

血液透析患者に特異的な 動脈硬化進展機序はあるか？

——単球スカベンジャー受容体発現の異常——

安藤 稔

東京都立駒込病院腎臓内科

key words : 心・血管病, マクロファージ刺激因子, 酸化 LDL, リアルタイム PCR

要 旨

背景：単球の発現するスカベンジャー受容体（SR）は、粥状動脈硬化発症のメカニズムにおける初期段階で重症な役割を演じている。本研究では、HD 患者における動脈硬化進展の機序に、SR 発現の異常が関わっているか否かに焦点を当てて研究した。また、SR 発現と HD 患者血中に高濃度で蓄積するマクロファージ刺激因子（M-CSF）との関連を調べた。

方法：末梢血単球における SR クラス A（SR-A）とクラス B の一つである CD36 の遺伝子発現状態をリアルタイム PCR 法（RT-PCR）で調べ、慢性 HD 患者 30 例と年齢を一致させた健常者 10 例の間で比較した。末梢血単球は CD14 でラベルされた磁気ビーズ（Miltenyi Biotec）を用いて末梢血から抽出した。血清 M-CSF 濃度を市販の ELISA キット（R&D Systems）を用いて測定した。

結果：SR-A と CD36 の遺伝子発現は、両者とも HD 患者で有意に亢進していた（データは中央値 [四分位範囲]）。SR-A 発現：HD 患者 1.64 [0.96~2.76] vs 健常者 0.90 [0.60~1.04], $P=0.0060$ 。CD36 発現：HD 患者 1.09 [0.88~1.74] vs 健常者 0.74 [0.64~0.99], $P=0.0255$ 。また、血清 M-CSF 濃度は、HD 患者で圧倒的に高値であり（1,121 [999~1,342] vs 176 [155~202], $P<0.0001$ ）、単球の M-CSF 遺伝子発現も HD 患者で有意に亢進していた（0.79 [0.42~1.53] vs 0.42 [0.28~0.66], $P=0.039$ ）。さらに、血清 M-CSF 濃度は、

SR-A および CD36 遺伝子発現と正の有意な相関を示した。

結論：HD 患者の SR 遺伝子発現は亢進しており、これは、HD 患者が易動脈硬化性である理由の一つかもしれない。HD 患者の SR 遺伝子発現の亢進と血中に高濃度で蓄積している M-CSF には関連がある。

緒 言

透析患者の動脈硬化の主役は、古典的には血管内膜粥状硬化（atherosclerosis）の悪化と考えられ、atherogenic なレムナント・リポタンパク、酸化 LDL、small-dense LDL など、質的に変化した lipid の血管内皮下への蓄積が初期病巣を形成する^{1~6}。本研究は、こうした atherogenic な脂質を血管内皮下に取り込むさいに主役を演じるスカベンジャー受容体（SR）^{7~13}の発現状態に注目し、透析患者の末梢血単球でその発現状態が亢進状態にあるか否かを慢性血液透析（HD）患者において研究することを目的とした。SR は、SR クラス A（SR-A）とクラス B（CD36）の 2 種類の発現状態を研究する。また、SR 発現異常と HD 患者血中に高濃度で蓄積するマクロファージ刺激因子（M-CSF）との関連を調べた^{14, 15}。

1 対象・方法

対象サンプルは、慢性 HD 患者 30 例（表 1）、年齢を一致させた健常者 10 例から得た末梢血単球である。方法は以下である。

表1 対象患者のプロフィール

Patients, no.	30
Men, no. (%)	14 (47)
Age, years	62 (55~67)
HD duration, months	67 (15~289)
Diabetes mellitus, no. (%)	8 (27)
Cardiovascular disease, no. (%)	11 (37)
Hypertension, no. (%)	22 (73)
Use of ARB or ACEI, no. (%)	19 (63)
Use of CCB, no. (%)	16 (53)
Use of statins, no. (%)	17 (57)
White blood cells (x10 ³ /μl)	5.17 (4.07~6.71)
Red blood cells (x10 ⁴ /μl)	372 (359~409)
Hemoglobin, g/dl	10.8 (10.4~11.6)
Hematocrit, %	34.9 (33.7~37.2)
Platelets (x10 ⁴ /μl)	14.8 (12.3~20.4)
Serum albumin, g/dl	3.8 (3.4~4.0)
Serum urea nitrogen, mg/dl	65.0 (53.0~71.8)
Serum creatinine, mg/dl	11.1 (8.0~12.9)
Serum calcium, mg/dl	8.7 (8.4~9.4)
Serum phosphorus, mg/dl	5.1 (4.4~6.0)
Serum C-reactive protein, mg/dl	0.09 (0.05~0.14)
Serum total cholesterol, mg/dl	136 (125~161)
Serum LDL-C, mg/dl	67 (55~80)
Serum HDL-C, mg/dl	46 (32~61)
Serum triglycerides, mg/dl	198 (164~235)

