

特集 : CKD-MBD

生体内の石灰化機構

Mechanism of calcification

渡辺 隆一 宮本 健史

Ryuichi WATANABE and Takeshi MIYAMOTO

要 旨

生体内の石灰化は、骨や歯などの硬組織が生理活性を持つための必要不可欠な過程であり、カルシウム、リン、水酸化物イオンから形成されるハイドロキシアパタイト結晶がコラーゲン線維に沈着することで生じる。しかし、動脈壁や心臓弁などの軟部組織に生じる石灰化は異所性石灰化と呼ばれ、非生理的な現象であり、さまざまな臓器障害を引き起こす。

骨石灰化はピロリン酸や osteocalcin などの sibling 蛋白質で阻害され、その活性は PPi 産生酵素 ENPP1 や PPi 輸送蛋白 ANK, PPi 分解酵素 ALP などによって調節されている。これらの石灰化抑制機構が破綻すると、異所性石灰化が生じる。

血管石灰化は、糖尿病や CKD-MBD に虚血性心疾患、脳血管障害、心不全などを併発させ、生命予後を悪化させる。これまで、加齢に伴う生理的現象と捉えられてきた血管石灰化の分子機序が、近年、骨石灰化プロセスと非常に類似していることが示された。

本稿では、骨石灰化および異所性石灰化の代表例である血管石灰化の分子機序について概説する。

骨石灰化

骨石灰化は、細胞外に分泌されたコラーゲン線維から形成される類骨に、ハイドロキシアパタイト (HA) が沈着することで形成される。細胞は、2つの無機リン (Pi) が脱水縮合した無機ピロリン酸 (PPi) を産生し、HA 結晶に直接結合することによって軟部組織である細胞外基質の石灰化を

阻害している。体内の多くの細胞では、PPi を産生することで組織の石灰化の防御機構が働いている。一方、骨などの硬組織では alkaline phosphatase liver/kidney/bone (ALP), tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP), Akp2 により PPi が Pi に分解されて、結晶の成長が進行する¹⁾。

この PPi による生体内の生理的石灰化防御機構の詳細な機序は、PPi が HA の結晶に直接結合し、その成長を阻害するとともに ALP 活性を抑制し、さらに骨吸収作用のある osteopontin (OPN) の発現を誘導することで、HA 結晶への Pi 沈着が抑制されることである。細胞外基質における PPi 濃度の上昇調節は、アデノシン三リン酸 (ATP) の分解反応で PPi が生成される反応を触媒する ectoenzyme nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (ENPP1) と細胞質から細胞外基質への PPi 輸送作用を持つ progressive ankylosis (ANK) が関与している²⁾。

ENPP1 は C 末端が細胞外に存在する 2 型膜貫通型糖蛋白で、主に骨、軟骨、肝臓などに多く発現している。ENPP1 が石灰化抑制に働いていることは、自然発生変異の ENPP1 機能喪失マウス (*ttw* ; tiptoe-walking mouse) がアキレス腱をはじめとする腱付着部や関節軟骨、後縦靱帯、さらには大動脈や腎細動脈に石灰化をきたすことで証明された³⁾。さらに *Enpp1*^{-/-} マウスにおいては、FGF23 の発現が上昇し、腎からの Pi 排泄が増加するために石灰化抑制が生じることも示されている⁴⁾。

ANK は細胞膜貫通型蛋白であり、細胞内 PPi の細胞外輸送に作用しているが、*Ank*^{-/-} マウスにおいては、進行性の関節強直や脊椎椎体の過剰な石灰化の表現型を呈する⁵⁾。一方、ANK の gain of function では、細胞外 PPi 濃度が増加し、ピロリン酸カルシウム (calcium pyrophosphate dehydrate : CPPD) が関節内に沈着する結晶誘発性関節炎、「偽痛風」が生じる⁶⁾。

