

東海大学大学院平成28年度博士論文

尿毒症毒素パラクレジル硫酸のマウス骨芽細胞
に及ぼす影響とその作用機序の解明

指導 深川 雅史 教授

東海大学大学院医学研究科
先端医科学専攻
田中 寿絵

- この学位申請論文は、**Bone**に掲載された主要公刊論文を基に作成された。
- **Bone** に掲載された主要公刊論文の一部を学位申請論文に用いる事に加えて、学位申請論文を機関リポジトリ[電子書庫システム]で公開することの承諾を得ている。

総括

慢性腎臓病（CKD）では、種々の骨ミネラル代謝異常が出現する。近年CKDにおける骨ミネラル代謝異常は、全身の血管石灰化を介して生命予後に大きな影響を及ぼすことが明らかとなり、CKD-MBDと呼ばれる全身性疾患として認識されるようになった。

腎機能が低下すると、通常腎臓から排泄される物質が体内に蓄積し、尿毒症と呼ばれる全身の諸症状を呈する。この生体に様々な毒性を及ぼす物質は、尿毒症毒素（UTx）と呼ばれている。パラクレジル硫酸（PCS）は、測定法の改良により近年認識されたUTxで、血中ではアルブミンと結合する蛋白結合UTxの一つである。通常透析では除去しにくく、CKDの進行や心血管疾患、生命予後に関連することが報告されている。しかしPCSの骨代謝に及ぼす影響については未だ明らかではない。そこで今回我々は、PCSの骨芽細胞に及ぼす作用とその作用機序について検討し、同じく蛋白結合UTxであり先行研究においてその毒性が明らかなインドキシル硫酸（IS）と比較した。

マウス新生仔頭頂骨より単離した初代培養骨芽細胞を用いて、PCSもしくはISを0.05～0.5mMの濃度で添加した。その際、血液透析患者の血清PCS濃度とされる0.2～0.3mM、血清IS濃度とされる0.1～0.2mMを参考にした。PCSは0.125mM以上の添加で、PTH投

与後の細胞内cAMP産生とPTH受容体（PTHR） mRNAの発現を、濃度依存性に抑制した。またPCSは同濃度以上の添加で、骨芽細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導、MTTアッセイでは細胞バイアビリティの低下を示した。一方ISを添加した骨芽細胞では、PTH投与後のcAMP産生やPTHR mRNAの発現に有意な低下は認めなかったが、0.5mMの添加でのみ細胞の増殖抑制やアポトーシスの増加、そしてバイアビリティの低下を示した。

次にPCSの骨芽細胞障害の機序について、細胞内活性酸素種（ROS）の測定を行い酸化ストレスの関与を検討した。ISは、0.05mM以上の添加で有意なROSの上昇を認め、酸化ストレスを誘導したのに対し、PCSは、0.25mM以上の濃度添加で有意に骨芽細胞内のROSを上昇させ、酸化ストレスを誘導した。また同濃度のPCSとともに抗酸化物質であるN-acetylcysteineを投与すると、骨芽細胞障害は軽減された。0.125mMのPCSを添加した骨芽細胞では、酸化ストレスの誘導は見られなかったため、ROS以外の関与が考えられた。そこで、低濃度PCS（0.125mM）における骨芽細胞障害の機序について、細胞内シグナル伝達経路である分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ（MAPK）経路を、ウェスタンブロット法を用いて検討した。0.125mMのPCSを添加した骨芽細胞では、MAPK経路のうちアポトーシスを誘導するJNKおよびp38MAPKの有意なリン酸化を認め、これら経路の活性化を示した。さらにJNKもしくはp38MAPKの阻害薬を投与すると、PCSによる骨芽細胞障害は消失もしくは減弱した。一方0.125mMのISを添加した骨芽細胞では、これらMAPK経路の活性化は認めなかった。

PCS は、CKD 患者の血中濃度より低い濃度の添加で、骨芽細胞の PTH に対する反応性低下すなわち PTH 抵抗性と細胞障害を呈した。またその作用機序では、酸化ストレスの誘導に加え、JNK および p38MAPK の活性化により、IS とは異なる機序で骨芽細胞障害をきたすことを発見した。PCS による骨代謝異常のさらなる理解には、骨細胞や破骨細胞など、骨を構成する他の細胞に対する PCS の作用なども明らかにする必要がある。PCS を含む UTx は、CKD 患者の呈する骨病変の発症において重要な役割を担っており、今後の CKD 治療の主要なターゲットの一つであると考えられる。

