

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461251

研究課題名(和文)腎機能低下に伴うMg代謝異常の骨由来リン利尿因子と抗加齢蛋白に対する効果の検討

研究課題名(英文)Effect of magnesium in renal dysfunction to phosphorus diuretic and anti-aging factor.

研究代表者

大矢 昌樹 (Ohya, Masaki)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90550301

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)：透析導入時尿毒症状態にある1231例の患者において、高Mg血症は高頻度に認められ、副甲状腺ホルモン(PTH)と血清Mg濃度が独立した関連因子であることを報告した。高リン負荷ラット大動脈血管組織培養において血管石灰化部位をFTIRおよびSEM-EDXを用いた成分分析を行い、その主成分がリン酸カルシウムであることを明らかにした。Ca負荷により血管石灰化が増強し、Pit-1の発現が増加すること、さらに高リン負荷血管石灰化がMg添加により抑制されることを明らかにした。また、TRPM7の阻害作用のある2-APBを添加することで、効果が減弱し、Pit-1の発現量が減少することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A high serum level of Mg is frequent in uremic patients with end-stage renal disease just prior to beginning HD. There was a significant correlation between the serum Mg and iPTH levels. Furthermore, the serum Mg level was an independent factor apart from the other factors regulating iPTH. Aortic rings obtained from rats were incubated for 10 days. The inorganic phosphate (Pi) concentration of the medium was increased to induce VC. The mineral composition of the calcification was analyzed using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic imaging, SEM-EDX mapping. Exposure to high Pi concentration augments aortic calcification via an increase in Pit-1, which mainly contains calcium phosphate. Exposure to high Pi and high Ca concentration augments aortic calcification via an increase in Pit-1. When several concentrations of Mg add in the HPI medium, VC quantified as aortic calcium (Ca) content was suppressed in a dose-dependent manner.

研究分野：慢性腎臓病

キーワード：血管石灰化 慢性腎臓病 リン マグネシウム カルシウム

1. 研究開始当初の背景

マグネシウム(Mg)は腎不全の病態において血清中に増加し、慢性腎臓病に伴う骨ミネラル代謝異常(CKD-MBD)に重要な関与が疑われながらもその機序は不明なことが多い。腎臓病に伴う Mg の役割に関する機序の解明することで、CKD-MBD の分野において新たに寄与できる。

2. 研究の目的

本研究では腎機能低下に伴うマグネシウム代謝異常と腎不全患者に高率に生じる血管石灰化におよぼす影響を検討し、Mg の生命予後、心血管予後改善への役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 国内 9 施設における透析導入直前の尿毒症状態にある患者の血液データを含むパラメータから、血清 Mg 濃度の腎機能低下時の状態を明らかにし、血清 Mg との関連因子との検討を行った。

(2) SD ラット大動脈切片の血管組織培養を用い、高リン負荷条件下において血管石灰化を生じるモデルを用い、Pit-1 の遺伝子発現および蛋白発現量の検討を行った。生じる血管石灰化のミネラル組成分析を FTIR および SEM-EDX を用いた検討を行った。

(3) (2) で用いた高リン負荷血管組織培養にてカルシウム負荷による血管石灰化の変化を検討し、リン酸トランスポーターである Pit-1 を遺伝子発現および蛋白発現量の検討を行った。

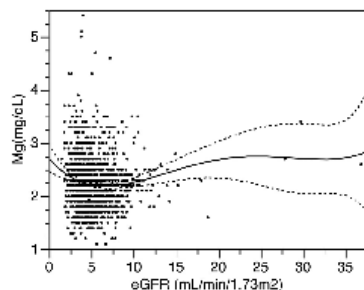
(4) (2) で用いた高リン負荷血管組織培養にて Mg 負荷による血管石灰化の変化を検討した。その機序の検討として TRPM7 阻害作用のある 2-APB を添加し、血管石灰化の変化の検討を行った。さらに Pit-1 の遺伝子発現および蛋白発現量の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 透析導入直前の尿毒症状態にある患者 1231 例において eGFR と血清 Mg 濃度との関係では、eGFR<5mL/min において血清 Mg 濃度の上昇が認められた。(図 1)

非透析尿毒症患者において、血清 intact iPTH(iPTH)濃度に関連する因子として、iPTH 低値群では有意に血清 Mg は高値を示した。(表 1)単変量および多変量解析の結果でも、血清 Mg 濃度は有意な関連性が認められた。(表 2)

以上の結果を論文にて報告した。



(図 1) Relationship between serum Mg and

eGFR in uremic patients.

