

ラットにおける骨粗鬆症に対して食事中的の  
カルシウム・リンバランスが及ぼす影響  
および  
既存骨粗鬆症治療薬による新たな治療方策

2020 年

渡邊 厚

## 目次

本文の要旨.....	4
緒言.....	7
<b>第1章 食事中的カルシウム・リンバランスが骨粗鬆症に及ぼす影響.....</b>	<b>10</b>
1.1. 序論.....	10
1.2. 実験材料および方法.....	11
1.2.1. 使用動物.....	11
1.2.2. 飼料.....	11
1.2.3. 実験デザイン.....	11
1.3. 検査項目.....	12
1.3.1. 体重・摂餌量・尿量・飲水量.....	12
1.3.2. 尿検査.....	12
1.3.3. 血液学的検査.....	12
1.3.4. 血液生化学的検査.....	12
1.3.5. 臓器重量・病理組織学的検査.....	12
1.4. 統計.....	12
1.5. 結果.....	13
1.5.1. 体重・摂餌量・尿量・飲水量.....	13
1.5.2. 尿検査.....	13
1.5.3. 血液検査.....	13
1.5.4. 血液化学検査.....	13
1.5.5. 臓器重量、病理組織学的検査.....	13
1.6. 考察.....	23
<b>第2章 既存骨粗鬆症治療薬による新たな骨粗鬆症治療方策.....</b>	<b>24</b>
2.1. 序論.....	24
2.2. 実験材料および方法.....	25
2.2.1. 使用動物.....	25
2.2.2. 被験物質.....	25
2.2.3. 実験デザイン.....	25
2.3. 検査項目.....	26
2.3.1. 一般状態.....	26
2.3.2. 体重.....	26
2.3.3. Toxicokinetics.....	26
2.3.4. 骨密度計測.....	26

2.3.5. 骨代謝バイオマーカー測定 .....	26
2.3.6. 病理組織学的検査 .....	26
2.4. 統計 .....	27
2.5. 結果 .....	27
2.5.1. 体重、一般状態観察および病理組織学的検査 .....	27
2.5.2. Toxicokinetics (Table 2) .....	27
2.5.3. BMD .....	27
2.5.4. 骨代謝バイオマーカー .....	27
2.6. 考察 .....	34
総括 .....	36
引用文献 .....	38
論文目録 .....	43
謝辞 .....	44
利益相反 (COI) .....	44
Abstract .....	45

## 本文の要旨

骨粗鬆症は、加齢や悪しき生活習慣に基づいて比較的高率に発生し、日本を含む先進諸国における少子高齢化の進展と相まって、世界的に懸念されている疾患である。したがって、予防や治療により骨粗鬆症を制御することは、喫緊の課題と考えられている。食習慣は生活習慣病である骨粗鬆症の発生・進展に深く関与するもので、それを制御することは骨粗鬆症そのものを制御することに繋がる。しかしながら、具体的にどのような食要因がどのように関与し、どうすれば骨粗鬆症の制御、特に予防に貢献できるかについては、未解決の部分が大きい。一方、骨粗鬆症の治療に関しては各種の医薬品が開発されているが、現状では決定的なものが限られていて、また、副作用の懸念もあり、投与方法の工夫を含む新たな治療戦略の構築が望まれているところである。本研究は、これらの課題の解決に資する基礎的情報を得る目的で、動物実験による解析を行った。

### 食事中的カルシウム・リンバランスが骨粗鬆症に及ぼす影響

骨粗鬆症の発生と進展には、カルシウムとリンをはじめとするミネラルの体内バランスの変動が大きな影響要因となる。したがって、その調節臓器としての腎臓に障害が起きた場合には、病態が加速することが知られている。また、食事から摂取するミネラルのバランスも、病態の進行に影響を及ぼす重要な要因とされている。しかし、それらの詳細については、なお未解明な部分が多い。そこで本研究では、腎動脈部分結紮によるラット慢性腎臓病 (CKD) モデルに高リン食を適用して、食事中的カルシウムとリンの濃度が骨粗鬆症に及ぼす影響について解析した。

実験は、雄性 Slc:SD ラットを用い、8 及び 9 週齢時に無処置または左右腎動脈をそれぞれ 3/4 結紮する腎動脈部分結紮処置を行った後、カルシウム濃度に対するリン濃度の割合を 1/2 から 4 倍量まで変動させた食事を 10 週齢から 47 日間与えて解剖し、種々の解析を行った。

その結果、腎動脈部分結紮処置・リン 4 倍量群では、28 日目に著明な体重増加抑制がみられたため、動物福祉の観点から安楽殺を行った。また、無処置・リン 4 倍量群でも、21 日目から体重減少傾向がみられていた。腎動脈部分結紮処置群では血液学的、血液化学的および病理組織学的に CKD 様病態が観察され、特にリン 4 倍量群で顕著であった。また、無処置・リン 4 倍量群でも同様の変化が観察された。さらに、腎動脈部分結紮処置・リン 4 倍量群と無処置・リン 4 倍量群では、高リン血症・低カルシウム血症が誘導され、血中で線維芽細胞増殖因子 23 (FGF23) および副甲状腺ホルモンが高濃度であった。腎動脈部分結紮処置・リン 4 倍量群では、腎病変に加えて副甲状腺細胞の腫大や全身の血管における石灰化等の病変が観察された。さらに、骨においては骨髓腔の造血細胞減少・間葉系細胞の増殖・骨芽細胞/破骨細胞の増生・類骨領域の増加などが観察され、これらは骨粗鬆症またはそれに進

展し得る所見であった。

以上より、腎動脈部分結紮処置と、リン濃度増強による食事中的カルシウムとリンの濃度のアンバランス化は、ラットにおいて、比較的短期間にCKDを伴う骨粗鬆症様病変を誘発することが判明した。本研究の成果は、CKD合併骨粗鬆症の動物モデルとして有効に機能する実験系を確立し、ヒトへの外挿を経て、当該疾患の病態と背景分子機構の解明や、悪しき食習慣などリスク要因・増悪因子の同定と分子機構に基づいた制御方策の策定に資するものである。

#### 既存骨粗鬆症治療薬による新たな骨粗鬆症治療方策

骨粗鬆症治療薬であるテリパラチド（PTH(1-34)）は、骨形成を行うことで骨粗鬆症を治療することが出来る唯一の医薬品であるが、ラットを用いたがん原性試験で骨肉腫が発生したことから、生涯1回しか使用することが出来ない。しかし、テリパラチドのラットにおける発がん性については、投与頻度により表現型が異なり、週1回投与であれば無毒性量を設定することの可能性が示されている。そこで本研究では、ラットを用いて、テリパラチドの投与頻度による骨形成作用の違いと、その骨粗鬆症治療における意義について解析した。

実験は、雄性Cr1:CD(SD)ラットを用い、3か月間、種々の用量のテリパラチドを週1回または連日皮下投与して解剖し、骨形成バイオマーカーであるオステオカルシン（OC）および骨吸収バイオマーカーであるI型コラーゲン架橋N-テロペプチド（NTx）の血中レベルと骨密度（BMD）の経時的変化を解析した。

その結果、週1回投与群において、NTxはいずれの用量でも影響が現れず、OCは用量依存性に増加し、72時間をピークに次回投与（1週間後）までに正常値に戻った。BMDは、穏やかな増加を示したが、用量による差を認めなかった。これらの結果から、この群では、骨形成と骨吸収の亢進が定常状態に至るものと推察された。一方、連日投与群において、NTxは用量依存性に増加し、OCは週1回投与と比べ著しく高値を示した。BMDは、週1回投与と比べ高値を示したが、用量による差を認めなかった。これらの結果から、この群の骨形成は、限界無く過剰に亢進しているものと推察された。

以上より、テリパラチドは、週1回投与条件において正常骨代謝型（定常型リモデリング）、連日投与条件において高代謝回転型（高代謝回転型リモデリング）の骨形成促進作用を示すことが判明した。高代謝回転型の骨形成促進状態では、骨折に繋がるリスクが高く、ラットがん原性試験で検出された発がんリスクについても懸念がある。一方、正常骨代謝型の骨形成促進状態では、骨吸収に大きな影響を示さない自然生理に近い骨形成が行われるため、過剰な骨吸収が起こりにくく、骨折リスクが低いと考えられる。また、破骨細胞を活性化することなく骨芽細胞を活性化することから、発がんリスクについても懸念が低まることが期待される。本研究の成果は、投与条件を工夫することにより、テリパラチドによる新しい、より安全で繰り返し実施できる骨粗鬆症治療方策の策定に資するものである。

本研究の成果は骨粗鬆症の予防と治療に資するものであり、したがって、研究目的は達成されたものとする。

## 緒言

骨粗鬆症は、加齢や悪しき生活習慣に基づいて比較的高率に発生し、日本を含む先進諸国における少子高齢化の進展と相まって、世界的に懸念されている疾患である。したがって、予防や治療により骨粗鬆症を制御することは、喫緊の課題と考えられている。

骨粗鬆症の発症には、加齢・閉経・遺伝・ビタミン不足・運動不足・ストレスなどいくつかの因子が関与しているが、発症に最も大きく関与している因子がカルシウムである。カルシウムは、成人の体内において、その約 99%が骨や歯にハイドロキシアパタイト ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) の形で存在し、残りである約 1%の殆どが細胞内に分布しているため、血中に全体の約 0.1%が存在するに過ぎない<sup>1)</sup>。また、血清カルシウムの約 40%は、アルブミンなどのタンパク質と結合して、組織で利用する事ができない。一方、リン酸カルシウム・炭酸カルシウム・シュウ酸カルシウムなどのイオン複合体にキレート化されたカルシウム (血清カルシウムの約 9%) は吸収されて組織に運ばれ、残りの遊離したカルシウム (血清カルシウムの約 51%, 体内カルシウムの約 0.051%) は生理機能を維持するために利用される<sup>2,3)</sup>。このイオン化されたカルシウムは筋収縮・酵素リン酸化 (プロテインキナーゼ)・神経伝導・ホルモン分泌・血液凝固などの調節のために必要とされ、その他にも様々な代謝過程に適切な濃度のカルシウムが必要とされる<sup>4-7)</sup>。カルシウムの生理機能は生命維持に極めて重要であるため、血中のカルシウム濃度は厳密に調整されるが、この調節は主として内分泌的に行われる。たとえば、カルシウム摂取量が不足することにより血液中のカルシウムが減少した場合には、副甲状腺内のカルシウム感知タンパク質がシグナルを送り、副甲状腺ホルモン (PTH) を分泌させる<sup>8)</sup>。PTH は腎臓中でビタミン D を活性型のカルシトリオールへ変換し、カルシトリオールは小腸からのカルシウム吸収を増加させる。また、カルシトリオールは、PTH と協調して破骨細胞 (骨を再吸収する細胞) を活性化させて骨からのカルシウム放出を刺激するほか、腎臓において再吸収を増加させることによってカルシウムの尿からの排泄を減少させる。これら内分泌的な血中のカルシウム濃度調整は骨代謝に重要な役割を果たすが、一般に、PTH は骨吸収を促進し、甲状腺の傍濾胞細胞から分泌されるカルシトニン は骨吸収を抑制する。この過程は、特に加齢による影響を大きく受け、カルシトニンの分泌が加齢性低下により、骨吸収が進行する。また、女性ホルモンであるエストロゲンは、骨形成を促進するため、女性において閉経により減少すると、骨量が減少する。これらの結果、高齢者では、血中カルシウム濃度が減少し、骨からのカルシウム補給が持続的に行われて、骨粗鬆症に至る<sup>9,10)</sup>。カルシウム代謝は食習慣によっても影響を受け、食事からのカルシウム摂取が過剰な場合は骨にハイドロキシアパタイトとしての形で蓄積し、その過程で血中のカルシウムとリンが消費される。一方、カルシウム摂取が過少な場合は、骨からの溶出により、血中のカルシウムとリンの濃度が増加する。

リンは、カルシウムと相補的な関係にあり、したがって、その代謝がカルシウム代謝と表裏一体を為すため、骨粗鬆症への影響も大きい。しかしながら、リンの生理学的機能や調節機能については、未だ十分に解明されていると言えない。ヒトは、概略で 1200 mg/日のリンを摂取し、この内の 950 mg が吸収され、その 29%が骨に貯蔵され、血中に 1%未満が存在する。吸収されたリンの 70%は、細胞内において、交換可能な状態で存在する。リンは、便中に 150 mg/日、尿中に 800 mg/日が排泄される<sup>11)</sup>。血中のリン濃度は、PTH と骨から放出される線維芽細胞増殖因子 23 (FGF23) の 2 種類のリン利尿因子により調節されている<sup>12, 13)</sup>。PTH は、腎臓に発現する副甲状腺ホルモン受容体 (PTHr1) に作用してリントランスポーター量を低下させ、リン利尿を促進する<sup>13)</sup>。一方、FGF23 は、腎臓において klotho および FGF 受容体 1 (FGFR 1) と結合してリン排泄を促すと共に、腎臓におけるカルシトリオール合成を抑制してその血中濃度を低下させ、腸管におけるリン吸収の抑制を引き起こす<sup>12)</sup>。腎機能が正常の場合には、高リン負荷に応答して副甲状腺および骨のリン利尿因子 (PTH・FGF23) が作用することで、過剰なリンを体外に排泄している。

本研究では、第 1 章として示すように、食事に含まれるリンとカルシウム濃度に注目し、慢性腎障害 (CKD) モデルを用いて、食事時のカルシウム濃度を一定にした条件下でのリン濃度の変動が骨粗鬆症に及ぼす影響について検討した。

