

機関番号：32622
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590985
 研究課題名（和文） 慢性腎臓病ミネラル骨代謝異常症（CKD-MBD）退縮をめざした実験的研究
 研究課題名（英文） Experimental study for the regression of chronic kidney disease and mineral bone disorder (CKD-MBD)
 研究代表者
 秋澤 忠男 (AKIZAWA TADAO)
 昭和大学・医学部・教授
 研究者番号：40102339

研究成果の概要（和文）：慢性腎臓病ミネラル骨代謝異常症を構成する二次性副甲状腺機能亢進症、線維性骨炎については、活性型ビタミンD製剤の副甲状腺内局注と引き続き全身投与や、calcimimeticsの積極的使用により退縮の実現できる可能性が示された。しかし異所性血管石灰化の退縮はこれらの手段で達成は困難で、炎症の抑制、エラスチン代謝の制御など、新たな手段の構築が必要と考えられた。

研究成果の概要（英文）：To regress the pathological findings resulted from chronic kidney disease mineral and bone disorder (CKD-MBD), it may be effective to directly inject the active vitamin D or its analogue into parathyroid gland and to systemically administrate vitamin D and /or calcimimetics for enlarged parathyroid gland and high turn-over bone disease. But it is difficult to regress ectopic vascular calcification by these methods. It may be important to prevent inflammatory process and elastin degradation for regression. Further studies are urgently required to clarify this point.

交付決定額

（金額単位：円）

| 年度 | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2009年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2010年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：慢性腎臓病ミネラル骨代謝異常症、二次性副甲状腺機能亢進症、腎性骨異栄養症、異所性石灰化、慢性炎症、エラスチン

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病ミネラル骨代謝異常症（CKD-MBD）は腎機能障害に伴うCa/P代謝異常が、副甲状腺・骨代謝障害のみならず、異所性（血管）石灰化から動脈硬化から心血管系合併症を引き起こし、慢性腎臓病患者（CKD）の予後とQOLを阻害する疾病として、2006年にKidney Disease Improving Global Outcome (KDIGO)から提唱された新たな疾患概念である。このような新しい概念であるCKD-MBDについて、その予防手段と効果は従来の二次性副甲状腺機能亢進症や腎性骨異栄養症を対象に研究が行われて

きたが、治療・寛解をめざした研究は不十分であり、完成したCKD-MBDを退縮させる研究はその疾患概念の提唱からの期間が短いこともあり、ほとんど行われていない。

2. 研究の目的

本研究は、CKD-MBDの主要な臓器障害である異所性血管石灰化、線維性骨炎、副甲状腺腫大の3病態に焦点をあて、これらを退縮させる治療手段を明らかにすることを目的として実施する。方法は我々が確立した3病変を伴うCKD-MBDモデルラットなどを用い、完成されたCKD-MBDの病態に対し、Vitamin D受容体（VDR）およびCa感知受

容体に対する強力な刺激と血清 Ca/P の管理などを行い、これらが病態の寛解だけではなく、退縮をももたらすことを、形態、病理、免疫組織学的に証明し、その退縮条件を解明することで、今後の臨床への応用の端緒となる成果をあげることが目標とする。本研究の特色は CKD-MBD という新しい疾患概念を研究対象とした点、及び予防・寛解ではなく、退縮に研究目標を限定した点である。

3. 研究の方法

(1) 腫大副甲状腺の退縮手段の研究

Sprague-Dawley ラットを 5/6 腎摘にて腎不全とし、高 P、低 Ca 食にて飼育し、PTH の上昇と副甲状腺腫大を呈する二次性副甲状腺機能亢進症ラットを作成する。本モデルに、calcitriol, maxacalcitol などの活性型ビタミン D およびアナログを副甲状腺内局注後、静脈内投与するなどの治療介入を行い、副甲状腺重量が減少するかの測定と併に、副甲状腺の免疫組織学的検討を行った。

