

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17715

研究課題名(和文) CPP依存性新規Factor X活性化機序に関連したリン代謝疾患発症機構の検証

研究課題名(英文) Investigation of the pathogenesis of phosphorus metabolism diseases in relation to a novel CPP-dependent Factor X activation mechanism

研究代表者

三浦 裕 (Miura, Yutaka)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：20823678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病の進行に伴うリン恒常性破綻に起因する、血中でのリン酸カルシウムを含むコロイド粒子(CPP)の上昇は、心血管イベントリスクの増大の一因と考えられているが、CPPによる疾患発症機序は未解明である。
血中リン濃度が高いCKD患者やリン代謝疾患モデルマウスの血漿から単離されるCPPにFactor Xが含まれるという知見は、このFactor X含有CPPが高リン血症に起因して発症する病態と関連している可能性を強く示唆する。そこで、リン代謝疾患モデルであるKlothoマウスのFactor Xa活性を阻害すると、Klothoマウスに認められる血管石灰化や炎症が顕著に抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の遂行により、慢性腎臓病の進行などに伴うリン恒常性破綻に起因する、血管石灰化などの病態には凝固因子・Factor X が関与していることが示された。
この結果は慢性腎臓病の進行などに伴うリン恒常性破綻に起因する、血管石灰化などへの新たな治療戦略につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Elevation of colloidal particles containing calcium phosphate (CPP) in the blood due to disruption of phosphorus homeostasis with the progression of chronic kidney disease is thought to contribute to increased risk of cardiovascular events. However, the mechanism of CPP-induced disease pathogenesis remains unresolved. The finding that CPP isolated from the plasma of CKD patients with high blood phosphorus levels contains Factor X strongly suggests that Factor X-containing CPP may be associated with the pathology caused by hyperphosphatemia. Inhibiting Factor Xa activity in Klotho mice, a model of phosphorus metabolism disease, markedly suppressed vascular calcification and inflammation observed in Klotho mice.

研究分野：リン代謝

キーワード：リン代謝 klotho 血管石灰化

1. 研究開始当初の背景

生体は、血中リン濃度の恒常性を腸管吸収、骨からの動員、そして腎排泄によって適切に維持している。近年、この恒常性を保つうえで最も重要な腎排泄に負荷を与える過剰なリン摂取が、慢性腎臓病(chronic kidney disease: CKD)の発症および進行に関連することが示されている。通常、健常者では、食事などによる一過的な血中リン濃度の上昇を骨細胞が感知しリン利尿ホルモンである FGF23 を分泌、その腎臓への作用により余剰なリンは排泄され血中リン濃度の恒常性が維持される。しかしながら、腎臓からのリン排泄能に障害がある CKD 患者や腎機能を喪失している透析患者では、食事などからのリンの摂取は血中リン濃度の上昇につながる。そしてこのとき、高濃度となった血中リンは、部分的にカルシウムと結合しリン酸カルシウム結晶を形成、この結晶自体による細胞傷害が炎症反応やその反応に引き続く血管石灰化を誘発し、その後の心血管イベントリスクの発症・進展の一因になると考えられている。

生体はこのリン酸カルシウム結晶による直接的な細胞毒性に対して、血液中に大量に存在する Fetuin-A 蛋白質(以下、Fetuin-A)によりリン酸カルシウム結晶を吸着し Calciprotein Particle (以下、CPP) というコロイド粒子として分散させるという防御機構を備えている。実際に Fetuin-A を欠損させたマウスへの過剰なリン負荷は、全身での血管石灰化を誘発することが示されている[J Clin Invest. 112: 357 (2003)]。さらに、血中リン濃度が正常でも CPP 値が血管石灰化(冠動脈石灰化スコア)、血管の硬さ(大動脈脈波速度)、炎症所見と相関すること[J Am Soc Nephrol. 21: 1998 (2010), Nephrol Dial Transplant. 27: 1957 (2012)]、in vitro において人工合成した CPP が細胞傷害能を有することも示されており、申請者らを含む CPP 研究者より、リン酸カルシウム結晶を含む CPP がリン代謝疾患誘発物質であるという「CPP 病原体仮説」が提唱されている[Nat Rev Nephrol. 9: 650 (2013)]。しかしながら、この CPP 病原体仮説の証明を進めるうえで最も重要な事項の1つである血中 CPP の測定法に関しては、リン酸カルシウム結合蛋白質であるヒト Fetuin-A に対する抗体を用いた ELISA(Fetuin-A 法)が存在するのみで、ヒト以外の動物種の Fetuin-A に対するこの抗体の交差性の問題や測定感度の問題などがあり、他の動物種に対応できる測定法や CPP 値の正式な定義が存在しない現状があった。

