

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09269

研究課題名（和文）慢性腎不全モデル動物におけるビスホスホネート薬と運動療法の骨と骨格筋に対する効果

研究課題名（英文）Effects of bisphosphonates and treadmill exercise on bone and skeletal muscle in adenine-induced chronic kidney disease model rats

研究代表者

宮腰 尚久（Miyakoshi, Naohisa）

秋田大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90302273

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：慢性腎臓病（CKD）モデルラットにおいて、ビスホスホネート薬（アレンドロネート：ALN）と運動療法の併用効果を検証した。ALNは腎機能を悪化させず、骨密度、骨強度、骨微細構造、骨代謝を有意に改善した。トレッドミル運動（Exe）単独は、骨微細構造と骨代謝、腎間質線維化面積を改善した。ALNとExeの併用療法は、CKD群に比べ骨密度、骨強度、骨微細構造、骨代謝、間質線維化面積を改善した。ALNとExeの併用療法は、腎機能を悪化させることなく、骨密度、骨強度、骨微細構造、および骨代謝を改善したことから、安全かつ有効である可能性が示唆された。一方、ALNとExeの骨格筋への効果は、検証中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の高齢化に伴い慢性腎臓病（CKD）患者の高齢化も進んでいる。高齢のCKD患者では、骨強度の低下と筋萎縮により骨折しやすくなる。高齢者の骨折は、健康寿命を縮めるため骨強度を回復し筋萎縮を予防する治療が必要となる。本研究では、CKDモデルラットにおいて運動療法と薬物治療の併用療法は、腎機能障害を悪化することなく骨密度や骨強度を改善した。一方、骨格筋への効果は検証中であるが、併用療法によりCKDによる筋萎縮を防止することが期待されている。今後、CKDの患者において、運動療法と薬物治療の併用療法により、骨強度と筋力を維持し骨折のリスクを軽減できれば高齢CKD患者の健康寿命の延伸に寄与できる。

研究成果の概要（英文）：The combined effects of bisphosphonate (alendronate: ALN) and exercise therapy were examined in a rat model of chronic kidney disease (CKD). ALN significantly improved bone mineral density (BMD), bone strength, bone microstructure, and bone metabolism without worsening renal function; treadmill exercise (Exe) alone improved bone microstructure, bone metabolism, and renal interstitial fibrosis area; and combination therapy with ALN and Exe improved BMD, bone strength, bone microstructure, bone metabolism, and interstitial fibrosis area compared with the CKD group. Combination therapy with ALN and Exe improved BMD, bone strength, bone microstructure, and bone metabolism without worsening renal function, suggesting that ALN and Exe may be safe and effective. On the other hand, the effects of ALN and Exe on skeletal muscle are still under investigation.

研究分野：医学

キーワード：慢性腎臓病 骨粗鬆症 運動療法 ビスホスホネート薬 骨密度 骨強度 骨格筋

様式 C - 19 , F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢者の健康寿命の延伸は、喫緊の社会問題である。高齢者に増加する骨粗鬆症と慢性腎臓病 (CKD) は、ともに骨の脆弱化や筋の萎縮を生じることにより転倒や骨折のリスクを増加させる [1]。そのため、骨粗鬆症と CKD の治療は非常に重要で、健康寿命の延伸につながる事が期待される。骨粗鬆症に対しては、薬物治療が選択されることが多く、ビスホスホネート薬は最も一般的に処方される骨粗鬆症治療薬である。しかし、ビスホスホネート薬は、腎排泄性であるため進行した慢性腎臓病の患者にはその安全性や治療効果は確立されていない。一方、ウォーキングなどの運動療法も、骨密度を増やすなど骨粗鬆症の治療効果が明らかとなっている [2]。さらに近年では、運動療法が腎機能を改善することも明らかとなっている。そのため、骨粗鬆症と CKD を伴った高齢者に対し、運動療法とビスホスホネート薬の併用療法は腎機能を悪化することなく、骨強度の低下や骨格筋の萎縮を予防し骨折リスクを減らすことが期待される。しかし、これまでそれらの併用効果については明らかになっていない。

