

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590950
 研究課題名（和文） 慢性腎不全にともなうミネラル骨代謝異常における新規活性および阻害分子の作用機序
 研究課題名（英文） Role and Action of New Stimulants and inhibitors on Bone Metabolism in Chronic Kidney Disease
 研究代表者
 深川 雅史 (FUKAGAWA MASAFUMI)
 神戸大学・医学部附属病院・准教授
 研究者番号：00211516

研究成果の概要：

慢性腎臓病(Chronic Kidney Disease: CKD)とその最大の原因である糖尿病における骨代謝異常の機序,特に骨の副甲状腺ホルモン(PTH)に対する抵抗性と骨芽細胞機能抑制の発症機序について検討したところ,尿毒症物質であるインドキシル硫酸が有機酸トランスポーターを通じて細胞内に入り,酸化ストレスを惹起して,PTHの作用を減弱させることを示した.また,酸化ストレスは,糖尿病における骨芽細胞機能低下にも大きな役割を果たしていることが,糖尿病動物モデルや抗酸化物質過剰発現マウスを用いた実験で明らかになった.これらの知見は,CKDにおける骨回転の調節異常の治療法につながると考えられる.

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：人工透析学, 骨代謝

1. 研究開始当初の背景

腎臓は,骨,副甲状腺,腸管とともに,生体のミネラルバランスの維持のために最も重要な臓器の一つである.したがって,腎臓の機能が次第に低下する慢性腎臓病(Chronic Kidney Disease: CKD)では,この調節系の異常は必発し,生命予後をも左右する全身疾患としてCKD-MBDと呼ばれている.われわれは,CKDの最大の原因である糖尿病も含めて,この病態を広く解明して来た.

その中でわれわれは,尿毒物質や酸化ストレスの骨代謝(特に骨芽細胞機能の抑制)に

おける役割,新規PTH分子の存在について,新しい知見を得たので,この3つの病態について解析を進めることとした.

2. 研究の目的

CKDや糖尿病などの病態における骨代謝刺激因子と抑制因子の役割について,

- (1) CKDにおける骨のPTHに対する抵抗性に関与しているインドキシル硫酸の作用機序を解明する.
- (2) 糖尿病モデル動物の骨病変の発症におけ

る酸化ストレスや AGE (Advanced Glycation Endproducts) の関与の検討を行う。

- (3) 重症の二次性副甲状腺機能亢進症例における新規PTH分子の存在証明と解析を行う。
ことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 新生児ラット頭蓋骨より初代培養した骨芽細胞を用いて、尿毒物質であるインドキシル硫酸の細胞増殖、酸化ストレスに対する影響を検討した。

(2) ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスや日本人の2型糖尿病のモデルであるSDTラットにおいて、骨形態、酸化ストレスやAGE関連マーカーの解析を行った。また、全身にthioredoxin-1を過剰発現させたマウスおよびRAGEノックアウトマウスでも、同様の解析を行った。

(3) 新規PTH分子の存在が示唆された症例では、第3世代(whole PTH等)/第2世代(intact PTH)等の比率が逆転していた。そこで、研究代表者のネットワークを通じて、そのような症例の情報を集積し、その治療への反応性や副甲状腺腫大度などを検討した。

また、これらの症例より収集した血清や腺抽出物を用いて、新規PTH分子を直接定量化する検査法を開発するために、複数の抗体カラムを用いる方法と、簡易HPLC法の検討を行った。

4. 研究成果

(1) われわれは、腎不全において血清中に蓄積するインドキシル硫酸が、骨のPTHに対する抵抗性の原因になっていることを動物実験で証明していた。実際に透析患者で検討してみたところ、血清インドキシル硫酸濃度は、PTH濃度や骨形成マーカーであるアルカリフォスファターゼ活性と相関していたが、骨吸収マーカーであるTRAP5Bとの関係は見られなかった。

さらに骨芽細胞を用いた実験で、インドキシル硫酸が、プロベネシドにて阻害される細胞膜の有機酸トランスポーターを通じて細胞に入り、酸化ストレスを惹起することによって、PTHの作用を減弱させるとともに、PTH受容体をdown regulateすることを明らかにした。このような機序は、その後、他の尿毒物質でも証明された。

(2) ストレプトゾトシンによる糖尿病マウスやSDTラットにおいて、骨芽細胞機能の抑

制に酸化ストレスが強く関与しており、インスリン治療によって、それが改善することを明らかにした。

さらに、抗酸化作用のあるthioredoxin-1過剰発現マウスを解析したところ、酸化ストレスの改善に伴い、骨芽細胞機能が改善し、骨密度の低下が予防されていることも示した。

