

血液透析患者における 新たな血管石灰化因子に関する研究

浅宮有香理*1 大坪 茂*1,2 菊地 勘*3,4 土谷 健*4 新田孝作*1

*1 東京女子医科大学第四内科 *2 三軒茶屋病院 *3 下落合クリニック *4 東京女子医科大学血液浄化療法科

key words : 血管石灰化粒子, エクソソーム

要 旨

透析患者の血管石灰化粒子の特徴をより明らかにするために、過去の報告を基に粒子の抽出を試み、走査型電子顕微鏡での形態観察、サイズ測定、重量測定、成分分析を行った。粒子の含有が想定される試料の顕微鏡所見では、数百 nm～数 μm の結晶と思われる粒子が観察され、蒸発残留物の重量は 84 mg/g、成分分析では NaCl を多く含んでいた。しかし、粒子のサイズや成分分析の結果より、粒子に加え周囲の液体を一緒に含んでいた可能性が高かった。そのため、回収法の精度の向上を試み、さらには違う視点から抽出を行う方法について検討した。

最近、透析患者の血管石灰化形成には血管平滑筋細胞から分泌される直径 30～150 nm の細胞外小胞（エクソソーム）が関与し、その中にカルシウム、リン、fetuin-A を含むことが報告された。そのため、続いてエクソソームの単離を試み、ナノ粒子解析装置での粒子径サイズの測定、X 線分析による成分分析、エクソソームの代表テトラスパンニンである CD63 濃度の測定を行い、これらの特徴について調べた。結果は、粒子径は単一ピークを示さず 100 nm 以下での分布を多く認め（D50 メジアン径 75.4 nm）、成分分析ではカルシウム、リン、鉄、クロール等の含有を認めた。CD63

濃度の測定は通常の 2 倍量および 3 倍量の試料を用いた。結果は、2 倍量では $12.2\sim 66.4\times 10^8$ 、3 倍量では $12.8\sim 113\times 10^8$ であった。3 倍量のほうが CD63 濃度は高値を示すことが予測されるが、50% の検体では低値を示した。この理由としては、エクソソーム単離の精度は高くなかった可能性が考えられた。

エクソソームの単離方法には、超遠心分離法、表面抗原に対する抗体を用いたアフィニティー法、ポリマー試薬による沈殿法などがあり、数種類の単離キットが存在している。しかし、これらには回収効率や純度が不十分なものを含むことが指摘されている。そのため、今後はまず、エクソソーム単離における精度の確認が必要と考えられた。また、今回の研究結果をさらに発展させるための手法案としては、エクソソーム内のカルシウムや fetuin-A の蛍光染色を施行し顕微鏡にて観察を行い、透析患者と健常人における発現量を比較する方法があげられる。さらには、エクソソーム内のマイクロ RNA (miRNA) や構成分子（蛋白、脂質など）は疾患ごとに特徴が異なるため、腎不全患者におけるこれらの解明は、血管石灰化機構の新たな発見や関連物質の同定に役立つと考えられる。

緒 言

動脈硬化・血管石灰化病変の形成は、心血管疾患の

A study of the particle associated with vascular calcification in hemodialysis patients

Department of Medicine, Kidney Center, Tokyo Women's Medical University

Yukari Asamiya

Department of Blood Purification, Sangenjaya Hospital

Shigeru Otsubo

Shimoochiai Clinic

Kan Kikuchi

発症や死因に直結している。この病変の促進因子として慢性腎臓病、糖尿病、高血圧、脂質異常症、慢性炎症性疾患、高齢が代表的であり、これらの患者数はきわめて多い。血管石灰化病変は粥状硬化の終末像であるが、近年、血液が循環している間に石灰化粒子が形成され、この粒子が直接血管内皮細胞を傷害し血管壁に侵入していく機序が示されている¹⁻³⁾。しかし、この粒子自体の特徴や関連物質に関しては未解明な部分が多い。透析患者における血管石灰化粒子に関する過去の報告では、血清を高速長時間で遠心分離を行うと血管石灰化粒子が沈殿し、その粒子形成には石灰化抑制作用を有する fetuin-A が使用され、遠心分離後の上清 fetuin-A 濃度は前のそれと比べて低下することが報告されている⁴⁻⁶⁾。さらに、腎不全患者におけるこの低下率は、血管石灰化や動脈硬化病変の進展と関係し、その他の血管石灰化因子（骨関連蛋白マーカー [血清 bone morphogenetic protein (BMP)-2/BMP-7 ratio やサイトカイン TNF- α]）とも関連することが報告されている⁴⁻⁶⁾。

