

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461247

研究課題名(和文)CKD-MBDにおける酸化ストレスおよび細胞周期チェックポイントの解明

研究課題名(英文)Involvement of oxidative stress and check points in CKD-MBD

研究代表者

濱田 康弘 (HAMADA, Yasuhiro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：30397830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題においては慢性腎臓病に伴う骨ミネラル代謝異常(CKD-MBD)をひきおこす代表的な疾患であり、また低回転骨をきたす代表的な疾患でもある糖尿病に着目し、糖尿病モデル動物を用いた検討をおこなった。具体的には、低回転骨に対する抗酸化ストレス作用を解明する目的で、抗酸化ストレス作用をもち、脂質代謝異常の薬としても用いられているスタチン製剤に注目して検討を行った。スタチンの投与により糖尿病により惹起される低回転性の骨減少症を改善することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Diabetes Mellitus is one of the representative diseases to cause chronic kidney disease - mineral and bone disorder (CKD-MBD). The bone disorder of diabetes shows low turnover bone. In order to elucidate the involvement of oxidative stress in low turnover bone, statin, which is a lipid-lowering medication and has anti-oxidative effect, were administered to diabetic animal model. In conclusion, administration of statin improved low turnover diabetic osteopenia.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：骨代謝 低回転骨

1. 研究開始当初の背景

腎機能が低下すると「慢性腎臓病に伴う骨ミネラル代謝異常 (Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder: CKD-MBD)」という病態があらわれ (Moe S. et al: *Kidney Int.* 69:1945-1953: 2006)、この CKD-MBD は生命予後、Quality of Life (QOL) に大きな影響を及ぼす。さらにこの CKD-MBD の中でも骨代謝回転が低下したいわゆる低回転骨が近年増加している (D'Haese PC. et al: *Kidney Int Suppl* 85:S73-S78: 2003)。低回転骨は骨質の低下をきたし骨折リスクが増大するだけでなく、異所性石灰化の原因としても注目され、生命予後に影響を及ぼすにもかかわらず、発症進展機序は不明な点が多く、いまだに低回転骨に対しては臨床的に著効するといえる治療法が存在しない。

この低回転骨の発症進展メカニズムの一つとしてこれまでに酸化ストレスの関与が深いことを報告してきた (Hamada Y. et al: *Bone* 45:35-38: 2009)。さらに酸化ストレスと細胞周期チェックポイントの関連を示唆する所見も得ている (Kani S, Hamada Y. et al: *Genes Cells* 12:919-928: 2007) ため、低回転骨病変における細胞周期チェックポイントの関与に注目した。

2. 研究の目的

骨質の低下をきたし骨折リスクが増大するだけでなく、異所性石灰化の原因としても注目され、生命予後に影響を及ぼす低回転骨における酸化ストレスの関与および細胞周期チェックポイントの関与を解明する目的で下記のとおりの実験を計画した。

すなわち、(1) 近年、抗酸化ストレス作用ももつことが報告され、高コレステロール血症の治療薬としてもすでに実地臨床において使用されているシンバスタチンの低回転骨に対する効果について糖尿病モデル動

物を用いて検討する。(2) 低回転骨における細胞周期チェックポイントの果たす役割を解明する目的で、Checkpoint kinase 2 (Chk2) 遺伝子をノックアウトしたマウス (Chk2-K/O) に糖尿病を誘発し、その骨病変について解析する。という2つの検討を行うこととした。

3. 研究の方法

前述のとおり、(1) シンバスタチンの低回転骨に及ぼす影響について糖尿病モデルマウスを用いて検討する。(2) 細胞周期チェックポイント機構の低回転骨に及ぼす影響について糖尿病モデルマウスを用いて検討する。の2つの検討を行った。

(1) 骨組織に移行しやすいと考えられる脂溶性スタチン製剤であるシンバスタチンを投与して糖尿病に伴う低回転骨の変化に対する詳細な解析を行った。具体的には、ストレプトゾトシン投与により糖尿病を誘発し、マウスを 非糖尿病+シンバスタチン非投与、非糖尿病+シンバスタチン投与、糖尿病+シンバスタチン非投与、糖尿病+シンバスタチン投与の4群にわけ、糖尿病性低回転骨の進展増悪に対してスタチン製剤および抗酸化ストレス作用が及ぼす影響を解析した。具体的には、上記のマウス群のそれぞれにおいて血液、尿を採取し、生化学項目測定、副甲状腺ホルモン測定、骨代謝マーカー測定を行い、同時に骨の採取も行い、骨密度測定、カルセイン投与による石灰化速度 (MAR: mineral apposition rate) 等の測定を行った。また同時に非脱灰骨組織標本も作成し、ゴールドナー染色等の特殊染色を行い、骨梁表面が骨形成面であるか、骨吸収面であるかを判断して、骨形態計測を実施した。さらに、スタチン投与による糖尿病状態における酸化ストレスの変化についての解析を行った。

