

塩化ナトリウムとリン酸塩負荷による血管石灰化の相乗的促進機構に関する研究

山田俊輔

九州大学病院腎・高血圧・脳血管内科

key words : 塩化ナトリウム, リン酸, 血管石灰化, 慢性腎臓病

要 旨

血管石灰化は慢性腎臓病患者の心血管合併症の原因としてきわめて重要である。NaCl 負荷による腎臓・心血管系臓器への悪影響は広く知られているが、血管石灰化への影響はほとんど研究がなされていない。我々は慢性腎不全マウスに給餌する餌中の NaCl 量を調整し、NaCl の負荷量の多寡が血管石灰化に及ぼす影響を検討した。アデニン 0.2%、リン 1.2% 含有餌をベースに、餌中の NaCl 量が 0.2% と 0.5% の 2 種の餌をマウスに 8 週間給餌した。0.5% 含有餌群は、0.2% 含有餌群と比較して、大動脈石灰化がより高度であった。以上より、NaCl の食餌性負荷はアデニン腎症マウスの血管石灰化促進因子である可能性が示唆された。

1 緒 言

血管石灰化は慢性腎臓病 (CKD) 患者の心血管合併症の原因としてきわめて重要である¹⁾。透析患者の血管石灰化は、CKD に伴う骨ミネラル代謝異常との関係において特に研究されてきた^{2,3)}。これまでの研究の結果、リン負荷、カルシウム負荷、二次性副甲状腺機能亢進症などが血管石灰化を促進することが明らかになっている。中でもリンが血管石灰化に及ぼす影響は非常に甚大で、血管局所において血管平滑筋細胞を骨芽細胞様細胞へ変化させ、アポトーシスを誘導し、細胞外マトリックスを分解し、calciprotein の増加を促すことで、血管石灰化を相乗的かつ多面的に促進す

ることが明らかになっている^{4,5)}。このため、CKD 患者においてリン負荷を低減することが重要な治療戦略になると理解され、日常臨床で実践されてきた。実際、血液透析患者を対象にしたランダム化比較試験において、血清リン濃度を厳格に管理した群は通常のリン管理を行った群と比較して、冠動脈石灰化の進展は緩徐であった⁶⁾。しかし、この研究は、血清リン濃度を適切に管理できた場合においてさえも血管石灰化は進展することを実証したことにもなり、リン負荷の適切な管理だけでは血管石灰化の進展を阻止する治療戦略としては不十分であることが判明した。このため、血管石灰化の病態機序に関与しかつ日常臨床で介入可能な危険因子を同定することは非常に重要である。今回我々は、これまで血管石灰化領域ではあまり注目されてこなかった NaCl (塩化ナトリウム) 負荷量と血管石灰化の関係に着目した。

NaCl 負荷の腎臓・心血管臓器への悪影響は以前から広く知られている^{7,8)}。NaCl 負荷はレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系 (RAAS) を活性化し、高血圧、心肥大、腎不全を引き起こす^{7,8)}。これまでの研究結果に基づけば、NaCl 負荷は心血管疾患の発症と進展に深く関与し、血圧や RAAS の制御、NaCl 制限によってその発症と進展を制御できる可能性が基礎および臨床研究の成果によって明らかにされた⁹⁾。また、近年、アルドステロンの作用標的で、体液量調節において非常に重要な役割を担っているミネラルコルチコイド受容体を、rac1 GTPase が直接活性化することが報告された^{10,11)}。この rac1 GTPase は NaCl 負

