

The effect of Lanthanum carbonate on Calciprotein
particles in Hemodialysis patients

(血液透析患者でのCalciprotein particlesに対する炭酸
ランタンの影響)

中村公彦

山口大学大学院医学系研究科

情報解析医学系専攻 上皮情報解析医学領域

泌尿器科学分野

令和元年12月

目次

1. 要旨	1
2. 研究の背景	1
3. 目的	1
4. 方法	2
(1) 対象	2
(2) 方法	2
(3) 解析	2
5. 結果	3
6. 考察	6
7. 結語	7
8. 謝辞	7
9. 参考文献	7

1. 要旨

リン酸カルシウムと Fetuin-A が凝集したナノ粒子は calciprotein particles (CPP) と呼ばれる。慢性腎臓病に伴う骨ミネラル代謝異常 (CKD-MBD) は心血管系疾患、軟部組織の石灰化に関わっている。特に、高リン血症は血液透析患者での心血管系死亡率の大きなリスク因子となる。血清 CPP は慢性腎不全患者で増加し、血管の石灰化と相関している。本研究では血液透析患者での血清 CPP に対するリン吸着剤である炭酸ランタン(LC)と炭酸カルシウム(CC)の効果を評価した。すでに、CC を内服している 24 例の血液透析患者を登録し、0 週から 8 週までは CC のまま治療、9 週から 16 週は LC に切り替え治療した。血液検査のためのサンプルは 0 週、8 週、16 週に採取した。TCPP (total CPP)はゲル濾過法で測定した。低密度の CPP (LCPP)は血清サンプルを遠心分離後、上清を測定することで求めた。TCPP と LCPP の差は、高密度 CPP (HCPP)として定義した。TCPP、LCPP、HCPP および、血清カルシウム、リン、i-PTH、FGF23、Klotho、Fetuin-A、大動脈石灰化指数 (ACI)、LDL コレステロール、hs-CRP との関連を評価した。CC から LC への切り替えで、TCPP と LCPP は有意に低下したが、カルシウム、リンは変わらなかった。HCPP は全患者で測定下限以下であった。カルシウム・リン積、リン、LDL コレステロールの変化は TCPP の変化と相関していた。本研究より、TCPP は CC から LC への変更で有意に減少することが明らかとなり、カルシウムがベースとなっていないリン吸着剤である LC は CPP 値を下げるのに適していることが示された。

2. 研究の背景

慢性腎臓病に伴う骨ミネラル代謝異常 (CKD-MBD) は心血管系疾患、軟部組織の石灰化に関わっている[1]。特に、高リン血症は血液透析患者での心血管系死亡率の大きなリスク因子となる[2]。

血中の CPP が慢性腎臓病(CKD)の進行と血管石灰化に関わっていることも報告された[3,4]。リンとカルシウムは血液中で溶解度の限界を超えるとリン酸カルシウム結晶を形成する。このリン酸カルシウム結晶に結合し、成長を阻害する役割を担うのが肝細胞由来の蛋白質である Fetuin-A と呼ばれる物質で、このリン酸カルシウム結晶を吸着した Fetuin-A はさらに重合し、calciprotein particles (CPP)を形成する[5]。CPP の形成はリン酸カルシウム結晶の成長を妨げる防御機構として捉えられていたが[6]、最近の研究で、石灰化や炎症反応を惹起すると示された[7-9]。

リン吸着剤は高リン血症の患者で使用されており、炭酸カルシウムは最も広く使われている。しかし、炭酸カルシウムは、カルシウムが元となっていないリン吸着剤である炭酸ランタンと比べ、血管石灰化の重症度と関与していると報告されている[10]。炭酸ランタンが血管石灰化を減らすのに寄与するという報告もあるが、CPP における炭酸ランタンの影響はわかっていない。

