

表 題 血中 CPP は血管石灰化の原因物質である

論 文 の 区 分 博士課程

著 者 名 三浦 麻里菜

担当指導教員氏名 自治医科大学 分子病態治療研究センター
抗加齢医学研究部 教授
黒尾 誠

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
人間生物学系専攻
生体分子医学分野
抗加齢医学

2020年1月10日申請の学位論文

目次

はじめに	2
方法	5
1. ミニブタ透析モデルの作成	5
2. CPP 吸着カラムの作製：吸着体の検討	6
3. CPP 吸着カラムの作製：吸着カラムの評価	7
4. ミニブタ透析モデルにおける実験	7
5. 血中 CPP の測定	8
6. 組織学的解析	9
7. CT による解析	9
8. 大動脈中のカルシウム及びリンの定量	9
9. 摘出血管収縮反応の評価	10
10. T_{50} の測定	10
11. 培養細胞実験	11
12. 臨床研究	12
13. 統計	12
結果	13
CPP 吸着カラムの作製	13
CPP 吸着カラムの評価	16
ミニブタ血液透析モデルにおける CPP 吸着カラムの実験	19
CPP 吸着カラムの生命予後改善効果	20
血管石灰化	21
転移性肺石灰化	24
血管内皮機能障害	27
血液を用いた検討：石灰化傾向	28
有害事象	31
CPP が血管系に直接及ぼす作用	33
保存期 CKD 患者及び透析患者の血漿 CPP の測定	36
考察	37
結語	40
謝辞	41
参考文献	42

はじめに

慢性腎臓病(Chronic Kidney Disease : CKD)は、日本人の約 1330 万人が罹患していると推計され、成人の約 8 人に 1 人が罹患する、新たな国民病である。リンを摂取すると、腎臓の尿細管におけるリン再吸収が抑制され、尿中のリン排泄量が増加する。こうして、腎臓は生体内におけるリンの調節に重要な役割を果たしているが、CKD では腎臓が障害されステージが進行すると、リンの恒常性が破綻し、容易に高リン血症を呈するようになる。CKD 患者及び透析患者では、血中リン高値が生命予後の悪化や心血管疾患(Cardiovascular disease : CVD)の発症と相関することが知られており[1][2]、血管石灰化のリスクとなることが報告されている[3][4]。 *in vitro* の研究では、リン濃度の高い培地で培養すると、血管内皮細胞は reactive oxygen species(ROS)の産生を増加させ、アポトーシスが誘導されることが報告された[5][6]。さらに、血管平滑筋細胞は BNP-2、Runx2、オステオポンチンの発現を亢進させ、骨芽細胞様の形質転換と石灰化を起こすことが報告されている[7][8]。これらの研究からは、血管石灰化やそれに伴う CVD の原因を、リンの直接作用により生じた血管内皮障害や血管平滑筋の石灰化により説明できる可能性があった。しかし、通常の培地のリン濃度は約 1 mM、カルシウム濃度は 2 mM で、飽和濃度に近いことから、リン濃度を 1-2 mM 上昇させるだけであってもリン酸カルシウムが形成され、リンの直接作用と考えられていた数々の障害が、実はリン酸カルシウムの作用であった可能性が示された[9]。それを裏付けるように、リン酸カルシウムの存在下では、培地のリン濃度が高くなくても細胞障害が生じ、逆に培地のリン濃度を高くしていても、phosphonoformic acid 等のリン酸カルシウム結晶の形成を阻害する薬剤が添加してあれば、血管平滑筋の形質転換は起こらないことが報告されている

[9][10][11]。

これまでの臨床研究、基礎研究で見られたリンで生じる作用が、どのようなメカニズムで引き起こされるのか解明するため、我々は、**Calciprotein particles (CPP)**に注目している。**CPP**とは、リン酸カルシウムに血清タンパクである**Fetuin-A**が結合して形成される複合体ナノ粒子であり、血中ではコロイドとして分散している[12][13]。培地中のリンを上昇させると、リン酸カルシウムが生じるが、血清を添加した培地であれば、血清に豊富に含まれる**Fetuin-A**が速やかにリン酸カルシウムを吸着し、時間の経過とともに自然と**CPP**が形成される。**CPP**は不溶性のリン酸カルシウムを、臓器間で運搬する血中の担体として働いていると考えられる。また、骨以外の組織でリン酸カルシウムが成長することに対する防御機構が作動した結果生じるとも考えられ、実際、**Fetuin-A**のノックアウトマウスでは、全身に重度の異所性石灰化を起こすため、これを支持している[14][15]。これまでに報告された *in vitro* の研究では、人工的に作成した **CPP** を培養細胞に添加した実験において、培養平滑筋細胞の石灰化を誘導したり[16]、培養マクロファージに炎症性サイトカインの分泌を誘導したりする[17]ことが指摘されている。最近の臨床研究では、血清リン値の上昇に伴い、血中 **CPP** も増加することが明らかにされており[18]、血中 **CPP** が冠動脈石灰化スコアや脈波伝播速度(**pulse wave velocity : PWV**)と相関する[19][20]との報告があることから、**CPP** は血管石灰化と相関すると考えられる。従って、**CPP** の活性を考慮すると、この相関関係は実は因果関係である可能性があり、**CPP** が透析患者等に血管内皮障害や血管石灰化を引き起こす原因物質であることが強く示唆される。

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は、脂

質とアポタンパクが結合して形成され、貯蔵先である脂肪組織へ脂質を運搬する。リポタンパクが過剰になると、血管に貯まり粥状硬化の原因となることがよく知られており、それを標的とした治療が行なわれている[21]。一方、リン酸カルシウムと Fetuin-A が結合して形成されるコロイド状ナノ粒子である CPP も、主な貯蔵先である骨ではなく、血管に貯まると血管石灰化の原因になる可能性がある点は脂質と同様であるが、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[22]。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リンを下げる治療の効果は十分ではない[23]。そこで、血中 CPP が高値となる透析患者の CPP を除去することができれば、透析患者に見られる血管石灰化を抑制でき、臨床転帰の改善が期待でき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。具体的には、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。

方法

1. ミニブタ透析モデルの作成

株式会社日本バイオリサーチセンターのミニブタ実験施設(羽島研究所 修善寺分室)にて透析モデルを作成した。体重 23.2～31.9 kg、月齢 8～12 ヶ月のオスのミニブタを使用した。ミニブタは、げっ歯類では循環血液量が少ないため施行不可能な体外循環にも耐えられことから選択した。それに加え、組織学的、生理学的にもヒトに近いという利点もある。

ミニブタの実験は試験施設の動物実験委員会で承認され、厚生労働省通知 科発第 0601001 号「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成 18 年 6 月 1 日)及び、「日本バイオリサーチセンター実験動物の管理及び福祉に関する規定」(平成 19 年 4 月 2 日)を遵守して実施した。

7 日間の検疫期間の後、一般飼育用固形飼料(NS、日生研株式会社)200 g と、高リン食(無機リン酸ナトリウム 0.6 g/kg を加えた MP 1.2 倍 P 特注飼料、オリエンタル酵母株式会社)200 g を混合して 400 g にし、1 日 1 回、16:00 - 18:00 に給餌した。水道水を飲料水として自由に摂取させた。

全身麻酔下に血圧測定用カテーテル(メディカット LCV-UK キット、16 G、70 cm、日本コヴィディエン)を右又は左大動脈側枝に挿入し、先端部を腹部大動脈へ留置した後、血液透析用ダブルルーメンカテーテル(ブラッドアクセス UK-カテーテルキット、12 Fr、ニプロ株式会社)を頸静脈に挿入した。腹部を切開し腎臓を剥離して、尿管・腎動静脈を結紮し、両側の腎臓を摘出した。胃体部に JMS 親水性フォーリーカテーテル(16 Fr、株式会社ジェイ・エム・エス)を挿入し、胃に巾着縫合して固定した後、他端を腹部から出し皮膚に固定した。その後閉創

し手術を終了した。

血液透析はミニブタのダブルルーメンカテーテルを個人用透析装置 (NCU-12 及び NCV-10、ニプロ株式会社) に接続して行った。透析液は AK ソリタ®・DL (AY Pharmaceuticals Co.Ltd.) を用い、透析液の電解質濃度は以下のように調整した。Na⁺ : 140 mEq/L、K⁺ : 2.0 mEq/L、Ca²⁺ : 3.0 mEq/L、Mg²⁺ : 1.0 mEq/L、Cl⁻ : 111 mEq/L、CH₃COO⁻ : 10 mEq/L、Glucose : 100 mEq/L、HCO₃⁻ : 25 mEq/L。透析条件は、ダイアライザー : FB-90P β ECO (膜面積 0.9 m²、ニプロ株式会社)、血流 : 150 mL/min、透析液流量 : 300 mL/min、透析時間 : 5 時間、抗凝固薬 : 透析直前にレビパリンナトリウム注射液 (クリバリン®透析用 1000 単位/mL バイアル 5 mL、マイラン EPD 合同会社) 50 U/kg ボーラス投与後 100 U/5 mL/hr で持続投与、透析頻度 : 2 日に 1 回とした。除水量は初回透析日のみ飲水量を除水量とし、2 回目以降は基本的に前回の透析後体重からの増加分とプライミングボリュームを足した量に設定した。透析前後の血圧及び血液ガス検査の結果から除水量は適宜調整した。血液ガスは、大腿動脈に留置したカテーテルから採取した血液を、ポータブル血液分析器 (i-STAT1、扶桑薬品工業株式会社) を用いて分析した。ミニブタは 3~4 週間以内に、血管石灰化、血管内皮機能不全、転移性肺石灰化、高リン血症、心肥大などの血液透析患者と類似した合併症を発症し、死亡率が増加した。

2. CPP 吸着カラムの作製 : 吸着体の検討

カルボキシル基を表面に加工したセルロース担体に、アレンドロネート、ネリドロネート、パミドロネートの 3 種類のビスホスホネートをそれぞれ固相化した吸着体を作成した。それぞれの吸着体に透析患者の血清を加え、室温で 1 時間インキュベートした血清と、未処理の血清中の CPP を、ゲルろ過法にて測定して吸着率を比較した。

3. CPP 吸着カラムの作製：吸着カラムの評価

CPP 吸着カラムは株式会社カネカで作製した。アレンドロネートをセルロース担体に固相化して作製した吸着体を、120 ml のカラム容器に充填して作製した。コントロールカラムには、アレンドロネートを固相化していないセルロース担体を同量充填した。

両腎摘出後 3 日目のミニブタに対してダイアライザーのない透析回路を用いて体外循環を行った。コントロールカラムまたは CPP 吸着カラムのみを直列に回路に接続した。体外循環を開始してから 30 分後に血液を採取した。血液は CPP 吸着カラムの前後の採血ポートより採取し、CPP を測定した。

