

# 透析患者における新たな血管石灰化の機序としてのグリコサミノグリカン関連酵素である EXTL2 に関する研究

後藤俊介\*1 藤井秀毅\*1 渡邊健太郎\*1 西 慎一\*1 灘中里美\*2 北川裕之\*2  
中西昌平\*3 金 鐘一\*3

\*1 神戸大学大学院医学研究科腎臓内科/腎・血液浄化センター \*2 神戸薬科大学学生化学研究室 \*3 千船病院腎臓内科

key words : 血液透析, 血管石灰化, グリコサミノグリカン, EXTL2

## 要 旨

血管石灰化は血液透析患者における生命予後に対する重要な危険因子であるが、その機序の解明や治療については十分でない。最近、グリコサミノグリカンの合成に関連する酵素の一つである exostosin-like 2 (EXTL2) が腎不全の血管石灰化に関連することが動物実験で示されたため、今回、血液透析患者にて血中の EXTL2 と血管石灰化について検討した。血中の EXTL2 は血球中の EXTL2 mRNA を測定し、血液透析患者と健常者コントロールで比較した。また血管石灰化は腹部大動脈を CT で評価した aortic calcification index (ACI) を用いた。結果は、コントロール群 (N=12) に比べて血液透析患者群 (N=15) において EXTL2 mRNA の低下を認めた (コントロール: 0.45 (0.27~0.55), 血液透析: 0.15 (0.10~0.24),  $P<0.05$ )。EXTL2 mRNA と ACI との相関は認めなかった。EXTL2 の低下は血管石灰化を引き起こす可能性があり、血液透析患者の血管石灰化に EXTL2 が関与している可能性が示唆された。

## 1 目 的

血管石灰化は透析患者に非常に多く認め<sup>1)</sup>、また血管石灰化は血液透析患者において生命予後に関わる重要な危険因子である<sup>2)</sup>。血管石灰化が起こる機序については、Ca・P 代謝異常や炎症、高血圧、糖尿病、脂

質異常、石灰化を阻止する Fetuin-A などの因子の減少など様々なものがあげられているが、血管石灰化に対する治療は未だ十分とはいえず、新たな治療ターゲットが求められている<sup>3)</sup>。

最近、グリコサミノグリカンに関連した酵素である exostosin-like 2 (EXTL2) をノックアウトした腎不全マウスが、野生型の腎不全マウスに比べ血管石灰化が著明に進行していることが報告された<sup>4)</sup>。EXTL2 はグリコサミノグリカンの中のコンドロイチン硫酸とヘパラン硫酸の合成に関わっており、これらの合成を止める働きがあるとされている<sup>5)</sup>。そのため、EXTL2 がノックアウトされるとコンドロイチン硫酸やヘパラン硫酸の合成を止めることができず、それらが血管に蓄積されることで血管石灰化が進行するという機序が考えられている。

EXTL2 の働きは体の様々な場所で認められるとされている<sup>6)</sup>。この EXTL2 に関して、血液透析患者で検討した報告は今までないため、今回、我々は血液透析患者における血液中の EXTL2、および EXTL2 と血管石灰化との関連について検討することとした。

## 2 方 法

### 2-1 研究の対象

血液透析患者の対象としては、千船病院に外来通院中の血液透析患者を対象とした。ただし、①入院中の患者、②19歳以下の患者、③透析導入後半年以内の

患者、④糖尿病患者、⑤腹部大動脈径が3 cm以上の患者、⑥腹部大動脈の手術歴がある患者、⑦本研究に同意が得られない、の七つのうちどれか一つでも満たす患者は除外した。

糖尿病の定義は、①HbA1cが6.5%以上、②糖尿病薬の内服歴がある、③カルテ上、今まで糖尿病の指摘がある、の三つのうちどれか一つでも満たした場合を糖尿病とした。また健常人からボランティアを募り、それらをコントロールとした。本研究は千船病院の倫理委員会の承認（承認番号27-0527-01）を得たうえで、各患者から文書での承諾を得て行った。

