

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16079

研究課題名(和文)腎疾患におけるオステオクリン/NPR-C系に着目した筋・骨・腎連関の意義の解析

研究課題名(英文)Osteo-musculo-renal interaction in CKD via Osteoclin/Npr3 signaling

研究代表者

森 慶太 (Mori, Keita P.)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：00769507

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)：1) 自作した化学発光酵素免疫測定を用い、非透析導入CKD患者血中OSTN濃度の測定を行ったところ、年齢と弱い負の相関を、eGFRと弱い正の相関を示した。さらに、測定前の骨折既往のある患者ではOSTN濃度が有意に低値であることを見い出した。また、アデニン負荷CKDモデルマウスにおいて、骨格筋・骨のOstn mRNA発現が有意に低下することを見い出した。

2) Ostn-TgおよびNpr3のノックアウトマウスに対し腎線維化モデルである片側尿管結紮(UUO)を施し腎障害を検討したところ、Ostn-TgはWTマウスと比較し線維化の程度に変化はなく、Npr3-KOは線維化が悪化することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、高齢者では骨格筋量の低下や骨粗鬆症などを生じ、運動能の低下を来すサルコペニアの概念が提唱されている。また、慢性腎臓病(CKD)においても類似した変化が生じ、腎予後だけでなく生活の質や生命予後をも悪化させるが、それらが生じるメカニズムについては十分解明されていない。

本研究では、CKD患者において骨延長に寄与するオステオクリン(Ostn)が加齢や腎機能低下により血中濃度が低下することや、骨折歴のある患者ではない患者に比較して有意に血中濃度が低いことを見いだした。Ostnは分泌蛋白であるため、臨床応用されているANPと同様に、新たな治療標的となり得ることを示唆する結果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：1. In the observational study of non-dialysis CKD patients in Kyoto University Hospital, we found that plasma Osteoclin (OSTN) concentration of non-dialysis CKD patients was negatively correlated with age and positively with eGFR using our custom-made OSTN-CLEIA system. Furthermore, we found that plasma OSTN concentration of CKD patients with history of bone fracture was significantly lower than that with no history of bone fracture. Furthermore, we found that renal dysfunction induced by adenine administration decreased expression of Ostn mRNA both in skeletal muscle and bone.

2. Using Ostn-transgenic (Ostn-Tg) mice and Npr3 knockout (Npr3-KO) mice, we found that Npr3-KO mice showed exacerbation of renal fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction (UUO) compared with wild type (WT) mice whereas renal fibrosis of Ostn-Tg mice by UUO was similar to that of WT mice.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：慢性腎臓病
NS受容体 骨粗鬆症 NPR-C ナトリウム利尿ペプチド オステオクリン ナトリウム利尿ペプチドクリアラ

1. 研究開始当初の背景

近年、本邦を始め世界各国では高齢化問題が注目され、特に健康寿命の延長が重要視されてきている。高齢者では骨格筋量の低下や骨粗鬆症などを生じ、運動能の低下を来すサルコペニアの概念が提唱されている。また、慢性腎臓病(CKD)においても筋量低下(るいそう)や骨疾患(CKD-MBD)が生じ、腎予後だけでなく生活の質や生命予後をも悪化させるため、介入が不可欠であるが、それらが生じるメカニズムについては十分解明されていない。ナトリウム利尿ペプチド系はリガンドの ANP・BNP・CNP と GC-A・GC-B・NPR-C 受容体から構成される。ANP・BNP/GC-A 系は血管や腎において血圧低下、ナトリウム利尿作用を発揮することが知られているが、申請者の研究室では BNP の血中濃度が著明に上昇する BNP トランスジェニックマウスを用いて、BNP/GC-A 系が腎保護的に作用することを報告してきた(Kasahara, et al. J Am Soc Nephrol 2000, Suganami et al. J Am Soc Nephrol 2001, Ogawa et al. J Am Soc Nephrol 2012 など)。これらの成果より、ヒトにおいても ANP や BNP の血中濃度を上げることで、心臓・腎臓・血管などに発現する GC-A を介した臓器保護作用が期待できると考えられる。一方、CNP/GC-B 系は骨において骨伸長作用を発揮するが、GC-B は骨以外に、血管内皮を含め全身に広く発現し抗線維化、抗炎症作用を種々の有用な作用をもつとされる。CNP の投与が腎障害を抑制するという報告が近年あるものの少数にとどまり(Hu et al. Lab Invest 2014, Kimura et al. Cancer Chemother Pharmacol 2015)、その意義が十分に明らかにされたとは言えない。NPR-C は ANP・BNP・CNP のクリアランスを担う受容体である。降圧・利尿・骨伸長作用・抗線維化作用などの作用を持つが、腎臓はその作用の主要臓器の一つである。オステオクリン (OSTN)は、骨格筋・骨から分泌されるペプチドで、NPR-C に特異的に結合をすることで、ANP・BNP・CNP のクリアランスを阻害することでその寿命を延長させ、これらの作用を増強させる可能性が示唆されている。実際、Ostn 過剰発現マウスは、Npr3(NPR-C) ノックアウトマウスに類似した骨伸長のフェノタイプを呈することが報告され、骨における CNP/GC-B シグナルを増強しうるということが報告された(Moffatt et al. J Biol Chem 2007)。さらに近年、リコンビナント Ostn 投与によりマウスの耐運動能が向上すること、運動自体でマウスの骨格筋での Ostn の発現・分泌が促進されることが報告された(Subbotina et al. Proc Natl Acad Sci USA 2015)。