また、ダイアライザーが存在する透析回路に挿入する際のカラムの吸着能を評価するために、通常の透析回路に CPP 吸着カラムを接続して血液透析を行った。カラムは、ミニブタとダイアライザーの間に直列に接続した。血液透析セッション中の血液を、CPP 吸着カラムの前後の採血ポートより経時的(透析開始前、透析開始後 5、15、60、300 分)に採取し、CPP を測定した。

さらに、使用済みの吸着カラムから吸着体を取り出し、Dulbecco' s Modified Eagle Medium (DMEM、Life Technologies、Carlsbad、CA、USA)で5回洗浄し、50 mM EDTA 溶液で結合した蛋白質を溶出した。溶出液は SDS-PAGE 後、銀染色を行った。

4. ミニブタ透析モデルにおける実験

株式会社日本バイオリサーチセンターのミニブタ実験施設にて、ミニブタ透析モデルを使用して CPP 吸着カラムの効果を確認する実験を行った。両腎摘出して2日後より、血液透析を開始した。CPP 吸着カラムを使用する「カラム使用群」と使用しない「コントロール群」の2群を設定して、腎摘前(day0)と術後2、6、14、22 日目の透析前後の血液を採取した。血液は頸静脈に留置したダブル

ルルーメンカテーテルから採取した。血算検査を行い、血清・ヘパリン血漿を分離して凍結保存した。血算検査は、多項目自動血球計数装置 pocH-100iV(シメックス株式会社)で行った。試験終了日である術後 28 日目には全身麻酔下で心エコー検査を施行後、血管内超音波 (IVUS) を行って血管石灰化を評価した。IVUS は IVUS IMAGING: s5™ Imaging System(Volcano Corporation)を用いて左冠動脈回旋枝の IVUS 画像を記録した。さらに剖検を行い、心臓と血管 (大動脈、冠動脈) と肺を採取した。冠動脈左回旋枝の一部は摘出血管収縮反応検査 (マグヌス試験) に使用した。心臓、血管、肺の組織は、ホルマリン固定・パラフィン包埋後薄切し、von Kossa 染色で病理組織検査を行った。ホルマリン固定後の心臓と肺を CT 撮影し、石灰化を描出した。一般生化学 (クレアチニン、BUN、リン、カルシウム) を測定した。一般生化学は生化学自動分析装置 AU 480(ベックマン・コールター・バイオメディカル株式会社)で行った。

5. 血中 CPP の測定

血中 CPP をゲルろ過法にて測定した[18]。4 μ L の血漿を 36 μ L の 100 mM HEPES(pH 8.0)と 0.5 μ M OsteoSense を含んだ DMEM に加えた。25 $^{\circ}$ C で 60 分間インキュベートした後、混合物のうち 30 μ L を排除限界が 40 kDa のスピンカラム(Bio-rad Laboratories、Hercules、California、USA) に添加し、1,000 g, 2 分間遠心分離した。フロースルーは、蛍光色素の凝集による蛍光のクエンチングを避けるために、1 % SDS と 50 mM EDTA で CPP を溶解し、96 well プレートに移して近赤外蛍光スキャナー(Odyssey CLx, LI-COR、Lincoln、NE、USA excitation 685 nm、emission 700 nm)で蛍光を定量した。700 nm の蛍光強度を CPP 値として定義した。

6. 組織学的解析

剖検を行い、心臓と血管（大動脈、冠動脈）と肺を採取した。10 %中性緩衝ホルマリン液で固定した。パラフィン包埋後、薄切し、von Kossa 染色を行った。光学顕微鏡 (OLYMPUS BX51、オリンパス株式会社) を用いて観察し、画像を取得した。

7. CT による解析

ホルマリン固定したミニブタの心臓と肺を使用した。それぞれの臓器を個体毎にサランラップで円筒形に包み、Somatom Definition AS+(Siemens Healthineers Japan) を使用して 3D-CT を撮像した。

8. 大動脈中のカルシウム及びリンの定量

凍結保存していた大動脈を凍結乾燥させ、乾燥重量を測定した。クロロホルム：メタノール＝2：1の混合液中に、組織を約2日間浸漬させて脱脂した。脱脂後、アセトン中に約3時間以上浸漬させて脱水した。脱水した組織を電気マッフル炉 (FUW253PB、Advantec) を用いて 550 °C で 12 時間灰化した。室温から 550 °C まで 6 時間、550 °C を 12 時間、550 °C から室温まで 10 時間に設定した。灰を 6 M 塩酸に溶解後、蒸留水を加えて 4 倍希釈し、よく混和した。抽出溶液中のカルシウムをカルシウム E-テストワコー (富士フィルム和光純薬工業株式会社) を用いて測定した。同様に抽出溶液中のリンをホスファ C-テストワコー (富士フィルム和光純薬工業株式会社) を用いて測定した。灰化組織におけるカルシウム及びリン濃度を、灰化物中濃度 (mg/dL) = 測定値 × 抽出希釈倍率 × 測定時希釈倍率で算出した。灰組織のカルシウム及びリン含有量を、灰化物中含量 (mg) = 濃度 (mg/mL) × 抽出用量 (mL) で算出した。組織中のカルシウム及びリン含有量を、組織中含量 (mg/g tissue) = 灰化物中含量 (mg) / 組織重量

(g)で算出した。

9. 摘出血管収縮反応の評価

摘出した冠動脈左回旋枝を 2 mm の輪切りにしたリング標本を作製した。95 % O_2 及び 5 % CO_2 を通気した Krebs-Henseleit buffer (KH buffer、37 °C、10 mL) で満たした Magunus 管内に 2 g の静止張力で懸垂した。標本の張力変化を等尺性トランスデューサー (TB-611 または TB-612、日本光電、日本) を用いて測定した。30 分間の平衡化の後、KH buffer を 66.7 mM KCl の高カリウム KH buffer に置換し脱分極収縮反応を観察した。Magunus 管を洗浄して 30 分以上平衡化した後、エンドセリン-1 (ET-1: $3 \times 10^{-10} \sim 3 \times 10^{-8}$ M、公比: 3) の収縮反応を観察し、収縮の持続が安定したところで、ブラジキニン (BK: $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-6}$ M、公比: 10) による血管内皮依存性の弛緩反応、ニトロプルシド (SNP: $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-4}$ M、公比: 10) による血管内皮非依存性の弛緩反応を観察した。各群の KCl の収縮張力 (g) を 100 として、ET-1 の収縮率を算出した。同様に、ET-1 の最大収縮を 100 として最大張力からの減少値を用いて BK、SNP の弛緩率を算出した。

10. T_{50} の測定

CPP の形成しにくさを定量出来る T_{50} についても検討した。 T_{50} とは、血清または血漿にカルシウムとリン酸塩を加え、人工 CPP が形成されるまでに経過した時間 (分) として定義され、 T_{50} が大きいほど CPP 形成に耐性があり、小さいほど CPP を形成しやすいと解釈されている [24]。96 well プレートに以下の順で操作を行った。

(1) 140 mM NaCl 20 μ L/well を分注した。(2) ミニブタ血漿 80 μ L/well を加え、1 分混和した。(3) Calcium solution (20 mM $CaCl_2$ 、50 mM Hepes、140 mM NaCl pH 7.40) 50 μ L/well を加え、1 分混和した。(4) Phosphate solution

(19.44 mM Na₂HPO₄、4.56 mM NaH₂PO₄、100 mM Hepes、140 mM NaCl pH 7.40) 50 μL/well を加え、1 分混和した。(5) 96well プレートを手シールでカバーした後、ネフエロスター(BMG Labtec、Jena、Germany)にて、30 °C、1 サイクルは180 秒に設定し、経時的に濁度を測定した。

1 1. 培養細胞実験

ヒト臍静脈内皮細胞 (HUVEC) 及びラット大動脈平滑筋細胞 (A7r5) はそれぞれ Promo Cell 及び、ATCC より購入し、購入元が推奨する培地でそれぞれ培養した。10 %ウシ胎児血清(FBS)を添加した DMEM 中のカルシウムとリン酸塩の濃度をそれぞれ 5 mM と 7 mM に設定し、37 °Cで 24 時間インキュベートすることにより、*in vitro*で CPP を生成した。この培地を「CPP 含有培地」と定義した。10 % FBS を含む通常の DMEM は 2 mM のカルシウムと 1 mM のリン酸塩を含んでいるが、37 °Cで 24 時間インキュベートした後でもゲルろ過法で検出可能な CPP を生じなかったため、「CPP 非含有培地」と定義した。CPP 含有培地及び CPP 非含有培地を、CPP 吸着カラムまたはコントロールカラムを用いてろ過した。細胞生存率を評価するために、カラムフロースルーを等量の HUVEC 用増殖培地とそれぞれ混合し、96 well プレートに播種したコンフルエントな HUVEC に添加し、72 時間または 96 時間後、MTT アッセイ Kit (Promega、マディソン、WI)を用いてプロトコルに従って測定を行った。

また、カラムフロースルーを等量の増殖培地と混合し、コンフルエントな A7r5 に振りかけて石灰化の程度を評価した。カラムフロースルー混合培地は 3 日毎に繰り返し交換した。4 週間後、A7r5 をメタノールで固定し、アリザリンレッド S(コスモ・バイオ株式会社)を使用して染色した。アリザリンレッド S を 10 % (w/v) 塩化セルピリジニウムで溶出し、570 nm の吸光度を測定し定量した。

1 2. 臨床研究

保存期 CKD 患者、血液透析患者の血漿 CPP レベルの測定は、自治医科大学の倫理審査委員会により承認されたプロトコル及びヘルシンキ宣言に従って実施した。148 人の保存期 CKD 患者の血漿 CPP 値は以前に報告されている[18]。合計 75 人の維持透析患者が地域のクリニックから募集に応じた。全ての患者から書面によるインフォームドコンセントを得た。それぞれの患者において、透析前に採取した血液からヘパリン血漿を調製し、ゲルろ過法で CPP 値を測定するまで、-80 °C のフリーザーにて保存した[18]。

1 3. 統計

統計分析は、GraphPad Prism 8(Graph Pad Software, Inc. La Jolla, CA, USA) を用いて行った。統計定量データは、特に明記しない限り、平均±標準偏差で表示した。すべての t 検定は、一貫した標準偏差を仮定せずに両側で行った。

結果

CPP 吸着カラムの作製

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、CPP 吸着カラムを作製した。ビスホスホネートは、ピロリン酸の誘導体で、リン酸カルシウム結晶に特異的に結合する性質を持ち、破骨細胞に細胞死を誘導する生物活性も持っている。現在様々なビスホスホネートが臨床応用されているが、その中でも、アミノ基を側鎖に持つ、パミドロネート、アレンドロネート、ネリドロネートの 3 種を候補とした(図 1)。これらのビスホスホネートは、カルボキシル基を表面に加工したセルロース担体と、アミンカップリングで容易に固相化できるためである。

