

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17749

研究課題名(和文)CKD-MBDにおける骨病変と破骨細胞・骨芽細胞カップリング因子の検討

研究課題名(英文)Alterations of Osteoclast/Osteoblast Coupling in CKD-MBD

研究代表者

永田 友貴 (Nagata, Yuki)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：20779483

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)：慢性腎臓病(CKD)に伴う骨・ミネラル代謝異常では、二次性副甲状腺機能亢進症に伴う高回転型骨病変が出現する。CKDにおける破骨細胞/骨芽細胞カップリング因子EphrinB2/EphB4発現を検討した。In vitroおよびin vivoともに破骨細胞/骨芽細胞EphrinB2/EphB4発現はPTHで増加し、抗RANKL抗体で抑制された。二次性副甲状腺機能亢進症を呈するCKDマウスでは、PTHによって骨吸収優位に骨代謝が亢進し、破骨細胞/骨芽細胞EphrinB2/EphB4発現は共に増加した。その他のカップリング因子であるCthrc1/Waif1発現も検討し、同様の変化を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CKD-MBDでは、二次性副甲状腺機能亢進症によってPTHが持続的高値を呈した結果、骨吸収優位の骨代謝亢進となり、骨病変の病因となる。本研究により、PTHによって刺激された骨芽細胞のRANKL発現を介して、破骨細胞/骨芽細胞カップリング因子が増大するメカニズムが明らかとなり、CKD-MBDの骨組織における破骨細胞/骨芽細胞カップリング因子でも同様に、過剰なPTHによって増大することが明らかとなった。この機構が明らかになったことで、CKD-MBDにおける骨病変の原因の一端を解明につながる可能性があり、本研究はトランスレーショナルリサーチとして、非常に重要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD), with secondary hyperparathyroidism, result in the development of high turnover bone metabolism and osteodystrophy. We investigated osteoclast/osteoblast coupling factors EphrinB2/EphB4 in CKD. Both in vitro and in vivo experiments, osteoclast/osteoblast-derived EphrinB2/EphB4 expressions was increased by PTH and suppressed by anti-receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) antibody. In contrast, soluble RANKL promote osteoclast formation and increased EphrinB2 expression in vivo. CKD mice established by unilateral nephrectomy and contralateral renal artery ligation. Those mice exhibited secondary hyperparathyroidism and facilitated bone turnover, as well as increased EphrinB2/EphB4 expressions in osteoclasts/osteoblasts, compared to Sham-operated mice. Additionally, another coupling factors, Cthrc1 and Waif1 were similarly altered in CKD and PTH treated mice.

研究分野：代謝内分泌

キーワード：破骨細胞 骨芽細胞 カップリング因子 CKD 副甲状腺ホルモン

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)患者で生じるミネラル代謝異常は、骨や副甲状腺の異常、血管石灰化等を引き起こし、生命予後に大きく影響することが認識され、CKDに伴う骨・ミネラル代謝異常(CKD Mineral and Bone Disorder :CKD-MBD)という新しい概念が確立された。腎機能低下に伴う高リン(P)血症、1,25(OH)₂D 低下およびその結果としての低カルシウム(Ca)血症を代償するために持続的に副甲状腺ホルモン(PTH)が上昇し(二次性副甲状腺機能亢進症)、骨芽細胞に作用して骨形成を刺激する。一方で、骨芽・骨細胞では破骨細胞前駆細胞に発現する受容体の Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B (RANK)と結合する RANK Ligand (RANKL)発現が増加し、破骨細胞形成および骨吸収を促進する結果、高回転型骨病変の原因となる。

骨リモデリングは、破骨細胞による骨吸収の後、骨芽細胞が新たな骨形成するという、破骨細胞/骨芽細胞カップリングが平衡状態を保持している。近年様々な破骨細胞/骨芽細胞カップリング因子が報告されている。破骨細胞/骨芽細胞にそれぞれに存在する細胞表面の分子の EphrinB2 および骨芽細胞に発現する EphB4 受容体は、シグナルを双方向性に伝達し、主なカップリング因子の一つである。破骨細胞は EphrinB2 を介するシグナルにより、NFATc1 発現が低下し、破骨細胞形成および骨吸収が抑制される。一方、骨芽細胞は EphB4 を介する ERK シグナルにより骨芽細胞分化および骨形成を促進する。申請者は PTH が RANKL 発現を増加させることで破骨細胞分化および形成が促進され、破骨細胞由来の EphrinB2 発現増加を確認した。現在のところ、CKD に伴う二次性副甲状腺機能亢進症における破骨細胞/骨芽細胞カップリング因子の変化や高回転型骨病変における関与については明らかではない。CKD-MBD の診療において、全身のミネラル代謝異常に対する治療が行われているにも関わらず、脆弱性骨折リスクはなお高い。腎機能障害により使用できる骨粗鬆症薬も少数であり、その病態解明および骨折予防につながる治療法が望まれる。