3. 目的

本研究の目的は、炭酸ランタンが、炭酸カルシウムと比較し、血液透析患者における CPP に影響を及ぼすか否かを検討することである。

4. 方法

(1) 対象

高リン血症のため炭酸カルシウムにより治療している 20 歳以上の 24 例の血液透析患者を対象とした。12 例が男性で、年齢の中央値は 68 歳であった。慢性腎臓病の原疾患は 46%が糖尿病、21%が慢性糸球体腎炎、13%が腎硬化症、4%が多発性嚢胞腎であった。合併症は、83%が高血圧症、46%が糖尿病、脳心血管系疾患が 38%、二次性副甲状腺機能亢進症が 33%であった。

(2) 方法

この研究は 2012 年から 2013 年に行われた。高リン血症のため登録時に内服している炭酸カルシウムを 8 週間継続した。その後、炭酸ランタンに変更し、8 週間継続した。変更後の炭酸ランタンの内服量は力価を考慮し、炭酸カルシウムの半量か 750mg とした。2 週間毎に血液検査を施行し、カルシウム、リンによって、炭酸カルシウム、炭酸ランタンとも調節を行った。研究開始時、炭酸カルシウムから炭酸ランタンへの変更時、16 週後で、CPP、FGF23、Klotho、fetuin-A、大動脈石灰化指数(ACI)などの測定を行った。

(3) 解析

ACI は CT 検査での横隔膜から総腸骨動脈分岐部までの腹部大動脈を用い、算出した[12]。

CPP 値の測定は報告されている方法に若干の変更を加え行った[13]。5 μ l の血漿と 45 μ l の Dulbecco's Modified Eagle Medium (100mM HEPES、0.5 μ l OsteoSense 680EX を 25 $^{\circ}$ C で 1 時間培養し、30 μ l を gel-filtration spin column に移し、2 分 1000g で遠心分離した。さらに、30 μ l の Dulbecco's Modified Eagle Medium を column に移し同様に遠心分離した。それぞれ遠心分離した 30 μ l ずつを併せた 60 μ l のうち 50 μ l と、2% SDS と 100mM EDTA の 50 μ l で、赤外線蛍光スキャナにて測定した。OsteoSense の蛍光強度を total CPP(TCPP)と定義した。血漿を 16000g で 2 回遠心分離後、上清を同様に測定した。これを低密度 CPP(LCPP)と定義した。高密度 CPP(HCPP)は TCPP より LCPP を減算して、決定した。

Fetuin-A 値(F1)は human fetuin-A ELISA kit を用い測定した。次に、CPP を沈殿させるために、血清を 2 時間、16000~24000g 遠心分離した。上清の fetuin-A 値(F2)を ELISA kit を用い測定した。(F1-F2)/F1 は fetuin-A の低下率とし、

血清 CPP 値の代替値として用いた[3,4]。

統計解析は StatMateIV を用いて行った。P 値は 0.05 未満で有意とした。2 群間の比較は Wilcoxon signed-rank test または Student's t-test を用いた。連続変数の相関係数は Spearman's rank correlation を用いた。

5. 結果

Table.1 に患者背景を示す。以前の報告[14,15]より、FGF23 は正常値より高値で、Fetuin-A は低値だった。Klotho は正常値であった。Table.2 に CC から LC へ変更した検査結果を示す。i-PTH を除き、有意な変化は認めなかった。

Table 1. 患者背景.

	n=24
Age (year)	68 ± 12
Male (%)	12 (50)
BMI (kg/m ²)	21.2 ± 2.3
SBP (mmHg)	144 ± 23
DBP (mmHg)	76 ± 13
Period of hemodialysis (years)	5 (2-10)
Kt/v	1.74 ± 0.34
ACI (%)	46.8 ± 27.1
GNRI	98.0 ± 5.8
Serum albumin (g/dl)	3.9 ± 0.2
LDL cholesterol (mmol/l)	79.1 (62.6-106.3)
Serum Ca (mg/dl)	9.0 (8.4-9.7)
Serum P (mg/dl)	5.4 (4.4-6.3)
Ca × PO ₄ product	48.8 (39.3-54.9)
iPTH (pg/ml)	88.0 (41.3-151.0)
FGF23 (Log) (pg/ml)	1.3 (0.6-2.8)
α-Klotho (pg/ml)	428.2 (380.2-659.2)
Fetuin-A (μg/ml)	230.8 (193.9-240.8)
hs-CRP (mg/l)	0.3 (0.2-0.9)

mean ± SD or number (percentage) or median (interquartile range).

