない中膜石灰化を中心とする血管石灰化病変が知られていた【図 1】。

【図 1】ヒト冠動脈石灰化組織像 [自験例]

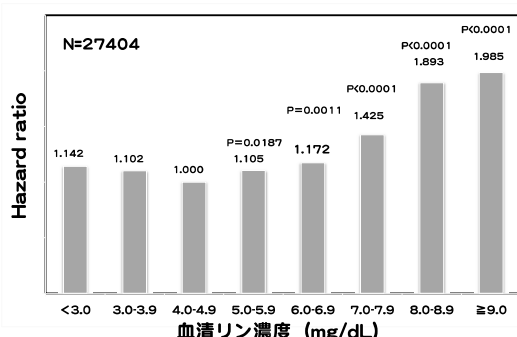
[A] 慢性腎臓病例 [B] 非腎臓病例



この血管中膜石灰化は高リン血症が危険因子となる事が示唆されつつあった。実際の臨床医学においても、慢性維持透析患者においては高リン血症では生命予後が悪化する事が報告している (Nakai S, et al. Ther Apher Dial. 12:49-54, 2008) 【図 2】。

リンは本来ヒトにおいては骨や歯形成に必須であるばかりなく、遺伝子の成分やエネルギー代謝・細胞内情報伝達など必須の元素である。しかしながら一方では毒物として良く知られているヒ素と類似した性格を持ち、過剰では毒性を発揮する。このため厳密に調節

【図 2】血清リン濃度と生命予後



節されている必要性があり、その中心的な役割を果たす臓器が腎臓と骨である。腎臓ではリン代謝のみならず老化阻止にも関連性の深いClotho蛋白が産生され、骨からはClotho蛋白のLegandになる線維芽細胞増殖因子 23 (FGF-23) が産生され、これらはリン毒性の際にも大きく変動することが示唆されている。このため、慢性腎臓病 (CKD: Chronic Kidney disease) のような腎機能障害では生体におけるリン調節機構が破綻し、リン過剰によるリン毒性が出現してくると考えられる。このリン毒性【図 2】の一つでもっとも生命予後に影響を与えるのが血管障害【図 1 左パネル】である。

2. 研究の目的

本研究は大きくは、リン過剰によって惹起されるリン毒性の克服を目指す基礎研究である。リンはホルモンとは異なり古典的な標的臓器は不明である。これまでリン負荷の効果が観察荒れている臓器は腎臓と骨組織がある。腎機能障害に伴うリン過剰によって起こるリン毒性を、新たに発見され確立しつつある血管障害・特に特異性の高い血管中膜の石灰化を指標にして再評価し確立させることを最初の目標とした。更に、このリン過剰によるリン毒性発現に先行して起きる変化から、リン感受性機構とリンセンサーの探索を行なうことを目的とする。将来はこれらの研究成果から、血管石灰化や血管障害の予防策や阻止治療が生み出すことも視野に入れたい。

3. 研究の方法

3つのパートに分れる。

(1)リン感受性の探索：

リン負荷により生体に起こる現象を科学的に捉える。リン負荷により反応する臓器や細胞や臓器相関を示すシステムを明らかにする。このリン反応性を有する臓器や細胞やシステムにリン感受性機構が内在していると考えるのは妥当と思われる。

(2)リン感受性の指標としての血管系の解析：

次の段階として、リン負荷に反応する臓器として血管を選択した。血管特に血管平滑筋細胞を有する動脈が特に特異性の高い血管中膜の石灰化を指標にして、リン負荷言い換えればリン毒性を客観的に評価し確立することを最初の目標とした。

(3)他臓器におけるリン反応性の検討：

同様の考え方から、骨組織系と免疫系をリン負荷に対する反応性を有する一すなわちリン感受性を示す系として探索した。

4. 研究成果

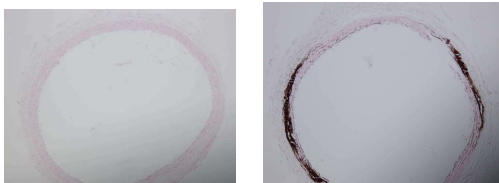
(1) (2)リン感受性の探索とリン感受性の指標としての血管系の解析

リン感受性臓器として、既にいくつかの施設から血管平滑筋細胞の異所性石灰化を促進されている中膜を有する動脈を選択した。これは我々が既に御モデルとして試みていた組織である