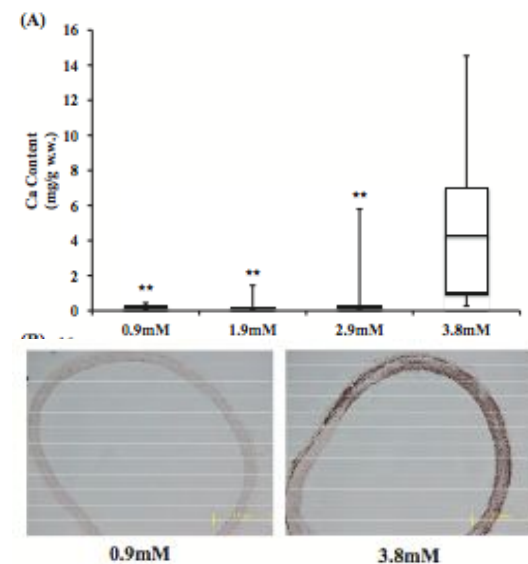
(表 1) Laboratory Parameters of Uremic Patients Above and Below Median Serum iPTH Level

	iPTH < 258 pg/mL (n = 616)	iPTH ≥ 258 pg/mL (n = 615)	P Value
Age, y	67.7 ± 12.8	63.9 ± 14.4	<.01
Sex (male), n, %	459 (54.0)	391 (46.0)	<.01
Diabetes, n, %	282 (45.9)	246 (40.0)	.38
SBP, mm Hg	150.5 ± 27	153.2 ± 25.5	.03
DBP, mm Hg	78.6 ± 14.3	78.6 ± 16.4	.01
Hemoglobin, g/dL	8.7 ± 1.5	8.5 ± 1.5	.54
Serum albumin, g/dL	3.2 ± 0.6	3.3 ± 0.6	<.01
SCr, mg/dL	9 ± 3.4	10 ± 3.5	<.01
eGFR, mL/min per 1.73 m ²	5.8 ± 2.9	4.8 ± 1.8	<.01
Serum corrected Ca, mg/dL	8.9 ± 0.9	8.2 ± 1	<.01
Serum Mg, mg/dL	2.3 ± 0.5	2.1 ± 0.5	<.01
Hypomagnesemia, n, %	40 (6.5)	66 (10.7)	<.01
Serum P, mg/dL	5.9 ± 1.6	6.6 ± 1.9	<.01
Alkaline phosphatase, U/L	255.4 ± 230.4	284.1 ± 161.3	<.01
Bicarbonate, mmol/L	19.4 ± 4.8	18.2 ± 4.8	<.01
ESA, n, %	486 (78.9)	455 (74.0)	.04
RAAI, n, %	406 (65.9)	351 (57.1)	<.01
VDRA, n, %	138 (22.4)	126 (20.5)	.41

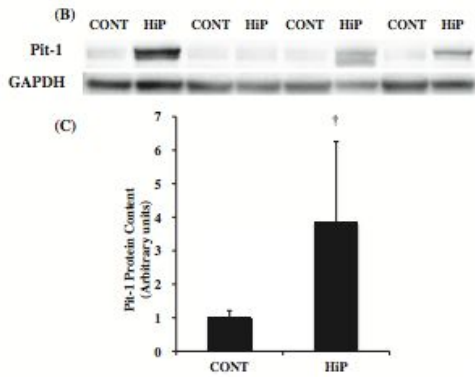
(表 2) Univariate and multivariate correlations between intact parathyroid hormone (iPTH) levels and other factors in uremic patients

	iPTH		Multivariate-β*	
	Univariate-ρ	P Value		P Value
Serum magnesium, mg/dL	-0.14	<.01	-0.12	<.01
Age, y	-0.13	<.01		NS
Sex (male, 0; female, 1)	0.13	<.01	0.15	<.01
Diabetes (no, 0; yes, 1)	-0.05	.10		NS
SBP, mm Hg	0.08	<.01		NS
DBP, mm Hg	0.09	<.01		NS
Hemoglobin, g/dL	-0.06	.04		NS
Serum albumin, g/dL	0.08	<.01		NS
SCr, mg/dL	0.19	<.01		NS
eGFR, mL/min per 1.73 m ²	-0.22	<.01	-0.18	<.01
Serum corrected calcium, mg/dL	-0.41	<.01	-0.25	<.01
Serum phosphate, mg/dL	0.21	<.01		NS
Alkaline phosphatase, U/L	0.23	<.01	0.15	<.01
Bicarbonate, mmol/L	-0.15	<.01		NS
ESA (no, 0; yes, 1)	-0.06	.03		NS
RAAI (no, 0; yes, 1)	-0.08	<.01	-0.07	.02
VDRA (no, 0; yes, 1)	-0.04	NS		NS

