

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17754

研究課題名(和文)閉経後骨粗鬆症が腎性骨症に及ぼす影響

研究課題名(英文)Effects of postmenopausal osteoporosis on renal osteodystrophy

研究代表者

田中 寿絵 (TANAKA, Hisae)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：60803327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ラットを用いて二次性副甲状腺機能亢進症(SHPT)モデルと閉経(OVX)モデルを作成し、骨に発現するmRNAを用いて骨代謝と3点曲げ試験による骨強度を検討した。SHPTモデルでは骨形成、骨吸収ともに亢進しており、SHPT+OVXモデルでは骨吸収はさらに亢進し、骨形成はSHPTモデルと比較して低下していた。骨強度はSHPTモデルで低下し、SHPT+OVXモデルでは増強していた。エストロゲン欠乏はSHPTによる骨吸収を相加的に促進し、骨形成を抑制することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エストロゲン欠乏と二次性副甲状腺機能亢進症を合併したときに、各々、またその組み合わせが骨代謝に与える影響を検討した研究は乏しく、慢性腎不全を有する女性の骨代謝におけるエストロゲンの重要性を示唆した。臨床的に慢性腎不全を伴う女性は男性よりも骨折リスクが高いことが分かっている。慢性腎不全を有する閉経後女性の骨粗鬆症や病的骨折に対する治療として、骨吸収抑制薬だけでは不十分で、エストロゲン補充や骨形成促進薬を用いて骨形成を促す必要性を示唆する研究である。

研究成果の概要(英文)：We induced secondary hyperparathyroidism (SHPT) by feeding high phosphorus diet after 5/6 nephrectomy, estrogen deficiency by ovariectomy (OVX), and combination of both in rats. Bone turnover and bone strength was evaluated with mRNA expression in bones and 3-point bend test for femurs, respectively. Rats with SHPT showed enhanced mRNA expression associated with both bone resorption and bone formation compared to sham operated rats. Additional OVX to SHPT led to increased RANKL/OPG ratio, which reflects bone resorption, and attenuated expression of mRNA associated with bone formation. Regarding mechanical properties of femur, yield force was lower in SHPT rats than sham rats, while higher force was required to break femurs of SHPT + OVX rats than CKD rats. This study suggests that OVX attenuates bone formation and exacerbate bone resorption caused by SHPT. Further studies are needed to elucidate the impact of OVX on bone strength in SHPT setting.

研究分野：CKD-MBD

キーワード：副甲状腺機能亢進症 慢性腎不全 閉経 エストロゲン 骨粗鬆症

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(**Chronic kidney disease, CKD**)患者では骨脆弱性をきたすことが知られており、これを腎性骨症(**Renal osteodystrophy, ROD**)と呼ぶ。これは二次性副甲状腺機能亢進症(**Secondary hyperparathyroidism, SHPT**)による高骨代謝回転や、尿毒症物質による骨質の悪化などが原因として知られている。一方で女性では閉経が骨粗鬆症の原因の一つとなることが知られており、エストロゲンがそのメカニズムに深く関与するとされている。しかし **ROD** に対する閉経の影響に関する報告は乏しい。

2. 研究の目的

我々は **SHPT** による骨代謝の亢進を閉経によるエストロゲン欠乏が増強すると仮説を立てて、**SHPT** モデル、閉経モデルラットを用いて検証することとした。本研究では **5/6** 腎摘後に高リン食を投与したラットを **SHPT** モデルとし、両側卵巣摘出ラットを閉経後骨粗鬆症モデルとし、**SHPT** の有無、卵巣摘出(**OVX**)の有無で **4** 群に分け、それぞれの骨代謝、骨強度を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) **SHPT** モデルラットの作成

雌 **SD** ラットを **sham** 群、**SHPT** 群、卵巣摘出(**OVX**)群、**SHPT + OVX** 群の **4** 群に割り付けた。**SHPT** 群、**SHPT+OVX** 群に対してまず左腎の **2/3** を切除する。**Sham** 群、**OVX** 群に対しては腎の露出のみを行い、腎に対する **sham** 手術とした **1** 週間後に **SHPT** 群、**SHPT+OVX** 群に対して右腎摘出を行った。**Sham** 群、**OVX** 群に対しては右腎の露出のみを行い腎に対する **sham** 手術とした **5/6** 腎摘を行ったラットに対しては腎摘の **1** 週間後から食餌を高リン食とし、**SHPT** を誘発した。