- Shibata M, Shigematsu T, Hatamura I, et al. Ren Fail. 2010 Jan;32(2):214-23
- Mune S, Shibata M, Hatamura I, et al. Clin Exp Nephrol. 2009 Dec;13(6):571-7

より体系的に解析するために、*in vitro* による動脈石灰化の再現を目指した。これまで高リン血症を呈する腎不全患者では、一般的な粥状動脈硬化症による血管狭窄と内膜の石灰化とは異なり、動脈の狭窄を伴わない中膜石灰化が頻発する事が知られていた。そこで本研究では、腎機能正常すなわち高リン血症を呈していない(正常以上のリン負荷の無い条件下)ラットから、腹部大動脈を中心とした動脈を摘出し、高リン条件での血管組織培養(Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEMにて培養)にて*ex vivo*による血管中膜石灰化を伴う障害の再現に成功した【図3】。

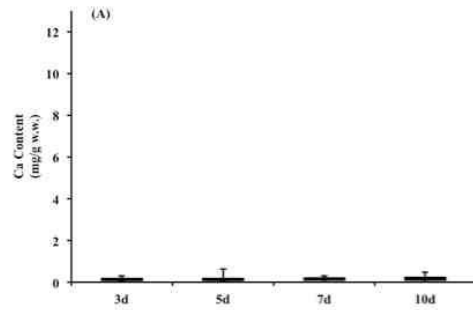
【図3】10日間血管組織培養における高リン負荷による動脈中膜石灰化の*Ex vivo*における再現



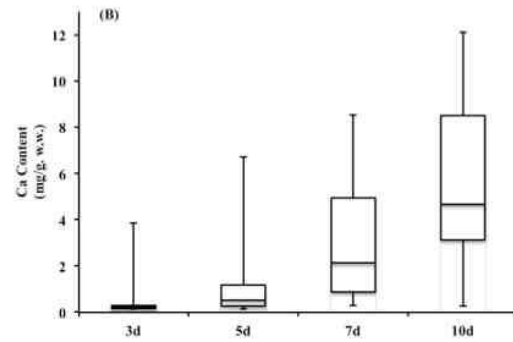
【A】0.9mM リン含有 【B】3.8mM リン含有
Fon Kossa 染色によるカルシウム (Ca) 染色

血中正常リン濃度の正常腎機能ラットから摘出し組織培養された動脈で、高リン条件下で中膜石灰化が再現できた事から、この中膜石灰化を指標としてリンの Dose Response と Time Course を検討した。これは取りもなおさず、リン感受性の Dose Response と Time Course の解析に繋がる。

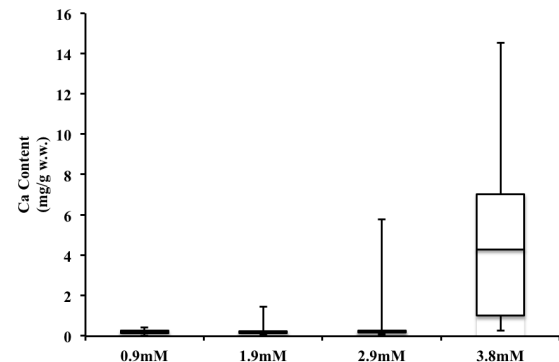
【図4】正リン濃度 (0.9mM Pi) Medium 培養における血管中膜石灰化の Ca 含有量の Time Course