(2) 線維性骨炎の退縮手段の研究

上述の Sprague-Dawley ラットを 5/6 腎摘にて腎不全とし、高 P、低 Ca 食にて飼育し作成した二次性副甲状腺機能亢進症ラットは著明な線維性骨炎像を呈する。完成した線維性骨炎を呈するラットの副甲状腺に maxacalcitol を副甲状腺内に直接注入し、その後 maxacalcitol の静脈内投与を週 3 回実施し、4 週間後に屠殺して骨の変化を観察し、maxacalcitol 投与前の骨組織を改善するかの検討を行った。

(3) 異所性血管石灰化の退縮手段の研究

先の Sprague-Dawley ラットを 5/6 腎摘にて腎不全とし、高 P、低 Ca 食にて飼育し作成した二次性副甲状腺機能亢進症と著明な線維性骨炎像を呈するラットは、異所性血管石灰化をも合併する。そこで著明な二次性副甲状腺機能亢進症と線維性骨炎を呈した本ラットに Ca 感知受容体作動薬である calcimimetics(NPS-R568)10mg/kg を 28 日間投与後に屠殺し、異所性血管石灰化に退縮がみられるかを検討した。

(4) 異所性血管石灰化に対する炎症性サイトカインの影響と活性型ビタミン D アナログ及び calcimimetics 投与の研究

CKD-MBD に伴う異所性血管石灰化には慢性炎症の関与が想定されている。そこで慢性炎症のメディエーターであるサイトカイン TNF- α の血管石灰化への影響と、これに及ぼす活性型ビタミン D アナログと calcimimetics の抑制効果を *in vitro* で検討した。タカラバイオ社製のヒト大動脈平滑筋細胞を正 P (0.9mM)、高 P (2.5mM) で 9 日間培養し、石灰化の程度と TNF- α 、さらに活性型ビタミン D アナログ(maxacalcitol: OCT) および calcimimetics(NPS-R568) 添加の影響を組織 Ca 染色、組織内 Ca 量、平滑筋細胞

内骨芽細胞関連因子や骨基質の発現で評価した。また、組織中のエラスチン代謝に重要な影響を及ぼす、Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) の発現も併せて検討した。

(5) 血管石灰化と MMP-2 発現の *in vivo* における研究

Sprague-Dawley ラットを 5/6 腎摘にて腎不全とし、高 P、低 Ca 食にて飼育して血管石灰化をもたらしたラットモデルで、MMP-2 発現の変化を、非腎不全ラットと比較した。

4. 研究成果

(1) 腫大副甲状腺の退縮手段の研究

ビタミン D およびアナログの副甲状腺内局注と引き続く全身投与で rat intact PTH は calcitriol 投与群で 4200pg/mL から 670pg/mL に、maxacalcitol 投与群で 4300pg/mL から 1100pg/mL に減少し、全体重に対する副甲状腺重量の割合にも約 20% に低下が認められた。組織学的観察では、ビタミン D およびアナログ投与群で副甲状腺細胞の apoptosis が観察され、apoptosis は Tunnel 染色陽性、DNA electrophoresis の確認、電子顕微鏡所見での核の condensation や fragmentation を伴う apoptosis body の観察で証明された。以前の我々の研究で、高濃度のビタミン D 製剤を直接副甲状腺内に注入すると副甲状腺細胞のビタミン D 受容体や Ca 感知受容体が増強し、副甲状腺の増殖刺激を減少させることが明らかになっており、繰り返される副甲状腺と全身へのビタミン D 製剤の投与は、この効果を反復させることで腫大した副甲状腺の退縮効果をもたらすことが推測された。

(2) 線維性骨炎の退縮手段の研究

maxacalcitol の投与で rat intact PTH は 2600pg/mL から 620pg/mL に著明に低下し、maxacalcitol 非投与群ではこの間 PTH は 3000pg/mL から 6600pg/mL に著増した。海綿骨の骨形態計測では、maxacalcitol 投与群で maxacalcitol 投与前に屠殺した群に比べ、線維骨量の減少、骨形成速度の低下などの線維性骨炎の改善がみられ、この変化は皮質骨でより顕著であった。一方、maxacalcitol 非投与群では、線維性骨病変のさらなる進行が観察された。以上の結果から、ビタミン D アナログ(maxacalcitol) の副甲状腺内局所投与とその後の全身投与は、完成された線維性骨炎を退縮させる手段になりえると考えられた。

