

氏 名	三 浦 裕
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 553 号
学位授与年月日	平成 30 年 3 月 19 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	血中コロイド粒子 CPP の新規測定法の確立とその物性の解析
論文審査委員	(委員長) 教授 長 田 太 助
	(委 員) 教授 高 橋 將 文 教授 興 水 崇 鏡
	講 師 田 中 哲 洋

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

リン酸カルシウムから構成される骨をもつ動物は骨以外の組織でリン酸カルシウム結晶の成長を防ぐ機構を進化させてきた。このメカニズムの一つは血清タンパク質 fetuin-A によるものである。Fetuin-A はリン酸カルシウムに結合する性質を持ち、それによって血中でリン酸カルシウム結晶が大きく成長するのを防いでいる。小さなリン酸カルシウムを吸着した fetuin-A は凝集し、ナノ粒子を形成する。このミネラル・タンパク質複合体は Calciprotein particles (CPP) と呼ばれ、コロイドとして血中に分散している。これまでの臨床研究によって、血清 CPP 値は、腎機能の低下や、冠動脈石灰化スコア、大動脈脈波伝達速度および血清の炎症マーカーと関連することが示されている。また、*in vitro*においては、CPP が血管平滑筋の石灰化や自然免疫反応を誘導する活性を持つという報告があることから、CPP は CKD 患者の予後を悪化させる動脈硬化や慢性炎症の原因物質であることが考えられる。しかしながら、これまでの臨床研究に用いられた CPP 測定法である、fetuin-A 法には 2 つの大きな限界がある。第一に、ELISA キットの誤差が大きく測定に影響してしまい、感度が低いこと。第二に、このアッセイはヒトの fetuin-A ELISA キットに依存しており、実験動物の CPP 測定には直接適用できないことである。そこで本研究では、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性質を利用し、より高感度で、動物実験にも直接適用可能で、迅速、安価な CPP の新規測定法を開発し、血中 CPP について解析することを目的とした。

### 2 研究方法

血清または血漿を蛍光標識したビスホスホネート (OsteoSense) を含んだ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) に加えた。25℃で 60 分間インキュベートした後、混合物をゲル濾過スピンカラムに乗せ、1000g, 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、等量の 2% SDS と 100 mM EDTA で CPP を溶解し、96 well plate に移して近赤外蛍光スキャナーで蛍光を定量した。OsteoSense の蛍光強度を total CPP レベルとして定義した。比重の軽い CPP (L-CPP) レベルの測定には 16,000g, 2 時間遠心分離した後の上清を同じように測定した。16,000g, 2 時間の遠心分離で沈殿する比重の重い CPP (H-CPP)

レベルは、total CPP レベルから L-CPP レベルを差し引くことで求めた（ゲル濾過法）。この新たに確立したゲル濾過法を用いて、凍結融解など様々な物理学的刺激を加えた場合に、CPP レベルが変化するか健常者、透析患者のサンプルを解析した。また、一定のサンプル調整を行った CKD 患者の CPP レベルと、リン、カルシウム、ビタミン D などの臨床パラメーターとの関連を調べた。

さらに、ビスホスホネートを利用し、免疫沈降に類似した手順で CPP のアフィニティー沈降を行い、CPP を構成しているタンパク質の解析を行った。また、CPP の粒子サイズ分布をナノ粒子トラッキング法によって測定した。

### 3 研究成果

新たに確立したゲル濾過法などを用いて生体内の CPP に最も近いと考えられる新鮮血漿中の CPP は、これまで報告された CPP よりも粒子径が小さくて比重も軽いことを明らかにした。また、保存期 CKD 患者の CPP レベルは主に血清リン値に比例して上昇することを明らかにした。さらに、CPP の凝集や溶解、および *in vitro* における非晶質相から結晶相へのリン酸カルシウムの相転移などは、試料を希釈する溶液の組成や、凍結融解の回数、試料の凍結方法、どのような温度にどれだけの時間放置されたか、などの物理化学的要因によって引き起こされることを示した。また、これまでに fetuin-A 法などで測定していた CPP の一部はサンプル処理中に生成したものであることも明らかにした。

### 4 考察

採血後、保存された血清、血漿において CPP 中のリン酸カルシウムが非晶質から結晶へと相転移することを示した。新鮮血漿中の CPP が *in vivo* の CPP に近いとすると、血中を流れている CPP は主に L-CPP、もしくはそれに近い物であると考えられる。しかしながら、サンプル調製における様々な物理化学的刺激が L-CPP を凝集させ、H-CPP の生成を誘導したり、OsteoSense の結合を増加させるリン酸カルシウムの非晶質相から結晶相への転移を起こす。