研究の背景

腎臓は、副甲状腺・骨・腸管とともに生体のミネラル調節に重要な臓器である。腎臓は、副甲状腺から分泌される副甲状腺ホルモン（PTH）の作用を受け、リン（P）およびカルシウム（Ca）の排泄を調節する一方、活性型ビタミン D の産生を行い、腸管での P や Ca の吸収、骨代謝にも関与する。慢性腎臓病（CKD：chronic kidney disease）に伴う骨ミネラル代謝異常は、近年 CKD-MBD（chronic kidney disease-mineral and bone disorder）という新たな疾患概念が提唱された。CKD 患者は、その機能低下に伴うミネラルホメオスターシスの破綻によって、種々の骨病変を呈し、また全身の血管石灰化を介して生命予後も大きな影響を受ける。このため CKD-MBD は、「Ca、P、PTH などの検査値の異常」、「骨代謝の異常」、「血管石灰化」を 3 つの柱とする全身性のミネラル代謝疾患として認識されるようになった。

二次性副甲状腺機能亢進症は、広く知られた CKD-MBD の病態の一つで、骨においては、過剰な PTH 作用により骨形成と骨吸収の両者が亢進し高回転骨をきたす。その結果骨量は低下、典型例では線維性骨炎と呼ばれる所見を呈する。一方 CKD-MBD では、PTH に対する骨の反応性の低下によって、無形成骨と呼ばれる、骨代謝回転の低下をきたすことも知られている。この PTH に対する骨の反応性の低下すなわち PTH 抵抗性の存在により、CKD 患者では、PTH 値が正常範囲内にあっても通常の骨代謝回転となっているとは限らず、PTH 値から骨代謝回転の程度を推測することは難しい。また PTH 抵抗性の機序についても、未だそのすべては明らかとなっておらず、近年腎機能低下とともに生体に蓄積する

尿毒症毒素（UTx : Uremic Toxin）（後述）が、その発症に関わることが報告されている。

腎機能が低下すると、通常腎臓より排泄される物質が体内に蓄積する。そしてそれらは、血中濃度の上昇に伴い生体に様々な毒性を及ぼし、尿毒症と呼ばれる全身の諸症状を呈することから UTx と呼ばれている。現在までに、約 120 種類以上の UTx が報告され、分子量やアルブミン蛋白との結合力などの性質により分類されている。特にアルブミン蛋白との結合力の強い UTx（蛋白結合 UTx）は、通常透析では除去しにくく生体に蓄積しやすく、それらの一部は、CKD が進行するほど高くなる死亡や心血管合併症のリスクと関連することが明らかとなっている。

インドキシル硫酸（IS : indoxyl sulfate）は、代表的な蛋白結合 UTx の一つで、その毒性について、様々な研究者により研究が行われてきた。IS は、食物中に含まれるアミノ酸のトリプトファンから、腸内細菌により合成される。臨床研究では、IS が腎機能悪化に関与することや、心血管病、生命予後と関連することも示されている。IS と骨代謝の関連については、血液透析患者の血中 IS 濃度が、ALP や BAP といった骨形成マーカーと負の相関を示す事が報告されている。我々の、マウス頭蓋冠より培養した骨芽細胞を用いた実験では、IS の添加により酸化ストレスが誘導され、骨芽細胞バイアビリティーの低下を認めた。また IS は、PTH 受容体（PTHr）の発現低下を介して、PTH に対する骨芽細胞の反応性を低下させた。さらに、腎不全のモデルラットに、IS を含む腸管由来の UTx を吸着する AST-120 を経口摂取させると、低下した骨回転が改善することも報告した。以上より、IS は、PTH に対する

骨芽細胞の反応性の低下や骨芽細胞障害に関わり、骨代謝回転を低下させると考えられる。

パラクレジル硫酸（PCS：p-cresyl sulfate）は、IS と同じ蛋白結合 UTx で、近年注目されている UTx の一つである。アミノ酸の中のチロシンが、腸内細菌によって発酵されパラクレゾールとなり、その後硫酸抱合を受け PCS となる。過去の研究では、PCS の前駆体であるパラクレゾールに焦点が当てられ、その強い毒性が注目されてきたが、近年の分析手法の改善により、血中パラクレゾールのほとんどは、PCS の形で存在することが明らかとなった。したがって、パラクレゾールによる毒性と考えられてきた作用も、実際は PCS により引き起こされている可能性が示唆され、UTx としての PCS の研究が進められることとなった。近年の臨床研究では、PCS は IS 同様、CKD の進行や心血管合併症、生命予後と直接関連することが報告されている。PCS が 内皮の微粒子の脱落を誘導し内皮細胞障害を起こすこと、白血球のフリーラジカル産生を介して炎症を促進する作用を示すことが報告されたが、PCS の骨代謝に与える影響や骨芽細胞におよぼす作用は未だ明らかではない。そこで今回我々は、PCS の骨代謝に与える影響の解明を目的に、PCS の骨芽細胞に及ぼす作用とその細胞障害メカニズムを検討し、IS と比較した。