現在の骨粗鬆症治療においては、閉経後骨粗鬆症治療薬として、作用機序の異なる複数の薬が存在している。医療現場においては第一選択薬としてビスホスホネート系の骨吸収抑制薬が用いられることが多い<sup>14)</sup>。このビスホスホネートや、抗receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) 抗体薬、選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM) などの骨吸収抑制薬は、破骨細胞の数を減少させ、その活動も抑制することにより、骨代謝回転を低下させて骨吸収を抑制することで、骨粗鬆症の悪化を抑制している。しかしこれらの薬物には骨形成促進作用がないため、投与により当面は単位体積当たりの骨量を示す骨密度 (BMD) が増加して骨折が減少するものの、骨の正常な新陳代謝は阻害される<sup>15, 16)</sup>。それは、骨吸収抑制薬を長期間継続服薬することにより、残った骨が古い骨で占められることとなって骨質の劣化が起こり、骨折しやすい状態 (大理石病) になることに基づくと考えられている<sup>17-19)</sup>。以上のことから、吸収抑制薬が骨折リスクの増大を是正することは明らかであるものの、その効果はあくまでも骨強度低下の進行により増大する骨折リスクを部分的に抑制しているにすぎず、長期投与によりむしろ骨節リスクを増大させるおそれがある。このことから、近年、アメリカ合衆国憲法医薬食品局 (FDA) の諮問委員会から骨粗鬆症による骨折防止のためのビスホスホネートの使用期間は 5 年に制限されなければならないなどの提言があり<sup>20)</sup>、同様の考えはアメリカ合衆国臨床内分泌学会議 (AACE) のガイドラインでも提唱されている<sup>21)</sup>。

一方、ヒト PTH の 1~34 番目のアミノ酸に相当する遺伝子組換えペプチドであるテリパラチドは、古い骨を新しい骨に作り替える薬理作用によって骨粗鬆症を治療するという画期



的なもので、骨折が危惧されるハイリスクの骨粗鬆症患者を対象とした新生骨促進薬である。現在医療現場で使用されているテリパラチド製剤には、20  $\mu\text{g}$ 連日投与製剤としてイーライリリー株式会社から「フォルテオ」、フォルテオのバイオシミラー製剤として持田製薬株式会社から「テリパラチドBS モチダ」が販売され、56.5  $\mu\text{g}$ 週1回投与製剤として旭化成ファーマ株式会社から「テリボン」が販売している。「フォルテオ」および「テリボン」については、ラットを用いたテリパラチドのがん原性試験の連日投与群において過剰な骨形成によると推察される骨肉腫の発生が検出されたこと<sup>22-24)</sup>から、いずれも投与期間に制限が設定されている（「モチダ」はバイオシミラー製剤の為、がん原性試験は未実施だが、同様に投与期間が設定されている）。しかし現実には、当初テリパラチドの連日投与製剤の使用患者で骨肉腫の発生に関連性を示唆する報告<sup>25)</sup>があったものの、実際に骨肉腫を発生した患者にテリパラチドを使用した患者が含まれていなかったという報告もされている<sup>26)</sup>。さらに、ヒトにおいてテリパラチドが骨肉腫を誘発するという科学的報告あるいはメカニズムを示す報告もない。一方、前述のラットを用いたがん原性試験の週1回投与群では、低用量群で骨肉腫の発生がなかった<sup>22)</sup>。これらのことから、テリパラチドの発がん性には種差があり、また、ラットにおける骨肉腫の発生にはテリパラチドの投与頻度が関与している可能性が示唆され、仮にラットに対する発がん性がヒトに外挿できると仮定したとしても、ヒトにおける発がんリスクの有無・強弱の決定要因として投与頻度・用量が関与すると想定できる。また、近年実施された、マウスを用いてテリパラチドの投与頻度の違いによる生体影響の差について検討を行った研究では、高投与頻度ではミニモデリング（破骨細胞の骨吸収に依存せず、休止期骨芽細胞が活性化し活性型骨芽細胞となって、既存骨の上に新しい骨を添加してゆく現象）が優位であったのに対し、低投与頻度ではリモデリング（破骨細胞の骨吸収後に活性型骨芽細胞により新しい骨を作る現象）が観察された<sup>27)</sup>。これは、「高投与頻度では高代謝回転型（高代謝回転型リモデリング）の骨形成促進作用（破骨細胞の骨吸収に依存せず、休止期骨芽細胞が活性化し活性型骨芽細胞となって、既存骨の上に新しい骨を添加してゆく現象）が優位であったのに対し、低投与頻度では正常骨代謝型（定常型リモデリング）の骨形成促進作用（破骨細胞の骨吸収後に活性型骨芽細胞により新しい骨を作る現象）が観察された<sup>27)</sup>。またヒトでは、骨粗鬆症患者において、フォルテオの連日投与やテリボンの週1回投与の骨代謝バイオマーカー（オステオカルシン、NTX、PINP等）の変動について、検討が行われている<sup>28, 29)</sup>。

本研究では、第2章として示すように、ラットを用いて、テリパラチドの投与頻度による骨形成作用の違いと、その骨粗鬆症治療における意義について検討した。

# 第1章 食事中のカルシウム・リンバランスが 骨粗鬆症に及ぼす影響

## 1.1. 序論

CKD では、腎機能の低下に伴って尿量が著しく減少し、水分や老廃物を排泄することが出来なくなることに基づき、様々な障害が誘発される。主な障害の一つとしては、リンの排泄障害に伴う高リン血症がある。CKD 患者は透析治療により水分や不純物を体外に排出しているが、リンに関しては1回の透析での除去量に限界があるため十分排泄されず、しばしば血中のリン濃度が上昇する。この現象は、主として、食事により透析除去可能量を超えた大量のリンを摂取することで発生する。この状況を放置すると体内にリンが蓄積することで高リン血症が誘発され、異所性石灰化や骨粗鬆症を誘発することが知られている<sup>30)</sup>。CKD に起因するこのような病態は、さらに血管石灰化を介して死亡リスクの増大に関与していることが示され、国際腎臓病診療ガイドライン機構 (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) により、「慢性腎臓病に伴う骨ミネラル代謝異常 (CKD-mineral and bone disorder (CKD-MBD))」という全身性疾患概念が創出されている<sup>31)</sup>。CKD、特にそのステージが進んだ状態では、血中の PTH およびリンの濃度が増加し、活性型ビタミン D 濃度の低下に加えて高リン血症により PTH 合成・分泌が促進され、二次性副甲状腺機能亢進症が引き起こされる<sup>32)</sup>。FGF23 は、副甲状腺に作用して PTH の合成・分泌を抑制する<sup>33, 34)</sup> 作用を有するが、CKD が進行すると、副甲状腺において klotho および FGFR1 の発現低下により FGF23 の抑制作用への抵抗性が誘導される<sup>35)</sup>。さらに、CKD の進行に伴って骨からカルシウムが放出され、血管等の軟組織にカルシウムとリンの貯蔵場所が形成され、異所性石灰化を引き起こす<sup>36)</sup>。このように、CKD では、血中の PTH・カルシウム・リンの濃度の異常により、骨代謝異常が引き起こされる。

以上より、CKD においては、カルシウム・リン代謝が病態の深刻さと予後、また、患者の生活の質 (QOL) を規定する要因として、重要な役割を果たす。食事中のカルシウムとリンそれぞれの量や両者のバランスは、このカルシウム・リン代謝に大きく影響するため、CKD にも多大な影響を及ぼすと考えられる。しかしながら現在のところ、その点に関する情報は限定的であり、その原因のひとつは適切な動物モデルが少ないことである。そこで本研究は、ヒト病態に近似する、高リン血症を伴う CKD モデルをラットで確立すべく、腎動脈を部分結紮するモデルを用いた検討を行った。この腎動脈一部結紮手術 (RL) では、左右の腎臓それぞれについて、4 本ある腎動脈のうち 1 本を残して 3 本を結紮した。本処置を施したラットでは、機能糸球体数を物理的に減少して腎臓に負荷がかかり、全身の血圧と共に糸球体内血圧が上昇し、基底膜の障害に基づく蛋白の漏出などから始まる腎障害を誘発し、やがて間質の線維化を伴う CKD に移行する。本研究では、このモデルを用いて、食事中カルシウムとリ

ンのバランスの変化が骨粗鬆症に及ぼす影響について解析した。

## 1.2. 実験材料および方法

### 1.2.1. 使用動物

動物は、雄性 Slc:SD ラットを日本エスエルシー株式会社より入手し、ステンレス製網蓋付きポリカーボネート製ケージ (W 25×D 40×H 18 cm) を用いて個別に収容し、温度 21.0～25.0° C・湿度 40.0～70.0%・照明時間 12 時間/日の飼育室にて飼育し、上水道水を 7 週間自由に摂取させた。

本試験は、「動物の愛護および管理に関する法律」および「旭化成メディカル株式会社動物実験指針」を遵守し、試験施設の動物実験審査委員会による審査を受けた試験計画書に従って実施された。

### 1.2.2. 飼料

飼料は、PMI Nutrition International 社製の固形飼料を 7 週間自由摂取させた。各飼料は、カルシウム濃度に対するリン濃度の割合で表記し、1/2 forage : (5WJX (Ca 0.61%, P 0.30%) ), 1 forage : (5755 Basal (Ca 0.61%, P 0.57%) ), 2 forage : (5WJY (Ca 0.61%, P 1.20%) ), 4: (5WJZ (Ca 0.61%, P 2.40%) ) とした。なお、対照群の飼料としては、1/2 forage を用いた。

### 1.2.3. 実験デザイン

動物は、10 週齢のラットを合計 30 匹購入した。そのうち、20 匹は RL を施し、残る 10 匹は無処置のまま、実験に用いた。RL では、8 週齢時に左の腎臓について 4 本の腎動脈のうち 1 本を残して 3 本を結紮した後に腹腔に戻した。続いて 9 週齢時に、右側の腎臓も同様に処置した。

実験は、Table 1 に示す各群 5 匹の 6 群に分けて実施した。実験期間は 48 日間で、実験終了時に動物を屠殺・解剖した。

Table 1. Feed content (calcium and phosphorus) and group structure

Group	RL	Diet food condition			Number of animals
		Calcium (%)	Phosphorus (%)	Ca/P ratio	
Control	n. d.	0.61	0.30	1/2	5
N-2.4	n. d.	0.61	2.40	4	5
RL-0.3	Treated	0.61	0.30	1/2	5
RL-0.6	Treated	0.61	0.57	1	5
RL-1.2	Treated	0.61	1.20	2	5
RL-2.4	Treated	0.61	2.40	4	5

n. d. : not done.

### 1.3. 検査項目1.3.1. 体重・摂餌量・尿量・飲水量

入荷日から剖検日までの間に週に1回測定した。

### 1.3.2. 尿検査

尿検査は、血液生化学検査と同じ時に、代謝ケージにて前日からの24時間蓄尿を採取し、尿量を測定し、多機能型小型自動分析装置ビオリス24 i プレミアム（東京貿易メディシス株式会社）を用いてクレアチニン・尿素窒素・無機リン・カルシウム・尿中マイクロアルブミン・N-アセチルグルコニダーゼを測定した。

### 1.3.3. 血液学的検査

剖検時に腹部大動脈から採取した血液を用い、多項目自動血球分析装置 XT-2000iV（シスメックス株式会社）を用いて赤血球数・白血球数・血小板数・ヘモグロビン濃度・ヘマトクリット値・平均赤血球容積(MCV)・平均ヘモグロビン量(MCH)・平均ヘモグロビン濃度(MCHC)を測定した。

### 1.3.4. 血液生化学的検査

試験開始前日および試験開始後7, 14, 21, 28, 35, 42, 49日目に静脈から採取した血液と、剖検時に腹部大動脈から採取した血液から調整した血漿を用い、多機能型小型自動分析装置ビオリス24 i プレミアム（東京貿易メディシス株式会社）を用いて、クレアチニン・尿素窒素・電解質（ナトリウム・カリウム・塩素・無機リン・カルシウム・マグネシウム）を測定した。また、アスパラギン酸およびアラニンアミノトランスフェラーゼ・アルカリフォスファターゼ（ALP）・ $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ・アミラーゼ・総コレステロール・トリアシルグリセロール・グルコース・遊離脂肪酸・クレアチニンキナーゼ・総蛋白・アルブミン（ALB）・ビリルビン・電解質（マグネシウム）は、解剖時のサンプルを用いて測定した。

PTHおよびFGF23は、解剖時のサンプルを用いてELISA法により測定した。

### 1.3.5. 臓器重量・病理組織学的検査

剖検時に、肝臓・腎臓・副腎・胃・十二指腸・空腸・回腸・結腸・直腸・盲腸・食道・膵臓・脾臓・心臓・肺・気管・胸大動脈・精巣・精巣上部・前立腺・膀胱・胸腺・腸間膜リンパ節・甲状腺・副甲状腺・大腿骨・大腿部筋肉・脳（小脳・大脳）・下垂体を採取・秤量し、10 vol%中性緩衝ホルマリン液を使用して固定し、常法に従ってヘマトキシリン・エオジン（HE）染色標本作製し、すべての標本について鏡検した。

## 1.4. 統計

すべての統計分析は、BellCurve for Excel Ver3.20（社会情報サービス社）を用いて実施した。

## 1.5. 結果

### 1.5.1 体重・摂餌量・尿量・飲水量

体重は、RLを行ったすべての群で、試験開始前及び開始時点において対照群と比べて低値を示した。RL-2.4%群においては、その後も減少してDay 28に動物福祉上の安楽殺対象レベルであるDay 0の80%以下)に達したため、安楽殺した上で解剖を行った。また、N-2.4%群では、有意差がつかないものの、低値傾向を示した。その他の群においては、変化が認められなかった(Fig. 1A)。

