

# CKD の進行と CPP

黒尾 誠

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

key words : CPP, 血管石灰化, 慢性炎症, リン, カルシウム

## 要 旨

慢性腎臓病 (CKD) において, リンは「悪者」である。臨床研究では, 血中リン濃度が血管石灰化や全死亡率の上昇に相関することが示されているし, 基礎研究では, リンが血管内皮細胞を障害したり, 血管平滑筋細胞に骨芽細胞様の形質変換を誘導したりすることがわかっている。リンが CKD の予後悪化因子であることは確立されたが, リンがどのようにして悪さをするのか, そのメカニズムは必ずしも明らかでない。そのため, リンを標的とした CKD の治療も, 食事指導によるリン摂取制限, リン吸着剤の投与, 透析によるリンの強制排除などに限られているのが現状である。本稿では, 悪いのは実はリンそのものではなく, リン代謝産物の CPP (calciprotein particle) であり, CPP が CKD の新しい治療標的分子となる可能性について議論する。

## はじめに

高リン血症が CKD の全死亡率を上昇させる危険因子に同定されて以来<sup>1,2)</sup>, 血中リン濃度を下げること为目标としてリン吸着剤が投与されるようになり, 実際に効果をあげている<sup>3)</sup>。しかし, 高リン血症は CKD ステージ 4 から 5 で見られる末期症状なので, リン吸着剤の投与が正式に適用になるのは全 CKD 患者の数%に限られている<sup>4,5)</sup>。しかし, 血中リン濃度が正常範囲内の患者でもリンが高いほど全死亡率が高いこと

はわかっており<sup>6)</sup>, リン吸着剤の適用を血中リンが正常範囲の早期や中期 CKD 患者に拡大すべきか, 議論の的となっている。

最近, 小規模ではあるが, 血中リン濃度がほぼ正常範囲内のステージ 3 から 4 の CKD 患者にリン吸着剤を投与した前向き無作為化試験が行われ<sup>7)</sup>, 血中リンと尿中リンの減少および二次性副甲状腺機能亢進症の軽減が認められたものの, 血管石灰化はむしろ増悪した, と報告された。しかし内訳を見ると, リン吸着剤としてカルシウム剤を用いた群での血管石灰化が突出しており, 非カルシウム性リン吸着剤を用いた群では, 血管石灰化の亢進は認められていない。

なぜカルシウム剤は血中リンを下げてても血管石灰化を促進するのだろうか。そもそも, なぜ血中リン濃度が正常でも血管石灰化が起こり, 全死亡率が上昇するのであろうか。血中リン濃度だけでは説明できないこれらの事実を説明するため, 我々は CPP に着目した。

## 1 CPP とは

CPP とは, リン酸カルシウム結晶と血清蛋白 Fetuin-A の複合体ナノ粒子である。CPP の形成過程は, *in vitro* で詳細に研究されている<sup>8-11)</sup>。溶液中でリンとカルシウムの濃度が溶解度を超えると, リン酸カルシウム結晶が析出する。結晶は時間とともにその組成や構造を変えつつ成長し, 最終的には hydroxyapatite となって沈殿する。しかし, 血清の存在下ではこのような現象は起きない。なぜなら, 血清中には Fetuin-A

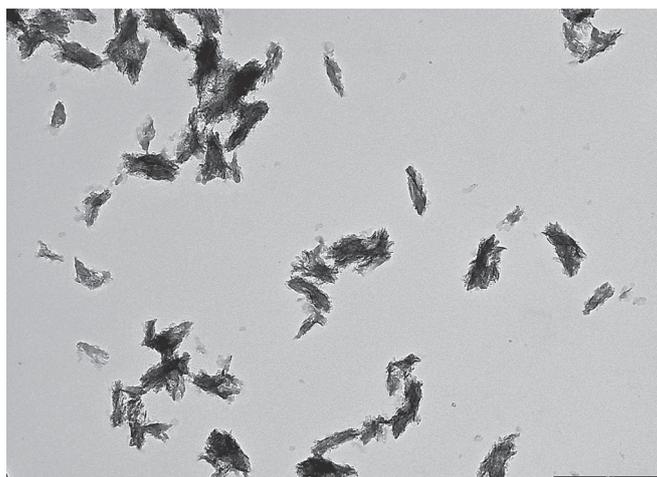


図1 CPPの透過電顕像  
(Bar = 1,000 nm)

