

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16670

研究課題名(和文)慢性腎臓病におけるミネラル結晶とコラーゲン分子の組織化障害をもたらす骨脆弱性

研究課題名(英文) Bone fragility induced by tissue disorder of mineral crystals and collagen in chronic kidney disease

研究代表者

清水 智弘 (Shimizu, Tomohiro)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：60784246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：CKDモデルラットを用いてCKDによる骨質異常の詳細を明らかにするとともに、進行期CKDに対する骨粗鬆症治療薬の有効性及び安全性の検証を行った。CKDラットを作成し、骨脆弱性発症のメカニズムのひとつとして炭酸塩含有率低下や高骨代謝回転などの骨質異常が関与することを明らかにした。次に代表的な骨粗鬆症治療薬であるBP製剤とTPD製剤の有効性及び安全性を検証した。BP製剤は、進行期CKD患者に対しても、安全かつ有効に使用できる可能性を示し用法・用量には大きく変化なかった。TPD製剤は骨形成優位に骨代謝回転を亢進させ、骨量増加と骨微細構造の改善などもたらすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病(Chronic kidney disease: CKD)罹患患者は、本邦では非常に多くなっており、その早期から骨折リスクが上昇するためCKDを原因とする続発性骨粗鬆症患者は相当数いると推定されている。CKD患者の骨脆弱性発症には骨質劣化が関与しているが、詳細についてはまた十分に解明されていない。また、進行期CKD患者に対して、腎排泄である既存の骨粗鬆症治療薬の有効性と安全性の検証は行われていない。本研究は前臨床研究として、動物モデルを作成して、骨代謝調整薬を投与し、骨質を含めた評価と安全性について検証を行った。この知見は臨床での薬剤投与法に参考になりうるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We clarified the mechanism of bone fragility by chronic kidney disease and investigated efficacy and safety of bisphosphonate (BP) and terparatide (TPD). We found the deterioration of bone quality including material parameters and high bone turnover. We next investigated the efficacy and safety of medicine. BP was safe and improved osteoporosis and bone fragility via suppression of bone turnover and there were no significant differences between different dose and frequency. TPD improved low bone volume and bone microstructure via promoting the bone turnover.

研究分野：整形外科

キーワード：骨脆弱性 慢性腎臓病 骨質

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 (Chronic kidney disease; CKD) は、全世界人口の 12-14% が罹患していると報告されており (U.S. Renal Data System.USRDS 2013) 本邦では患者数は 1330 万人にものぼる (CKD 診療ガイドライン 2012)。また、原発性骨粗鬆症も患者数が多い疾患であり、ヨーロッパでは 2750 万人 [1]、高齢化がすすむ日本では現在 1280 万人と報告されている (骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2015)。共に高齢者が多く罹患し、CKD と骨粗鬆症を合併した患者は相当数存在するものと考えられ、CKD 自体も続発性骨粗鬆症のリスク因子とされている [2]。CKD では stage が進行すると骨密度と関係なく骨質劣化に伴い骨折率が増加することが報告されている [3, 4]。その為、CKD では早期から骨粗鬆症治療を行うことが望ましいが、いまだに CKD における骨折予防に有用な骨粗鬆症治療法は CKD stage 1-3 までは確立しているが、late-stage (CKD stage 4 and 5) では確立していない。その理由の一つに骨粗鬆症治療薬のほとんどが腎排泄であるため人における臨床試験が未施行であることがあげられる。

2. 研究の目的

CKD stage 4 に対する薬剤の安全性・骨 (特に骨質) への影響を明らかにすることを主目的として、以下の三つを研究の目的として行った。CKD モデルラットを作成し、骨質劣化と骨脆弱性の評価を行うこと。CKD モデルラットに骨吸収抑制剤であるビスフォスフォネート製剤 (以下 BP) と骨形成促進剤である副甲状腺ホルモン製剤 (以下 TPD) 投与し比較すること。BP 製剤の投与量・頻度による違いにおける比較検討を行うこと。