BMI, body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure;

ACI, aortic calcification index; GNRI, geriatric nutritional risk index;

iPTH, intact parathyroid hormone; FGF23, fibroblast growth factor 23

hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein

Table 2. 検査値の変化.

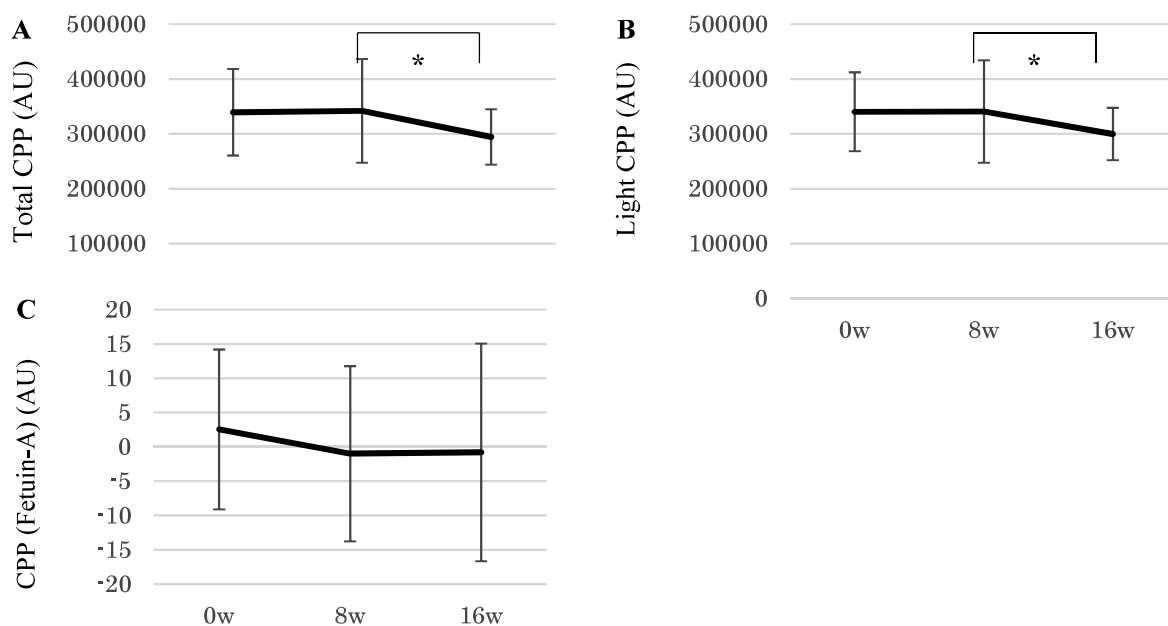
	0 week	8 week	16 week	P
Serum albumin (g/dl)	3.9 ± 0.2	3.8 ± 0.3	3.8 ± 0.3	0.30
LDL cholesterol (mmol/l)	79.1 (62.6-106.3)	76.6 (62.4-108.8)	84.6 (66.2-107.7)	0.40
Serum Ca (mg/dl)	9.0 (8.4-9.7)	9.0 (8.5-9.8)	8.8 (8.5-9.2)	0.07
Serum P (mg/dl)	5.4 (4.4-6.3)	5.3 (4.0-5.9)	4.9 (4.4-5.8)	0.73
Ca × PO ₄ product	48.8 (39.3-54.9)	46.9 (37.5-51.6)	44.6 (39.5-49.2)	0.44
iPTH (pg/ml)	88.0 (41.3-151.0)	76.0 (38.3-146.3)	130 (80.3-195.8)	<0.01
FGF23 (Log) (pg/ml)	1.3 (0.6-2.8)	1.0 (0.6-3.6)	1.0 (0.7-2.5)	0.85
α-Klotho (pg/ml)	428.2 (380.2-659.2)	423.4 (370.0-619.9)	456.1 (337.7-530.8)	0.31
Fetuin-A (μg/ml)	230.8 (193.9-240.8)	214.2 (200.2-245.1)	214.5 (190.9-233.3)	0.15
hs-CRP (mg/l)	0.3 (0.2-0.9)	0.6 (2.9-1.1)	0.7 (0.2-1.5)	0.58

P値はWilcoxon signed-rankかStudent's t-testを用い求めている。

mean ± SD or median (interquartile range).

