

血管石灰化に対するマグネシウムの治療効果とその分子機構の解明

黒尾 誠

自治医科大学分子病態治療研究センター抗加齢医学研究部

概要 動脈硬化には、粥状硬化と血管石灰化という二つの異なる病態が混在する。粥状硬化では「悪玉コレステロール(LDL)」が治療標的だが、血管石灰化では明確な治療標的が確立されていない。しかし最近、①リン酸カルシウムのコロイド粒子(CPP)の血中レベルが血管石灰化の指標と相関すること、②CPPには細胞障害や炎症反応を引き起こす病原活性があること、などが報告され、CPPが血管石灰化の原因物質であり、治療標的となる可能性が指摘されている。本研究では、血中CPPが高値で血管石灰化をきたすKlotho欠損マウスをモデルに、CPPを低下させるような薬物介入を行い、血管石灰化が治療できるかどうか検証することを目指した。

我々は、リン酸カルシウムの析出を阻害する物質としてマグネシウムに着目した。試験管内ではマグネシウムがCPPの形成を阻害することを確認したので、Klotho欠損マウスを高マグネシウム食(0.18%マグネシウム含有)で飼育し、血管石灰化が軽減するかどうか検討した。ほとんどのマウスが高マグネシウム食に適応できずに死亡してしまったが、適応に成功した少数のマウスでは、普通食(0.06%マグネシウム含有)で飼育したマウスよりも大動脈の石灰化マーカー(osteopontin)の発現が低下しており、マグネシウムの治療効果を示唆する結果が得られた。今後は、低マグネシウム食(0.02%マグネシウム含有)でKlotho欠損マウスを飼育すると血管石灰化が悪化するかどうか検討する予定である。

我々は、血中には少なくとも2種類の物性の異なるCPP、すなわち比重が高く粒子径の大きい高密度CPP(High-density CPP; H-CPP)と比重が低く粒子径の小さい低密度CPP(Low density-CPP; L-CPP)が存在することを見出した。さらに、健常者の血中にはL-CPPしか存在しないのに対し、慢性腎臓病患者の血中にはH-CPPが出現することが分かった。マウスにおいても、野生型マウスの血中にはL-CPPしか存在しないのに対し、Klotho欠損マウスの血中には、透析患者と同様、L-CPPだけでなくH-CPPも存在することが分かった。つまり、H-CPPの方がL-CPPよりも病原性が高いと予想される。したがって、マグネシウムがCPPに及ぼす効果も、CPPの血中レベルだけでなくCPPの物性、すなわちL-CPPとH-CPPの比を変える可能性についても検討する必要があることが分かった。

1. 研究目的

日本人成人の8人に1人が患う国民病が存在する。慢性腎臓病である。糖尿病や高血圧の合併症として、あるいは老化現象の一環として起こる場合が多く、進行して腎不全に至れば透析が必要となる。人口の高齢化と共に透析患者数は毎年約1万人のペースで増え続け、2011年には遂に30万人を超えた。透析患者の多くは、血管石灰化に起因する心血管病で命を落とす。血管石灰化の危険因子に高リン血症が同定されて以来、リン制限で血中リンを下げる治療が行われている。

リン制限には、大きく分けて食事療法と薬物療法の二つの方法がある。食事療法では、リンの含有量が多い食材や食品添加物を避けるような栄養指導が中心となる。しかし、リンはほとんどすべての食材、特に蛋白質の豊富な食材(乳製品、肉類など)に多く含まれているので、リン制限食とはすなわち蛋白制限食を意味し、厳格なリン制限食は低栄養をきたして、かえって予後を悪化させることが示唆されている。一方、薬物療法としては、消化管内で食餌中のリンをキレートすることで吸収を阻害する「リン吸着剤」が用いられているが、副作用(便秘、下痢、嘔気など

の消化器症状)や服薬コンプライアンスの問題があり、十分量を服薬できない症例も少なくない。このように、透析患者に実効性のあるリン制限を行うことは必ずしも容易でないが、リンがなぜ悪いのか、そのメカニズムが不明なため、リン制限以外に治療法の選択肢がないのが現状である。

