

二次性副甲状腺機能亢進症に対するビタミンD・シナカルセト治療が酸化ストレスおよび血管内皮機能に及ぼす影響についての検討

田中元子*1 伊藤和子*1 松下和孝*1 丸山 徹*2 小田切優樹*3 深川雅史*4

*1 松下会あけぼのクリニック腎臓内科 *2 熊本大学薬学部薬剤学分野 *3 崇城大学薬学部 *4 東海大学医学部腎・内分泌・代謝内科

key words : 二次性副甲状腺機能亢進症, ビタミンD, シナカルセト, 酸化ストレス, 血管内皮機能

要 旨

二次性副甲状腺機能亢進症に対する静注ビタミンDおよびシナカルセト併用療法が酸化ストレスおよび血管内皮機能に与える影響について、アルブミン酸化度およびEndo-PAT 2000を用いた血管内皮機能検査にて検討した。その結果、二次性副甲状腺機能亢進症に対する静注ビタミンDおよびシナカルセト投与は酸化ストレスを改善すると同時に血管内皮機能を改善し、心血管系リスクを低下させると考えられた。

緒 言

近年、慢性腎臓病（CKD）の進展や心血管疾患（CVD）をはじめとする合併症の発症因子として、活性酸素種（ROS）の過剰産生に起因した酸化ストレスが注目を集めている^{1,2)}。事実、酸化ストレスは、血管平滑筋の肥厚、細胞間物質の遊走や調節に関わっており^{3,4)}、動脈硬化、血管再狭窄を引き起こし、CVDを発症・進展させる要因の一つと位置づけられている^{5,6)}。従来より、PTHはホルモンの一つとして位置づけられてきたが、近年、腎不全により体内に蓄積する悪玉因子、いわゆる“尿毒症物質”の一つとしても注目されるようになってきた。インドキシル硫酸に関

する成果をはじめ、尿毒症物質と酸化ストレスの関係が注目を集めており、多くの研究が行われている^{7,8)}。そのような中、PTHも尿毒症物質であるため、酸化ストレスを惹起し、CVDをはじめとする病態の進行に關与している可能性が示唆される。

もし、これが正しければ、二次性副甲状腺機能亢進症に対するビタミンDやシナカルセトの投与はPTHを低下させることにより、酸化ストレスを軽減することができるため、新規抗酸化療法となりうる可能性を秘めている。しかしながら、ビタミンDやシナカルセトなどの二次性副甲状腺機能亢進症に対する治療戦略と酸化ストレスとの関連性に関する検討は見当たらない。

また近年、血液透析患者において、経口あるいは静注ビタミンD製剤投与群が非投与群に比し、心血管系リスクが有意に低いことが報告^{9~11)}されているが、その機序は未だ解明されていない。ビタミンDの多面的な作用が注目されているが、ビタミンD投与が酸化ストレスを改善するとの報告は少ない。最近、筆者らは、二次性副甲状腺機能亢進症を合併した透析患者に対する静注ビタミンD投与により、酸化ストレスマーカー（アルブミン酸化度、advanced oxidation protein products (AOPP)）が有意に低下・改善する

Effects of vitamin D and cinacalcet on serum oxidative stress and endothelial function in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism

Department of nephrology, Akebono Clinic

Motoko Tanaka

Department of Biopharmaceutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University

Toru Maruyama

Division of Nephrology and Metabolism, Tokai University School of Medicine

Masafumi Fukagawa

ことを報告した¹²⁾が、酸化ストレスの改善のみならず、血管内皮機能を改善するか否かを検討することは臨床的に重要であると思われる。

さらに、近年二次性副甲状腺機能亢進症を合併した透析患者に対するシナカルセト投与が心血管系リスクを低下させることが報告¹²⁾されているが、シナカルセトと酸化ストレス改善についての報告は、筆者らが調べた限りでは認めない。したがって、二次性副甲状腺機能亢進症を合併した透析患者に対するシナカルセト治療が酸化ストレスを改善するか否かについての検討は重要であり、さらに血管内皮機能についての検討は臨床的にも有用であると思われる。

今回筆者らは、アルブミン酸化度を用いた酸化ストレスマーカーによる評価および Endo-PAT 2000 を用いた新しい血管内皮機能検査法により、ビタミン D・シナカルセト治療が酸化ストレスおよび血管内皮機能に及ぼす影響について検討したので報告する。

1 対象と方法

当院で維持透析施行中の二次性副甲状腺機能亢進症患者で、ビタミン D 製剤未投与の患者 12 例に対し、新規にビタミン D として静注ビタミン D 製剤 (Calcitriol: 1.5 μ /week) を 8 週間投与した。ビタミン D 製剤投与開始時 (0 W)、開始後 2 週、4 週、8 週後のアルブミン酸化度および AOPP を測定し、同時に、カルシウム (Ca)、リン (Pi)、アルブミン (Alb)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、intact-PTH および Endo-PAT 2000 を用いて血管内皮機能を測定した。