(2) 細胞周期チェックポイントに関する

遺伝子改変マウスを用いた検討を行った。Chk1 ノックアウトマウスは胎生初期に致死であり、異常な細胞分裂像を呈することが報告されている (Takai H, et al. Genes & Dev. 2000 14: 1439-1447)。一方で、Chk2 ノックアウトマウスは電離放射線照射後の p53 の安定化や転写活性が低下しており、中枢神経系や胸腺における電離放射線後のアポトーシスの誘導がみられないものの、明らかな自然発癌も認められないことが報告されている (Hirao A, et al. Mol. Cell. Biol. 2002 22: 6521-6532)。

そこで、Chk2 ノックアウトマウスを用いてストレプトゾトシン投与により糖尿病を誘発し、マウスを 非糖尿病野生型マウス、非糖尿病 Chk2 ノックアウトマウス、糖尿病野生型マウス、糖尿病 Chk2 ノックアウトマウスの 4 群にわけ、糖尿病性低回転骨の進展増悪に対する細胞周期チェックポイント機構の関与を解析した。(1)と同様に、上記のマウス群のそれぞれにおいて血液、尿を採取し、生化学項目測定、PTH 測定、骨代謝マーカー測定を行い、同時に骨の採取も行い、骨密度測定、カルセイン投与による石灰化速度 (MAR:mineral apposition rate) 等の測定を行った。また同時に非脱灰骨組織標本も作成し、ゴールドナー染色等の特殊染色を行い、骨梁表面が骨形成面であるか、骨吸収面であるかを判断して、骨形態計測を実施した。

4. 研究成果

実施した、(1) シンバスタチンの低回転骨に及ぼす影響について糖尿病モデルマウスを用いての検討、および (2) 細胞周期チェックポイント機構の低回転骨に及ぼす影響について糖尿病モデルマウスを用いての検討の 2 つの結果については以下のとおりである。

(1) 非糖尿病群においては、シンバスタ

チンの投与の有無にかかわらず、生化学測定項目、副甲状腺ホルモン、骨代謝マーカーに有意な差は認められなかった。また、骨密度、カルセイン投与による石灰化速度 (MAR:mineral apposition rate) 等についても有意な差は認められなかった。非脱灰骨組織標本において、ゴールドナー染色等の特殊染色をおこなった上で実施した骨形態計測で有意な差はみられなかった。酸化ストレスマーカー、酸化ストレスマーカーの免疫染色においても 2 群間で有意な差はみられなかった。一方で、糖尿病を誘発したマウスにおいては、非糖尿病マウスと比較して、有意に骨密度、石灰化速度が低下しており、骨形態計測において低回転骨をきたしていた。さらに酸化ストレスマーカーが上昇し、骨の免疫染色において、酸化ストレスマーカーが強く染色された。シンバスタチンを投与した糖尿病マウスにおいては、これらの変化が有意に改善していることがわかった。すなわち、シンバスタチン投与は非糖尿病状態では骨代謝に影響を及ぼさず、酸化ストレスの亢進している糖尿病状態において、それらを有意に改善することが示唆された。

(2) Chk2 ノックアウトマウスを用いた検討においては、非糖尿病群において、生化学測定項目、PTH、骨代謝マーカーに有意な差は認められなかった。また、骨密度、カルセイン投与による石灰化速度 (MAR:mineral apposition rate) 等についても有意な差は認められなかった。非脱灰骨組織標本において、ゴールドナー染色等の特殊染色をおこなった上で実施した骨形態計測で有意な差はみられなかった。糖尿病を誘発することにより、有意に骨密度、石灰化速度が低下しており、骨形態計測において低回転骨をきたした。しかしながら、これらの変化は Chk2 ノックアウトマウスにおいても同様であり、現時点で Chk2 の糖尿病性低回転骨に対する有意な変化はとらえられていない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2件)

Mori K, Kitazawa R, Kondo T, Mori M, Hamada Y, Nishida M, Minami Y, Haraguchi R, Takahashi Y, Kitazawa S. Diabetic osteopenia by decreased β -catenin signaling is partly induced by epigenetic derepression of sFRP-4 gene. PLoS One. 査読有 2014;9(7):e102797. DOI: 10.1371/journal.pone.0102797.

Ohnishi R, Segawa H, Ohmoto T, Sasaki S, Hanazaki A, Mori A, Ikuta K, Furutani J, Kawakami E, Tatsumi S, Hamada Y, Miyamoto K. Effect of dietary components on renal inorganic phosphate (Pi) excretion induced by a Pi-depleted diet. J Med Invest. 査読有 2014;61(1-2):162-170.

[学会発表](計 2件)

松浦 明香、竹谷 豊、森西 真由美、米田 武志、山崎 通世、勝本 美咲、濱田 康弘、武田 英二、食品中リンの生体利用率の評価、第 57 回日本腎臓学会、2014.7.6、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

濱田 康弘、CKD-MBD からの栄養管理、第 29 回 ROD21 研究会、2014.1.18、徳島グランヴィリオホテル(徳島県・徳島市)

[図書](計 2件)

Yasuhiro Hamada 他、Springer、Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants、2014、4178(1281-1290)

濱田 康弘 他、建帛社、ミネラル摂取と老化制御、2014、165(123-141)

[その他]

ホームページ等

<http://www.tokushima-u.ac.jp/med/culture/sikantiryoueiyou/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

濱田 康弘 (HAMADA, Yasuhiro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：30397830