1.1 高リン血症が血管石灰化をもたらすメカニズム

培養細胞を用いた実験では、培地中のリン濃度を上昇させると、細胞に様々な変化が起こることが報告されている。例えば、血管内皮細胞はアポトーシスを起こす⁽¹⁾、血管平滑筋細胞は骨芽細胞様の形質変換、すなわち平滑筋マーカー(α -smooth muscle actin など)の発現低下と骨芽細胞マーカー(Runx2 や Osteopontin など)の発現上昇が誘導され、石灰化を起こす⁽²⁾。このような「リンの細胞毒性」は、細胞外のリンが細胞内に流入することが原因と信じられていた。というのも、細胞外のリンを細胞内に取り込むトランスポーター(ナトリウム依存性リン酸共輸送担体; PiT1)の阻害剤(と信じられていた) phosphonoformic acid の存在下では、平滑筋細胞の骨芽細胞様形質変換や石灰化が減弱することが報告されたからである⁽³⁾。

ところが、この考え方に対する反証が提示された。通常の培地中のリンとカルシウムの濃度はそれぞれ約 1 mM と 2 mM で、過飽和の状態である。したがって、リン濃度を 1 ~ 2 mM 上昇させるだけでも、それが cue となって培地中にリン酸カルシウムが析出する。つまり、「リンの細胞毒性」がリン酸イオンそのもののせいなのか、リン濃度上昇の結

果として培地中に形成されたリン酸カルシウムのせいなのか問題となった。その後、リンの細胞毒性を防ぐ phosphonoformic acid には、実は PiT1 を阻害する作用はなく、リン酸カルシウムの析出を抑制する作用があることが報告された⁽⁴⁾。さらに、培地にリン酸カルシウム結晶を加えれば、培地中のリン濃度を上げなくても「リンの細胞毒性」が誘導されることも報告され⁽⁵⁾、リンの細胞毒性の真犯人は「リン酸カルシウム」であることが証明された。

1.2 CPP(Calcioprotein particle)と血管石灰化

高リン血症の患者の血中にリン酸カルシウムが析出しても、血中に大量に存在する血清蛋白 Fetuin-A がこれを直ちに吸着するので、血中でリン酸カルシウムが大きな結晶に成長することはない。リン酸カルシウムの小さな結晶を吸着した Fetuin-A 分子はお互いに凝集し、直径 100 nm 前後のナノ粒子を形成して、コロイド状に液相に分散する (Fig. 1)⁽⁶⁾。このコロイド粒子のことを CPP (Calcioprotein particle)と呼んでおり、実際、透析患者の血中には CPP が出現する^(7,8)。

リン酸カルシウムは、Fetuin-A に吸着されると、結晶の成長が阻害されるだけでなく、その細胞毒性もある程度緩和されるが⁽⁹⁾、それでも CPP は無害ではない。CPP には、あたかも「病原体」のように、自然免疫反応や細胞障害を誘導する活性がある。さらに最近の臨床研究で、血中 CPP レベルが血管石灰化の指標と正相関することが報告され^(7,8)、血管石灰化の原因が CPP による血管障害と慢性炎症である可能性が示されたことから、CPP が新たな治療