近年、多くの細胞から分泌され、血液、尿、唾液、髄液、母乳などの体液中に存在するエクソソームには、病原性蛋白や老廃物の運搬、免疫応答、組織修復、神経伝達機構において重要な働きを持つことが示されている。エクソソームの表面または内部には、蛋白質、脂質、マイクロ RNA (miRNA) 等が含まれており、これらは疾患ごとに異なる特徴をもつことが解明されている。腎不全/血管石灰化領域の研究では、培養ヒト大動脈血管平滑筋細胞内より分泌されたエクソソーム内に fetuin-A、カルシウム、リンが含まれており、このエクソソーム分泌量は細胞外カルシウム濃度の上昇により上昇し、TNF- α 濃度にも影響を受けることが報告された⁷⁾。さらに、この報告では健常者の血管と透析患者の石灰化血管における CD63 (エクソソームの代表的なテトラスパニン) の発現についても調べており、前者の血管には発現を認めないものの後者の血管には発現していることも示されている。これらの発見により、以前から報告されている血管石灰化粒子は、エクソソーム内に取り込まれることや血管石灰化の形成には CD63 が関わるということが唆される。以上より、透析患者におけるこれらを標的とした研究の遂行は、血管石灰化機構における新たな病態の解明や関連物質の探索に役立つと考えられる。

今回、上記の学術的な背景を基に透析患者における血管石灰化粒子の研究を行う。

1 目的

血管石灰化病変の形成には血液中に存在する血管石灰化粒子が関与し、電子顕微鏡での粒子の形体についても報告されている。この粒子は高速長時間の遠心分離にて沈殿し、そのさいに fetuin-A が使用されることが報告されている。本研究ではこれらの過去の報告を基に透析患者における血管石灰化粒子の抽出を試み、走査型電子顕微鏡での観察、粒子のサイズ測定、重量測定、成分分析を行う。また、最近、透析患者の培養ヒト大動脈血管平滑筋細胞内より分泌されたエクソソーム内に fetuin-A、カルシウム、リン等が含まれていることが報告されたため、続いて透析患者の血清中エクソソームの抽出を試み、ナノ粒子解析装置を用いた粒子径のサイズ測定、蛍光 X 線分析による成分分析、エクソソームの代表的テトラスパニンの CD63 濃度の測定を行い、これらの特徴について調べる。上記の研究を行うことにより、透析患者の血管石灰化粒子の特徴をより明らかにすることを目的とする。

2 対象・方法

インフォームドコンセントを行い、研究に同意した東和病院外来通院中の透析患者 4 名を対象とし、同施設の承認を得て行い、東京女子医科大学の倫理委員会の承認を得た。

過去の報告⁴⁾を参考に、凍結解凍後の血清 0.5 ml をエッペンチューブに入れ、高速長時間 (1,600 \times g, 2 時間, 4 $^{\circ}$ C) の遠心分離を行い試料として用いる。今回、粒子の抽出や成分分析に関しては、関節液中のナノサイズレベルの微粒子の研究^{8,9)}で用いられた方法を参考にした (【実験 1-3】)。

【実験 1】 試料 0.5 ml を疎水性ペトリディッシュに滴下し、容器を密封し乾燥させる。析出物を走査型電子顕微鏡にて観察を行う。次に、遠心分離後の上清を丁寧に除去し、エッペンチューブの底面付近の液 1.5 μ l を回収し、疎水性ペトリディッシュに置いたカバーガラスに滴下し、容器を密封し乾燥させる。析出物を走査型電子顕微鏡にて観察を行う (分析装置: SEM, 日立ハイテクノロジー製 SU8240, 観察条件: 加速電圧 2 kV, 試料傾斜角 0 $^{\circ}$)。

【実験2】 試料 0.5 ml を秤量ビンに入れ 105℃ の定温乾燥器で 1 時間乾燥し、デシケーター内で 1 時間放冷し精秤する。これを恒量に達するまで繰り返し、蒸発残留物の重量を測定する。

【実験3】 試料 0.5 ml を疎水性ペトリディッシュ上に滴下し、容器を密封し乾燥させた後に出現した析出物に対し、X線回析での成分分析を行う（分析装置：リガク製, SmartLab, X線発生部：対陰極 Cu, 出力 45 kV 200 mA, 走査条件：走査軸 $2\theta/\omega$, 走査モード：連続走査, 走査範囲：5~90°, ステップ幅：0.02°, 走査速度：2°/min）。