考察と展望

今回我々は、CKD 患者の心血管疾患の発症や生命予後に関与する重要な蛋白結合 UTx の一つである、PCS の骨代謝に及ぼす影響について、骨芽細胞を用いて検証した。先行研究より、血液透析患者の血中 PCS 濃度は、0.2-0.3mM と報告されていることから、その血中 PCS 濃度と合うように今回 PCS 濃度は 0.05-0.5mM の範囲で添加し実験を行った。PTH に対する骨芽細胞の反応性では、PCS は 0.125mM 以上の濃度の添加で PTH 投与後の cAMP 産生や PTHR mRNA 発現を抑制した。また PCS は、0.125mM 以上の添加で、骨芽細胞の増殖抑制やアポトーシスの誘導、バイアビリティーの低下をきたした。一方 IS は、0.5mM 以下の濃度添加では骨芽細胞の反応性は変化せず、骨芽細胞の増殖抑制やアポトーシス、バイアビリティーの低下は 0.5mM の濃度の添加でのみ認めた。したがって PCS は、IS に比べより低濃度の添加でも骨芽細胞障害をきたす事が明らかとなった。

CKD 患者では、PTH に対する骨の反応性低下すなわち PTH 抵抗性により、PTH の値が正常範囲（150-300pg/ml）内であっても、骨生検では高頻度で低回転骨を呈する。CKD 患者において通常の骨代謝回転を保つためには、約 3～5 倍の PTH が必要との報告もある。無形成骨に代表される低回転骨は、CKD 患者の中でも特に透析患者に多く認められる。その頻度は、成人血液透析患者の約 40%以上ともいわれ、近年上昇傾向にある。高齢、糖尿病、低栄養などの患者背景の他、代謝性アシドーシス、高 P 血症、Ca 含有の P 吸着薬服用などに伴う Ca 負荷、ステロイド投与など、多数

の因子がそのリスクファクターとして考えられている。

PTH 抵抗性の原因は多岐にわたるが、その機序において我々は、骨芽細胞の PTHR mRNA 発現低下と PTH 投与後の細胞内 cAMP 産生の低下が重要であると考え。副甲状腺を摘出後、一定量の PTH を投与した腎不全ラットでは、腎機能低下に比例して骨の PTHR mRNA 発現は低下し、骨代謝回転も低下した。また一方で、この腎不全ラットに高容量の PTH を投与すると、容量依存性に骨代謝回転は改善を認めた。初代培養した骨芽細胞において IS の作用を検証した実験では、2.0mM の IS 添加で PTH 投与後の細胞内 cAMP 産生は有意に低下し、骨芽細胞の PTHR mRNA 発現も低下した。本研究では、骨芽細胞に PCS を投与して同様の検討を行ったが、PCS は IS に比べより低濃度の添加で、PTH 投与後の細胞内 cAMP 産生低下と、PTHR mRNA 発現の低下を示した。この PTHR 遺伝子発現の低下は、実際の末期 CKD 患者の骨生検においても報告があり、我々の腎不全ラットの実験や骨芽細胞における所見と一致する。一方、PTH 投与後の細胞内 cAMP 産生は、cAMP-protein kinase A (PKA) シグナル伝達経路と呼ばれる細胞内のシグナル経路により、骨芽細胞に直接影響を与えることが明らかとなっている。Krishnan らによると、PKA シグナル伝達経路は、PKA 依存性 Runx2 の活性化と cyclin D1 発現低下を介して骨芽細胞の分化を促進するとともに、cAMP response element binding protein (CREB) の合成促進とアポトーシスを促進する蛋白の不活化により、抗アポトーシス効果を誘導することが報告されている。つまり PTH 投与後の細胞内 cAMP 産生の低下は、骨芽細胞の分化を抑制するのみならず、細胞の生存シグナルを減弱させ、細胞を

アポトーシスに誘導する事によって骨芽細胞障害をきたす。したがって CKD 患者では、腎機能の低下に伴い蓄積した IS や PCS により、骨の PTHR 発現の低下と PTH 刺激後の細胞内 cAMP 産生低下に伴う骨芽細胞障害によって PTH 抵抗性を示し、骨代謝回転は低下すると考えられる。