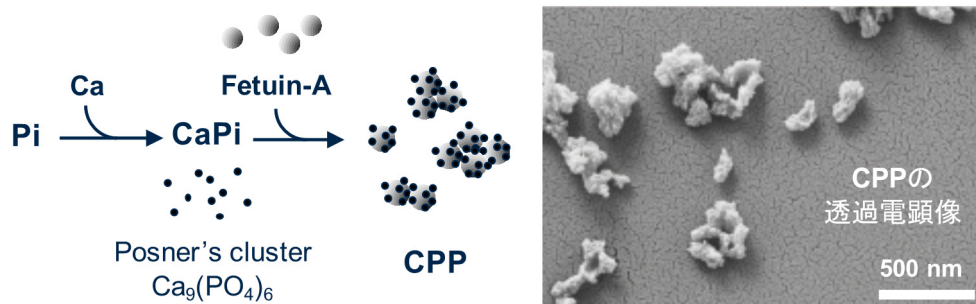


Fig 1 : Formation of CPP When concentration of phosphate (Pi) and calcium (Ca) exceeds the solubility limit, precipitations of solid-phase calcium phosphate are generated. The smallest particles of calcium phosphate are ~9.5 angstrom in diameter and called Posner's clusters usually expressed as $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$. A single molecule of fetuin-A is believed capable of absorbing up to 120 Posner's clusters. Fetuin-A molecules laden with Posner's clusters aggregate spontaneously to form nanoparticles, which are designated as calcioprotein particles (CPPs) and dispersed in the liquid phase (Kuro-o M. *Nat Rev Nephrol* 9, 650-660, 2013)

標的として注目されるようになった。

1. 3 CPP 形成阻害剤としてのマグネシウム

リン酸カルシウムの析出を抑制する薬剤は、当然のことながら *in vitro* で CPP 形成を抑制する。上述した phosphonoformic acid の他にも、ピロリン酸などもリン酸カルシウムの析出を抑制することが知られているが、これらの薬剤は毒性の問題や生体内での分解の問題があり、実用には向かない可能性が高い。それに対してマグネシウム(にがりの主成分)は、食品からも摂取できるし、酸化マグネシウムは「カマ」の愛称で緩下剤として古くから使われてきた歴史もあり、リン酸カルシウム形成阻害剤として実用性が高いと考えられる。さらに疫学研究では、マグネシウムの摂取量と心血管イベントが逆相関すると指摘されている⁽¹⁰⁾。これは、マグネシウムがリン酸カルシウムの析出を阻害することで CPP 形成を抑制し、血管石灰化を軽減した結果である可能性が考えられる。

本研究では、マウスの血管石灰化モデルにマグネシウムを投与すると、血中 CPP レベルが低下して血管石灰化が軽減するか検証し、マグネシウムの心血管病に対する効果の分子機構を明らかにすることを目的とする。

2. 研究方法

2. 1 血管石灰化モデルマウス

本研究では、血管石灰化モデルとして Klotho 欠損マウスを用いる⁽¹¹⁾。これは申請者が樹立した突然変異マウス

で、4 週齢頃から血管石灰化や高リン血症など、透析患者に似た多彩な症状を呈し、8 週齢頃に死亡してしまう。

Klotho 遺伝子は、一回膜貫通型膜蛋白をコードしており、主に腎臓の尿細管細胞に限局して発現している。Klotho 蛋白は、線維芽細胞成長因子(Fibroblast growth factor; FGF)の受容体(FGF receptor; FGFR)の特定のアイソフォーム(FGFR1c, FGFR3c, FGFR4)と複合体を形成する性質がある⁽¹²⁾。この FGFR-Klotho 複合体は、FGF ファミリーの一員である FGF23 の高親和性受容体として機能する⁽¹²⁾。FGF23 は、リンを摂取すると骨細胞から分泌されて血中を流れ、腎尿細管に発現する FGFR-Klotho 複合体に結合すると、尿細管におけるリン再吸収を抑制し、尿中リン排泄を増やす。つまり、FGF23 は「リン利尿ホルモン」として機能する(Fig. 2)⁽¹³⁾。Klotho 欠損マウスは、FGF23 が高値にもかかわらず、受容体が存在しないために機能できず、リン排泄障害による高リン血症を呈し、血中 CPP が上昇する。透析患者も Klotho の発現が低下し、血中リン、FGF23, CPP が上昇する。つまり Klotho 欠損マウスは、症状だけでなく病態も透析患者と似ている上、血管石灰化の発症時期・重症度に個体差が少ない特徴もあり、本研究に最適のモデルと考えられる。

2. 2 実験のデザイン

Klotho 欠損マウスは、遅くとも 4 週齢ころから大動脈に中膜石灰化が認められ、8~9 週齢で死亡してしまうので、まず離乳時(3 週齢)からマグネシウム含有量の異なる飼