T CPP と L CPP は CC から LC の変更で有意に減少した。Fetuin-A 法での CPP は変化を認めなかった(Figure.1)。

Figure 1. CPPの変化.



* P < 0.05

Wilcoxon signed-rank test を用いた。

AU: Arbitrary Unit

CC から LC の変更によるカルシウム・リン積および血清リン値の変化量は TCPP の変化量と正の相関を認めた(Figure.2BC)。しかし、カルシウムでは相関を認めなかった(Figure.2A)。TCPP の変化量は薬剤変更 8 週時点での TCPP 値と負の相関を示した(Figure.2D)。LDL の変化量は TCPP の変化量と有意な相関を示したが、hs-CRP、ACI は相関を認めなかった(Figure.3)。

Figure.2

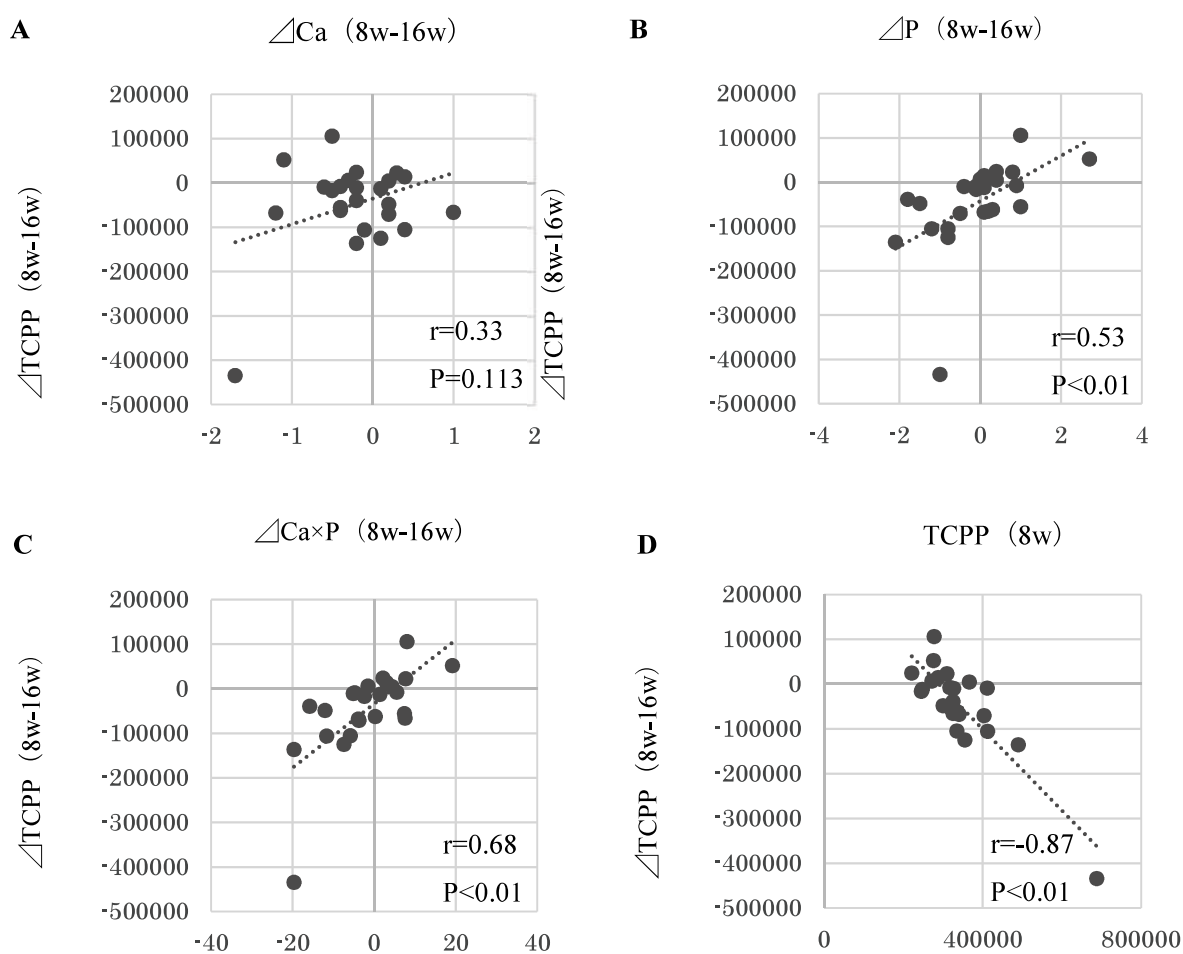
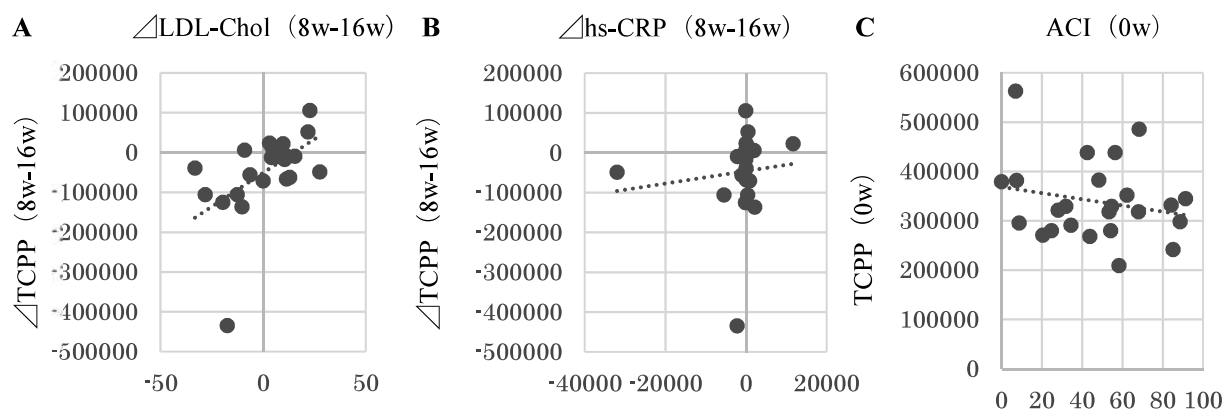