次に、静注ビタミン D 製剤投与中の二次性副甲状腺機能亢進症症例 12 例に対し、シナカルセト 25 mg/日を投与し、投与開始時 (0 W)、開始後 2 週、4 週、6 週、8 週週後のアルブミン酸化度、AOPP、血清 Ca、Pi、intact-PTH および Endo-PAT 2000 を用いて血管内皮機能を測定した。

今回、酸化ストレスマーカーとしてアルブミン酸化度を指標としたが、その原理は、アルブミンの 34 位に唯一存在する Cys が血中の SH 基の約 80% を占めることから、この酸化-還元状態をモニタリングすることで、病態の酸化ストレスや本剤の抗酸化効果を簡便かつ感度よく評価することが可能であることによる。具体的には、SH 基が還元状態のメルカプトアルブミン (HMA) や酸化状態のノンメルカプトアルブミン

(HNA) 濃度、あるいはこれらの存在比 (HNA/HMA: アルブミン酸化度) を指標とする。

① 患者血清

本研究に使用した検体は、採血後 30 分静置後、上清を血清として遠心分離し、実験に使用するまで -80°C で凍結保存した。

② アルブミン酸化度の HPLC による解析

カラム: Shodex Asahipak ES502-N 7C (f7.6 X 100 mm) (Shodex 社)

ポンプ: Jasco PU-2080iPlus 型 (日本分光製)

検出器: Jasco FP-2025Plus 型 (日本分光製)

移動相: A: EtOH, B: 0.05M sodium acetate-0.4M sodium sulfate buffer (pH 4.85)

グラジエント条件: 0~5 min; A 100%, 5~30 min; A 95%, 30~35 min; A 100%

測定波長: 蛍光モニター (励起波長/蛍光波長 = 280 nm/340 nm)

流速: 1.0 mL/min

③ アフィニティーカラムを用いた血清からの HSA の単離

患者血清を、HSA の精製に汎用されるアフィニティーカラム Blue Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare 社) に付し、50 mM NaPB で洗浄後、elution buffer (3 mM NaCl in 50 mM NaPB) を加え HSA 画分を溶出した。溶出液を脱塩カラムを用いて塩を除き HSA 溶液として調製した。

④ 血中 AOPP 含量の測定

AOPP 含量は Witko-Sarsat らの方法³⁴⁾により測定した。100 μ L の血清サンプル (PBS にて 10 倍希釈) にイオン交換水 10 μ L、酢酸 20 μ L を混和し、340 nm における吸光度を TECAN SPECTRA fluor plus (Tecan 社) により測定した。0~100 μ M のクロラミン T 溶液 100 μ L に、1.16 M ヨウ化カリウム 10 μ L、酢酸 20 μ L を混和し測定したものを検量線とし、AOPP 濃度を算出した。

⑤ 統計解析

実験データおよび検査データは平均値 \pm 標準偏差で示し、検査データの時間変化は平均値 \pm 標準誤差で示した。各データについて有意差検定の前に χ^2 検定により正規性を確認した。患者データの有意差検定の 2 群間においては Wilcoxon 符号付順位検定を用いて行い、*in vitro* 実験系の 2 群間においては Student の t 検

定を用いて行った。危険率が0.05未満であるとき統計学的に有意差があると評価した。3群以上のデータについてはScheffe法による多重比較検定を行い、危険値が0.05未満であるとき統計学的に有意差があると評価した。血管内皮細胞を用いた *in vitro* 実験系の3群以上のデータについては、Dunnnettの多重比較検定を用いて、controlに対する統計的有意差を確認した。

2 結果

2-1 ビタミンD投与による生化学的パラメータ

観察期間中、ビタミンD投与によるPTH濃度、Ca、Pi濃度の有意な変化は観察されなかった。なお、血中尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cre)、Alb濃度およびALP活性も、観察期間中に有意な変化は認められなかった。

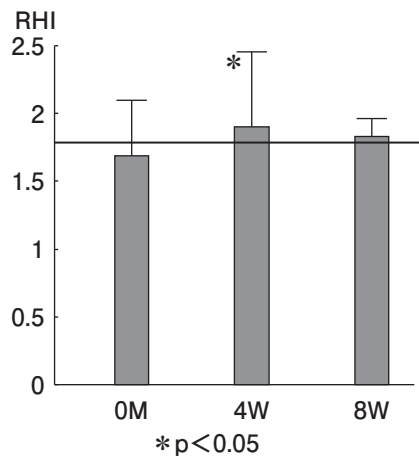


図1 ビタミンD投与と血管内皮機能

2-2 ビタミンD投与が循環血中の酸化ストレスに及ぼす影響

前述のとおり、ビタミンDの投与前後で生化学的パラメータの有意な変化は認めなかったが、酸化ストレスマーカーであるアルブミン酸化度を算出したところ、ビタミンD投与により有意に低下した (0W 2.5 ± 0.9, 4W 1.3 ± 0.8, 8W 1.5 ± 0.6, p < 0.01)。