【図5】高リン濃度 (3.8mM Pi) Medium 培養における血管中膜石灰化の Ca 含有量の Time Course



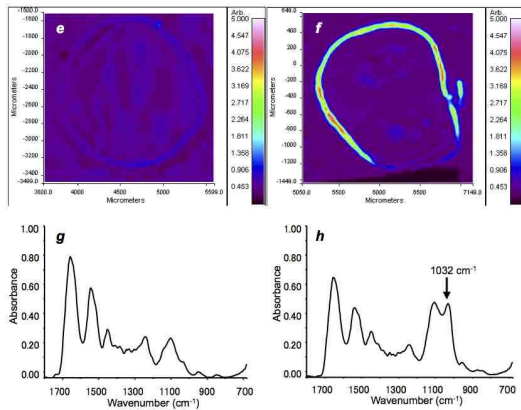
【図6】10日間培養血管中膜石灰化の Ca 含有量の Dose Response



これまでの【図4-6】の結果から、リンの感受性をもっとも良く分離可能な条件として、高リン Medium (3.8mM) 条件下での *ex vivo* 動脈組織培養を採用した。この検体を分子の振動による赤外線吸収を測定することで分子構造の情報を得る手法である赤外分光法分析を行なった。以下に示すのが、そのフーリエ変換赤外分光光度 (FT-IR) 測定結果が【図7】である。上記のように、高リン条件下の中膜石灰化を有した血管では、リン (PO_4^{3-}) のスペクトラムを検出した。更に分子レベルでの解析を進めるために走査型電子顕微鏡で原始解析を行なったところ、下記の【図8】のごとく中膜石灰化に位置してリン酸カルシウムの存在を認めた。これは培養動脈の中膜石灰化部位に、リン酸カルシウムの結晶 = すなわち Hydroxy-Apatite が形

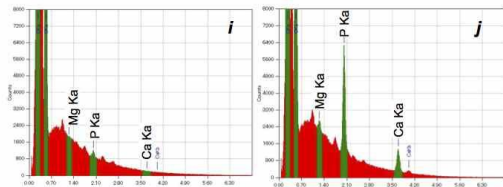
成されている事を示唆するものである。

【図 7】培養動脈によるフーリエ変換赤外分光光度 (FT-IR)



【A】0.9mM リン含有 【B】3.8mM リン含有

【図 8】



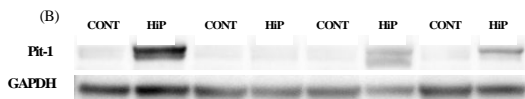
【A】0.9mM リン含有 【B】3.8mM リン含有

このハイドロキシアパタイトを形成するには細胞内へのリンの流入が必要とされる。血管に存在するリン流入を司る分子こそがリン感受性を有しリンセンサー機能を有している事が考えられる。すでに我々は血管石灰化部位において DNA チップを用いた DNA マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析アレイを行い、その結果を公表報告している。

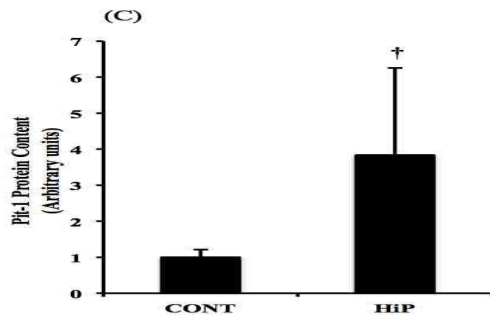
・ Shibata M, Shigematsu T, Hatamura I, et al. Ren Fail. 2010 Jan;32(2):214-23

これらの結果から、血管に存在するリン流入を司る分子の候補として、リン酸輸送蛋白の一つである Pit-1 蛋白に注目して、リンセンサー機能蛋白として解析した。

【図 9】高リン条件 (3.8mM) における培養動脈における Pit-1 蛋白の発現増強

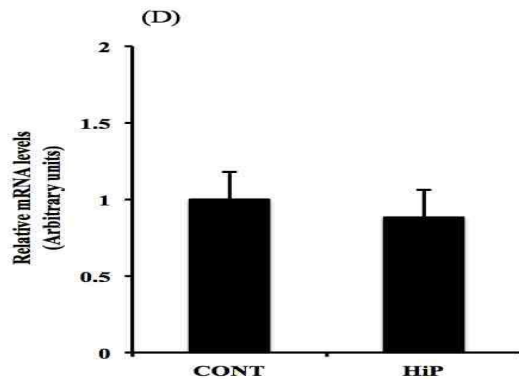


複数回の解析によっても、高リン条件下 (3.8mM) では、いずれも正リン条件下 (0.9mM) に比して、Pit-1 蛋白の発現が亢進していた。しかしながら、当初の予想と異なり、Pit-1 の mRNA は高リン条件下 (3.8mM)