2. 研究の目的

CKD モデルラットにおいて、ビスホスホネート薬と運動療法の骨密度や骨強度、および骨格筋と腎機能への併用効果を検証することである。

3. 研究の方法

8 週齢の Wistar 系雄ラットを 4 週間 0.75% アデニン飼料で飼育後、20 週齢まで普通飼料で飼育し CKD モデルラットを作製した [3]。20 週齢で溶媒を投与した CKD 群、ビスホスホネート薬 (アレンドロネート, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 皮下注, 1 回/日) を投与した ALN 群、トレッドミル運動 (20 m/分, 60 分/日, 5 回/週) を行った Exe 群、ビスホスホネート薬投与・トレッドミル運動を併用した Comb 群の 4 群に分け、普通飼料にて飼育した Control ラット (Cont 群) を加えた 5 群を設定した (各群 $n = 9 \sim 10$)。 (図 1)

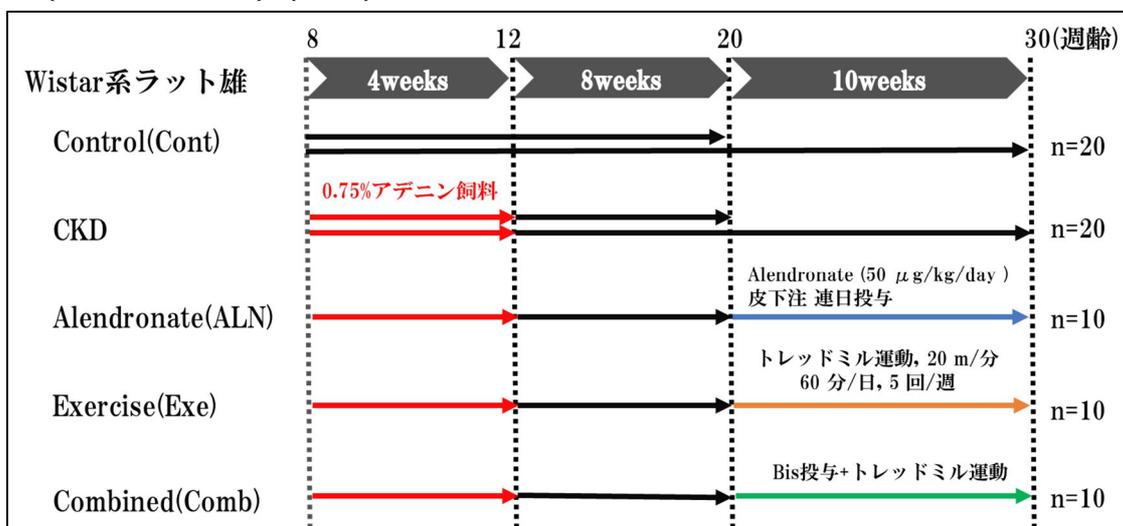


図 1 実験プロトコール

治療開始時の 20 週齢と 10 週間の治療後 30 週齢で、1) 血清学的検査: 尿素窒素 (BUN), クレアチニン (Cre), カルシウム (Ca), リン (P), Ca, 2) 尿検査: アルブミン (Alb), Cre, N-アセチルグルコサミニダーゼ (NAG) を測定し、30 週齢で、3) 骨密度 (BMD) (DXA 法): 腰椎, 大腿骨, 4) 骨強度: 大腿骨骨幹部 3 点曲げ試験と大腿骨遠位顆部圧縮試験, 5) 骨微細構造 (μCT): 大腿骨骨幹部 (皮質骨), 大腿骨遠位部 (海綿骨), 6) 骨形態計測, および 7) 腎臓組織評価を行った。Cont 群と CKD 群の比較を Student t-検定で, CKD 群, ALN 群, Exe 群, Comb 群の比較を一元配置分散分析と Post hoc 検定で統計解析し, P 値 < 0.05 を有意差ありとした。