したがって、これまでの研究で使用された保存血清の CPP の特性は *in vivo* のものとは大きく異なる可能性が高い。したがって、実際に血中を循環している CPP の物理特性、化学組成、構造などを明らかにするためには、CPP の *in vitro* における変化のリスクを排除した新しい分析方法を確立する必要がある。また、培養細胞などで CPP の活性を調べる際、インキュベーション時間や温度、pH、培地組成などの実験条件によって CPP は影響を受け、物理特性や活性が変化する可能性があるため、注意が必要である。また、保存期 CKD 患者では、Total CPP と L-CPP レベルは血清リンと年齢に相関していたことは重要と考えられる。血清リン値がほとんど正常とされる範囲の患者群において、血清リン値が全死亡率の段階的かつ独立した因子として特定されたという報告がある。正常範囲でも血清リン値が高い患者は CPP レベルが高い。これまでの報告では、CPP は動脈硬化や非感染性慢性炎症など、全死亡率を上昇させる病態と相関する。つまり、CPP が加齢とともに死亡率を増加させる原因物質である可能性がある。これを支持する所見として今回、保存期 CKD 患者の多変量解析によって、年齢の主要な独立説明変数として eGFR の他に total CPP が同定された。注目すべきは、血漿 CPP レベルと血清リン値の回帰曲線がシグモイダルであり、正常範囲の血清リンのわずかな上昇でも CPP の急激な上昇を引き起こしうる点である。この知見は、高リン血症ではない CKD 患者においても、リン吸着剤投与あるいはリン摂取制限など、血清リン

値を下げる「リン降下療法」で血中 CPP レベルを下げれば、生命予後が改善する可能性があると考えられる。

## 5 結論

血中 CPP レベルの新規測定系の確立と、新種の CPP (L-CPP) の同定を行った。L-CPP は既報の CPP よりも粒子径が小さく比重が軽い。新鮮血漿中の CPP はほとんどが L-CPP であり、既報の CPP は主に保存検体でしか検出できないことから、L-CPP が実際に血中を流れている CPP であり、既報の CPP は主に採血後に生成したアーティファクトと考えられる。採血後のサンプル調製における様々な物理化学的要因が、L-CPP の凝集による H-CPP の生成や、リン酸カルシウムの非晶質相から結晶相への転移などを誘発するので、臨床試験では、血液採取から CPP 測定までのプロセス全体を標準化することが必須である。L-CPP が加齢関連疾患の病態に果たす役割の解明、L-CPP の構造および生物学的活性の研究が今後の課題である。

## 論文審査の結果の要旨

fetuin-A はリン酸カルシウムに結合する性質を持ち、それによって血中でリン酸カルシウム結晶が大きく成長するのを防いでいる。小さなリン酸カルシウムを吸着した fetuin-A は凝集し、ナノ粒子を形成する。このミネラル・タンパク質複合体は Calciprotein particles (CPP) と呼ばれ、コロイドとして血中に分散している。

Primary CPP はカルシウムおよびリン添加後、数時間で現れ、非晶質のリン酸カルシウムを含み、球状で流体力学半径約 75 nm の CPP である。さらに長時間インキュベートすると、Primary CPP は自発的に、リン酸カルシウム結晶を含む楕円形で流体力学半径約 120 nm の Secondary CPP に変化する。Secondary CPP は *in vitro* において血管平滑筋細胞に石灰化を、マクロファージに自然免疫反応を誘導する活性を持つが、Primary CPP にはそのような活性はほとんどない。

一方、慢性腎臓病 (Chronic kidney disease; CKD) 患者の血清中に CPP が存在することが複数の臨床研究によって示されている。これらの研究では、以下のような方法で血清 CPP レベルを定量している。血清 fetuin-A 濃度を測定する (この濃度を F1 とする)。次に、血清を 16,000~24,000 g で 2 時間遠心分離し、CPP を沈殿させる。その上清中の fetuin-A 濃度 (この濃度を F2 とする) を再度測定する。最後に、遠心による fetuin-A の減少率 (reduction ratio; RR)  $(F1-F2)/F1$  を計算し、これを血清 CPP 値とする。この「fetuin-A 法」で測定した血清 CPP 値は、腎機能の低下や、冠動脈石灰化スコア、大動脈脈波伝達速度および血清の炎症マーカーと相関することが示されている。これまでの臨床試験の結果は、CPP が CKD 患者の予後を悪化させる動脈硬化や慢性炎症の原因物質であるという可能性を提起している。