3. 研究の方法

実験 1

Miller らの方法に準じて雄性 SD ラット (日本クレア、東京、日本) に対して 5/6 腎摘出 (nephrectomy ; Nx) する群 (CKD) と後腹膜切開のみを行う群 (Sham) とに分けた。食餌は本学の動物実験施設で通常使用されているカルシウム含有 0.98%、リン含有 0.80% のラボ MR ストック (日本農産工業、神奈川、日本) で飼育し、8 週齢で左腎臓を 2/3 摘出し、2 週間の回復期間をおいた後に、10 週齢で右腎臓を全摘してトータル 5/6Nx とし、14 週後の 24 週齢で尾静脈採血を行い CKD モデルの検証をした。

実験 2

24 週齢で CKD モデルとした後、すべてのラットを無作為に Vehicle control 群、alendronate (ALN) 投与群、TPD 投与群に分け、Sham 群と合わせて 4 群に分けた。ALN (LKT Laboratories, Inc, MN) は 50 µg/kg/day、TPD (Forteo®; Eli Lilly, Ltd., 神戸、日本) は 40 µg/kg/day で 4 週間毎日皮下投与した。

実験 3

CKD ラットモデルを同様の主義で作成し、20 週齢における採血で人における CKD stage 4 相当になっていることを確認し、Sham-vehicle、Sham-LDHF、Sham-HDLF、CKD-vehicle、CKD-LDHF、CKD-HDLF の 6 群を作成した。BP 製剤の一種であるアレンドロネート (ALN: alendronate) を LDHF 群は 0.05mg/kg/day、HDLF 群は 0.7mg/Kg/2 week で 10 週間投与した。Vehicle 群には PBS を連日投与した。

評価項目は以下の通りとした。

Primary end point (骨への効果) : 骨質・骨微細構造; マイクロ CT 検査 (左大腿骨遠位骨幹端, 第 5 腰椎) 骨力学強度検査; 圧縮試験 (左大腿骨遠位骨幹端, 第 5 腰椎) 骨代謝回転評価; 骨形態計測 (右大腿骨) 骨材料特性; フーリエ変換赤外分光法 (以下 FTIR, 右大腿骨)

Secondary end point (腎臓に与える影響) : 血液検査 (BUN, Cre, IP, Ca) 尿検査 (U-Alb, U-Cre, U-NAG) 腎病理 (elastica-masson 染色) を行った。

4. 研究成果

実験 1

5/6Nx とラボ MR ストックの飼育でモデルラットは CKD ステージ 4 に相当する腎障害を呈した
24 週齢時点の採血で、Sham 群と比較し CKD 群は腎機能障害と高リン血症・高リン利尿ホルモン血症が出現したが、血清 Ca 値は変化しなかった。

腎機能とミネラル代謝に対する影響

ALN と TPD の 4 週間投与によって腎機能の悪化を認めなかった。Vehicle と比較して、ALN の 4 週間投与によって血清 Ca 値は有意に低下し、血清 IP 値も低下する傾向であった。TPD の投与では血清 Ca 値と血清 IP 値に差はでなかった。

実験 1 および 2

力学的特性に対する影響

Sham と比較して Vehicle は最大荷重と剛性に変化を認めなかった。材質特性である弾性率と曲

げ強度については Vehicle で低下を認めた。TPD の投与によって最大荷重と剛性、材質特性である弾性率と曲げ強度がそれぞれ有意に増加し、ALN の投与では弾性率と曲げ強度のみ有意に増加する傾向であった。

骨量と骨微細構造に対する影響

Sham と比較して Vehicle は遠位大腿骨で骨量の増加を認めたものの、第 5 腰椎では変化を認めなかった。その他の骨密度や海綿骨と皮質骨の骨微細構造についても変化を認めなかった。TPD の投与によって大腿骨と第 5 腰椎ともに骨量の増加と骨微細構造の変化を認めた。