荷でその活性が上昇することが知られている。しかし、NaCl 負荷が CKD に合併する血管石灰化の進展に影響するかどうかについてはほとんど研究がなされていない。

今回、我々は慢性腎不全マウスに給餌する餌中の NaCl 量を調整し、NaCl の負荷量が血管石灰化に及ぼす影響について検討した。

2 対象と方法

CKD の誘導方法として、ラットの CKD モデルとして既に確立されているアデニン腎症モデルを選択した。アデニン腎症モデルの現法は、0.75% のアデニンを含有した餌をラットに 4~8 週間程度給餌し、進行性の腎障害を惹起するモデルとして報告されており、ラットを用いた血管石灰化の研究手法として広く用いられている。一方、マウスへのアデニン腎症モデルの応用はようやく端緒に着いたばかりで、適正なアデニン含量についてはまだ確定していない。我々は、先に予備実験を行い、アデニン 0.3% の餌は高度の CKD を呈するためにマウスが衰弱死し、0.15% の餌では CKD の程度が軽微であったことを確認した。このため、本実験におけるアデニンの含有割合は 0.2% に設定した。普通餌は日本クレア社の CE-2 を使用した。今回の実験に用いる特殊餌として、アデニン 0.2%、カルシウム 1.0%、無機リン 1.2%、蛋白 9.5~19%、ラクトース 20% を餌のベースの組成に決定し、さらに①NaCl の含有割合が 0.2% の餌（低 Na 餌）と、②0.5% の餌（高 Na 餌）、の 2 種の特殊餌を作製した。

次に、雌性 C57/BL6 マウスに片腎摘出術を施し、術後 1 週間の時点で①普通餌（CE-2、クレア社）給餌群（n=8）、②低 NaCl 餌給餌群（n=5）、③高 NaCl 餌給餌群（n=8）、の 3 群に分け、餌の給餌を開始して 8 週の時点で安楽死させた。安楽死に際して、心臓から採血を行うとともに、腎臓、大腿骨、さらには大動脈を採取した。採取した血液を用いて、血液中のアルブミン濃度、クレアチニン濃度、カルシウム濃度、リン濃度を測定した。腎臓は Masson-Trichrome 染色で線維化の程度を判定的に評価した。腹部大動脈は von Kossa 染色と Alizarin-Red 染色を行って血管石灰化の有無および分布を確認した。また、大動脈弓部のサンプルを用いてカルシウム含量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ wet weight) を測定し、血管石灰化の定量方法とした。

また、NaCl の負荷による血管石灰化の促進作用は、リン過負荷の条件が必須であることを確認するために、16 匹の雌性 C57/BL6 マウスを①リン制限（無機リン 0.3%、アデニン 0.2%、NaCl 0.5%）の特殊餌給餌群と、②リン負荷（無機リン 1.2%、アデニン 0.2%、NaCl 0.5%）の特殊餌給餌群に、それぞれ 8 匹ずつ割り当て、給餌から 8 週間後に安楽死させ、血管石灰化を定量的に評価し、2 群間で比較した。

3 結果と考察

“普通餌給餌群”は、8 週間の観察期間において、腎機能は不変で、8 週の時点で大動脈へのカルシウム沈着は皆無であった。一方、0.2% アデニンを含有した餌を給餌した“低 NaCl 餌給餌群”と“高 NaCl 餌給餌群”は、血清クレアチニン濃度が進行性に上昇した。8 週で安楽死させたマウスの腎臓を組織学的に観察した場合、“普通餌給餌群”は Masson-Trichrome 染色で腎間質の線維化をほとんど認めず、他方、0.2% アデニンを含有した餌を給餌した“低 NaCl 餌給餌群”と“高 NaCl 餌給餌群”では、炎症細胞浸潤、尿細管萎縮、間質線維化を認め、またアデニン結晶の尿細管腔中および腎間質への沈着が確認され、血液検査で実証された腎障害を組織学的に確認した。以上のことから、今回用いたアデニン腎症マウスモデルは、8 週間の経過で、進行性の腎機能障害、血管石灰化の進行を呈することが明らかになった。

次に、NaCl の食餌性負荷量の違いが血管石灰化の程度に影響を与えるかどうかを確認するために、パラフィン包埋処理を施した大動脈切片の Alizarin-Red 染色を行った。“普通餌給餌群”は、大動脈切片におけるハイドロキシアパタイトの沈着を全く認めなかったが、“低 NaCl 餌給餌群”と“高 NaCl 餌給餌群”は赤橙色に染色されるハイドロキシアパタイトの大動脈中膜領域への沈着を認めた。興味深いことに、ハイドロキシアパタイトの沈着は、“高 NaCl 餌給餌群”の方が“低 NaCl 餌給餌群”よりもその沈着範囲は広範囲に及んでいた。血管石灰化を定量するために大動脈弓を室温で乾燥させ、6N の塩酸で一昼夜処理したのちに、塩酸中のカルシウム濃度および蛋白濃度を測定した結果、“高 NaCl 餌給餌群”の方が“低 NaCl 餌給餌群”と比較して、大動脈弓における単位重量あたりのカルシウム含量が有意に高値であった。この結果から、NaCl の