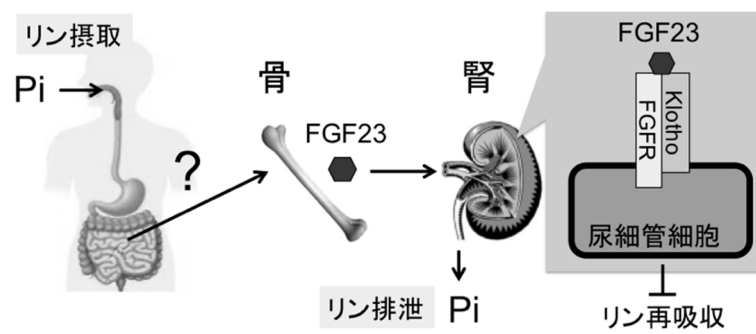


Fig 2 : The FGF23-Klotho endocrine system FGF23 is a peptide hormone secreted from osteocytes and/or osteoblasts when they sense phosphate (Pi) ingestion through a mechanism yet to be identified. FGF23 requires Klotho, a single-pass transmembrane protein⁽¹¹⁾, for binding to fibroblast growth factor receptor (FGFR). In contrast to ubiquitous expression of FGFRs, expression of Klotho is limited to renal tubular cells, rendering the kidney a target organ of FGF23. Binding of FGF23 to the Klotho-FGFR complex results in increase in urinary phosphate excretion (phosphaturia), thereby maintaining phosphate homeostasis.

料を与え、血管石灰化に対する予防効果を評価することとした。マグネシウム含有量は、0.06% (普通食) または 0.18% (高マグネシウム食) の 2 群を設定する。

6 週齢で代謝ケージに移し、餌の摂取量を測定後、血液と大動脈を採取する。血中 CPP を測定し、血管石灰化と慢性炎症の指標を測定する。すなわち、

- 1) 血清: リン, カルシウム, マグネシウムをドライケム法 (富士フィルム) で、炎症性サイトカイン (IL-6, IL-1 β , TNF- α , MCP-1) をマルチプレックス法 (BioRad) で測定する。
- 2) ヘパリン血漿: CPP を、申請者が開発した方法 (特許申請中) で測定する。
- 3) 大動脈: RNA を抽出し、平滑筋細胞マーカー (α SMA, SM22 α) と骨芽細胞マーカー (Runx2, Osteopontin, Osteocalcin) の mRNA レベルを定量的 RT-PCR で測定する。さらに、大動脈を *ex vivo* で Osteosense 染色し、近赤外線スキャナーでリン酸カルシウム結晶の含有量を測定する。

これらの指標が、普通食群と高マグネシウム食群の間で有意な差があるか解析する。予備実験から、 $N=8$ で各指標について十分な検出力が得られることを確認したので、各群 8 匹分のデータを取得する。仮説が正しければ、普通食群に比べて高マグネシウム群では、血中 CPP と炎症性サイトカインの低下、大動脈の平滑筋細胞マーカーの発現上昇と骨芽細胞マーカーの発現低下、大動脈のリン酸カルシウム結晶含有量の低下などの治療効果が認められるはずである。

3. 研究結果

3.1 高マグネシウム食の影響

Klotho 欠損マウスは、リン恒常性の破綻による高リン血症や、その結果と考えられる血管石灰化の他にも、実にさまざまな病態を呈する。離乳後間もなくから、成長障害、多臓器の萎縮 (性腺、胸腺、骨格筋、皮膚など)、骨粗鬆症、心肥大、老人肺、認知症、難聴などを次々と発症し、フレイルの状態となって早期に死亡する。平均寿命は 8~9 週齢である。このように Klotho 欠損マウスは、あたかも老化が加速した様な「早老症」を呈する。これまでの研究で、Klotho 欠損マウスを低リン食で飼育し、リン貯留を解消してやると、高リン血症や血管石灰化だけでなく、上記のような多彩な老化様症状もほとんど全て消失することを確認

している。低リン食で飼育していれば、成長障害に関しても、野生型マウスよりはやや小さいものの順調な体重増加が認められる。

もし、高マグネシウム食が低リン食と同等の治療効果を持つのであれば、成長障害も改善するはずであり、解剖して血液や臓器を解析しなくても治療効果の有無がある程度予測できる可能性がある。そこで先ず、普通食 (リン 0.35%, マグネシウム 0.06%) と全く同じ組成で、マグネシウムの含有量だけを 3 倍に増やした餌 (リン 0.35%, マグネシウム 0.18%) を、オリエンタル酵母 (株) に依頼して作成した。次に、この高マグネシウム食を Klotho 欠損マウスに離乳時から与え、体重の変化を追跡した。

