

機関番号：32651

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790823

研究課題名（和文） 透析患者の冠動脈石灰化の組織学的検討

研究課題名（英文） Histological examination of the coronary artery calcification in dialysis patients.

研究代表者

吉田 啓 (YOSHIDA HIRAKU)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：90408451

研究成果の概要（和文）：透析患者に多くみられる冠動脈石灰化は虚血性心疾患や脳血管疾患の原因となっていることが知られている。それらの疾患にかかる医療費が我が国の医療費に占める割合は非常に多い。本研究は透析患者の石灰化は炎症とミネラル代謝異常が原因であることを示唆している。炎症とミネラル代謝異常に対する治療を強化することにより、透析患者の心血管疾患を予防することは、透析患者の予後を改善し、医療費を抑制する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Coronary artery calcification cause cardiovascular disease in dialysis patients. The cost of cardiovascular disease in dialysis patients occupies huge amount of Japanese medical costs. This study indicates that inflammation and disorder of mineral metabolism cause the coronary artery calcification in dialysis patients. Intensive care for inflammation and disorder of mineral metabolism reads better outcome in dialysis patients and reduce medical costs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	300,000	90,000	390,000
2010年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
年度			
総計	600,000	180,000	780,000

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：動脈石灰化、慢性腎臓病、炎症、ミネラル代謝異常

1. 研究開始当初の背景

透析患者では虚血性心疾患などの心血管合併症の保有率が健康人に比べはるかに高く、心血管合併症は透析患者の死因の半数以上を占める。最近、慢性腎臓病(Chronic Kidney Disease: CKD)に伴う高リン血症などのミネラル代謝異常が血管石灰化および虚血性心疾患の関連因子であることが報告されている。CKD患者における血管石灰化は、組織学的特徴から内膜石灰化(Arterial Intima

Calcification: AIC)と中膜石灰化(Arterial Media Calcification: AMC)の二つに大別でき、AICは動脈硬化の終末像であり、炎症や脂質代謝異常が原因と考えられているのに対し、AMCはCKD患者に特有の病変と考えられているが、その発現病期、機序は不明な点が多い。そこで剖検から得られた検体を用いて、CKD stageによる血管石灰化の発現病期ならびに発現機序の差異につき組織学的に検討した。

2. 研究の目的

透析患者における冠動脈石灰化の発症時期と機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は後ろ向きの観察研究である。1979年から2004年に当院病理部で行われた剖検例で、剖検時冠動脈起始部に石灰化を認め、同部位のvon Kossa染色陽性が確認された透析患者剖検例14例と初期CKD患者剖検例5例を対象とした (Table 1)。

Table 1. Patients' characteristics.

Case	Age (y)	Gender	HD (y)	DM	Cause of death	Hb		Alb		Cr		Ca		Pi		LDL-C (mg/dl)
						(g/dl)	(g/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)			
1	66	M	0	-	IHD	13.2	4.2	0.9	9.2	4.1	145					
2	72	M	0	-	malignancy	12.8	3.4	0.7	9.0	3.2						
3	73	M	0	-	malignancy	11.7	3.3	0.8	8.8	4.4	106					
4	89	M	0	-	malignancy	11.5	3.0	1.0	9.8	3.8	96					
5	76	F	0	-	IHD	12.0	2.8	1.0	9.7	4.0	112					
6	39	F	12	-	CHF	5.6	2.9	10.8	9.2	5.0	-					
7	46	M	13	-	infection	7.4	-	10.9	9.6	4.4	98					
8	64	F	14	-	GI bleeding	7.0	-	12.0	9.0	-	110					
9	88	F	1	-	infection	8.1	2.8	8.2	6.7	9.1	127					
10	80	M	5	-	IHD	10.8	-	9.0	8.2	8.0	153					
11	57	M	3	-	GI bleeding	9.4	3.1	7.9	-	6.5	-					
12	63	F	6	-	CHF	8.2	2.5	6.8	9.9	7.0	121					
13	50	M	2	-	IHD	9.5	3.4	11.3	10.3	-	130					
14	62	M	9	-	Cerebral bleeding	7.3	-	-	8.4	6.2	-					
15	53	M	1	+	CHF	9.6	-	5.6	6.8	5.4	141					
16	81	M	1	+	infection	11.3	2.9	6.7	7.5	5.1	-					
17	79	M	14	+	malignancy	9.0	2.9	-	8.8	8.4	-					
18	62	M	2	+	IHD	9.3	3.5	18.1	-	-	124					
19	72	M	11	+	IHD	8.2	3.3	7.7	10.2	5.4	118					

DM = diabetes mellitus, HD = hemodialysis, IHD = ischemic heart disease, CHF = congestive heart failure, GI bleeding = gastro-intestinal bleeding, Hb = hemoglobin, Alb = albumin, Cr = creatinine, Ca = calcium, Pi = inorganic phosphate, LDL-C = low density lipoprotein cholesterol.