(2) **OVX** モデルの作成(卵巣摘出)

右腎摘と同時に両側子宮角を露出して卵巣を同定し、**OVX** 群、**SHPT+OVX** 群では両側卵巣を絹糸で結紮後に鉗で切離した。**Sham** 群、**SHPT** 群に対しては露出のみを行い、卵巣に対する **sham** 手術とした。

(3) 骨の **mRNA** 発現の検討、骨強度の測定

8 週間の飼育後に腹大動脈からの全採血で安楽殺し、両側大腿骨・脛骨を採取した。血清を用いて腎機能の評価目的で尿素窒素、クレアチニン (**Cr**)、骨代謝に関連するマーカーとしてカルシウム、リン、**intact PTH**、**FGF23**、**ALP** を測定した。大腿骨は一方で **qPCR** を行って骨代謝に関連する **mRNA** の発現について検討し、もう一方では **3** 点曲げ試験によって骨強度を検討した。

4. 研究成果

体重について、**OVX** を行った群では有意に増加し、**SHPT** を行った群では低下する傾向にあった (図 **1a**)。腎機能について **5/6** 腎摘を行った群ではいずれも血清尿素窒素、**Cr** 値が有意に上昇していたが、卵巣摘出術は腎機能に影響を及ぼさなかったことから (図 **1b, c**)、モデル動物は問題なく作成されていることが示された。

骨代謝関連マーカーについて、血清カルシウムは各群に有意な差はなかった (図 **2a**)。血清リンは **SHPT + OVX** 群で **sham** 群よりも有意に上昇していた (図 **2b**)。Intact **PTH**、**FGF23** 値は **sham** 群、**OVX** 群と比較して **SHPT** 群で有意に上昇しており、**SHPT+OVX** 群では上昇が軽減されており、これらを反映するように尿中リン排泄分画は **SHPT** 群で有意に上昇し、**SHPT+OVX** 群では上昇が減弱していた (図 **2c, d, e**)。

次に大腿骨は骨髄細胞を可能な限り除去して、骨組織の **mRNA** 発現を検討した。骨芽細胞の分化などに関連する転写因子であることから骨形成を反映するとされる **Runx2**、**Osterix**、**Col1a1**、**ALP** は **OVX** 群では **sham** 群と比較して差はなかったが、**SHPT** 群で有意に発現が亢進しており、**SHPT+OVX** 群ではその程度が減弱していた (図 **3a, b, c, d**)。骨吸収を反映するとされる **RANKL/OPG** 比について、**OVX** 群では **sham** 群と同等であったが、**SHPT** 群では発現が **sham** 群と比較して有意に亢進しており、**SHPT+OVX** 群では **SHPT** 群と比較してさらに発現が亢進していた (図 **3e**)。

最後に大腿骨を用いて **3** 点曲げ試験による骨強度の比較を行った (図 **4**)。骨破断に必要な最大強度は **sham** 群と比較して、**SHPT** 群では有意に小さく、骨が脆弱化している可能性が示唆された。**OVX** 群では有意差はないものの、破断に必要な最大強度が **sham** 群と比較して大きい傾向にあった。**SHPT+OVX** 群では **sham** 群、**SHPT** 群のいずれと比較しても有意に骨破断に必要な最大強度が増していた。

