

令和 3 年 4 月 23 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17753

研究課題名(和文)腎不全病態における間葉系幹細胞の骨芽細胞分化に対する変化を与える因子の解明

研究課題名(英文)Elucidation of factors that affect osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells in renal failure

研究代表者

加藤 憲 (Kato, Tadashi)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：20644305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腎不全による二次性副甲状腺機能亢進症は高回転性の骨代謝障害を惹起し、繊維性骨炎をきたすが、その機序は十分には分かっていない。我々は腎不全ラットにおける間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化能を調べた。5/6腎摘を施術したラットから分離した間葉系幹細胞を骨芽細胞分化誘導培地にて培養すると、施術していない対照群から分離した間葉系幹細胞と比較して骨芽細胞分化マーカーの発現が有意に低下していた。腎不全病態において間葉系幹細胞の骨芽細胞分化能が障害されていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎不全病態において間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化能は通常分化誘導環境においては低下しており、二次性副甲状腺機能亢進症における高回転性の骨代謝障害はカルシウムやリン、副甲状腺ホルモンといった生体内環境の要因が影響している可能性が示唆された。また腎不全病態における間葉系幹細胞の分化能へ変化を与える要因を今後調べることで、骨代謝障害の機序解明の一助となり得る。

研究成果の概要(英文)：Severe secondary hyperparathyroidism (SHPT) represents a high turnover bone disease, osteitis fibrosa, but the pathogenesis of osteitis fibrosa remains to be fully elucidated. We examined the characteristics of the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) into osteoblasts in uremic rats. Osteoblastic differentiation markers in the BMSCs from the 5/6 nephrectomized rats were significantly suppressed compared with those isolated from the control groups. These results suggest that the BMSCs differentiation into osteoblasts was disturbed in the uremic rats.

研究分野：CKD-MBD

キーワード：CKD-MBD 間葉系幹細胞 リン 二次性副甲状腺機能亢進症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎不全における高リン食は骨形態を変化させることが知られており、高リン負荷をした 5/6 腎摘マウスでは骨梁および骨密度は増加し、皮質骨密度は低下する(*Nephrol Dial Transplant* 2013, 28: 62-69)。一方、間葉系幹細胞(MSC)において PTH 受容体を knock down したモデルマウスにおいて MSC の骨芽細胞への分化は抑制され脂肪細胞への分化が促進し、かつその脂肪細胞は PTH シグナルがないときに RANKL の産生源となっているという報告がある(*Cell Metab.* 2017 Mar 7;25(3):661-672)。腎不全における二次性副甲状腺機能亢進症や高リン負荷といった因子は MSC の分化・機能に対し影響を及ぼす可能性があるが、その解析はいまだされていない。

今回の研究において、腎不全および高リン負荷をしたラットの MSC の分化・機能の変化を解析することを目的とする。また臨床的に腎性骨症に対する治療は、電解質異常や顎骨壊死などといった副作用の面から介入が困難であることも多く、Wnt シグナルを標的とした分子標的治療も検討はされているが(*Nature Reviews Nephrology* 2013 9, 681-692)、実用化には至っていない。今回 MSC の骨分化への変化の原因となる細胞内シグナル伝達や原因遺伝子の検索も行うことで、腎性骨症に対する新規分子標的治療法の基盤を構築する。

2. 研究の目的

本研究では腎不全および高リン血症病態においての間葉系幹細胞の性質変化を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