## 2-2 臨床データおよび血液データ

年齢、性別、透析歴などのデータはカルテより抽出した。血液検体は中2日空けた週初めの検体を用いた。血中のEXTL2の測定については、血球中からmRNAを抽出し、real-time PCRを用いて、血球中のEXTL2 mRNAを測定した。またEXTL2以外のグリコサミノグリカンの合成に関わる因子として、chondroitin 4-O-sulfotransferase 1 (C4ST1)、xylosyltransferase 2 (XYLT2)、family with sequence similarity 20 member B (Fam20B)のmRNAについても検討した。ハウスキーピング遺伝子としてはglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)を用いた。

## 2-3 血管石灰化の評価

血管石灰化の評価は腹部CTで撮影された腹部大動脈で行った。評価法はaortic calcification index (ACI)を用いた。ACIは以前に我々の研究で用いた方法にて測定した<sup>7)</sup>。その方法を簡単に示すと、大動脈分岐部から頭側にかけて1 cm刻みで10スライス選び、1スライスを12分割する。この120領域のうち石灰化している部分を計算し、その割合をパーセント表示したものをACIとした。この腹部CTでの血管石灰化の評価は血液透析患者群のみ行った。

## 2-4 統計解析

データは、連続変数で正規分布しているものは平均±標準偏差、正規分布していないものは中央値（四分位）、二値変数は割合で表した。血液透析患者群とコントロール群のEXTL2 mRNA、C4ST mRNA、XYLT2 mRNA、Fam20B mRNAの比較、および血液透析患者

内での男女間でのEXTL2 mRNAの比較はMann-WhitneyのU検定を用いた。また血液透析患者におけるEXTL2 mRNAとACI、年齢、透析歴、Hb、Alb、CRP、補正Ca、P、インタクトPTHとの相関はSpearmanの相関係数にて検討した。P<0.05を有意差ありとした。これらの統計解析はSPSS version 22.0 (IBM, Tokyo, Japan)を用いた。

## 3 結果

15名の血液透析患者が研究に参加した。参加した血液透析患者の患者背景は表1の通りである。貧血やCa、P、PTHのコントロールは良好で、炎症もほぼ認めていない安定した血液透析患者であった。またコントロール群として健常人12名が研究に参加し、年齢は36±8歳で、性別は男性が67%であった。

血液透析患者群とコントロール群のEXTL2 mRNAについて図1に示す。それぞれのEXTL2 mRNAは血液透析患者群：0.15 (0.10~0.24)、コントロール群：0.45 (0.27~0.55)で、血液透析患者群ではコントロ

表1 患者背景 (N=15)

男性 (%)	73
年齢 (歳)	72±10
透析歴 (月)	88 (52~144)
Hb (g/dl)	11.5±1.1
Alb (g/dl)	3.5±0.3
CRP (mg/dl)	0.13 (0.07~0.22)
補正Ca (mg/dl)	8.7±0.4
P (mg/dl)	5.0±0.6
インタクトPTH (pg/ml)	163 (95~210)
ACI (%)	34 (21~64)