4. 研究成果

現時点での研究結果は、腎機能と皮質骨および海綿骨の骨密度・骨微細構造・骨強度への ALN と Exe の単独および併用の効果について解析を行った。骨格筋に対するそれぞれの効果については検証を継続している。

1. 血液生化学検査 (表 1)

20 週齢時の血液生化学検査では、CKD ラットは Cont 群と比較して血清 BUN および Cre 値が有意に高く ($p < 0.01$), 血清 IP 値が有意に低かった ($p < 0.05$)。ALN 単独群 (ALN 群) および運動療法との併用群 (Comb 群) のいずれにおいても、10 週間の投与で血清 BUN および Cre に有意な変化は認められなかった。運動療法単独では血清 BUN および Cre に有意な変化はみられなかった。

が、Exe 群では 10 週間後の血清 IP が投与開始時に比べて有意に低下した ($p < 0.05$)。

表 1. 血液生化学検査

	Cont N=9	CKD N=10	ALN N=10	Exe N=10	Comb N=9	ANOVA p-Value
20 週齢						
BUN (mg/dL)	18.2 ± 2.6	33.8 ± 4.2 ^a	27.7 ± 3.8	33.1 ± 5.5	31.7 ± 5.1	0.046
CRE (mg/dL)	0.34 ± 0.04	0.73 ± 0.15 ^a	0.64 ± 0.07	0.78 ± 0.14	0.64 ± 0.11	0.060
Ca (mg/dL)	11.1 ± 0.3	10.9 ± 0.3	10.3 ± 0.2 ^{b'}	10.4 ± 0.2 ^{b'}	10.9 ± 0.36 ^{cd}	<0.001
IP (mg/dL)	9.1 ± 1.3 ^a	7.2 ± 0.7 ^a	6.2 ± 0.3 ^{b'}	6.4 ± 0.6 ^b	6.3 ± 0.5 ^b	0.003
30 週齢						
BUN (mg/dL)	17.0 ± 2.5	34.2 ± 3.3 ^a	29.1 ± 4.0	37.7 ± 7.4	29.7 ± 6.8	0.009
CRE (mg/dL)	0.36 ± 0.04	0.64 ± 0.10 ^a	0.68 ± 0.19	0.87 ± 0.37	0.65 ± 0.13	0.127
Ca (mg/dL)	11.1 ± 0.5	10.8 ± 0.1	10.5 ± 0.5	10.5 ± 0.3	11.0 ± 0.7	0.047
IP (mg/dL)	8.0 ± 1.2	7.0 ± 0.8	5.5 ± 1.3	5.7 ± 0.7 ^e	6.9 ± 2.1	0.042

a : $p < 0.01$ vs Cont 群 by Student's t test, b : $p < 0.05$, b' : $p < 0.01$ vs CKD 群 by Tukey multiple comparison test, c : $p < 0.01$ vs ALN 群 by Tukey multiple comparison test, d : $p < 0.01$ vs Exe 群 by Tukey multiple comparison test, e : $p < 0.05$ between 20 週齢 and 30 週齢 の各群間 by Student t test

2. 腎機能および腎組織評価

CKD ラットは Cont ラットに比べて U-Alb/U-Cre 率が有意に高かった ($p < 0.01$) (図 2a) U-Alb/U-Cre 率は、CKD 群・ALN 群・Exe 群・Comb 群で経時的に増加した ($p < 0.05$) (図 2a)。腎間質の線維化率は CKD ラットで Cont ラットに比べ有意に高く ($p < 0.01$) (図 2b)、ALN 投与により線維化率は悪化しなかった (図 2b)。運動介入により、CKD 群と比較して Exe 群および Comb 群では腎間質の線維化率が有意に低下し ($p < 0.01$) (図 2b)、運動介入の腎保護効果が示唆された。CKD ラット (図 2c-(2)) は、Elastica-Masson 染色切片で Cont 群 (図 2c-(1)) よりも腎間質の線維性組織が高率に認められた。運動 (図 2c-(4)) および ALN と運動の併用 (図 2c-(5)) では、CKD 群 (図 2c-(2)) よりも線維組織が減少したが、ALN (図 2c-(3)) 群では減少しなかった。