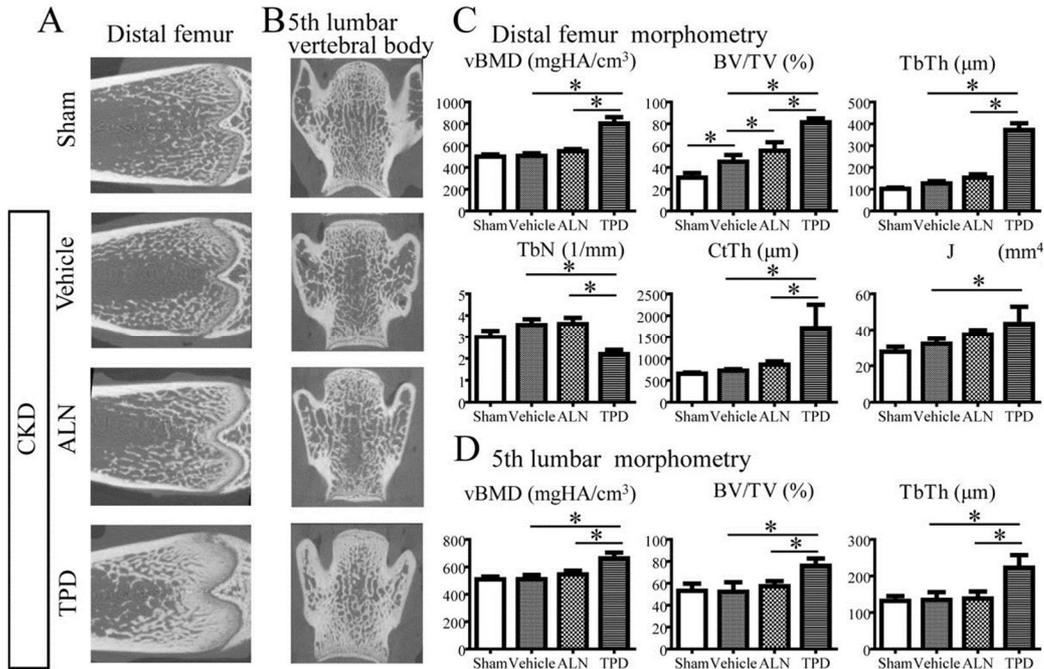


図 1: マイクロ CT と骨微細構造の比較

骨代謝に対する影響

CKD による骨代謝への影響と薬剤の効果を明らかにするために、我々は投与 4 週間後に大腿骨遠位の組織学的検討を行った。Sham と比較して Vehicle は、明視野で赤紫色に観察される類骨が多くなっており、蛍光で観察されるカルセインの 2 重標識間隔も広がっていることから二次性副甲状腺機能亢進症を反映した高骨代謝回転になっていることがわかったが定量的評価では有意差はなかった。

骨質に対する影響

CKD による骨質への影響を評価するために、骨の材質を可視化する手法である FTIR イメージングを行った。骨質のパラメータである石灰化度と炭酸塩含有量を計測すると皮質骨において vehicle CKD ラットは石灰化度と炭酸塩含有量の低下を認める一方で ALN 投与では石灰化度と炭酸塩含有量の上昇を認め TPD 投与では石灰化度上昇と炭酸塩含有量の低下を認めた。

実験 3 BP 製剤における投与・頻度の変化

マイクロ CT 検査における骨質・骨微細構造の評価

大腿骨遠位：組織量当たりの海綿骨量 (BV/TV)、骨梁数 (Tb.N.)、骨梁幅 (TbTh) は CKD の影響・ALN の投与による影響が有意にあり、また CKD と ALN の有意な相互作用を BV/TV と TbTh で認めた。しかし、LDHF, HDLF による投与スケジュール間の差は sham 群、CKD 群共に認めなかった。また皮質骨では有意な CKD および ALN による変化は認められなかった (図 2)。

