

## Fetuin-A containing calciprotein particles (CPP) によるアルブミン発現に与える影響について (透析患者の PEW、MIA 症候群の病態解明を目指して)

大阪公立大学大学院医学研究科 代謝内分泌病態内科学  
上殿 英記

### 1. 諸言

近年、慢性腎臓病 (CKD) 患者数は右肩あがりに上昇しており、現在約 1,300 万人の CKD 患者が存在する。これら CKD 患者における骨ミネラル代謝異常 (CKD-MBD) は、過剰なリン (P)・カルシウム (Ca) 負荷を引き起こして血管石灰化を促進し、最終的には生命予後の悪化につながっている。Fetuin-A は肝で合成され、分泌される約 60kDa の多機能糖蛋白質であるが、CKD-MBD の病態においては血管石灰化抑制作用を有している点が注目されている。血中に分泌された fetuin-A は、過剰な Ca,P 負荷に対して血中で calciprotein particles (CPP) というコロイド粒子を形成することにより、異所性・血管石灰化を抑制する。実際、fetuin-A をノックアウトしたマウスでは異所性石灰化を引き起こし<sup>1)</sup>、透析患者において fetuin-A 低値群では高値群と比較して血管石灰化が進展し、有意に生命予後が不良であることが報告されている<sup>2)</sup>。上記の通り、石灰化抑制の結果の産物である CPP であるが、近年この CPP が全身で慢性炎症、細胞傷害を引き起こし、さまざまな老化現象に関与しているという CPP 病原体説が提唱されている。具体的には、CPP がマクロファージを活性化して TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカインを誘導し<sup>3)</sup>、CKD 患者において血中 CPP 濃度には、脈波伝播速度 (PWV) で測定した大動脈 stiffness との相関関係を認めている<sup>4)</sup>。一方、維持透析患者において、低アルブミン (alb) 血症は生命予後に対する独立した危険因子であり<sup>5)</sup>、血液透析患者においては低栄養と炎症は互いに関係しており、食欲不振、筋力量減少および低 alb 血症を引き起こすと考えられている。さらに、ラットの単離肝細胞において IL-6、TNF- $\alpha$  は濃度依存的に alb 分泌を阻害することが報告されている<sup>6)</sup>。

われわれは以前より、CKD 病態における fetuin-A、CPP、血清石灰化傾向 (T50 : Primary CPP から Secondary CPP が形成されるのに要する時間) に関してさまざまな検討を行ってきた。尿毒症毒素の一つであるインドキシル硫酸が肝の fetuin-A 発現を抑制することを報告し、CKD 患者の予後悪化に関与する可能性を示した<sup>7)</sup>。また、石灰化ストレスに対して低下する血中 fetuin-A に対し、鏡面的に増加する CPP が、翻訳後修飾を介して肝での fetuin-

A 発現を増加させる **positive feedback** 機構の機序について報告した<sup>8)</sup>。さらに、二次性副甲状腺機能亢進症を有する血液透析患者を対象にカルシウム受容体作動薬（カルシミメティクス）治療群と活性型ビタミンD製剤（VDRA）治療群にランダム割り付けし、T50の変化量をプライマリーエンドポイントとして検証した VICTORY 試験において、カルシミメティクスは VDRA と比較して高い T50 延長（石灰化ストレス軽減）効果を認めている<sup>9)</sup>。次なる検討課題として、CPP が炎症性サイトカインの誘導を介して alb 分泌を低下させ、透析患者における PEW（protein-energy wasting：蛋白・エネルギー消費状態）、MIA 症候群（Malnutrition、Inflammation、Atherosclerosis：栄養障害、慢性炎症状態、動脈硬化）の病態に関与しているのではないかという仮説を立てて検討を行った。

## 2.方法

まず、*in vitro* で既報通りに bovine の fetuin-A を使用して CPP を合成した<sup>4)</sup>。Human 由来の培養肝細胞である HepG2 細胞に対して合成 CPP の添加を行い、alb の遺伝子発現や蛋白発現の変化を確認した。さらに、CPP による alb 分泌低下と炎症性サイトカインとの関連性や、その他の受容体を介した alb 分泌低下の可能性を含めた機序の解明を行う。

また、野生型マウスを用いて、右腎動脈の完全結紮と左腎動脈の2分枝のうち1分枝結紮により 3/4 腎摘とした腎不全モデルを作成した。alb に対する CPP の役割を検討するため、野生型マウスと腎不全モデルマウスを炭酸ガスにより安楽死させた後、血中 CPP 濃度や、臓器摘出後の遺伝子学的検査を行い、CPP を介した alb の影響について検討する。