Figure.3



r=0.53

P<0.01

r=0.11

P=0.60

r=-0.21

P=0.32

6. 考察

本研究は、血液透析症例におけるリン吸着剤を CC から LC へ変更した際の CPP への影響を評価した最初の報告である。一般的な細胞培養培地でリン濃度が 1mM から 2mM の上昇毎に、不要性のリン酸カルシウム結晶が析出される[16]。リン酸カルシウム結晶は培地のリン酸濃度上昇することなく、活性酸素などの細胞反応を引き起こす。リン酸カルシウム結晶を除去または形成を抑制されることにより、高リン酸塩培地下でも細胞反応は起きなかったと報告されている[7,8]。つまり、高リン酸培地に対する細胞反応の原因は、リンではなくリン酸カルシウム結晶である可能性がある。Posner's clusters と呼ばれる最小のリン酸カルシウムが凝集して、アモルファスのリン酸カルシウムに変わり、ヒドロキシアパタイトに成長する[17]。しかし、Fetuin-A のようなミネラル結合蛋白の存在下では、Posner's cluster は Fetuin-A に吸収され、大きなリン酸カルシウムの沈殿物の成長が妨げられる。CPP と呼ばれるリン酸カルシウムと Fetuin-A の凝集がコロイドとして分散する[6]。