また、AGEの骨代謝に対する影響を調べるために、AGE受容体(RAGE)欠損マウスの解析を行ったところ、非糖尿病状態では、RAGE欠損マウスの骨密度は野生型マウスに比べて増加しており、骨形態計測では石灰化面積の増大、骨吸収能低下が見られた。しかし、予想に反し、糖尿病状態では有意な差が認めず、その機序のさらなる検討が必要と考えられた。

(4) 新規PTH分子の存在を示唆する検査結果を示す症例は、全体の1-2%で、特に重篤な二次性副甲状腺機能亢進症を呈していた。特殊なHPLC法を用いて、従来の1-84PTHや7-84PTHとは異なるピークを示すことはできたが、簡便法の確立までは至らなかった。この分子は、intact PTH測定キットでは検出できないが、whole PTH測定キットでは検出できるというもので、intact PTHで用いられている抗体が認識する、アミノ端より10以上離れた部分のアミノ酸が、何らかの修飾と受けているものと推測された。

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 24 件)

1. 2. Ivanovski O, Nikolov IG, Joki N, Caudrillier A, Phan O, Mentaverri R, Maizel J, Nguyen-Khoa T, Fukagawa M, Kamel S, Lacour B, Druke TB, Massy Z: The calcimimetic R-568 retards progression of uremia-enhanced vascular calcification and atherosclerosis in apolipoprotein E deficient (apoE^{-/-}) mice. Atherosclerosis, in press, 2009. (査読あり)

2. Fujii H, Nishijima F, Goto S, Sugano M, Yamato H, Kitazawa R, Kitazawa S, Fukagawa M: Oral charcoal adsorbent (AST-120) prevents the progression of cardiac damage in chronic kidney disease through the suppression of oxidative stress. Nephrol Dial Transplant, in press, 2009. (査読あり)

3. Sato T, Fukagawa M, Uchida K, Katayama A, Nagasaka T, Matsuoka S, Goto N, Tominaga

Y, Kobayashi T, Nakao A: Pharmacokinetic target for ciclosporin A-based regimens in renal transplantation: Implications of maintaining 1,25-dihydroxyvitamin D3 synthesis. Clin Transplant 23: 368-374, 2009. (査読あり)

4. Hamada Y, Fujii H, Kitazawa R, Yodoi J, Kitazawa S, Fukagawa M: Thioredoxin-1 overexpression in transgenic mice attenuates streptozotocin-induced diabetic osteoporosis: A novel role of oxidative stress and therapeutic implications. Bone 44: 936-941, 2009. (査読あり)

5. Fukagawa M, Yumita S, Akizawa T, Uchida E, Tsukamoto Y, Iwasaki M, Koshikawa S, and KRN1493 study group: Cinacalcet (KRN 1493) effectively decreases serum intact PTH level with favorable control of serum phosphorus and calcium levels in Japanese dialysis patients. Nephrol Dial Transplant 23: 328-335, 2008. (査読あり)

6. Shiizaki K, Fukagawa M, Yuan Q, Hatamura I, Nii-Kono T, Saji F, Shigematsu T, Akizawa T: Direct calcitriol or its analogue injection improves abnormal gene expression of hyperplastic parathyroid gland in secondary hyperparathyroidism. Am J Nephrol 28: 59-66, 2008. (査読あり)

7. Fujii H, Hamada Y, Fukagawa M: Bone formation in the newly established non-obese type 2 diabetic model rats; Spontaneously Diabetic Torii (SDT) rats. Bone 42: 372-379, 2008. (査読あり)

8. Nakai S, Akiba T, Kazama JJ, Yokoyama K, Fukagawa M, Tominaga Y, Iseki K, Tsubakihara Y: Effects of serum levels of calcium, phosphorus, and intact PTH on survival in chronic hemodialysis patients in Japan. Ther Aphr Dial 12: 49-54, 2008. (査読あり)

9. Hamada Y, Nii-Kono T, Moriguchi Y, Higuchi M, Fukagawa M: Alteration of duodenal iron absorption in adenine-induced renal failure rats: a possible mechanism of iron deficiency in chronic kidney disease patients with erythropoietin treatment. Nephrol Dial Transplant 23: 1886-1891, 2008. (査読あり)

10. Tsuchihashi D, Abe T, Komaba H, Fujii H, Hamada Y, Nii-Kono T, Tanaka M, Fukagawa M: Serum hepcidin as an indicator of iron status in dialysis patients. Ther Aphr Dial 12: 226-231, 2008. (査読あり)

11. Fujii H, Takiuchi S, Kawano Y, Fukagawa M: Putative role of asymmetric

dimethylarginine in microvascular disease of kidney and heart in hypertensive patients, Am J Hypertension 21: 650-656, 2008. (査読あり)

12. Fujii H, Fukuda A, Tanaka M, Kojima Y, Ishida T, Hirata K, Fukagawa M: Putative role of endothelial lipase in cardiovascular disease in dialysis patients with malnutrition and inflammation. Am J Nephrol 28: 974-981, 2008. (査読あり)