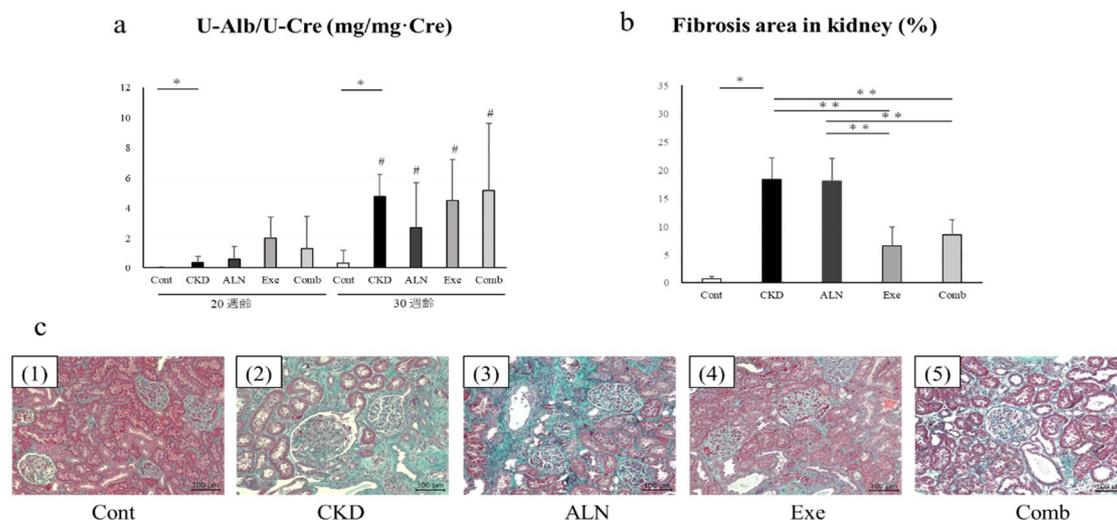


図 2 腎機能および腎組織評価

: $P < 0.05$ vs 20 週齢の各群 by Student's t test, * : $P < 0.01$ vs Cont 群 by Student's t test, ** : $P < 0.01$ by ANOVA and Tukey's post hoc test.

3. 皮質骨評価

大腿骨骨幹部の BMD は、ALN 群および Comb 群で CKD 群および Exe 群よりも有意に高く ($p < 0.05$ ~ $p < 0.01$), Cont 群と比較して CKD による有意な変化は認められなかった (図 3a)。大腿骨 BMD に対するトレッドミル運動単独療法の効果は観察されなかった。

大腿骨骨幹部のマイクロ CT の横断像から、CKD ラット (図 3b-(2)) では Cont ラット (図 3b-(1)) よりも皮質間隙率が増加していた。ALN は皮質間隙率に変化を与えることなく皮質骨幅を厚くした (図 3b-(3))。運動は皮質間隙率を低下させ (図 3b-(4))、ALN と運動の併用は皮質骨幅を厚くし、皮質間隙率を低下させた (図 3b-(5))。

皮質間隙率および間隙量 (図 3c-(2) および 3c-(3)) は、CKD 群では Cont 群と比較して有意に増加し、エネルギー吸収率 (図 3d-(2)) は有意に減少した ($p < 0.05$)。ALN 投与群は CKD 群と比較