Modification of Diet in Renal Disease (MDRD)による糸球体ろ過量推定式 (estimated glomerular filtration rate: eGFR) で30 ml/min/1.73m²以上90 ml/min/1.73m²未満 (CKD stage 2-3) を初期CKDと定義した。推定式として eGFR (ml/min/1.73m²) = 0.741 × 175 × (serum creatinine, mg/dL)^{-1.154} × (age, year)^{-0.203} × (0.742 for women) を使用した。

透析群の平均年齢は62.4歳、平均透析期間は6.7年で、糖尿病が5例含まれ、死亡原因は8例が心血管合併症であった。一方、初期CKD群の平均年齢は75.6歳、糖尿病患者は含まれず、死亡原因は5例中2例が心血管合併症であった。臨床データは最終入院時のものを診療録より採用した。

組織中のカルシウム塩を同定するために von Kossa 染色を施行した。血管平滑筋のマーカーとして α smooth muscle actin (α SMA)、骨関連蛋白として Osteopontin (OPN)、骨芽細胞のマーカーとして Runx2/Cbfa1、マクロファージのマーカーとして CD68 を免疫組織学的手法により染色した。

染色の程度は半定量的に評価し、染色されないものを (-)、染色される範囲が血管全周の4分の1未満のものを (+)、4分の1以上かつ2分の1未満のものを (++)、2分の1以上のものを (+++) とした。

4. 研究成果

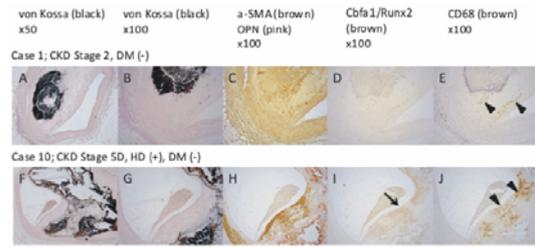


Figure 1. Immunohistochemical staining of coronary artery intima calcification. Case 1 was positive in von Kossa (A, B), α-SMA, OPN (C), CD 68 (E) and negative in Cbfa1/Runx2 (D). Case 10 was positive in von Kossa (F, G), α-SMA, OPN (H), Cbfa1/Runx2 (I), and CD68 (J). Magnification: (A, F) × 50, (B, E, G-J) 100.

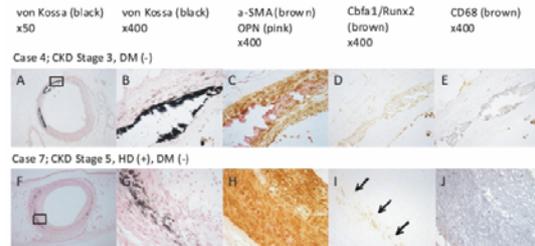


Figure 2. Immunohistochemical staining of coronary artery media calcification. Case 4 was positive in von Kossa (A, B), α-SMA, OPN (C) and negative in Cbfa1/Runx2 (D) and CD 68 (E). Case 7 was positive in von Kossa (F, G), α-SMA, OPN (H), Cbfa1/Runx2 (I) and negative in CD 68 (J). Magnification: (A, F) 50, (B, E, G-J) 400.