申請者は、CPP の構成成分において動物種の壁を超えて共通であるリン酸カルシウム結晶に着目、この結晶構造を特異的に認識し結合するビスホスホネートの特性を応用し、ヒトだけでなく様々な動物種の血中 CPP の高感度測定を可能にする OsteoSense 法を開発し、その報告の中で、健常者においても CPP が存在すること、透析患者ならびに血中リン濃度の高い CKD 患者の血中において CPP が顕著に上昇していること、申請者らが世界に先駆けて報告したリン代謝恒常性破綻マウスである Klotho マウスにおいて異常上昇している血中 CPP が、低リン食(0.1%リン含有)を与えることで、血中リン濃度の低下とともに減少することを明らかにしている[Sci Rep. 8: 1256 (2018)]。

この新規の CPP 測定法の開発により、血中の CPP に関しては、高リン血症を伴う CKD 患者や透析患者において上昇していること、Klotho マウスや高リン負荷を与えたマウスを用いた解析から、リン代謝の恒常性破綻に起因して上昇してくることが明らかとなったが、健常者とリン代謝疾患患者に存在する CPP の間で Fetuin-A 以外の構成蛋白質を含めた成分の違いの有無、リン恒常性維持破綻時に血中 CPP 濃度の上昇が疾患を誘発するメカニズムの詳細は全く解明されていない。このため、健常者とリン代謝疾患患者ならびにリン代謝疾患モデルマウスに存在する CPP の構成分子基盤の実体の解明、さらには、CPP が疾患を発症させる詳細なメカニズムを解明することは、生理学的観点だけでなく、リン代謝破綻に起因する疾患の発症と重篤化を予防・治療する手法を開発するという医学・薬学的観点からも重要な研究課題と考えられる。

申請者は、上記の高感度新規 CPP 測定法を開発する過程で、リン酸カルシウム結晶に特異的に結合するビスホスホネートの一種であるアレンドロネートをリガンドとして結合させたアフィニティークラム(アレンドロネートカラム)を開発した。そして、ヒトあるいはマウス血漿より、リン酸カルシウム結晶を介してこのカラムに結合する CPP 構成蛋白質を精製、LC-MS/MS 解析による分子の同定を試みた。その結果、主要な CPP 構成蛋白質である Fetuin-A に加え、透析患者ならびに血中リン濃度の高い CKD 患者の CPP 構成蛋白質には、健常者の CPP からは検出されない血液凝固因子プロテアーゼ、Factor X が存在することを見出した。さらに、リン利尿が抑制されることで高リン血症を呈する Klotho マウスの血漿から精製された CPP 中にも、同様に Factor X が含まれていること、逆に、リン制限食(0.1%リン含有)で飼育することで高リン血症を改善させた Klotho マウスでは、CPP 中の Factor X 含有量が顕著に減少していることも見出している。

さらに、Factor Xa 特異的切断配列を含む基質を用いた解析より、高リン血症を示す血漿より単離した CPP 中の Factor X がプロテアーゼ活性を有することも明らかになった。CPP による Factor X の活性化は、三量体型 G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) に分類される Protease-activated receptor (Par)ファミリー、とりわけ Par2 の活性化を介して疾患を誘発する可能性を示唆するものである。

これに関連して、最近、血栓症を伴わない一部の粥状動脈硬化症では、血液凝固プロテアーゼカスケードが活性化されていないにもかかわらず血中において Factor X が活性化されており、Factor Xa 阻害薬であるリバーロキサバンがその進行を抑制することが示された[Circulation 138: 1706 (2018)]。この報告は、Factor X の活性化機構を解明する本研究課題が、動脈硬化疾患の予後リスクの観点からも重要であることを示している。

2 . 研究の目的

これまでに得られた、血中リン濃度が高いCKD患者、透析患者、あるいはリン代謝疾患モデルマウスの血漿から単離される CPP に活性を持つ凝固因子・Factor X が含まれるという知見は、この Factor X 含有 CPP が高リン血症に起因して発症する病態と関連している可能性を強く示唆している。

したがって、本研究の目的は高リン血症に関連した疾患を誘発させたモデル動物を用いて、この CPP 依存性 Factor X 活性化機構が高リン血症に関連した疾患発症・進行の一因、さらにはその治療標的となり得るのかを検証、証明することにある。