して皮質幅を有意に厚くしたが ($p < 0.05$) (図 3c-(1)), 皮質骨強度は CKD 群と比較して有意な改善は認められなかった。トレッドミル運動は, 皮質骨強度に有意な変化はなかったが, 皮質間隙率と間隙量を ALN 群と比較して有意に減少させた (図 3c-(2)および 3c-(3)) ($p < 0.01$)。ALN とトレッドミル運動の併用は皮質幅を有意に厚くし (図 3c-(1)), 弾性率を ALN 群と Exe 群に比べ有意に増加した ($p < 0.05 \sim p < 0.01$) (図 3d-(1))。

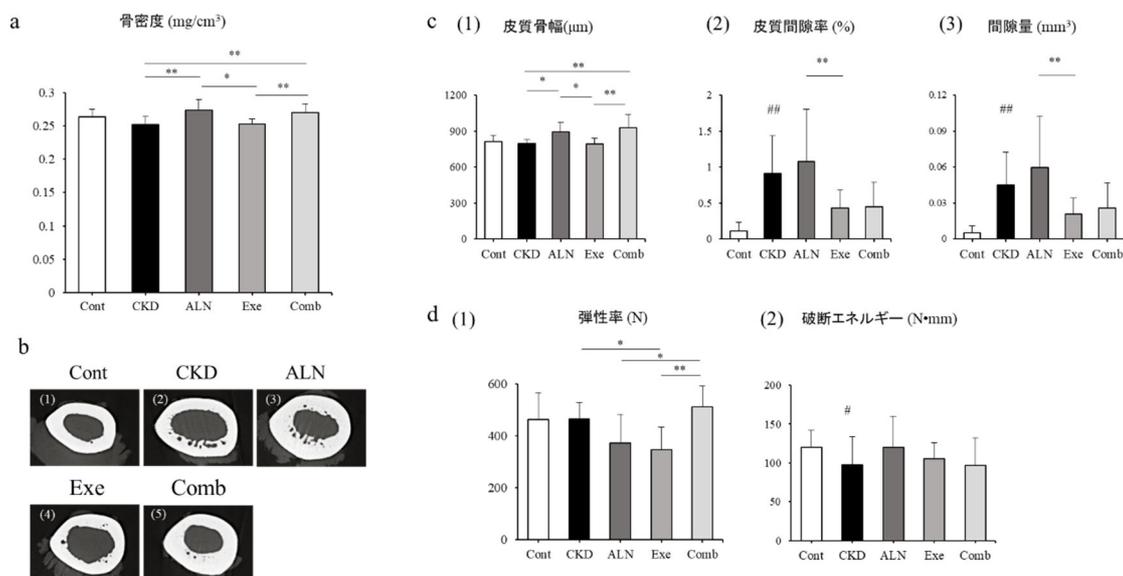


図 3 皮質骨関連評価

: $P < 0.01$ vs Cont 群 by Student's *t* test, * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ by ANOVA and Tukey's post hoc test.

4. 海綿骨評価

腰椎および大腿骨近位部の BMD (図 4a-(1)および図 4a-(2)) は, CKD 群では Cont 群と比較して有意に低かった ($p < 0.05$). ALN 単独治療 (ALN 群) および運動療法との併用治療 (Comb 群) は, CKD 群および Exe 群と比較して腰椎および大腿骨近位部の BMD を有意に増加させたが ($p < 0.05 \sim p < 0.01$), トレッドミル運動単独 (Exe 群) は BMD を改善しなかった (図 4a-(1)および(2)). 脛骨近位部の骨組織形態計測では, CKD 群は Cont 群と比較して骨量が有意に低下し ($p < 0.05$), 類骨面および浸食面がともに有意に増加した ($p < 0.01$) ことから (図 4b-(1), (2), (3)), この CKD モデルラットでは骨代謝が亢進していることが確認された。ALN 群, Exe 群および Comb 群の骨量は CKD 群と比較して有意に増加した ($p < 0.05 \sim p < 0.01$) (図 4b-(1)). Exe 群では浸食面のみが CKD 群と比較して有意に減少した ($p < 0.01$) (図 4b-(3)).

