

氏名・(本籍)	齋藤 光 (秋田県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第 1063 号
学位授与の日付	令和 4 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Analysis of bone in adenine-induced chronic kidney disease model rats (アデニン誘発慢性腎臓病モデルラットの骨についての解析)

論文審査委員	(主査) 新山 幸俊 教授		
	(副査) 沼田 朋大 教授	中永 士師明 教授	

学位論文内容要旨

Analysis of bone in adenine-induced chronic kidney disease model rats

アデニン誘発慢性腎臓病モデルラットの骨についての解析

申請者氏名 齋藤 光

研究目的

慢性腎臓病（CKD）は腎機能障害に加えて、ミネラル骨代謝障害（MBD）、骨粗鬆症の発症、脆弱性骨折のリスク上昇と関連する。CKD 患者における骨折のリスクは健常者の 2～14 倍と報告されており、特に CKD ステージIV以上に進行すると骨折の発生率が高くなる。CKD 患者の脆弱性骨折を予防するためには、CKD における骨量や骨微細構造の変化を明らかにする必要がある。CKD の動物モデルであるアデニン誘発 CKD モデルラットは、0.75%のアデニン飼料で 4 週間飼育することで、非進行性かつ不可逆的な腎不全が誘発される。しかし、アデニン誘発 CKD モデルラットにおいてステージIVの CKD が発生しているのか、その状態がどの程度続くのか、骨密度（BMD）、骨微細構造、海綿骨・皮質骨の強度がどのように変化するかは不明である。本研究の目的は、0.75%アデニン飼料にて 4 週間飼育し作製した CKD モデルラットにおいて、血清学的評価により CKD のステージを調べ、BMD、骨強度、海綿骨と皮質骨の微細構造の変化について検討することである。

研究方法

8 週齢の Wistar 系雄性ラットを、0.75%アデニン飼料で 12 週齢まで 4 週間飼育し、その後は普通飼料にて飼育した CKD モデルラット（CKD 群）と、普通飼料のみで飼育した Sham ラット（Sham 群）の 2 群を設定した。CKD 群と sham 群を 12 週齢、16 週齢、20 週齢で犠牲死させ（各群 n=7）、以下のパラメータを評価した。血清学的評価として血清尿素窒素（BUN）、クレアチニン（CRE）、カルシウム（Ca）、無機リン（IP）、血清副甲状腺ホルモン（I-PTH）を測定した。さらに腎組織学的評価として、腎組織切片を H&E 染色と、Elastica-Masson 染色にて染色し、間質に占める線維化面積を測定した。全身骨密度を Dual energy x-ray absorptiometry（DXA）法にて測定し、大腿骨遠位顆部の圧縮試験により骨強度を計測、マイクロコンピュータ断層撮影（ μ CT）で大腿骨遠位顆部の海綿骨と皮質骨の骨微細構造関連パラメータを評価した。各パラメータを 2 群間で比較した。

研究成績

血清学的評価では、20 週齢の CKD 群で、BUN、CRE、IP、I-PTH が有意に上昇し（ $p < 0.05$ ）たが、Ca は正常であった。以上より、本モデルラットは CKD stage IV であり、二次性副甲状腺機能亢進症を伴っていた。腎組織切片では 20 週齢の CKD ラットで尿細管腔の拡大、間質の線維化を認めた。全体に占める線維化の割合は、CKD ラットが sham ラットに比べて有意に高く（ $p = 0.025$ & $p < 0.001$ ）、その割合は 12 週から 20 週にかけて時間依存的に CKD ラットで有意に増加した（ $p < 0.01$ ）。20 週齢の CKD ラットで、全身および大腿骨の BMD は有意に低下し（ $p < 0.05$ ）、大腿骨遠位顆部圧縮試験による破断エネルギー、最大荷重は、CKD ラットで有意に低下していた（ $P < 0.05$ ）。マイクロ CT 解析では、皮質骨断面積・皮質骨幅は CKD ラットで有意に低下していた（ $p < 0.05$ ）。