しかしながら、これまでの研究に用いられた fetuin-A 法には 2 つの大きな限界があり、F1 と F2 の差が小さくなる程、精度が下がり、またヒトの fetuin-A ELISA キットでは実験動物の CPP 測定には直接適用できない。そこで本研究では、OsteoSense を使用する新しい CPP アッセイが開発された。血清もしくは血漿に OsteoSense を加えた後、ゲル濾過スピンカラムを用いて CPP に結合した OsteoSense と CPP に結合しなかった OsteoSense とを分離する方法である。CPP を含んだフロースルーの蛍光強度を近赤外蛍光スキャナーを用いて定量し、CPP 値とした。この「ゲル濾過

法」は高感度、迅速、安価だけでなく、フローサイトメトリー法のように実験動物にも直接適用できる。さらに重要なことは、このゲル濾過法によって、fetuin-A 法およびフローサイトメトリー法で測定した CPP よりも小さく、比重の軽い CPP (low density CPP; L-CPP) が存在することが分かり、生体内における CPP は主にこの L-CPP であることを明らかにした。これらは、新規に開発された技術により得られた知見であり、極めて価値の高いものであると考えられる。

また腎臓内科の CKD や透析患者の臨床検体を用いた検討では、実際の採血後のサンプル調製における様々な物理化学的要因が、L-CPP の凝集による H-CPP の生成や、リン酸カルシウムの非晶質相から結晶相への転移などを誘発するので、臨床試験では、血液採取から CPP 測定までのプロセス全体を標準化することが必須であることが明らかにされ、今後のこの分野における研究の過程で十分注意を払わなければいけない点についても明確な指針が確立された点は、高く評価でき、学位論文としてふさわしい内容と判断した。

## 最終試験の結果の要旨

最終試験では、委員 4 名から下記のような質問、意見が出され、三浦氏から回答があり、論文の記載については後日、改訂された論文が提出され、それについて吟味した。下線部分が委員からの主な質問と意見であり、⇒以下が三浦氏の回答である。

1. 今回、vivo で検出した H-CPP/L-CPP は vitro で作成される Primary CPP/Secondary CPP とは異なるとのことであるが、vitro での CPP を用いた実験はあまり意味がないということか？  
H-CPP が実験操作のアーチファクトと言い切ってしまうと、fetuin-A 法で計測して研究していた今までの研究の結果の真偽にまで話が行ってしまうので、多少緩めた書きぶりが必要な部分もあるのではなかろうか。L-CPP が、確かにこれまでに見過ごされてきた CPP であるとの理由を、実験の根拠とともに明記してほしい。

⇒

P16-17: 「注目すべきは、H-CPP は複数回の凍結融解の後にはじめて検出されるようになった、という事実である (図 3c)。これは、H-CPP の多くが凍結融解の過程において in vitro で生成されたものである可能性が高いことを示している。」と書き換えた。また論文全体的に、バランスが取れるように細かい記載についても変更が加えられた。

2. ビスホスホネートとしてアレンドロネートを用いているが、なぜアレンドロネートを使用したのか？他の同系薬剤ではどうか？

⇒

アレンドロネートが最も入手しやすく、安価である点からもっばらアレンドロネートを使用した。ビスホスホネート製剤であれば、他のものでも化学的にはほぼ同じ動向を示すことは確認している。

3. 本研究では採血後の検体で、どのような因子が CPP に影響を与えているかを詳細に検証しているが、採血前、つまり食事や運動などの影響はどうか？

⇒

実際の臨床検体は前向きに採取したものではないため、条件がそろっているとはいいがたい。そのような面では見ることはできないので、これについては今後、食事や運動によってどの程度変動があるのか、今回開発した系を用いて検討していく必要がある。

4. 学位論文はどのような成果が得られたかよりも、研究や実験をどれくらいしっかりやったかわかる方が重要だと考える。方法をもっと詳細に記載すべき。例えば、SDS-PAGE やイムノブロットなど、ゲルの濃度、抗体濃度、処理時間、2 次抗体など、出来るだけ詳しく記載した方が良い。また、使用試薬やソフトウェアなど、メーカー名、都市名などをきちんと記載すべきである。

⇒

修正論文では、すべて指示通り訂正した。

5. ディスカッション前の本文に、表 5，表 6 の記載がなく、ディスカッションで初めて出てくるのは違和感がある。

⇒

P. 31 に「また、年齢の主要な独立説明変数として eGFR の他に total CPP、L-CPP が残った。eGFR と total CPP の標準偏回帰係数はそれぞれ-0.510, 0.343 であった（表 5）。同様に、eGFR と L-CPP の標準偏回帰係数はそれぞれ、-0.495, 0.346 であった（表 6）。」という記載を追加した。

その他、スペルミス等についても全て訂正がなされていることを確認した。

英文誌にもすでにほぼこれと同じ内容で in press となっており、また今回の質疑応答、論文の訂正ともに十分、学位審査の要求に応じていると考えられ、合格と判断した。