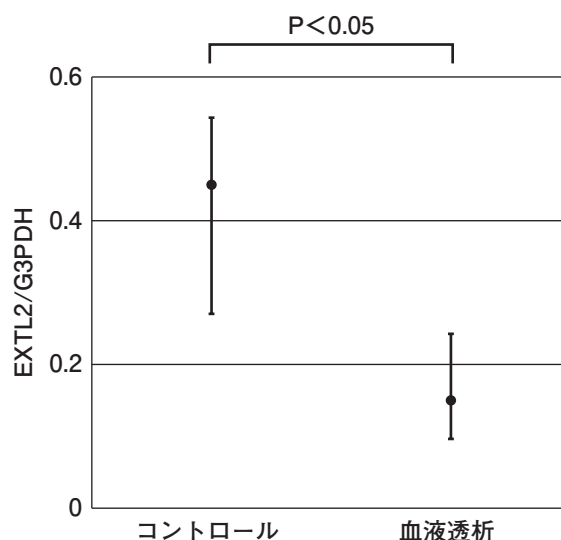


図1 血液透析患者群とコントロール群での血中のEXTL2 mRNA

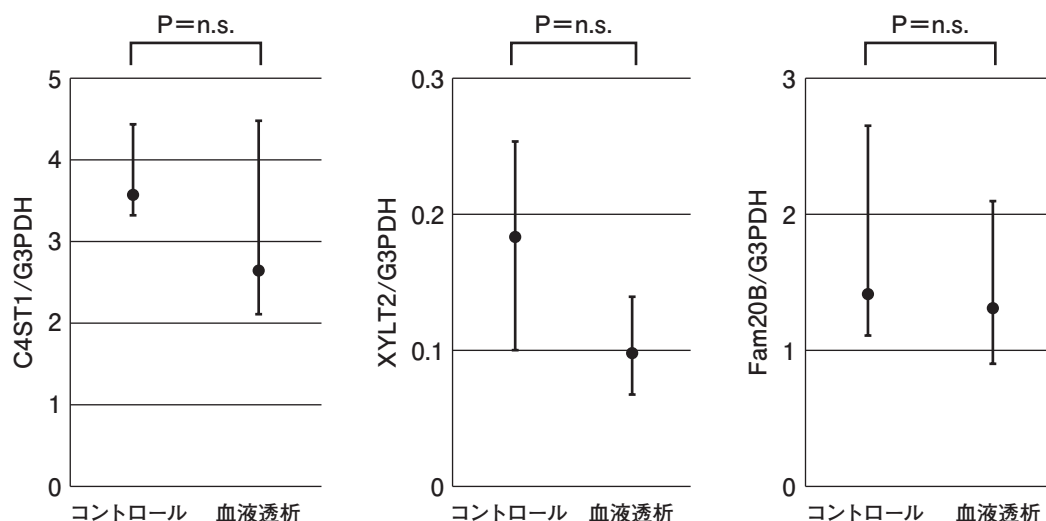


図2 血液透析患者群とコントロール群での血中の EXTL2 以外のグリコサミノグリカン合成関連酵素の mRNA

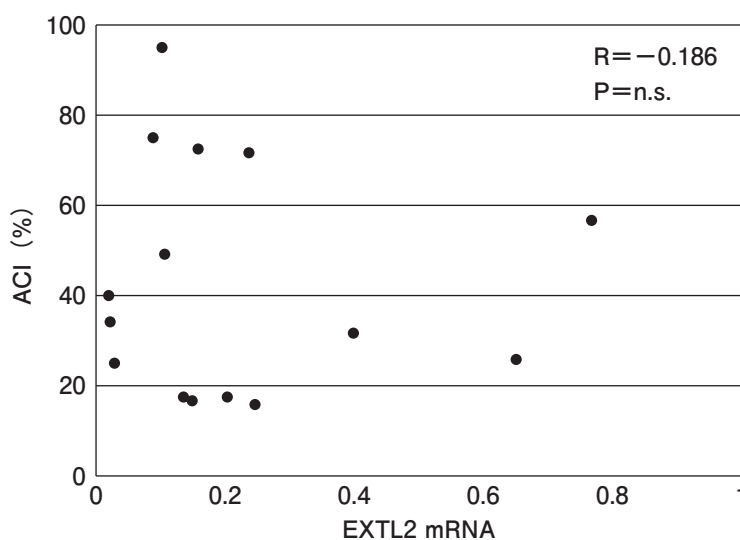


図3 血液透析患者における ACI と EXTL2 mRNA の相関

ール群に比べ、有意に低値であった。また血液透析患者群とコントロール群における C4ST1, XYLT2, Fam20B の mRNA について図 2 に示す。この三つの因子については、血液透析患者群とコントロール群において有意差は認めなかった。

