

氏 名	林 宏 栄
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 661 号
学位授与年月日	令和 4 年 3 月 23 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	骨量減少によって骨から溶出するリンが腎機能に及ぼす影響の研究
論文審査委員	（委員長）教授 高橋 将 文 （委 員）教授 森下 義 幸 教授 竹下 克 志

論文内容の要旨

1 研究目的

リンは生命維持にとって欠かせない必須元素の 1 つであるが、過剰に摂取すると生体に有害な場合がある。実際に、過剰なリン摂取がマウスやラット、ヒトにおいて腎臓を障害することが報告されている。また、リンによる腎障害はネフロンあたりのリン排泄量と関係しており、ネフロン数が少なくなると、同じ量のリンを摂取してもより重度の腎障害に発展する。つまり、ネフロン数の減少する高齢者では、若年世代では過剰なリン摂取とならないリンの量でも、腎障害を発症する可能性がある。慢性腎臓病（CKD）などの腎疾患を有するような患者ではより容易に重度の腎障害に発展しうる。

通常、過剰なリンを排泄するための迅速な応答として副甲状腺ホルモン（PTH）が分泌され、続いて骨から線維芽細胞増殖因子 23（FGF23）が分泌される。FGF23 の主要な標的臓器は腎臓であり、尿細管細胞に発現する Klotho 蛋白と FGF 受容体の複合体に結合することで、近位尿細管でのリン再吸収を抑制し尿中へのリン排泄量を増加させる。この反応を FGF23-Klotho 内分泌系と呼び、これら 2 つのホルモンにより血中のリン濃度が一定の範囲内で保たれている。

しかし、この血中リン濃度を維持するための適応反応により、尿細管障害が誘導される。FGF23 によるリン再吸収の抑制により、尿中へのリン排泄量が増加すると近位尿細管での尿中リン濃度が上昇し、微細なリン酸カルシウム結晶が尿細管内に出現する。この結晶が近位尿細管頂上膜の Toll 様受容体 4（TLR4）に結合すると、尿細管細胞の障害と炎症細胞の浸潤を引き起こす。持続的な尿細管障害は、間質線維化やネフロン数を減少させる。その結果、尿中へのリン排泄量を増加させるためにさらに FGF23 が分泌され、尿細管障害が遷延するためネフロン喪失が進行するという負の連鎖が起きる。

このようにリンによる腎臓への悪影響が明らかになっているが、このリンは腸から吸収される食事（体外）由来のリンである。しかし、血中に流入するリンは、この体外由来のリンだけでなく、骨から溶出する体内由来のリンも考えられる。骨粗鬆症や寝たきり状態などの骨量が減少する疾患において、骨から溶出した体内由来のリンが腎臓に及ぼす影響はまだ明らかになっていない。そこで、骨から溶出した体内由来のリンが血中に流入すると、血中 FGF23 値を上昇させ、尿細管障害を誘導するという仮説を立てた。本研究では、マウスに骨量減少を引き起こした時の腎

臓への影響を検討した。

2 研究方法

骨吸収の促進に可溶性破骨細胞分化誘導因子（sRANKL）を、骨吸収の予防にリセドロネート（Ris）を用いた。

- 1) sRANKL 単回投与実験：C57BL/6J マウス（10 週齢、メス）に対して sRANKL（2.0 mg/kg）を単回投与（腹腔内注射）し、sRANKL 投与前のベースラインおよび投与から 18・21・24・27・30・48 時間後までの経時的な変化を評価した。
- 2) sRANKL 3 回投与実験：C57BL/6J マウス（10 週齢、メス）に対し sRANKL（2.0 mg/kg）を 24 時間毎に 3 日間連続で腹腔内注射した。1 回目の sRANKL 投与前のベースラインおよび 3 回目の sRANKL 投与から 1.5・12・24・36 時間後までの経時的な変化を評価した。また、尿中のリン・カルシウム排泄量を評価するために sRANKL 投与前から蓄尿を行い、24 時間毎に計 4 日間の尿を採取した。
- 3) C57BL/6J マウス（10 週齢、メス）に対し、sRANKL の投与前に Ris（10 µg/kg）を 24 時間毎に 3 回皮下注射を行った。その後、Ris を 24 時間毎に 2 回追加投与（皮下注射）し、同時に sRANKL（2.0 mg/kg）を 24 時間毎に 3 日間腹腔内注射した。3 回目の sRANKL 投与から 24 時間後にマウスの解剖を行った。また、尿中のリン・カルシウム排泄量を評価するために最後の Ris 投与後から蓄尿を行い、24 時間毎に計 4 日間の尿を採取した。

3 研究成果

- 1) sRANKL を投与すると破骨細胞の分化が進み、骨量減少を来することが明らかになった。骨から溶出したリンとカルシウムが血中に流入し、血中リンとカルシウム値は一過性に上昇した。これに続いて血中 FGF23 値が上昇した結果、尿中のリン排泄量が増加した。つまり、骨から血中に流入したリンは FGF23-Klotho 内分泌系により尿中へ排泄されることが明らかになった。
- 2) sRANKL 3 回投与では単回投与の時よりも破骨細胞が多く分化し、骨量減少が強く長く誘導された。sRANKL の蓄積効果により、血中リンとカルシウム値はより高値を示し、これに続いて血中 FGF23 値もより高値を示した。その結果、尿中のリン排泄量の増加も長時間持続し、尿細管障害が誘導されることが明らかになった。
- 3) sRANKL 投与前に Ris を投与して sRANKL が誘導する骨量減少を予防すると、破骨細胞の分化が抑制され骨量減少を予防できた。これにより、血中 FGF23 値の上昇は抑制され、尿中のリン排泄量も減少した。この結果、骨吸収の予防により尿細管障害の誘導も予防できることが明らかになった。