大腿骨遠位骨幹端部におけるマイクロ CT の横断像から, CKD 群では海綿骨が減少し, 骨梁構造が損なわれていることが示された (図 4c-(2)). ALN 単独治療は海綿骨量と骨梁数を増加させた (図 4c-(3)), トレッドミル運動は増加させなかった (図 4c-(4)). ALN と運動療法の併用は, 海綿骨量と骨梁数を増加させ, 海綿骨梁の間隙は減少した (図 4c-(5)). マイクロ CT 画像における骨組織形態計測では, CKD 群では Cont 群と比較して, 骨梁数が減少し (図 4d-(3)), 骨強度関連パラメータ (SMI) が悪化した ($p < 0.05$) (図 4d-(5)). ALN は CKD 群および Exe 群と比較して, 骨量 (図 4d-(1)), 骨微細構造 (骨梁数および骨梁間隙) (図 4d-(3)および(4)), 骨強度関連パラメータ (SMI, Conn.D) (図 4d-(5)および(6)) を有意に改善した ($p < 0.05 \sim p < 0.01$). トレッドミル運動は CKD 群と比較して SMI を有意に改善した ($p < 0.01$) (図 4d-(5)).

ALN とトレッドミル運動の併用療法 (Comb 群) は, CKD 群および Exe 群と比較して, 骨量 (図 4d-(1)), 骨梁数 (図 4d-(3)), 骨梁間隙 (図 4d-(4)), Conn.D (図 4d-(6)) を有意に改善した ($p < 0.05 \sim p < 0.01$). 大腿骨遠位部の圧縮試験において, 剛性は CKD 群で Cont 群と比較して有意に低かった ($p < 0.05$) (図 4e-(2)). ALN は, CKD 群および Exe 群と比較して, 最大荷重 (図 4e-(1)) および破断エネルギー (図 4e-(3)) を有意に増加させた ($p < 0.05$ または $p < 0.01$). トレッドミル運動単独群 (Exe 群) は大腿骨遠位部の海綿骨領域の骨強度に影響を与えなかったが, ALN とトレッドミル運動の併用群 (Comb 群) は, CKD 群と比較して大腿骨遠位部の弾性率が唯一有意に改善した ($p < 0.01$) (図 4e-(2)).

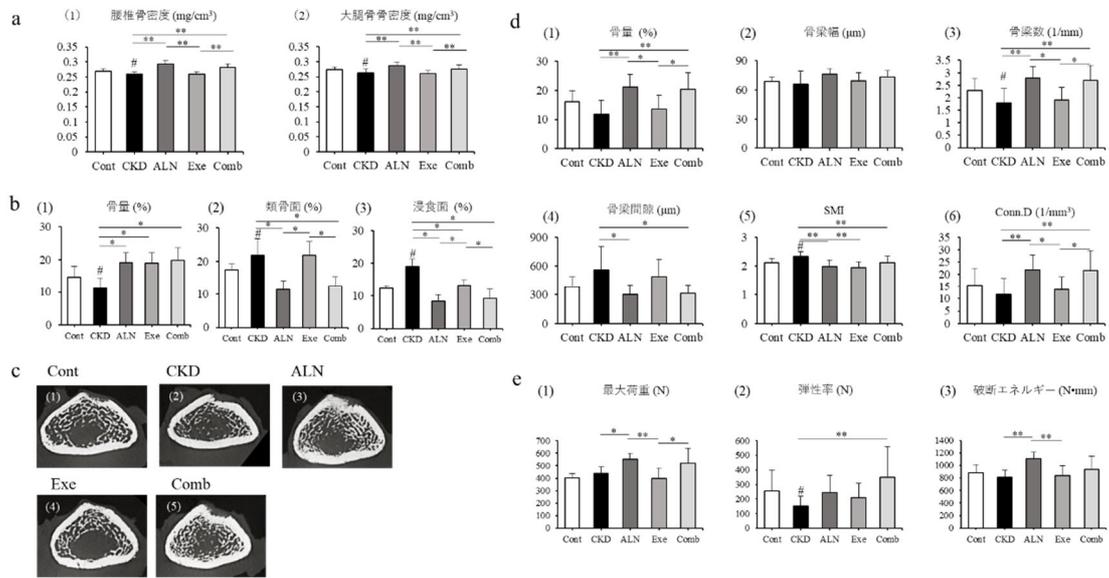


図4 海綿骨関連評価

: $P < 0.05$ vs Cont 群 by Student's t test, * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ by ANOVA and Tukey's post hoc test.