細胞外 PPI 濃度の低下には骨芽細胞分化マーカー、ALP が作用しており、GPI (glycosylphosphatidylinositol) アンカー型蛋白で細胞外に酵素活性を持っている。ALP 欠損症や $\text{Akp2}^{-/-}$ マウスでは、血液中の PPI 濃度が上昇し、低ホスファターゼ症 (hypophosphatasia) と低石灰化をきたす⁷⁾。

骨基質はコラーゲン以外にも多くの蛋白質から形成されており、そのなかでも石灰化抑制機能を持つものとして、sibling family に属し酸性糖蛋白質である dentin matrix protein (DMP1), matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE), osteopontin (OPN) や, Gla 蛋白質である osteocalcin (OC) と matrix gla protein (MGP) などがあげられる⁸⁾。sibling family は, acidic serine- and aspartate-rich motif (ASARM) と呼ばれる構造を持ち、リン酸化修飾された MEPE や OPN の ASARM ペプチドは, HA 結晶に結合して石灰化を抑制し、ALP が OPN を脱リン酸化すると石灰化抑制能が失われる。X 染色体劣性低リン血症性くる病の原因遺伝子である PHEX (phosphate-regulating neutral endopeptidase) によって分解される。 PPI は PHEX を抑制するだけでなく、骨芽細胞が産生する OPN の転写を誘導することが明らかにされている⁹⁾。

MGP は、 γ -カルボキシル基を持つ細胞外基質糖蛋白質であり、 Ca^{2+} をキレートすることで石灰化抑制分子として働き、 $\text{MGP}^{-/-}$ マウスの表現型では動脈や関節軟骨の石灰化を認める¹⁰⁾。さらに MGP は骨形成蛋白 (bone morphogenetic protein 2: BMP2) と結合し、骨芽細胞分化の抑制機能も併せ持っている¹¹⁾。

基質小胞 (matrix vesicle: MV) は、肥大軟骨細胞、骨芽細胞などで分泌される脂質二重膜に囲まれた小胞であり、膜上に存在する annexin (A2, A5, A6) が Ca^{2+} を流入させるチャネルとして働き、 Pi を細胞内に流入させるために Pit-1/2 が Na^+/Pi co-transporter として機能している¹²⁾。MV 内のリン脂質の相互作用により Ca^{2+} と H_3PO_4^- は HA 結晶の材料となる。HA 結晶は MV 内部で成長し、脂質二重膜が破れた後も石灰化球として成長し骨の石灰化に寄与している¹³⁾ (図 1)。

血管石灰化

これまで血管石灰化は血管細胞の変性過程で生じるカルシウム結晶の受動的な沈着であり、加齢に伴う生理的变化として捉えられてきた。しかし、1990 年代に骨形成に関与する蛋白質の発現が血管石灰化部分で認められたことから、現在では骨形成に類似した能動的なプロセスによる病

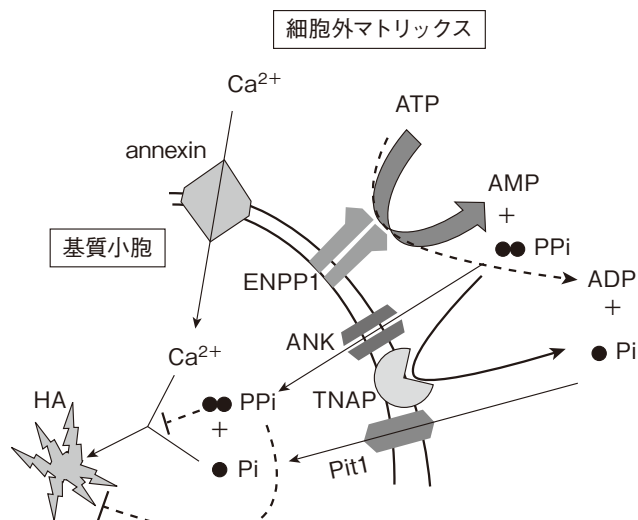


図 1 基質小胞(MV)におけるハイドロキシアパタイト(HA)の結晶化メカニズム

骨芽細胞は類骨に MV を分泌する。膜上に存在する ENPP1 は ATP を加水分解し、AMP とピロリン酸 (PPI) を産生し、二次的に PPI 縮合を分解することによって ADP とリン (Pi) を産生する。また、PPI は TNAP (アルカリホスファターゼ) によって Pi に分解され、PPI は ANK、Pi は Pit1 によって MV に輸送される。

