

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09737

研究課題名(和文) iPS細胞を利用した腎不全時における骨のPTH抵抗性の病態モデルの作製

研究課題名(英文) Establishment of Pathological Model of Skeletal resistance to PTH in Uremia using iPS Cells

研究代表者

緒方 浩顕 (OGATA, HIROAKI)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：30296959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病では様々な骨・ミネラル代謝異常がみられるが、中でも重要なのが骨代謝の維持に必須である副甲状腺ホルモン(PTH)に対する骨の反応性の低下が生じることである。本研究では、本研究では動物モデルやヒトから作製したiPS細胞から骨の構成細胞を分化・誘導し、それを使用して骨のPTH抵抗性のメカニズムを解明に有用なツールを構築することであった。残念ながら、安定しiPS細胞由来の骨構成細胞の誘導を確立出来なかったため、骨髄、末梢血液中の間葉系幹細胞から骨芽細胞を誘導し、検討を行った。その結果、腎機能障害ラットの骨髄系幹細胞から誘導した骨芽細胞では様々な異常を見出すことが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病では様々な骨・ミネラル代謝がみられ、骨病変だけでなく心血管障害などの合併症の発症や進展に関与しています。本研究では、疾患モデル動物や患者から作製したiPS細胞から骨細胞を誘導し、これらの異常の研究に有用なモデル構築を目的としました。しかしながら、安定したiPS細胞由来の骨細胞を作製が困難であったために、骨髄や末梢血中の間葉系幹細胞から骨細胞を誘導し、これを使用して腎障害における骨・ミネラル代謝異常の原因の一端を明らかにすることが出来ました。本研究は、従来、生体から骨を取り出して行っていた研究が、容易に採取可能な間葉系幹細胞由来の骨細胞を用いることにより可能であること示しました。

研究成果の概要(英文)：Although the hyporesponsiveness of parathyroid hormone, that is a master regulator in the bone-mineral metabolism, to bone is a major factor contributing to CKD-MBD, its pathomechanism is still obscure.

In the present study, we attempted to elucidate the mechanism of the hyporesponsiveness of PTH to bone using iPS-derived bone cells. Unfortunately, we could not obtain stable yield of iPS-derived bone cells with consistent phenotype responsive to various stimuli. Therefore, alternatively, investigated whether uremic factors mimic decreased responsiveness of PTH to mesenchymal stem cell-derived osteoblastic-like bone cells. As a result, we found that there are similar properties in responsiveness to various stimuli, including phosphate load, calcium depletion, and active vitamin D treatment, between bone tissues in uremia and mesenchymal stem cell-derived osteoblasts bone cells from uremic animal models.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：副甲状腺ホルモン 尿毒症 iPS細胞 CKD-MBD

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病では骨・ミネラル代謝異常(CKD-MBD)が必発であり、CKD-MBD が骨病変だけでなく、CKD では罹患率・死亡率とも高い心血管障害の発症、進展機序に関与していることが、多くの大規模観察研究から明らかにされている。CKD-MBD の病態生理は不明な点が多く、治療法が確立されていない。CKD-MBD の病態においては、腎機能低下による様々な液性因子の障害に加え、それらの標的臓器の 1 つである骨組織の反応性異常が重要な役割を果たしていると思定されている。CKD-MBD には様々な異常がみられるが、代表的な異常である二次性副甲状腺機能亢進症(SHPT)では、副甲状腺から生理的制御を超えた副甲状腺ホルモン(PTH)が分泌され、線維性骨炎、心肥大や動脈硬化の発症、進展に関与するが、この PTH の過剰分泌の原因の 1 つに骨組織の PTH 反応性の低下があると古くから指摘されてきた。通常、PTH はその受容体を介して、骨芽細胞や破骨細胞に作用して、骨吸収、骨形成を調節しているが、尿毒症下では PTH の過剰な存在にもかかわらず、骨芽細胞や破骨細胞の反応が低下しているのである。このメカニズムは不明だが、その背景には骨組織は硬組織であり、実験動物やヒトでの生検が難しく、更には治療判定のために複数回の生検が現実的でないことがある。このために、従来の研究方法としては株化細胞や器官培養した細胞、腎不全モデル動物の sacrifice 後の骨組織の検討が行われてきたが、その成果は捗々しいものではなかった。