をはじめとする様々なミネラル結合蛋白が存在し、リン酸カルシウム結晶が析出するや否や、直径が1 nm以下の段階でこれを速やかに吸着し、結晶の成長を阻害するからである。その結果、リン酸カルシウムの微小結晶を吸着した Fetuin-A の多量体、すなわち CPP が形成される (図1)。

CPP はナノ粒子なので、液相にコロイド状に分散する。つまり CPP とは、リン酸カルシウム結晶を血中で成長させないための防御機構が働いた結果できたコロイド粒子と考えられる。不溶性の物質を蛋白に吸着させ、コロイドにして可溶化するという方法は、リポ蛋白やミルクにもみられ、生体の普遍的な戦略と考えられる。ちなみに、ミルクが白いのは、リン酸カルシウム結晶とカゼイン蛋白の複合体ナノ粒子がコロイド状に分散し、いわゆるチンダル現象が起きているからである。

## 2 CPP の臨床研究

最近の臨床研究で、慢性腎臓病患者の血中に CPP が流れており、その血中レベルが腎機能の低下とともに上昇することが報告された<sup>12,13)</sup>。これらの研究では、血中 CPP レベルを以下の方法で測定している。まず、血清を分離して Fetuin-A を測定する。次に、血清を高速遠心 (16,000 x g, 2 時間) して血清中に分散している CPP を沈殿させる。最後に、高速遠心後の上清の Fetuin-A を測定する。高速遠心前後の Fetuin-A の濃度差をもって CPP 濃度に代用する、という方法である。

このようにして測定した血中 CPP 値は、冠動脈石

灰化スコア、動脈の硬さ (脈波伝播速度)、血中リン濃度、炎症マーカーなどと正相関し、eGFR と逆相関する。重要なことは、これらの相関関係が、血中リン濃度がほぼ正常範囲の CKD 患者で認められたことである。

## 3 CPP の基礎研究

これまで、培養細胞を高濃度のリンに曝すとなにが起るのか、様々な研究がなされてきた。例えば、血管内皮細胞を培養し、培地のリン濃度を上げると、酸化ストレスや細胞死が誘導される<sup>14,15)</sup>。血管平滑筋細胞では、骨芽細胞様の形質変換を起こし、RUNX2、BMP2、osteopontin などの骨細胞関連遺伝子の発現が誘導され、石灰化が起こる<sup>16,17)</sup>。

高濃度のリンに対するこのような反応が生体内でも起きるなら、高リン血症に伴う血管石灰化の分子機構をうまく説明できる<sup>18)</sup>。しかし、ここで注意しなければならないのは、通常の細胞培養用培地は、約 1 mM のリンと 2 mM のカルシウムを含んでいる点である。これは、正常のヒトの血中リンとカルシウムの濃度にほぼ等しく、飽和濃度に近い。したがって、培地にリンを加えるとリン酸カルシウム結晶が析出する可能性があり、さらに血清を含む培地なら CPP が形成される可能性がある。つまり、今までリンに対する反応と考えられてきた現象が、実は CPP に対する反応であった可能性がある。

実際、この可能性を検証した報告がいくつか存在する。すなわち、リン酸カルシウム結晶の析出を阻害する薬剤 (phosphonoformic acid, pyrophosphate など)

を培地に添加しておけば、リン濃度を上げて血管平滑筋細胞の形質変換や石灰化が起こらない<sup>19-21)</sup>。このことは、これまでリンのせいと思われていた現象の少なくとも一部は、実はリンのせいではなく、リン濃度上昇の結果形成された CPP のせいであることを示している。

