

氏名	三浦 麻里菜
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 616 号
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 16 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	血中 CPP は血管石灰化の原因物質である
論文審査委員	(委員長) 教授 小谷 和彦 (委員) 教授 松村 正巳 教授 高橋 将文

論文内容の要旨

1 研究目的

アテローム性動脈硬化と血管石灰化は、動脈硬化の 2 つの異なる病態である。血液中の不溶性脂質を輸送するコロイド状ナノ粒子であるリポタンパク質は、アテローム性動脈硬化症の原因物質であり、それを標的とした治療が行なわれている。対照的に、血管石灰化の効果的な治療標的は確立されていないのが現状である。血管石灰化の最も進行した病態は、高リン血症を伴う末期腎不全患者に多く観察される。しかし、現在臨床で行なわれているリン吸着薬と血液透析による血中リンを低下させる治療の効果は十分ではない。Calciprotein particles(CPP)は、血中に生じたリン酸カルシウムと、血清タンパクである Fetuin-A などが結合した、複合体ナノ粒子である。血管内皮細胞および平滑筋細胞にそれぞれ作用すると、細胞死および石灰化を誘発する活性があることが報告されている。CPP はコロイド粒子として、循環血液中に分散しており、血中リン濃度の上昇等とともに増加することが知られている。末期腎不全患者においては、高リン血症の進行とともに血中 CPP が上昇する。透析患者における臨床研究では、CPP は血管石灰化や非感染性慢性炎症との相関が報告されている。そこで、CPP は血管石灰化や非感染性慢性炎症を引き起こし、透析患者の臨床転帰を悪化させる原因となっているのではないかという仮説を立てた。この仮説を証明するために、血中 CPP が高値を示す透析モデルにおいて、CPP を除去することで検証を行った。

2 研究方法

ミニブタ透析モデルとは、ミニブタに両腎摘出術を行って腎不全を導入した後、血液透析用のダブルルーメンカテーテル、個人用透析器を用いて、2 日に 1 度の頻度で血液透析を行い、28 日間維持したモデルである。透析患者と同様に高リン血症、血管石灰化などの合併症を発症し、死亡率が増加する。血中 CPP も実際の透析患者と同様に高値を示す。CPP を除去する手段として、血液透析セッション中に血液から CPP を取り除くことができる CPP 吸着カラムを開発し、ミニブタ透析モデルを用いてその有効性を評価した。

3 研究成果

CPP 吸着カラムは、リン酸カルシウム結晶に強固に結合するビスホスホネートを使用して作製

した。まず、吸着カラムが実際に循環血液中の CPP を除去できるか検討した。両腎摘したミニブタに対してカラムを回路に接続した上で体外循環を行った。吸着カラムの流入前と流出後の採血ポートより血液を採取し、CPP 値を測定した結果、吸着カラムを通過した血液では CPP の低下が認められた。コントロールカラムでは CPP の低下は認められなかった。次に、透析セッション中にもカラムは CPP を吸着できるかどうか確認した。透析回路に接続したカラムの前後で、透析セッション中に経時的に血液を採取し CPP を測定した。血中 CPP 値は経時的に低下しており、吸着カラムは透析中にも CPP を除去できることが確認できた。使用済みのカラム中の吸着体に吸着されたタンパク質を溶出して銀染色すると、CPP の主な構成蛋白である Fetuin-A が多量に含まれており、カラムは CPP を吸着できていると考えられた。

実際にミニブタ透析モデルを使用し、CPP 吸着カラムの有効性を評価した。術後 28 日目までを観察期間と設定し、対照群と吸着カラム使用群の臨床転帰を比較した。2 群間で最も顕著に差が見られたのは、生命予後であった。対照群では 15 頭中 5 頭のみが観察期間中に生存したのに対して、吸着カラム使用群では 8 頭全頭が生存した。吸着カラム使用群では有意に生命予後が改善されていた。観察期間を生存した各群のミニブタ 4 頭をそれぞれ安楽死させ、冠動脈の石灰化を組織学的検査、血管内超音波検査、3D-CT で評価したところ、対照群の 4 頭中 3 頭で冠動脈石灰化を認めたのに対し、吸着カラム使用群の 4 頭ではいずれの検査においても冠動脈石灰化を認めず、吸着カラム使用によって統計学的にも有意に冠動脈石灰化が抑制されていることがわかった。その他には、吸着カラム使用群では転移性肺石灰化が軽度にとどまり、摘出した冠動脈の内皮依存性血管拡張薬に対する反応も改善されていた。血液を用いて石灰化傾向を比較したところ、CPP 吸着カラムは血中リン値の上昇を抑制し、CPP の形成しにくさの指標である T_{50} を延長させ、血中 CPP を減少させる傾向にあった。カラムの使用による有害事象と思われたのは、貧血の進行が対照群と比較して有意に速かった点である。その他の血液パラメータに有意差は認めなかった。