最近の検討では、iPS 細胞から誘導した細胞には遺伝情報だけでなく、epigenetic なメモリも残存している可能性が報告されており、腎不全の個体から確立した iPS 細胞由来の骨細胞にも尿毒症による異常が認められる可能性があり、iPS 細胞由来骨芽細胞や破骨細胞を解析することによりホストの骨組織に生じている異常を把握することが出来ることが考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、

- (1) 尿毒症病態下の個体における骨組織の PTH に対する抵抗性の機序の解明を可能にする iPS 細胞由来の骨細胞を使用した新規の評価法を開発することであり、
- (2) 更には同方法を用いた臨床的な骨組織の PTH 抵抗性の評価法の有用性を評価するモデルを構築、その有用性を明らかにすることである。

3. 研究の方法

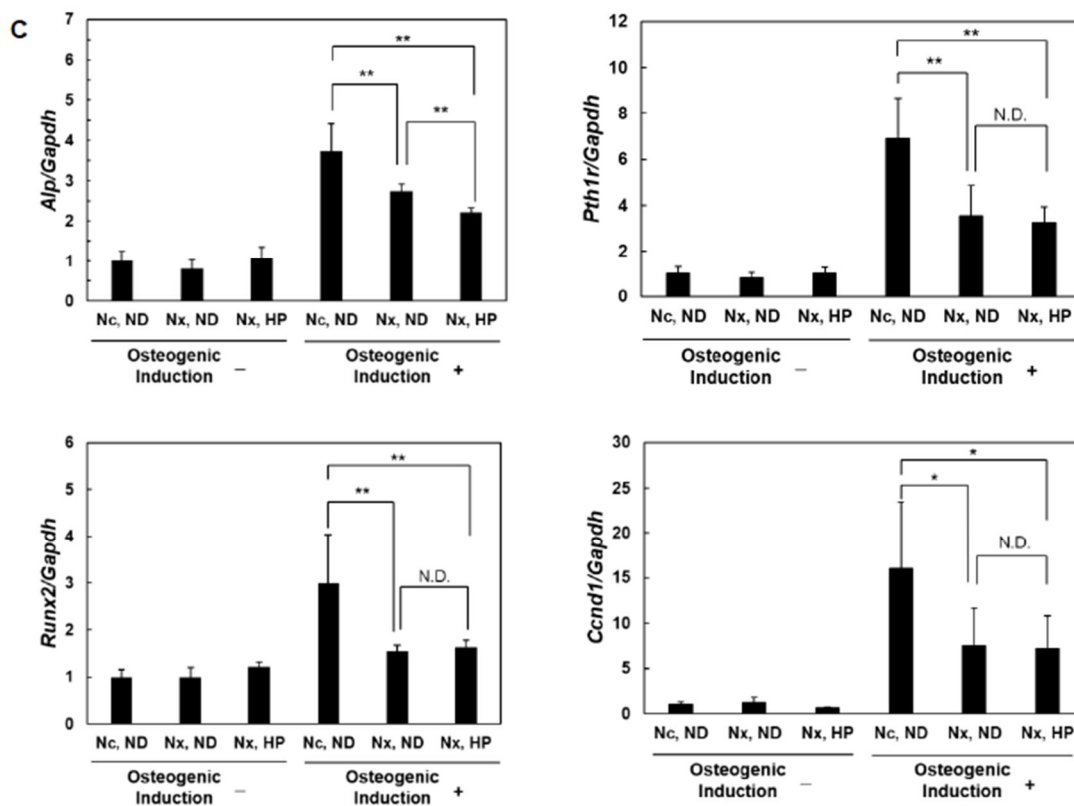
我々が当初採用した方法は、腎不全動物モデルの末梢単核球ないしは脂肪細胞を採取し、そこから iPS 細胞を確立、骨芽細胞、破骨細胞を誘導し、それらの細胞の characteristics を解析し、ホストの骨組織にみられる異常との analogy を評価することにより、骨生検に寄らない iPS 細胞由来骨構成細胞を用いた病態解析のモデル構築を目指した。この新規評価法の正当性が確認できれば、つぎのステップとしてヒト由来の iPS 細胞(コントロール、腎不全患者)由来の骨芽細胞・破骨細胞を作製し、同様の検討を行い、このモデルの臨床的な有用性の検討を予定した。