それぞれのビスホスホネートをリガンドとして 3 種類の吸着体を作成し、透析患者の血清を用いて CPP の吸着効率を検討した(図 2)。いずれのビスホスホネートを固相化した吸着体もほぼ同じ効率で CPP を吸着することが確認された。従って、安価で大量入手が容易なアレンドロネートを選択した。

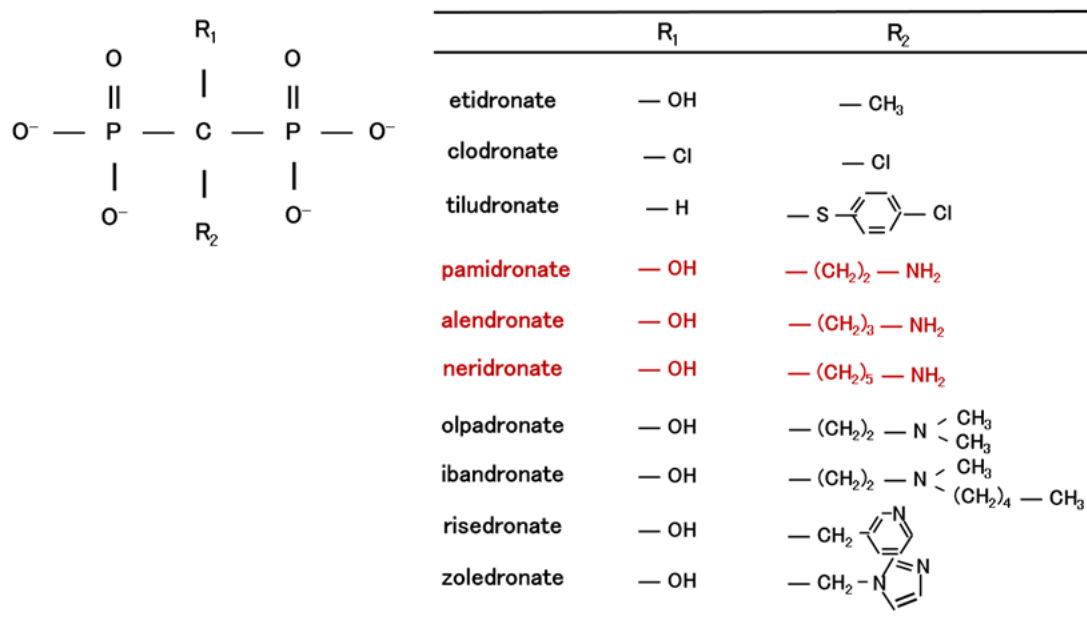


図 1：ビスホスホネートの構造

(a) 基本骨格。

(b) 側鎖構造により、破骨細胞を細胞死させる生物活性の程度に違いがあることが知られているが、いずれもリン酸カルシウム結晶に結合する化学活性は保たれている。

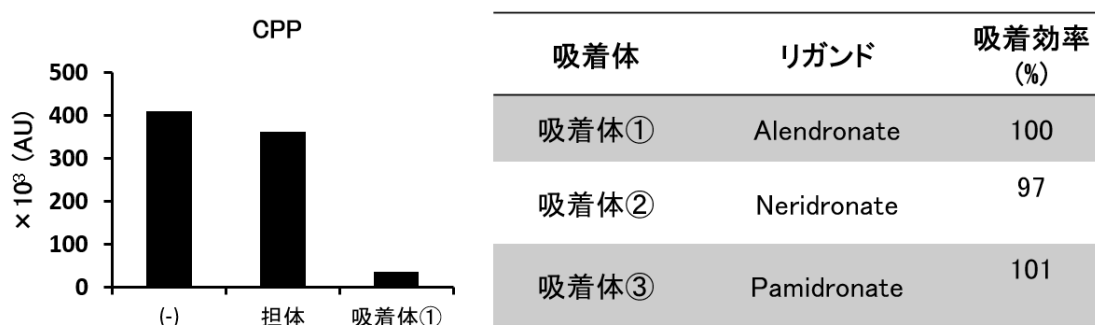


図 2：CPP 吸着体

(a) 透析患者の血清 CPP を測定後(左)、セルロース担体(中)または吸着体①(右)

を加え、室温で1時間インキュベートした後、再度 CPP を測定した。

- (b) 試作した3種類の CPP 吸着体。吸着体①の吸着効率を100 %とした時、吸着体②及び吸着体③の吸着効率を相対化すると、ほぼ同様の吸着効率であった。

CPP 吸着カラムの評価

まず、アレンドロネート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、コントロールカラムまたは CPP 吸着カラムのみを回路に接続し、体外循環を行った(図 3 a)。血液を CPP 吸着カラムの流入前と流出後の採血ポートより採取し、CPP を測定した。CPP レベルの低下は CPP 吸着カラムを通過した血液で認められたが、コントロールカラムを通過した血液では認められなかった(図 3 b)。

さらに、CPP 吸着カラムを血液透析回路に連結する場合の CPP 吸着能を評価した(図 3 c)。経時的に血中 CPP レベルは低下しており、CPP 吸着カラムは透析セッション中に CPP を除去できることが確認できた(図 3 d)。

また、使用済みカラム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 吸着カラムの溶出液中には CPP の主な構成タンパク質である Fetuin-A が多量に含まれており、CPP はカラムに吸着できていると考えられた(図 3 e)。

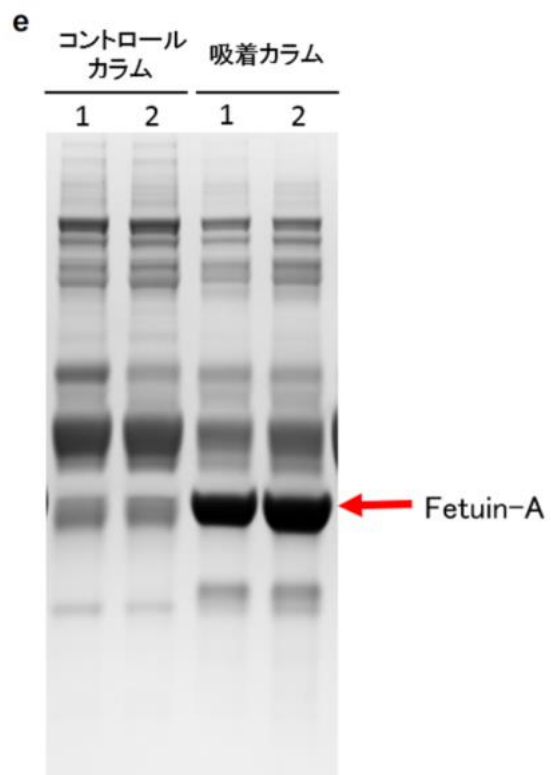
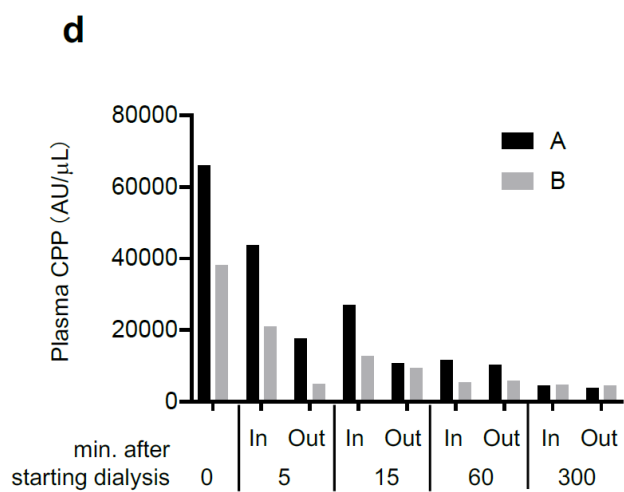
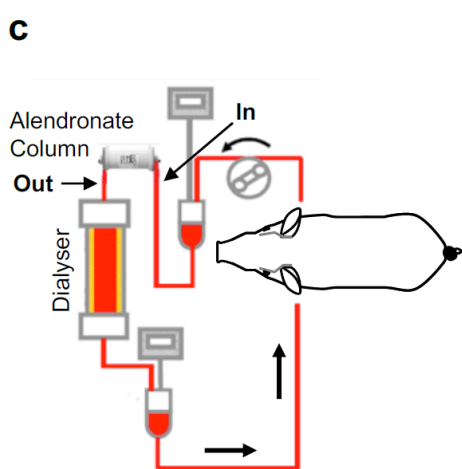
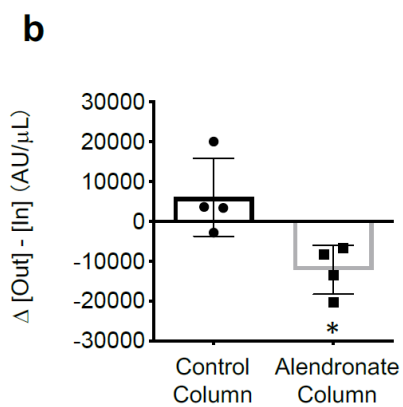
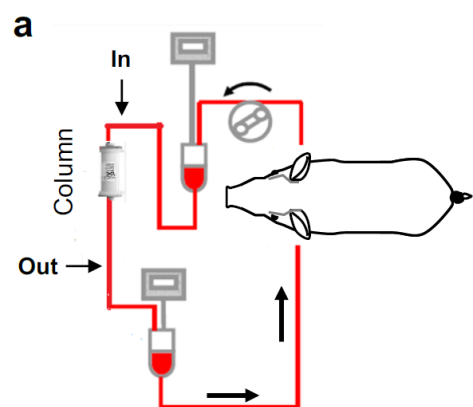


図 3 : ミニブタを用いた CPP 吸着カラムの評価

- (a) CPP 吸着カラムまたはコントロールカラムを使用した体外循環の概略図。体外循環を開始し 30 分後に、カラム流入前・流出後の採血ポートよりそれぞれ血液サンプルを採取した。CPP はゲルろ過法で測定した。
- (b) カラム前後の血中 CPP レベルの差。CPP 吸着カラムは CPP を吸着した(コントロールカラム群 4 頭、CPP 吸着カラム群 4 頭。データは平均値±標準偏差。
* $P = 0.02$: t 検定)。
- (c) CPP 吸着カラムを使用した血液透析回路の概略図。CPP 吸着カラムはダイヤライザーの上流に直列に接続した。
- (d) CPP 吸着カラム群のミニブタ 2 頭(A:黒、B:グレー)の血液透析開始前、開始 5、15、60、300 分後の CPP を測定した。CPP 吸着カラム流入前・流出後の採血ポートよりそれぞれ採取した。
- (e) カラム溶出液中タンパク質の比較。CPP 吸着カラムの溶出液中には CPP の主な構成タンパク質である Fetuin-A が多量に含まれていた(矢印)。