#### 4 CPP 病原体説

これまでの CPP に関する基礎研究と臨床研究を総合して、我々は「CPP 病原体説」を提唱してきた<sup>22)</sup>。血中の CPP が直接作用する可能性のある細胞は、まず血管内皮細胞である。CPP が血管内皮を障害すれば、その下層にある血管平滑筋細胞にも CPP が直接作用できるようになり、骨芽細胞様の形質変換と石灰化を誘導する可能性がある。血中リン濃度が正常範囲内でも、腎機能が低下すれば血中 CPP 値が上昇するので、高リン血症がなくても血管石灰化が起きる理由が説明できる。また、なぜ同じリン吸着剤でも、非カルシウム性リン吸着剤がカルシウム剤よりも血管石灰化を起こしにくいのか、も説明できる。すなわち、リンの吸収を抑えてもカルシウムの吸収が増えてしまえば、リン酸カルシウム結晶の析出という点では効果が相殺されてしまって CPP 形成が抑えられないと考えられる。白血球も血中の CPP が直接作用する可能性のある細胞である。

最近、マクロファージを CPP で刺激すると TNF $\alpha$  や IL1 $\beta$  などの炎症性サイトカインの分泌が誘導されることが報告された<sup>23)</sup>。つまり、CPP はあたかも病

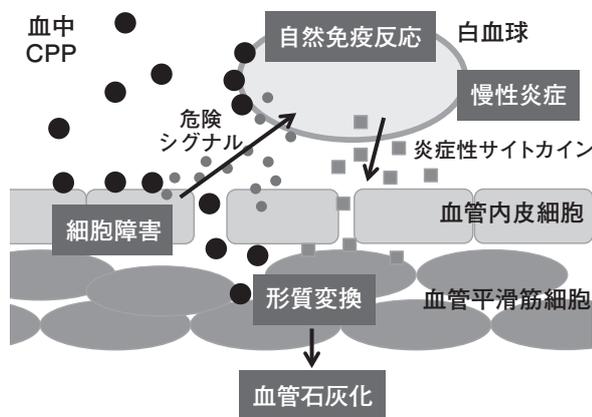


図2 CPP 病原体説 (血中 CPP)

血中の CPP は、白血球に自然免疫反応と慢性炎症を、血管内皮細胞に細胞障害と危険シグナルの放出を誘導する。炎症性サイトカインや CPP が血管平滑筋細胞に直接作用すれば、骨芽細胞様の形質変換を誘導し、血管石灰化を引き起こす。

原体のように自然免疫反応を誘導するのである。このことは、血中 CPP 値が炎症所見と相関するという臨床研究の結果をうまく説明する。さらに、慢性炎症の存在は CKD の予後悪化因子であることは以前から知られていたが、慢性炎症の原因となる「病原体」は不明であった。もし CPP がその「病原体」の一つであることが証明できれば、CPP が CKD の新たな治療標的分子として正当化されるかもしれない (図 2)。

#### 5 FGF23-Klotho 内分泌系

我々は 20 年ほど前、早老症を呈する突然変異マウスを発見し、欠損している遺伝子を同定した<sup>24)</sup>。ギリシャ神話の生命の糸を紡ぐ女神の名に因んで Klotho と命名したその遺伝子は、その後の我々の研究により、FGF23 というリン利尿ホルモンの受容体をコードすることがわかった<sup>25)</sup>。