- (1) まず、腎不全モデル(5/6 腎摘ラット)の末梢血単核球細胞や皮下脂肪組織から、iPS 細胞を作製し、骨芽細胞の誘導を試みたが、収量及びその解析結果が安定せず、病態解析ツールの構築までには至らなかった。
- (2) 次善の方法として、個体の骨髓や末梢血中の間葉系幹細胞(BMSC: 細胞表面マーカー、CD90 陽性、CD29 陽性、CD45 陰性、CD31 陰性)を分離し、それを osteogenic medium で培養、骨芽細胞様細胞(Obc)を誘導した。コントロール及び尿毒症モデル(5/6 腎摘ラット)から BMSC 由来 Obc を作製し、様々な細胞応答を検討した。

4. 研究成果

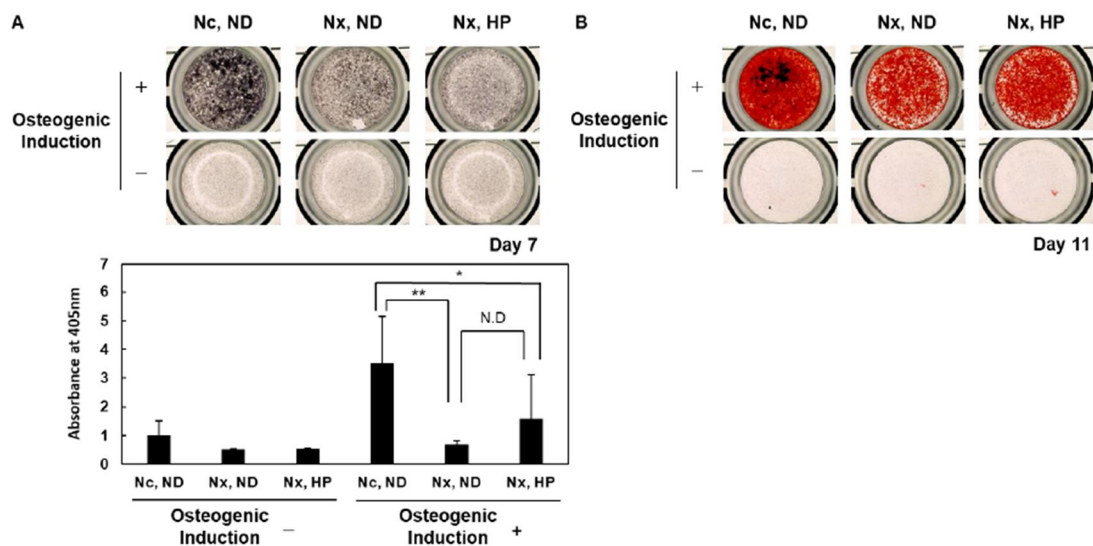
腎不全モデル iPS 細胞由来の骨芽細胞や破骨細胞の誘導は、その収量は安定せず、その細胞の解析結果も安定しなかった。学内外の研究者の協力も得て、様々方策を検討したが、満足な結果が得られなかった為に、上述した個体の骨髓や末梢血中の BMSC を分離し、osteogenic induction 培地で Obc を誘導し、その過程及び Obc の characterization を検討したところ、腎機能正常のコントロールに比較して、腎不全ラットでも得られた BMSC 収量は変わらなかったが、尿毒症の個体由来の BMSC ではコントロールに比して、Alkaline phosphatase、骨芽細胞分化に必須な転写因子 Runx2、PTH1 受容体や Cyclin D1 の遺伝子発現が有意に低下しており、尿毒症病態下では stem cell レベルで骨芽細胞への分化誘導が低下している可能性が示唆された。更には、誘導された細胞では石灰化能が低下していることも確認された[文献]。このことは、骨髓や末梢血より分離した BMSC より誘導した Obc には骨組織の骨芽細胞同様の石灰化障害や PTH 受容体の発現低下がみられることを示しており、BMSC 由来の Obc は CKD-MBD の病態解明に有用なツールとなり得る可能性を示している。

図1 正常食ないし高リン食を与えたコントロール及び5/6腎摘ラット由来のBMSCを骨芽細胞誘導培地で培養した後の各マーカー遺伝子発現(文献より改変)