【実験4】 エクソソームの回収は試薬 [ExoQuick™ Exosome Precipitation Solution, Sstem Biosciences (SBI)] を用いて行い、回収後のエクソソームの粒子

サイズはナノ粒子解析装置を用いて測定する (HORI-BA nano partica SZ-100)。次に回収したエクソソームの成分分析を蛍光 X 線分析で行う。

【実験5】 血管石灰化粒子との関連が報告⁵⁾されている血清 BMP-2/BMP-7 ratio を調べ、これとエクソソーム単離後の CD63 濃度との関係を調べる。上記のエクソソーム回収用試薬は血清 250 μ l に対し試薬を 63 μ l 用いるが、試料と試薬の量比を保ち増量するとエクソソームの回収量が増加する。今回は、通常の 2 倍量と 3 倍量を用いて測定を行う。

3 結果

【実験1】 試料 0.5 ml における析出物の走査型電子顕微鏡による所見を図 1 (倍率 3000 倍) と図 2 (倍率

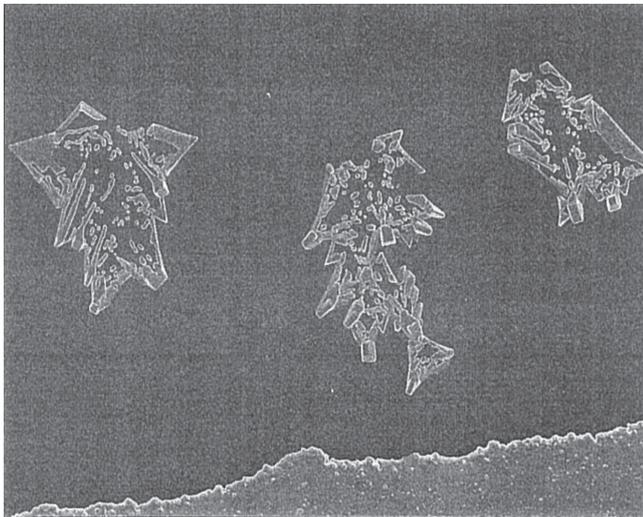


図 1 析出物 (試料 0.5 ml) の走査型電子顕微鏡所見
倍率 3000 倍

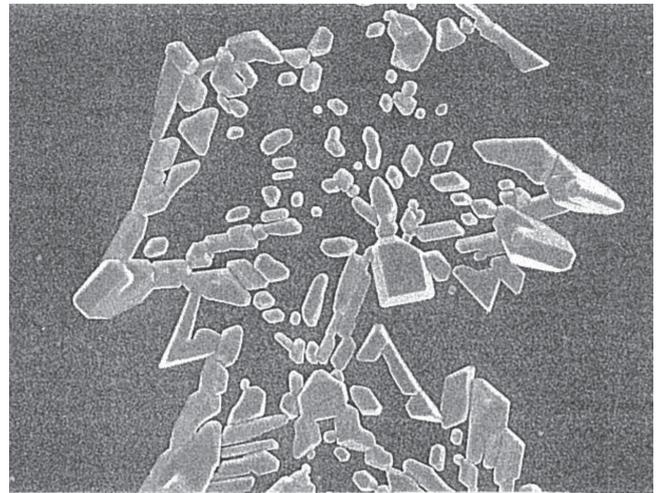


図 2 析出物 (試料 0.5 ml) の走査型電子顕微鏡所見
倍率 100,00 倍

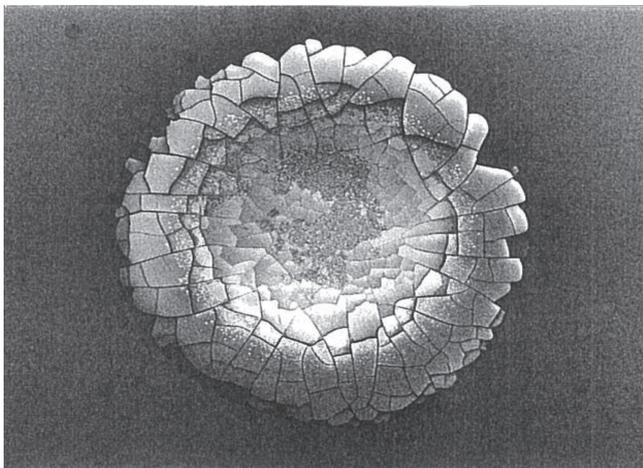


図 3 析出物 (試料 1.5 μ l) の走査型電子顕微鏡所見
倍率 30 倍

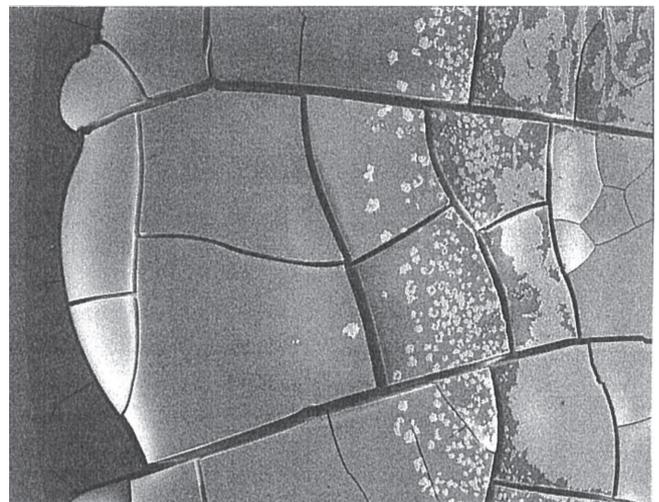


図 4 析出物 (試料 1.5 μ l) の走査型電子顕微鏡所見
倍率 200 倍

100,00倍)に示した。サイズ数百nm~数 μm の結晶と思われる粒子が観察された。次に、沈殿した粒子を高密度に回収するために、エッペンチューブ底面に限定し1.5 μl を回収し、この試料より出現した析出物を走査型電子顕微鏡にて観察した所見を図3(30倍)と