で特に亢進を認めなかった【図 10】。この結果は、当初の予想とは異なりリン感受性システムは、mRNA レベルの遺伝子発現調節ではなく、mRNA からの蛋白発現の翻訳レベルで機能している事が示唆された。今後はこの分子レベルでの解析を進めて行く予定である。

【図 10】高リン条件 (3.8mM) における培養動脈における Pit-1 の mRNA 発現



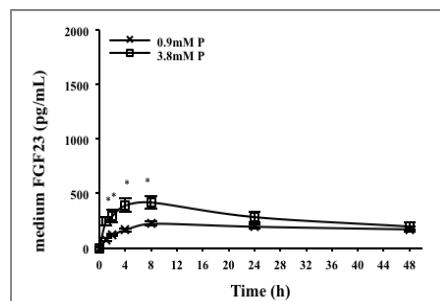
(3)他臓器におけるリン反応性の検討

すでに我々は骨組織培養系を確立報告している。

・ Saji F, Shigematsu T, Sakaguchi T, et al. Am J Physiol Renal Physiol. 2010

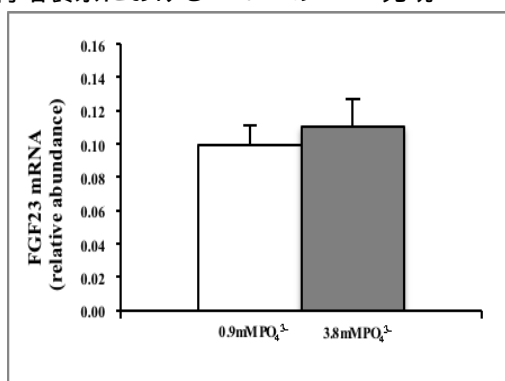
この骨組織培養系を利用して、ラット動脈組織培養系と同様の正リン条件下 (0.9mM) と高リン条件下 (3.8mM) で骨組織培養を行った。その際に正リン条件下と高リン条件下にて、骨由来の発現の差を認める蛋白として Fibroblast Growth Factor 3 (FGF 23) 見いだした。

【図 11】腎機能正常の正リンラットにおける頭蓋骨培養系における FGF-23 産生



複数回の解析によっても、高リン条件下（3.8mM）では、いずれも正リン条件下（0.9mM）に比して、培養 Medium 中の FGF-23 蛋白濃度は高濃度であった。しかしながら、当初の予想と異なり、FGF-23 の mRNA は高リン条件下（3.8mM）で特に亢進を認めなかった【図 12】。この結果は、培養動脈におけるリン負荷後の Pit-1 の動きと一致している。これらの事実は、リン感受性システムは、mRNA レベルの遺伝子発現調節ではなく、mRNA からの蛋白発現の翻訳レベルで、臓器特異性がなく普遍的に機能している事が示唆される。今後はこの分子レベルでの解析を進めて行く予定である。

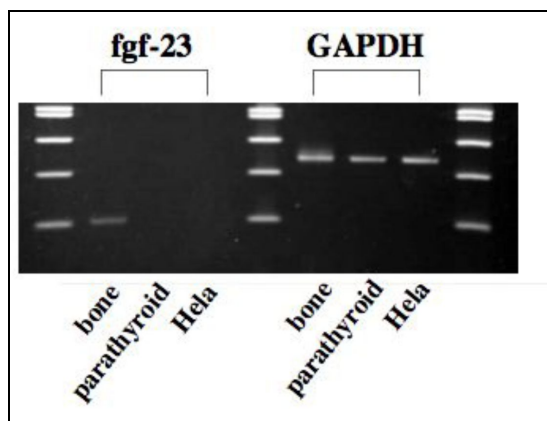
【図 12】高リン条件（3.8mM）における頭蓋骨培養系における Pit-1 の mRNA 発現