ミニブタ血液透析モデルにおける CPP 吸着カラムの実験

作製した CPP 吸着カラムを用いて、ミニブタ透析実験を行った。オスのミニブタの両腎を摘出して腎不全を導入し、術後 2 日目より血液透析を開始した。ミニブタは、CPP 吸着カラム非使用群(対照群)と CPP 吸着カラム使用群(カラム使用群)の 2 群に分け(対照群 15 頭、使用群 8 頭)、2 日に 1 回、1 回 5 時間の血液透析を施行した。観察期間は術後 28 日目までと設定し、合計 14 回の透析セッションを行った。対照群とカラム使用群の間で、透析効率に統計学的有意差は認めなかった(図 4)。

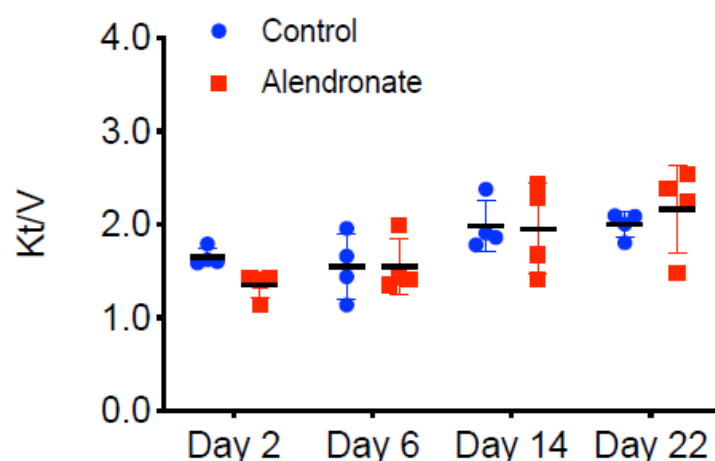


図 4：透析効率

カラム使用群(赤、N = 4)と対照群(青、N = 4)の群間で、Kt/V は統計学的有意差を認めなかった。データは平均値±標準偏差。透析効率は Daugirdas の式[25]を使用して算出した。 $Kt/V = -\ln(Ct/Co - 0.008t) + (4 - 3.5Ct/Co) \times \Delta BW / (BW)$ 、Ct: 透析後 BUN(mg/dL)、Co: 透析前 BUN(mg/dL)、t: 透析時間(hr)、 ΔBW : 総除水量(kg)、BW: 透析後体重(kg)

CPP 吸着カラムの生命予後改善効果

カラム使用群と対照群の臨床転帰を検討した。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、カラム使用群では 8 頭全頭が生存した。カラム使用群では有意に生命予後が改善されていた (図 5)。ミニブタの死因は、原因不明の突然死が多かった。心肥大を来たすモデルであるので、拡張障害が原因の心不全や不整脈が考えられる。死因が明らかにできた個体では、消化管出血や呼吸不全が見られた。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、以下のような組織学的解析を行った。

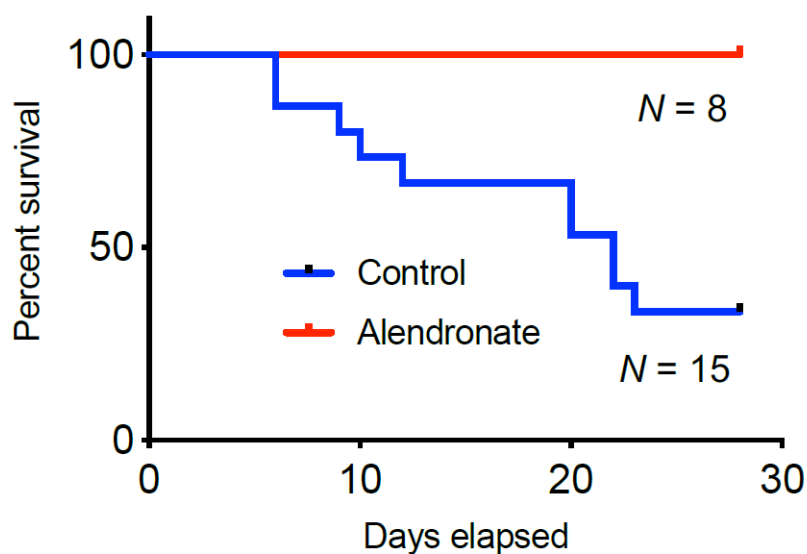


図 5：生命予後に対する CPP 吸着カラムの効果

カラム使用群 (赤、N = 8)、対照群 (青、N = 15) の Kaplan-Meier 生存曲線。Log-rank 検定で $P = 0.004$ 。腎摘後 28 日間の観察期間を生存したミニブタのうち、対照群の 4 頭 (Control #1-4)、カラム使用群の 4 頭 (Alendronate #1-4) で剖検し、組織学的検査と 3D-CT 検査を行った。

血管石灰化

肉眼所見を比較すると、対照群の 4 頭中 2 頭で明らかな冠動脈石灰化が認められた。肉眼的には石灰化が確認できない 2 頭のミニブタのうち 1 頭は、血管内超音波検査 (IVUS) により、冠動脈の部分的な中膜石灰化が見出された (図 6)。組織学的所見においては、von Kossa 染色で冠動脈の血管平滑筋層の石灰化が見られた (図 7 a)。ホルマリン固定したミニブタの心臓の標本を 3D-CT で解析すると、対照群の冠動脈は、著しく輝度が上昇していた (図 7 b、7 c)。対照群の 4 頭中 3 頭で冠動脈石灰化が認められたのに対し、カラム使用群の 4 頭では IVUS (図 6)、von Kossa 染色 (図 7 d)、3D-CT (図 7 e、7 f) のいずれの検査においても冠動脈石灰化は認められなかった。カイ二乗検定で検討すると、 $P = 0.029$ であり、CPP 吸着カラムの使用によって冠動脈石灰化が有意に抑制された。

心臓弁は、対照群及びカラム使用群のいずれでも石灰化を認めなかった。

下行大動脈、胸部大動脈、及び腹部大動脈組織中のカルシウム及び無機リンの定量を行い、対照群では含有量が高い個体も認められたが、両群間で比較しても統計学的有意差を認めなかった。