結論

本研究により、0.75%アデニンにて 4 週間飼育した CKD モデルラットは、20 週齢でステージ IV の CKD を発症していた。CKD モデルラットでは、実験期間中に血清 I-PTH 値および腎線維化の割合が高くなり、進行した CKD と二次性副甲状腺機能亢進症を呈した。CKD モデルラットでは、全身の BMD、皮質骨の微細構造、骨強度が低下していた。これらの CKD モデルラットは、CKD に関連する骨粗鬆症や MBD に対するいくつかの治療法の効果を評価するのに適していると思われた。

学位(博士一甲)論文審査結果の要旨

主査: 新山 幸俊

申請者: 齋藤 光

論文題名: Analysis of bone in adenine-induced chronic kidney disease model rats

(アデニン誘発慢性腎臓病モデルラットの骨についての解析)

要旨

著者の研究はアデニン誘発慢性腎臓病モデルラットを作製し、そのモデルラットにおける腎機能障害の推移を血清学的検査と腎組織学的検査で検討し、慢性腎臓病による骨障害について、骨密度、骨強度、骨微細構造を用いて評価したものである。アデニン誘発慢性腎臓病モデルラットは0.75%のアデニン添加飼料を4週間投与することで不可逆的、かつ非進行性の腎障害を引き起こすことが報告されているが、腎障害がどのように推移・持続するのか、また、骨密度、骨強度、骨微細構造がどのように変化するのかが不明である。著者らは初めて、アデニン誘発慢性腎臓病モデルラットの腎障害と骨障害について詳細に検討した。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下のとおりである。

1) 斬新さ

アデニン誘発慢性腎臓病モデルラットの腎障害がどのように推移・持続するのかについての報告は限られていた。本研究では、慢性腎不全のステージを血清学的評価から推察し、また腎組織学的検査で間質の線維化を定量的に評価した点で斬新である。またこれまで、本モデルラットの骨について詳細に検討した報告は限られていた。本研究はアデニン誘発慢性腎臓病モデルラットの骨について、骨密度、骨強度、骨微細構造と多面的に検討した数少ない報告である。

2) 重要性

慢性腎臓病患者は本邦に約1100万人いるとされ、80歳以上の約半数が罹患している。慢性腎臓病は特有の骨障害を生じ、臨床的にも骨折リスクが高いことが示されており、とくにステージ4になるとその骨折リスクは急激に上昇する。高齢者が骨折を生じると、日常生活動作の制限や生活の質の低下、死亡リスクの上昇を引き起こすとされている。以上のことから慢性腎臓病患者に対する骨の治療は非常に重要である。しかし慢性腎臓病患者では、骨粗鬆症治療薬の効果と安全性は示されていない。臨床試験が困難なため、モデル動物での検討が重要となる。本研究では0.75%アデニン飼料を4週間投与することで作製した慢性腎臓病モデルラットが、臨床的にステージ4の

モデルとなり、骨密度低下、骨強度低下、皮質骨の微細構造劣化が生じることを実証した。この結果により、今後は本モデルを用いて薬物療法、運動療法の効果・安全性を検証することが可能となり、慢性腎臓病患者の骨障害に対して新たな治療選択肢を示すことが期待され、臨床上非常に重要となる。

3) 研究方法の正確性

本研究では、評価に使用した検体はすべての個体で同様の手順で採取した。さらに、各評価項目の測定を同一検者で行い、測定に関する検者間のバイアスを除去している。骨密度、骨強度、骨微細構造は、過去の研究と同様の手順で正確に測定している。さらに、全ての結果は統計学的検討が加えられており、実験方法は客観的で正確性がある。

4) 表現の明瞭さ

本研究の持つ意味、腎機能評価と骨障害評価のための各種計測方法、評価項目、得られた結果、考察は簡潔かつ明瞭に記載されている。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定する。