図4(200倍)に示した。マイクロレベルのサイズの析出物を認めた。

【実験2】 蒸発残留物の重量は84mg/gであった。

【実験3】 X線回析の結果を図5に示した。2 θ =31, 45, 56deg等に複数のピークが検出され、NaCl

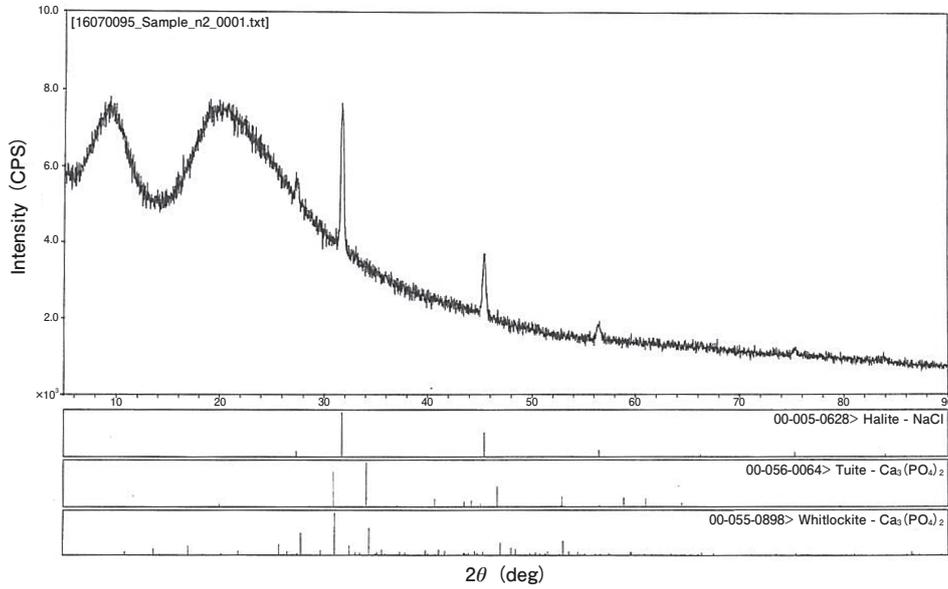


図5 析出物のX線回析による成分分析

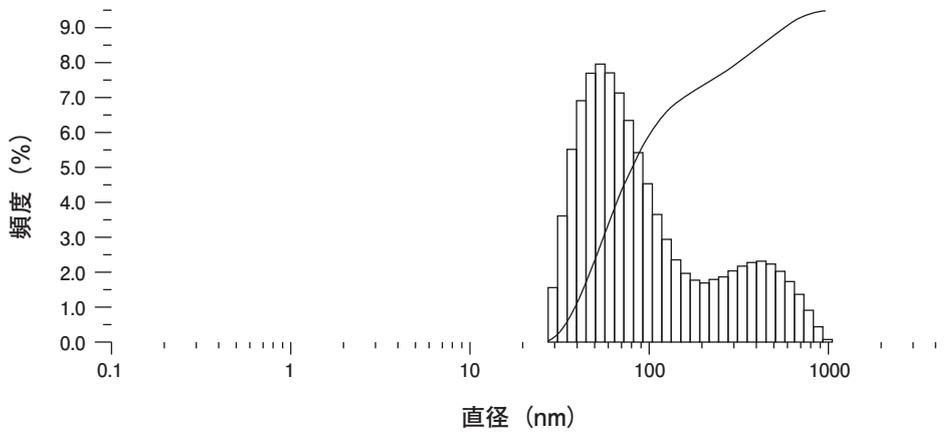


図6 粒子径分布

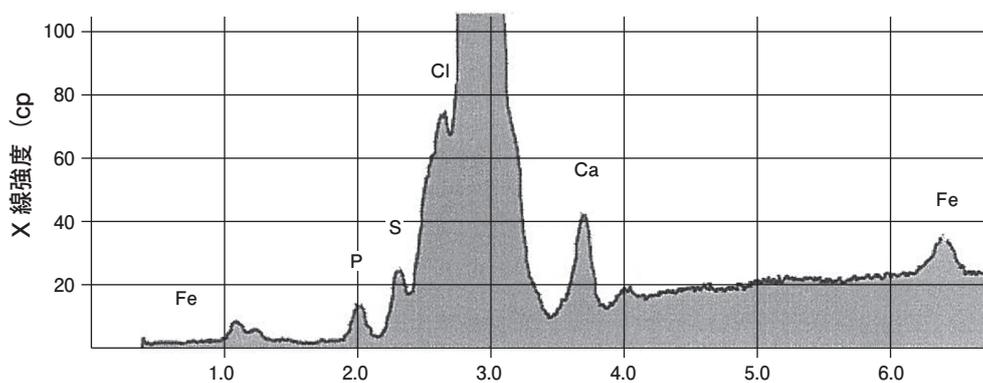


図7 蛍光X線分析による成分分析

に該当すると考えられた。リン酸カルシウムは本来、複数の組成および結晶構造を示すが、今回 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ の含有について調べたところ、ピークの検出を認めなかった。

【実験4】 回収後のエクソソームの粒子径分布（横軸は粒子径、縦軸は頻度）を図6に示した。粒子径は単一ピークは示さず、100 nm 以下にて分布を多く認め、D50 メジアン径は 75.4 nm であった。蛍光 X 線分析での成分分析の結果を図7に示した。カルシウム、リン、鉄、クロールの含有を認めた。