我々は既に、この FGF-23 の遺伝子発現は骨組織とともに脾臓にて発現する事を報告している【図 13, 14】。

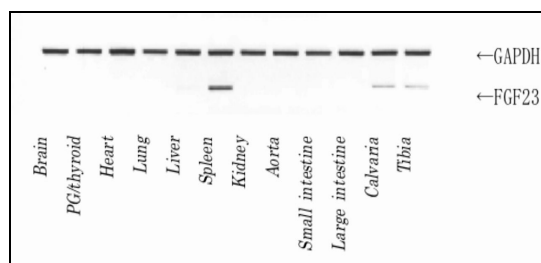
・ Saji F, et al.
Nephron Physiol. 2009;111(4):p59-66.

【図 13】骨組織における FGF-23 の遺伝子発現



【図 14】脾臓と骨組織における FGF-23 の遺伝子発現

我々は、FGF23 が骨以外に脾臓の樹状細胞でも発現し、そのリガンドである Klotho 分子が脾臓・末梢血の成熟した B 細胞で発現して



いることを発見した。つまり、FGF23 はリン代謝以外に、免疫調整にも関わる可能性を示唆する。この件の検討では下記の科学技術研究費の課題として、別プロジェクトとして研究施行中である。

【研究課題番号：24591236】

線維芽細胞増殖因子 23 の脾臓における発現の生物学的意義についての解析

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 9 件)

- Okamoto M, Yamanaka S, Yoshimoto W, Shigematsu T. : Alendronate as an effective treatment for bone loss and vascular calcification in kidney transplant recipients. In press J Transplant. 査読あり、2014;2014:269613. doi: 10.1155/2014/269613. Epub 2014 Feb 19.
- Maruyama Y, Taniguchi M, Kazama JJ, Yokoyama K, Hosoya T, Yokoo T, Shigematsu T, Iseki K, Tsubakihara Y. : A higher serum alkaline phosphatase is associated with the incidence of hip fracture and mortality among patients receiving hemodialysis in Japan. In press, Nephrol Dial Transplant. 査読あり、2014 Mar 18.
- Taniguchi M, Fukagawa M, Fujii N, Hamano T, Shoji T, Yokoyama K, Nakai S, Shigematsu T, Iseki K, Tsubakihara Y; Committee of Renal Data Registry of the Japanese Society for Dialysis Therapy. : Serum phosphate and calcium should be primarily and consistently controlled in prevalent hemodialysis patients. Ther Apher Dial. 査読あり、17:221-228、2013
- Shigematsu T, Nakashima Y, Ohya M, Tatsuta K, Koreeda D, Yoshimoto W, Yamanaka S, Sakaguchi T, Hanba Y, Mima T, Negi S. : The management of hyperphosphatemia by lanthanum carbonate in chronic kidney disease patients. Int J Nephrol Renovasc Dis. 査読あり、5:81-89, 2012
- Koiwa F, Komukai D, Hirose M, Yoshimura A, Ando R, Sakaguchi T, Komatsu Y, Shinoda T, Inaguma D, Joki N, Nishida H, Ikeda M, Shigematsu T. : Influence of renin-angiotensin system on serum parathyroid hormone levels in uremic patients. Clin Exp Nephrol. 査読あり、16:130-135, 2012

6. **Shigematsu T**, Negi S; COLC Research Group. : Combined therapy with lanthanum carbonate and calcium carbonate for hyperphosphatemia decreases serum FGF-23 level independently of calcium and PTH (COLC Study).