NC, control; Nx, 5/6 nephrectomized rat; ND, normal diet; HP, high phosphorus diet

図2. 尿毒症ラット由来のBMSCから誘導したObcでは石灰化能が低下していた(文献より改変)



文献

Kato T, Mizobuchi M, Ogata H, et al. Osteoblastic Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Uremic Rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2020 (*in press*)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mizobuchi Masahide, Ogata Hiroaki, Koiwa Fumihiko	4. 巻 23
2. 論文標題 Secondary Hyperparathyroidism: Pathogenesis and Latest Treatment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Therapeutic Apheresis and Dialysis	6. 最初と最後の頁 309 ~ 318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1744-9987.12772	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shikida Yasuto, Mizobuchi Masahide, Inoue Takashi, Hamada Toma, Ogata Hiroaki, Koiwa Fumihiko, Shibata Takanori	4. 巻 103
2. 論文標題 Effect of Continuous Intravenous Calcium Loading on Fibroblast Growth Factor 23 in Normal and Uremic Rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Calcified Tissue International	6. 最初と最後の頁 455 ~ 464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00223-018-0440-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aizawa Ryo, Yamada Atsushi, Seki Tatsuaki, Tanaka Junichi, Nagahama Ryo, Ikehata Mikiko, Kato Tadashi, Sakashita Akiko, Ogata Hiroaki, Chikazu Daichi, Maki Koutaro, Mishima Kenji, Yamamoto Matsuo, Kamiyo Ryutaro	4. 巻 512
2. 論文標題 Cdc42 regulates cranial suture morphogenesis and ossification	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 145 ~ 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.02.106	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kato Tadashi, Yamada Atsushi, Sasa Kiyohito, Yoshimura Kentaro, Morimura Naoko, Ogata Hiroaki, Sakashita Akiko, Kamiyo Ryutaro	4. 巻 104
2. 論文標題 Nephronectin Expression is Inhibited by Inorganic Phosphate in Osteoblasts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Calcified Tissue International	6. 最初と最後の頁 201 ~ 206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00223-018-0484-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Tadashi, Yamada Atsushi, Ikehata Mikiko, Yoshida Yuko, Sasa Kiyohito, Morimura Naoko, Sakashita Akiko, Iijima Takehiko, Chikazu Daichi, Ogata Hiroaki, Kamiyo Ryutaro	4. 巻 8
2. 論文標題 FGF-2 suppresses expression of nephronectin via JNK and PI3K pathways	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 836 ~ 842
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12421	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikehata M, Yamada A, Fujita K, Yoshida Y, Kato T, Sakashita A, Ogata H, Iijima T, Kuroda M, Chikazu D, Kamiyo R.	4. 巻 500
2. 論文標題 Cooperation of Rho family proteins Rac1 and Cdc42 in cartilage development and calcified tissue formation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 525-529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.04.032.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Tadashi, Yamada Atsushi, Ikehata Mikiko, Yoshida Yuko, Sasa Kiyohito, Morimura Naoko, Sakashita Akiko, Iijima Takehiko, Chikazu Daichi, Ogata Hiroaki, Kamiyo Ryutaro	4. 巻 19
2. 論文標題 FGF-2 suppresses expression of nephronectin via JNK and PI3K pathways	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 836-842
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12421	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tadashi Kato Masahide Mizobuchi Kiyohito Sasa Atsushi Yamada Hiroaki Ogata Hirokazu Honda Akiko Sakashita Ryutaro Kamiyo	4. 巻 in press
2. 論文標題 Biochemical and Biophysical Research Communications Osteoblastic Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Uremic Rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kato K, Mizobuchi M, Ogata H
2. 発表標題 Osteoblastic Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Uremic Rats with Secondary Hyperparathyroidism
3. 学会等名 Kidney Week 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本真寛、緒方浩顕
2. 発表標題 血液透析(HD)患者における貧血、CKD-MBD治療がFGF-23(F)代謝に与える影響
3. 学会等名 第63回日本透析医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本真寛、緒方浩顕
2. 発表標題 維持血液透析(HD)患者における静注vitamin D受容体作動薬(VDRA)治療がFGF-23代謝に与える影響
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

昭和大学学術業績リポジトリ https://meta.lititory.showa-u.ac.jp/
--