血液透析患者群における EXTL2 mRNA と ACI との相関について図 3 に示す。これらについては有意な相関は認めなかった。また ACI 以外のパラメーターと EXTL2 mRNA の相関を表 2 に示す。様々な因子について相関がないか検討したが、どの項目においても相関を認めなかった。また血液透析患者群において、男性と女性に分けて EXTL2 mRNA の差を検討したが、有意差は認めなかった (男性：0.16 (0.06~0.24), 女性：0.14 (0.13~0.21), P=0.794)。

表2 血液透析患者における EXTL2 mRNA と関連因子との相関

	r	p
年齢	-0.322	n.s.
透析歴	0.320	n.s.
Hb	-0.052	n.s.
Alb	0.234	n.s.
CRP	-0.181	n.s.
補正 Ca	0.393	n.s.
P	0.137	n.s.
インタクト PTH	-0.316	n.s.

#### 4 考 察

EXTL2 は EXT 遺伝子の中の一つで、この EXT 遺伝子のうち今まで 5 種類がクローニングされ、それぞ

れ EXT1, EXT2, EXTL1, EXTL2, EXTL3 と呼ばれている<sup>8)</sup>。EXT 遺伝子はもともと、遺伝性多発性外骨腫と呼ばれる常染色体優性遺伝で、四肢長管骨の骨端に軟骨帽をもつ良性の骨軟骨腫が多発する疾患の原因遺伝子として報告された。EXT 遺伝子は EXT1, EXT2, EXT3 の 3 種類が存在することが報告されており、そのうち EXT1 と EXT2 がクローニングされた。その後 EXT1 と EXT2 との配列の相同性から EXTL1, EXTL2, EXTL3 がクローニングされた。ただし、この EXTL1, EXTL2, EXTL3 と遺伝性多発性外骨腫発症との関連は報告されていない。これら EXT 遺伝子ファミリーの働きはしばらく不明であったが、その後グリコサミノグリカンの一つであるコンドロイチン硫酸やヘパラン硫酸の合成に関わっていることが示され、EXTL2 もコンドロイチン硫酸やヘパラン硫酸の合成を抑制することが報告されている<sup>5)</sup>。

この EXTL2 について、最近 5/6 腎摘マウスに高リン食を負荷したモデルにおいて EXTL2 をノックアウトすると、ノックアウトをしていないモデルと比較して、血管の石灰化が進行していることが示された<sup>4)</sup>。その機序としては、EXTL2 のノックアウトにて血管にコンドロイチン硫酸やヘパラン硫酸が蓄積すること、また細胞実験で、コンドロイチン硫酸やヘパラン硫酸の分解酵素により EXTL2 のノックアウトによる石灰化が減少することから、血管へのコンドロイチン硫酸やヘパラン硫酸の蓄積が機序の一つと考えられている。

血管石灰化は血液透析患者においてしばしば認めるとともに、重要な予後予測因子でもある<sup>2)</sup>。EXTL2 は様々な場所で発現していることが示されており<sup>6)</sup>、今回、血球中の EXTL2 の mRNA を測定することが可能であったため、他のグリコサミノグリカンの合成に関わる因子である C4ST1, XYLT2, Fam20B と共に検討した。結果としては C4ST1, XYLT2, Fam20B は健常コントロールと血液透析患者の両群において有意差は認めなかったが、EXTL2 のみ健常コントロールに比べ、血液透析患者のほうが発現が低いという結果であった。今回はパイロット研究で少数例の検討であるため、交絡因子をすべて調整したとは言いが、血液透析患者の EXTL2 の発現が低いことは、もしかしたら透析患者で血管石灰化が多いことの原因になっているかもしれない。