5/6 腎摘をラットに施術し、通常食群(Nx+NP)と高リン食負荷群(Nx+HP)の介入を加えた群を作製し正常ラット群(Nc+NP)と比較する。それぞれの群のラットから血液を採取し血清中のクレアチニン、Ca、P、iPTH、FGF-23 等を測定し腎機能障害の程度やカルシウム、リン代謝等の変化を確認した上で、脛骨の骨病理標本作製し骨髄変化および骨形態計測を行う。モデルラットの各群の骨形態計測を行うとともに、MSC を培養して分化および細胞内シグナル伝達を解析する。MSC の分離培養の方法は以前の同様の研究を行っている報告に準じて行う(*Life Sci.* 2016 Feb 1;146:174-83)。MSC の分離培養ができていのかどうかについても同文献の報告より CD90、CD29、CD54、CD45、CD31 の細胞表面マーカーをフローサイトメトリーで確認する。採取した間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化誘導し、分化マーカーとして ALP 染色、Alizalin Red 染色および活性をみるとともに骨芽細胞分化マーカーの mRNA の発現も real-time PCR で同時に解析する。分化誘導培地は MEM にアスコルビン酸 50 µg/mL、ヒドロコルチゾン 10nM、 β -グリセロホスフェート 10mM、Bone Morphogenetic Protein (BMP)-2 100ng/mL を含有したものを用いる。採取した MSC を mRNA assay を用いることで腎不全、高リン負荷による MSC の遺伝子変化を網羅的に解析することで、腎不全、高リン病態における MSC の骨芽細胞分化へ影響を与える因子を解明する。

4. 研究成果

(1) 腎不全モデルラットの作製および骨形態変化の解析

腎不全モデルラットの各群における脛骨病理標本を作製した(図1)。正常群と腎不全+正常食群では変化を認めなかったが、腎不全+高リン食群においては骨量の低下、骨芽細胞面および破骨細胞面の増加を認め、骨形態計測上も有意な変化を認めた。これにより腎不全+高リン食群においてのみ高回転性の骨病理変化があることを確認した。

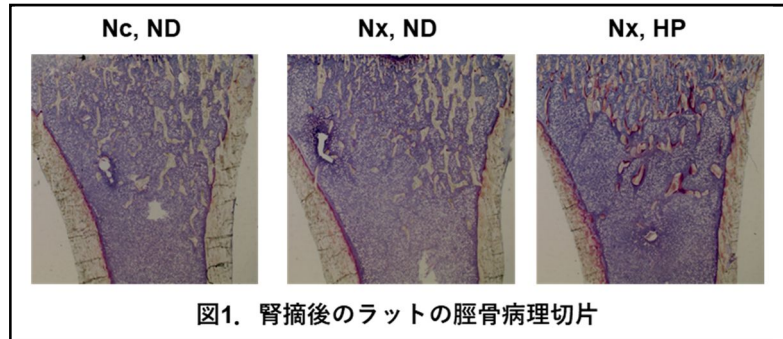


図1. 腎摘後のラットの脛骨病理切片

(2) 間葉系幹細胞の分離、培養

作成した各モデル群のラットの大腿骨から細胞を採取し、培養フラスコへ播種した。接着した細胞を MSC とし、フラスコ内で培養の上、継代を行った。3継代後における培養細胞での MSC 表面マーカーをフローサイトメトリーにて評価した(図2)。それぞれの群において90%以上の細胞がCD90、CD29 陽性であり、採取・培養した細胞が MSC であり、またその細胞における MSC の純度が同等であることを確認した。加えて白血球マーカーである CD45 および血小板マーカーである CD31 に関してもいずれも90%以上が陰性であり各群での差がないことも確認した。