Data are expressed as median (interquartile range), if otherwise stated. Abbreviations : no., number; HD, hemodialysis; ACEI, angiotensin converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin receptor blocker; CCB, calcium channel blocker; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol

- ① SR-A と CD36 の mRNA 発現状態を通常のリアルタイム PCR (RT-PCR) で定量化して比較した^{16,17)}。実験は一つのサンプルにつき、triplicateで行った。2群間比較は、Mann-Whitney法を用いた。
- ② SR-A, CD36 発現亢進の原因探索：既報から透

析患者の M-CSF 濃度が健常者の約 20 倍以上昇していることに注目し、SR 発現量と血中 M-CSF 濃度およびその遺伝子発現量との関連を解析した。相関関係は Pearson's correlation coefficient を用いた。

2 結果

2-1 末梢血単球における SR-A および

CD36 遺伝子発現状態

HD 患者単球は、年齢を一致させた健常者単球に比べ、無刺激状態ですでに SR-A, CD36 遺伝子発現は、統計的に有意に上昇していた。HD 患者、健常者の mRNA 発現は以下の通りである (データは中央値 [四分位範囲])。SR-A : HD 患者 1.67 [0.96~2.76] vs 健常者 0.90 [0.60~1.04], $P=0.0060$ 。CD36 : HD 患者 1.09 [0.88~1.74] vs 健常者 0.74 [0.64~0.99], $P=0.0255$ (図 1)。

2-2 血清 M-CSF 濃度と各 SR 遺伝子発現の関連

M-CSF 濃度は市販の ELISA (R&D Systems) で測定した。HD 患者の血清濃度は、健常者の濃度に比べ大きく上昇していた。各々、1,121 [999~1,342] vs 176 [155~202] pg/ml, $P<0.0001$ であった (図 2-a)。また、単球の M-CSF 遺伝子発現は、HD 患者で健常者に比べ、有意に亢進していた。HD 患者 0.79 [0.42~1.53] vs 健常者 0.42 [0.28~0.66], $P=0.0392$ (図 2-b)。さらに、血清 M-CSF 濃度は、SR-A 遺伝子および CD36 遺伝子の両者と有意な正の相関関係を示した。M-CSF と SR-A の相関 : $r^2=0.1681$, $P=0.0086$ 。M-CSF と