【実験5】 血清 BMP-2 濃度と血清 BMP-7 濃度は共に測定感度以下を示した。再検査を行ったが同様の結果であり、今回はデータの意義を見出せなかった。また、CD63 濃度の測定に関しては、試料2倍量と3倍量において、CD63 濃度を比較した。2倍量では $\text{CD63} : 12.2 \sim 66.4 \times 10^8$ であり、3倍量では $12.8 \sim 113 \times 10^8$ であった。通常3倍の試薬のほうが CD63 濃度は高値を示すと考えられるが、検体の半数にて低値を示した。

4 考察

本研究は、透析患者における血管石灰化粒子の特徴をより明らかにすることを目的とした。まず、実験3の成分分析の結果で NaCl を多く含んでいたが、その理由としては、微粒子に加え周囲の液体を一緒に回収していた可能性が考えられた。また、蒸発残留物の重量測定とは、液中への浮遊物や溶解物の総量が測定されるが、この実験においても微粒子に加え周囲の液体の蒸発成分を含んでいる可能性があり、血管石灰化粒子単独の重量測定ではない可能性が考えられた。以上より、固体成分（微粒子）の抽出には工夫が必要と考えられたため、方法について検討を行った。

本研究と同じ血管石灰化粒子（fetuin-A-containing calciprotein particles）をターゲットとした最近の研究報告では、高速遠心分離後の上清を丁寧に取り除き、バッファーにて慎重に数回洗浄を行い、これにより沈殿している微粒子の存在が明らかにされている⁶⁾。そのため、この前処理の方法は有効と考えられるため、今後採用したい。その他、血管石灰化粒子の抽出精度を高める方法について別の視点から検討を行い、エクソソームを回収して実験を行うこととした。