高マグネシウム食で飼育した Klotho 欠損マウスは、低リン食で飼育した場合のような順調な体重増加は認められず、逆に体重の減少と寿命の短縮が認められ、数匹を除いて全ての Klotho 欠損マウスが 6 週齢に達する前に死亡してしまっただけであった。予想に反する結果であったが、摂餌量を測定したところ、死亡した Klotho 欠損マウスは高マグネシウム食をほとんど摂取していないことが分かった。ただし、数匹だけ高マグネシウム食に適応して 6 週齢まで生存した Klotho 欠損マウスがいたので、大動脈の RNA を抽出し、石灰化マーカーの発現を qPCR で定量したところ、普通食で飼育した Klotho 欠損マウスに比べ、Osteopontin の発現が低下していた。

3.2 CPP の物理化学的性状

試験管内で CPP を合成する場合、分散媒中のリン酸とカルシウムのイオン濃度、Fetuin-A 濃度の他、温度、pH、インキュベートする時間、共存するその他のイオンや蛋白や薬剤の種類や濃度などの条件が異なると、構造・物性・組成の異なる CPP が形成される。つまり、血中にも構造・物性・組成といった物理化学的性状の異なるさまざまな CPP が存在する可能性がある。一般に、物理化学的性状が異なるコロイド粒子は生理活性も異なる。典型例は、リポ蛋白の LDL と HDL である。LDL は、粒子径が大きく比重の軽いリポ蛋白で、粥状硬化を促進する悪玉コレステロールである。一方、HDL は、粒子径が小さく比重が重いリポ蛋白で、LDL とは逆に粥状硬化を抑制する善玉コレステロールである。つまり、物理化学的性状の異なる CPP も生理活性が大きく異なる可能性がある。

本研究で申請者は、血中には少なくとも 2 種類の物性

の異なる CPP, すなわち比重が高く粒子径の大きい高密度 CPP (High-density CPP; H-CPP) と比重が低く粒子径の小さい低密度 CPP (Low density-CPP; L-CPP) が存在することを見出した。さらに、健常者の血中には L-CPP しか存在しないのに対し、慢性腎臓病患者の血中には H-CPP が出現することが分かった (Fig. 3)。

マウスにおいても、野生型マウスの血中には L-CPP しか存在しないのに対し、Klotho 欠損マウスの血中には、透析患者と同様、L-CPP だけでなく H-CPP も存在することが分かった。

4. 考察

高マグネシウム食で飼育すると、Klotho 欠損マウスの生存率が著しく低下する、という結果は、予想に反するものであった。しかし、Klotho 欠損マウスが高マグネシウム食をほとんど摂餌していなかったことから、これはマグネシウムが Klotho 欠損マウスの症状を悪化させたというよりは、高マグネシウム食が不味いため(おそらく苦い?)、十分摂食できなかったことが死因と考えられた。

