

## 187. 新規局所石灰化因子の同定と作用機序の解明

柳沢 裕美

\*筑波大学 生命領域学際研究センター

Key words : 細胞外基質, 腎石灰化, 腎線維化, 慢性腎臓病

### 緒言

我が国の慢性腎臓病患者はすでに 1,300 万人を越えており、透析患者は 32 万人にのぼる。透析による維持療法は患者の生活の質的低下と国家の経済的負担を大きくしている。従って、腎機能の低下を阻止し、透析導入を防ぐための有効な薬物療法の開発が必要である。慢性腎臓病の治療において、血管壁や腎尿細管の病的石灰化を制御することは、その予後をコントロールする上できわめて重要である。これまでに石灰化を制御する因子として、リン・カルシウム代謝 (PTH、FGF23、ビタミン D3)、腎臓でのリン再吸収 (Klotho、Napi2a)、石灰化阻害因子 (MGP、Fetuin-A) の関与や、血管平滑筋細胞や腎尿細管細胞から骨芽細胞への分化、アポトーシス、炎症細胞の局所浸潤などが報告されている [1]。しかし組織でリン酸カルシウムの沈着を促進する「局所石灰化因子」の全貌は、未だ明らかにされていない。筆者らは、成体マウスの腎臓に高発現しヘパリン結合性を有する細胞外基質 *fibulin-7* に着目し [2]、その生化学的解析に従事してきた。本研究は、その *fibulin-7* の組織石灰化における役割を、筆者らが独自に作製した *fibulin-7* 欠損マウスを用いて解析し、新たな石灰化療法の開発への基盤を確立することを目指すものである。

### 方法

#### 1. 高リン負荷による腎石灰化誘導

4 週齢のオス野生型および *fibulin-7* 欠損マウス (*Fbln7* KO) (n = 6~8 /グループ) を用いて、普通食 (0.35 % リン、0.6 % カルシウム) もしくは、高リン食 (2 % リン、0.6 % カルシウム) による負荷を 4 週間行った。

#### 2. 代謝および腎石灰化病変の解析

メタボリックケージを用いて、高リン負荷中のマウスの食餌摂取量、飲水量、尿量、体重あたりのカルシウムおよびリンの尿排出量を測定した。また、血中の腎機能 (BUN、クレアチニン、アルブミン)、カルシウムとリンを測定した。腎臓を採取し、組織学的診断 (HE 染色、Masson-Trichrome 染色、Von Kossa 染色、Picrosirius Red 染色)・画像診断 (マイクロ CT)・分子生物学的診断 (qPCR) により、石灰化病変を解析した。

### 結果および考察

#### 1. 高リン負荷による代謝の変化

図 1 に示すように、野生型と *Fbln7* KO は、普通食 (ND) でも高リン食 (HP) でも食餌摂取量には差はなかったが、どちらのマウスも高リン食により飲水量と尿量、24 時間あたりのリンの尿排出量が増加した。逆に、24 時間のカルシウム排出量は低下した。