2. 研究の目的

上述のように、骨や骨格筋で発現分泌する OSTN は、骨や骨格筋局所におけるナトリウム利尿ペプチド系の作用増強を介した生理機能を発揮することが明らかになっているが、発現・分泌された OSTN が循環系を介して遠隔臓器へ作用することに関しては明らかになっていない。もし、そのような作用があるとすれば、骨・骨格筋と遠隔臓器間における臓器連関の一端を担っている可能性がある。さらに、OSTN の濃度測定または、OSTN 自体もしくはそのアナログ投与が新たな疾患マーカーや治療になる可能性が考えられる。しかし、OSTN の信頼できる測定系ならびに OSTN 投与による腎疾患への影響を検討した報告はなかった。そこで、本研究では、1) OSTN が血液中に存在し、慢性腎臓病において OSTN 血中濃度の測定系を確立し、それがどのように変化するかを解析して腎臓と骨・骨格筋との間における臓器連関(骨・筋・腎連関)の可能性を検索すること、2) Ostn 過剰発現マウスまたは Npr3 ノックアウトマウスを用いて腎疾患における意義の解明をすること、を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、1) OSTN が血中に存在し、腎疾患や腎不全状態における骨・筋・腎連関の形成に OSTN/NPR-C 系が関与している可能性を明らかにする目的で、マウス・ヒトの血漿 OSTN 濃度の測定できるサンドイッチ CLEIA (化学発光酵素免疫測定法)を確立し、2) 腎疾患への OSTN/NPR-C 系の関与を解析する目的で、遺伝子改変マウスに腎障害を誘導し野生型マウスとの変化を評価することとした。

- 1) 確立した CLEIA 測定系を用い、マウス研究として、研究協力者の京都大学大学院医学研究科糖尿病・内分泌・栄養内科の八十田明宏講師らが作成した血中濃度上昇型 OSTN 過剰発現マウス(Ostn-Tg; Kanai, Yasoda, Mori KP et al. J Clin Invest 2017)、東北大学大学院薬学研究科臨床薬学講座の高橋信行准教授らが作成した Npr3 ノックアウトマウス(Npr3-KO; Matsukawa, Takahashi, et al. Proc Natl Acad Sci U S A 1999)または野生型マウス(WT)の血中濃度を測定した。一方、ヒト研究として、非透析 CKD 患者の血中濃度を横断的に測定し、臨床的パラメータとの相関を評価した(京都大学医学部附属病院医の倫理委員会承認番号 G0774 号)。さらに、WT マウスにアデニン負荷 CKD モデルを作製し、腎障害時における骨での Ostn mRNA 発現の変化を評価した。
- 2) CKD の特徴である腎線維化への OSTN/Npr3 系の寄与を *in vivo* で評価するため、Ostn-Tg

マウスまたは Npr3-KO マウスに対し、腎線維化モデルである片側尿管結紮(UUO)を行い、腎線維化や腎内の炎症の程度を WT マウスと比較した。

4. 研究成果

1) 研究協力者の国立循環器病研究センター研究所の望月直樹所長、南野直人創薬オミックス解析センター長より、活性型マウス Ostin (mOstin(80-130))の C 端に対するウサギポリクローナル抗体、活性型ヒト OSTN (hOSTN(83-133))の C 端に対するウサギポリクローナル抗体を入手した。これらを、mOstin(80-130)、hOSTN(83-133)いずれの N 端を認識する市販ラットモノクローナル抗体(R&D 社)を組み合わせた化学発光酵素免疫測定系(CLEIA)を確立した。マウス CLEIA は数十~数百 pg/mL オーダーを、ヒト CLEIA は十数~数百 pg/mL オーダーの濃度測定が可能であることを確認した。まず、マウス CLEIA を用い、Ostin-Tg マウスの血漿を測定すると約 50ng/mL の血中濃度であるのに対し、野生型マウスでは測定感度未満(<1ng/mL)であることを報告した(Kanai Y, Yasoda A, Mori KP, et al. J Clin Invest 2017)。さらに、Npr3 ノックアウトマウスやアデニン負荷 WT マウスの血中濃度も無介入 WT マウスと同様に測定感度未満であった(未発表データ)。

