

# リン負荷が慢性腎不全における細胞老化を介して血管石灰化を促進する機序の解明

山田俊輔 徳本正憲 大星博明

福岡歯科大学総合医学講座内科学分野

key words : 細胞老化, 血管平滑筋細胞, リン負荷, 血管石灰化, 慢性腎臓病

## 要 旨

血管石灰化は透析患者の生命予後を規定する重要な原因である。血管石灰化の重要な促進因子として、透析患者で蓄積するリンが重要視されている。リンは、細胞表面にあるリン・ナトリウム共輸送体を介して細胞内に取り込まれ、血管平滑筋細胞を骨芽細胞様細胞に変化させ、動脈の中膜にカルシウムとリンからなる結晶を析出させる。またリンは、平滑筋細胞のアポトーシス、エラスチンなどの弾性線維の断片化などにも関与し、重層的に血管石灰化を促進する。

近年、血管石灰化は細胞老化現象であることが報告されている。慢性腎臓病における様々な合併症の多くが、細胞老化によって促進されることが報告されている。しかし、透析患者で重要な石灰化促進因子であるリンが血管平滑筋細胞に老化を引き起こすかどうか、またリン吸着薬が細胞老化を抑制するかどうかの検証もなされていない。

そこで我々は、慢性腎不全ラット（アデニン腎症ラット）を用いて、リン負荷が細胞老化を惹起するかどうか、またリンによって促進される細胞老化が血管石灰化を促進するかどうかを明らかにするために動物実験を行った。

慢性腎不全ラットでは、腎不全が進行するとともに尿中リン排泄量が低下し、血清リン濃度が上昇し、大動脈中膜の血管石灰化が進行した。血管石灰化部位に

は細胞老化で観察される SA- $\beta$ -GAL の増加、p21 および p53 の増加を認め、同部位では酸化ストレスと局所の炎症 (TNF- $\alpha$ ) が増大していた。これらの変化はリン吸着薬 (炭酸カルシウム、炭酸ランタン) の投与により抑制された。また培養平滑筋細胞を高リン環境に曝露すると、培養血管平滑筋細胞の老化が促進され、組織のカルシウム沈着量が増加した。

以上の結果から、慢性腎不全におけるリン負荷は血管平滑筋細胞の細胞老化を促進することで、血管平滑筋細胞を骨芽細胞様細胞に形質変化させ、血管石灰化を促進すること、さらにリン吸着薬の使用はリン負荷に伴う細胞老化を抑制し、血管石灰化の発症を抑制することが明らかになった。

## 1 研究目的

血管石灰化は透析患者の生命予後を規定する重要な原因である<sup>1)</sup>。近年、慢性腎臓病に伴う骨ミネラル代謝異常が血管石灰化を促進することが明らかになった<sup>2)</sup>。なかでも、血管石灰化の重要な促進因子として、透析患者で蓄積するリンが重要視されている<sup>3)</sup>。リンは、細胞表面にあるリン・ナトリウム共輸送体 (Pit-1) を介して細胞内に取り込まれ、血管平滑筋細胞を骨芽細胞様細胞に変化させ、動脈の中膜にカルシウムとリンからなる結晶を析出させる。またリンは、平滑筋細胞のアポトーシス、エラスチンなどの弾性線維の断片化などにも関与し、重層的に血管石灰化を促進する<sup>4)</sup>。

リンは、血管石灰化の促進機序を複数同時に刺激するために、血液透析患者の血管石灰化を管理するうえできわめて重要な治療ターゲットになっている。

近年、血管石灰化は細胞老化現象であることが報告されている<sup>5)</sup>。慢性腎臓病における様々な合併症の多くが、細胞老化によって促進されることが報告されている<sup>6)</sup>。血管平滑筋細胞は血管局所の炎症や酸化ストレスによって細胞老化をおこし、形質変化をきたす。血管平滑筋細胞の骨芽細胞様細胞への形質変化とは細胞老化の結果にほかならず、細胞老化が起こる結果、血管平滑筋細胞は石灰化形質を獲得する。このため、血管平滑筋細胞の老化を阻止することが重要である。