腰椎：CKD 群で体積骨密度 (vBMD) BV/TV は Sham 群に比べて有意に低下した。ALN の投与により BV/TV は CKD-LDHF 群および CKD-HDLF 群で共に有意に CKD-vehicle 群と比べて有意に増加したが、CKD-LDHF, CKD-HDLF 群における有意差はいずれのパラメータでも認められなかった。ALN は LDHF, HDLF のいずれの投与スケジュールでも CKD stage4 ラットの大腿骨遠位骨幹端、第 5 腰椎の骨強度は改善した。

大腿骨遠位骨幹端と第 5 腰椎を用いた圧縮試験による骨力学強度の評価

大腿骨遠位骨幹端では力学強度のうち構造力学的パラメータである破断強度 (Ultimate load)、剛性 (Stiffness)、破壊エネルギー (energy to failure) はいずれも ALN の投与による有意な影響は認められたものの、CKD による影響は認めなかった。CKD 群において Ultimate load、Stiffness、energy to failure は有意に ALN の投与で改善した。CKD-LDHF、CKD-HDLF 群における有意差はい

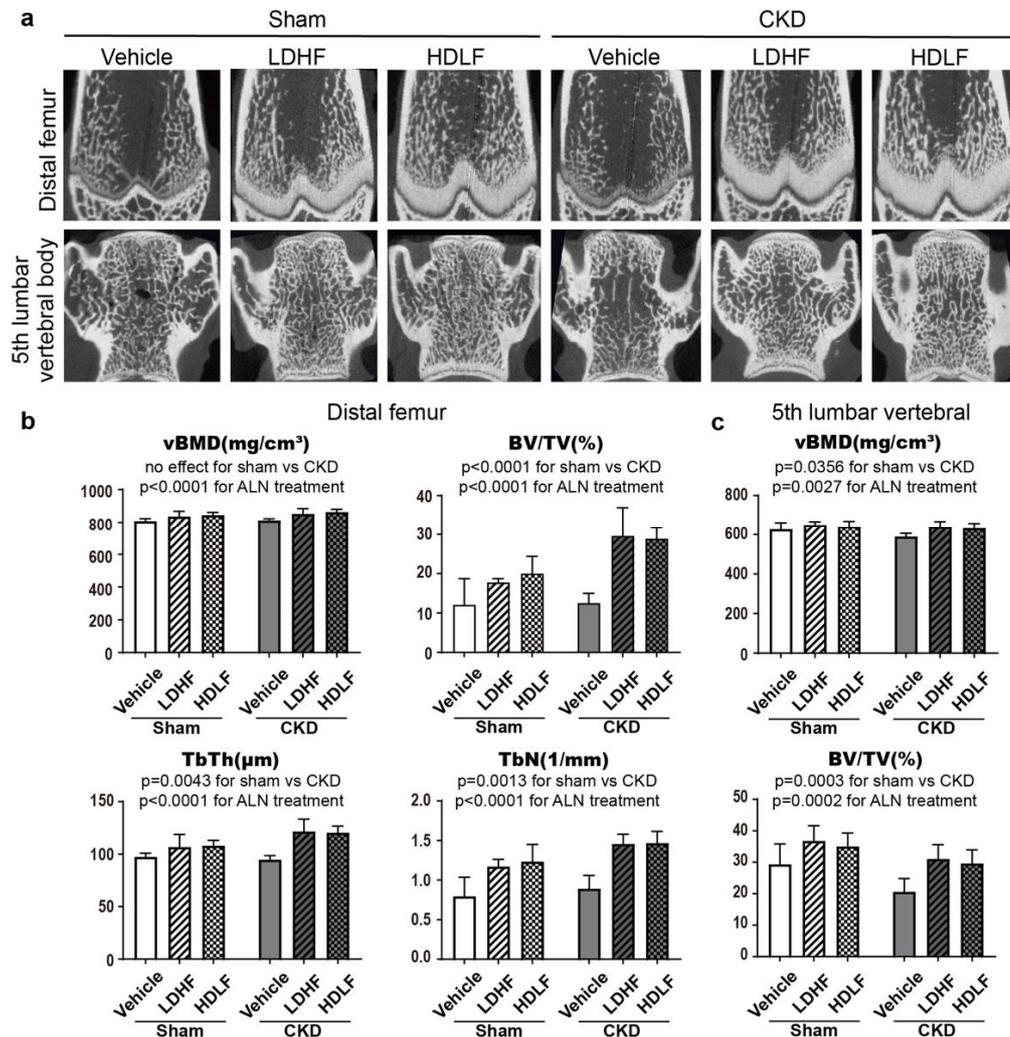


図 2: マイクロ CT と骨微細構造の比較

ずれの項目でも認めなかった。

血液検査, 尿検査, 腎病理を用いた薬剤性腎機能障害の評価

血液検査においても CKDstage4 ラットに対する ALN の投与は予想に反して、LDHF 群だけでなく HDLF 群でも薬剤性腎機能障害を認めなかった。

血液検査: BUN, Cre は CKD による有意な増加は認めたものの ALN による影響は認めなかった。CKD は Sham- と比べて有意に BUN, Cre の増加を認めたが、ALN 投与によるさらなる増加は認めなかった。また Ca, IP の有意な変化も CKD-vehicle, CKD-LDHF, CKD-HDLF 群のいずれの間でもみとめなかった。

腎病理: glomerulus number per area で腎機能評価を、elastica-masson 染色で青く染色された領域 (間質障害領域) を WinROOF image analysis software (Mitani Corporation, Tokyo, Japan) を用いて計測し、薬剤性間質障害の程度を評価した。