尿量は、N-2.4%・RL-1.2%・RL-2.4%群において、対照群と比べて実験期間中ほぼ高値を示し、(Fig. 1B)。

飲水量は尿量と同様の推移を示し、摂餌量には変化が認められなかった。

### 1.5.2. 尿検査

尿中リン濃度は、N-2.4%・RL-1.2%・RL-2.4%群で、7日目から切迫解剖または計画解剖前まで高値を示し、特にN-2.4%・RL-2.4%群で顕著であった(Fig. 2A)。尿中カルシウム濃度は、RL-0.3%群で最終測定時に高値が見られ、N-2.4%・RL-1.2%・RL-2.4%群で21日目以降に有意差がつかないものの低値傾向を示した(Fig. 2B)。尿中アルブミンは、RL-1.2%・RL-2.4%群で高値を示し、対照群・N-2.4%群を除くその他の群で高値傾向を示した。尿中尿素窒素は、N-2.4%群で7・14日目に、RL-2.4%群で7日目に、それぞれ高値を示した(Fig. 2C)。クレアチニンは、RLを行ったすべての群で試験開始時に低値を示した(Fig. 2D)。それ以外の項目については、変化が認められなかった。

### 1.5.3. 血液検査

赤血球数・ヘモグロビン濃度・ヘマトクリット値は、RL-2.4%群で低値を示し、有意差がつかないもののN-2.4%群で低値傾向がみられた。白血球数は、RL-2.4%群で高値を示した。その他の群や検査項目においては、変化が認められなかった。

### 1.5.4. 血液化学検査

血中リン濃度は、RL-2.4%群で7日目から切迫解剖まで顕著に高値を示し、N-2.4%・RL-1.2%群で高値が散見された(Fig. 3A)。血中カルシウム濃度は、RL-2.4%群で低値を示し、N-2.4R群で有意差がつかないものの低値傾向が見られた(Fig. 3B)。BUNは、RLを行った群で投与開始時高値を示し、N-2.4%・RL-0.3%・RL-2.4%群で高値が散見された(Fig. 3C)。クレアチニンも、RLを行った群で投与開始時高値を示し、N-2.4%群でその後も高値を示した(Fig. 3D)。

ALPは、RL-2.4%群で高値傾向を示した(Fig. 4A)。その他の群や検査項目においては、変化が認められなかった。FGF-23は、RL-2.4%群において高値を示した(Fig. 4B)。PTHも、同様にRL-2.4%群で高値を示した。また、N-2.4%・RL-1.2%群では、有意差がつかないもののFGF-23およびPTHが高値傾向を示した(Fig. 4C)。

### 1.5.5. 臓器重量、病理組織学的検査

臓器重量では、腎臓の絶対重量がN-2.4%・RL-2.4%群において増加し、相対重量がRL-

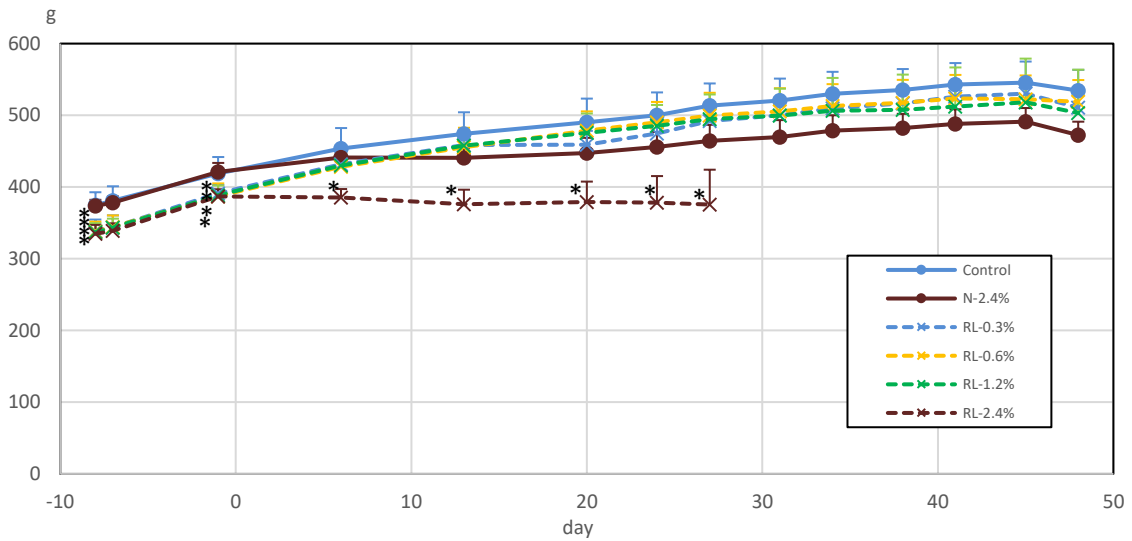
2.4%群において増加した。その他の群や臓器においては、変化が認められなかった。

腎の病理組織学検査では、RLを行った群で、拘束部位が委縮して結合組織により置換され、炎症細胞浸潤と残存ネフロンの変性壊死と共に石灰化が観察された。本病変は、結紮による梗塞巣と診断した。結紮領域と正常組織との境界は明瞭で、境界部位では間質の炎症細胞浸潤・尿円柱・尿細管腔の拡張・ボウマン嚢や尿細管基底膜の線維性肥厚・尿細管上皮細胞の変性再生像が観察された。さらにリンを負荷したRL-2.4%群では、RL-0.3%群に比べて腎臓が腫大し、尿細管腔の拡張・尿円柱が観察された(Fig. 5A)。また、腎臓全体にわたり間質の炎症性細胞浸潤・線維芽細胞の高度な増生・石灰化・基底膜の肥厚を伴う上皮細胞の変性/再生等が観察された(Fig. 5B)。また糸球体では、輸入細動脈腔/糸球体毛細血管の拡張・タコ足細胞の腫大・ボウマン嚢の上皮細胞増生・ボウマン壁の肥厚・糸球体とボウマン壁の癒着・メサンジウム細胞の腫大等が観察された(Fig. 5C)。これらの変化は、RL-1.2%群で軽度で観察されたが、RL-0.3%・RL-0.6%群で観察されなかった。N-2.4%群においては、楔状に好塩基性を示し尿細管腔の拡張がみられ、RL-2.4%群とほぼ同様の変化が観察されたが、糸球体の輸入細動脈腔/糸球体毛細血管の拡張が観察されなかった(Fig. 5D)。

腎以外の臓器において、RL-2.4%群では、副甲状腺が対照群と比べて低倍像でも顕著に腫大し、高倍像で副甲状腺実質細胞の核が明るく、クロマチンが角膜に偏在して大きく、細胞質に顆粒状の胞体が顕著となっていた(Fig. 6A, B)。大腿骨遠位端の成長版直下においては、淡明化がみられ、骨梁領域が顕著に肥厚し、造血細胞領域が狭小化していた(Fig. 7A)。高倍像では、対照群と比べて間葉系の細胞が顕著に増殖していた。骨梁においては、骨芽細胞の顕著な増生および破骨細胞の数も多く観察された(Fig. 7B)。また、活性化した骨芽細胞が一行に並び、既存骨との間に類骨領域が顕著に増加していた(Fig. 7C)。さらに、全身の血管・胃腺部・心筋細胞等に石灰化が観察された。

その他の群においては、特筆すべき病理組織学的変化が観察されなかった。

A



B

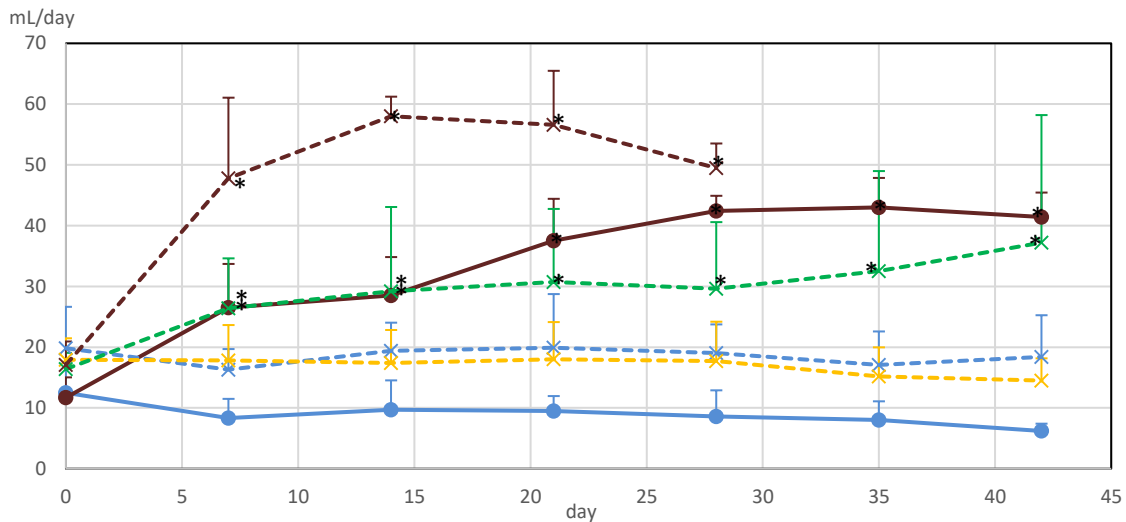


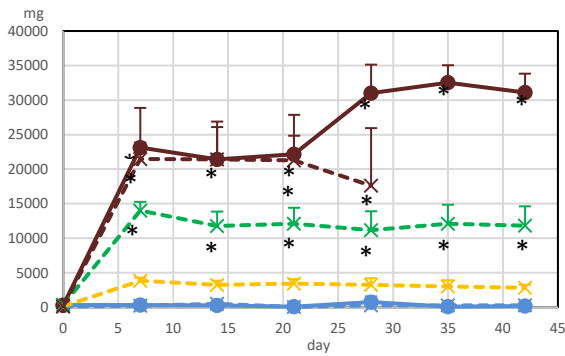
Fig. 1. Body weight change and urinary volume changes of rat chronic kidney disease (CKD) model

(A) Body weights were slightly lower in all of the partial ligation groups compared to the control group, both before and at the start of the study (baseline). The body weight in the RL-2.4% group continued to decline during the study, reaching levels warranting euthanasia on Day 28 from the perspective of animal ethics (i.e. a body weight of 80% of or lower than that on Day 0); these animals were therefore euthanized before scheduled necropsy. Body weight tended to be low in the N-2.4% group as a result of decreased body weight gain, although the change was not significant. No changes were observed in any of the other groups. (B) Urinary volume were compared to the control group, the N-2.4%, RL1.2%, and RL2.4% groups showed high levels of urine output

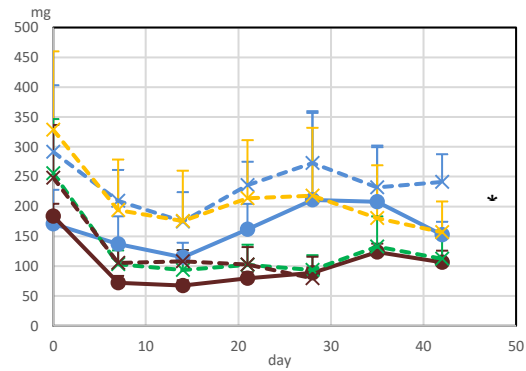
nearly consistently throughout the duration of the study. Symbols indicate mean  $\pm$  SD. \*:Significantly different from the control value.



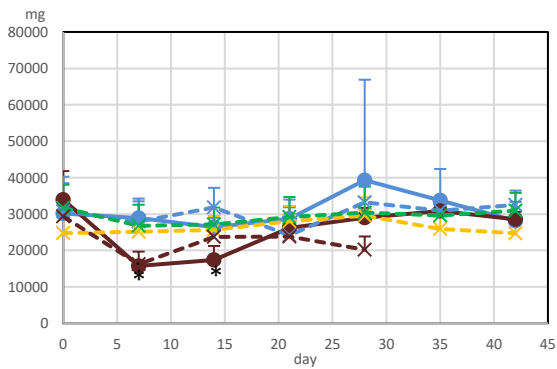
A



B



C



D

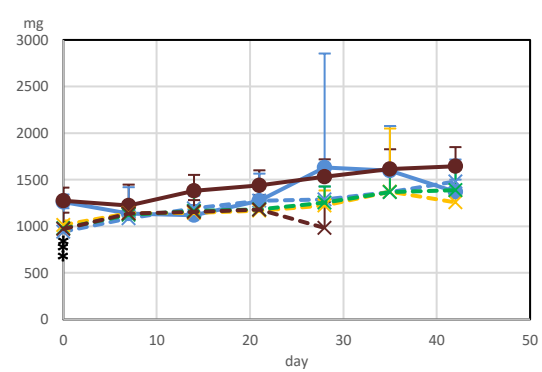


Fig. 2. Urinalysis changes of rat chronic kidney disease (CKD) model

The levels of phosphorus in the urine were high from Day 7 until before the animals' emergency or scheduled necropsy in the N-2.4%, RL-1.2%, and RL-2.4% groups, particularly in the N-2.4% and RL-2.4% groups (A). The levels of calcium in the urine were high in the final measurement of the RL-0.3% group, while the levels tended to be low in the N-2.4%, RL-1.2%, and RL-2.4% groups on and after Day 21, although the changes were not significant (B). The urine albumin levels were high in the RL-1.2% and RL-2.4% groups, and tended to be high in all the other groups except for the control and N-2.4% groups. The urinary urea nitrogen levels were high in the N-2.4% group on Days 7 and 14, and in the RL-2.4% group on Day 7 (C). The creatinine levels were smaller at baseline in all of the groups of animals that had undergone partial renal artery ligation (D). No changes were observed in any of the other test items. Symbols indicate mean  $\pm$  SD. \*:Significantly different from the control value.