PCS による細胞障害の機序の検討では、近年の他の細胞を用いた研究同様、骨芽細胞を用いた本研究においても、細胞内の ROS 産生を上昇させ、酸化ストレスを誘導することを確認した。そしてその細胞内 ROS の上昇は、PCS を 0.25mM 以上の濃度で添加した場合に有意となった。また同濃度の PCS 添加では、細胞内 ROS の上昇とともに MAPK 経路の JNK および p38MAPK の活性化を認め、骨芽細胞のアポトーシスが増加、バイアビリティーが低下することも明らかとなった。

MAPK 経路は、真核生物において広く存在する細胞内シグナル経路で、細胞外からの様々なシグナルを細胞内に伝達し、増殖、分化、アポトーシスなどの細胞応答を制御する働きがある。MAPK 経路のうち、ERK1/2 は主に増殖刺激により活性化され、細胞増殖や分化に関わり、JNK および p38MAPK は、炎症性サイトカインや細胞ストレス等に反応して活性化され、アポトーシスの誘導に関わるとされる。今回抗酸化物質である NAC の投与を行うと、0.25mM の PCS と培養した骨芽細胞において、JNK および p38MAPK の活性化は減少し、骨芽細胞障害を軽減することができた。これは、酸化ストレスが MAPK 経路の特に JNK および p38MAPK を活性化するという報告と矛盾しない。つまり、0.25mM 以上の濃度の PCS では、酸化ストレスの誘導を介して、

JNK および p38MAPK が活性化され、骨芽細胞障害を呈すると考えられる。そしてこの PCS 濃度は、培養ヒト尿細管 HK-2 細胞を用いた研究において、細胞内 ROS の上昇とバイアビリティーの低下を引き起こした濃度と一致する。しかしながら、初代培養の骨芽細胞を用いた本研究では、0.25mM よりさらに低濃度の 0.125mM の PCS 添加においても骨芽細胞障害を示した。また 0.125mM の PCS と培養した骨芽細胞では、0.25mM の PCS 添加の際と異なり、JNK および p38MAPK の活性化は示したが、酸化ストレスの誘導は認めなかった。以上の結果から、0.125mM の低濃度 PCS 添加では、酸化ストレス以外の機序で JNK および p38MAPK が活性化され、骨芽細胞障害を呈する可能性が示唆された。

次に我々は、低濃度 PCS (0.125mM) 添加における JNK および p38MAPK の活性化と骨芽細胞障害の関連について、近年の知見から JNK および p38MAPK 阻害薬の投与が、それら経路を介したアポトーシスを抑制することが示されていることから、それぞれの阻害薬を用い検証を行った。骨芽細胞に 0.125mM の PCS を添加すると、有意に JNK および p38MAPK のリン酸化が誘導され、これら経路が活性化された。そして JNK 阻害薬である SP600125 や p38MAPK 阻害薬である SB203580 の投与を行うと、PCS によって引き起こされた骨芽細胞障害は、消失もしくは減弱することも明らかとなった。PTH 刺激後の cAMP 産生、PTHrP mRNA 発現および骨芽細胞の増殖能、バイアビリティーは、JNK 阻害薬ではほぼ完全に、p38MAPK 阻害薬では部分的に回復を示した。断片化 DNA についても同様の傾向で減少しており、0.125mM の低濃度

PCS 添加では、何らかの機序により活性化された JNK および p38MAPK が、骨芽細胞障害を引き起こすことが明らかとなった。

一方、IS と MAPK 経路については、いくつかの研究で IS も MAPK 経路の活性化に関わることが報告されている。IS と細胞増殖およびアポトーシスの関連について検討した研究では、IS は ERK1/2 および p38MAPK の活性促進により、血管平滑筋の増殖に関連すると報告されている。今回の研究で IS は、骨芽細胞において p38MAPK の活性化は示さなかったものの、ERK1/2 の活性化を 1 分および 15 分後に認めた。しかし、本研究における IS の ERK1/2 活性化と骨芽細胞に対する作用との関連は不明である。

骨芽細胞を用いた今回の検討において、PCS は IS と比べより低濃度の添加でも骨芽細胞障害をきたすことが明らかとなった。Meijers らの報告では、実際の透析患者の血中 PCS 濃度は、IS のそれよりもやや高いとされる。したがって PCS は、生体内で IS よりさらに強い毒性を有する可能性が示唆される。PCS の骨芽細胞障害の機序の検討では、JNK および p38MAPK 経路の活性化が関連し、IS のそれとは異なるものであることを発見した。また酸化ストレスについても、添加する PCS の濃度により、誘導される場合と誘導されない場合があった。PCS の酸化ストレスを介さない JNK および p38MAPK 活性化の機序については、今後さらなる研究解明が必要である。また今回の実験は、PCS と骨芽細胞の一過性の暴露であったが、腎機能の低下とともに徐々に蓄積される UTx は、長期にわたり生体に影響を及ぼす。したがって実際の CKD 患者における PCS の作用は、今回の検証より強いものである可能性が疑われる。今後、PCS の骨細胞や破骨細胞など、骨芽細