CKD-vehicle は Sham-vehicle と比べて有意に glomerulus number per area は低下しており、elastica-masson 染色領域は増加していたが、CKD-vehicle, CKD-LDHF, CKD-HDLF 群のいずれの間でも有意な差はみとめなかった。尿検査: U-Alb/U-Cre, U-NAG (腎間質障害の指標) は共に sham-vehicle に比べて CKD-vehicle で有意に増加していたが、CKD-vehicle, CKD-LDHF, CKD-HDLF 群のいずれの間でも有意な変化をみとめなかった。

骨形態計測を用いた骨代謝回転の評価

Sham-vehicle 群と比して CKD-vehicle 群ではカルセインによるラベリング間隔の差が有意に広がり、高骨代謝回転になっていることが確認された。また CKD 群では sham 群と比べて有意に類骨が増加していることが確認され、CKD-vehicle では高骨代謝回転を、CKD-LDHF, CKD-HDLF 群では石灰化障害が反映している (i.e., Mit) ためと考えられた。骨形成パラメータは (i.e., Ob. Pm/B. Pm, MAR, BFR/B. Pm, M.Pm/B.Pm)、骨吸収パラメーター (i.e., E. Pm/B. Pm) いずれも

CKD と ALN の両方の影響を有意にうけるという結果となり、Tukey post-hoc analysis により骨形成マーカーのうち MAR、BFR/B. Pm, M.Pm/B.Pm と骨吸収マーカーの E. Pm/B. Pm では CKD-vehicle と比して ALN 投与による CKD-HDLF, CKD-LDHF のいずれにおいても有意差を認めただけでなく、CKD-HDLF と CKD-LDHF の間でも有意差を認めた。つまり CKDstage4 に対する ALN 投与は LDHF、HDLF 共に有意に骨代謝回転を抑制したが、HDLF は LDHF よりもさらに有意に骨代謝回転を抑制した。

FTIR を用いた大腿骨の材料特性評価

ALN の投与により CKD-LDHF、CKD-HDLF は共に CKD-vehicle と比して有意に海面骨の石灰化度、ミネラル成熟度が増加した。また CKD-HDLF では CKD-LDHF と比べても有意に石灰化度、ミネラル成熟度が増加した。