(1) AIC と AMC の頻度と形態

初期CKD群では5例全例にAICを認めた。うち2例 (症例4, 5) はAICとAMCの両者を認めた。透析群では14例中13例にAICを認め、うち5例でAICとAMCの両者を認めた。症例7ではAMCのみ認めた (Table 2)。CKD stageにかかわらず、AICは内膜肥厚をともなうことが多く、内膜肥厚が強い病変ほど内腔狭窄が高度であった (Fig. 5)。一方、AMCでは病変の主座は中膜であり、内膜肥厚や内腔狭窄は認めなかった (Fig. 6)。

(2) OPN、α SMA 二重染色

CKD stageにかかわらずすべての症例で OPN 染色陽性部位は Kossa 染色陽性の石灰化部位と重複あるいは隣接し、かつ石灰化部位よりも広域であった。OPN 染色陽性部位は α SMA 陽性の血管平滑筋細胞とも重複あるいは隣接していた。

(3) Cbfa1/Runx2 染色

CKD stageにかかわらずAICではα SMA 陽性血管平滑筋細胞の内膜への浸潤を認めた。初期CKD群ではAIC、AMCいずれにおいても Cbfa1/Runx2 染色は陰性であった。透析群ではAIC、AMCいずれにおいても血管平滑筋細胞の核で Cbfa1/Runx2 染色が陽性であった (Fig. 5, 6 矢印)。

(4) CD68 染色

AICにおいては初期CKD群では5例中3例、透析群では14例中12例で石灰化部位の周辺にCD68陽性マクロファージを認めた (Fig. 5 ▲印)。一方、AMCにおいてはCKD stageにか

かわらず CD68 染色は陰性であった。(Table 3)

Table 2. Results of Immunohistochemistry of coronary artery calcification.

Cases	DM	CKD Stage	Arterial intima calcification				Arterial media calcification			
			Von Kossa	OPN	Cbfa1/Runx2	CD68	Von Kossa	OPN	Cbfa1/Runx2	CD68
1	-	2	**	**	-	*	-	-	-	-
2	-	2	*	*	-	-	-	-	-	-
3	-	2	*	*	-	*	-	-	-	-
4	-	3	-	-	-	*	*	*	-	-
5	-	3	*	*	-	*	*	*	-	-
6	-	5D	*	*	*	*	**	**	*	-
7	-	5D	-	-	-	-	**	**	**	-
8	-	5D	*	+++	*	*	-	-	-	-
9	-	5D	*	*	-	*	-	-	-	-
10	-	5D	+++	+++	*	*	-	-	-	-
11	-	5D	*	**	*	-	-	-	-	-
12	-	5D	**	**	*	**	*	*	*	-
13	-	5D	*	*	*	*	-	-	-	-
14	-	5D	*	**	*	*	*	*	*	-
15	*	5D	+++	+++	*	**	*	*	*	-
16	*	5D	**	+++	*	**	*	*	*	-
17	*	5D	*	**	*	*	-	-	-	-
18	*	5D	*	*	*	*	-	-	-	-
19	*	5D	*	*	*	*	-	-	-	-

DM = diabetes mellitus; CKD = chronic kidney disease; OPN = osteopontin; Cbfa1 = core binding factor α-1; Runx2 = runt-related transcription factor-2; (-) = negative; (*) = positive in a quarter; (**) = positive in a half; (***) = positive in over a half of circumference of vessel wall.

(5) 考察

正常な骨組織は骨梁とそれをつなぐ骨基質により形成される。骨梁の主成分はコラーゲンであり、骨基質の主成分はカルシウムやリンなどのミネラルと骨関連蛋白（非コラーゲン蛋白）である。かつて血管石灰化は受動的なミネラルの沈着にすぎないと考えられてきたが、血管石灰化部位に OPN などの骨関連蛋白や骨芽細胞様の血管平滑筋が確認されるようになり、血管石灰化は能動的な異所性の骨化現象と考えられるようになってきた。

OPN は骨や歯牙の基質に存在する非コラーゲン性蛋白であり、骨や歯牙の石灰化を阻害するとともに破骨細胞機能を活性化させる。OPN は正常の血管には発現していないが、粥状動脈硬化病変や心臓弁の石灰化部位に発現していることが示されている。また OPN は石灰化病変の進展を抑制するのみでなく、石灰化病変を減退させることも示されている。

本研究では CKD stage にかかわらずすべての症例で OPN は von Kossa 染色陽性の石灰化部位に重複あるいは隣接し、石灰化部位よりも広域に染色されていた。このことから石灰化よりも先に石灰化抑制蛋白である OPN が発現し、抑制できなかった部位が石灰化した可能性が示唆された。また、αSMA との二重染色において αSMA と OPN の染色性が重複または隣接している所見は血管平滑筋が OPN を産生していることを示唆する所見であった。