食餌性負荷はアデニン腎症マウスモデルにおける血管石灰化を促進することが示された。

最後に、NaCl負荷の血管石灰化への影響が、リン負荷量と独立しているかどうかを確認するために、“リン制限餌群”と“リン負荷餌群”の大動脈の石灰化の程度を比較した。“リン制限餌群”の大動脈弓にはハイドロキシアパタイトの沈着を全く認めなかったことから、NaCl負荷による血管石灰化促進作用は、リン負荷が同時に作用する必要があると推測された。

4 結論

本研究の結果、NaClの食餌性負荷はアデニン腎症マウスにおけるリン負荷を背景にした血管石灰化の進展を促進した。CKD患者における食塩摂取制限は、リン摂取制限同様、血管石灰化の進展を予防する上で非常に有効である可能性がある。今後、NaCl負荷がどのようなメカニズムでリン負荷による血管石灰化を増強するのか、その分子生物学的機序のさらなる解明が必要である。

本研究は、平成29年度の日本透析医会公募研究助成によって行われた。本研究は、今後、原著論文として英文雑誌に投稿することを予定しており、二重投稿を避けるため、本報告書ではその概要を総説的に記載した。

利益相反：本研究に関連して、筆頭著者は、令和元年度の日本腎臓財団腎不全病態研究助成および学術振興会の科学研究費助成事業の支援を受けているが、本研究の遂行および研究成果の発表に際してこれらの団体の影響を受けることはない。

文 献

- 1) Blacher J, Guerin AP, Pannier B, et al. : Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertension* 2001; 38 : 938-942.
- 2) Fukagawa M, Yokoyama K, Koiwa F, et al. : Clinical practice guideline for the management of chronic kidney disease-mineral and bone disorder. *Ther Apher Dial* 2013; 17 : 247-288.
- 3) Yamada S, Giachelli CM : Vascular calcification in CKD-MBD : Roles for phosphate, FGF23, and Klotho. *Bone* 2017; 100 : 87-93.
- 4) Paloian NJ, Giachelli CM : A current understanding of vascular calcification in CKD. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014; 307 : F891-F900.
- 5) Kuro-o M : Calciprotein particle (CPP) : a true culprit of phosphorus woes? *Nefrologia* 2014; 34 : 1-4.
- 6) Isaka Y, Fujii H, Tsujimoto Y, et al. : Rationale, design, and characteristics of a trial to evaluate the new phosphate iron-based binder sucroferric oxyhydroxide in dialysis patients with the goal of advancing the practice of E.B.M. (EPISODE). *Clin Exp Nephrol* 2018; 22 : 967-972.
- 7) Toyonaga J, Tsuruya K, Ikeda H, et al. : Spironolactone inhibits hyperglycemia-induced podocyte injury by attenuating ROS production. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26 : 2475-2484.
- 8) Eriguchi M, Tsuruya K, Haruyama N, et al. : Renal denervation has blood pressure-independent protective effects on kidney and heart in a rat model of chronic kidney disease. *Kidney Int* 2015; 87 : 116-127.
- 9) Nagase M : Activation of the aldosterone/mineralocorticoid receptor system in chronic kidney disease and metabolic syndrome. *Clin Exp Nephrol* 2010; 14 : 303-314.
- 10) Shibata S, Nagase M, Yoshida S, et al. : Modification of mineralocorticoid receptor function by Rac1 GTPase : implication in proteinuric kidney disease. *Nat Med* 2008; 14 : 1370-1376.
- 11) Kawarazaki W, Nagase M, Yoshida S, et al. : Angiotensin II- and salt-induced kidney injury through Rac1-mediated mineralocorticoid receptor activation. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23 : 997-1007.