参考文献

1. Svedbom A, Hernlund E, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, McCloskey EV, Jönsson B, Kanis JA, IOF ERPo (2013) Osteoporosis in the European Union: a compendium of country-specific reports. Arch Osteoporos 8:137
2. Inker LA, Lambers Heerspink HJ, Mondal H, Schmid CH, Tighiouart H, Noubary F, Coresh J, Greene T, Levey AS (2014) GFR decline as an alternative end point to kidney failure in clinical trials: a meta-analysis of treatment effects from 37 randomized trials. Am J Kidney Dis 64:848-859
3. Cummings SR, Black DM, Nevitt MC, Browner W, Cauley J, Ensrud K, Genant HK, Palermo L, Scott J, Vogt TM (1993) Bone density at various sites for prediction of hip fractures. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. Lancet 341:72-75
4. Naylor KL, McArthur E, Leslie WD, et al. (2014) The three-year incidence of fracture in chronic kidney disease. Kidney Int 86:810-818

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Asano Tsuyoshi, Shimizu Tomohiro, Takahashi Daisuke, Ota Masahiro, Sato Dai, Hamano Hiroki, Hiratsuka Shigeto, Takahata Masahiko, Iwasaki Norimasa	4. 巻 37
2. 論文標題 Potential association with early changes in serum calcium level after starting or switching to denosumab combined with eldecalcitol	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 351 ~ 357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1007/s00774-018-0928-x	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 該当する
1. 著者名 Ota Masahiro, Takahata Masahiko, Shimizu Tomohiro, Momma Daisuke, Hamano Hiroki, Hiratsuka Shigeto, Amizuka Norio, Hasegawa Tomoka, Iwasaki Norimasa	4. 巻 37
2. 論文標題 Optimal administration frequency and dose of teriparatide for acceleration of biomechanical healing of long-bone fracture in a mouse model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 256 ~ 263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1007/s00774-018-0930-3	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 該当する
1. 著者名 Ota M, Takahata M, Shimizu T, Kanehira Y, Kimura-Suda H, Kameda Y, Hamano H, Hiratsuka S, Sato D, Iwasaki N.	4. 巻 28
2. 論文標題 Efficacy and safety of osteoporosis medications in a rat model of late-stage chronic kidney disease accompanied by secondary hyperparathyroidism and hyperphosphatemia.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Osteoporosis International	6. 最初と最後の頁 1481-1490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00198-016-3861-7	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 該当する
1. 著者名 Shimodan S, Sato D, Takahashi K, Nakamura Y, Hyakkan R, Watanabe T, Hishimura R, Ota M, Shimizu H, Hojo Y, Hasegawa Y, Chubachi T, Yasui K, Tsujimoto T, Tsukuda Y, Asano T, Takahashi D, Takahata M, Iwasaki N, Shimizu T.	4. 巻 38
2. 論文標題 Ten years change in post-fracture care for hip fracture patients.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 222-2229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-019-01047-3	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 太田昌博, 清水智弘, 菱村亮介, 高橋要, 佐藤大, 辻本武尊, 岸本隆史, 林晴久, 宮本守孝, 佃幸憲, 高橋大介, 高畑雅彦, 岩崎倫政
2. 発表標題 手術加療を施行した脆弱性骨折における術後骨粗鬆症検査・治療介入率の検証 - 北海道10年多施設後ろ向きコホート -
3. 学会等名 第20回日本骨粗鬆症学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤大, 清水智弘, 菱村亮介, 高橋要, 太田昌博, 辻本武尊, 佃幸憲, 高橋大介, 高畑雅彦, 岩崎倫政
2. 発表標題 新規骨粗鬆症治療薬が骨粗鬆症性骨脆弱性骨折に及ぼす影響の検討：10年2747例の検討
3. 学会等名 第20回日本骨粗鬆症学会, 長崎市, 2018年10月26日-28日
4. 発表年 2018年

〔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
---------------------------	-----------------------	----