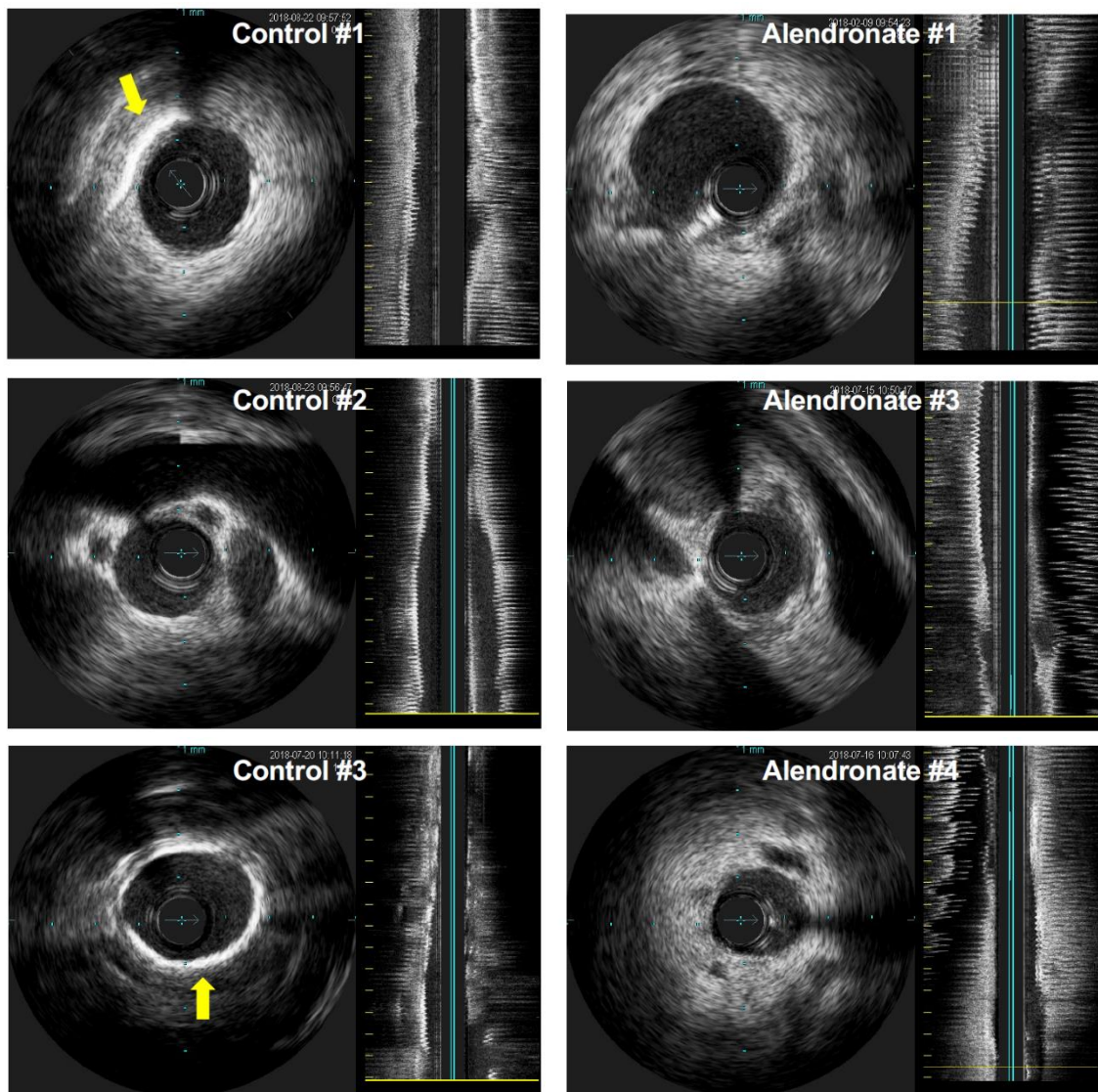


図 6：血管内超音波検査 (IVUS) で検出された冠動脈石灰化

冠動脈左回旋枝の中膜の石灰化は、一部または全周性の高エコー病変として、Control #1、Control #3 で検出された(矢印)。

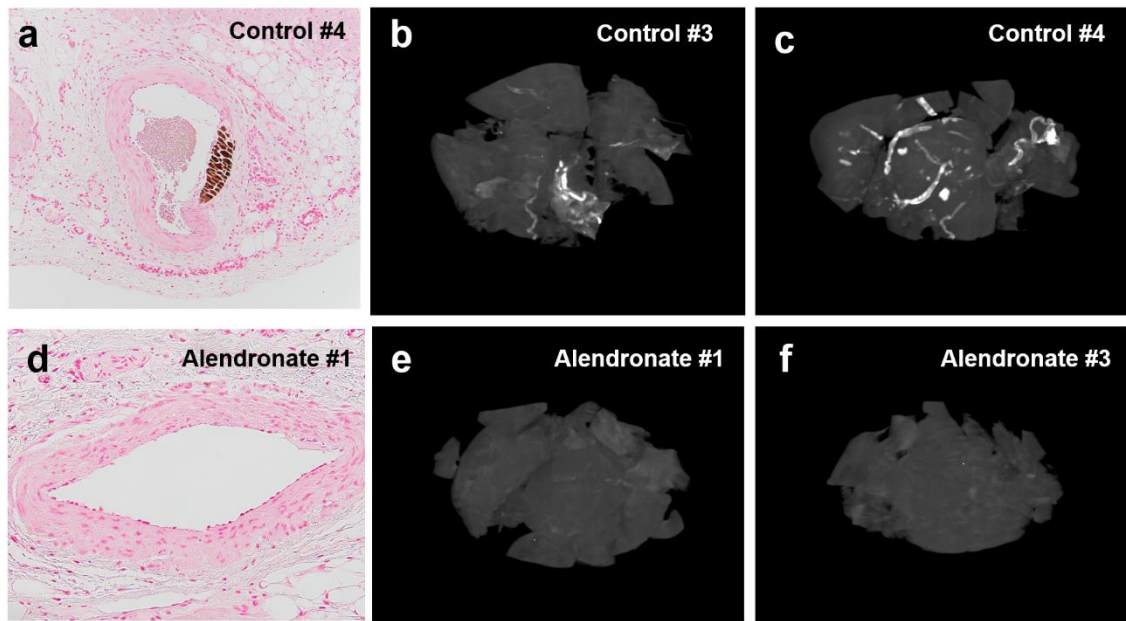


図 7 : 血管石灰化に対する CPP 吸着カラムの効果を示す組織学的検査と 3D-CT 所見

(a) (d) はホルマリン固定した心臓の切片の von Kossa 染色。a:Control #4、d:Alendronate #1。対照群では、冠動脈中膜の石灰化部位が褐色に染色された。

(b) (c) (e) (f) はホルマリン固定した心臓標本の 3D-CT 画像。c:Control #3、d:Control #4、f:Alendronate #1、g:Alendronate #3。対照群では冠動脈が高輝度で描出された。

転移性肺石灰化

剖検時に透析患者の 60 - 75 %で、肺の石灰化が存在しているとする報告があり [26]、本研究においてもミニブタの肺にリン酸カルシウムの沈着を認めた。対照群のミニブタでは、全頭が重度の転移性肺石灰化を呈していた。カラム使用群においても転移性肺石灰化を認めたが、対照群と比較すると軽度であった（図 8）。von Kossa 染色では透析患者における報告と同様に、主に肺胞壁の石灰化が観察された [26]。対照群は重度の転移性肺石灰化であったが、pH、 HCO_3^- 、BE、酸素及び二酸化炭素の分圧を含む動脈血ガスの値は、対照群とカラム使用群の間で統計学的な有意差はなかった（図 9）。

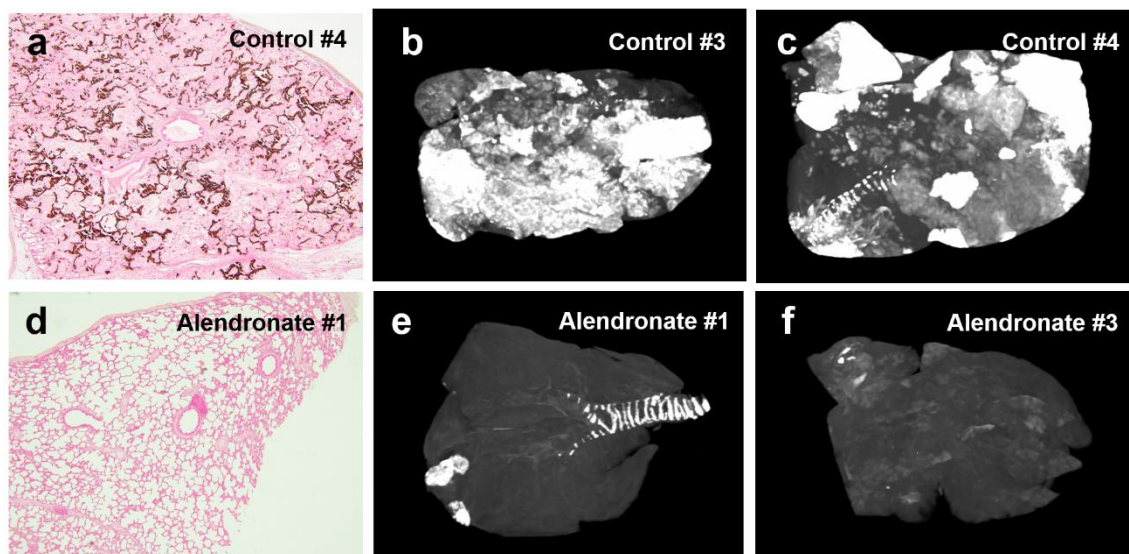


図 8：転移性肺石灰化に対する CPP 吸着カラムの効果を示す代表的な組織所見と 3D-CT 所見

(a) (d) はホルマリン固定した肺切片の von Kossa 染色。a:Control #4、d:Alendronate #1。対照群では肺胞壁の異所性石灰化が褐色に染色されている。

(b) (c) (e) (f) はホルマリン固定した肺標本の 3D-CT 画像。b:Control #3、c:Control #4、e:Alendronate #1、f:Alendronate #3。対照群では高輝度に描出される石灰化領域が散見された。カラム使用群では石灰化の程度が軽減していた。

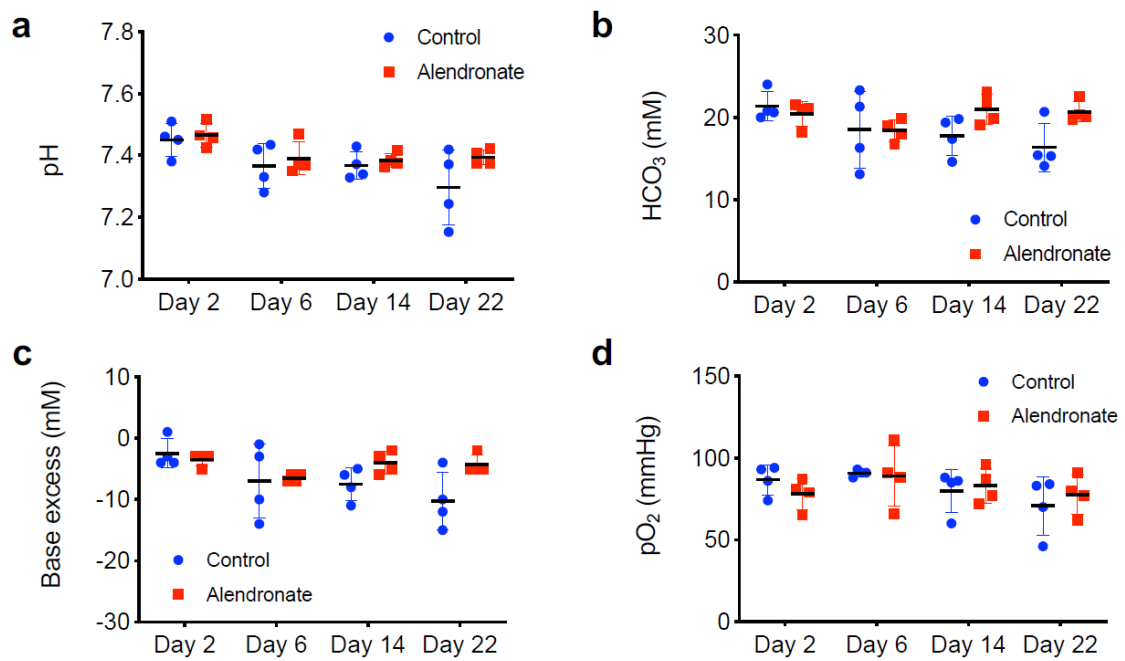


図9：動脈血液ガス検査所見。透析前に採取した動脈血の動脈血 pH (a)、重炭酸塩 (b)、Base excess (c)、酸素分圧 (d)、二酸化炭素分圧 (e)。カラム使用群(赤、N = 4)、対照群 (青、N = 4)。データは平均値±標準偏差。2 群間に統計学的な有意差は認められなかった。

血管内皮機能障害

血管内皮機能障害は CKD 患者と関連しており、心血管合併症の発症・進展に関与することが知られている[27]。摘出したミニブタの冠動脈左回旋枝を用いて、内皮依存性の血管拡張薬に対する反応障害の程度を確認し、血管内皮機能を評価した。対照群の冠動脈では、内皮依存性血管拡張薬の用量を増加させても反応が乏しかったのに対し、カラム使用群の冠動脈の拡張反応は、正常なミニブタの冠動脈とほぼ同等であった。(図 10)

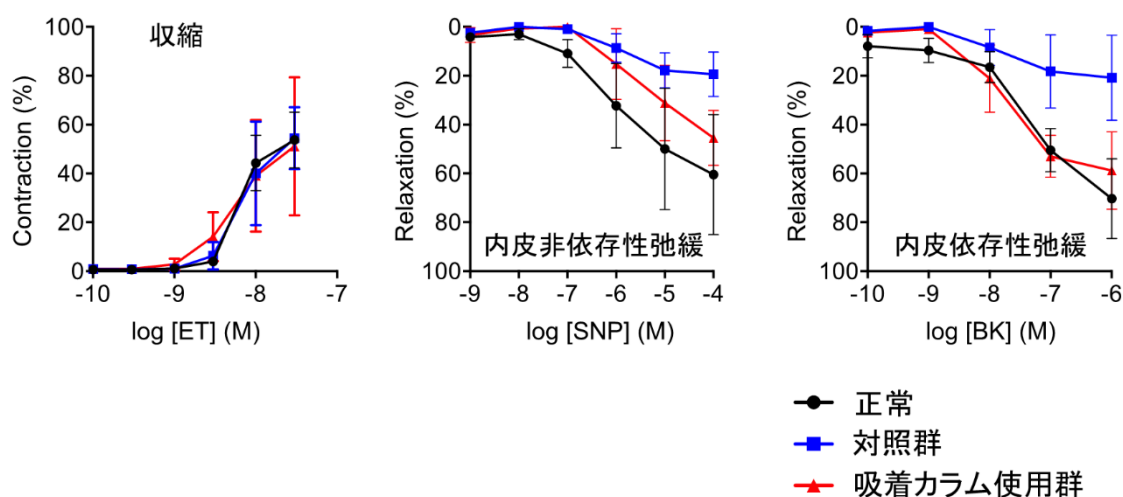


図 10 : ミニブタ冠動脈の内皮依存性血管拡張

対照群(青、N = 3; Control #1、#2、#3)、カラム使用群(赤、N = 3; Alendronate #1、#3、#4)に加え、比較のため正常なミニブタ(腎臓を摘出していない健常なミニブタ。黒、N = 3)のデータも示した。冠動脈は、ブラジキニンで処理する前にエンドセリン-1 (30 nM) で収縮することを事前に確認した。血管の張力はエンドセリン-1 による収縮を最大張力とし、最大張力からの減少値で表した。データは平均値±標準誤差。