2. 研究の目的

本研究では、PTH によって増加した破骨細胞/骨芽細胞カップリング因子 EphrinB2/EphB4 の骨吸収/骨形成への直接的な関与を検討する。加えて、CKD に伴う二次性副甲状腺機能亢進症の骨組織での破骨細胞/骨芽細胞における EphrinB2/EphB4 発現の変化と、RANKL を介した EphrinB2/EphB4 の発現調節機構の存在を明らかにし、CKD-MBD における骨病変の病因の一端を明らかとすることが目的とした。さらにその他のカップリング因子である Cthrc1/Waif1 発現の変化も追加で検討を行った。

3. 研究の方法

動物実験において、PTH 持続投与による骨代謝回転亢進を検討するために、6週齢 C57BL6J マウスに human PTH1-34 を充填した浸透圧ポンプを皮下に埋設し、25 µg/kg/day の割合にて2週間の持続投与を行った。骨吸収を亢進させたモデルとして、6週齢 C57BL6J マウスに RANKL 0.5 mg/kg を24時間あけて2回腹腔内投与し、24時間後に検体を採取した。一方、骨吸収抑制モデルとして、抗マウス RANKL 中和抗体 5 mg/kg を腹腔内投与し、2週間後に検体を採取した。さらに、PTH 持続投与および抗 RANKL 抗体投与を同時に行い、同様に2週間後に検体を採取した。CKD モデルマウスは、6週齢 C57BL6J マウスに片腎摘出および対側腎動脈分岐部の結紮によって作製し、処置後は食餌として高リン食(P:1.12%, Ca:0.74%)を用いて4週間飼育し、検討を行った。

細胞実験では、骨芽細胞の初代培養は、C57BL6J マウスから長管骨を採取し、骨髄を除去した後に、20%ウシ胎仔血清(FBS)添加 -Minimum Essential Medium (-MEM) に100 U/mL ペニシリンおよび100 µg/mL ストレプトマイシンを添加した培地中で培養し、遊走した細胞を使用した。破骨細胞の初代培養は、単核球の初代培養から破骨細胞様細胞を誘導した。具体的には6~10週齢の C57BL6N 雌マウスの大腿骨から骨髄を採取し、比重遠心法により単球分画を得た。分離した単球 $2 \sim 3 \times 10^6$ /mL にマクロファージコロニー刺激因子(Macrophage Stimulating Factor; M-CSF) 10 ng/mL を添加し3日間培養した後、破骨細胞分化誘導因子である RANKL 50 ng/mL を添加して4日間培養し、破骨細胞様細胞を誘導した。破骨細胞/骨芽細胞共培養では、上記にて誘導した破骨細胞様細胞をセルスクレイパーにて剥離し、 $2 \sim 3 \times 10^4$ /mL で播種した。翌日に骨芽細胞をトリプシンによって剥離後に 1×10^5 /mL で播種し、実験に使用した。上記の培養系を用い、PTH および抗 RANKL 抗体による添加実験はそれぞれ48時間行い、PBS 洗浄後に RIPA 溶解液にてタンパク抽出を行った。

4. 研究成果

(1) PTH による骨代謝回転亢進と破骨細胞/骨芽細胞 ephrinB2/EphB4 の変化

PTH 持続投与マウス骨組織・抽出液では、vehicle 投与群と比較して、Cathpsin K や ALP 発現増加も認められ、PTH により破骨細胞および骨芽細胞が活性化され骨代謝回転が亢進していることが示された。骨組織の免疫組織化学的検討では、PTH 持続投与群において、多核でサイズ増大した TRAP 陽性となる破骨細胞が多数認められ、それらの細胞に EphrinB2 発現の増加を認めた。骨芽細胞においても PTH 持続投与群で EphB4 発現増加を認めた。これは、破骨細胞前駆細胞から成熟破骨細胞への分化に伴い EphrinB2 発現が増加するという以前の報告(Zhao C et al. Cell

Metab 2006)と一致する。同様に、細胞実験において、PTH 投与にて骨芽細胞 EphrinB2/EphB4 発現も増大していた。以上より、破骨細胞の形成・分化が促進され、EphrinB2 発現が増加すると共に、骨芽細胞 EphrinB2 発現も増大すると考えられた。