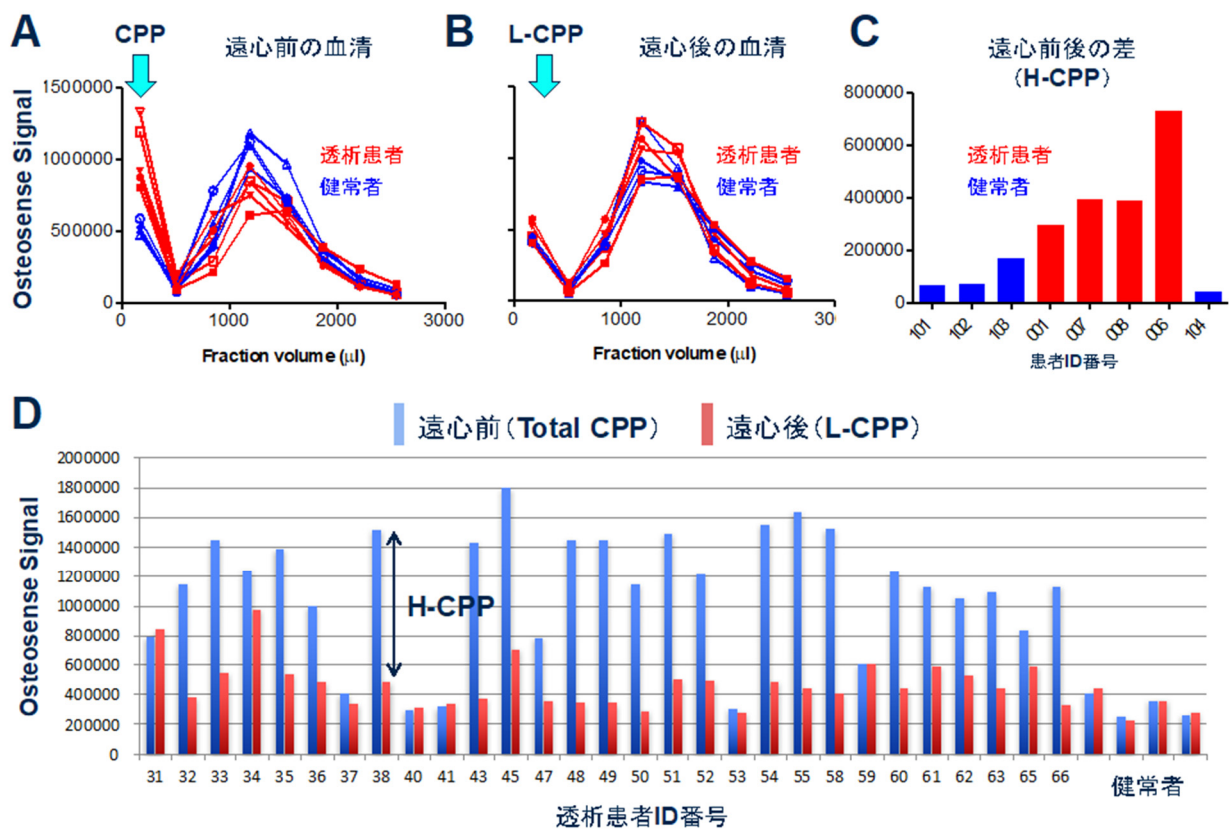


Fig 3 : CPPs with different physical properties (A) Serum samples from normal individuals (blue) and hemodialysis patients (red) were incubated with Osteosense (a fluorescence probe that bound to CPPs) and then fractionated by gel filtration. The first sharp peak (arrow) represented CPPs. The second broad peak represented free Osteosense. (B) Same as (A), except that serum samples were centrifuged at 16,000 g for 2 hours. This centrifugation condition was believed to precipitate CPPs and thus no peak for CPPs was expected. However, the peak for CPPs was observed in serum samples after the centrifugation, indicating that low-density CPPs (L-CPP) that were not precipitated by the centrifugation existed in both normal individuals and hemodialysis patients. (C) High-density CPPs (H-CPP) that were precipitated by the centrifugation were calculated by taking the difference between the Osteosense signal before and after the centrifugation. H-CPPs were found mainly in hemodialysis patients. (D) H-CPP and L-CPP levels in serum samples from 29 hemodialysis patients and 4 normal individuals.

Klotho 欠損マウスは、インスリン感受性が亢進して低血糖であり、絶食 (starvation) に対して非常に弱く、一晚 (16 時間) の絶食に耐えられずに死亡することが分かっている。通常のマウスなら高マグネシウム食に適応できる場合でも、Klotho 欠損マウスは適応する前に低血糖で死亡してしまったものと考えられた。

高マグネシウム食に適応して生存した数匹の Klotho 欠損マウスでは、大動脈における石灰化のマーカ遺伝子 (osteopontin) の発現が抑制されていたことから、仮説 (マグネシウムが CPP 形成を抑制して血管石灰化を軽減する) が正しい可能性は残されている。今後は実験デザインを変更し、改めて仮説の検証を行う。