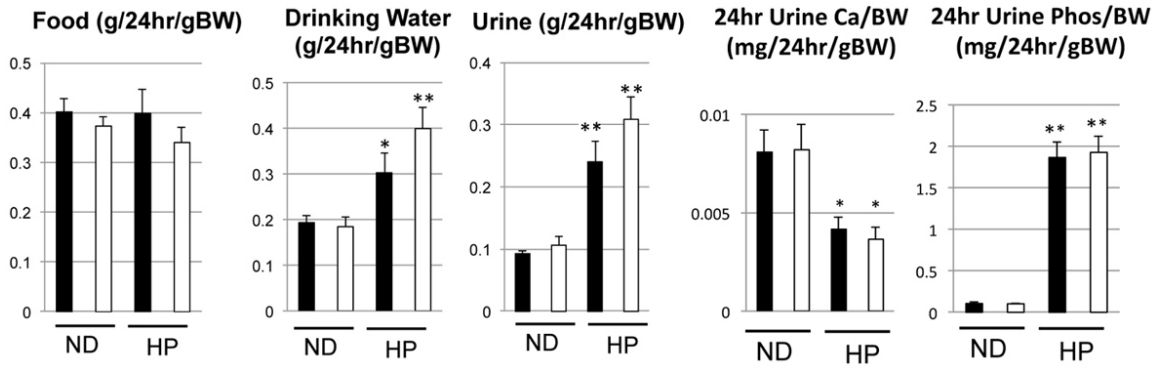


図1. メタボリックケージによる解析

普通食 (ND) と高リン食 (HP) で、野生型 (*Fbln7*<sup>+/+</sup>) と *Fbln7* KO (*Fbln7*<sup>-/-</sup>) を比較検討した。  
n = 8、\*p < 0.05、\*\*p < 0.01 : HP vs ND、t 検定。黒グラフ (野生型)、白グラフ (*Fbln7*<sup>-/-</sup>)。

さらに腎機能を調べたところ、図2に示すように、血中尿素 (BUN) は野生型、*Fbln7* KO とともに普通食と比べて低下していたが、*Fbln7* KO の方が野生型と比べて有意に高かった。逆に血中クレアチニン (Cre) は普通食でも高リン食でも差はなかったが、野生型と比べて *Fbln7* KO の値が明らかに低値を示していた。血中リンは、高リン食によって野生型、*Fbln7* KO とともに上昇したが、両者に差は認められなかった。血中カルシウムは逆に高リン食によって低下したが、野生型、*Fbln7* KO 間で変化はなかった。血中アルブミンは高リン食による変化は見られなかった。以上から、野生型と *Fbln7* KO において、カルシウムやリン代謝に大きな差は認められなかった。

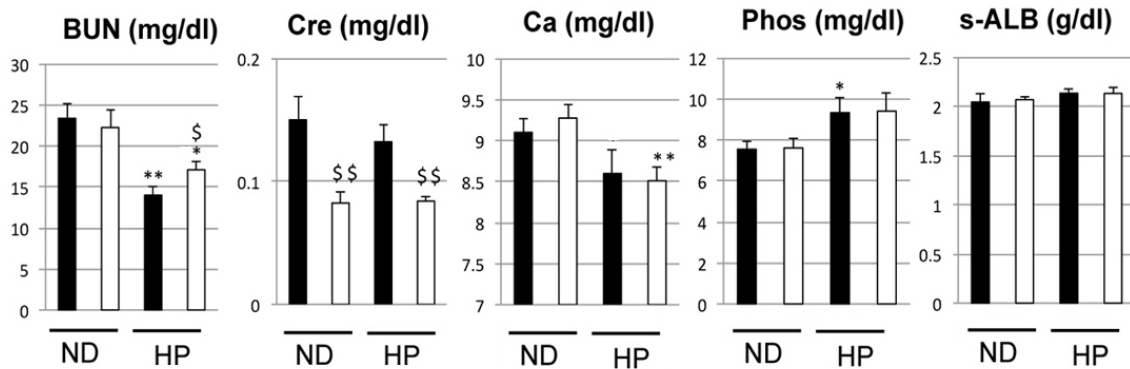


図2. 腎機能およびカルシウム・リン血中濃度の比較

n = 8、黒グラフ (野生型)、白グラフ (*Fbln7*<sup>-/-</sup>)。

\*p < 0.05、\*\*p < 0.01 : HP vs ND、\$p < 0.05、\$\$p < 0.01 : *Fbln7*<sup>+/+</sup> vs *Fbln7*<sup>-/-</sup>、t 検定。

## 2. 腎石灰化病変の解析

### (1) 組織学的解析

*Fbln7* KO の腎臓や腎盂、尿管などに奇形や変形などの異常は認められなかった。高リン食後の腎臓の組織像では、Masson-Trichrome 染色と Picrosirius Red 染色から *Fbln7* KO では明らかに線維化が減少していることがわかった (図 3b と f、図 3c と g、左のグラフ)。また、Von Kossa 陽性の石灰化の病変も、*Fbln7* KO では明らかに少ないことがわかった (図 3d と h、右のグラフ)。以上より、*Fbln7* KO では高リン負荷に対して石灰化が抑制されていることがわかった。また、カルシウムの沈着に伴う二次的な線維化も明らかに減少していることがわかった。