13. Kakuta T, Fukagawa M, Kitaoka M, Koiwa F, Onoda N, Tominaga Y, Akizawa T, Kurokawa K: Percutaneous ethanol injection therapy for advanced renal hyperparathyroidism in Japan: A 2004 survey by the Japanese Society for Parathyroid Intervention. NDT Plus (Supple) 1: iii21-iii25, 2008. (査読あり)

14. Tanaka R, Kakuta T, Koiwa F, Fukagawa M, Saito A: Long-term prognosis (over 5 years) of parathyroid function in chronic dialysis patients after PEIT guided by ultrasonography. NDT Plus (Supple) 1: iii29-iii34, 2008. (査読あり)

15. Tanaka M, Nakanishi S, Komaba H, Itoh K, Matsushita K, Fukagawa M: Association between long-term efficacy of cinacalcet and parathyroid gland volume in haemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. NDT Plus (Supple) 1: iii49-iii53, 2008. (査読あり)

16. Tanaka M, Komaba H, Itoh K, Matsushita K, Matsushita K, Hamada Y, Fujii H, Fukagawa M: The whole-PTH/intact-PTH ratio is a useful predictor of severity of secondary hyperparathyroidism. NDT Plus (Supple) 1: iii59-iii62, 2008. (査読あり)

17. Kakuta T, Tanaka R, Kanai G, Miyamoto Y, Inagaki M, Suzuki H, Fukagawa M, Saito A: Relationship between the weight of parathyroid glands and their secretion of parathyroid hormone in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. Ther Aphr Dial 12: 385-390, 2008. (査読あり)

18. Fujimori A, Yorifuji M, Sakai M, Fukagawa M: Reduced dialysate calcium improves mineral metabolism in hemodialysis patients. Clin Nephrol 67: 20-24, 2007. (査読あり)

19. Hamada Y, Fukagawa M: A Possible role of thioredoxine interacting protein in the pathogenesis of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. Kobe J Med Sci 53: 53-61, 2007. (査読あり)

20. Nii-Kono T, Iwasaki Y, Yamato H, Fukagawa M: Indoxyl sulfate induced skeletal resistance to PTH in osteoblastic cells, *Kidney Int* 71: 738-743, 2007. (査読あり)
21. Hamada Y, Kitazawa S, Kitazawa R, Fujii H, Kasuga M, Fukagawa M: Histomorphometric analysis of diabetic osteopenia in streptozotocin-induced diabetic mice: a possible role of oxidative stress. *Bone* 40: 1408-1414, 2007. (査読あり)
22. Hamada Y, Miyata S, Nii-Kono T, Kitazawa R, Kitazawa S, Higo S, Fukunaga M, Ueyama S, Nakamura H, Yodoi J, Fukagawa M, Kasuga M: Overexpression of thioredoxin 1 in transgenic mice suppresses development of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 22: 1547-1557, 2007. (査読あり)
23. Yamashita H, Yamazaki Y, Hasagawa H, Yamashita T, Fukumoto S, Shigematsu T, Kazama JJ, Fukagawa M, Noguchi S: Fibroblast growth factor-23 (FGF-23) in patients with transient hypoparathyroidism: Its important role in serum phosphate regulation. *Endocrine J* 54: 465-470, 2007. (査読あり)
24. Fujii H, Kim J-I, Abe T, Umezumi M, Fukagawa M: Relationship between parathyroid hormone and cardiac abnormalities in chronic dialysis patients without cardiac disease, *Internal Med* 46: 1507-1512, 2007. (査読あり)

[学会発表] (計 16 件)

- 1 Fukagawa M: FGF23, phosphate, and VDRE in dialysis. V International Symposium: Advances in Bone and Mineral Disorders in CKD, May 20, 2009, Oviedo, Spain.
2. Fukagawa M: Nephrology in earthquakes: Sharing experiences and information, Workshop of Earthquake Related AKI, co-organized ISN COMGAN & Chinese Society of Nephrology, December 16, 2008, Chengdu, China.
3. Iwasaki Y, Yamato H, Fukagawa M: Kidney dysfunction disturbs collagen maturation in dynamic bone disease as assessed by confocal laser Raman spectroscopy, American Society for Bone and Mineral Research, September 14, 2008, Montreal, Canada.
4. Shiizaki K, Hatamura I, Nakazawa E, Iwazu Y, Watanabe Y, Fukagawa M, Akizawa T, Kusano E: Functional induction of

target genes in parathyroid cell by direct injection technique, American Society for Bone and Mineral Research, September 14, 2008, Montreal Canada.