FGF23 (fibroblast growth factor-23) は、FGF ファミリーに属するにもかかわらず、FGF 受容体に対する親和性が著しく低く、生理的濃度では FGF 受容体にほとんど結合しない。しかし、Klotho と複合体を形成した FGF 受容体には高い親和性で結合する。つまり、FGF23 の生理的受容体は、FGF 受容体ではなく、Klotho-FGF 受容体複合体なのである。ここに、リン恒常性維持に必須の FGF23-Klotho 内分泌系が同定された<sup>26)</sup>。すなわち、リンを摂取すると、なんらかの機構で骨がこれを感じ、FGF23 を分泌する。FGF23 は腎臓に発現する Klotho-FGF 受容体複合体に作用し、ネフロン当たりのリン排泄量を増やす。この FGF23-Klotho 内分泌系が正常に機能すれば、摂取したリンと同量のリンを尿へ排泄するため、リン恒常性が保たれて血中リン濃度は上昇しない (図 3)。

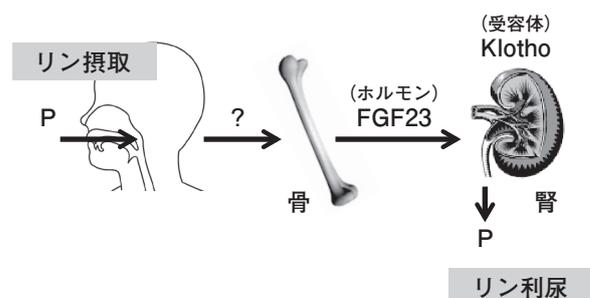


図3 FGF23-Klotho 内分泌系

リン摂取量に応じたリン利尿を誘導することで、リン恒常性を維持している。

## 6 尿中 CPP

今から 30 年以上前、「CPP 病原体説」の観点で見直すと、非常に興味深い動物実験が行われている。部分腎摘をしてネフロン数をさまざまに減らしたラットに、さまざまな量のリンを餌で負荷し、ネフロン当たりのリン排泄量を独立変数として変化させ、6 カ月後に腎臓の組織学的変化を従属変数として調べた実験である<sup>27)</sup>。

これらのラットはすべて、摂取したリンと同量のリンを尿に排泄しており、リンのバランスは保たれているので、血中リン濃度は上昇せず、一見何事もなかったかのように見える。しかし、腎には尿細管障害と間質の線維化が起きていた。重要なことは、尿細管障害の程度がネフロン当たりのリン排泄量に比例している、という事実である。ネフロン当たりのリン排泄量が増え、それに比例して原尿中のリン濃度が上昇し、リン酸カルシウム結晶が析出する可能性がある。

実際、ラットの尿細管を穿刺して原尿を採取してリ

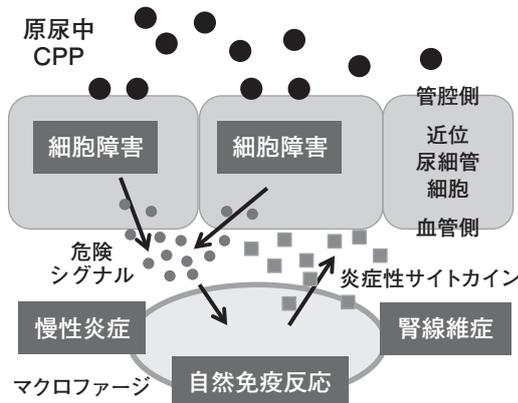


図 4 CPP 病原体説 (原尿中 CPP)

原尿中に CPP が形成されると、尿細管の障害と、それに伴う危険シグナルの放出が、間質の慢性炎症を引き起こす可能性がある。

ンやカルシウム濃度を測定した実験では、リン負荷時には飽和濃度を超える場合があることが示されている<sup>28,29)</sup>。尿細管は Fetuin-A を管腔側に分泌している。すなわち、ネフロン当たりのリン排泄量が増えると原尿中に CPP が形成され、それが管腔側から尿細管障害を誘導する可能性がある。障害された尿細管からは、危険シグナルが放出され、間質にマクロファージを呼び寄せて活性化し、腎線維症を引き起こす可能性が考えられる (図 4)。当時は、FGF23-Klotho 内分泌系の存在は知られていなかったため、このラットの実験では血中 FGF23 を測定していないが、もし測定していたら、ネフロン当たりのリン排泄量と比例して上昇していたと考えられる。