<引用文献>

1. Kazama JJ (2017) Chronic kidney disease and fragility fracture. Clin Exp Nephrol 21:46-52.
2. Kemmler W, Häberle L, von Stengel S (2013) Effects of exercise on fracture reduction in older adults: a systematic review and meta-analysis. Osteoporos Int 24:1937-1950.
3. Igarashi S, Kasukawa Y, Nozaka K, Tsuchie H, Abe K, Saito H, Shoji R, Kasama F, Harata S, Okamoto K, Oya K, Miyakoshi N (2023) Teriparatide and etelcalcetide improve bone, fibrosis, and fat parameters in chronic kidney disease model rats. Osteoporos Sarcopenia. 9:121-130.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Harata Shuntaro, Kasukawa Yuji, Nozaka Koji, Tsuchie Hiroyuki, Shoji Ryo, Igarashi Shun, Kasama Fumihito, Oya Keita, Okamoto Kento, Miyakoshi Naohisa	4. 巻 41
2. 論文標題 Effects of bisphosphonates and treadmill exercise on bone and kidney in adenine-induced chronic kidney disease rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 785 ~ 796
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00774-023-01471-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原田俊太郎 粕川雄司 野坂光司 土江博幸 阿部和伸 齋藤光 東海林諒 笠間史仁 五十嵐駿 岡本憲人 大屋敬太 宮腰尚久
2. 発表標題 慢性腎臓病モデルラットにおけるビスホスホネートと運動療法の骨と腎臓に対する効果の検討
3. 学会等名 第43回 東北骨代謝・骨粗鬆症研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原田俊太郎 粕川雄司 野坂光司 土江博幸 阿部和伸 齋藤光 東海林諒 笠間史仁 五十嵐駿 岡本憲人 大屋敬太 宮腰尚久
2. 発表標題 アデニン誘発性慢性腎臓病モデルラットにおけるビスホスホネートとトレッドミル運動の骨と腎臓に対する効果
3. 学会等名 第37回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原田俊太郎 粕川雄司 野坂光司 土江博幸 阿部和伸 齋藤光 東海林諒 笠間史仁 五十嵐駿 岡本憲人 大屋敬太 宮腰尚久
2. 発表標題 アデニン誘発性慢性腎臓病モデルラットにおけるビスホスホネートと運動療法の骨と腎臓に対する効果の検討
3. 学会等名 第40回 日本骨代謝学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原田俊太郎 粕川雄司 野坂光司 土江博幸 阿部和伸 齋藤光 東海林諒 笠間史仁 五十嵐駿 岡本憲人 大屋敬太 宮腰尚久
2. 発表標題 慢性腎臓病モデルラットにおけるビスホスホネートとトレッドミル運動の骨と腎臓に対する効果の検討
3. 学会等名 第42回 日本骨形態計測学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原田 俊太郎 粕川 雄司 野坂 光司 土江 博幸 大屋 敬太 岡本 憲人 宮腰 尚久
2. 発表標題 ビスホスホネートとトレッドミル運動の併用の慢性腎臓病モデルラットにおける骨と腎臓に対する効果の検討
3. 学会等名 第38回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2023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
研究 分担者	本郷 道生 (Hongo Michio) (50375250)	秋田大学・医学系研究科・教授 (11401)	
研究 分担者	粕川 雄司 (Kasukawa Yuji) (60375285)	秋田大学・医学部附属病院・准教授 (11401)	

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
---------	---------