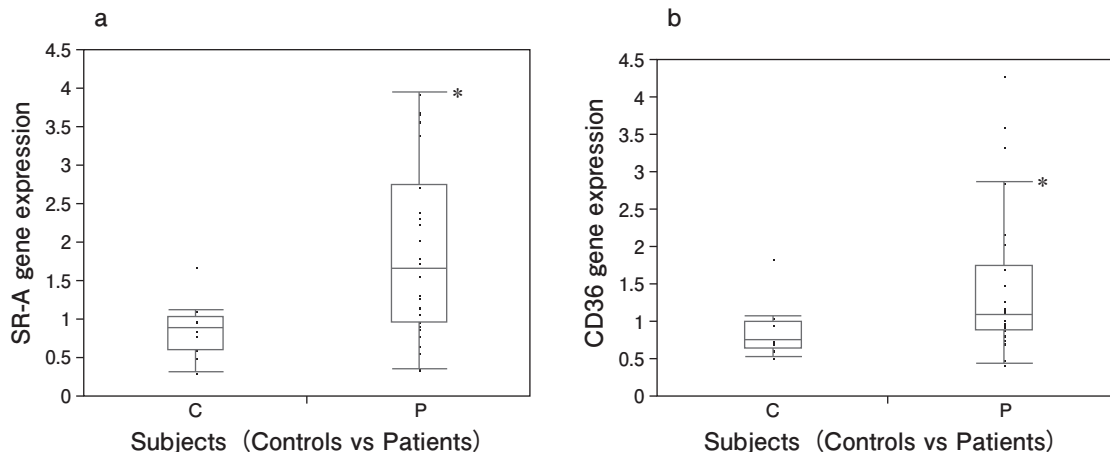


図1 リアルタイム PCR 法による患者および健常者単球における SR-A および CD36 の遺伝子発現量の比較

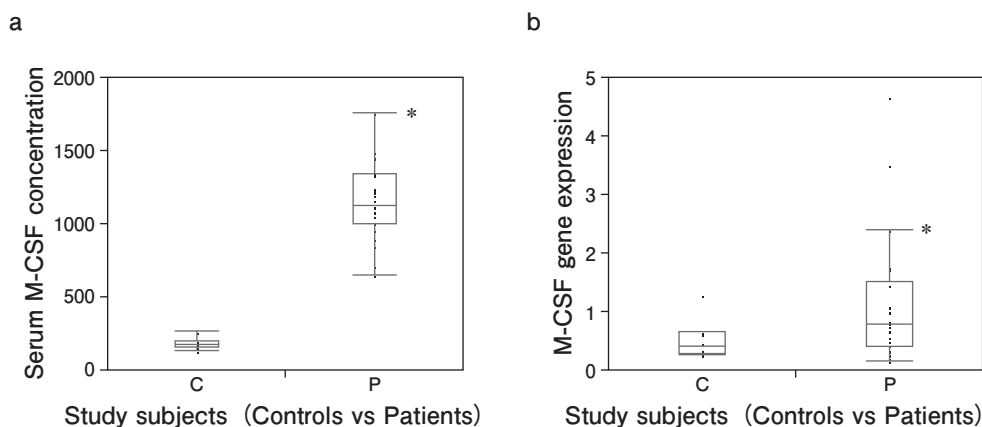


図2 患者および健常者の血清 M-CSF 濃度 (a), および単球における M-CSF 遺伝子発現量 (b) の比較

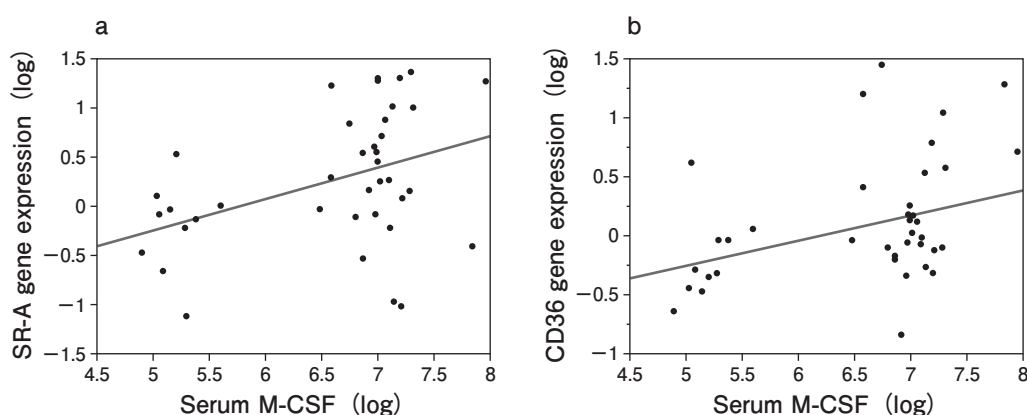


図3 血清 M-CSF 濃度と単球における SR-A (a), および CD36 (b) の遺伝子発現量の相関性

CD36 の相関: $r^2=0.1202$, $P=0.0284$ (図3).

3 考察と結論

本研究は、従来の lipid 異常の視点ではなく、脂質取り込み受容体異常の視点から、SR クラス A (SR-A) とクラス B (CD36) の発現状態を HD 患者において研究する点に、本研究は独創性をもつ。

慢性 HD 患者では、粥状動脈硬化の初期病巣である泡沫細胞の形成で中心的役割をはたす、単球の発現する受容体である SR-A および CD36 の両者の遺伝子発現の亢進が認められた。一般に、HD 患者では、酸化 LDL 産生の亢進があることに鑑みれば^{18,19)}, SR 発現亢進が、通常状態で認められたことは、HD 患者が、粥状動脈硬化に陥りやすい準備状態 (易動脈硬化性) に置かれていることを示唆している。また、この SR 遺伝子亢進には、HD 患者血中に異常に高濃度で蓄積する M-CSF が、単球を慢性的に刺激し続けていることが原因の一つとして考えられる^{14,15,20)}。