MV では Ca と Pi から HA が産生され、PPI は石灰化を抑制している。

態として考えられるようになった。

動脈の石灰化は、動脈硬化プラーク量と相関し、心筋梗塞などの心血管イベントのリスク因子であることが示されている¹⁴⁾。血管石灰化は、動脈硬化に伴う内膜の石灰化と細動脈に認められる中膜が石灰化するメンケベルク型に分類される¹⁵⁾。中膜石灰化は、特に高齢者、糖尿病患者、末期腎不全患者に著明に認められる。

1. 血管石灰化を調整する因子

1) 骨形成蛋白 (BMP2)

Demer や Giachelli らは、ヒトの動脈硬化病変に骨形成過程に重要な因子である BMP2 や OPN が発現していることを報告した^{16,17)}。TGF- β スーパーファミリーである BMP2 は、血管平滑筋細胞、筋線維芽細胞、血管周囲細胞、血管内皮細胞、マクロファージに発現しているものと考えられている。BMP2 は骨形成において膜性骨化にかかわる Msx2、軟骨内骨化にかかわる Runx2 をそれぞれ活性化している。

2) Ca と P の役割

高リン血症と $\text{Ca} \times \text{P}$ 高値は血管石灰化を促進させることがわかっている。また石灰化の進行は血清 P 濃度、 $\text{Ca} \times \text{P}$ 、

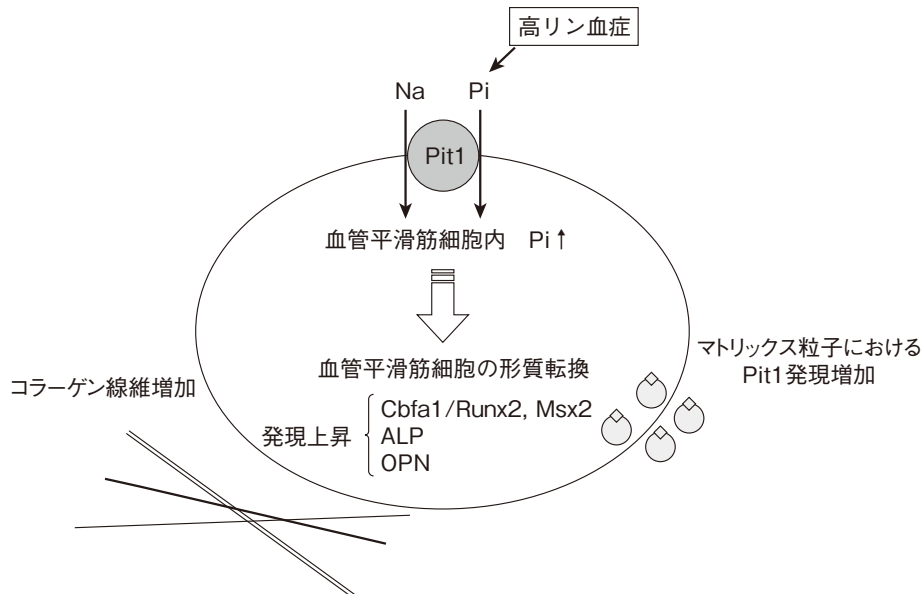


図 2 リンによる血管平滑筋細胞の石灰化機序

リン濃度の上昇により Pit1 の発現が増加すると細胞内への Pi の取り込みが促進される。細胞内の Pi 濃度上昇により血管平滑筋細胞の形質転換が生じ、骨芽細胞特異的遺伝子 (Cbfa1/Runx2, Msx2, ALP, OPN) の発現が誘導される。また、マトリックス粒子における Pit1 の発現が増加することで細胞外マトリックスのミネラル化が生じる。(文献 16 より引用, 改変)