## 3.結果

Human 由来の培養肝細胞である HepG2 細胞に対して合成 CPP の添加を行ったところ、CPP は濃度依存的（10~200 µg/mL）に alb の遺伝子発現を低下させた。また、200 µg/mL の CPP の添加により経時的にも alb の遺伝子発現を低下させ（図 1）、さらに濃度依存的（10~200 µg/mL）な alb の蛋白発現低下も確認した（図 2）。さらに、medium 中の蛋白分泌も CPP 500 µg/mL にて低下を認めた。CPP が TLR4 の agonist であることが既報から明らかになっていたため<sup>3)</sup>、検討を行ったが、今回の alb 発現低下に TLR4 が関与していることには否定的な結果であった。現在、その他のシグナルカスケードについて検討中である。

続いて *in vivo* での実験に関して検討を行った。さまざまな条件下で検討した結果、腎動脈結紮の上で、高 P 食で 8 週後、絶食にて評価を行った場合に、もっとも野生型マウスと腎不全モデルマウスの P 濃度に差を認めた。しかし、CPP 濃度に関して傾向はあるものの、有意差を認めなかった（図 3）。こちらについては現在も条件検討を続けており、今後高 CPP 腎不全モデルを完成させて alb の分泌低下を含めて検討を行いたいと考えている。