(3) 異所性血管石灰化の退縮手段の研究

血管石灰化モデルラットに対する calcimimetics 投与前と投与後の血液生化学的検査結果を表 1 に示す。calcimimetics 投与により PTH に加え、血清 Ca、P 値にも有意な低下、ないし低下傾向が認められた。

表 1

| | sBP | Alb | Cr | Ca | P | PTH |
|---------|----------|------------|------------|-----------|-------------|--------------|
| | mmHg | g/dl | mg/dl | mg/dl | mg/dl | pg/ml |
| Sham | 124 ± 12 | 4.0 ± 0.2 | 0.3 ± 0.1 | 9.8 ± 0.5 | 7.6 ± 0.9 | 33 ± 13 |
| R568投与前 | 166 ± 8a | 3.3 ± 0.4b | 1.0 ± 0.3a | 9.2 ± 0.3 | 11.7 ± 0.6a | 2319 ± 1946a |
| R568投与後 | 165 ± 7a | 3.3 ± 0.4b | 0.8 ± 0.1a | 8.5 ± 0.1 | 9.2 ± 0.7b | 91 ± 32c |
| P value | <0.05 | <0.01 | <0.01 | 0.28 | <0.01 | <0.05 |

しかし、投与前と投与後で血管石灰化には変化は認められなかった (図 1)。

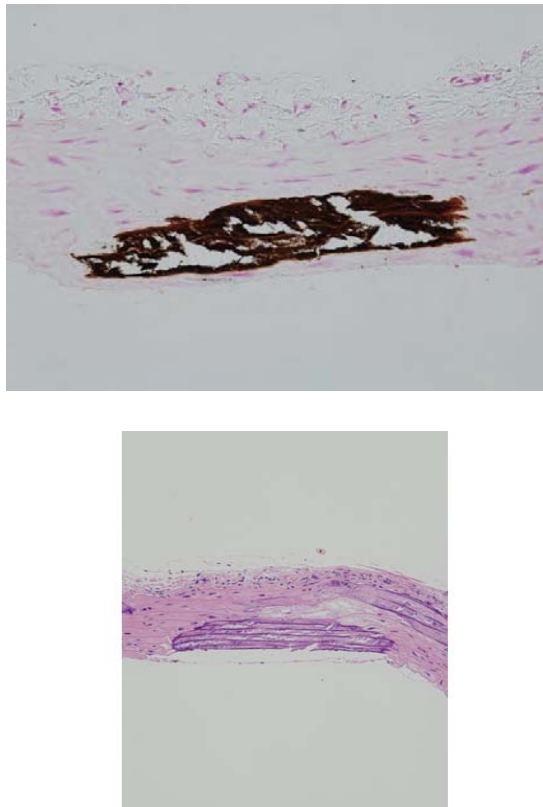


図 1 calcimimetics 投与前 (上) 投与後 (下)

(4) 異所性血管石灰化に対する炎症性サイトカインの影響と活性型ビタミン D アナログ及び、calcimimetics 投与の研究

正 P に比べ高 P 培養下で組織中 Ca 含量は増加し、石灰化が促進することが示された。また TNF- α の添加で石灰化はさらに増強し、高 P と TNF- α の存在で石灰化は最大となった (図 2)。

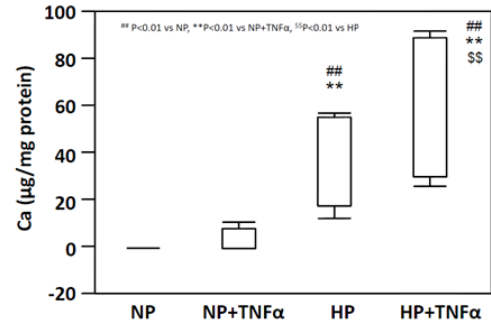


図 2

一方、これらに活性型ビタミン D アナログ (OCT), calcimimetics を添加すると石灰化は抑制され、とくに OCT では濃度依存性の抑制が認められた (図 3)。