Ca 摂取量に相関し、Pi が血管平滑筋の石灰化を引き起こす機序について多くの知見が明らかになっている¹⁸⁾。ヒト平滑筋細胞を高リン濃度 (>2.4 mM) で培養すると細胞外マトリックス中のコラーゲン線維に HA の沈着が生じ、このミネラル化に伴って、血管平滑筋細胞が形質変換し、骨芽細胞特異的遺伝子 (Cbfa1/Runx2, Msx2, OPN, OC など) の発現が誘導される。このようなミネラル化は Na 依存性リン共輸送体 (Pit1) を介した形質変換によるものであり、培養液中の Ca 濃度を 2.6 mM 以上にしても同様の変化が生じる (図 2)。

3) Matrix GLA 蛋白 (MGP)

MGP^{-/-}マウスでは骨の形態異常は軽微であるものの、大動脈中膜の血管平滑筋細胞が軟骨細胞に置換され、高度の石灰化が生じる表現型を示す。この事実から MGP は BMP2 を抑制し、血管平滑筋細胞から骨芽細胞への分化転換を阻害する血管石灰化抑制因子であることが示された⁸⁾。

4) RANK, RANKL, OPG

TNFα ファミリーに属する RANK (receptor activator of nuclear factor κB), RANKL (RANK ligand), および osteoprotegerin (OPG) の 3 つの因子は骨免疫系の調節因子である¹⁹⁾。RANKL は T 細胞で同定され、骨芽細胞や骨細胞で主に発現しており、破骨細胞や樹状細胞、その前駆細胞に発現す

る RANK に結合して、多核破骨細胞への分化を促進させる。また、RANKL は多核破骨細胞の機能亢進、成熟、生存延長作用の調節因子である。OPG は RANKL と同様に T 細胞や骨芽細胞で多く発現しているが、可溶性デコイ受容体として RANKL に結合し RANK/RANKL の作用を阻害する。

OPG^{-/-}マウスでは高度の骨粗鬆症と大動脈・腎動脈に血管石灰化を認める。このマウスにおける血管石灰化病変では、通常の血管でほとんど発現していない RANKL, RANK を発現する細胞が存在し、破骨細胞形成に類似した骨リモデリングが進行している。さらにこのマウスに生後 OPG を投与すると骨粗鬆症はレスキューされるが、血管石灰化は改善されない²⁰⁾。この結果から、OPG は RANKL との相対的レベルに応じて生理的に作用していることが考えられている。

2. 血管石灰化の細胞内シグナル

1) 動脈中膜石灰化

動脈中膜石灰化は膜性骨化に類似した組織を示すことから、BMP2-Msx2 pathway の関与が考えられている。Shimizu らは、ヒト冠動脈内膜や頸動脈プラークを免疫組織学的解析から、動脈硬化病変における骨形成因子である BMP2, OPN, OC だけでなく、Msx2, Runx2 などの骨芽細胞分化

への転写因子の発現や notch シグナル分子(Jagged1)の発現を報告した。また, notch intracellular domain(NICD)を遺伝子導入させたアデノウイルスベクターを大動脈由来の血管平滑筋細胞に強制発現させると, 骨芽細胞への分化転換を認めた。一方, Msx2 を siRNA でノックダウンした血管平滑筋細胞では, NICD による骨芽細胞への分化がほぼ完全に消失する結果となった。Msx2 プロモーター解析にて, notch シグナルは RBPJK 配列に結合し Msx2 プロモーターを活性化していることが明らかにされた²¹⁾。