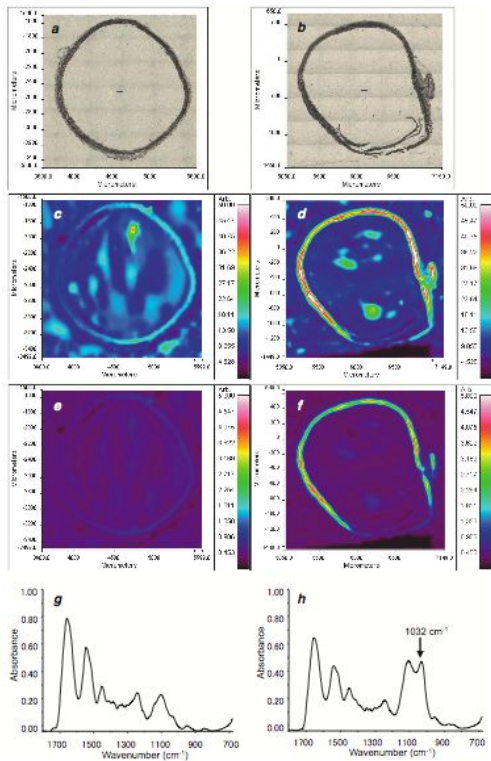
(2) ラット血管組織培養を高リン負荷条件下で 10 日間培養にて血管石灰化を生じた。(図 2)Pit-1 は高リン負荷にて遺伝子発現および蛋白発現量ともに増加していた。(図 3) FTIR を用いた検討ではリン酸塩が最も強く認められた。(図 4)SEM-EDX を用いた検討では、カルシウムとリンが石灰化の同一部位に沈着が認められた。(図 5) 以上のことから、血管石灰化部位はおもにリン酸カルシウムであることが明らかとなった。以上の結果を論文にて報告した。



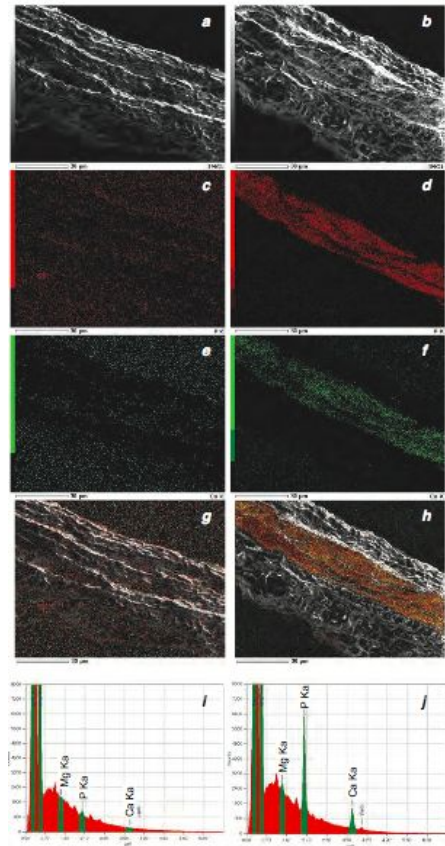
(図 2) Calcium content of rat aortic rings incubated under different concentrations of inorganic phosphorus (Pi).



(図3) Effect of incubation in a HiP medium on protein expression of the Pit-1 in aortic tissue.

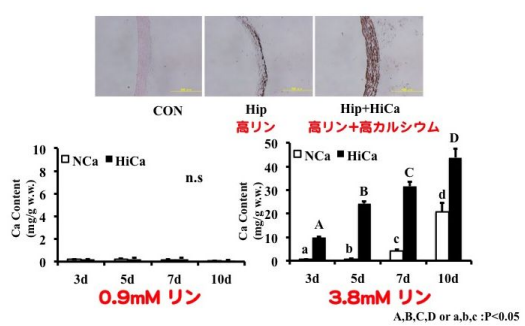


(図4) Microscopic images of aortic rings cultured in medium with (a) normal concentration of Pi 0.9 mmol/L (CONT) or (b) HiP, 3.8 mmol/L. FTIR images of the distribution of PO₄³⁻ (approximately 1,185 - 900 cm⁻¹) in aortic rings cultured in (c) CONT or (d) HiP. FTIR images of the distribution of PO₄³⁻ (1,035 - 1,025 cm⁻¹) in aortic rings cultured in (e) CONT or (f) HiP. FTIR spectra of aortic rings cultured in (g) CONT or (h) HiP. The PO₄³⁻ band at 1,032 cm⁻¹ (arrow) in (h) is designated as hydroxyapatite.