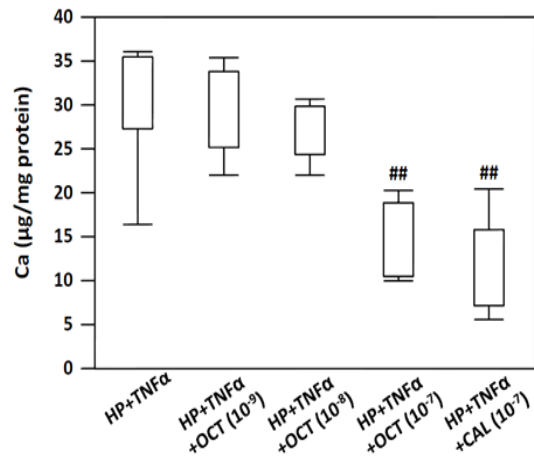
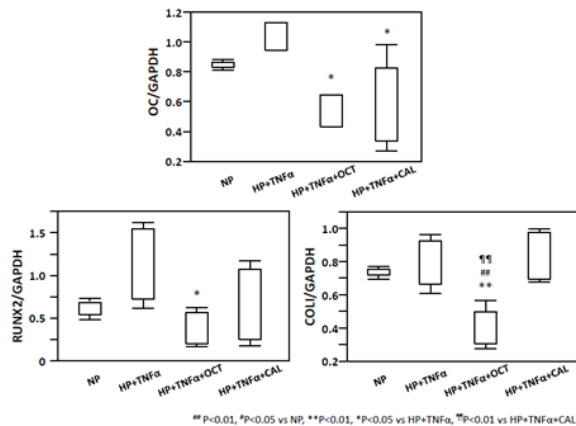


図 3

また、OCT の添加により骨芽細胞様物質である osteocalcin と RUNX2、骨基質 1 型 collagen の発現の抑制が、さらに calcimimetics でも osteocalcin の発現減少が認められた (図 4)。



**P<0.01, *P<0.05 vs NP, **P<0.01, *P<0.05 vs HP+TNFα, **P<0.01 vs HP+TNFα+CAL

図 4

高 P と TNF- α による石灰化で増加していた MMP-2 は OCT あるいは calcimimetics の添加で発現は有意に減少した (図 5)。

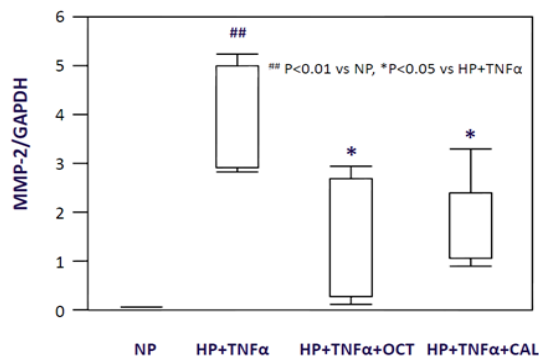


図 5

(5) 血管石灰化と MMP-2 発現の in vivo における研究

モデルラットでは著明な血管石灰化とともに MMP-2 の増加がみられ、エラスチンの代謝の変化に伴い、in vivo でも MMP-2 が増加することが確認された (図 6)。

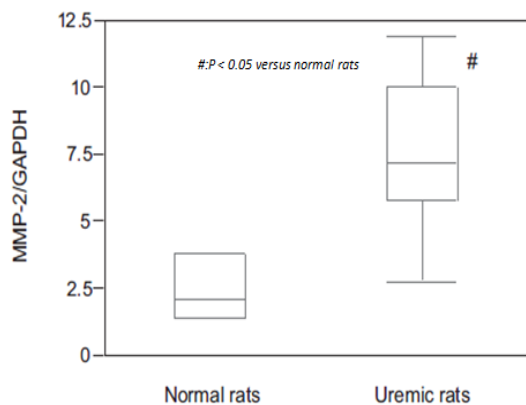


図 6

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 24 件)