最近の研究で、CPP は血管石灰化を引き起こす病原性の役割があることが示唆されている[7,8]。Smith らは CPP が炎症の誘発やマクロファージでのアポトーシスのカスケードに関わることを示した[9]。Sage らは CPP が血管平滑筋細胞から骨芽細胞への分化を引き起こすことを示した[16]。さらに、CPP は CKD の進行で上昇し、血管石灰化と相関する[3,4]。これらの研究結果は CPP を制御することが臨床的に重要である可能性を示している。

食事によるリン酸摂取の制限と透析によるリンの除去は血清リン値を正常内に維持するのに必ずしも十分ではない。従って、多くの透析患者はリン吸着剤を内服している。それにも関わらず、多くの透析患者は血清リン値が正常内にコントロールされていても、血管石灰化が起こる。CC は高リン血症の症例に広く使用されているが、血管石灰化の進行と関連する[18]。血管石灰化と外因性のカルシウム摂取との相関が報告されている[19]。LC のようなカルシウムがベースとなっていないリン吸着剤は CC より血管石灰化が少なく、その理由として LC は CC より CPP を低下させることが推測されている[20,21]。

最近、いくつかの CPP 測定法が考案されており、Hamano は Fetuin-A を用いることによる間接的に測定した[6]。LDL と CPP の変化量の関係のメカニズムはわかっていないが、スカベンジャー受容体が血液からの CPP と LDL 両方のクリアランスに関わっているため、TCPP の減少が LDL のクリアランスを促進させているのかもしれない[22]。

血清 CPP の成長時間 (T50) は個々の血管石灰化の程度を測定する新しい方法で、T50 は石灰化に対する内因性に防ぐ指標となりうる[23]。また、高流量の血液透析と血

液濾過透析は数分で T50 を改善させる。

本研究ではカルシウム・リン積、リン値に関わらず、リン吸着剤の変更で、CPP が有意に減少した。LC は腸管から吸収されないが、CC はリンとカルシウムが共に腸管から吸収される。CC によるカルシウム付加は CPP 形成のリスクを上昇させるかもしれない。腸管から吸収された CC のカルシウムは血液中の CPP に寄与する可能性がある。今回のゲルを使った測定法では LCPP と HCPP を区別して測定できる点が特徴である。HCPP は Fetuin-A 法で測定した CPP と同等であり、血清リン値、CRP、酸化 LDL、BMP-2/7 と相関すると考えられている[4]。しかし、HCPP はゲルや Fetuin-A の方法を用いると、測定には低すぎるため、我々は HCPP を測定できなかった。これは研究に登録された血液透析患者が血液透析とリン吸着剤で十分コントロールされていたためであると推測される。

本研究の限界は症例数が少ない、観察期間が短いことである。今後、リン吸着剤投与前の HCPP 高値患者での研究が必要である。

7. 結語

TCP 是 CC から LC への変更で有意に減少する。カルシウムがベースでないリン吸着剤である LC は CPP 値を下げるのに適している。

8. 謝辞

本論文は筆者が山口大学大学院医学系研究科博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものである。松山先生には指導教官として本研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行にあたって終始、ご指導を戴いた。ここに深謝の意を表す。並びに、自治医科大学医学部抗加齢医学研究部教授黒尾線瀬には本論文の細部にわたりご指導を戴いた。ここに深謝の意を表す。

9. 参考文献

1. Moe S, Drüeke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2006;69:1945–53.
2. Young EW, Albert JM, Satayathum S, Goodkin DA, Pisoni RL, Akiba T, et al. Predictors and consequences of altered mineral metabolism: The Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study. *Kidney Int.* 2005;67:1179–87.
3. Hamano T, Matsui I, Mikami S, Tomida K, Fujii N, Imai E, et al. Fetuin-Mineral Complex Reflects Extraosseous Calcification Stress in CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21:1998–2007.
4. Smith ER, Ford ML, Tomlinson LA, Rajkumar C, McMahon LP, Holt SG.

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;27:1957–66.