CKD に特異的な変化として血管平滑筋が骨芽細胞様の形質を獲得することが知られている。本研究では初期 CKD 群では AIC、AMC いずれにおいても骨芽細胞のマーカである Cbfa1/Runx2 を認めなかったのに対し、透析群では AIC、AMC いずれにおいても血管平滑筋のマーカである αSMA 陽性の血管平滑

筋の核内に Cbfa1/Runx2 を認めた。このことから、血管平滑筋が骨芽細胞様の形質を獲得する時期は CKD 後期と考えられた。

Cbfa1/Runx2 は骨芽細胞の核内転写因子のひとつで、骨芽細胞様細胞への形質転換の指標となる。高リン血症の状態にある後期 CKD 患者では Cbfa1/Runx2 の発現が亢進していることが確認されている。本研究でも初期 CKD 群に Cbfa1/Runx2 の発現は認めず、透析群で Cbfa1/Runx2 の発現を認めたことから、血管平滑筋の骨芽細胞様細胞への形質転換は高リン血症が顕性化する CKD stage の後期に認められる現象と推察された。

初期 CKD 群で 5 例中 3 例、透析群で 14 例中 12 例にマクロファージを認めた。このことから AIC にはマクロファージが関与しているものと考えられた。一方、AMC では CKD stage にかかわらず CD68 は陰性であり、マクロファージは AIC には関与するが AMC には関与していない可能性が示唆された。

以上より、AIC に関与する細胞は、初期 CKD 群ではマクロファージ、透析群ではマクロファージおよび骨芽細胞様細胞への形質転換した血管平滑筋、AMC に関与する細胞は透析群では骨芽細胞様細胞への形質転換した血管平滑筋と考えられた。初期 CKD 群の AMC については血管平滑筋に重複あるいは隣接して石灰化抑制蛋白である OPN が染色されたが、形質転換のマーカである Runx2/Cbfa1 は染色されなかったため、OPN の石灰化抑制作用により血管平滑筋の骨芽細胞様形質転換が制御されている可能性が示唆された。

本研究から治療へのフィードバックとして、脂質異常症の治療薬であるスタチン製剤、降圧薬である angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEI)、angiotensin receptor blockers (ARB)、抗血小板薬であるアスピリンは、いずれも内膜の炎症過程および内皮細胞障害を抑制することが知られており、内膜粥状硬化や AIC の予防効果が期待できる。スタチン製剤の抗炎症効果は透析患者の死亡率低下に寄与する可能性が示されている。ACEI、ARB は Angiotensin II が内皮細胞や血管平滑筋の VCAM-1 や IL-6 の発現を誘導するプロセスを抑制すると考えられている。アスピリンはプラーク内の炎症性サイトカイン活性を低下させると報告されている。

血管平滑筋の骨芽細胞様形質転換の原因となるミネラル代謝異常症に対する治療薬として、われわれは経口リン吸着薬、活性化ビタミン D 製剤、Calcimimetics などの治療薬を選択できる。カルシウム負荷が血管石灰化を促進することが明らかとなり、最近ではカルシウムを含まない経口リン吸着薬が使用されるようになった。活性化ビタミン D 製剤がカルシウム、リンを上昇させるのに対し

Calcimimetics はカルシウム、リンを上昇させることなく二次性副甲状腺機能亢進症の治療に用いることが可能であり、血管石灰化の予防に有用である。

CKD 患者において炎症およびミネラル代謝異常は血管石灰化に関与し、血管石灰化は心血管合併症の発症および生命予後に大きく寄与する。本研究では炎症およびミネラル代謝異常が血管石灰化を促進することが示された。血管石灰化のメカニズム解明と治療法の確立が今後の重要な課題と考えられた。

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 1 件)

1. Hiraku Yoshida, et al.

Difference in coronary artery intima and media calcification in autopsied patients with chronic kidney disease.

Clinical Nephrology

査読有り

75巻、2011年、p. 1-7

[学会発表] (計 1 件)

1. 吉田 啓、他 7 名

剖検にみる慢性腎臓病 (CKD) 患者の冠動脈石灰化についての組織学的検討

日本腎臓学会 (優秀演題賞受賞)

平成 22 年 6 月 17 日

神戸ポートピアホテル

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 啓 (YOSHIDA HIRAKU)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：90408451