我々は、細胞老化の原因としてリンに注目している。実際、高リン血症および全身の血管石灰化を呈する Klotho ノックアウトマウスおよび FGF23 ノックアウトマウスでは、全身の細胞が老化するが、これらの変化は、リン負荷を制限することによってその大部分を抑制することが可能であった<sup>7)</sup>。このため、同様のことが慢性腎臓病に伴う血管石灰化においても関係していることが予測される。しかし、透析患者を含む慢性腎臓病においてきわめて重要な石灰化促進因子であるリンが、血管平滑筋細胞に老化を引きおこし、血管石灰化を促進しているかどうか、またリン吸着薬が細胞老化を抑制することができるかどうかについては十分な検討がなされていない。

そこで、本研究では以下のことを明らかにすることを目的に、後述の動物実験および培養細胞実験を実施した。本研究の目的は、

- ① リン負荷に伴う血管平滑筋細胞の細胞老化が、血管石灰化を促進する機序を明らかにすること
- ② リン吸着薬がリン負荷に伴う細胞老化を抑制し、血管石灰化も抑制することを明らかにすること
- ③ リン吸着薬の種類の違いが細胞老化、血管石灰化に及ぼす影響の相違を明らかにすること

である。

## 2 研究方法

慢性腎不全における、リンによる血管平滑筋細胞の老化、および血管石灰化の促進機序を明らかにするために、10週齢のSDラットを以下の4群に分け、8週間飼育した。4群とは、①正常群；通常餌を給餌、②慢性腎臓病（CKD）群；アデニン0.3%含有餌を給餌、

③CKD+炭酸ランタン群；アデニン0.3%、炭酸ランタン6%含有餌を給餌、④CKD+炭酸カルシウム群；アデニン0.3%、炭酸カルシウム6%含有餌を給餌、である。

0.3%アデニン含有餌を摂取したラットは、緩徐進行性のCKDを発症し、CKDに特徴的な病態（進行性の腎機能障害、尿細管間質障害、血清リン濃度の上昇、血清ビタミンD濃度の低下、二次性副甲状腺機能亢進症の進展、骨量低下、体重減少）を示すことを予備実験で事前に確認している<sup>8)</sup>。すべてのラットは、屠殺の24時間前から畜尿し、屠殺にさいして血液、心臓、大動脈、腎臓を採取した。

採取した血清を用いて尿素窒素、クレアチニン、カルシウム、リン、アルブミン、PTH、活性型vitamin D、FGF23、TNF- $\alpha$ の濃度を測定した。また採取した心臓、大動脈、および腎臓から遺伝子を取り出し、real-time PCRで遺伝子発現（Klotho、FGFR、sirt1、sirt2、Nrf2）を評価した。また、動脈の免疫染色（8-OHdG、TNF- $\alpha$ ）を行った。大動脈の凍結切片を用いてSA- $\beta$ -GAL染色を実施した。大動脈の血管石灰化の広がり程度を定量するために、大動脈のvon Kossa染色により大動脈カルシウム含量およびリン含量を測定した。測定には、カルシウムE-test WAKOおよびホスファCテスト WAKOを用いた。

次に、リンによる平滑筋細胞の細胞老化に対する直接作用の機序を解明することを目的に培養細胞実験を行った。ヒト培養平滑筋細胞（東洋紡ライフサイエンス）にリン負荷（Pi 0.9 mM、P 2.4 mM）を1日あるいは7日行い、細胞老化の検出、血管石灰化形質への変化とカルシウム含量の測定、および遺伝子変化の解析を順次行った。細胞老化の評価として、血管平滑筋細胞のSA- $\beta$ -GAL染色、遺伝子発現（p21、p27、Rb）、蛋白発現の免疫染色による評価（p16、p21）を実施した。酸化ストレスの定量として培地中のTNF- $\alpha$ の定量を実施した。血管平滑筋細胞の形質変化を確認する方法としてreal-time PCRを実施した。解析した遺伝子は $\alpha$ -SMA、BMP-2、Runx2、p21、p53、Nox4とした。

## 3 結果と考察

CKDラットは、正常腎機能ラットと比べて、8週間の経過で、進行性の腎機能・構造障害（血清クレアチニン、尿素窒素の上昇、尿細管間質障害）、血清リ

ン濃度の上昇, 血清 FGF23 濃度の上昇, 血清 PTH 濃度の上昇, 大動脈中膜の石灰化の進行, 血清アルブミン濃度の低下, 体重減少, 筋肉量の減少 (尿中クレアチニン排泄量低下) を認めた. 大動脈の石灰化部位では Runx2, BMP-2, osteocalcin の発現が亢進し, 血管平滑筋細胞の骨芽細胞様細胞への形質転換が促進された.