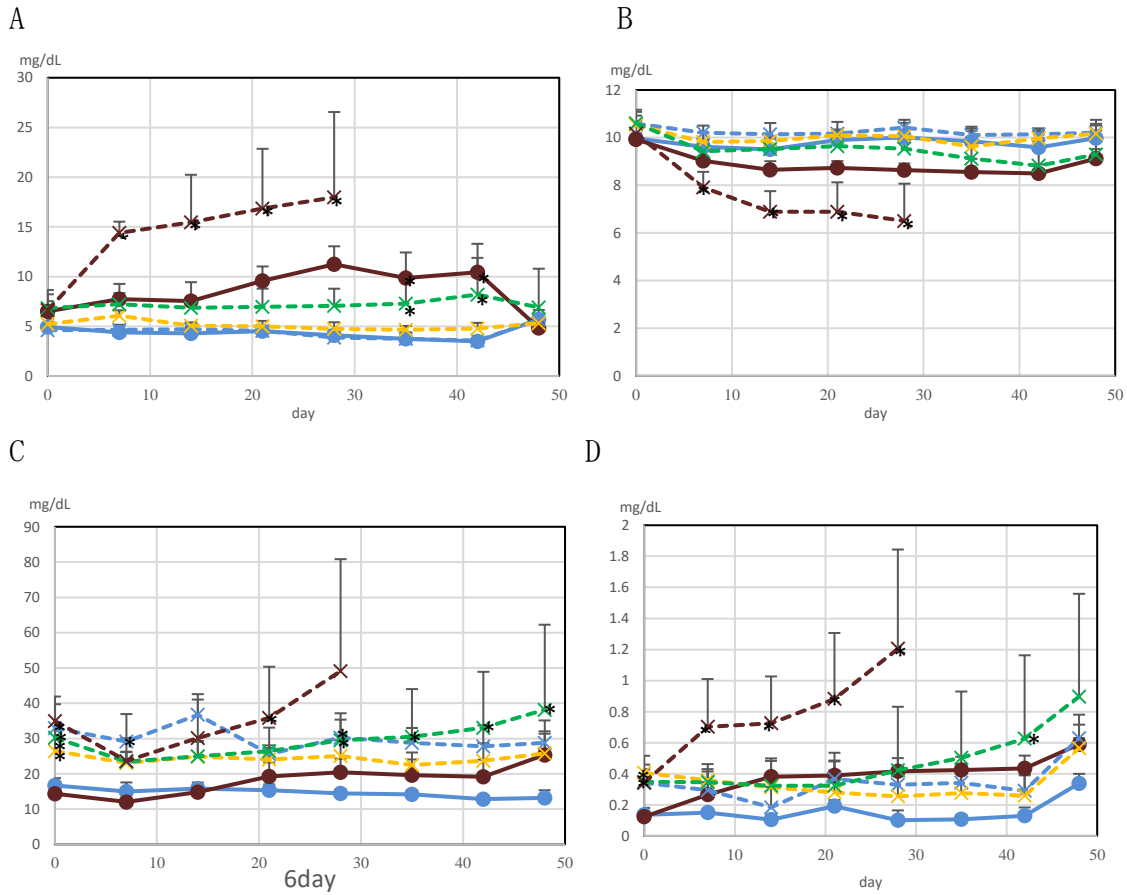
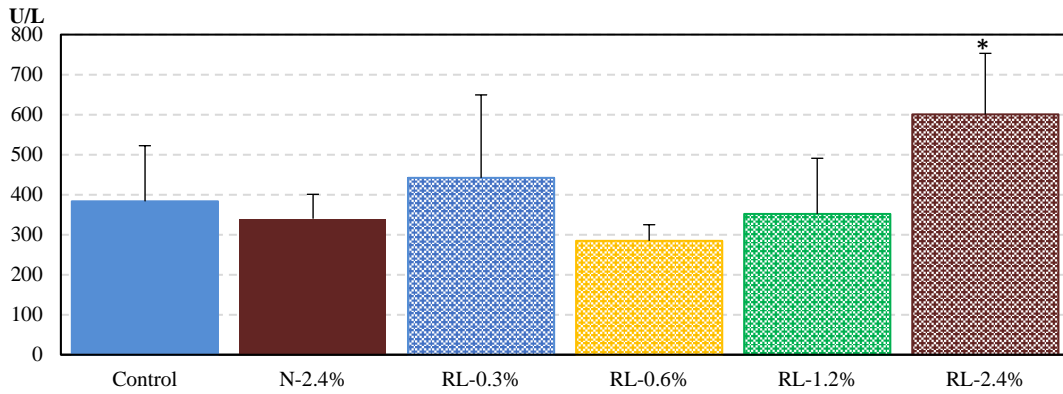


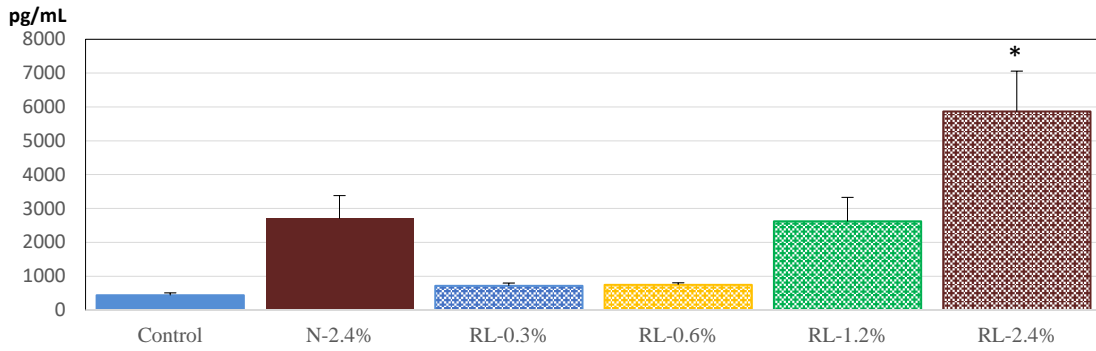
Fig. 3. Phosphorus, calcium, blood urea nitrogen, creatinine changes of rat chronic kidney disease (CKD) model

The levels of phosphorus in the blood were markedly high in the RL-2.4% group from Day 7 through emergency necropsy, with the N-2.4% and RL-1.2% groups showing occasionally high levels (A). The levels of calcium in the blood were low in the RL-2.4% group, and tended to be low in N-2.4% group, although the difference was not significant (B). The blood urea nitrogen (BUN) levels were high at the start of the feeding study in the groups of animals that had undergone partial ligation of the renal artery, with the N-2.4%, L-0.3%, and RL-2.4% groups showing occasionally high levels (C). The creatinine levels were also high at the start of the feeding in the groups of animals that had undergone partial ligation of the renal artery, with the N-2.4% group continuing to show high levels thereafter (D). Symbols indicate mean  $\pm$  SD. \*:Significantly different from the control value.

A



B



C

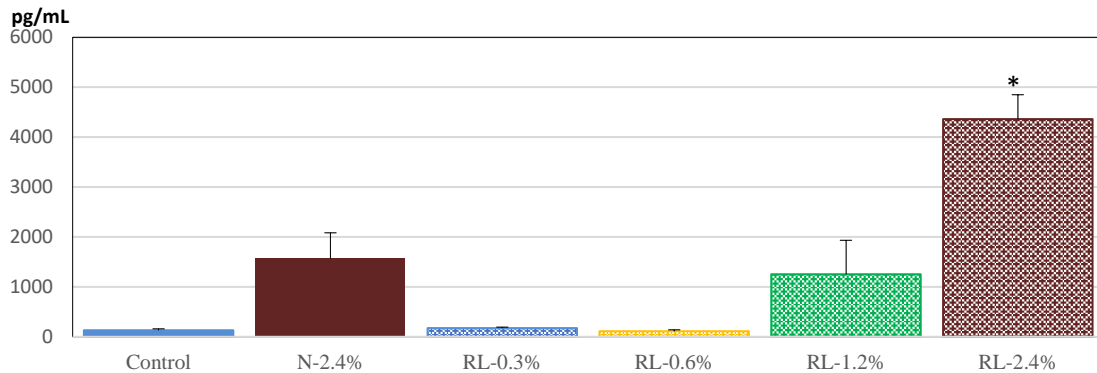


Fig. 4. Alkaline phosphatase, FGF-23, PTH changes of rat chronic kidney disease (CKD) model

The alkaline phosphatase (ALP) levels reported are those at the time of necropsy; the levels tended to be high in RL-2.4% group, although the difference was not significant. No changes were observed in any of the other test items or in the other groups (A). The levels of FGF-23 were high in RL-2.4% group (B). The levels of PTH tended to be high in N-2.4% and RL-1.2% groups, although the differences were not significant (C). Symbols indicate mean  $\pm$  SD. \*:Significantly different from the control value.

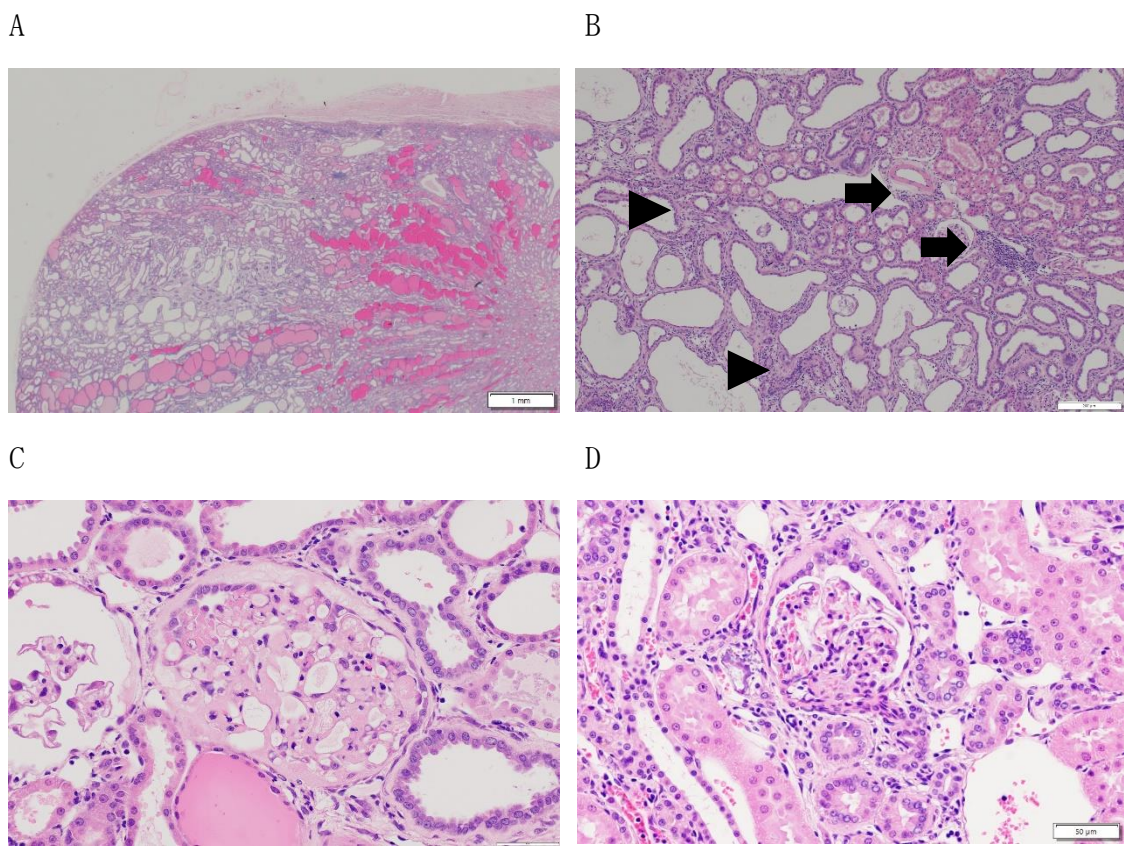


Fig. 5. Histopathological changes of kidney by rat chronic kidney disease (CKD) model

There were clearly defined boundaries between the ligated areas and the normal tissues; in the areas around the boundaries, inflammatory interstitial cell infiltration, urinary casts, expansion of the renal tubular lumen, fibrous thickening of the Bowman's capsule and the renal tubular basement membranes, as well as the degeneration and regeneration of renal tubular epithelial cells, were observed. In the RL-2.4% group whose phosphorus intake had been further increased, the kidneys were enlarged compared to those in the RL-0.3% group, and expansion of the renal tubular lumen and urinary casts were also observed (A, B, C). These changes were almost the same as those observed in the N-2.4% group, although no expansion of the afferent arteriole lumen and glomerular capillaries was observed (D).