本研究の実験4におけるエクソソームのサイズ測定

の結果は、100 nm 以下での分布を多く認め、D50 メジアン径は 75.4 nm であった。この値はエクソソームのサイズ（直径 30~150 nm）の範疇にあり矛盾を認めていなかった。しかし、測定サイズに単一ピークを認めなかった点と、測定中の短時間でサイズ変動を認めやすかった点は、不純物の混在やエクソソームの崩壊によるサイズの不均一性を認めていた可能性が考えられた。また、エクソソーム回収にあたり、試料3倍量にて CD63 濃度は試料2倍量よりも高値を示すことが想定されるが、50% の検体では低値を認めていた。この点に関しても、純度の高いエクソソームの単離がなされていない可能性が考えられた。

現在、エクソソームの単離方法として、超遠心分離法、表面抗原に対する抗体を用いたアフィニティー法、ポリマー試薬による沈殿法などがあり、市販のキットも数種類が存在している。しかし、これらの回収効率や純度は異なっていることが指摘されている。

研究上、結合蛋白を含まない、かつエクソソームの崩壊のない高純度な検体を採用することが重要となるため、今後、単離の精度について評価を行うことが望ましい。

精度の判定に役立つ方法としては、透過型電子顕微鏡での観察があげられる。エクソソーム単離の精度が高い場合には膜に包まれた球状の粒子（直径 30~150 nm）が観察され、一方、エクソソームがダメージを受け破片などが混在したような精度が低い場合には、粒子の形状およびサイズの不均一性を認めることとなる。

今回の研究結果をさらに発展させるための手法案としては、エクソソーム内のカルシウムや fetuin-A の蛍光染色を施行し顕微鏡で観察を行い、透析患者と健常人における発現量を比較する方法があげられる。さらには、エクソソーム内のマイクロ RNA (miRNA) や構成分子（蛋白、脂質など）は疾患ごとに特徴が異なるため、腎不全患者におけるこれらの解明は、血管石灰化機構の新たな発見や関連物質の同定に役立つと考えられる。

結語

血管石灰化粒子の抽出方法として精度の高い方法は確立していない。しかし、この方法を確立することは定量化につながり、最終的には臨床的な病勢の判断、

将来的な治療効果の判定に役立つ可能性が高い。そのため、今回、透析患者における血管石灰化粒子の抽出を試み、その特徴をより明らかにすることを目的として研究を行い、粒子の抽出精度を高める方法として、エクソソームを回収してから分析する方法を試した。

本研究では、透析患者のエクソソームの成分分析ではカルシウム、リン、鉄、クロール等の含有を認めた。今後、透析患者と健常者においてエクソソームの成分分析を比較することやエクソソーム内のカルシウムや fetuin-A の蛍光染色を施行し顕微鏡で観察を行い、透析患者と健常人における発現量を比較する方法が有効と考えられる。さらには、エクソソーム内のマイクロ RNA (miRNA) や構成分子 (蛋白, 脂質など) は疾患ごとに特徴が異なるため、腎不全患者におけるこれらの解明は、血管石灰化機構の新たな発見や関連物質の同定に役立つと考えられる。

この研究は、平成 26 年度日本透析医会公募研究助成事業によって行われた。

文 献

- 1) 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* 2003; 278 : 13333-13341.

- 2) Herrmann M, Schäfer C, Heiss A, et al. : Clearance of fetuin-A-containing calciprotein particles is mediated by scavenger receptor-A. *Circ Res* 2012; 111 : 575-584.
- 3) Jahnen-Dechent W, Heiss A, Schäfer C, et al. : Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism. *Circ Res* 2011; 108 : 1494-1509.
- 4) Hamano T, Matsui I, Mikami S, et al. : Fetuin-mineral complex reflects extraosseous calcification stress in CKD. *J Am Soc Nephrol* 2010, 21 : 1998-2007.
- 5) 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* 2012, 27: 1957-1966.
- 6) Smith ER : The Isolation and Quantitation of Fetuin-A-Containing Calciprotein Particles from Biological Fluids. *Methods Mol Biol* 2016; 1397 : 221-240.
- 7) Kapustin AN, Chatrou ML, Drozdov I, et al. : Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circ Res* 2015, 116 : 1312-1323.

参考 URL

- ‡1) 「科学研究費助成事業 (科学研究費補助金) 研究成果報告書, 研究課題名: 石灰化をともなうナノ粒子の各種関節疾患発生への関与に関する研究 (平成 24 年 4 月 20 日)」 <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-21591950/>