2) 粥状硬化性石灰化

Runx2 は, 前述したように軟骨内骨化にかかわる骨形成の重要な転写因子であるが, 粥状硬化性石灰化は血管新生と軟骨内骨化に似た組織像を示し, 病変部に BMP2 や Runx2 が発現していることが確認されている。一方で, 非石灰化病変では Runx2 と血管平滑筋細胞マーカーである SM α -actin が重複して一部発現しており, Runx2 は myocardin による SMC 遺伝子の発現誘導を強力に抑制し, さらに, 血管平滑筋細胞に Runx2 を過剰発現させると SMC 遺伝子の発現が減少し, 逆にノックダウンすると SMC 遺伝子の発現が増加することが示された²²⁾。このことから, Runx2 は血管平滑筋細胞分化の抑制因子であるといわれている。

3. 石灰化機構の破綻によって生じる異所性石灰化の代表的疾患

1) 後縦靱帯骨化症(ossification of posterior longitudinal ligament : OPLL)

脊椎椎体後面の支持組織である後縦靱帯が骨化し, 頭尾側および背側方向に増大することによって, 脊柱管内の脊髄を圧迫し脊髄症状をきたす骨増殖性疾患である。

2) 進行性骨化性線維異形成(fibrodysplasia ossificans progressive : FOP)

骨形成蛋白である 1 型アクチビン受容体をエンコードしている ACVR1 遺伝子の突然変異によって生じる遺伝性疾患である。軟骨細胞の内軟骨性骨化の異常により, 進行性に増殖する骨組織が全身の軟部組織を圧排し, 移動はおろか, 最終的には呼吸筋も骨化し死に至る。

3) 高リン血症性家族性腫瘍状石灰沈着症(hyperphosphatemic familial tumoral calcinosis : HFTC)

常染色体劣性遺伝であり, *GLANT3*, *FGF23*, *Klotho* 遺伝子の突然変異が原因遺伝子であると報告されている²³⁾。*GLANT3*, *FGF23* 遺伝子変異では FGF23 の分泌障害, *Klotho* 遺伝子変異では FGF23 に対する *Klotho*-FGF23 受容体複合体の応答性によって, 近位尿細管からのリン再吸収, 腸管

からのリン吸収の抑制が障害され高リン血症が惹起され, 大関節周囲に異所性石灰化をきたす。

おわりに

骨石灰化のメカニズムの解明が進み, 正常な硬組織における骨代謝の理解の深まりから骨粗鬆症治療の新たなアプローチが展開されている。その一方で, これまで慢性腎不全や糖尿病および透析患者に認められる血管石灰化は, 血中のカルシウムやリンの過飽和による受動的な石灰沈着プロセスとして捉えられてきたが, 血管平滑筋細胞から骨芽細胞への分化転換による能動的な石灰化が病態の中心であり, 骨石灰化過程との類似性が解明されてきた。このような生命予後を悪化させる血管石灰化に対して, 更なる治療標的分子の同定や予防を含めた治療介入の確立が今後期待される。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

1. Addison WN, Azari F, Sørensen ES, Kaartinen MT, McKee MD. Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity. *J Biol Chem* 2007 ; 282(21) : 15872-15883.
2. Mackenzie NC, Huesa C, Rutsch F, MacRae VE. New insights into NPP1 function : Lessons from clinical and animal studies. *Bone* 2012 ; 51(5477) : 961-968.
3. Okawa A, Nakamura I, Goto S, Moriya H, Nakamura Y, Ikegawa S. Mutation in Npps in a mouse model of ossification of the posterior longitudinal of the spine. *Nat Genet* 1998 ; 19(3) : 271-273.
4. Mackenzie NC, Zhu D, Milne EM, van't Hof R, Martin A, Darryl Quarles L, Millán JL, Farquharson C, MacRae VE. Altered bone development and an increase in FGF-23 expression in *Enpp1*^{-/-} mice. *PLoS One* 2012 ; 7(2) : e32177.
5. Gurley KA, Chen H, Guenther C, Nguyen ET, Rountree RB, Schoor M, Kingsley DM. Mineral formation in joints caused by complete or joint-specific loss of ANK function. *J Bone Miner Res* 2006 ; 21(8) : 1238-1247.
6. Abhishek A, Doherty M. Pathophysiology of articular chondrocalcinosis role of ANKH. *Nat Rev Rheumatol* 2011 ; 7(2) : 96-104.
7. Harmey D, Hesse L, Narisawa S, Johnson KA, Terkeltaub R, Millán JL. Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by *akp2*, *enpp1*, and *ank* : an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders. *Am J Pathol* 2004 ; 164(4) : 1199-1209.