一方、ヒト CLEIA を用い、非透析導入 CKD 患者 103 名の血中 OSTN 濃度の測定を行ったところ、平均年齢 63 歳、eGFR 46mL/min/1.73m² に対し、平均 OSTN 血中濃度は 38 ± 35pg/mL であった。血中 OSTN 濃度は、年齢と弱い負の相関(R²=0.14, p<0.01)を、eGFR とごく弱い正の相関(R²=0.04, p<0.05)を示した。さらに、測定前の骨折既往のある患者では、年齢・腎機能に差はないのに対し、OSTN 濃度が有意に低値であることを見出した(21pg/mL vs 40pg/mL, p<0.01)。一方、12 ヶ月齢マウスは 8 週齢マウスと骨 Ostin mRNA 発現量は変わらないものの、アデニン負荷 CKD マウスにおいては、コントロールマウスと比較し約 70%の発現低下を認めた。すなわち、腎不全では細胞単位で OSTN 発現低下を認める一方で、加齢においては細胞単位における OSTN 発現低下ではなくおそらく骨量(もしくは骨格筋量)の低下により血中濃度が低下する可能性が示唆された。また、本 CKD コホートにおいては、比較的高齢患者が中心であったため、腎機能低下よりも加齢による変化が強く表れたと考察している。

以上の成果を、第 116 回日本内科学会総会・講演会で報告するとともに、論文準備中である。

2) 腎障害における OSTN/NPR-C 系の意義を評価するため、上述の Ostin-Tg マウスおよび Npr3-KO マウスに対し腎線維化モデルである片側尿管結紮(UUO)を施し、WT マウスとの腎障害の変化を検討した。既報においては、BNP/GC-A 系の増強または CNP/GC-B 系の増強が腎障害抑制作用を発揮しているため、これらの増強を促すと思われる Ostin 過剰状態(Ostin-Tg)もしくは Npr3 の欠失(Npr3-KO)も同様に腎障害改善を呈することが期待されたが、予想外に Ostin-Tg は WT マウスと比較し線維化の程度に変化はなく、Npr3-KO は線維化が有意に悪化することを確認した。Npr3-KO は UUO 早期に炎症性サイトカインの腎発現が亢進していたため、障害早期の炎症亢進が、その後の線維化の促進を来していると考えられた。また、Npr3 は細胞内にグアニリルシクラーゼ活性領域を有しないため、ナトリウム利尿ペプチドのクリアランス以外の作用については、広く受け入れられているメカニズムはない。しかし、Npr3 の発現自体が腎障害時における抗炎症作用を有しており、その欠失による影響が状況によりナトリウム利尿ペプチド系の増強作用を上回るため、臓器障害的に働かう可能性が示唆された。

以上の成果を、第 54 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会で報告したとともに、論文準備中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

1. Kanai Y, Yasoda A, Mori KP, Watanabe-takano H, Nagai-okatani C, Yamashita Y, et al. Circulating osteocrin stimulates bone growth by limiting C-type natriuretic peptide clearance. J Clin Invest. 2017;127(11):4136-47.
2. Kato Y, Mori K, Kasahara M, Osaki K, Ishii A, Mori KP, Toda N, Ohno S, Kuwabara T, Tokudome T, Kishimoto I, Saleem MA, Matsusaka T, Nakao K, Mukoyama M, Yanagita M, Yokoi H. Natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A pathway counteracts glomerular injury evoked by aldosterone through p38 mitogen-activated protein kinase inhibition. Sci Rep. 2017;7:46624.
3. Toda N, Mori K, Kasahara M, Koga K, Ishii A, Mori KP, Osaki K, Mukoyama M, Yanagita M, Yokoi H. Deletion of connective tissue growth factor ameliorates peritoneal fibrosis by inhibiting angiogenesis and inflammation. Nephrol Dial Transplant. 2018;33:943-953.

4. Ishii A, Katsuura G, Imamaki H, Kimura H, Mori KP, Kuwabara T, Kasahara M, Yokoi H, Ohinata K, Kawanishi T, Tsuchida J, Nakamoto Y, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M, Mori K. Obesity-promoting and anti-thermogenic effects of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in mice. Sci Rep. 2017;7:1-11.
5. Ono E, Uchino E, Mori KP, Yokoi H, Toda N, Koga K, Kasahara M, Matsubara T, Yanagita M. Peritonitis due to Mycobacterium abscessus in peritoneal dialysis patients: Case presentation and minireview. Renal Replacement Therapy. 2018 4:52.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 2018年12月7日、第54回高血圧関連疾患モデル学会学術総会、ナトリウム利尿ペプチドクリアランス受容体は抗腎線維化作用を有する(森慶太、半田貴也、石井輝、高橋信行、望月直樹、向山政志、柳田素子、横井秀基)
2. 2019年4月26日、第116回日本内科学会総会・講演会、高齢者慢性腎臓病における心保護・骨延長因子オステオクリンの低下(森慶太、石井輝、半田貴也、生島昭恵、望月直樹、南野直人、柳田素子、向山政志、横井秀基)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：横井秀基

ローマ字氏名：Hideki Yokoi

研究協力者氏名：石井輝

ローマ字氏名：Akira Ishii

研究協力者氏名：望月直樹

ローマ字氏名：Naoki Mochizuki

研究協力者氏名：南野直人

ローマ字氏名：Naoto Minamino

研究協力者氏名：八十田明宏
ローマ字氏名：Akihiro Yasoda

研究協力者氏名：金井有吾
ローマ字氏名：Yugo Kanai

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。