本研究の一部は、平成 25 年度日本透析医会公募研究助成金により行われた。

平成 25 年度日本透析医会公募研究助成により得られた研究成果は、原著論文として、“Nephron Clinical Practice” に投稿したため、二重投稿となることを避け、本研究報告書ではその概要を総論的に記載した。なお、原著論文は平成 28 年 5 月時点ではまだ査読中であり、採択の可否は未定である。

文 献

- 1) Collado S, Coll E, Nicolau C, et al. : Atherosclerotic disease predicts cardiovascular events in hemodialysis patients : a prospective study. PLoS One DOI : 10.1371/0127344.
- 2) Gansevoort RT, Correa-Rotter R, Hemmelgarn BR, et al. : Chronic kidney disease and cardiovascular risk : epidemiology, mechanisms, and prevention. Lancet 2013; 27 : 339-352.
- 3) Schoppet M, Shroff RC, Hofbauer LC, et al. : Exploring the biology of vascular calcification in chronic kidney disease : what's circulating? Kidney Int 2008; 73 : 384-390.
- 4) Ikewaki K, Schaefer JR, Frischmann ME, et al. : Delayed in

- vivo catabolism of intermediate-density lipoprotein and low-density lipoprotein in hemodialysis patients as potential cause of premature atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25 : 2615-2622.
- 5) Kronenberg F, Konig P, Neyer U, et al. : Multicenter study of lipoprotein (a) and apolipoprotein (a) phenotypes in patients with end-stage renal disease treated by hemodialysis or continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Am Soc Nephrol* 1995; 6 : 110-120.
 - 6) Shoji T, Ishimura E, Inaba M, et al. : Atherogenic lipoproteins in end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis* 2001; 38 : S30-33.
 - 7) Ando M, Iwata A, Ozeki Y, et al. : Circulating platelet-derived microparticles with procoagulant activity may be a potential cause of thrombosis in uremic patients. *Kidney Int* 2002; 62 : 1757-1763.
 - 8) Takahashi T, Kubota M, Nakamura T, et al. : Interleukin-6 gene expression in peripheral blood mononuclear cells from patients undergoing hemodialysis or continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Ren Fail* 2000; 22 : 345-354.
 - 9) Lonnemann G, Behme TC, Lenzner B, et al. : Permeability of dialyzer membranes to TNF alpha-inducing substances derived from water bacteria. *Kidney Int* 1992; 42 : 61-68.
 - 10) Steinberg D : The cholesterol controversy is over. Why did it take so long? *Circulation* 1989; 80 : 1070-1078.
 - 11) Ross R : Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340, 115-126.
 - 12) Kodama T, Freeman M, Rohrer L, et al. : Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature* 1990; 343 : 531-535.
 - 13) Robbins CS, Hilgendorf I, Weber GF, et al. : Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med* 2013; 19 : 1166-1172.
 - 14) Le Meur Y, Fixe P, Aldigier JC, et al. : Macrophage colony stimulating factor involvement in uremic patients. *Kidney Int* 1996; 50 : 1007-1012.
 - 15) Nikolic D, Calderon L, Du L, et al. : SR-A ligand and M-CSF dynamically regulate SR-A expression and function in primary macrophages via p38 MAPK activation. *BMC Immunology* 2011; 12 : 37.
 - 16) Livak KJ, Schmittgen TD : Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods* 2001; 25 : 402-408.
 - 17) Schmittgen TD, Livak KJ : Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nat Protoc* 2008; 3 : 1101-1108.
 - 18) Maggi E, Bellazzi R, Falaschi F, et al. : Enhanced LDL oxidation in uremic patients : an additional mechanism for accelerated atherosclerosis? *Kidney Int* 1994; 45 : 876-883.
 - 19) Ando M, Sanaka T, Nihei H : Eicosapentanoic acid reduces plasma levels of remnant lipoproteins and prevents in vivo peroxidation of LDL in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10 : 2177-2184.
 - 20) Ando M, Gafvels M, Bergstrom J, et al. : Uremic serum enhances scavenger receptor expression and activity in the human monocytic cell line U937. *Kidney Int* 1997; 51 : 785-792.