5. Tanaka M, Tokunaga T, Komaba H, Itoh K, Matsushita K, Maruyama T, Otagiri M, Fukagawa M: Vitamin D receptor activator (VDRA) treatment attenuate increased oxidative stress in hemodialysis patients, American Society of Nephrology, November 7, 2008, Philadelphia, USA.
6. Shiizaki K, Hatamura I, Nakazawa E, Saji F, Imazu Y, Watanabe Y, Ueda Y, Fukagawa M, Akizawa T, Kusano E: Functional induction of target genes in parathyroid cell by direct injection, American Society of Nephrology, November 7, 2008, Philadelphia, USA.
7. Fujii H, Hamada Y, Komaba H, Kitazawa R, Kitazawa S, Fukagawa M: Different roles of oxidative stress and asymmetric dimethylarginine for the progression of diabetic nephropathy in the newly established non-obese type 2 diabetic model rat: Spontaneously Diabetic Torii (SDT) rats, American Society of Nephrology, November 7, 2008, Philadelphia, USA.
8. Goto S, Fujii H, Kim J-I, Fukagawa M: Sevelamer hydrochloride elevates serum homocysteine levels through inhibiting absorption of folic acid in chronic dialysis, American Society of Nephrology, November 7, 2008, Philadelphia, USA.
9. Hamada Y, Goto S, Komaba H, Fujii H, Fukagawa M: Putative roles of receptors for AGEs (RAGE) in bone metabolism under non-diabetic and diabetic, American Society of Nephrology, November 7, 2008, Philadelphia, USA.
10. Komaba H, Nakazawa T, Tsuji G, Yamaguchi Y, Kumagai S, Fukagawa M: Treatment of various renal involvements associated with multicentric Castleman's disease with anti-interleukin-6 receptor antibody (Tocilizumab), American Society of Nephrology, November 7, 2008, Philadelphia, USA.
11. Fukagawa M: FGF-23 in CKD, ectopic calcification, post-transplantation hypophosphatemia, and nephrolithiasis. Symposium, XLV ERA-EDTA Congress, May 12, 2008, Stockholm, Sweden, .
11. Fukagawa M: CKD-MBD in diabetes: from bench to bedside, Updates on CKD-MBD, Korea University, April 26, 2008, Seoul, Korea.
13. Fukagawa M: PTH assay: from principle

to practice, Updates on CKD-MBD, Korea University, Seoul, April 26, 2008, Seoul, Korea.

14. Fujii H, Takiuchi S, Kawano Y, Fukagawa M: Asymmetric dimethylarginine reflects an incipient atherosclerosis in both kidney and heart, ERA-EDTA Congress, June 22, 2007, Barcelona, Spain.

15. Fukagawa M, Yumita S, Akizawa T, Tsukamoto Y, Uchida E, Iwasaki M, Koshikawa S: Randomized, placebo-controlled trial of cinacalcet (KRN1493) in Japanese dialysis patients with more severe hyperparathyroidism and longer dialysis, June 22, 2007, ERA-EDTA Congress, Barcelona, Spain.

16. Tanaka M, Itoh K, Matsushita K, Matsushita K, Hamada Y, Fujii H, Fukagawa M: 1-84PTH/intact PTH ratio is a useful predictor of the severity of secondary hyperparathyroidism, ERA-EDTA Congress, June 22, 2007, Barcelona, Spain.

[図書] (計 5 件)

1. Komaba H, Tanaka M, Fukagawa M: Imaging of intervention of parathyroid hyperplasia, in Spectrum of Renal Osteodystrophy and Vascular Calcification in Uremia, edited by Olgaard K, Silver J, Salusky I, Oxford University Press, in press.

2. Cho KC, Fukagawa M, Kurokawa K: Fluid & Electrolyte Disorders, in 2008 Current Medical Diagnosis & Treatment, edited by McPhee SJ, Papadakis, MA, Lange Medical Books/McGraw Hill, New York, 2009, pp766-794.

3. Fukagawa M, Kurokawa K, Papadakis MA:
2. Fukagawa M, Kurokawa K, Papadakis MA: Fluid & Electrolyte Disorders, in 2008 Current Medical Diagnosis & Treatment, edited by McPhee SJ, Papadakis, MA, Tierney LM Jr., Lange Medical Books/McGraw Hill, New York, 2008, pp757-784.

4. Fukagawa M, Tanaka M: Hypophosphatemia, Encyclopedic reference of molecular mechanism of disease, Springer, 2008.

5. Fluid & Electrolyte Disorders, in 2007 Current Medical Diagnosis & Treatment, edited by Tierney LM Jr, McPhee SJ, Papadakis MA, Lange Medical Books/McGraw Hill, New York, pp887-913, 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深川 雅史 (FUKAGAWA MASAFUMI)

神戸大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 00211516

(2) 研究分担者

濱田 康弘 (HAMADA YASUHIRO)

神戸大学・医学部附属病院・特定助教

研究者番号: 30397830

(3) 連携研究者

なし