

論文内容の要旨

高リン血症に合併した骨・ミネラル代謝異常を呈する
新規慢性腎臓病モデルマウスの確立

日本医科大学大学院医学研究科 腎臓内科学分野

大学院生 谷 崇

Scientific Reports 7 巻 2233 番 doi:10.1038/s41598-017-02351-6 (2017) 掲載

【背景・目的】

血管中膜石灰化 (medial artery calcification; MAC) はメンケベルグ型石灰化としても知られ、慢性腎臓病 (CKD) に頻度の高い骨ミネラル合併症 (mineral bone disease; MBD) である。MAC は動脈血管壁の弾性力低下から左室肥大、冠動脈還流血液量の低下、心不全等を引き起こし、透析患者の高い心血管病合併率、死亡率に寄与していると考えられている。MAC の合併率は腎不全の進行とともに増加し、その発症には様々な尿毒素がリスク因子になるとされているが、特に高リン血症との相関は数多く報告されている。血管中膜の血管平滑筋細胞 (VSMC) は、高リン環境などの刺激により骨芽細胞様の性質を獲得 (形質転換) するとされ、MAC の発症には正常造骨機序の様な能動的な石灰化機構が働くと報告されている。

MAC を呈するマウス実験モデルは複数報告があるが、遺伝子改変マウス、外科手術など費用や設備面で制限があるものが多い。アデニン負荷腎不全モデルは代謝物のジヒドロキシアデニンが尿細管で結晶化して炎症・閉塞を惹起して腎不全を呈し、ラットではアデニン負荷のみで高リン血症と血管石灰化の合併が報告されている。一方で、マウス、特に C57BL/6J 系統は石灰化の忍容性が高くアデニンの負荷のみでは MAC を合併しないことが知られている。

そこで、我々はアデニン負荷により CKD-MBD の病態を呈し、これらの既存疾患動物モデルの短所を補完する腎不全モデルマウスの確立を本研究の目的とした。

【方法】

35 匹の 8 週令の C57BL/6J マウスを無作為に以下の 7 グループに分類した (各群 n=5)。Control 群：アデニン非含有/0.8%リン含有の通常の食餌を 6, 12 週間投与したものをそれぞれ C6, C12 群とした。CKD-正常リン (CKD-NP) 群：0.2%アデニン/0.8%リン含有食を 6 週間負荷したものを A6 群、12 週間負荷したものを A12 群とした。CKD-高リン (CKD-HP) 群：0.2%アデニン/0.8%リン含有食を 6 週間負荷して腎不全に至らしめた後、0.2%アデニン/1.8%リン含有食による高リン含有食負荷を 2, 4, 6 週行ったものをそれぞれ A6P2 群, A6P4 群, A6P6 群とした。実験終了時に 24 時間蓄尿検査と動物用 CT 検査を施行し、屠殺時には血液、大動脈、腎臓、大腿骨を採取した。

血中または尿中のリン、カルシウム、尿素窒素、クレアチニン濃度は自動解析器で測定し、副甲状腺ホルモン及び FGF-23 濃度の測定は ELISA キットを用いた。大動脈は各マウス毎に同じ部位を病理組織標本、組織中カルシウム濃度定量 (OCPC 法)、リアルタイム PCR 法による mRNA 発現量の解析に用いた。大動脈、腎臓、大腿骨はホルマリン固定の後、各標準的手法を用いて染色し、組織標本を作製した。

【結果】

CKD-NP 群と CKD-HP 群では腎病理組織に於いて強い炎症細胞の浸潤を伴う尿細管障害

像を呈していた。また、両群は Control 群に比し顕著に血清尿素窒素・クレアチニンが上昇し、特に CKD-NP 群でその傾向が顕著であった。CKD-NP 群では Control 群に比し有意な血清リン値の上昇は認めない一方、CKD-HP 群の血清リン値は CKD-NP 群と Control 群に対して約 1.4~2.8 倍上昇していた。

血管病理組織において、CKD-HP 群では Von Kossa 染色、Alizalin Red 染色陽性の血管中膜石灰化を認め、動物用 CT 画像でも CKD-HP 群の大動脈弓と腹部大動脈を中心に MAC を認めた。一方、これらの所見は CKD-NP 群と Control 群では認めなかった。さらに、CT 画像上に於ける MAC の体積 (mm³) 及び組織標本上の石灰化面積の比率 (%) は高リン食負荷期間の長さに比例して増加した。また、CKD-HP 群は Control 群と CKD-NP 群に対し Runx2, Osteopontin, 組織非特異型アルカリフォスファターゼ (TNAP) の mRNA 発現量が増加を認めた。一方、Pit-1 と Pit-2 は A6P2 群でのみ有意に mRNA 発現量増加を認めた。

大腿骨遠位端の骨 CT 画像解析では、CKD-HP 群は Control 群と CKD-NP 群に対して皮質骨密度、皮質骨塩量が有意に減少していた。骨病理組織に於いても骨梁構造の疎な傾向は全ての CKD 群で認めたが、CKD-HP 群では特に皮質骨の菲薄化が目立った。

【考察・結論】

CKD 群の中でも血清リンの上昇した CKD-HP 群でのみ MAC を認め、且つ時間依存的に MAC が悪化したことは、多くの尿毒素の中でもリンが血管石灰化に強く与える影響を示唆した。一方、VSMC の骨芽細胞様形質転換に於ける転写因子である Runx2, 骨芽細胞のマーカである TNAP が CKD-HP 群の大動脈壁に於いて発現上昇したことは、MAC の発症と VSMC の形質転換との関連を示唆した。また、A6P2 群に於けるリン酸トランスポーターの Pit1, Pit2 の発現上昇は、過剰な細胞内リン流入を介し石灰化形成に寄与した可能性がある。CKD-HP 群では骨皮質でより強い骨密度低下を認め、CKD-NP 群に比し腎性骨症が重度であった。これは高リン負荷に伴う続発性副甲状腺機能亢進症とそれによる高回転型骨粗鬆症の悪化によって説明可能と考えられた。

我々が新規に確立した CKD モデルマウスはヒトにおける CKD-MBD の病態を良く反映し、比較的平易に作成可能なことから、遺伝子改変等の特殊な動物での検証にも適用可能と考えられた。また、他の CKD 動物モデルと比較して個体差が少なく、動物 CT 画像と血管病理組織を用いて MAC の半定量的評価が可能なことから、新規治療薬の効果判定を目的とした実験などへの応用も期待される。