血液を用いた検討：石灰化傾向

透析前血中リン濃度は、対照群では観察期間中に徐々に上昇する傾向にあったが、カラム使用群では day 6 以降は頭打ちとなり、血中リン濃度の上昇を抑制した(図 1 1 a、1 1 b)。

CPP の形成しにくさの指標となる T_{50} についても検討した。 T_{50} とは、血清または血漿にカルシウムとリン酸塩を加え、人工 CPP が形成されるまでに経過した時間(分)として定義され、 T_{50} が大きいほど CPP 形成に耐性があると解釈されている[24]。実際に、本研究においても、血漿 T_{50} と血漿 CPP 値の間には、負の相関関係を認めた(図 1 1 c)。これまでに、 T_{50} は冠動脈石灰化スコア[28]及び CKD 患者の全死亡率と逆相関することが報告されている[29]。本研究の血漿 T_{50} は、観察期間中に、カラム使用群で徐々に延長したのに対し、対照群では一定のままであった(図 1 1 d、1 1 e)。その傾向に対応するように、血漿 CPP 値は、カラム使用群で減少していたが、対照群では減少しなかった(図 1 1 f、1 1 g)。

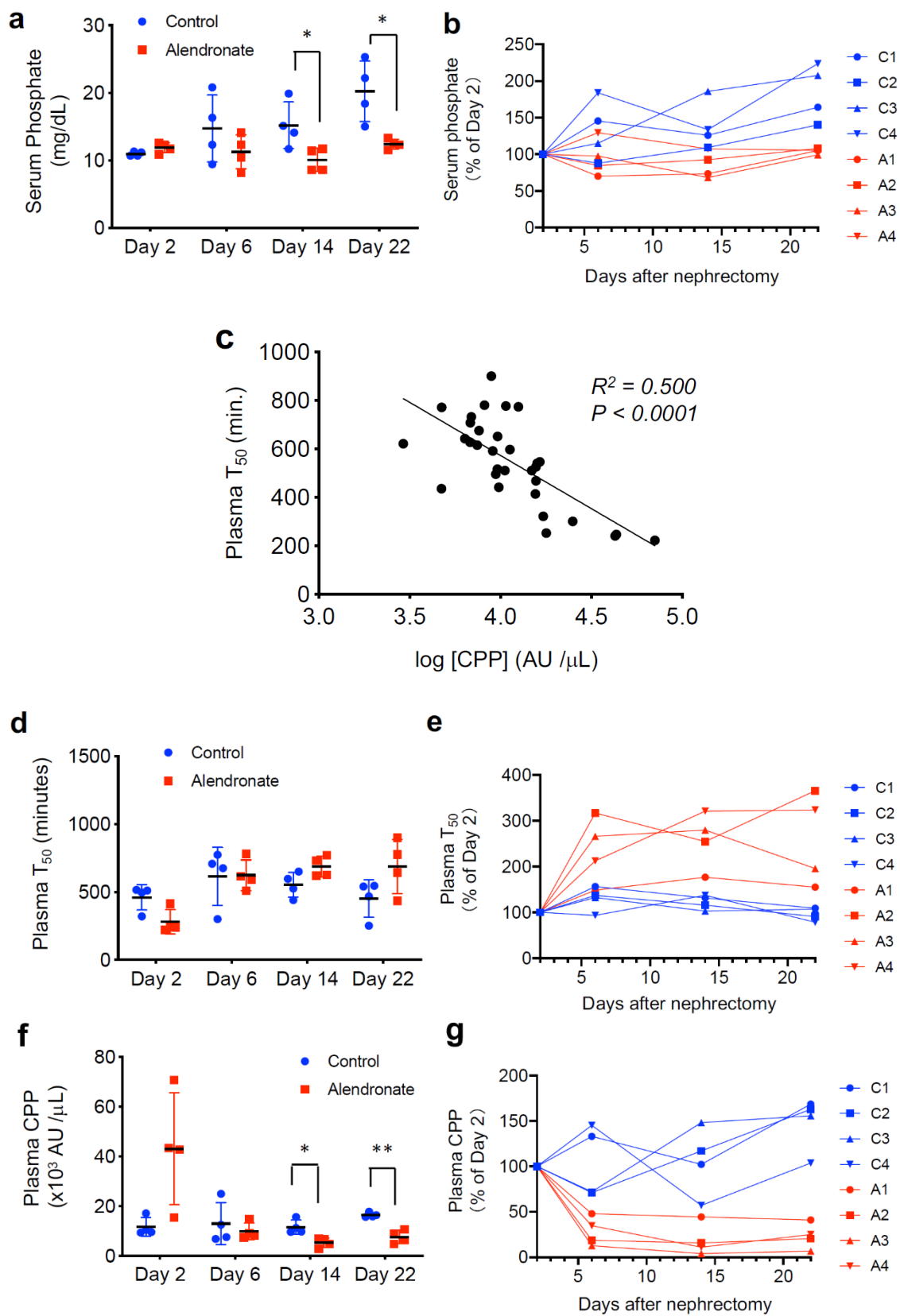


図 1 1 : 石灰化傾向を評価できる血液パラメータの変化

- (a) 透析前血中リン値。* $P < 0.05$: t 検定。
- (b) 透析前血中リン値の推移。術後 2 日目のリン値を 100 %として相対化し、カラム使用群(赤、Alendronate #1-4 が A1-A4 で示されている。)、対照群(青、Control #1-4 が C1-C4 で示されている。)の個々のミニブタのリン値が、どのように変化したかを示した。
- (c) 血漿 T_{50} と CPP 値は負の相関関係にある。
- (d) 透析後血漿の T_{50} 。
- (e) 透析後血漿の T_{50} の変化。術後 2 日目を基準として相対化した。
- (f) 透析後血漿の CPP 値。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$: t 検定。
- (g) 透析後血漿の CPP 値の変化。術後 2 日目を基準として相対化した。

有害事象

CPP 吸着カラムによる有害事象と考えられたのは、貧血であった。ミニブタ透析モデルでは、赤血球造血刺激因子製剤(エスポー注射液 1500、協和発酵キリン株式会社)と鉄剤(フェジン®静注 40 mg、日医工株式会社)を投与していること、観察期間中カラム使用群では赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリットが漸減し、MCV が漸増していたことから(図 1 2)、葉酸やビタミン B12 の欠乏が示唆された[30]。他の血液パラメータは、2 群間で有意差を認めなかった。

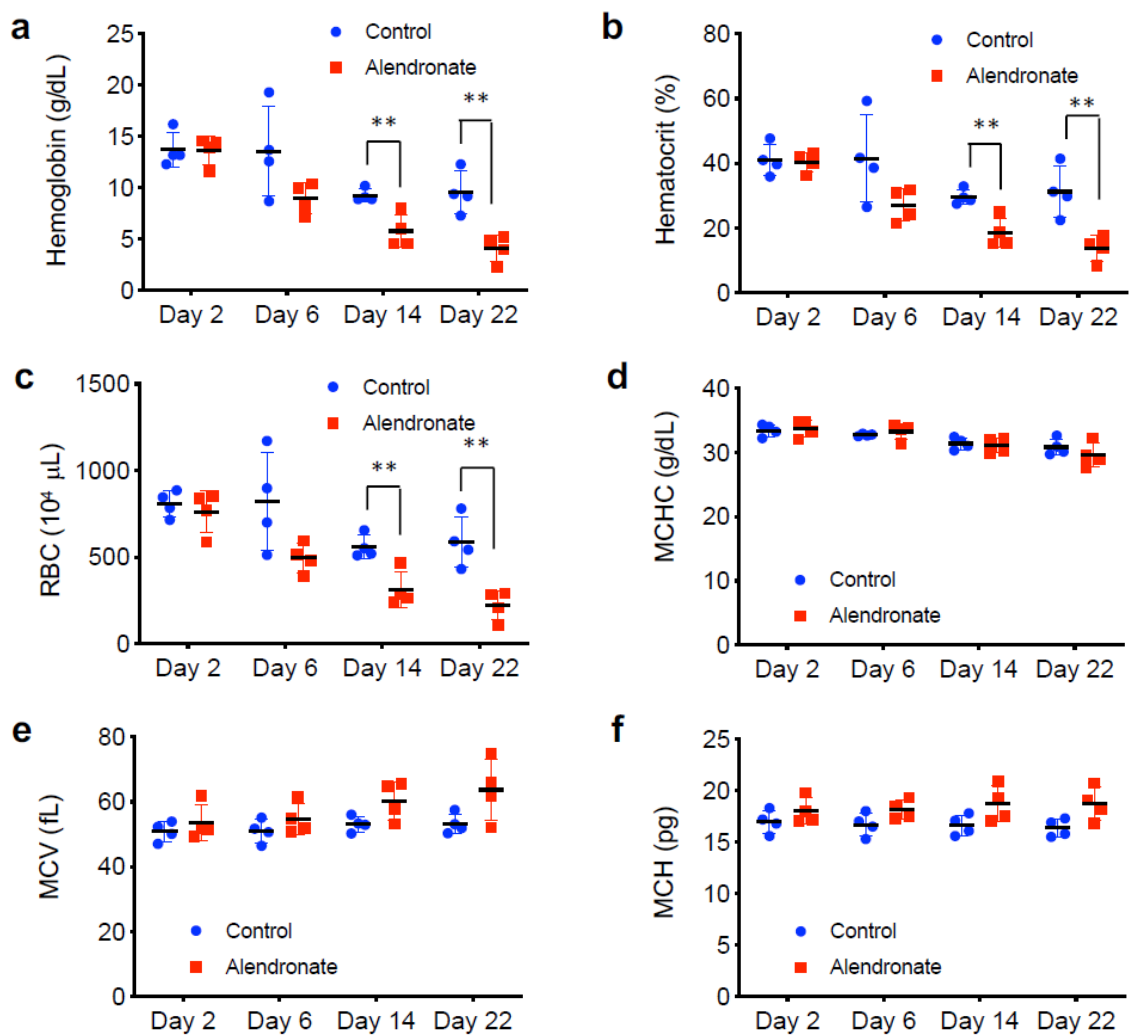


図 1 2 : CPP 吸着カラムは貧血を進行させた。透析前採血のヘモグロビン(a)、ヘマトクリット(b)、赤血球数(c、RBC)、平均赤血球血色素濃度(d、MCHC)、平均赤血球容積(e、MCV)、平均赤血球血色素量(f、MCH)。カラム使用群(赤、N = 4)、対照群(青、N = 4)。データは平均値±標準偏差。**t 検定で $P < 0.01$ 。