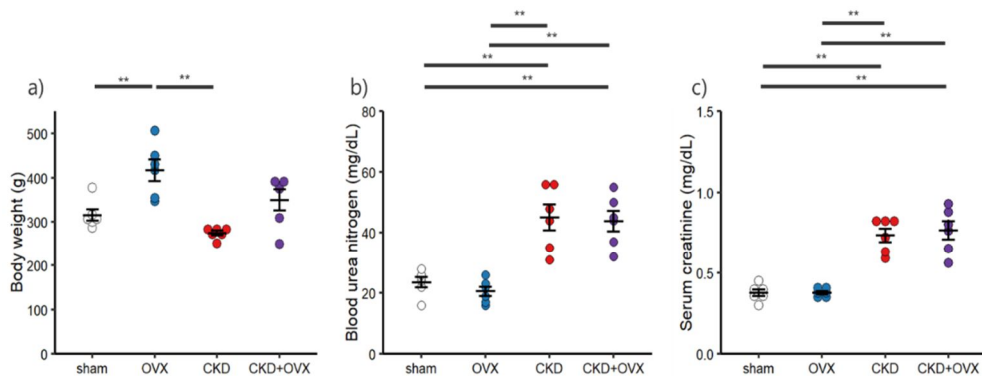
我々の研究からラットにおいて **SHPT** は骨形成、骨吸収のいずれも亢進させるが、卵巣摘出は **SHPT** による骨吸収亢進をさらに促進し、**SHPT** により亢進した骨形成を抑制することが示された。この結果は、臨床研究で透析患者における **SHPT** 治療が進歩して女性の骨折イベント

が減っていることが報告されているが、それでもなお女性は男性よりも有意に骨折リスクが高い理由の **1** つを説明している可能性がある。さらに我々は透析患者からなるコホート研究データを用いて、患者を性別と、年齢を **50** 歳以上と **50** 歳未満で区切って **4** 群に分けて、骨代謝マーカーと **PTH** 値の関連を検討すると、骨吸収マーカーである **TRACP5b** が **50** 歳未満では男女差がないのに対し、**50** 歳以上では有意な男女差を認めることを発表している。一方、**4** 群で **TRACP5b** と **PTH** の間の関連に有意な交互作用は見られないことから、**SHPT** と閉経は相加的に（独立して）骨吸収を促進する可能性を示唆し、本研究で検討した **RANKL/OPG** の結果とも矛盾しない結果であった。

SHPT+OVX 群では **SHPT** 群と比較して骨形成に関連する **mRNA** が軒並み低下していたことから、骨強度も **SHPT+OVX** 群で低下すると予想していたが、しかし骨強度は予想に反して **SHPT** 群と比較して **SHPT+OVX** 群で増強していた。これにはいくつか理由が想定される。**1** つめに、骨強度の規定因子である骨密度と骨質のうち、骨質への影響が挙げられる。エストロゲン欠乏は上流の分泌刺激である卵胞刺激ホルモンの増加をもたらす、摂餌量が増加し、基礎代謝が低下して体重増加をもたらすことが報告されている。骨質を保つ因子の **1** つに機械的刺激があり、体重が増加すると骨への機械的刺激が増加する。本研究において **SHPT+OVX** 群では **SHPT** 群と比較して体重が有意に増加していたことから、体重増加が骨質改善に寄与して骨強度が増した可能性がある。この問題は各群の食事量を統一するペアフィーディングを行うことで克服できるかもしれない。もう **1** つに観察月齢の問題が挙げられる。本研究は **1** ヶ月齢ラットに対して **2** 回の手術後、**8** 週間飼育の後に **3** ヶ月齢で検体採取を行った。雌ラットは種にもよるが自然史として **9~12** ヶ月齢ごろに大腿骨量がピークを迎え、その後減少するとされている。本研究は骨量が増加に向かう月齢での研究であり、**OVX** により骨吸収が亢進したとしても、それ以上に骨形成が勝って骨強度が増した可能性がある。今回我々は骨の **mRNA** 発現のみを検討しており、骨密度を測定することで骨形成と骨吸収のいずれが優位であったかを検討できる可能性がある。また骨密度がむしろ増加しているようであれば、**9** ヶ月齢など高齢のラットを用いて、この問題を克服できるかもしれない。