(2) 破骨細胞、骨芽細胞における骨吸収/骨形成と EphrinB2/EphB4 発現の検討

RANKL 投与マウス骨組織は PBS 投与マウスと比較して、Cathepsin K 発現は増加し、骨吸収亢進を確認できた。また、同マウス骨組織ではサイズが大きく、多核となった TRAP 陽性の破骨細胞が多数出現した。免疫組織化学染色にてそれらの EphrinB2 発現は増加していた。一方、抗マウス RANKL 中和抗体投与したマウス骨組織では、Cathepsin K 発現は低下し、骨組織では TRAP 陽性細胞はほぼ認めず、骨吸収抑制が確認できた。それらのマウス骨組織 EphrinB2 発現は低下した。さらに、PTH 持続投与マウス骨組織では、EphrinB2 発現は対照群と比較して増加するが、PTH 持続投与に加えて抗マウス RANKL 中和抗体投与すると Cathepsin K および ALP 発現は低下した。このことから、骨吸収/骨形成が共に抑制されたことが確認された。(図 1) 同マウスでの EphrinB2/EphB4 発現は低下した。細胞実験においては、破骨細胞単独培養において、PTH 添加しても破骨細胞の分化や EphrinB2 発現に変化なかったが、破骨細胞/骨芽細胞共培養においては PTH 添加により破骨細胞形成及び EphrinB2/EphB4 発現は増加し、抗マウス RANKL 中和抗体の添加でそれらは抑制され、動物実験と同様の結果が得られた。

以上の結果より、PTH は破骨細胞に直接作用するのではなく、骨芽細胞における RANKL 発現を増加させることで破骨細胞の形成や成熟を促進し、EphrinB2 発現が増加することが明らかとなった。

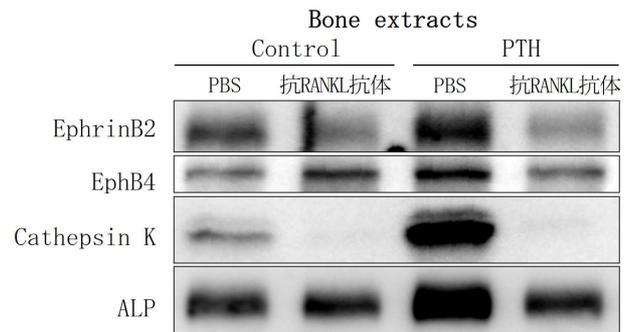
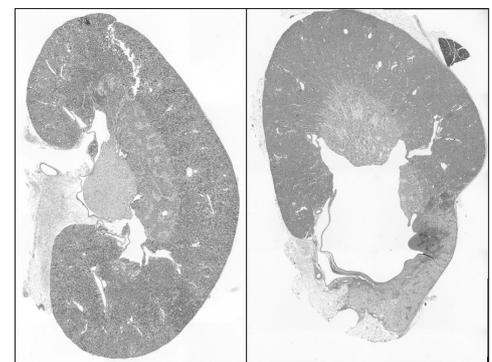


図1 PTH持続/抗RANKL抗体投与マウス骨組織での EphrinB2/EphB4発現変化



正常 (Sham) 腎動脈分岐部の結紮後

図2 腎不全モデルマウス腎組織

(3) 二次性副甲状腺機能亢進症を呈する CKD モデルマウス

CKD マウスでは腎動脈結紮部の腎組織は萎縮する。(図 2) CKD マウスでは処置 1 週間後から BUN/Cr とともに Sham 群に比較して有意な増加を認め、以後 4 週間に渡ってそれらは持続した。Sham/CKD 群で非絶食時の血清リンに有意な差は認めなかったため、18 時間程度の絶食を行い、食餌による影響を検討した。絶食後は Sham 群で血清リン低下が認められたが、CKD 群では血清リン低下はなく、食餌開始により CKD 群では血清リン濃度が急峻に上昇した。一方、Sham 群において、血清リンは食餌により徐々に絶食前の水準まで回復した。この結果から、本 CKD モデルマウスは CKD-MBD として使用可能であると考えられた。高リン食負荷 4 週後の CKD 群では、Sham 群と比較して、血清クレアチニン (Sham vs CKD: 0.30 ± 0.07 vs 0.55 ± 0.09 mg/dL; $p < 0.05$) および血清リン (Sham vs CKD: 8.3 ± 1.7 vs 12.2 ± 2.2 mg/dL; $p < 0.05$) の有意な増加を認めた。上記マウスにおいて PTH を測定したところ、CKD マウスにおいて血清 PTH は有意に増加した (Sham vs CKD: 226 ± 62 vs 1382 ± 894 pg/mL; $p < 0.05$)。また、血清 ALP は同様に CKD マウスにおいて有意に上昇し (Sham vs CKD: 185 ± 69 vs 279 ± 39 mg/dL; $p < 0.05$)、二次性副甲状腺機能亢進症によって、骨代謝回転が亢進していることが示唆された。