4 考察

本研究で、持続する骨吸収が尿細管障害を誘導することを明らかにしたが、血中 Cre 値の上昇は認められずサブクリニカル急性腎障害（AKI）の病態を示した。この状態で、食事などの体外由来のリンが加わることでより重度の腎障害に発展し、この AKI の繰り返しが CKD への移行を早める可能性がある。このサブクリニカル AKI を防ぐことは腎機能の保護に貢献できるため、骨吸収を停止あるいは持続させないことが重要である。

骨量減少を来す病態として、寝たきり状態が注目されている。現代では高齢化社会が進み寝たきり状態の患者が増えている。この病態では骨吸収が優位になるため、骨からはカルシウムだけでなく、リンも溶出する。これが血中に流入し続けると、リンが尿中に持続的に排泄されるためサブクリニカル AKI を発症しうる。高齢者に限らず脳血管疾患や骨折などによる寝たきり状態でも骨量減少が引き起こされると考えられる。実際に、AKI は股関節手術後の患者によくみられる合併症の 1 つとして報告されている。

本研究で、体内由来のリンが、食事由来のリンと同様の排泄経路をたどることが明らかになったため、同じ機序で尿細管障害を誘導していると考えられる。食事や骨由来に関わらず、リンが持続して血中に流入することで、FGF23 が上昇し尿中のリン排泄量が増加する。その結果、尿細管内での微細なリン酸カルシウム結晶を析出し尿細管障害が誘導される。

CKD には骨密度の低下による骨折が発生することがある。これを慢性腎臓病に伴うミネラル骨代謝異常 (CKD-MBD) と呼び、CKD が骨量減少の原因と捉えられているが、本研究では、骨量減少が AKI や CKD の原因となりうることを示している。実際に、高齢者や CKD 患者における座位行動が、低骨密度などと相関することが示されており、座位行動の代わりに運動療法を行うことで骨密度を増加させることが明らかになっている。運動や薬物療法による骨量維持が、CKD や加齢による腎機能低下を予防あるいは減速させる可能性があるため、今後の介入研究が期待される。

5 結論

本研究では、sRANKL が誘導する骨吸収により骨から溶出したリンとカルシウムは、血中に流入し尿中に排出された。また、持続する骨吸収が尿細管障害を誘導し、骨吸収を予防すると尿細管障害の誘導も予防できることを明らかにした。本研究の成果は、骨由来のリンが食事由来のリンと同様に尿細管障害を誘導するため、骨量減少を来す疾患だけでなく、術後安静を要する若年者や高齢者においても、骨量減少を停止することが腎機能保護の治療法につながる可能性を示した。

論文審査の結果の要旨

リンは生命維持に欠かせない必須元素の一つである。しかし、過剰なリン摂取により腎障害が誘発されることが知られており、リン代謝を制御する FGF23-Klotho 内分泌系を介して尿中リン排泄量が増加すると、近位尿細管での尿中リン濃度が上昇して、リン酸カルシウム結晶が形成され、TLR4 を介した経路で炎症反応や尿細管障害が惹起される。これまで、この過剰なリンによる腎障害は、腸から吸収される食事性 (体外) 由来のリンでしか知られていなかった。

申請者は、骨から溶出する、いわゆる体内由来のリンによっても尿細管障害が誘導されるのではないかとの仮説を立て、sRANKL 投与によるマウス骨量減少モデルを用いて本研究を行った。

その結果、

- 1) sRANKL (1 回) 投与による破骨細胞の分化が進み、骨量減少が起こり、骨から溶出したリンとカルシウムが血中に流入して、尿中リン排泄量が増加した。
- 2) sRANKL (3 回投与) により破骨細胞の分化と骨量減少が強く長く誘導されるとともに、血中

のリンとカルシウム濃度の増加も高値を示し、尿細管障害が誘導された。

3) sRANK (3 回) 投与前にリセドロネート (Ris) を投与することにより、sRANKL によって誘導される骨量減少を予防すると、尿中リン排泄量も減少して尿細管障害も抑制された。

以上の結果から、持続する骨吸収によって溶出した体内由来のリンにより尿細管障害が誘導されること、この骨吸収を予防することで尿細管障害も予防できることが明らかになった。

本研究の研究目的は明確で、研究方法も妥当であり、新規性や独自性もある。また、骨量減少を来す疾患や慢性腎臓病、高齢者の腎保護の治療法にも繋がることが期待されることから、審査員全員一致で博士論文に相応しいと評価した。

最終試験の結果の要旨

申請者は、研究背景や目的、方法、結果、考察について、決められた時間内で要領よく説明した。その内容の骨子は「論文審査の結果」に記載したとおりである。なお、審査委員からなされた主な質問やコメントは以下の通りである。

- 1) 腎の糸球体あるいは尿細管障害について
- 2) 本研究のモデルとして使用したリセドロネート以外のビスフォスフォネート製剤による同様の作用の可能性
- 3) 腎尿細管障害の原因物質としてのリン酸カルシウム結晶と CPP について
- 4) 外因性（食餌由来）リン負荷モデルとの違いについて
- 5) IL-1 β や TNF- α 、IL-6 などの炎症性サイトカインの発現
- 6) リセドロネート投与モデルにおける性差、雄と雌の違い、他のモデルの可能性

申請者は、ほとんどの質問に対して的確に返答した。一部の質問に関しては、検討されていない、あるいはこれから検討予定とのことで、申請者自身の仮説を交えることで適切に答えることができた。また、提出された学位論文では、一部の指摘事項について、適切に修正かつ加筆された。

以上の発表および質疑応答から、申請者が十分な資質と能力を有していることが明らかになり、審査委員全員一致で合格と判断された。