4 考察

生体内で、不溶性の物質を血中に溶かして運搬する戦略としてコロイドを形成する機構には、脂質およびリン酸カルシウムが挙げられる。脂質は一般に知られているように血清タンパク質であるアポ蛋白が結合し、コロイド粒子であるリポ蛋白を形成して血中に分散している。それと同様に不溶性物質であるリン酸カルシウムも、Fetuin-A という血清タンパク質が主に結合し、コロイド粒子である CPP となって血中に分散する。脂質もリン酸カルシウムもコロイド粒子となって血中を運搬され、それぞれの貯蔵器官である脂肪と骨に辿り着く。しかし、ターゲットを誤って血管系に設定してしまうと、リポ蛋白は粥状硬化を生じさせる。CPP の場合もリポ蛋白と同様に血管系に運搬されると、血管石灰化を誘発すると考えられる。本研究では、CPP が血管石灰化を引き起こし、生命予後を悪化させることを示した。リポ蛋白は、低密度リポ蛋白がアテローム硬化を促進し、高密度リポ蛋白は逆にアテローム硬化を抑制するといったように、粒子径、密度、組成等のコロイド特性に応じて、異なる機能を有している。同様に、CPP についても結晶性のリン酸カルシウムを含む結晶性 CPP はサイズが大きく、石灰化を惹起する力が強いため、非結晶性のアモルファス CPP よりも病原性が高い性質がある。アレンドロネートは主に結晶性のリン酸カルシウムに結合するため、本研究で使用した CPP 吸着カラムは、病原性の高い CPP を除去することが可能と考えられる。

保存期 CKD 患者の多くは、血中リン値がたとえ基準値内にあったとしても、透析患者に匹敵するレベルの CPP 高値を示す症例も多い。保存期 CKD 患者に対して CPP 吸着カラムは使用できないが、血中 CPP 値を下げたり、アモルファス CPP が結晶性 CPP に相転移するのを阻害して、ある意味「解毒」したりすることを目的とした薬物療法が有効である可能性がある。この概念と一致する臨床試験の結果が 2019 年に示されている。保存期 CKD 患者を対象としたランダム化比較試験で、マグネシウムの経口投与が冠動脈石灰化の進行を抑制したという結果であった。マグネシウムが血管石灰化に及ぼす治療効果は、マグネシウムが *in vitro* 及び *in vivo* の両方で T_{50} を延長するとして報告が指し示すように、マグネシウムが持つ CPP の形成を阻害する効果に起因している可能性がある。さらに最近の臨床試験では、透析液中のマグネシウム濃度を上げることで、透析患者の血中 CPP が低下したという報告がある。CKD 患者において、血中 CPP を下げ、CPP の性質を病原性が低くなる方向に促す治療法は、血管石灰化の治療と予後改善に有効と考えられる。

5 結論

本研究では、ミニブタ透析モデルを用いた検討により、CPP を除去することで血管石灰化が抑制され、生命予後が改善することを明らかにした。この結果は、CPP を治療標的とすることを正当化している。また、透析患者のみならず、保存期 CKD 患者においても、CPP の形成・作用を抑制する薬剤や治療法が予後の改善につながる可能性を示唆している。

論文審査の結果の要旨

本研究は、ミニブタ透析モデルを用いて、CPP の除去による血管石灰化への影響を明らかにする目的で実施された。申請者の所属する研究室は、CPP の研究のフロントラインにある。今回の研究で、申請者は、まず CPP の吸着カラムを作成した。CPP 吸着カラムを評価した上で、血中からの CPP の除去（透析）による血管石灰化の抑制効果を示した。病理組織や血管生理学的検査を用いて、その効果の病態生理学的裏付けも得た。さらに、生命予後の改善効果も示した（カラム未使用群では 15 頭中 5 頭が観察期間中に生存したのに対して、カラム使用群では 8 頭全頭が生存した）。治療の標的成分として CPP を位置づける大きな成果と考えられた。

本研究は、ミニブタ透析モデルを用いる着想や結果の新規性からみて、高い学術的意義を有すると考えられた。今後、CPP を標的とする診療への発展が期待される。保存期 CKD や透析を要する疾患の対策は、地域医療における重要課題であることから、委員が一致して、本学の学位論文として相応しいと判断した。

最終試験の結果の要旨

申請者から、本研究に至る背景、方法、結果とその考察についてプレゼンテーションが行われ、その後には口頭試問が行われた。以下のような点について、質疑がなされた：死亡例の頻度やその原因、CPP の測定方法（精度を含む）、その値のヒトとの比較、CPP による細胞死の機序、腹部大動脈や心臓弁膜に対する石灰化の程度、有害事象としての貧血への考え。これらについて、申請

者は適切に回答し、また学位論文の修正にも反映した。口頭試問の様子から、申請者が主体的に研究を遂行したと思われた。

研究から得られた成果を含めて、申請者は本学大学院博士課程の最終試験の合格レベルにあると判断された。