## 7 リン制限の新しい考え方

残存ネフロン数に対してリン摂取が過剰だと、リン恒常性を維持するためにネフロン当たりのリン排泄量を増やす必要に迫られるが、これは FGF23 を上昇させることで達成される。逆に、FGF23 が上昇したら、残存ネフロン数に対してリン摂取が過剰であると考えられるので、たとえ血中リン濃度が上昇していなくても、リン摂取を減らして原尿中の CPP 形成を予防する必要があると考えられる。

現在、リン制限やリン吸着剤の投与は、血中リン濃度を下げることが目標に行われている。これは、高リン血症を心血管合併症の危険因子に同定した臨床研究が根拠であるが、高リン血症はステージ 4 か 5 で見られる CKD の末期症状なので、実際にリン吸着剤が適用となるのは、全 CKD 患者の数 % に過ぎない<sup>4,5)</sup>。一方、FGF23 はステージ 2 の早期から上昇し始める<sup>30)</sup>。もし「CPP 病原体説」が正しければ、腎線維症の進行抑制を目標としたリン制限が正当化され、リン吸着

表 1 現在のリン制限・リン吸着剤適用の考え方と「CPP 病原体説」に基づく新しい考え方の比較

	現在の考え方	新しい考え方
理論的根拠	高リン血症は血管石灰化、心血管病のリスクを増す	残存ネフロン数に対してリン摂取が過剰だと、FGF23 が上昇し、CPP による尿細管障害が起こる
目標	血中リン濃度を下げる	FGF23 を下げる
アウトカム	心血管合併症の抑制	慢性腎臓病の発症・進行の抑制
適用	高リン血症を伴う末期腎不全患者 (全 CKD 患者の数 %)	ネフロン数が少ない人 (CKD 患者や高齢者)

剤の適用も大幅に拡大することになる (表1)<sup>22)</sup>.

### おわりに

「CPP 病原体説」を検証し、CKD の治療に応用するには、まだまだ多くの課題が残されている。たとえば、血中の CPP がどのように形成されるのか、まだわかっていない。血中のリンとカルシウム濃度が飽和濃度に達していなくても血中に CPP は出現するので、少なくとも血中でリン酸カルシウム結晶が析出するのではない。

では、何時、何処でリン酸カルシウム結晶が析出し、血中に入って CPP になるのであろうか。また、CPP の受容体は存在するのであろうか。これらの課題が解決されれば、血中 CPP 値を測定することで CKD 患者の心血管合併症のリスク診断ができるようになり、さらに CPP 形成過程の抑制や CPP 受容体の阻害など、CPP を標的とした CKD の新しい治療法の開発も正当化される。「CPP 病原体説」は、CKD の早期診断、先制治療を可能にしてくれるかもしれない。