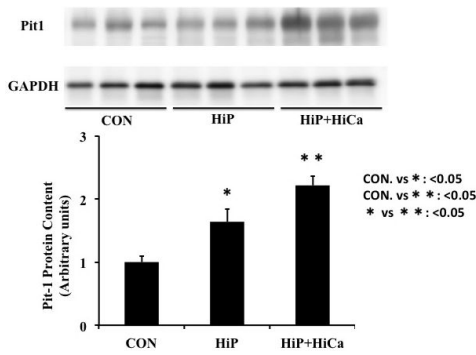


(図5) SEM images of aortic rings cultured in (a) CONT or (b) HiP. EDX maps of phosphorus in aortic rings cultured in (c) CONT and (d) HiP. EDX maps of calcium in aortic rings cultured in (e) CONT and (f) HiP. SEM-EDX overlay maps for phosphorus and calcium in aortic rings cultured in (g) CONT and (h) HiP. EDX spectra of aortic rings cultured in (i) CONT and (j) HiP.

(3) 血管組織培養においてカルシウムを負荷したところ、正常リン条件下では血管の石灰化は全く生じなかったが、高リン条件下で高リン単独で生じる血管石灰化がカルシウム負荷によりさらに増強することが認められた。(図6)さらに Pit-1 の遺伝子発現および蛋白発現量も高リン条件下にてその発現が増強していた。(図7)

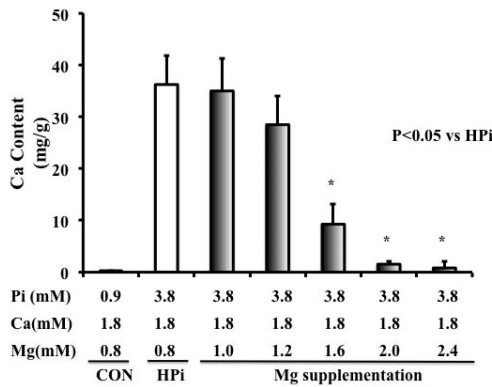


(図6) 正常リン、高リン条件下でのカルシウム負荷による血管石灰化の効果

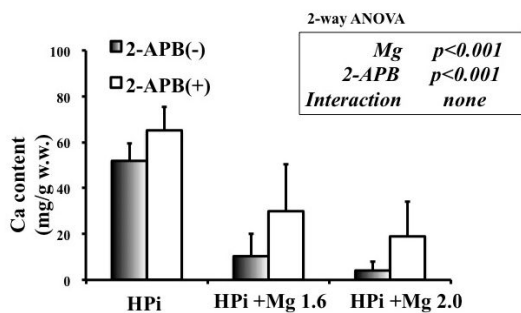


(図 7) 高リン負荷血管組織培養カルシウム負荷での Pit-1 の発現

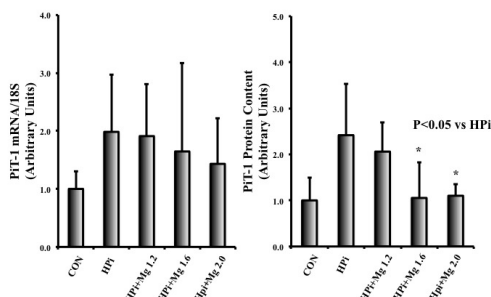
(4) 高リン負荷血管組織培養に Mg 負荷をおこなうと、血管石灰化は抑制された。(図 8) TRPM7 阻害作用のある 2-APB を添加したところ、Mg による血管石灰化抑制効果は減弱した。(図 9) Pit-1 の遺伝子発現および蛋白発現量は Mg 負荷によりその発現量は低下する傾向が認められた。(図 10)



(図 8) 高リン負荷血管組織培養による Mg 負荷による血管石灰化の効果



(図 9) 2-APB 添加による Mg による血管石灰化抑制効果に対する効果



(図 10) Mg 負荷による Pit-1 の発現量の変化

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 2 件)

Mineral composition of phosphate-induced calcification in a rat aortic tissue culture model.

Sonou T, Ohya M, Yashiro M, Masumoto A, Nakashima Y, Ito T, Mima T, Negi S, Kimura-Suda H, Shigematsu T.

J Atheroscler Thromb. 22(11):1197-206, 2015 doi: 10.5551/jat.28647.

Significance of serum magnesium as an independent correlative factor on the parathyroid hormone level in uremic patients.

Ohya M, Negi S, Sakaguchi T, Koiwa F, Ando R, Komatsu Y, Shinoda T, Inaguma D, Joki N, Yamaka T, Ikeda M, Shigematsu T.

J Clin Endocrinol Metab. 99(10):3873-8, 2014 doi: 10.1210/jc.2013-4396.

{ 学会発表 } (計 1 件)

第 59 回日本透析医学会学術総会 シンポジウム「CKD-MBD と New Comer の Mg」
大矢 昌樹 2014 年 6 月 13 日 神戸

{ 図書 } (計 0 件)

{ 産業財産権 }

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

{ その他 }

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大矢昌樹 (Masaki Ohya)
和歌山県立医科大学 医学部 講師
研究者番号：90550301

(2) 研究分担者

重松隆 (Takashi Shigematsu)
和歌山県立医科大学 医学部 教授
研究者番号：30187348