5. 今後の課題

Klotho 欠損マウスを高マグネシウム食で飼育することは難しいことが分かったので、高マグネシウム食と普通食を比較するのではなく、普通食と低マグネシウム食を比較し、

低マグネシウム食で CPP が増加して血管石灰化が悪化するかどうか検討する方向で、現在、新たな実験を開始している。

健常者や野生型マウスの血中には主に L-CPP しか存在しないのに対し、透析患者や Klotho 欠損マウスの血中には L-CPP だけでなく H-CPP も存在することから、H-CPP の方が L-CPP よりも病原性が高いと予想される。したがって、マグネシウムが CPP に及ぼす効果も、CPP の血中レベルだけでなく CPP の質、すなわち L-CPP と H-CPP の比を変える可能性についても検討する必要がある。

申請者は最近、CPP の粒度分布を測定する方法を開発中である。これは、コロイド物理学の分野で利用されている「ナノ粒子トラッキング法」という方法で、これまでに合成 CPP の粒度分布の測定に成功しており、現在血漿サンプル中の CPP の測定条件を検討しているところである。この方法が確立すれば、マグネシウムが CPP の粒度分布に及ぼす影響も検討可能になることが期待される (Fig. 4)。

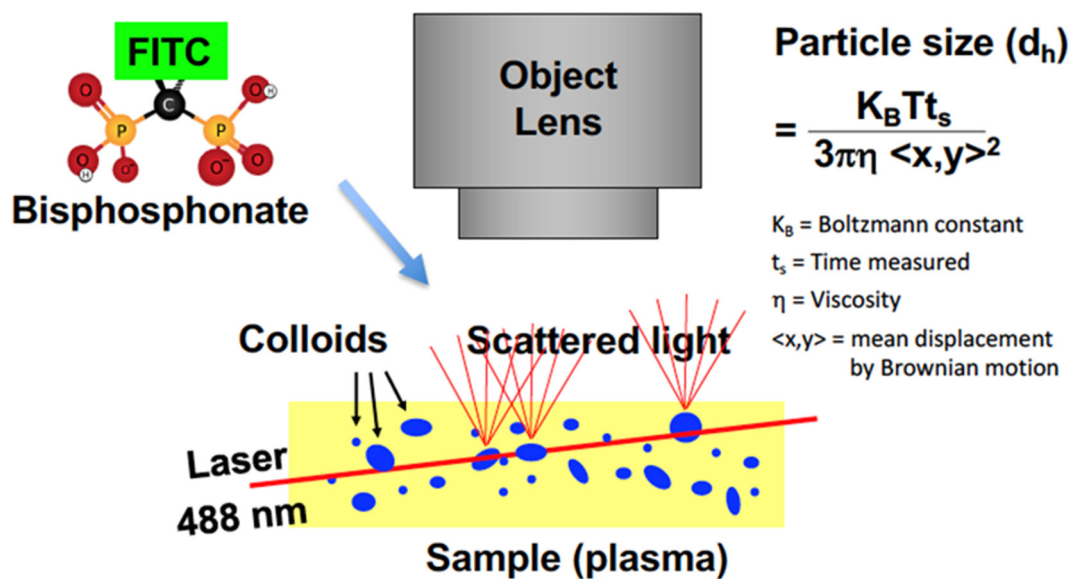


Fig 4 : Nanoparticle tracking analysis (NTA) Liquid samples containing colloidal particles were irradiated with laser. When the laser hit a particle, scattered light was elicited, which was observed under a light microscope. By monitoring Brownian motion of the scattered light, the particle size was calculated using the Einstein-Stokes equation. By adding FITC-labeled bisphosphonate to the samples and observing the scattered light through an FITC filter, one can selectively observe CPPs in plasma samples.