1. Fukagawa M, Komaba H, Onishi Y, Fukuhara S, Akizawa T, Kurokawa K. Mineral Metabolism Management in Hemodialysis Patients with Secondary Hyperparathyroidism in Japan: Baseline Data from the MBD-5D. Am J Nephrol. 査読有、2011 ;33(5):427-437.
2. Fukuhara S, Akizawa T, Fukagawa M, Onishi Y, Yamaguchi T, Hasegawa T, Kurokawa K. Mineral and bone disorders outcomes study for Japanese chronic kidney disease stage 5D patients: rationale and study design. Ther Apher Dial. 査読有、2011 15(2):169-75.
3. Chiaki Kumata,1 Masahide Mizobuchi,

Hiroaki Ogata, Fumihiko Koiwa, Fumiko Kondo, Eriko Kinugasa, Tadao Akizawa. Involvement of Matrix Metalloproteinase-2 in the Development of Medial Layer Vascular Calcification in Uremic Rats. Ther Apher Dial. 査読有、15(Supplement 1):18-22

4. Ogata H, Kumata-Maeta C, Shishido K, Mizobuchi M, Yamamoto M, Koiwa F, Kinugasa E, Akizawa T. Detection of peripheral artery disease by duplex ultrasonography among hemodialysis patients. Clin J Am Soc Nephrol. 査読有、2010 ;5(12):2199-206.

5. Ashikaga E, Honda H, Suzuki H, Hosaka N, Hirai Y, Sanada D, Nakamura M, Nagai H, Matsumoto K, Kato N, Mukai M, Watanabe M, Takahashi K, Shishido K, Akizawa T. Impact of fibroblast growth factor 23 on lipids and atherosclerosis in hemodialysis patients. Ther Apher Dial. 査読有、2010 ;14(3):315-22.

6. Shiizaki K, Hatamura I, Fukagawa M, Nakazawa E, Saji F, Watanabe Y, Akizawa T, Kusano E. Development of a technique for introduction of an expressed complementary deoxyribonucleic acid into parathyroid cells by direct injection. Endocrinology. 査読有、2010;151(8):4031-8.

7. Kumata C, Mizobuchi M, Ogata H, Koiwa F, Nakazawa A, Kondo F, Kadokura Y, Kinugasa E, Akizawa T. Involvement of alpha-klotho and fibroblast growth factor receptor in the development of secondary hyperparathyroidism. Am J Nephrol. 査読有、2010;31(3):230-8.

8. Mizobuchi M, Nakamura H, Tokumoto M, Finch J, Morrissey J, Liapis H, Slatopolsky E. Myocardial effects of VDR activators in renal failure. J Steroid Biochem Mol Biol. 査読有、2010 ;121(1-2):188-92.

9. Nakamura H, Tokumoto M, Mizobuchi M, Ritter CS, Finch JL, Mukai M, Slatopolsky E. Novel markers of left ventricular hypertrophy in uremia. Am J Nephrol. 査読有、2010;31(4):292-302.

10. Hosaka N, Mizobuchi M, Ogata H, Kumata C, Kondo F, Koiwa F, Kinugasa E, Akizawa T. Elastin degradation accelerates phosphate-induced mineralization of vascular smooth muscle cells. Calcif Tissue Int. 査読有、2009 ;85(6):523-9.

11. Shiizaki K, Hatamura I, Imazeki I, Moriguchi Y, Sakaguchi T, Saji F, Nakazawa E, Kato S, Akizawa T, Kusano E. Improvement of impaired calcium and skeletal homeostasis in vitamin D receptor

knockout mice by a high dose of calcitriol and maxacalcitol. Bone. 査読有、2009 ;45(5):964-71.

12. Mizobuchi M, Ogata H, Koiwa F, Kinugasa E, Akizawa T. Vitamin D and vascular calcification in chronic kidney disease. Bone. 査読有、2009 ;45 Suppl 1:S26-9

13. Shigematsu T, Akizawa T, Uchida E, Tsukamoto Y, Iwasaki M, Koshikawa S; KRN1493 Study Group. Long-term cinacalcet HCl treatment improved bone metabolism in Japanese hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. Am J Nephrol. 査読有、2009;29(3):230-6.