5. Heiss A, Pipich V, Jahnen-Dechent W, Schwahn D. Fetuin-A is a mineral carrier protein: Small angle neutron scattering provides new insight on fetuin-A controlled calcification inhibition. *Biophys J* [Internet]. Biophysical Society; 2010;99:3986–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2010.10.030>

6. Kuro-O M. A phosphate-centric paradigm for pathophysiology and therapy of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl*. Elsevier Masson SAS; 2013;3:420–6.

7. Villa-Bellosta R, Sorribas V. Phosphonoformic acid prevents vascular smooth muscle cell calcification by inhibiting calcium-phosphate deposition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:761–6.

8. Ewence AE, Bootman M, Roderick HL, Skepper JN, McCarthy G, Epple M, et al. Calcium Phosphate Crystals Induce Cell Death in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ Res*. 2008;103:28–34.

9. Smith ER, Hanssen E, McMahon LP, Holt SG. Fetuin-A-Containing Calciprotein Particles Reduce Mineral Stress in the Macrophage. *PLoS One*. 2013;8.

10. Toussaint ND, Lau KK, Polkinghorne KR, Kerr PG. Attenuation of aortic calcification with lanthanum carbonate versus calcium-based phosphate binders in haemodialysis: A pilot randomized controlled trial. *Nephrology*. 2011;16:290–8.

11. Daugirdas JT, Finn WF, Emmett M, Chertow GM. The Phosphate Binder Equivalent Dose. *Semin Dial*. 2011;24:41–9.

12. Ohya M, Otani H, Kimura K, Saika Y, Fujii R, Yukawa S, et al. Vascular calcification estimated by aortic calcification area index is a significant predictive parameter of cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Clin Exp Nephrol*. 2011;15:877–83.

13. Miura Y, Iwazu Y, Shiizaki K, Akimoto T, Kotani K, Kurabayashi M, et al. Identification and quantification of plasma calciprotein particles with distinct physical properties in patients with chronic kidney disease. *Sci Rep*. 2018;8:1–16.

14. Fukagawa M, Kazama JJ. With or without the kidney: the role of FGF23 in CKD. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20:1295–8.

15. 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;361:827–33.

16. Sage AP, Lu J, Tintut Y, Demer LL. Hyperphosphatemia-induced nanocrystals upregulate the expression of bone morphogenetic protein-2 and osteopontin genes in mouse smooth muscle cells in vitro. *Kidney Int* [Internet]. Elsevier Masson SAS;

2011;79:414–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2010.390>

17. Kanzaki N, Treboux G, Onuma K, Tsutsumi S, Ito A. Calcium phosphate clusters. *Biomaterials*. 2001;22:2921–9.

18. Chertow GM, Raggi P, Chasan-Taber S, Bommer J, Holzer H, Burke SK. Determinants of progressive vascular calcification in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19:1489–96.

19. Subjects S. T 1478 : 2000;

20. Joy MS, Finn WF. Randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-titration, phase III study assessing the efficacy and tolerability of lanthanum carbonate: A new phosphate binder for the treatment of hyperphosphatemia. *Am J Kidney Dis* [Internet]. National Kidney Foundation, Inc.; 2003;42:96–107. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0272-6386\(03\)00554-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0272-6386(03)00554-7)

21. Shigematsu T, Group the LC. Multicenter prospective randomized, double-blind comparative study between lanthanum carbonate and calcium carbonate as phosphate binders in Japanese hemodialysis patients with hyperphosphatemia. *Clin Nephrol*. 2008;70:404–10.

22. Herrmann M, Schäfer C, Heiss A, Gräber S, Kinkeldey A, Büscher A, et al. Clearance of fetuin-A-containing calciprotein particles is mediated by scavenger receptor-A. *Circ Res*. 2012. p. 575–84.

23. Dekker M, Pasch A, Dersande F, Konings C, Bachtler M, Dionisi M, et al. High-flux hemodialysis and high-volume hemodiafiltration improve serum calcification propensity. *PLoS One*. 2016;11:1–13.

24. Kimihiko Nakamura, Hideyasu Matsuyama, Makoto Kuro-o, et al. The effect of lanthanum carbonate on calciprotein particles in hemodialysis patients. *Clinical and Experimental Nephrology*. In press. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10157-019-01832-4>