A

B

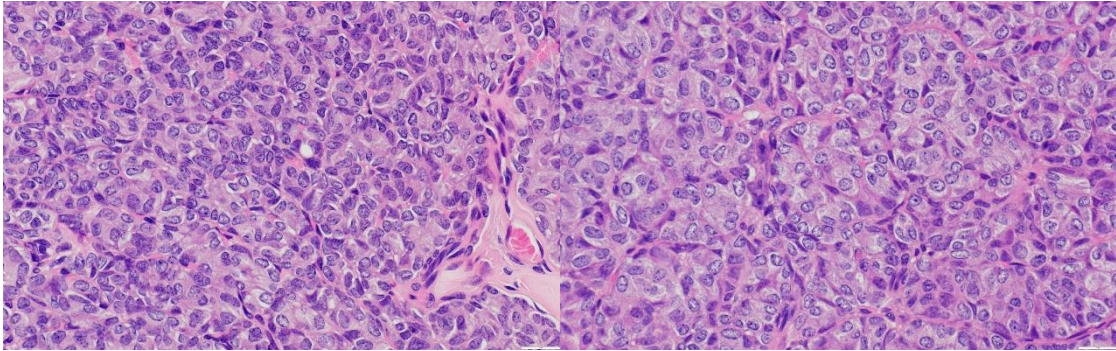
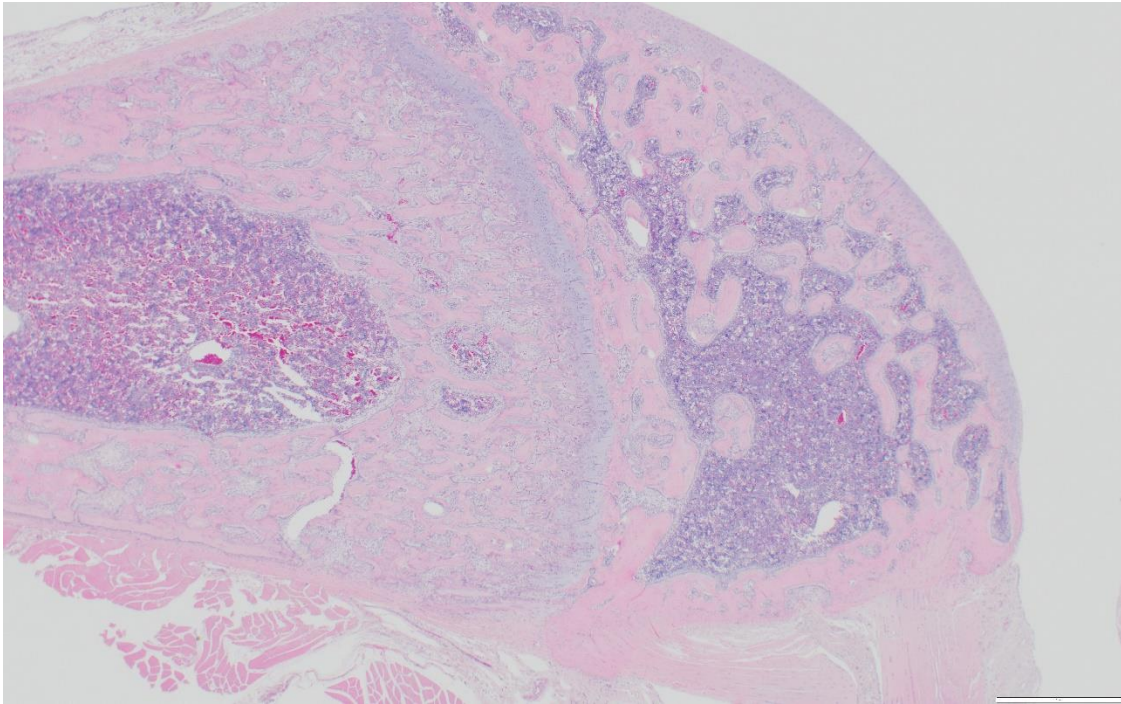


Fig. 6. Histopathological changes of parathyroid by rat chronic kidney disease (CKD) model

In the RL-2.4% group, some of the findings in organs other than kidneys included a marked enlargement of the parathyroid compared to the control group, which was apparent even under low magnification. Under high magnification, the nuclei of the parathyroid parenchymal cells appeared bright, while the chromatin were large and disproportionately concentrated in the cornea, and the granular cell bodies were prominent in the cytoplasm (A, B)

A



B

C

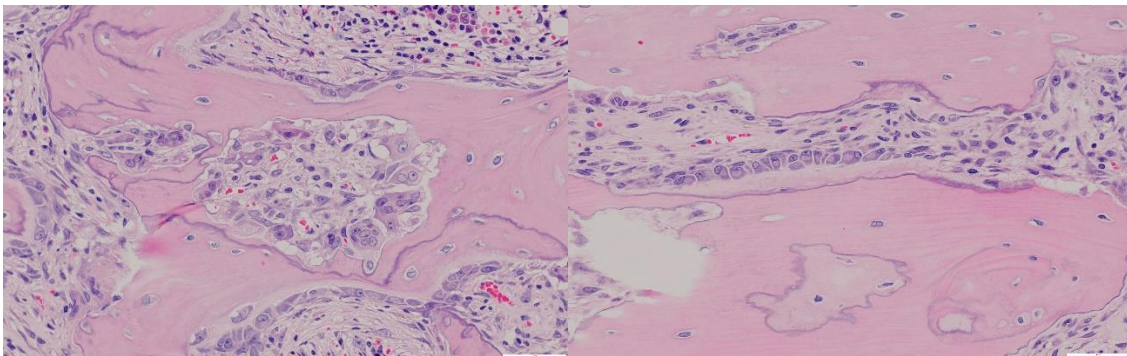


Fig. 7. Histopathological changes of bone by rat chronic kidney disease (CKD) model

The area directly below the growth plate at the distal end of the femur appeared to be clearer, with the trabecular bone area being markedly thicker and the hematopoietic cell area narrower (A). Under a high magnification, a marked proliferation of mesenchymal cells compared to the control group was observed. In the trabecular bone, a marked growth of osteoblasts was observed, as well as a large number of osteoclasts (B). In addition, activated osteoblasts formed a line, creating a marked increase in the osteoid area between them and the existing bones (C).

## 1.6. 考察

本研究は、RLによるラットCKD病態モデルを確立し、高リン食投与による食事中カルシウムとリンのバランスの変化が骨粗鬆症に及ぼす影響について解析した。

その結果、無処置ラットの食事中リン濃度を通常の4倍量にしたN-2.4%群では、体重減少傾向・貧血傾向・尿および血漿中のリンの高濃度とカルシウムの低濃度・血中のFGF23およびPTHの高濃度傾向・腎臓重量の増加がみられ、病理組織学的に尿円柱や糸球体の病変等ネフロン単位での腎障害が検出された。したがって、食事中の高リン濃度によるカルシウムとリンのアンバランスは、CKD様病態を誘発することが判明した。リンの腎臓に対する影響は以前から指摘されていた<sup>36-40)</sup>が、食事中のカルシウムとリンのバランスに着目した報告は限られている。我々は、予備的研究において、卵巣摘出ラットの食事中カルシウム濃度をリン濃度の1/2から5倍まで変動させて10週間投与した実験を行ったが、CKDまたは骨粗鬆症を示す病態が観察されなかった。このことは、恒常性が破綻してCKD様病態に至り、さらに骨粗鬆症様病態を誘導するには、食事中のリン濃度を相当程度高め、著しいカルシウムとリンのアンバランス状態を現出する必要があることを示したものである。

一方、RLを施したラットでは、食事中リン濃度を通常の4倍量にしたRL-2.4%群において一般状態を良好に保つことができず、28日目に著しい体重増加抑制がみられたため安楽殺を行わざるを得ない状況に陥った。これらの動物では、血中のFGF23およびPTHの高濃度に加え、尿・血漿マーカーの高レベルや、病理組織学的に検出される副甲状腺の腫大・活性化が誘導され、腎臓間質の線維化や尿細管の石灰化に至る変化に代表されるCKD病態の程度がN-2.4%群に比べて著しく悪化していた。したがって、RLは、ラットの腎機能を低下させ、糸球体において高血圧状態により誘発される障害や尿細管に対する変性・再生像を発生させ、腎に強いストレスをかけていることが明確である。このことが食事中カルシウムとリンのアンバランスによるCKD様病態を早期に誘導し促進したと考えられる。

RL-2.4%群では、腎のみならず、骨にも異常が発生し、骨芽細胞や破骨細胞の増生、血中ALP濃度の高値など骨代謝の亢進に基づき骨粗鬆症様の病態が誘導された。さらに、全身の血管などに石灰化病変が観察されたことから、この背景には、副甲状腺機能亢進が関与することから腎性骨異栄養症に近い病態が誘発されたことが判明した。

以上より、RLと食事中のリン高濃度によるカルシウムとリンのアンバランスを組み合わせた本研究の実験条件は、比較的短期間にCKDを伴う骨粗鬆症様病変を誘発する動物モデルとして有効に機能するものであり、その病態や背景分子機構の解明に資するものであることが判明した。本研究の成果は、ヒトの食事中のリンの過剰摂取によるカルシウムとリンのアンバランスがCKDおよび骨粗鬆症のリスクとなり得ることを示唆する新しい知見である。この成果は、CKD-MBDの機構解明と制御方策の策定に貢献でき、また、早期腎障害患者において食事によるリンとカルシウムの管理を行うことで慢性腎不全への移行を遅らせ、新規透析患者数を減らすことにも貢献できるものである。

## 第2章 既存骨粗鬆症治療薬による 新たな骨粗鬆症治療方策

### 2.1. 序論

骨粗鬆症の治療において第一選択薬として用いられている骨吸収抑制薬は、破骨細胞を量的・質的に抑制し、骨代謝回転を低下させ、骨吸収を抑制することを作用機序とするが、骨形成に影響しないため骨の正常な新陳代謝が阻害され<sup>15, 16)</sup>、長期連用により骨質が劣化してむしろ易骨折状態に陥るおそれがある<sup>17-19)</sup>。すなわち、骨吸収抑制薬は、骨粗鬆症における骨強度低下の進行により増大する骨折リスクを部分的かつ一時的に抑制しているにすぎず、治療期間の増加に伴って逆に骨折リスクが増大するのである。

比較的最近実用化されたテリパラチドは、骨粗鬆症によって劣化した骨を新しい骨に作り替える新生骨促進作用というコンセプトの下に開発されたもので、骨吸収抑制薬と異なり、骨折が危惧されるハイリスクの骨粗鬆症患者にも使用できる。したがって、テリパラチドは、骨粗鬆症治療薬として有望であると考えられている。しかしながら、テリパラチドについては、非臨床安全性評価の際に実施されたラットがん原性試験において、連日投与により骨肉腫が誘発された<sup>22-24)</sup>。この発がん性は過剰な骨形成によると推察されているが、そうは言っても安全性に一定の懸念があるおそれがあるため、テリパラチドのヒト臨床投与期間には制限が設定されるに至った。それゆえ、せっかくの有望な治療薬を自由に使用することができず、骨粗鬆症患者、特に高リスクな人々にとっての不利益が生じている。ただ、このテリパラチドによる発がん性がヒトにおいて発現した、またはそれを示唆する所見があったとの報告は、今に至るもまったく存在しない。一方、前述のラットがん原性試験においても週1回投与であれば無発がん量が存在する<sup>22)</sup>ことから、齧歯類におけるテリパラチドの発がん性には、投与頻度による差異が存在し、適切な投与頻度と用量であれば回避できる可能性が示唆された。実際、テリパラチドによるマウスや骨粗鬆症患者における骨代謝バイオマーカーの変動には、投与頻度の違いによる差異があることを示唆する予備的知見がある<sup>27-29)</sup>。これらの事実・考察からは、仮にラットに対する発がん性がヒトに外挿できると仮定したとしても、テリパラチドの投与頻度・用量は、ヒトにおける発がんリスクの有無・強弱を決定する重要な要因であることが予想される。

以上より、テリパラチドは、その投与頻度・用量を工夫することによって長期間の使用が可能となり、結果として骨粗鬆症患者に現在に優る有用性を提供できる可能性がある。そのことを明らかにするためには、様々な手法でのデータの蓄積が求められている。そこで本研究は、ラットを用いて、現在のヒト臨床現場で用いられている2つの投与頻度である週1回と連日投与の条件下で、骨代謝バイオマーカー等の変動について比較検討し、それらによる骨形成作用の違いと、その骨粗鬆症治療における意義について解析した。



## 2.2. 実験材料および方法

### 2.2.1. 使用動物

動物は、雄性 Cr1:CD(SD) ラットを日本チャールス・リバー株式会社（厚木飼育センター）より入手し、ステンレス製ワイヤーケージを用いて個別に収容し、温度 21.0～25.0° C・湿度 40.0～70.0%・照明時間 12 時間/日の飼育室にて飼育し、ラット用固形飼料（CRF-1、オリエンタル酵母工業株式会社、東京都）および上水道水を自由に摂取させた。

本試験は、「動物の愛護および管理に関する法律」および「株式会社イナリサーチ動物実験指針」を遵守し、試験施設の動物実験審査委員会（IACUC）による審査を受けた試験計画書に従って AAALAC 認証施設である株式会社イナリサーチで実施された。

### 2.2.2. 被験物質

化学的に合成されたテリパラチド酢酸塩（TERIBONE™ Inj. 56.5  $\mu$ g の活性成分）（旭化成ファーマ社、東京、日本）を用いた。凍結乾燥されたテリパラチド酢酸塩は、投与日の朝に 0.9%生理食塩水を用いて指定濃度に調整した

### 2.2.3. 実験デザイン

動物は、10週齢のラットを合計60匹購入して、そのうち30匹を週1回投与、残る30匹を連日投与を行う群とし、いずれの群においても被験物質を投与しない対照群3匹と、低・中・高用量を投与する3群各9匹に分けた。被験物質であるテリパラチド酢酸塩は、週1回投与の場合テリパラチドとして75・100・125.4  $\mu$ g/kg/回、連日投与の場合5・10・13.6  $\mu$ g/kg/day、の用量で3か月間背部皮下に投与した。

Table 1. Agent dosage and group structure

Group	Frequency of administration			
	Weekly		Daily	
	Dosage ( $\mu$ g/kg/回)	Animal number	Dosage ( $\mu$ g/kg/日)	Animal number
Control	0	3	0	3
Low	75	9	5	9
Middle	100	9	10	9
High	125.4	9	13.6	9

各投与量設定根拠としては、がん原性試験の最高投与量としての上限值であるヒト血中濃度の25倍量を目処に設定した。週1回投与では、事前に週1回13週間反復皮下投与によるTK試験を実施し、約25倍の曝露が想定される125.4  $\mu$ g/kg/weekを高用量とし、約20および15倍のヒト曝露が想定される100および75  $\mu$ g/kg/weekをそれぞれ中および低用量とした<sup>9)</sup>。連日投与も同様に13週間皮下投与した際の曝露量から、がん原性試験で骨肉腫が発生する用量である13.6  $\mu$ g/kg/dayを高用量、ヒト臨床での曝露量の約25倍の曝露が想定

される10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を中用量とし、約10倍の曝露が予想される5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を低用量とした。なお対照群には日本薬局方生理食塩液（株式会社大塚製薬工場、徳島県）を同様に投与した。