14. Mizobuchi M, Towler D, Slatopolsky E. Vascular calcification: the killer of patients with chronic kidney disease. J Am Soc Nephrol. 査読有、2009 ;20(7):1453-64.

15. Mizobuchi M, Ritter CS, Krits I, Slatopolsky E, Sicard G, Brown AJ. Calcium-sensing receptor expression is regulated by glial cells missing-2 in human parathyroid cells. J Bone Miner Res. 査読有、2009 ;24(7):1173-9.

16. Tokumoto M, Mizobuchi M, Finch JL, Nakamura H, Martin DR, Slatopolsky E. Blockage of the renin-angiotensin system attenuates mortality but not vascular calcification in uremic rats: sevelamer carbonate prevents vascular calcification. Am J Nephrol. 査読有、2009;29(6):582-91.

17. Husain K, Ferder L, Mizobuchi M, Finch J, Slatopolsky E. Combination therapy with paricalcitol and enalapril ameliorates cardiac oxidative injury in uremic rats. Am J Nephrol. 査読有、2009;29(5):465-72.

18. Ito H, Ogata H, Yamamoto M, Takahashi K, Shishido K, Takahashi J, Taguchi S, Kinugasa E. Comparison of oral falecalcitriol and intravenous calcitriol in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism: a randomized, crossover trial. Clin Nephrol. 査読有、2009 ;71(6):660-8.

19. Yajima A, Akizawa T, Tsukamoto Y, Kurihara S, Ito A; K Study Group. Impact of cinacalcet hydrochloride on bone histology in patients with secondary hyperparathyroidism. Ther Apher Dial. 査読有、2008 ;12 Suppl 1:S38-43.

20. Wada Y, Kunimura T, Sato S, Hisayuki T, Sato M, Imataka H, Yamashita N, Akizawa T, Moroboshi T. Proliferating potential and apoptosis in the development

of secondary hyperparathyroidism: a study based on Ki-67 immunohistochemical staining and the terminal dUTP nick-end labeling assay. Ther Apher Dial. 査読有、2008 ;12(4):319-28

21. Shiizaki K, Hatamura I, Nakazawa E, Ogura M, Masuda T, Akizawa T, Kusano E. Molecular and morphological approach of uremia-induced hyperplastic parathyroid gland following direct maxacalcitol injection. Med Mol Morphol. 査読有、2008 ;41(2):76-82.

22. Tentori F, Blayney MJ, Albert JM, Gillespie BW, Kerr PG, Bommer J, Young EW, Akizawa T, Akiba T, Pisoni RL, Robinson BM, Port FK. Mortality risk for dialysis patients with different levels: the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). Am J Kidney Dis. 査読有、2008 ;52(3):519-30.

23. Shiizaki K, Hatamura I, Negi S, Sakaguchi T, Saji F, Imazeki I, Kusano E, Shigematsu T, Akizawa T. Highly concentrated calcitriol and its analogues induce apoptosis of parathyroid cells and regression of the hyperplastic gland--study in rats. Nephrol Dial Transplant. 査読有、2008 ;23(5):1529-36.

24. Shiizaki K, Fukagawa M, Yuan Q, Hatamura I, Nii-Kono T, Saji F, Shigematsu T, Akizawa T. Direct injection of calcitriol or its analog improves abnormal gene expression in the hyperplastic parathyroid gland in uremia. Am J Nephrol. 査読有、2008;28(1):59-66.

〔学会発表〕(計 16 件)

1. 第 43 回米国腎臓学会 (2010) 4 件
2. 第 42 回米国腎臓学会 (2009) 6 件
3. 第 41 回米国腎臓学会 (2008) 6 件

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

その他 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋澤忠男 (AKIZAWA TADAO)
昭和大学医学部 教授
研究者番号 : 40102339

(2) 研究分担者

緒方浩顕 (OGATA HIROAKI)
昭和大学医学部講師
研究者番号 : 30296959
溝渕正英 (MIZOBUCHI MASAHIDE)
昭和大学医学部助教
研究者番号 90465203