また大動脈の免疫染色では 8-OHdG が高度に染色され, 動脈の TNF- $\alpha$  の遺伝子発現も亢進した. また大動脈の免疫染色では 8-OHdG が高度に染色され, 動脈の TNF- $\alpha$  の遺伝子発現も亢進した. このことにより血管局所での炎症と酸化ストレスの亢進が示唆された. 血管石灰化部位に一致して, 細胞老化のマーカーである SA- $\beta$ -GAL が陽性になり, 大動脈における p16, p21 の遺伝子発現が亢進した. すなわち, 大動脈の石灰化部位では細胞老化が亢進していることが明らかになった.

炭酸ランタンおよび炭酸カルシウムを投与したラットでは, 尿中リン排泄量が正常ラットと同等にまで低下し, 血清リン濃度も正常化した. 大動脈には石灰化をほとんど認めず, 平滑筋細胞の形質変化や細胞老化を認めなかった. また血管局所の炎症および酸化ストレスも改善していた. このことは, リン吸着薬の使用によって適切にリンを管理することが, 血管平滑筋細胞のリンによる局所の炎症, 酸化ストレスおよび細胞老化を抑制し, 血管石灰化の発症, 進行を抑制する可能性を示している.

一方, 炭酸ランタン治療群と炭酸カルシウム治療群では大動脈中のカルシウム含量が後者で有意に高く, また血清のカルシウム濃度および血清 TNF- $\alpha$  濃度も炭酸カルシウム群で上昇していることが明らかになった. 近年, カルシウム負荷は血管石灰化を促進するため, カルシウム負荷を軽減することが推奨されているが, 今回の実験により, 炭酸カルシウムはカルシウムを含有しないリン吸着薬である炭酸ランタンと比較して, カルシウムを負荷する分, リン吸着薬としての効果が不十分である可能性が示唆された.

#### 4 結 論

慢性腎不全におけるリン負荷は, 血管平滑筋細胞の

細胞老化を促進し, 血管平滑筋細胞を骨芽細胞様細胞に変化させ, 動脈石灰化を促進する. リンが血管平滑筋細胞の老化を促進する機序として, 血管局所における炎症および酸化ストレスが関係している可能性が考えられた. また, 慢性腎不全におけるリン吸着薬の使用は, 血管平滑筋細胞の細胞老化を抑制し, 血管石灰化の進展を抑制できる可能性があると考えられた. さらに, リン吸着役の中でもカルシウムを含有する薬剤は炎症反応を惹起し, 血管石灰化を促進する可能性が考えられた.

この研究は, 平成 24 年度日本透析医会公募研究助成によって行われた.

#### 文 献

- 1) Blacher J, Guerin AP, Pannier B, et al. : Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertension*, 38; 938-942, 2001.
- 2) Kidney Disease : Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group : KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int*, 113(Suppl); S1-S130, 2009.
- 3) Jono S, McKee MD, Murray CE, et al. : Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res*, 87; E10-E17, 2000.
- 4) Mizobuchi M, Towler D, Slatopolsky E : Vascular calcification: the killer of patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 20; 1453-1464, 2009.
- 5) Campisi J, d'Adda di Fagnagna F : Cellular senescence : when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8; 729-740, 2007.
- 6) Yang H, Fogo AB : Cell senescence in the aging kidney. *J Am Soc Nephrol*, 21; 1436-1439, 2010.
- 7) Stubbs JR, Liu S, Tang W, et al. : Role of hyperphosphatemia and 1,25-dihydroxyvitamin D in vascular calcification and mortality in fibroblastic growth factor 23 null mice. *J Am Soc Nephrol*, 18; 2116-2124, 2007.
- 8) Yamada S, Taniguchi M, Tokumoto M, et al. : The antioxidant tempol ameliorates arterial medial calcification in uremic rats: important role of oxidative stress in the pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease. *J Bone Miner Res*, 27; 474-485, 2012.