(4) CKD モデルでの骨組織 ephrinB2/EphB4 発現の変化

上記で作製した CKD に伴う二次性副甲状腺機能亢進症を呈したマウスにおいて、骨組織での ephrinB2/EphB4 は Sham と比較して、若干の増加を認めた。Cathepsin K 発現は明らかに増加していたが、ALP 増加はほぼなく、骨吸収優位の骨代謝回転となっていることが示唆された。(図 3)

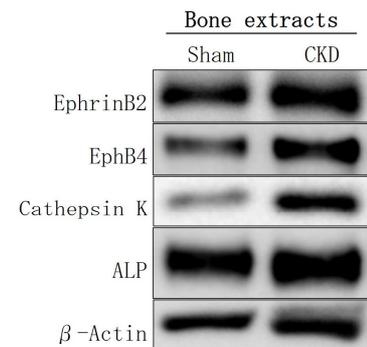


図3 CKDモデルマウスの骨組織におけるカップリング因子EphrinB2/EphB4

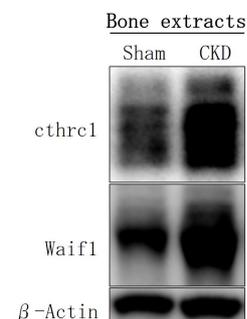


図4 CKDモデルマウスの骨組織におけるカップリング因子Cthrc1/Waif1

(5) その他のカップリング因子である Cthrc1/Waif1 の CKD モデルマウスにおける発現変化

破骨細胞/骨芽細胞のカップリングを形成する因子は一つではなく、近年様々な因子が報告されている。EphrinB2/EphB4 以外の破骨細胞/骨芽細胞カップリング因子である Cthrc1/Waif1 の発現変化と PTH、骨代謝との関係を追加で検討を行った。PTH 持続投与マウスでは、Cthrc1/Waif1 発現は骨代謝回転亢進と共に増加を認めた。また、RANKL 投与では骨吸収亢進に伴ってやはり増加した。さらに、CKD に伴う二次性副甲状腺機能亢進症を呈したマウスにおいて、骨組織での Cthrc1/Waif1 は増加していた。(図 4)

(6) まとめ

腎機能正常で PTH 持続投与した場合、骨代謝回転が亢進し、破骨細胞/骨芽細胞カップリング因子 EphrinB2/EphB4 発現は増加する。その機序として、PTH によって骨芽細胞の RANKL 発現が上昇することで、破骨細胞の形成や成熟が促進し、EphrinB2 発現が増加すると考えられた。一方、慢性腎臓病に伴う二次性副甲状腺機能亢進症により骨代謝回転が亢進している骨組織では、骨吸収優位の骨代謝回転になっているにも関わらず、破骨細胞/骨芽細胞カップリング因子 EphrinB2/EphB4 発現変化は大きいものではないことが判明した。さらに、他の破骨細胞/骨芽細胞カップリング因子 Cthrc1/Waif1 発現は増大し、骨代謝回転亢進に伴って破骨細胞/骨芽細胞間の作用を増強していると考えられた。このことから、種々の破骨細胞/骨芽細胞カップリング因子が骨代謝回転亢進に伴って変化していると推察される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 永田 友貴、今西 康雄、都井 律和、藏城 雅文、絵本 正憲
2. 発表標題 副甲状腺ホルモンによる破骨細胞/骨芽細胞カップリング因子EphrinB2/EphB4の変化についての検討
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 永田 友貴、今西 康雄、宮岡 大知、都井 律和、山田 真介、絵本 正憲、稲葉 雅章
2. 発表標題 副甲状腺ホルモンによる破骨細胞/骨芽細胞カップリング因子Cthrc1/Waif1の変化
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永田 友貴、今西 康雄、宮岡 大知、藏城 雅文、森 克仁、庄司 哲雄、絵本 正憲、稲葉 雅章
2. 発表標題 CKDマウスにおける骨代謝および破骨細胞/骨芽細胞カップリング因子Cthrc1/Waif1の検討
3. 学会等名 第65回日本透析医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永田 友貴、今西 康雄、宮岡 大知、林 礼行、都井 律和、山田 真介、絵本 正憲、稲葉 雅章
2. 発表標題 副甲状腺ホルモンによる破骨細胞 / 骨芽細胞カップリング因子EphrinB2/EphB4増大とそのメカニズム
3. 学会等名 第39回日本骨形態計測学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Nagata, Yasuo Imanishi, Daichi Miyaoka, Noriyuki Hayashi, Masanori Emoto, Masaaki Inaba
2. 発表標題 Parathyroid Hormone augments EphrinB2 derived from OCL via increased RANKL expression in OB in Osteoclast/Osteoblast Coupling.
3. 学会等名 米国骨代謝学会2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------