CPP が血管系に直接及ぼす作用

血管系に対する吸着カラムの効果を *in vitro* で再現できるかどうかを検討するために、CPP 吸着カラムまたはコントロールカラムのいずれかのカラムに通した CPP 含有培地で血管内皮細胞及び血管平滑筋細胞を培養した。コントロールカラムは培地から CPP をほとんど除去しなかったのに対し、CPP 吸着カラムは CPP の約 50 % を除去した (図 1 3 a)。CPP 吸着カラムのカラムフロースルーは、コントロールカラムのカラムフロースルーよりも、内皮細胞の細胞死を減少させ (図 1 3 b)、平滑筋細胞の石灰化を抑制した。(図 1 3 c)。

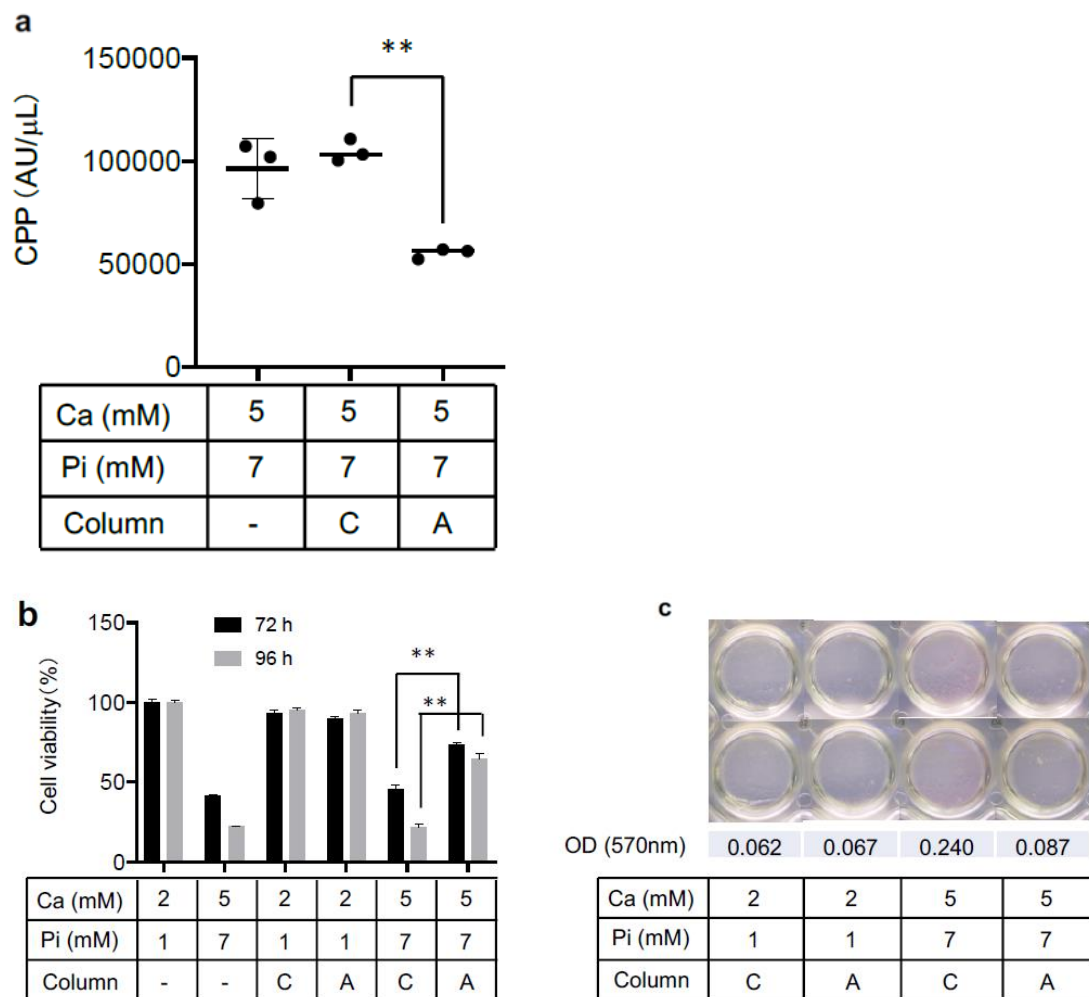


図 1 3 : 培養細胞の実験

(a) アレンドロネートカラムによる細胞培養培地からの CPP 除去。10 %FBS を含む高カルシウム (5 mM)、高リン酸塩 (7 mM) 培地を 37℃で 24 時間インキュベートすると、CPP が培地内に生成される。培地中の CPP 値は、ゲルろ過法で測定すると、約 100,000 AU / μ l に達した。CPP 含有培地をコントロールカラム (C) または CPP 吸着カラム (A) のいずれかに適用し、カラムフロースルーの CPP 値をゲルろ過法で測定した。コントロールカラムは CPP を吸着しなかったが、CPP 吸着カラムは約 50 %の CPP を吸着した。データは平均値 \pm 標準偏差。** $P=0.0001$ (t 検定)。

(b) 培養ヒト血管内皮細胞 (HUVEC) の細胞生存率に対する CPP 除去の効果。

血管内皮細胞は、CPP フリー培地 (2 mM カルシウム[Ca]及び 1 mM リン酸塩[Pi]を含む通常の培地)、CPP 含有培地 (5 mM Ca 及び 7 mM Pi)、これらの培地をコントロールカラム(C)、CPP 吸着カラム(A)のそれぞれを用いて得たカラムフロースルーで 72 時間または 96 時間培養した。データは平均値±標準偏差。各群 N = 4、t 検定で** $P < 0.0001$ 。

(c) 培養ラット血管平滑筋細胞(A7r5)の石灰化に対する CPP 除去の効果。平滑筋細胞を CPP フリー培地、CPP 含有培地、またはこれらの培地をコントロールカラム(C)、CPP 吸着カラム(A)のそれぞれを用いて得たカラムフロースルーで 28 日間培養した後、カルシウムに結合するアリザリンレッドで染色した。細胞抽出物を 570 nm における光学密度 (OD) を測定し、平均値を示した。

保存期 CKD 患者及び透析患者の血漿 CPP の測定

保存期 CKD 患者 148 人、維持透析患者 75 人の透析前血漿を採取し、ゲルろ過法を用いて CPP 値を測定した。148 人の保存期 CKD 患者の CPP 値は以前に報告した[18]。測定した血漿 CPP 値をバイオリンプロットで示した(図 1 4)。保存期 CKD 患者の病期の内訳は、ステージ 1 : 11 人、ステージ 2 : 30 人、ステージ 3 : 63 人、ステージ 4 : 29 人、ステージ 5 : 15 人であった。CKD の病期は、推定糸球体濾過率(eGFR、mL / min / 1.73 m²)に基づいて、ステージ 1 : ≥ 90 、ステージ 2 : 60 - 89、ステージ 3 : 30 - 59、ステージ 4 : 15 - 29、ステージ 5 : < 15 と定義した。

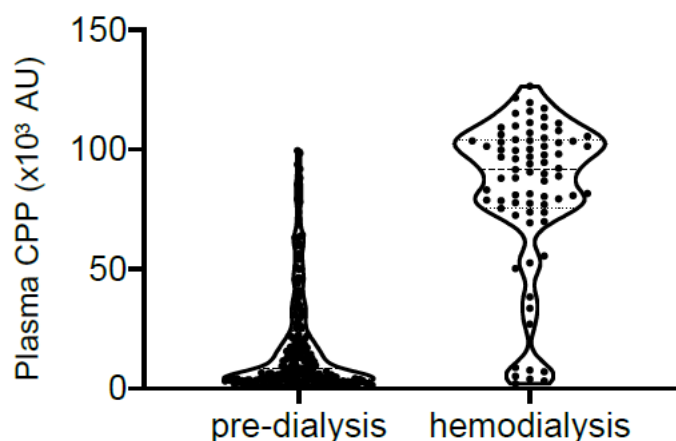


図 1 4 : 保存期 CKD 患者及び血液透析患者の血漿 CPP 値

保存期 CKD 患者 148 人、血液透析患者 75 人の血漿中の CPP をゲルろ過法にて測定した。中央値と四分位数は、それぞれ破線と点線で示した。

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、脂質及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[13]。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[21]。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[24]、石灰化を惹起する力が強い[16]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[18]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。血管系に対する吸着カラムの効果を *in vitro* で再現した実験では、CPP 吸着カラムのカラムフロースルーは血管内皮細胞の細胞死を減少させることができた。これまでに、*in vitro* の研究では、血管内皮細胞をリン濃度の高い培地で培養すると、ROS の産生が増加し、アポトーシスが誘導されることが報告されている[5][6]。CPP を除去することで、

ROS の産生を抑制させ、細胞死を減少させている可能性がある。

今回、ミニブタ透析モデル、保存期 CKD 患者、透析患者の血中 CPP をゲルろ過法を用いて測定した。血中 CPP の量を測定する方法には、従来、FetuinA 法[31]が採用されていた。Fetuin-A 法は、まず血清サンプルの Fetuin-A 濃度を ELISA で測定する。この値を F1 とする。次に、血清を 16,000～24,000 g で 2 時間遠心して CPP を沈殿させた後、上清中の Fetuin-A 濃度を測定する。この値を F2 とすると、CPP を $F1 - F2$ で間接的に定量し、F1 で除して算出した Fetuin-A の減少率で血中 CPP を表現した。しかし、Fetuin-A 法では、CPP 値が低いと測定誤差が大きくなってしまうことと、ヒト Fetuin-A ELISA キットに依存しているため実験動物の血中 CPP を直接測定できないという限界があった。この限界を克服するために、リン酸カルシウム結晶に特異的に結合する蛍光プローブを加え、CPP を直接検出・定量する方法が開発された。その中でも我々が開発したゲルろ過法[18]は、他の方法と比較して高感度で簡便であり、ミニブタの血中 CPP を測定するのに有用であった。ゲルろ過法の Coefficient of Variation (CV)は 0.022 である。実際に測定したミニブタ透析モデルの CPP レベルは、透析患者の CPP レベルと同程度の値を示していた。