## 2.3. 検査項目

### 2.3.1. 一般状態

投与開始前1日から剖検日までの間1日2回観察した。

### 2.3.2. 体重

投与開始前1日に測定し、投与開始後は週2回投与前に測定した。

### 2.3.3. Toxicokinetics

最終投与時に投与前と投与後0.25・0.5・1・2・4・6時間に継時的に採血し、被験物質の全身暴露（TK）について Enzyme-Linked Immunosorbent Assay（ELISA）法により、各採血ポイントにおける血漿中テリパラチド酢酸塩濃度を測定し評価した。測定は High Sensitivity Human PTH(1-34) ELISA Kit（Immutopics Inc.、CA、U.S.A.）を用いて吸光度を測定し、テリパラチド測定標準品（旭化成ファーマ株式会社、東京都）で作成した検量線から血漿試料中のテリパラチド酢酸塩濃度を求めた。血漿中テリパラチド酢酸塩濃度は、duplicate で測定した平均値を測定濃度とした。

### 2.3.4. 骨密度計測

マイクロCT（R<sub>m</sub>CT AX, 株式会社リガク、東京都）を用いて、投与開始前日と最終投与終了時に第4～第5腰椎、右大腿骨及び右脛骨のCT像を撮影し、そのCT像から骨密度（BMD, 単位： $\text{mg}/\text{cm}^3$ ）を算出した。

### 2.3.5. 骨代謝バイオマーカー測定

最終投与時に、週1回投与群では投与前日と投与後6・24・72・144時間、連日投与では投与前日と投与後6・24時間、にそれぞれ採血し、ELISA法にて、骨代謝バイオマーカーであるオステカルシン（OC）およびI型コラーゲン架橋N-テロペプチド（NTx）の血清中濃度を測定した。OCはosteocalcin rat ELISA system（GEヘルスケア・ジャパン株式会社、東京都）、NTxはオステオマーク NTx 血清（アリーアメディカル株式会社、東京都）、をそれぞれ用いて吸光度を測定し、標準液から求めた検量線を用いてそれぞれの濃度を算出した。いずれも duplicate で測定した平均値を測定濃度とした。

### 2.3.6. 病理組織学的検査

剖検時に対照群及び高用量群の肝臓・腎臓・脾臓・甲状腺・上皮小体・肺・気管支・上腕骨骨髓を採取・秤量し、10 vol%中性緩衝ホルマリン液を使用し固定し、常法に従ってHE染色標本作製し、すべての標本について鏡検した。

## 2.4. 統計

BMDの投与前値と最終投与終了時値については、各群の平均値及び標準偏差を算出してBartlett法による分散の一樣性の検定(有意水準5%)を行った。分散が一樣であった場合は、Dunnett法によって対照群と各被験物質群との間で平均値の検定を行った。分散が一樣でなかった場合は、データを対数変換して再度Bartlett法による分散の一樣性の検定(有意水準5%)を行い、分散が一樣になれば変換後データを用いてDunnett法によって対照群と各被験物質群との間で平均値の差について検定を行った。この時点でも分散が一樣でなかった場合は、元データを用いて対照群と各被験物質群との平均順位の違いについてSteel検定を行った。

## 2.5. 結果

### 2.5.1. 体重、一般状態観察および病理組織学的検査

体重、一般状態観察および主要臓器の病理組織学的検査においては、特筆すべき変化を認めなかった。

### 2.5.2. Toxicokinetics (Table 2)

血漿中テリパラチド酢酸塩濃度については、3か月間投与後において週1回投与群および連日投与群のいずれも投与量に応じて最高血中濃度および総血中濃度が上昇し、最高血中濃度時間が15分から30分であった。1週間あたりの総暴露量で比較したところ、総投与量から算出した総血中濃度では、連日投与群の方が週1回投与群よりも高い値を示した。さらに、骨粗鬆患者を用いた臨床試験にて $56.5 \mu\text{g}$ を週1回投与した際の血中濃度<sup>9)</sup>から算出した安全域は、週1回投与群の高用量群( $125.4 \mu\text{g/kg/week}$ )で34.0倍、中用量群( $100 \mu\text{g/kg/week}$ )で25.5倍、低用量群( $75 \mu\text{g/kg/week}$ )で23.2倍であった。

### 2.5.3. BMD

第4、5腰椎、大腿骨及び脛骨について計測したBMDは、いずれの部位においても、対照群に対して被験物質投与で高値を示した(Fig. 1)。連日投与群ではすべての部位で用量依存的に著しい増加を示したが、週1回投与群では連日投与群と比べて腰椎・脛骨で増加程度が弱かった。さらに、週1回投与群では、 $75 \mu\text{g/kg}$ でBMD値が一定になり、大腿骨で全用量でもBMDが有意に増加したが、第4・5腰椎の $100 \mu\text{g/kg}$ 群と脛骨の $125 \mu\text{g/kg}$ 群での増加に統計学的有意差が得られなかった。連日投与群では、用量の増加に伴って高値を示し、顕著な骨形成を示唆する結果と推察された。

### 2.5.4. 骨代謝バイオマーカー

#### 2.5.4.1. OC: 骨形成バイオマーカー

週1回投与群(Fig. 2A)では、投与直後に一過性の減少を示した後に増加し、24時間後に投与前と同じ値に戻り、その後さらに72時間後をピークに再度増加し、144時間後に投与前とほぼ同じ値に戻った。

連日投与群(Fig. 2B)では、投与前から対照群より高値を示し、週1回投与群と同様に

投与直後に一過性の減少を示した後に増加し、24時間後でも投与前より高い値を維持した。

#### 2.5.4.2. NTx：骨吸収バイオマーカー

週1回投与群 (Fig. 3A) では、対照群とほぼ同じ動態を示し、骨吸収に大きな影響がないと推察された。

連日投与群 (Fig. 3B) では、投与後6時間まで変動がないが、中・高用量群において24時間後に著しい高値を示していた。

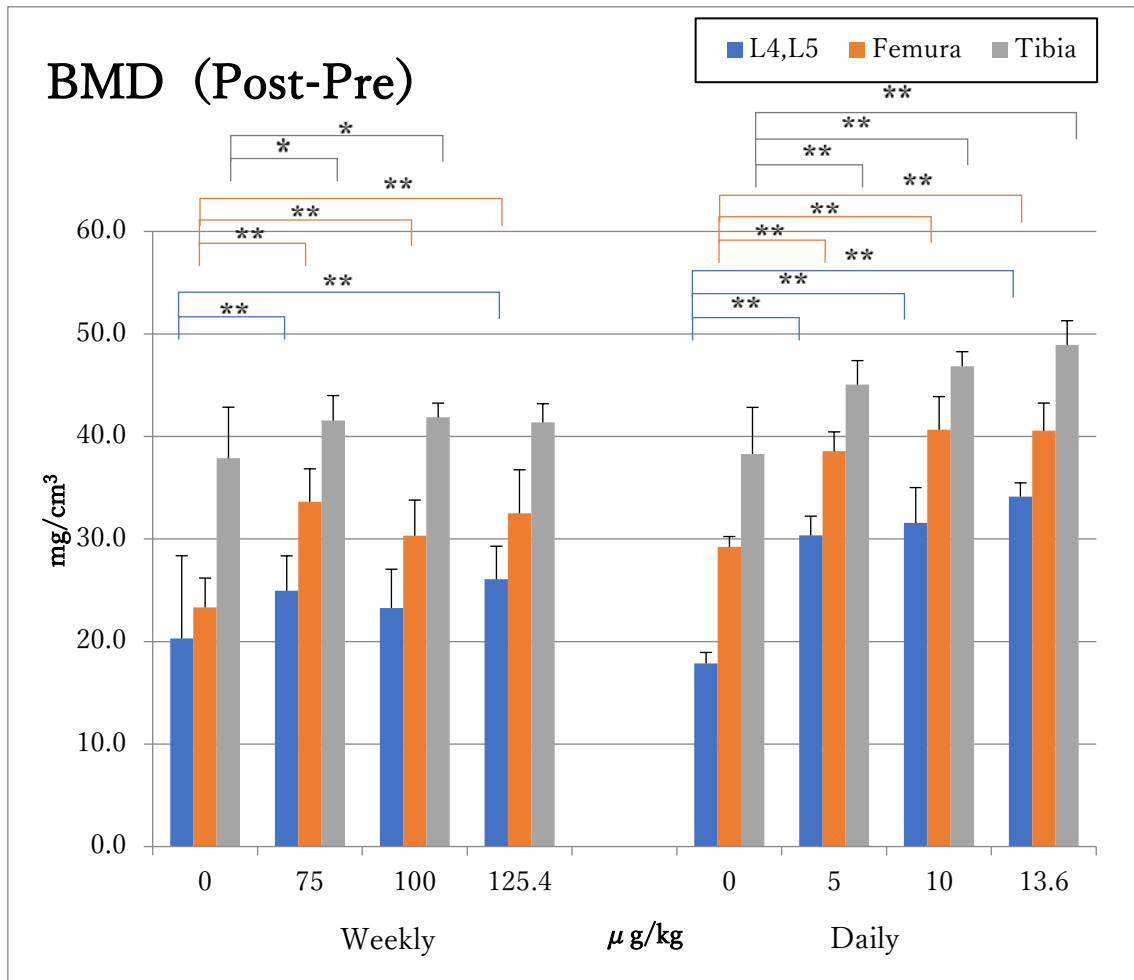
Table 2. Comparison of blood parameters in weekly toxicokinetic measurements after 3-month administration for once-daily groups

The blood levels of PTH 1-34 were measured in animals in the once-weekly and once-daily groups after 3 months of administration. Both groups showed elevated maximum serum concentrations and total serum concentration in a dose-dependent manner, with the time to maximum plasma concentration being between 15 and 30 minutes.

Group ( $\mu$ g/kg)	$C_{max}$ (pg/mL)	$T_{max}$ (min)	AUC <sub>all</sub> (ng·min/mL)	Safety margin*
Daily(*7)				
35 (5*7)	3308.8	15	900.9*	16.3
70 (10*7)	4200.8	15	1600.9*	29.0
95.2 (13.6 *7)	7685.6	15	2088.8*	37.9
Weekly				
75	24798.2	30	1277.6	23.2
100	27684.6	15	1406.1	25.5
125.4	37280.0	15	1876.8	34.0

\* : AUC for the once-daily groups is multiplied 7x to convert to 1-week exposure.

\*\* : AUC<sub>last</sub>: (results on Day 1) with 56.5  $\mu$ g administration (sc) in osteoporosis patients (55.14 ng·min/mL)



\*, \*\*: Significantly different from vehicle control group at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively

Fig. 1. Growth rate in the BMD measurement by the three months dosage BMD for the fourth and fifth lumbar vertebrae, femur, and tibia and were found to be higher in the PTH 1-34 groups than in the control groups for each of the measurement sites. Once-daily groups showed a marked, significant, dose-dependent increase in BMD for all measurement sites at all doses. In comparison, a relatively small increase in BMD was observed in the once-weekly groups and was not dose-dependent. It was statistically significant at all three doses for femur, and at 2 of 3 doses for vertebrae and tibia.

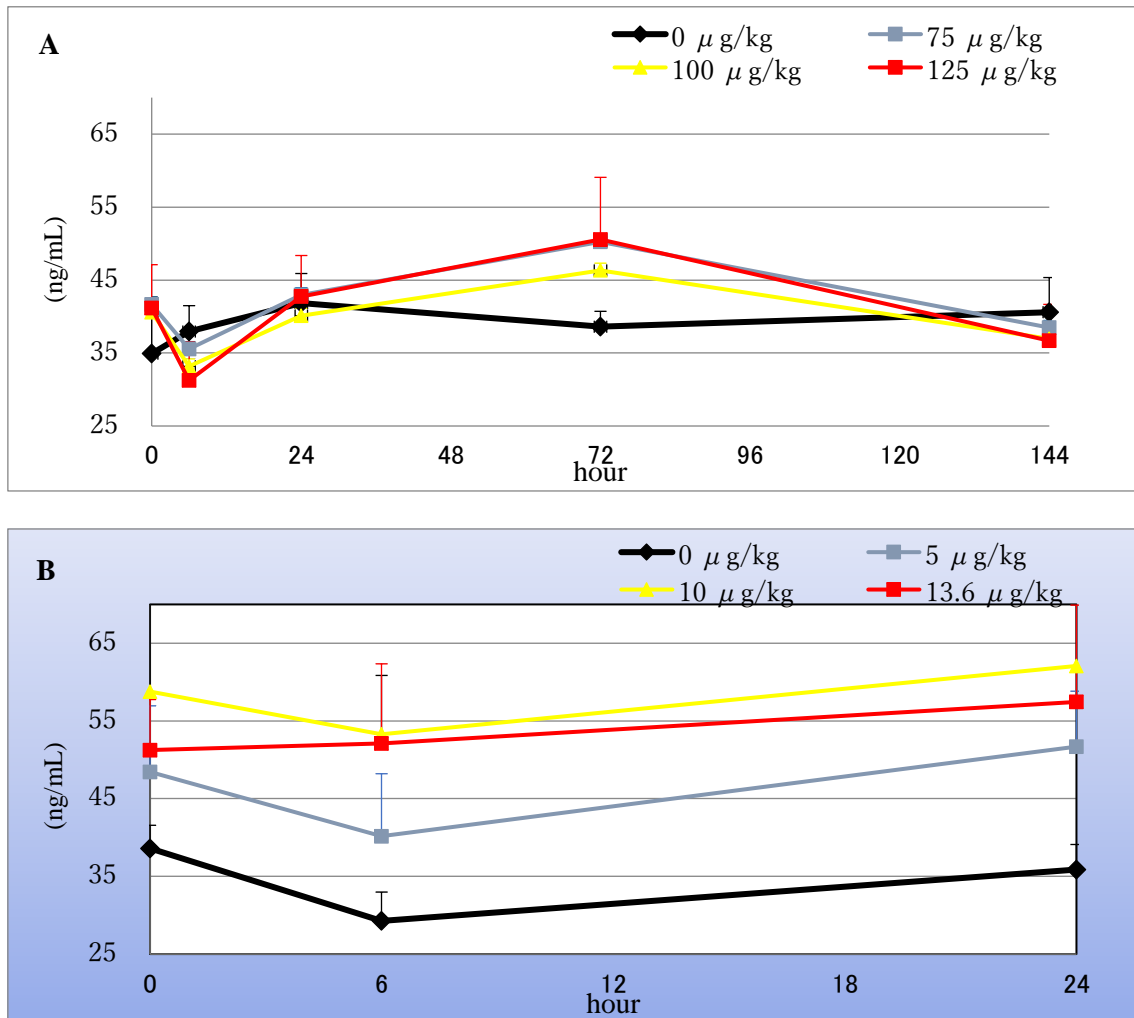


Fig. 2. Change comparison of the weekly administered group in the Osteocalcin measurement by the three months dosage (A :It is show a change to the next dosage time(144 hours).) (B: It is show a change to the next dosage time(24 hours).)