Nephrol Dial Transplant. 査読あり、27:1050-1054, 2012

7. Ohya M, Otani H, Kimura K, Saika Y, Fujii R, Yukawa S, **Shigematsu T**. : Vascular calcification estimated by aortic calcification area index is a significant predictive parameter of cardiovascular mortality in hemodialysis patients.

Clin Exp Nephrol. 査読あり、15:877-83, 2011

8. Taniguchi M, Tanaka M, Hamano T, Nakanishi S, Fujii H, Kato H, Koiwa F, Ando R, Kimata N, Akiba T, Kono T, Yokoyama K, **Shigematsu T**, Kakuta T, Kazama JJ, Tominaga Y, Fukagawa M. Comparison between whole and intact parathyroid hormone assays. Ther Apher Dial. 査読あり、15 Suppl 1:42-49, 2011

9. **Shigematsu T**, Tokumoto A, Nakaoka A, Arisaka H. : Effect of lanthanum carbonate treatment on bone in Japanese dialysis patients with hyperphosphatemia.

Ther Apher Dial. 査読あり、15:176-184, 2011

[学会発表](計8件)

1. 重松隆・根木茂雄：高リン血症を呈する保存期慢性腎不全患者に対する炭酸ランタンの二重盲検プラセボ対象のリン低下効果の検討 第56回日本腎臓学会学術総会 2013.5.10-12 東京

2. 重松隆：CKD患者におけるCKD-MBD管理 第56回日本腎臓学会学術総会 2013.5.10-12 東京

3. 丸山之雄・横山啓太郎・重松隆・谷口正智・風間順一郎・細谷龍男：慢性血液透析患者における血中ALP値と生命予後の検討 第58回日本透析医学会学術集会・総会 2013.6.20-23 福岡

4. 重松隆：透析患者のCKD-MBD管理 第58回日本透析医学会学術集会・総会 ランチョンセミナー41 2013.6.20-23 福岡

5. 伊達敏行・山本忠司・前田兼徳・重松隆：血管石灰化の進行を抑制するための望ましい透析液ca濃度に関する検討 第57回(社)日本透析医学会学術集会・総会 2012.6.22-24. 札幌

6. 小岩文彦・高安真美子・吉村吾志夫・坂口俊文・安藤亮一・山家敏彦・篠田俊雄・常喜信彦・渡邊尚・稲熊大城・重松隆：透析導入時の活性型ビタミンD、炭酸Caがミネラル代謝に及ぼす影響 第57回(社)日本透析医学会学術集会・総会 2012.6.22-24. 札幌

7. 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 Congress on Uremia Research and Toxicity. 2011.5.12-14, Nagoya

8. **Shigematsu T**, Ueki H, Arima M, Kodama N, Goto T, Kodama T, Maeda A, Negi S, Mima T, Sakaguchi T: The evaluation of affecting factors for phosphate removal during hemodialysis session using direct measurement of dialysate phosphate. 7th International Congress on Uremia Research and Toxicity. 2011.5.12-14, Nagoya

[図書](計2件)

1. 重松隆・大矢昌樹：血液透析患者における大動脈瘤石灰化と骨密度の関連 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 Calciphylaxisの診断・治療に関わる調査・研究 平成22年度-23年度 総合研究報告書 20-26, 2012

2. 重松隆・大矢昌樹：血液透析患者における大動脈瘤石灰化と骨密度の関連 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 カルシフィラキシスの診断・治療に関わる調査・研究 平成23年度総括・分担研究報告書 13-17, 2012

[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

・和歌山県立以下大学附属病院 腎臓内科

<http://www.wakayama-med.ac.jp/hospital/shinryo/blood-cleansing/index.html>

・和歌山県立医科大学 腎臓内科学講座

<http://www.wakayama-med.ac.jp/med/nephrology/contents/Professor.html>

・日本腎循環器病研究会

<http://jibkk.kenkyuukai.jp/special/?id=11024>

・和歌山透析研究会

http://wakayama-rrt.kenkyuukai.jp/event/event_detail.asp?id=9953

6. 研究組織

(1)研究代表者：重松 隆

(SDHIGEMATSU Takashi)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30187348