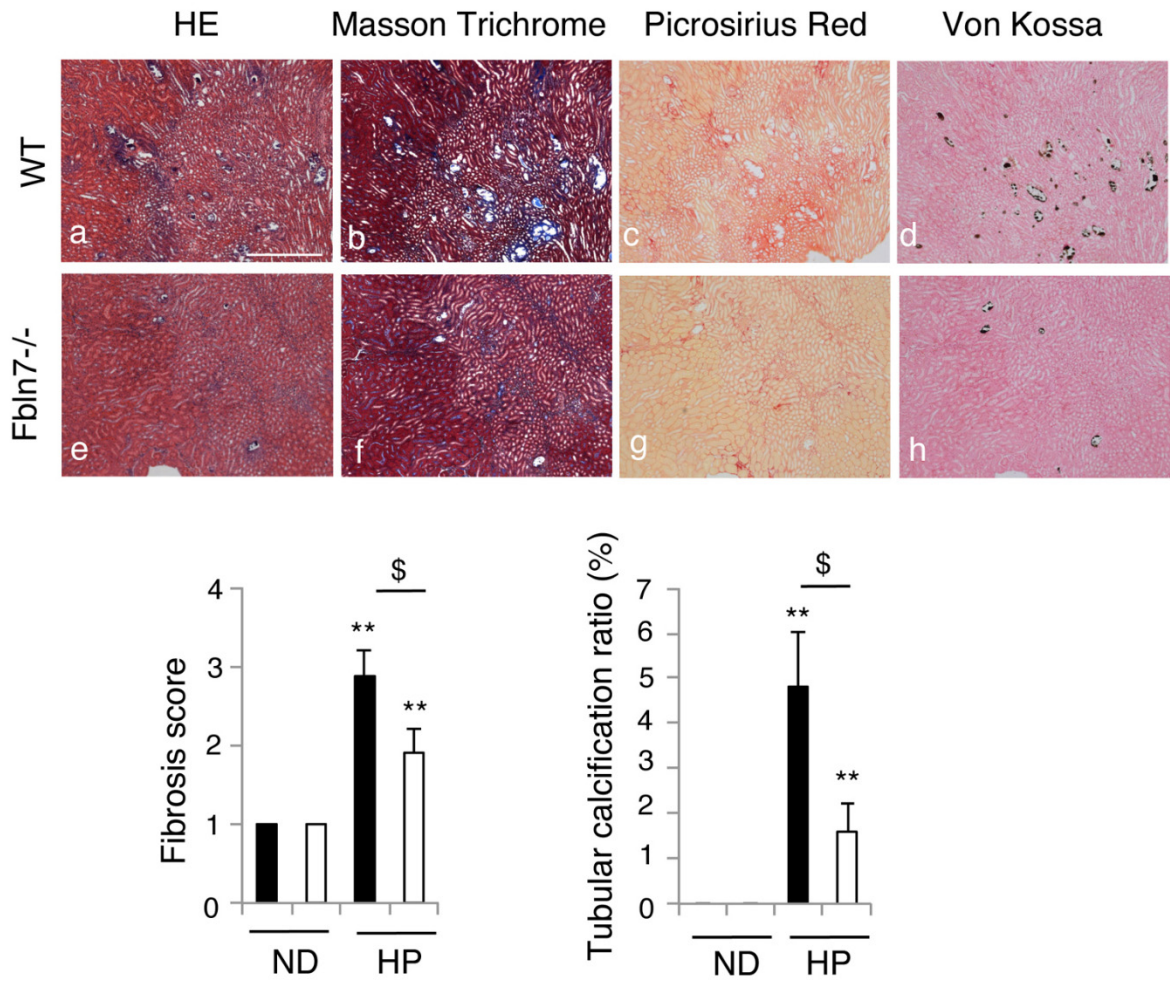


図3. 高リン負荷後の腎臓の組織学的解析

HE 染色 (a, e)、Masson-Trichrome 染色 (b, f)、Picrosirius Red 染色 (c, g)、VonKossa 染色 (d, h) を施した高リン負荷後の腎臓組織像。Scale bar = 500  $\mu$ m。下段のグラフは、Picrosirius Red 染色に基づく線維化指標 (左) と Von Kossa 染色に基づく石灰化指標 (右)。黒グラフ (野生型)、白グラフ (*Fbln7*<sup>-/-</sup>)。\*\* $p < 0.01$  : HP vs ND、\$ $p < 0.05$  : *Fbln7*<sup>+/+</sup> vs *Fbln7*<sup>-/-</sup>、t 検定。