6. 文 献

- 1 Di Marco GS, Hausberg M, Hillebrand U, Rustemeyer P, Wittkowski W, Lang D & Pavenstadt H. Increased inorganic phosphate induces human endothelial cell apoptosis in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol* 294, F1381-F1387, 2008.
- 2 Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H & Giachelli CM. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 87, E10-17, 2000.
- 3 Li X, Yang HY & Giachelli CM. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 98, 905-912, 2006.
- 4 Villa-Bellosta R & Sorribas V. Phosphonoformic acid prevents vascular smooth muscle cell calcification by inhibiting calcium-phosphate deposition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 761-766, 2009.
- 5 Ewence AE, Bootman M, Roderick HL, Skepper JN, McCarthy G, Epple M, Neumann M, Shanahan CM & Proudfoot D. Calcium phosphate crystals induce cell death in human vascular smooth muscle cells: a potential mechanism in atherosclerotic plaque destabilization. *Circ Res* 103, e28-34, 2008.
- 6 Kuro-o M. Klotho, phosphate and FGF-23 in ageing and disturbed mineral metabolism. *Nat Rev Nephrol* 9, 650-660, 2013.
- 7 Hamano T, Matsui I, Mikami S, Tomida K, Fujii N, Imai E, Rakugi H & Isaka Y. Fetuin-mineral complex reflects extraosseous calcification stress in CKD. *J Am Soc Nephrol* 21, 1998-2007, 2010.
- 8 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* 27, 1957-1966, 2012.
- 9 Smith ER, Hanssen E, McMahon LP & Holt SG. Fetuin-A-containing calciprotein particles reduce mineral stress in the macrophage. *PLoS One* 8, e60904, 2013.
- 10 Hruby A, O'Donnell CJ, Jacques PF, Meigs JB, Hoffmann U & McKeown NM. Magnesium intake is inversely associated with coronary artery calcification: the Framingham Heart Study. *JACC. Cardiovascular imaging* 7, 59-69, 2014.
- 11 Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R & Nabeshima Y. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390, 45-51, 1997.
- 12 Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Baum MG, Schiavi S, Hu MC, Moe OW & Kuro-o M. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *J Biol Chem* 281, 6120-6123, 2006.
- 13 Hu MC, Shiizaki K, Kuro-o M & Moe OW. Fibroblast growth factor 23 and klotho: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. *Annu Rev Physiol* 75, 503-533, 2013.

Molecular Mechanism behind the Therapeutic Effect of Magnesium on Vascular Calcification

Makoto Kuroo

Jichi Medical University

Summary

Two types of pathology exist in arteriosclerosis, namely, atherosclerosis and vascular calcification. In atherosclerosis, low-density lipoprotein (LDL) or 'bad' cholesterol has been established as a therapeutic target. In contrast, no such therapeutic target has been identified in vascular calcification. However, recent studies suggest that calciprotein particles (CPPs), colloidal particles composed of calcium-phosphate dispersed in the blood, may be a causative agent that induces vascular damage and chronic inflammation, and thus can be a therapeutic target for vascular calcification. The aim of this project is to determine whether vascular calcification can be treated with reagents that lower serum CPP levels in animal studies. We used Klotho-deficient mice as a model for vascular calcification associated with elevated serum CPP levels.

Because magnesium inhibited formation of CPPs *in vitro*, we placed Klotho-deficient mice on high magnesium diet (containing 0.18% magnesium) at weaning and asked if vascular calcification might be ameliorated. Unexpectedly, the majority of Klotho-deficient mice failed to adapt themselves to the high magnesium diet and died within a week. We analyzed aortas from a few survivors and observed decrease in expression of osteopontin, a marker of calcification, when compared with those from Klotho-deficient mice fed normal diet (containing 0.06% magnesium). To avoid death from maladaptation to the high magnesium diet, we are planning to compare between Klotho-deficient mice fed the normal diet and those fed low magnesium diet (containing 0.02% diet).

We identified two types of CPPs with different physical properties, namely, high-density CPPs (H-CPPs) and low-density CPPs (L-CPPs). L-CPPs were found in the blood from both normal individuals and dialysis patients with severe vascular calcification. In contrast, H-CPPs exist only in the blood from dialysis patients. Similarly, H-CPPs exist only in Klotho-deficient mice, but L-CPPs were found in both wild-type mice and Klotho-deficient mice, implying that H-CPPs may be primarily responsible for vascular calcification. In future studies, it will be necessary to determine potential effects of magnesium not only on serum levels but also on physical properties of CPPs (e.g. ratio of H-CPPs to L-CPPs).