In the once-weekly groups, OC measurements showed generally non-significant transient decreases 6 hours after the administration, except the decrease was statistically significant at the high dose at 3 months. Osteocalcin returned to pre-injection levels after 24 hrs in all groups and timepoints. The measurements continued to increase in the PTH groups, peaking at 72 hrs, and then almost returning to pre-injection levels after 144 hrs. This suggests that bone formation decreased transiently and then increased several days after once-weekly administration, returning to pre-administration levels by one week. In the once-daily groups, all PTH-treated groups had significantly higher OC levels than Control at all timepoints. Control, low, and medium-

dose groups showed a slight decrease at 6 hours relative to pre-injection levels. At 3 months there was a similar pattern but the changes were not significantly different at the low dose.



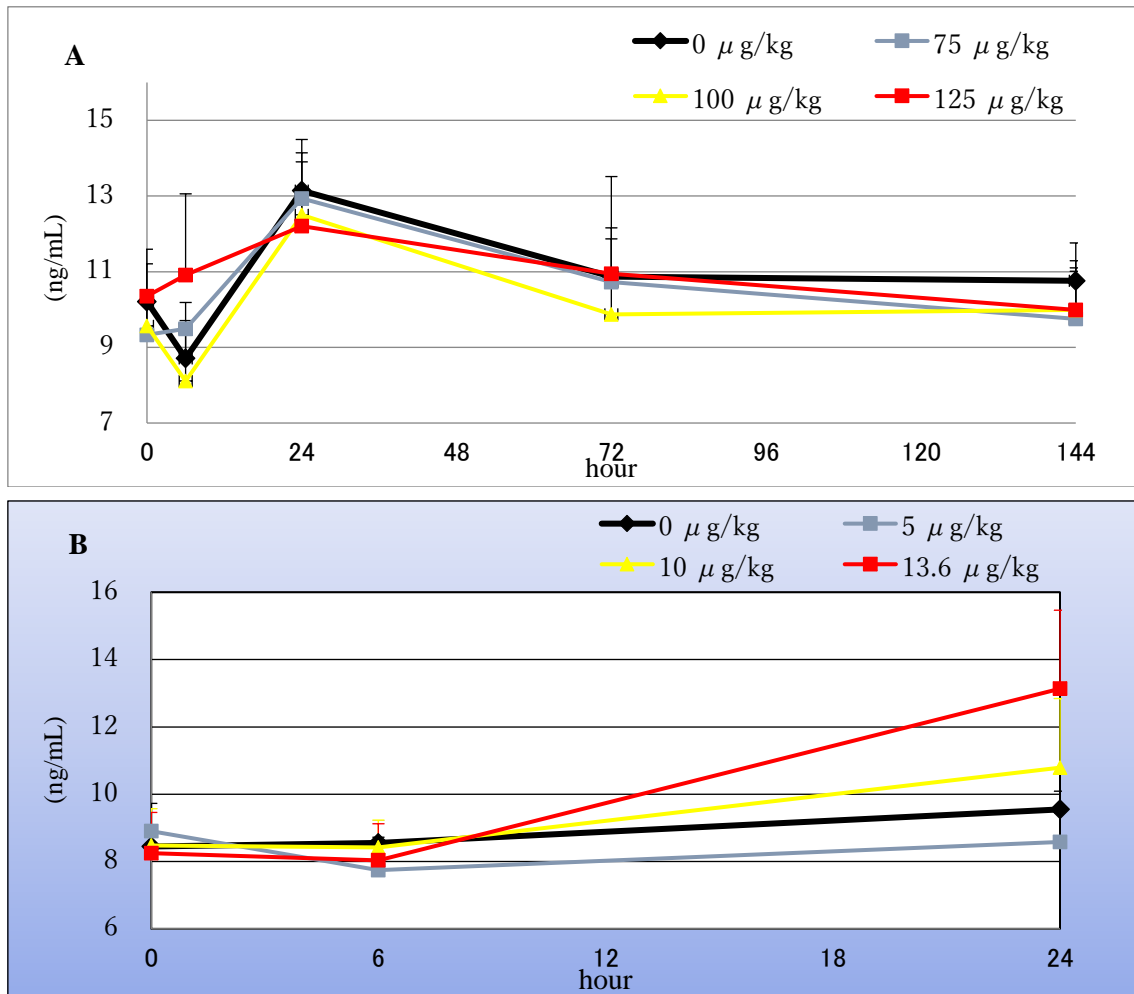


Fig. 3. Change comparison of the once a week administrated group in the NTx measurement by the three months dosage (A: It is show a change to the next dosage time (144 hours).) (B: It is show a change to the next dosage time (24 hours).)

The once-weekly groups showed NTx levels that were not significantly different from those of the control groups, except that the levels were significantly lower than Control in all 3 dose groups at 144 hours suggesting that once-weekly administration does no effect on and may transiently reduce bone resorption. Once-daily administration, although showing little change for the first 6 hrs, resulted in significantly higher levels after 24 hrs in the high- and medium-dose groups at 3 months. This suggests that once-daily administration may stimulate bone resorption slightly

## 2.6. 考察

本研究は、ラットを用いて、テリパラチドの投与頻度による骨形成作用の違いと、その骨粗鬆症治療における意義について解析した。

その結果、血中濃度動態については、週1回投与群および連日投与群の双方とも投与量に応じて血中濃度が上昇し、1週間当たりの総投与量で比較すると連日投与群の方が高値を示していた。これについては、連日投与により薬物代謝が飽和状態になったため高値を示したものと推察された。また、発がん性の安全倍率に関しても連日投与群で高い血中濃度を示すことから、骨粗鬆症患者を用いた臨床試験にて56.5  $\mu\text{g}$ を週1回投与した際の血中濃度から算出した1週間当たりの総投与量で比較すると、週1回投与群の方が広い安全域を示した。さらに、血中濃度から算出したヒト臨床曝露量の25倍に相当する投与量は、週1回投与群で100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$ 、連日投与群で約10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ であるものと算出された。

骨代謝バイオマーカーのうちで単位体積当たりの骨量を示す骨密度 (BMD) の増加量は、すべての投与群において対照群と比較して高値を示したことから、いずれの投与頻度でも骨形成が亢進しているものと推察された。

骨形成バイオマーカーであるOCの血中濃度については、週1回投与群で投与直後に一過性に減少した後、72時間 (3日) 目をピークに増加するが、144時間 (1週間) 目に投与前状態に戻っていた。このことから、週1回投与では、それぞれの投与後に一過性の骨形成が起こっているものの、1週間以内に正常状態に復帰するものと推察された。一方、連日投与群では、投与前から対照群より高値を示し、週1回投与群と同様に投与直後に一過性に減少した後増加したが、24時間後でも投与前より高い値を維持していた。このことから、テリパラチド酢酸塩の3か月間連日投与では、骨形成刺激が持続的かつ上乘せ的に起きているものと推察された。

骨吸収バイオマーカーであるNTxの血中濃度については、週1回投与群の動態に対照群との差はみられなかった。しかし、連日投与群では、投与後24時間において投与前より高い値を示したことから、骨吸収刺激が持続的に起きているものと推察された。

すなわち、テリパラチド酢酸塩の週1回投与の場合は、NTxに影響を示さず、OCが一過性の骨形成状態になった後、次回投与までに投与前状態に戻ることから、骨吸収を介さず緩やかな正常骨代謝型の骨形成促進作用 (定常型リモデリング) を誘導しているものと推察された。一方、連日投与の場合は、OCもNTxも投与量に増加に伴って増加したことから、骨吸収も骨形成も同時に活性化する高代謝回転型の骨形成促進作用 (高代謝回転型リモデリング) を誘導しているものと推察された。後者は、過剰な薬理作用が発揮されたものと考えられる<sup>27)</sup>。

本研究の結果は、テリパラチドの臨床試験での骨代謝バイオマーカーの変動<sup>41)</sup>とよく類似していたことから、ヒトへの外挿性が高いものである。したがって、テリパラチドは、ヒトにおいても、投与頻度によって異なる骨形成パターンを誘導する蓋然性が高い。特に連日投与群でみられた変化は、あらゆる部位で骨吸収と骨形成が同時に誘導される可能性を示

し、高齢者で問題となっている大腿骨頸部の骨折リスク<sup>42)</sup>を高めるおそれを示唆している。これに対して、週1回投与群では骨吸収に大きな影響を示さない、自然生理に近い骨形成が誘導されたことから、大腿骨頸部においても過剰な骨吸収が起こりにくく骨折リスクが低まる可能性がある。

テリパラチドの臨床応用に制限をもたらす原因となった発がん性に関しては、連日投与により高代謝回転型の骨形成が誘導された場合、初めに破骨細胞数が増加して骨吸収を促進し、トランスフォーミング増殖因子(TGF- $\beta$ )やインスリン様成長因子(IGF)などのサイトカインが骨から大量に分泌されて細胞増殖を刺激すると考えられる。たとえばがん患者にテリパラチドが適応された場合は、骨髄内にがん細胞があると、当該細胞が副甲状腺ホルモン関連蛋白(PTHrP)を放出し、それに刺激された骨芽細胞にRANKLが発現される。次いで、前破骨細胞でRANKLに結合するRANKが発現されることにより、前破骨細胞は成熟を促進されて破骨細胞に分化し、破骨細胞の数が増加する。このような悪性のサイクルが骨肉腫の発生や骨転移巣に関与すると考えられている<sup>43)</sup>。すなわちテリパラチドの連日投与は、骨芽細胞および破骨細胞を過剰に活性化し、骨代謝回転を上げることで骨粗鬆症治療効果を示すと同時に、がんの増悪や転移のリスク増大をもたらす可能性がある。また、がんの発生リスクについても完全に否定することは出来ず、特に骨の成長が盛んな時に連日投与のような曝露された場合には難しいと思われる。しかし、週1回投与の場合は、破骨細胞を活性化することなく骨芽細胞を活性化するため、そのようなリスクを回避できることが期待される。ラットがん原性試験の週1回投与で無発がん量が得られている<sup>22)</sup>ことは、この仮説を支持するものである。

以上より、テリパラチドは、週1回投与条件において正常骨代謝型(定常型リモデリング)、連日投与条件において高代謝回転型(高代謝回転型リモデリング)の骨形成促進作用を示すことが判明した。高代謝回転型の骨形成促進状態では、骨折に繋がるリスクが高く、ラットがん原性試験で検出された発がんリスクについても懸念がある。一方、正常骨代謝型の骨形成促進状態では、骨吸収に大きな影響を示さない自然生理に近い骨形成が行われるため、過剰な骨吸収が起こりにくく、骨折リスクが低いと考えられる。また、破骨細胞を過剰に活性化することなく骨芽細胞を活性化することから、発がんリスクについても懸念が低まることが期待される。本研究の成果は、投与条件を工夫することにより、テリパラチドによる新しい、より安全で繰り返し実施できる骨粗鬆症治療方策の策定に資するものである。

## 総括

本研究は、日本を含む先進諸国を中心に世界的な喫緊の課題となっている、骨粗鬆症の制御、すなわちその予防と治療の方策の策定に資する基礎的情報を得る目的で実施した。予防の観点からは、骨粗鬆症発症に深く関与するミネラルであるリンおよびカルシウムに着目し、それらの食事中組成が調節臓器たる腎臓と貯蔵臓器たる骨に及ぼす影響について検討した。治療の観点からは、現状で用いられている治療薬の限界に着目し、新たな治療戦略の構築に資すべく、投与方法の違いが当該薬の作用に及ぼす影響について検討した。

第1章の研究では、食事中のカルシウム・リンバランスが及ぼす影響について解析した。骨粗鬆症の発生と進展には、ミネラル体内バランスの調節臓器である腎臓の状態や、食事から摂取するミネラルのバランスが重大な影響を及ぼす。そこで本研究では、腎動脈部分結紮によるラットCKDモデルに高リン食を適用して、食事中のカルシウムとリンの濃度が骨粗鬆症に及ぼす影響について解析した。

その結果、腎動脈部分結紮処置と、リン濃度増強による食事中のカルシウムとリンの濃度のアンバランス化は、ラットにおいて、比較的短期間にCKDを伴う骨粗鬆症様病変を誘発することが判明した。

本研究の成果は、CKD合併骨粗鬆症の動物モデルとして有効に機能する実験系を確立したことであり、当該モデルを用いて今後得られる成果のヒトへの外挿を経て、当該疾患の病態と背景分子機構の解明、食事リスク要因の同定、背景分子機構に基づいた制御方策の策定などに資するものである。

第2章の研究では、既存骨粗鬆症治療薬による新たな骨粗鬆症治療方策について解析した。骨粗鬆症治療薬であるテリパラチドは、画期的な骨粗鬆症治療薬として実用化されたものであるが、非臨床安全性試験で発がん性を指摘されたことから、ヒトでの臨床使用に制限が課され、骨粗鬆症患者、特に高リスクな人々にとっての不利益が生じている。しかしながら、各種の先行研究は、投与方法の工夫により、発がんリスクを回避できる可能性を示唆する知見を報告している。そこで本研究は、ラットを用いて、テリパラチドの投与頻度による骨形成作用の違いと、その骨粗鬆症治療における意義について解析した。