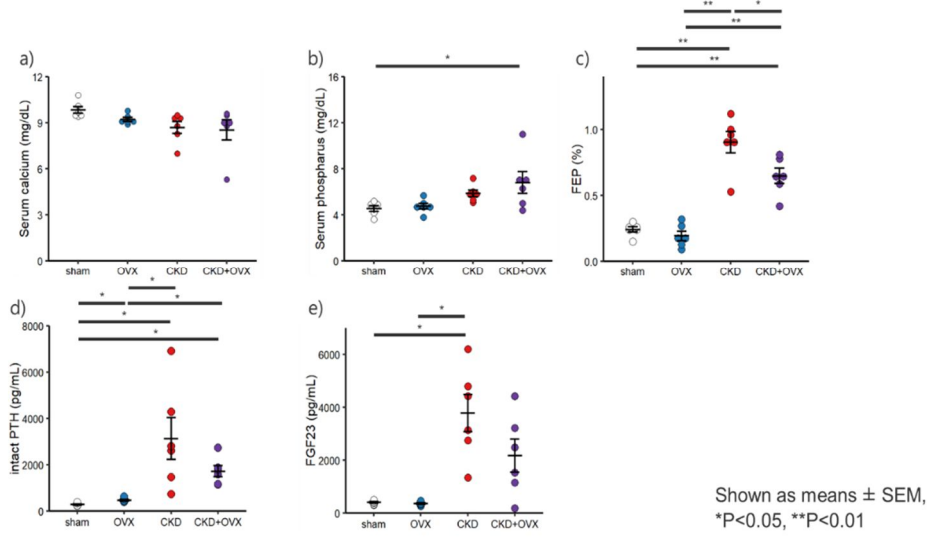
まとめると、卵巣摘出は **SHPT** による骨吸収亢進を相加的に増強することが明らかとなった。骨形成を反映する **mRNA** の発現は **4** 群の中で **SHPT** 群が最大で、**SHPT + OVX** 群では **SHPT** 群と比較して減弱しており、**SHPT** は骨吸収と骨形成が並行して亢進し、卵巣摘出では骨吸収と骨形成のバランスが異なる可能性が示唆された。エストロゲン欠乏が **SHPT** によってもたらされた骨脆弱性に与える影響を知るためにはさらなる研究を必要とする。

図 1

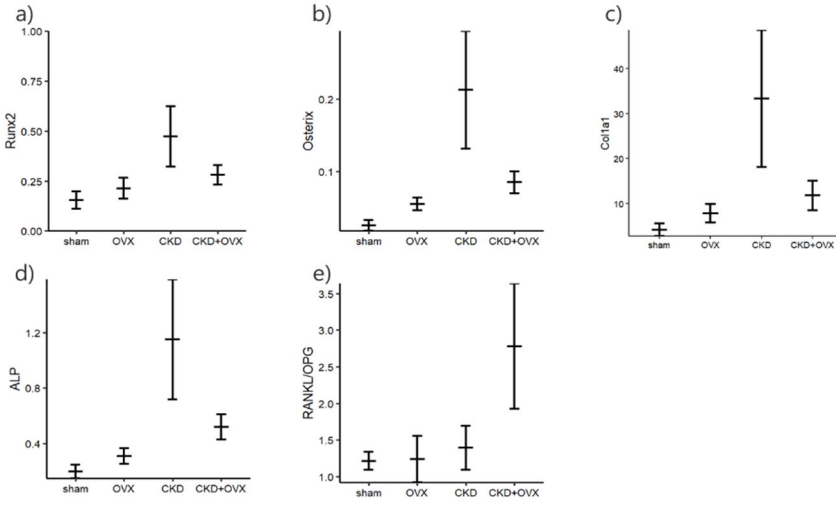


Shown as means \pm SEM, **P<0.01

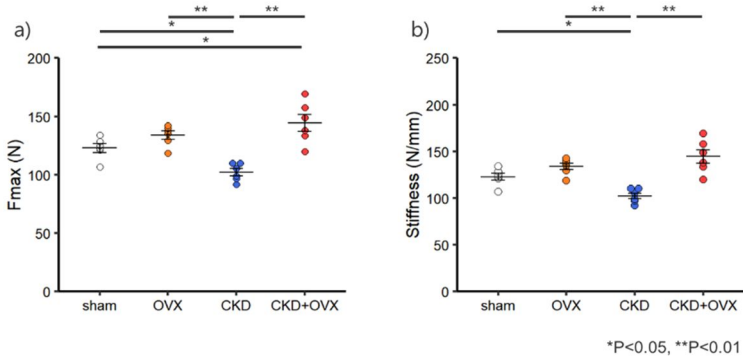
2



3



4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	濱野 直人 (Hamano Naoto)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関