胞以外の骨を構成する細胞に対する作用や、それら細胞間の応答反応に与える影響なども検証される必要がある。

世界的な大規模臨床データにおいて、CKD 患者、特に透析患者における骨折頻度は高いことが示されている。我が国からの報告でも、透析患者の大腿骨近位部骨折は、一般人口に比較して男性で 6.2 倍、女性で 4.9 倍とされる。一般に、骨折の発症は患者の ADL のみならず生命予後にも影響を与える事が知られている。Tentori らの研究では、透析患者の骨折後一年間の生命予後は極めて悪く、骨折後 1 ヶ月では、非骨折患者に比べ 3.8 倍から 11.6 倍の死亡率となることが報告された。したがって、CKD 患者の骨折予防は、CKD 患者の生命予後の改善に非常に重要である。

骨折に影響する因子は、「骨強度」であり、それは「骨量」と「骨質」の 2 つの因子から成る。骨量とは、骨の単位面積もしくは体積あたりのミネラル量で、通常骨密度で表される。一方骨質には、骨の微細構造、骨代謝回転、マイクロダメージの集積、石灰化などがある。CKD-MBD に伴う骨病変は、現在 TMV 分類と呼ばれる Turnover（骨代謝回転）・Mineralization（石灰化）・Volume（骨量）の 3 つのパラメーターに基づく組織学的分類が使用されている。CKD-MBD 患者では、これらの変化により骨量と骨質の両方が影響を受け、骨強度が低下することが明らかとなっている。例えば、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場合では、骨量の減少と骨微細構造の劣化による骨質低下をきたす。反対に、無形成骨のような骨代謝回転の極端な低下の場合は、骨代謝による骨修復機能の低下からマイクロダメージの集積、石灰化度の上昇均一化、老化コラーゲン架橋の増加

などにより骨質が低下する。つまり骨代謝回転は、高すぎる場合も低すぎる場合も骨強度は低下し、骨は脆弱になる。現在のところ、実際の CKD 患者においてみられる骨変化に対する PCS の直接的な作用は明らかではない。しかし、本研究により確認された PCS による骨の PTH 抵抗性や骨芽細胞障害は、腎不全ラットの研究において認めた低回転骨の所見と矛盾せず、また AST-120 の投与によって骨代謝回転が改善していることなどから、PCS は、CKD 患者の骨代謝回転を低下させ、骨強度の低下に寄与する可能性が示唆される。さらに近年では、CKD 自体すなわち尿毒症状態が骨に与える作用として、骨代謝回転異常の他、骨質の劣化に影響する骨コラーゲンの異常など、骨組成の変化も注目されている。我々の腎不全ラットモデルを用いた研究でも、同様の骨組成の変化を認め、またこれに関しても AST-120 の投与で改善を認めていることから、PCS は、骨代謝回転の他、骨組成にも影響を与える可能性が考えられる。

本研究は、近年認識された UTx である PCS の骨芽細胞に与える作用を明らかとした。PCS は、酸化ストレスや JNK および p38MAPK の活性化を介して、骨の PTH 抵抗性と骨芽細胞の増殖抑制、アポトーシスの誘導をきたし細胞障害を呈する。PCS は、IS 同様骨代謝回転を低下させ、骨強度の低下に寄与する可能性が示唆された。今後は、PCS の骨細胞や破骨細胞に対する作用を明らかにするとともに、CKD 患者の骨病変のさらなる理解のためには、PCS の直接的な骨組成への影響についても解明する必要がある。

結論

PCS は、CKD 患者の血中濃度より低い濃度の添加で、骨芽細胞の PTHR mRNA 発現を低下させ、PTH 投与後の細胞内 cAMP 産生低下をきたし、PTH 抵抗性を示すことが明らかとなった。また同濃度の PCS 添加で、骨芽細胞の増殖は抑制され、アポトーシスは増加、細胞バイアビリティーは低下し、骨芽細胞障害を示した。さらにその作用機序では、PCS は酸化ストレスの誘導のみならず JNK および p38MAPK 経路の活性化を介し、IS とは異なる機序で骨芽細胞障害をきたすことを発見した。CKD 患者が呈する骨病変のさらなる理解には、PCS など UTx による作用の解明が不可欠であり、PCS を含む UTx は、今後の CKD 治療の重要なターゲットの一つであると考えられる。