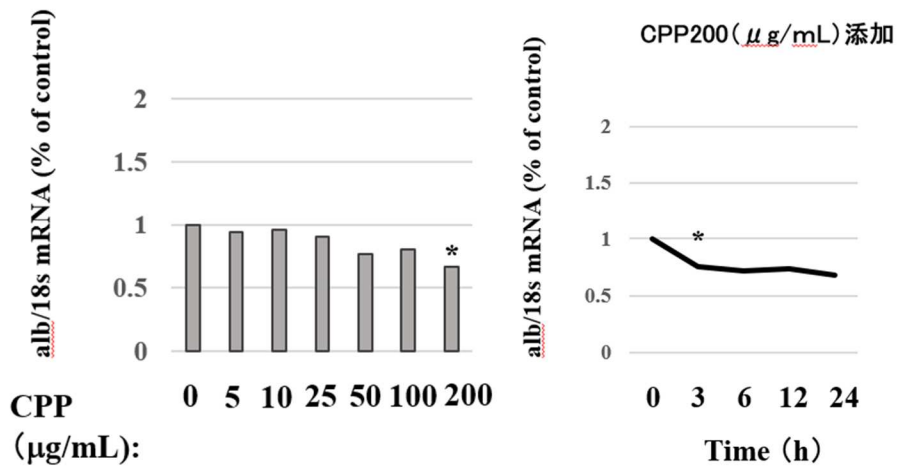


図1 培養幹細胞における CPP 添加の alb 発現に対する影響

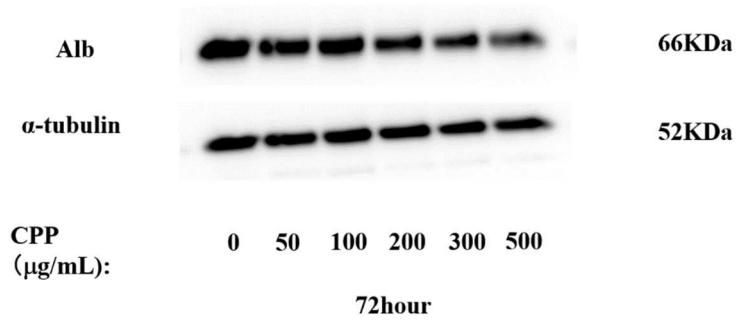


図2 培養幹細胞における CPP 添加の alb 蛋白発現に対する影響

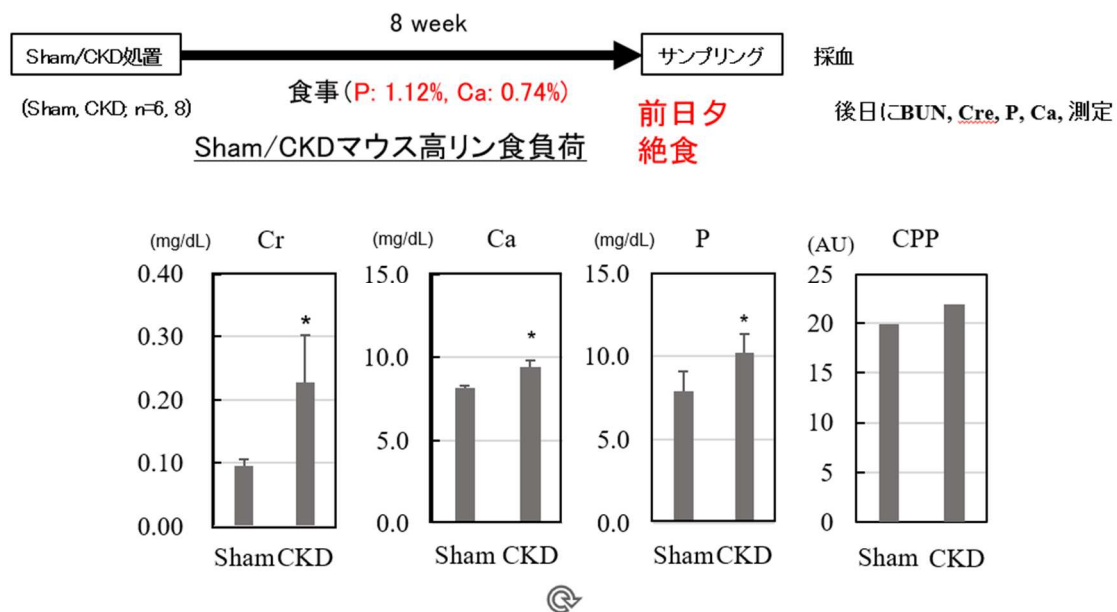


図3 腎動脈結紮+高P食(8週)+絶食後採血による腎不全モデル

#### 4.考察

HepG2細胞において、CPPがalbの発現・分泌を低下させることが示された。この現象は炎症性のサイトカインを介したものではないかと考え、既報のとおりTLR4やIL-6などの経路につき検討を行ったが、これらの関与については否定的な結果であった。現在、alb発現に直接関与する他のシグナルカスケードにつき検討中である。

また、in vivoでの高P、高CPP腎不全モデルマウスの作成に関しては、最初の条件から食餌のCa/P比率、絶食の有無などの条件を変更することによって高CPP、高PモデルCKDマウスに近づいてきており、現在最終的な条件を設定している段階である。

#### 5.結語

低alb血症を惹起する要因の一つとしてのCPPの関与を解明することは、今後の透析患者のPEW・MIA症候群に対するアプローチを変化させる可能性があり、新規の治療介入につながることを期待される。

#### 6.文献

- 1) Schafer C, Heiss A, Schwarz A, Westenfeld R, Ketteler M, Floege J, et al. The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. J Clin Invest. 2003; 112(3): 357-66.

- 2) Ketteler M, Bongartz P, Westenfeld R, Wildberger JE, Mahnken AH, Böhm R, et al. Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet*. 2003; 361(8): 827-33.
- 3) Smith ER, Hanssen E, McMahon LP, Holt SG et al. Fetuin-A-containing calciprotein particles reduce mineral stress in the macrophage. *PLoS One*. 2013; 8(4): e60904.
- 4) Smith ER, Ford ML, Tomlinson LA, Rajkumar C, McMahon LP, Holt SG 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(5): 1957-66.
- 5) Leavey SF, Strawderman RL, Jones CA, Port FK, Held PJ et al. Simple nutritional indicators as independent predictors of mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 1998; 31(6): 997-1006.
- 6) Odamaki M, Kato A, Kumagai H, Hishida A et al. Counter-regulatory effects of procalcitonin and indoxyl sulphate on net albumin secretion by cultured rat hepatocytes. *Nephrol Dial Transplant*. 2004; 19(4): 797-804.
- 7) Ochi A, Mori K, Nakatani S, Emoto M, Morioka T, Motoyama K, et al. Indoxyl sulfate suppresses hepatic fetuin-A expression via the aryl hydrocarbon receptor in HepG2 cells. *Nephrol Dial Transplant*. 2015; 30(10): 1683-92.
- 8) Uedono H, Mori K, Ochi A, Nakatani S, Miki Y, Tsuda A, et al. Effects of fetuin-A-containing calciprotein particles on posttranslational modifications of fetuin-A in HepG2 cells. *Sci Rep*. 2021; 11(1): 7486.
- 9) Shoji T, Nakatani S, Kabata D, Mori K, Shintani A, Yoshida H, et al. Comparative Effects of Etelcalcetide and Maxacalcitol on Serum Calcification Propensity in Secondary Hyperparathyroidism: A Randomized Clinical Trial. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2021; 16(4): 599-612.