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[18](図 1 1)。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[32]。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*[24]及び *in vivo*[33]の両方で T_{50} を延長するとした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[34]。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。

結語

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。

謝辞

本研究の機会を与えてくださり、貴重なご指導を賜りました、自治医科大学 分子病態治療研究センター 抗加齢医学研究部 教授 黒尾誠先生に深く感謝致します。

研究の計画・遂行にあたり、具体的かつ熱心にご指導を賜りました、自治医科大学 分子病態治療研究センター 抗加齢医学研究部 准教授 黒須洋先生、准教授 金田るり先生、講師 椎崎和弘先生、自治医科大学 臨床検査医学講座 講師 岩津好隆先生、自治医科大学 分子病態治療研究センター 抗加齢医学研究部 博士研究員 三浦裕氏に深く感謝致します。

研究を進めるにあたり、様々なご指導やご助言、ご協力をいただきました、自治医科大学 内科学講座 腎臓内科の皆様、自治医科大学 分子病態治療研究センター 抗加齢医学研究部の皆様に心より御礼申し上げます。

参考文献

1. Kestenbaum B, Sampson JN, Rudser KD, Patterson DJ, Seliger SL, Young B, Sherrard DJ and Andress DL, Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **16**, 520-528 (2005).
2. Tentori F, Blayney MJ, Albert JM, Gillespie BW, Kerr PG, Bommer J, Young EW, Akizawa T, Akiba T, Pisoni RL, Robinson BM and Port FK, Mortality risk for dialysis patients with different levels of serum calcium, phosphorus, and PTH: the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Am J Kidney Dis* **52**, 519-530 (2008).
3. Ganesh SK, Stack AG, Levin NW, Hulbert-Shearon T and Port FK, Association of elevated serum PO(4), Ca x PO(4) product, and parathyroid hormone with cardiac mortality risk in chronic hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* **12**, 2131-2138 (2001).
4. Goodman WG, Goldwin J, Kuizon BD, Yoon C, Gales B, Sider D, Wang Y, Chung J, Emerick A, Greaser L, Elashoff RM and Salusky IB, Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are

- undergoing dialysis. *N Engl J Med* **342**, 1478-1483 (2000).
5. Di Marco GS, Hausberg M, Hillebrand U, Rustemeyer P, Wittkowski W, Lang D and Pavenstädt H, Increased inorganic phosphate induces human endothelial cell apoptosis in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol* **294**, F1381-F1387 (2008).
 6. Shuto E, Taketani Y, Tanaka R, Harada N, Isshiki M, Sato M, Nashiki K, Amo K, Yamamoto H, Higashi Y, Nakaya Y, Takeda E, Dietary phosphorus acutely impairs endothelial function. *J Am Soc Nephrol* **20**, 1504-1512 (2009).
 7. Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebbersold R, Schinke T, Karsenty G and Giachelli CM, Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res* **89**, 1147-1154 (2001).
 8. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H and Giachelli CM, Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* **87**, E10-7 (2000).
 9. Sage AP, Lu J, Tintut Y and Demer LL, Hyperphosphatemia-induced

- nanocrystals upregulate the expression of bone morphogenetic protein-2 and osteopontin genes in mouse smooth muscle cells in vitro. *Kidney Int* **79**, 414-22 (2011).
10. Villa-Bellosta R and Sorribas V, Phosphonoformic acid prevents vascular smooth muscle cell calcification by inhibiting calcium-phosphate deposition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 761-766 (2009).
 11. Ewence AE, Bootman M, Roderick HL, Skepper JN, McCarthy G, Epple M, Neumann M, Shanahan CM and Proudfoot D, Calcium phosphate crystals induce cell death in human vascular smooth muscle cells: a potential mechanism in atherosclerotic plaque destabilization. *Circ Res* **103**, e28-34 (2008).
 12. A. Heiss, A. DuChesne, B. Denecke, J. Grotzinger, K. Yamamoto, T. Renne and W. Jahnchen-Dechent, Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles. *J Biol Chem* **278**, 13333-13341 (2003)
 13. Kuro-o, M. The Klotho proteins in health and disease. *Nat Rev Nephrol* **15**, 27-44 (2019).
 14. Heiss A, Pipich V, Jahnchen-Dechent W and Schwahn D, Fetuin-A is a

- mineral carrier protein: small angle neutron scattering provides new insight on Fetuin-A controlled calcification inhibition. *Biophys J* **99**, 3986-3995 (2010).
15. Heiss A, DuChesne A, Denecke B, Grötzinger J, Yamamoto K, Renné T, Jahnen-Dechent W, Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles. *J Biol Chem* **278**, 13333-13341 (2003).
 16. P. Aghagolzadeh, M. Bachtler, R. Bijarnia, C. Jackson, E. R. Smith, A. Odermatt, R. Radpour and A. Pasch, Calcification of vascular smooth muscle cells is induced by secondary calciprotein particles and enhanced by tumor necrosis factor-alpha. *Atherosclerosis* **251**, 404-414 (2016)
 17. Smith ER, Hanssen E, McMahon LP and Holt SG, Fetuin-A-containing calciprotein particles reduce mineral stress in the macrophage. *PLoS One* **8**, e60904 (2013).
 18. Y. Miura, Y. Iwazu, K. Shiizaki, T. Akimoto, K. Kotani, M. Kurabayashi, H. Kurosu and M. Kuro-o, Identification and quantification of plasma calciprotein particles with distinct physical properties in patients with chronic kidney disease. *Scientific reports* **8**, 1256 (2018).

19. T. Hamano, I. Matsui, S. Mikami, K. Tomida, N. Fujii, E. Imai, H. Rakugi and Y. Isaka, Fetuin-mineral complex reflects extraosseous calcification stress in CKD. *J Am Soc Nephrol* **21**, 1998-2007 (2010).
20. E. R. Smith, M. L. Ford, L. A. Tomlinson, C. Rajkumar, L. P. McMahon and S. G. Holt, Phosphorylated fetuin-A-containing calciprotein particles are associated with aortic stiffness and a procalcific milieu in patients with pre-dialysis CKD. *Nephrol Dial Transplant* **27**, 1957-1966 (2012).
21. Joseph L. Goldstein and Michael S. Brown, A Century of Cholesterol and Coronaries: From Plaques to Genes to Statins. *Cell* **161**, 161-172 (2015).
22. Qunibi, W. Y. , Nolan, C. A. and Ayus, J. C. , Cardiovascular calcification in patients with end-stage renal disease: a century-old phenomenon. *Kidney Int Suppl*, S73-80 (2002).
23. Copland, M., Komenda, P., Weinhandl, E. D., McCullough, P. A. and Morfin, J. A, Intensive Hemodialysis, Mineral and Bone Disorder, and Phosphate Binder Use. *Am J Kidney Dis* **68**, S24-s32 (2016).
24. A. Pasch, S. Farese, S. Graber, J. Wald, W. Richtering, J. Floege and W. Jahnke-Dechent, Nanoparticle-based test measures overall propensity for calcification in serum. *J Am Soc Nephrol* **23**, 1744-1752 (2012).

25. John T. Daugirdas, Second Generation Logarithmic Estimates of Single-Pool Variable Volume Kt/V: An Analysis of Error. *J Am Soc Nephrol* **4**, 1205-1213 (1993).
26. Luciana Camara Belém, Gláucia Zanetti, Arthur Soares Souza Jr., Bruno Hochhegger, Marcos Duarte Guimarães, Luiz Felipe Nobre, Rosana Souza Rodrigues, Edson Marchiori, Metastatic pulmonary calcification: state-of-the-art review focused on imaging findings. *Respiratory medicine* **108**, 668-676 (2014).
27. Moody WE, Edwards NC, Madhani M, Chue CD, Steeds RP, Ferro CJ, Townend JN, Endothelial dysfunction and cardiovascular disease in early-stage chronic kidney disease: cause or association? *Atherosclerosis* **223**, 86-94 (2012).
28. Bundy JD, Cai X, Scialla JJ, Dobre MA, Chen J, Hsu CY, Leonard MB, Go AS, Rao PS, Lash JP, Townsend RR, Feldman HI, de Boer IH, Block GA, Wolf M, Smith ER, Pasch A, Isakova T, Serum Calcification Propensity and Coronary Artery Calcification Among Patients With CKD: The CRIC (Chronic Renal Insufficiency Cohort) Study. *American Journal of Kidney Diseases* **73**, 806-814 (2019).

29. Smith ER, Ford ML, Tomlinson LA, Bodenham E, McMahon LP, Farese S, Rajkumar C, Holt SG, Pasch A, Serum calcification propensity predicts all-cause mortality in predialysis CKD. *J Am Soc Nephrol* **25**, 339-348 (2014).
30. Drueke, T, Hyporesponsiveness to recombinant human erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant* **26 Suppl 7**, 25-28 (2001).
31. Hamano T, Matsui I, Mikami S, Tomida K, Fujii N, Imai E, Rakugi H and Isaka Y, Fetuin-mineral complex reflects extraosseous calcification stress in CKD. *J Am Soc Nephrol* **21**, 1998-2007 (2010).
32. Sakaguchi Y, Hamano T, Obi Y, Monden C, Oka T, Yamaguchi S, Matsui I, Hashimoto N, Matsumoto A, Shimada K, Takabatake Y, Takahashi A, Kaimori JY, Moriyama T, Yamamoto R, Horio M, Yamamoto K, Sugimoto K, Rakugi H, Isaka Y, A Randomized Trial of Magnesium Oxide and Oral Carbon Adsorbent for Coronary Artery Calcification in Predialysis CKD. *J Am Soc Nephrol* **30**, 1073-1085 (2019).
33. Bressendorff I, Hansen D, Schou M, Silver B, Pasch A, Bouchelouche P, Pedersen L, Rasmussen LM, Brandi L, Oral Magnesium Supplementation in Chronic Kidney Disease Stages 3 and 4: Efficacy, Safety, and Effect on

Serum Calcification Propensity-A Prospective Randomized Double-Blinded Placebo-Controlled Clinical Trial. *Kidney Int Rep* **2**, 380-389 (2017).

34. Bressendorff I, Hansen D, Pasch A, Holt SG, Schou M, Brandi L, Smith ER, The effect of increasing dialysate magnesium on calciprotein particles, inflammation and bone markers: post hoc analysis from a randomized controlled clinical trial. *Nephrol Dial Transplant*, doi:10.1093/ndt/gfz234 (2019).