## (2) マイクロ CT による石灰化の解析

普通食の *Fbln7*KO、高リン食の野生型および *Fbln7*KO の腎臓を採取してマイクロ CT を用いて石灰化を観察した。図4に示すように、普通食の *Fbln7*KO の腎臓には石灰化が認められなかった。高リン食では、野生型では腎髄質と腎皮質の間に石灰化が明瞭に観察されたが、*Fbln7*KO では石灰化が減少していた。

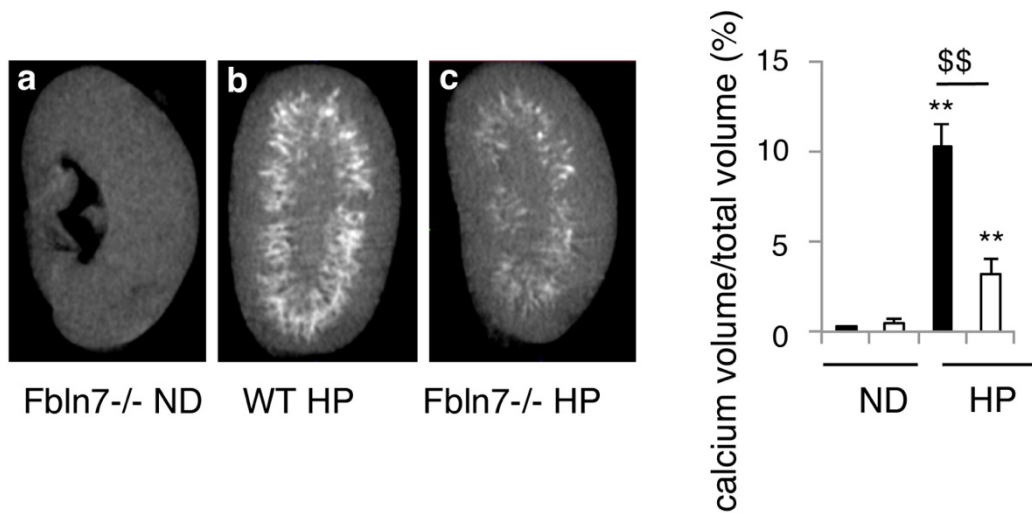


図4. 腎臓のマイクロCTによる石灰化解析

マイクロCT画像(a, b, c)と定量化をグラフに示す。黒グラフ(野生型)、白グラフ(*Fbln7*<sup>-/-</sup>)。

\*\*p < 0.01: HP vs ND, §§p < 0.01: *Fbln7*<sup>+/+</sup> vs *Fbln7*<sup>-/-</sup>, t検定。

### (3) qPCRによる炎症マーカーおよび線維化マーカーの解析

図5に示すように、野生型では炎症指標であるIL1beta、TNFalpha、MCP1、MMP3が増加していた。*Fbln7*KOでも、IL1beta、MCP1、MMP3の発現が普通食と比べると増加していたが、その度合いは、野生型と比べて、IL1betaとMMP3で有意に低かった。また、MCP1とTNFalphaは低い傾向にあった。興味深いことに、尿管障害の指標となるKIM1が高リン食により増加するが、*Fbln7*KOでは野生型と比べて有意に低いことがわかった。