2-3 ビタミンD投与が血管内皮機能に及ぼす影響

図1に示すように、Endo-PAT 2000を用いた血管内皮機能は有意な改善を認めた (0W 1.55 ± 0.47, 4W 1.80 ± 0.61, 8W 1.83 ± 0.56, p < 0.05)。

2-4 シナカルセト投与による生化学的パラメータ

シナカルセト投与後、PTH濃度の有意な低下が観察され、8週目では、投与前の半分程度まで減少していた。また、Ca、Pi濃度の低下傾向が観察されるとともに、Ca×P値の有意な減少が認められた。これらの結果から、シナカルセト療法が十分な治療効果を発揮していることが確かめられた。なお、BUN、Cre、Alb濃度およびALP活性の場合、観察期間中に有意な変化は認められなかった。

2-5 シナカルセトが循環血中の酸化ストレスに及ぼす影響

シナカルセトの投与前後での患者血清のアルブミン酸化度を測定した結果、還元型アルブミン (HMA) の増加と酸化型アルブミン (HNA) の減少が観察された (図2A)。また、両者の比よりアルブミン酸化度

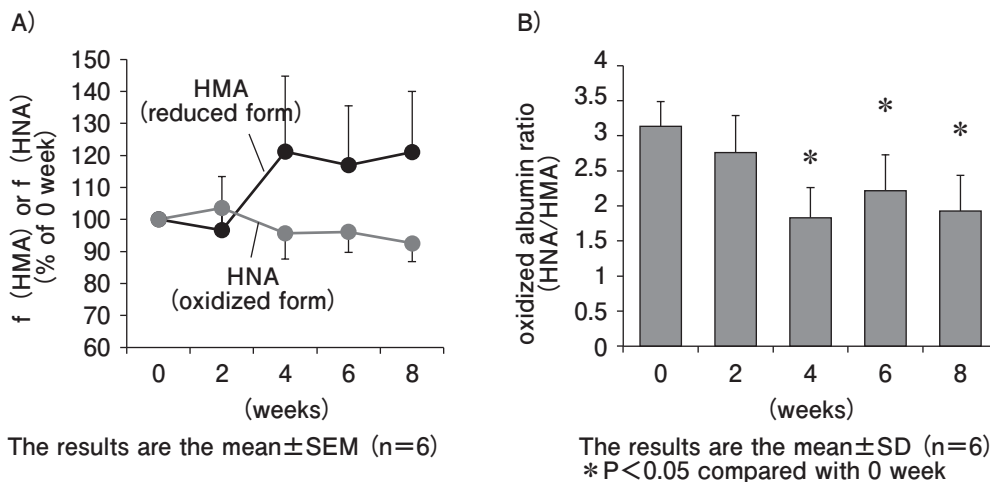


図2 シナカルセトが循環血中の酸化ストレスに及ぼす影響

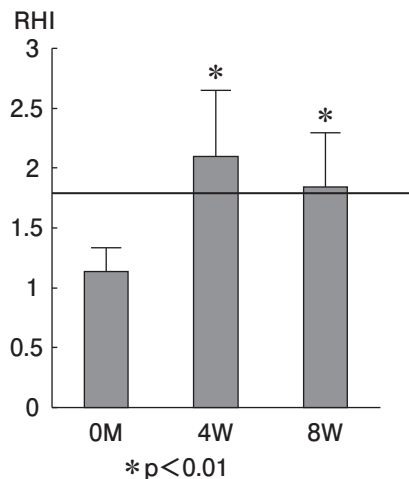


図3 シナカルセット投与と血管内皮機能

を算出したところ、シナカルセット投与により有意に低下した (図 2B)。

2-6 シナカルセットが血管内皮機能に及ぼす影響

シナカルセット投与により、Endo-PAT 2000 を用いた血管内皮機能も有意な改善を認めた (0 W 1.14 ± 0.49 , 4 W 2.09 ± 1.35 , 8 W 1.85 ± 0.82 , $p < 0.01$) (図 3)。

3 考察

近年、筆者らは、二次性副甲状腺機能亢進症を合併した透析患者に対する静注ビタミンD投与により、酸化ストレスマーカーが有意に低下・改善することを報告した¹²⁾が、今回の検討においては、酸化ストレスマーカーの改善のみならず血管内皮機能の有意な改善も認めた。この結果は、二次性副甲状腺機能亢進症患者に対するビタミンD投与が、抗酸化能を発揮することにより、血管内皮機能を改善し、ひいては心血管系リスクを改善すると考えられた。