血液透析患者における EXTL2 と血管石灰化の関連

について、本研究ではさらに CT での腹部大動脈の石灰化と EXTL2 との関連について検討したが、結果としては相関は認めなかった。その理由の一つとして、血液透析患者における血管石灰化の危険因子は血圧や糖尿病、脂質代謝異常、炎症、慢性腎臓病に伴う骨ミネラル代謝異常などと非常に多くのものがあげられる<sup>3)</sup>。本研究では糖尿病患者は除外されているため、糖尿病の影響はないと思われるが、それ以外の因子については調整できておらず、また少数例での検討であったため、EXTL2 と血管石灰化との関連をみるにあたって、血管石灰化に関わる他の因子が影響した可能性は否定できない。ヒトにおいても EXTL2 が血管石灰化と関連があるかどうかについては、もう少し多数例での検討が必要であると思われる。

EXTL2 と腎不全との関連以外に、年齢、性別、貧血、炎症、栄養状態、CKD-MBD に関連したパラメーターとの相関を検討したが、結果としてはどれも有意なものとは認めなかった。我々の知る限りでは、EXTL2 が何によって調整されているのか、基礎研究を含めて未だほとんど明らかにはなっていないと思われ、今後さらなる研究が必要であると思われる。

## 5 結 論

今回の研究で、グリコサミノグリカンの合成に関わり、また腎不全の血管石灰化に関わるとされている EXTL2 が、血液透析患者において低下している可能性が示された。EXTL2 低下は腎不全において血管石灰化を引き起こす可能性があり、EXTL2 の低下は血液透析患者における血管石灰化の原因の一つかもしれない。血液透析患者において血管石灰化は重要な危険因子であり、血液透析患者における EXTL2 の役割を明らかにすることで、腎不全における血管石灰化の新たなメカニズムが判明するかもしれない。

平成 27 年度日本透析医会公募研究助成により得られた成果は、原著論文として今後投稿予定である。二重投稿となることを避け、本報告書ではその概要を総説的に記載した。

## 文 献

- 1) Nakamura S, Ishibashi-Ueda H, Niizuma S, et al. : Coronary calcification in patients with chronic kidney disease and coro-

- nary artery disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4 : 1892-1900.
- 2) Matsuoka M, Iseki K, Tamashiro M, et al. : Impact of high coronary artery calcification score (CACS) on survival in patients on chronic hemodialysis. *Clin Exp Nephrol* 2004; 8 : 54-58.
  - 3) Wu M, Rementer C, Giachelli CM : Vascular calcification: an update on mechanism and challenges in treatment. *Calcif Tissue Int* 2013; 93 : 365-373.
  - 4) Purnomo E, Emoto N, Nugrahaningsih DAA, et al. : Glycosaminoglycan overproduction in the aorta increases aortic calcification in murine chronic kidney disease. *J Am Heart Assoc* 2013; 2 : e000405.
  - 5) Nadanaka S, Zhou S, Kagiya S, et al. : EXTL2, a member of the EXT family of tumor suppressors, controls glycosaminoglycan biosynthesis in a xylose kinase-dependent manner. *J Biol Chem* 2013; 288 : 9321-9333.
  - 6) Kitagawa H, Shimakawa H, Sugahara K : The tumor suppressor EXT-like gene EXTL2 encodes an  $\alpha$ 1, 4-N-acetylhexosaminyltransferase that transfers N-acetylgalactosamine and N-acetylglucosamine to the common glycosaminoglycan-protein linkage region. *J Biol Chem* 1999; 274 : 13933-13937.
  - 7) Goto S, Kitamura K, Kono K, et al. : Association between AST-120 and abdominal aortic calcification in predialysis patients with chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol* 2013; 17 : 365-371.
  - 8) 北川裕之 : 遺伝性多発性外骨腫とヘパラン硫酸の生合成, *医学のあゆみ* 2003; 207 : 348-354.