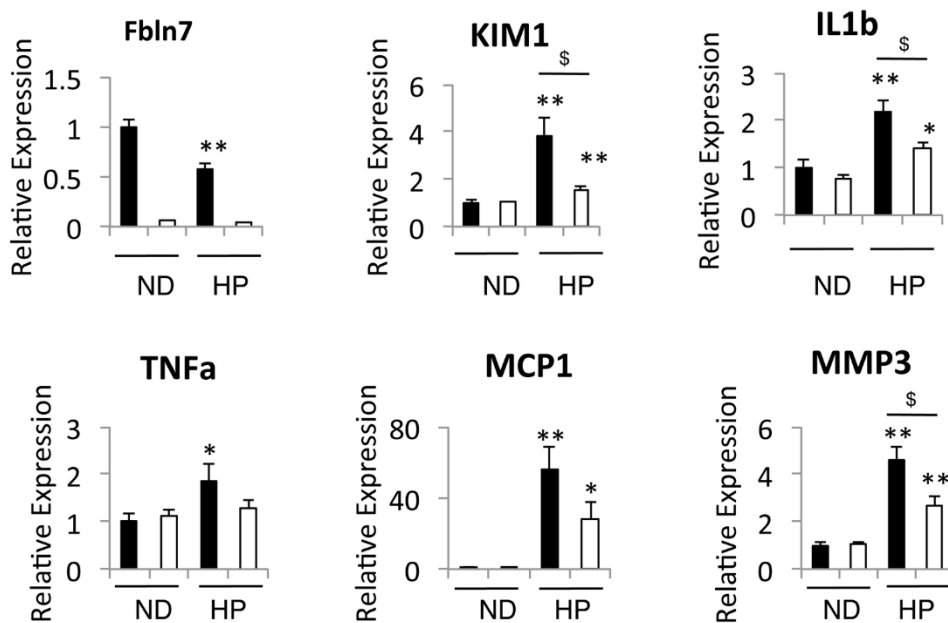


図5. 腎臓qPCRによる炎症マーカーの発現解析

\*p < 0.05, \*\*p < 0.01: HP vs ND, §p < 0.05: *Fbln7*<sup>+/+</sup> vs *Fbln7*<sup>-/-</sup>, t検定。

## 考 察

以上の結果から、*Fbln7* KO マウスの腎臓では、高リン負荷による腎石灰化があきらかに軽減していることがわかった。腎石灰化に伴う炎症性サイトカインの産生が低下していることと、全身のカルシウムーリン代謝は影響を受けていないことから、*Fbln7* KO の腎保護作用は局所の抗石灰化作用によるものと考えられた。その結果として、腎線維化も二次的に抑えられたものと考えられる [3]。

*Fibulin-7* はヘパリン結合能を有する腎尿細管細胞に局在する細胞外基質である。我々の最近の実験から、石灰化のトリガーとなる *Calcioprotein particle* と結合することがわかってきた [3]。従って、腎尿細管細胞膜上のヘパラン硫酸プロテオグリカン等と結合し、*Calcioprotein particle* をトラップすることによって石灰化を促進している可能性が考えられた。今後、*Fibulin-7* を除去することで腎石灰化を防ぎ、腎機能低下を抑えることができる可能性が示唆された。今後の課題として、*fibulin-7* が腎尿細管に局在するメカニズムを明らかにし、*fibulin-7* と細胞との結合を阻止する低分子化合物や抗体を開発していくことで、慢性腎臓病をコントロールすることが可能と考えられた。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京女子医科大学第四内科杉浦秀和、およびテキサス大学サウスウエスタン医学センター常住淳である。

## 文 献

- 1) Kuro-o M. Klotho, phosphate and FGF23 in ageing and disturbed mineral metabolism. *Nat Rev Nephrol.*2013 Nov;9(11):650-60. doi: 10.1038/nrneph.2013.111. PMID: 233774819
- 2) de Vega S, Iwamoto T, Nakamura T, Hozumi K, McKnight DA, Fisher LW, Fukumoto S, Yamada Y. TM14 is a new member of the fibulin family (fibulin-7) that interacts with extracellular matrix molecules and active for cell binding. *J Biol Chem.* 2007 Oct 19;282(42):30878-88. PMID: 17699513
- 3) Tsunozumi J, Sugiura H, Oinam L, Ali A., Thang BQ, Sada A, Yamashiro Y, Kuro-o M, and Yanagisawa H: *Matrix Biology.*2018 May 3. pii: S0945-053X(18)30053-2. doi: 10.1016/j.matbio.2018.04.014. [Epub ahead of print]