### 文 献

- 1) Kestenbaum B, Sampson JN, Rudser KD, et al. : Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 16; 520-528, 2005.
- 2) Ganesh SK, Stack AG, Levin NW, et al. : Association of elevated serum PO<sub>4</sub>(<sup>4-</sup>), Ca x PO<sub>4</sub>(<sup>4-</sup>) product, and parathyroid hormone with cardiac mortality risk in chronic hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*, 12; 2131-2138, 2001.
- 3) Martin KJ, Gonzalez EA : Prevention and Control of Phosphate Retention/Hyperphosphatemia in CKD-MBD : What Is Normal, When to Start, and How to Treat? *Clin J Am Soc Nephrol*, 6; 440-446, 2011.
- 4) Coresh J, Selvin E, Stevens LA, et al. : Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA*, 298; 2038-2047, 2007.
- 5) Levin A, Bakris GL, Molitch M, et al. : Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease : results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney Int*, 71; 31-38, 2007.
- 6) Tonelli M, Sacks F, Pfeffer M, et al. : Relation between serum phosphate level and cardiovascular event rate in people with coronary disease. *Circulation*, 112; 2627-2633, 2005.
- 7) Block GA, Wheeler DC, Persky MS, et al. : Effects of phosphate binders in moderate CKD. *J Am Soc Nephrol*, 23; 1407-1415, 2012.
- 8) Heiss A, Jahnen-Dechent W, Endo H, et al. : Structural dynamics of a colloidal protein-mineral complex bestowing on calcium phosphate a high solubility in biological fluids. *Bioinorganic Chemistry*, 2; 16-20, 2007.
- 9) Heiss A, DuChesne A, Denecke B, et al. : Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles. *J Biol Chem*, 278; 13333-13341, 2003.
- 10) Heiss A, Pipich V, Jahnen-Dechent W, et al. : 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.
- 11) Rochette CN, Rosenfeldt S, Heiss A, et al. : A shielding topology stabilizes the early stage protein-mineral complexes of fetuin-A and calcium phosphate: a time-resolved small-angle X-ray study. *ChemBiochem*, 10; 735-740, 2009.
- 12) Hamano T, Matsui I, Mikami S, et al. : Fetuin-mineral complex reflects extraosseous calcification stress in CKD. *J Am Soc Nephrol*, 21; 1998-2007, 2010.
- 13) Smith ER, Ford ML, Tomlinson LA, et al. : 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.
- 14) Di Marco GS, Hausberg M, Hillebrand U, et al. : Increased inorganic phosphate induces human endothelial cell apoptosis in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol*, 294; F1381-F1387, 2008.
- 15) Shuto E, Taketani Y, Tanaka R, et al. : Dietary phosphorus acutely impairs endothelial function. *J Am Soc Nephrol*, 20; 1504-1512, 2009.
- 16) Steitz SA, Speer MY, Curinga G, et al. : Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res*, 89; 1147-1154, 2001.
- 17) Jono S, McKee MD, Murry CE, et al. : Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res*, 87; E10-17, 2000.
- 18) Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, et al. : Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol*, 15; 2857-2867, 2004.
- 19) Sage AP, Lu J, Tintut Y, et al. : Hyperphosphatemia-induced nanocrystals upregulate the expression of bone morphogenetic protein-2 and osteopontin genes in mouse smooth muscle cells in vitro. *Kidney Int*, 79; 414-422, 2011.
- 20) Villa-Bellosta R, Sorribas V : Phosphonoformic acid prevents vascular smooth muscle cell calcification by inhibiting calcium-phosphate deposition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29; 761-766, 2009.

- 21) Ewence AE, Bootman M, Roderick HL, et al. : 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.
- 22) Kuro-o M : Klotho, phosphate and FGF-23 in ageing and disturbed mineral metabolism. *Nat Rev Nephrol*, 9; 650-660, 2013.
- 23) Smith ER, Hanssen E, McMahon LP, et al. : Fetuin-A-containing calciprotein particles reduce mineral stress in the macrophage. *PLoS One*, 8; e60904, 2013.
- 24) Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. : Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*, 390; 45-51, 1997.
- 25) Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, et al. : Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *J Biol Chem*, 281; 6120-6123, 2006.
- 26) Hu MC, Shiizaki K, Kuro-o M, et al. : Fibroblast growth factor 23 and klotho : physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. *Annu Rev Physiol*, 75; 503-533, 2013.
- 27) Haut LL, Alfrey AC, Guggenheim S, et al. : Renal toxicity of phosphate in rats. *Kidney Int*, 17; 722-731, 1980.
- 28) Bank N, Su WS, Aynedjian HS : A micropuncture study of renal phosphate transport in rats with chronic renal failure and secondary hyperparathyroidism. *J Clin Invest*, 61; 884-894, 1978.
- 29) Lau K : Phosphate excess and progressive renal failure: the precipitation-calcification hypothesis. *Kidney Int*, 36; 918-937, 1989.
- 30) Isakova T, Wahl P, Vargas GS, et al. : Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney Int*, 79; 1370-1378, 2011.