8. Staines KA, MacRae VE, Farquharson C. The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralization and bone remodeling. *J Endocrinol* 2012 ; 214(3) : 241-255.
9. Barros NM, Hoac B, Neves RL, Addison WN, Assis DM, Mursshed M, Carmona AK, McKee MD. Proteolytic processing of osteopontin by PHEX and accumulation of osteopontin fragments in Hyp mouse bone, the murine model of X-linked hypophosphatemia *J Bone Miner Res* 2013 ; 28(3) : 688-699.
10. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997 ; 386(6620) : 78-81.
11. Zebboudj AF, Imura M, Boström K. Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 2002 ; 277(6) : 4388-4394.
12. Boonrungsiman S, Gentleman E, Carzaniga R, Evans ND, McComb DW, Porter AE, Stevens MM. The role of intracellular calcium phosphate in osteoblast-mediated bone apatite formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012 ; 109(35) : 14170-14175.
13. Kirsch T. Biomineralization—an active or passive process? *Connect Tissue Res* 2012 ; 53(6) : 438-445.
14. Giachelli CM. Ectopic calcification : gathering hard facts about soft tissue mineralization. *Am J Pathol* 1999 ; 154(3) : 671-675.
15. El-Abbadi M, Giachelli CM. Arteriosclerosis, calcium phosphate deposition and cardiovascular disease in uremia : current concepts at the bench. *Cardiovasc Pathol* 2011 ; 33(5) : 409-417.
16. Demer LL, Tintut Y. Mineral exploration : Search for the mechanism of vascular calcification and beyond : The 2003 Jeffrey M. Hoeg Award Lecture. *Mechanism of Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003 ; 23 : 1739-1743.
17. Giachelli CM, Speer MY, Li X, Rajachar RM, Yang H. Regulation of vascular calcification : Roles of phosphate and osteopontin. *Circ Res* 2005 ; 96 : 717-722.
18. Giachelli CM, et al. Vascular calcification : *In vitro* evidence for the roles of inorganic phosphate. *J Am Soc Nephrol* 2003 ; 14 : S300-S304.
19. Tintut Y, Abedin M, Cho J, Choe A, Lim J, Demer LL. Regulation of vascular calcification by osteoblast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 ; 24 : 1046-1057.
20. Morony S, Tintut Y, Zhang Z, Cattley RC, Van G, Dwyer D, Stolina M, Kostenuik PJ, Demer LL. Osteoprotegerin inhibits vascular calcification without affecting atherosclerosis in *ldlr*^{-/-} mice. *Circulation* 2008 ; 117 : 411-420.
21. Shimizu T, Tanaka T, Iso T, Doi H, Sato H, Kawai-Kowase K, Arai M, Kurabayashi M. Notch signaling induces osteogenic differentiation and mineralization of vascular smooth muscle cells : role of *Msx2* gene induction via Notch-RBP-Jk signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009 ; 29 : 1104-1111.
22. Tanaka T, Sato H, Doi H, Yoshida CA, Shimizu T, Matsui H, Yamazaki M, Akiyama H, Kawai-Kowase K, Iso T, Komori T, Arai M, Kurabayashi M. Runx2 represses myocardin-mediated differentiation and facilitates osteogenic conversion of vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Biol* 2008 ; 28 : 1147-1160.
23. Fukumoto S, Martin TJ. Bone as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 2009 ; 20(5) : 230-236.