3 . 研究の方法

リン代謝疾患モデルである Klotho マウスの大動脈に認められる石灰化や炎症が、Factor Xa 阻害薬や Factor Xa の受容体である Par2 受容体を欠損することで抑制されるか、組織染色や疾患に関連する遺伝子発現解析等を行う。

4 . 研究成果

リン代謝疾患モデルである Klotho マウスに Factor Xa 阻害薬を添加した餌を与えると、対照である薬剤添加をしなかった Klotho マウスの大動脈に認められる血管石灰化の減弱とその部位での炎症マーカー遺伝子の発現が顕著に抑制されるという結果を得た。

Factor Xa 阻害薬で改善が認められた Klotho マウスの大動脈に認められる石灰化や炎症は、Factor Xa の受容体である Par2 受容体を欠損した Klotho マウスにおいても改善する傾向であることが確認できたが、その効果は Factor Xa 阻害薬よりも部分的であった。

したがって、Factor Xa 自体だけでなく、Thrombin などの下流の凝固カスケードの活性化も細胞障害に寄与している可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nakamura Kimihiko, Nagata Yudai, Hiroyoshi Toshiya, Isoyama Naohito, Fujikawa Koki, Miura Yutaka, Matsuyama Hideyasu, Kuro-o Makoto	4. 巻 24
2. 論文標題 The effect of lanthanum carbonate on calciprotein particles in hemodialysis patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 323 ~ 329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-019-01832-4	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 Nakano Toshihiro, Shiizaki Kazuhiro, Miura Yutaka, Matsui Masahiro, Kosaki Keisei, Mori Shoya, Yamagata Kunihiro, Maeda Seiji, Kishi Takuya, Usui Naoki, Yoshida Masahide, Onaka Tatsushi, Mizukami Hiroaki, Kaneda Ruri, Karasawa Kazunori, Nitta Kosaku, Kurosu Hiroshi, Kuro-o Makoto	4. 巻 9
2. 論文標題 Increased fibroblast growth factor-21 in chronic kidney disease is a trade-off between survival benefit and blood pressure dysregulation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-55643-4	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 Akiyama Ken-ichi, Miura Yutaka, Hayashi Hirosaka, Sakata Asuka, Matsumura Yoshitaka, Kojima Masaki, Tsuchiya Ken, Nitta Kosaku, Shiizaki Kazuhiro, Kurosu Hiroshi, Kuro-o Makoto	4. 巻 97
2. 論文標題 Calciprotein particles regulate fibroblast growth factor-23 expression in osteoblasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 702 ~ 712
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2019.10.019	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 Nakazato Jun, Hoshide Satoshi, Wake Minoru, Miura Yutaka, Kuro-o Makoto, Kario Kazuomi	4. 巻 74
2. 論文標題 Association of calciprotein particles measured by a new method with coronary artery plaque in patients with coronary artery disease: A cross-sectional study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 428 ~ 435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jjcc.2019.04.008	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 Gatate Yodo, Nakano Shintaro, Mizuno Yosuke, Muramatsu Toshihiro, Senbonmatsu Takaaki, Nishimura Shigeyuki, Kono Rika, Kaneko Keiko, Miura Yutaka, Kuro-o Makoto	4. 巻 303
2. 論文標題 Mid-term predictive value of calciprotein particles in maintenance hemodialysis patients based on a gel-filtration assay	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Atherosclerosis	6. 最初と最後の頁 46 ~ 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.atherosclerosis.2020.03.016	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 Wang Qin, Ishizawa Kenichi, Li Jinping, Fujii Wataru, Nemoto Yoshikazu, Yamazaki Osamu, Tamura Yoshifuru, Miura Yutaka, Nie Xuedan, Abe Ryo, Segawa Hiroko, Kuro-o Makoto, Shibata Shigeru	4. 巻 3
2. 論文標題 Urinary phosphate-containing nanoparticle contributes to inflammation and kidney injury in a salt-sensitive hypertension rat model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01298-1	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 Kunishige Rina, Mizoguchi Mai, Tsubouchi Asako, Hanaoka Kenjiro, Miura Yutaka, Kurosu Hiroshi, Urano Yasuteru, Kuro-o Makoto, Murata Masayuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Calciprotein particle-induced cytotoxicity via lysosomal dysfunction and altered cholesterol distribution in renal epithelial HK-2 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-77308-3	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0件

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------