さらに、二次性副甲状腺機能亢進症を合併した透析患者に対するビタミンD・シナカルセット併用投与によっても、酸化ストレスマーカーが有意に低下・改善するのみならず、血管内皮機能の著明な改善が認められた。この結果によって、Cunninghamらにより報告¹³⁾されたシナカルセット投与による心血管系疾患リスク低下の機序の一つとして、シナカルセットの抗酸化能および血管内皮機能改善効果が示唆された。

近年、血液透析患者において、経口あるいは静注ビタミンD製剤投与群が非投与群に比し、心血管系リスクが有意に低いことが報告⁹⁻¹¹⁾されているが、その

機序は未だ解明されていない。今回、筆者らが示したビタミンD投与による酸化ストレス改善効果は、ビタミンDの多面的な作用の一つと考えられるが、その機序としては、ビタミンDのRAS系抑制作用や抗炎症作用などが考えられる。

一方、ビタミンD・シナカルセット併用投与による酸化ストレスマーカーの改善は、Ca, Pi, PTHの低下を介したものの可能性が示唆され、ビタミンDとは異なる機序と考えられる。その機序解明にあたっては、さらなる検討が必要である。今回の検討結果より、ビタミンD・シナカルセット併用投与による抗酸化作用および血管内皮機能の著明な改善が、透析患者における心血管系疾患のリスク改善につながるものと考えられた。

4 結論

以上の結果より、本研究では、二次性副甲状腺機能亢進症患者に対するビタミンDおよびシナカルセット投与が、二次性副甲状腺機能亢進症患者において抗酸化作用を発揮することが明らかになった。さらにビタミンDおよびシナカルセット投与は、抗酸化作用を発揮するのみならず、血管内皮機能を改善することが明らかになった。

本研究は平成22年度日本透析医会公募研究助成によるものである。

文 献

- 1) Mastalerz-Migas A, Steciwko A, Pokorski M, et al. : What influences the level of oxidative stress as measured by 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in patients on hemodialysis? J Physiol Pharmacol, 57; 199-205, 2006.
- 2) Sasaki S, Yokozawa T, Cho EJ, et al. : Protective role of gamma-aminobutyric acid against chronic renal failure in rat. J Pharm Pharmacol, 58; 1515-1525, 2006.
- 3) Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, et al. : Reactive oxygen species produced by macrophage-derived from cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implication for atherosclerotic plaque stability. J Clin Invest, 98; 2572-2579, 1996.
- 4) Weber DS, Taniyama Y, Rocic P, et al. : Phosphoinositide-dependent kinase 1 and p21-activated protein kinase mediate reactive oxygen species-dependent regulation of platelet-derived growth factor-induced smooth muscle cell migration. Circ Res, 94; 1219-1226, 2004.

- 5) Taniyama Y, Griendling KK : Reactive oxygen species in the vasculature : molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*, 42; 1075-1081, 2003.
- 6) Hanna IR, Taniyama Y, Szocs K, et al. : NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species as mediators of angiotensin signaling. *Antioxid Redox Signal*, 4; 899-914, 2002.
- 7) Miyamoto Y, Watanabe H, Otagiri M, et al. : New insight into the redox properties of uremic solute indoxyl sulfate as a pro- and anti-oxidant. *Ther Apher Dial*, 15; 129-131, 2011.
- 8) Fujii H, Nakai K, Fukagawa M : Role of oxidative stress and indoxyl sulfate in progression of cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Ther Apher Dial*, 15; 125-128, 2011.
- 9) Shoji T, Shinohara K, Kimoto E, et al. : Lower risk for cardiovascular mortality in oral 1 alpha-hydroxy vitamin D3 users in a haemodialysis population. *Nephrol Dial Transplant*, 19; 179-184, 2004.
- 10) Teng M, Wolf M, Lowrie E, et al. : Survival of patients undergoing hemodialysis with paricalcitol or calcitriol therapy. *N Engl J Med*, 349; 446-456, 2003.
- 11) Teng M, Wolf M, Ofsthun MN, et al. : Activated injectable vitamin D and hemodialysis survival: a historical cohort study. *J Am Soc Nephrol*, 16; 1115-1125, 2005.
- 12) Tanaka M, Tokunaga K, Komaba H, et al. : Vitamin D receptor activator reduces oxidative stress in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Ther Apher Dial*, 2011.
- 13) Cunningham J, Danese M, Olson K, et al. : Effects of the calcimimetic cinacalcet HCl on cardiovascular disease, fracture, and health-related quality of life in secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int*, 68; 1793-1800, 2005.