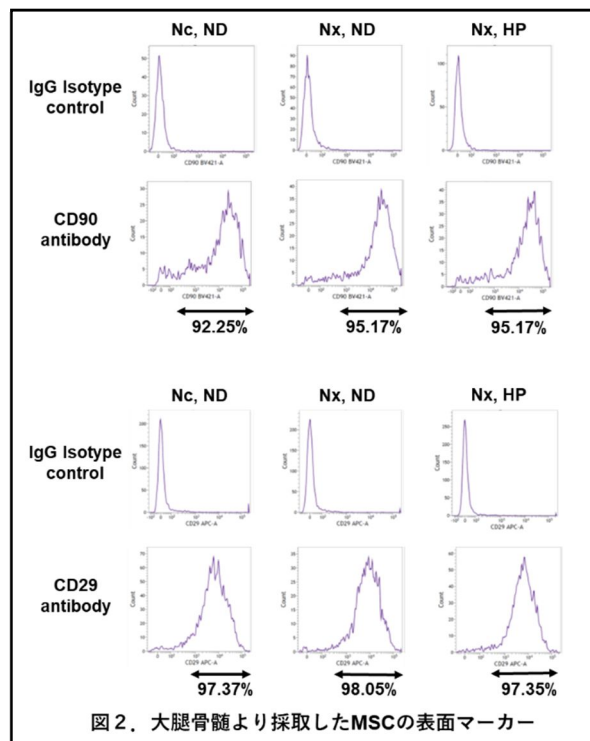


図2. 大腿骨髄より採取したMSCの表面マーカー

(3) 間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化誘導

腎不全群および対照群それぞれのラットより採取・培養した間葉系幹細胞を骨芽細胞分化誘導培地で培養し、ALP 染色および Alizalin Red 染色を行ったところ、腎不全群においていずれも活性が低下していた(図3)。定量においても有意な変化があり、また *Alp*, *PTHr1*, *Runx2*, *Col1*, *Osx* といった骨芽細胞マーカーの mRNA も RT-PCR で定量評価を行い同様の結果であることを確認した。これらの結果より、腎不全病態において間葉系幹細胞の骨芽細胞分化能は低下していることが明らかとなった。

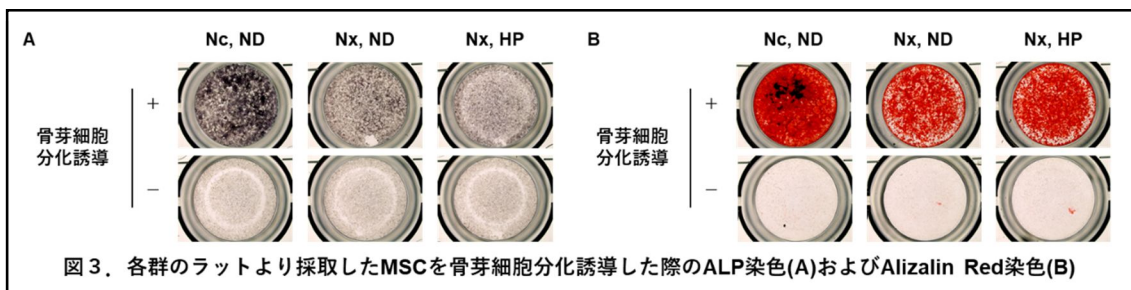


図3. 各群のラットより採取したMSCを骨芽細胞分化誘導した際のALP染色(A)およびAlizalin Red染色(B)

(4) 腎不全モデル動物における骨髄間葉系幹細胞の骨芽細胞分化へ影響を与える因子の解明

採取した MSC およびその骨芽細胞への分化誘導後の細胞における mRNA を網羅的に解析し、腎不全病態において MSC の骨芽細胞分化を障害する因子のスクリーニングを行った。多くの因子が腎不全病態における MSC において変化しており、骨芽細胞分化抑制に関わることが予想された。

(5) 今後の展望と課題

今回、腎不全病態における MSC の性質変化として骨芽細胞への分化能が障害されていることが明らかとなった。しかし現時点ではその要因までは特定できておらず今後の課題である。今後、網羅的に解析を行った mRNA で腎不全病態における MSC において変化が出た因子に着目していくことで、骨形成に関わる新たな因子の発見や腎不全病態における骨ミネラル代謝障害の病態解明および治療へと結びつく可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kato Tadashi, Mizobuchi Masahide, Sasa Kiyohito, Yamada Atsushi, Ogata Hiroaki, Honda Hirokazu, Sakashita Akiko, Kamiyo Ryutaro	4. 巻 532
2. 論文標題 Osteoblastic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in uremic rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 11~18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.05.096	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 -

1. 著者名 Aizawa Ryo, Yamada Atsushi, Seki Tatsuaki, Tanaka Junichi, Nagahama Ryo, Ikehata Mikiko, Kato Tadashi, Sakashita Akiko, Ogata Hiroaki, Chikazu Daichi, Maki Koutaro, Mishima Kenji, Yamamoto Matsuo, Kamiyo Ryutaro	4. 巻 512
2. 論文標題 Cdc42 regulates cranial suture morphogenesis and ossification	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 145~149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.02.106	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤 憲
2. 発表標題 腎不全ラットの骨髄由来間葉系幹細胞におけるリン負荷の影響
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
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
---------	---------