その結果、テリパラチドは、連日投与条件において高代謝回転型（高代謝回転型リモデリング）の骨形成促進作用を示し、骨折に繋がるリスクが高く、発がんリスクについても懸念があることが判明した。一方、週1回投与条件においては、正常骨代謝型（定常型リモデリング）の骨形成促進作用を示し、骨折リスクが低く、発がんリスクについても懸念が低まることが期待された。

本研究の成果は、投与条件を工夫することにより、テリパラチドによる新しい、より安全

で繰り返し実施できる骨粗鬆症治療方策の策定に資するものである。

骨粗鬆症は、加齢や悪しき生活習慣に基づいて比較的高率に発生し、日本を含む先進諸国における少子高齢化の進展と相まって、世界的に懸念されている疾患である。食習慣は生活習慣病である骨粗鬆症の発生・進展に深く関与するもので、それを制御することは骨粗鬆症そのものを制御することに繋がる。しかしながら、具体的にどのような食要因がどのように関与し、どうすれば骨粗鬆症の制御、特に予防に貢献できるかについては、未解決の部分が大きい。一方、骨粗鬆症の治療に関しては各種の医薬品が開発されているが、現状では決定的なものが限られていて、また、副作用の懸念もあり、投与方法の工夫を含む新たな治療戦略の構築が望まれているところである。上記の通り本研究は、これらの課題の解決に資する基礎的情報を提供することを目的に実施したものである。その成果は骨粗鬆症の予防と治療に資するものであり、したがって、研究目的は達成されたものとする。

## 引用文献

- 1). Matsumoto, T. (1992) Calcium metabolism regulators. *Exp. Med.*, **10**, 510-515.
- 2). Conceição, E.P., Carvalho, J.C., Manhães, A.C., Guarda, D.S., Figueiredo, M.S., Quitete, F.T., Oliveira, E., Moura, E.G. and Lisboa P.C. (2016) Effect of early overfeeding on palatable food preference and brain dopaminergic reward system at adulthood: role of calcium supplementation. *J. Neuroendocrinol.*, **28**.
- 3). Arazi, H., Eghbali, E., Saeedi, T. and Moghadam, R. (2016) The relationship of physical activity and anthropometric and physiological characteristics to bone mineral density in postmenopausal women. *J. Clin. Densitom.*, **19**, 382-388.
- 4). Gerlinger, C., Oster, M., Borgelt, L., Reyer, H., Muráni, E., Ponsuksili, S., Polley, C., Vollmar, B., Reichel, M., Wolf, P. and Wimmers, K. (2019) Physiological and transcriptional responses in weaned piglets fed diets with varying phosphorus and calcium levels. *Nutrients*, **11**.
- 5). Stewart, T.A. and Davis, F.M. (2019) An element for development: Calcium signaling in mammalian reproduction and development. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.*, **1866**, 1230-1238.
- 6). Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary reference intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride. Washington (DC): National Academies Press, 71-145.
- 7). Pearce, S.H. and Thakker, R.V. (1997) The calcium-sensing receptor: insights into extracellular calcium homeostasis in health and disease. *J. Endocrinol.*, **154**, 371-378.
- 8). Demontiero, O., Vidal, C. and Duque, G. (2012) Aging and bone loss: new insights for the clinician. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.*, **4**, 61-76.
- 9). Raisz, L.G. (2005) Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J. Clin. Invest.*, **115**, 3318-3325.
- 10). Azuma, Y. (2007) Animal models of osteoporosis and development of anti-osteoporotic agents. *Folia. Pharmacol. Jpn.*, **130**, 201-205.
- 11). Hruska KA, Mathew S, Lund R, Qiu P, Pratt R. Hyperphosphatemia of

- chronic kidney disease. *Kidney International*. 2008;74(2):148-157.
- 12). Quarles LD, Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. *J Clin Invest* 2008; 118:3820-3828.
  - 13). Segawa H, Aranami F, Kaneko I, Tomoe Y, Miyamoto K. The roles of Na/Pi-II transporters in phosphate metabolism. *Bone* 2009;45:S2-S7.
  - 14). Suzuki Y, et al ; Guidelines on the management and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis of the Japanese Society for Bone and Mineral Research: 2014 update. ;2014 update *J Bone Miner Metab*, 32(4):337-350, 2014
  - 15). Xu Feng Jay M. McDonald Disorders of Bone Remodeling *Annu Rev Pathol*. 2011 ; 6: 121-145.
  - 16). Iizuka T, Matsukawa M. Potential excessive suppression of bone turnover with long-term oral bisphosphonate therapy in postmenopausal osteoporotic patients. *Climacteric*. 2008 Aug;11(4):287-95.
  - 17). Mashiba T, Turner CH, Hirano T, Forwood MR, Johnston CC, Burr DB. Effects of suppressed bone turnover by bisphosphonates on microdamage accumulation and biomechanical properties in clinically relevant skeletal sites in beagles. *Bone* 2001; 28 (5): 524-31.
  - 18). Stepan JJ, Burr DB, Pavo I, Sipos A, Michalska D, Li J, et al. Low bone mineral density is associated with bone microdamage accumulation in postmenopausal women with osteoporosis. *Bone* 2007; 41 (3): 378-85.
  - 19). Michael P. Whyte, M.D., Deborah Wenkert, M.D., Karen L. Clements, R.N., William H. McAlister, M.D., and Steven Mumm, Ph.D :Bisphosphonate-Induced Osteopetrosia. *N Engl J Med* 2003; 349:457-463.
  - 20). Diab, D, Watts, N. Bisphosphonates drug holidays: who, when and how long. *Ther Adv Musculoskel Dis*. (2013). (3): 107-111.
  - 21). AACE Postmenopausal Osteoporosis Guidelines, *Endocr Pract*. 2010;16(Suppl 3)
  - 22). Watanabe A, Yoneyama S, Nakajima M, Sato N, Takao-Kawabata R, Isogai Y, Sakurai-Tanikawa A, Higuchi K, Shimoi A, Yamatoya H, Yoshida K, Kohira T. Osteosarcoma in Sprague-Dawley rats after long-term treatment with teriparatide (human parathyroid hormone (1-34)). *J Toxicol Sci*. 2012;37(3):617-29.
  - 23). Vahle, J.L., Sato, M., Long, G.G., Young, J.K., Francis, P.C., Engelhardt, J.A., Westmore, M.S., Ma, Y.L. and Nold, J.B. (2002): Skeletal changes in rats given daily subcutaneous injections of recombinant human parathyroid hormone(1-34) for 2 years and relevance

- to human safety. *Toxicol. Pathol.*, **30**, 312-321.
- 24). Vahle, J.L., Long, G.G., Sandusky, G., Westmore, M., Ma, Y.L. and Sato, M. (2004): Bone neoplasms in F344 rats given teriparatide [rhPTH(1-34)] are dependent on duration of treatment and dose. *Toxicol. Pathol.*, **32**, 426-438.
  - 25). Subbiah V, Madsen VS, Raymond AK, Benjamin RS, Ludwig JA. Of mice and men: divergent risks of teriparatide-induced osteosarcoma. *Osteoporos Int.* 2010 Jun;21(6):1041-5.
  - 26). Andrews EB, Gilsenan AW, Midkiff K, Sherrill B, Wu Y, Mann BH, Masica D. The US postmarketing surveillance study of adult osteosarcoma and teriparatide: study design and findings from the first 7 years. *J Bone Miner Res.* 2012 Dec;27(12):2429-37.
  - 27). Yamamoto T, Hasegawa T, Sasaki M, Hongo H, Tsuboi K, Shimizu T, Haramachi M, Ota M, Luiz de Freitas PH, Takakura A, Takao-Kawabata R, Isogai Y, Amizuka N. ; Frequency of teriparatide administration affects the histological pattern of bone formation in young adult male mice. *Endocrinology.* 2016 July 157(7):2604-2620
  - 28). Joel S. Finkelstein, Jason J. Wyland, Hang Lee, and Robert M. Neer.; Effects of Teriparatide, Alendronate, or Both in Women with Postmenopausal Osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Apr; 95(4): 1838-1845.
  - 29). M. Shiraki & T. Sugimoto & T. Nakamura.; Effects of a single injection of teriparatide on bone turnover markers in postmenopausal women. *Osteoporos Int* (2013) 24:219-226
  - 30). Keith A Hruska, Suresh Mathew, and Richard Lund :Osteoporosis and cardiovascular disease: lessons from chronic kidney disease *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2008 Jan-Apr; 5(1): 35-39.
  - 31). Moe S, Drüeke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, Ott S, SRLFague S, Lameire N, Eknoyan G : Kidney Disease : ImRLoving GlobalOutcome (KDIGO) : Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy : A position statement from Kidney Disease : ImRLoving Global Outcome (KDIGO) . *Kidney Int* 69 : 1945-1953, 2006
  - 32). Hruska KA, Mathew S, Lund R, Qiu P, RLatt R. Hyperphosphatemia of chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2008; 74:148-157
  - 33). Komaba H, Goto S, Fujii H et al. Depressed expression of klotho and FGF receptor 1 in hyperplastic parathyroid glands from uremic patients. *Kidney Int* 2010;77:232-238



- 34). Komaba H, Goto S, Fujii H et al. DeRLessed exRLesson of klotho and FGF receptor 1 inhyperRLastic parathyroid glands from uremic patients. *Kidney Int* 2010;77:232-238
- 35). Nagano N, Ando T, Tsutsu Ti et al. A new concept for the pathogenesis of secondary hyperparathyroidism : Pharmacological validation of the trade-off hypothesis and involvementof FGF23/Klotho. *J. Jpn. Soc. Dial. Ther.* 46\_(6) : 519~533, 2013
- 36). Watanabe K, Fujii H, Goto S. Newly Developed Rat Model of Chronic Kidney Disease-Mineral Bone Disorder. *J Atheroscler Thromb.* **25**: 170-177. 2018.
- 37). Tani Y, Sato T, Yamanaka-Okumura H, Yamamoto H, Arai H, Sawada H, Genjida K, Taketani Y, Takeda E l. Effects of Prolonged High Phosphorus Diet on Phosphorus and Calcium Balance in Rats. *J Clin Biochem Nutr.* **40**(3): 221-228. 2007.
- 38). Matsuzaki H, Katsumata S, Uehara M, Suzuki K, Miwa M . High-Phosphorus diet induces osteopontin expression of renal tubules in rats. *J Clin Biochem Nutr.* **41**: 179-183. 2007.
- 39). VA Aparicio, E Nebot, R García-del Moral, M. Machado-Vílchez<sup>3</sup>, J. M. Porres<sup>1</sup>, C. Sánchez<sup>1</sup> P. Aranda<sup>1</sup>. High-protein diets and renal status in rats. *Nutr Hosp.* **28**(1): 232-237. 2013.
- 40). Atsushi W, Katsuhiko M, Noriko K, Hisashi U, Takayuki A, Hijiri I, Reo A, Dai N. Impact of dietary calcium and phosphorus levels on an ovariectomized Sprague-Dawley rat model of osteoporosis. *Fundam. Toxicol. Sci.* **6**(7): 253-258, 2019
- 41). Nakamura T, Sugimoto T, Nakano T, Kishimoto H, Ito M, Fukunaga M, Hagino H, Sone T, Yoshikawa H, Nishizawa Y, Fujita T, Shiraki M. Randomized Teriparatide [human parathyroid hormone (PTH) 1-34] Once-Weekly Efficacy Research (TOWER) trial for examining the reduction in new vertebral fractures in subjects with primary osteoporosis and high fracture risk. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97:3097-3106.
- 42). Bhandari M, Jin L, See K, Burge R, Gilchrist N, Witvrouw R, Krohn KD, Warner MR, Ahmad QI<sup>2</sup>, Mitlak B. Does Teriparatide Improve Femoral Neck Fracture Healing: Results From A Randomized Placebo-controlled Trial. *Clin Orthop Relat Res.* 2016 May;474(5):1234-44.
- 43). Yu-Chi Chen<sup>1</sup> Donna M Sosnoski. Andrea M Mastro Breast cancer metastasis to the bone: mechanisms of bone loss. *Breast Cancer Res.*

2010; 12(6) : 215.

# 論文目録

## 主論文を構成する論文

Atsushi Watanabe, Toshinori Koizumi, Takumi Horikawa, Yusuke Sano, Haruka Uki, Katsuhiko Miyajima, Noriko Kemuriyama, Reo Anzai, Hijiri Iwata, Takayuki Anzai, Kenshi Nakagawa, Dai Nakae (2019), Impact of altered dietary calcium-phosphorus ratio caused by high phosphorus diets in a rat chronic kidney disease (CKD) model created by partial ligation of the renal arteries. Journal of Toxicologic Pathology 33(2): in press

Atsushi Watanabe, Katsuhiko Miyajima, Noriko Kemuriyama, Hisashi Uchiyama, Takayuki Anzai, Hijiri Iwata, Reo Anzai, Dai Nakae (2019). Impact of dietary calcium and phosphorus levels on an ovariectomized Sprague-Dawley rat model of osteoporosis. Fundamental Toxicological Sciences 6 (7): 253-258

Atsushi Watanabe, Kazuyuki Tsurui, Shigeki Yoneyama, Hijiri Iwata, Takayuki Anzai, Christopher Jerome, Dai Nakae. (2018). Effect of dosing frequency of teriparatide (PTH 1-34) on bone formation in rats: Comparison of bone metabolism marker levels. The Journal of Toxicological Sciences 43(7):435-442

## 参考論文

Atsushi Watanabe, Shigeki Yoneyama, Mikio Nakajima, Norihiro Sato, Ryoko Tkako-Kawabata, Yukihiro Isogai, Aki Sakurai-Tanikawa, Kazuhiro Higuchi, Akihito Shimoi, Hideyuki Yamatoya, Kenji Yoshuida, Terutomo Kohira. (2012). Osteosarcoma in Sprague-Dawley Rats after Long-Term Treatment with Teriparatide (Human Parathyroid Hormone (1-34)). The Journal of Toxicological Sciences 37(3):617-629

Masakazu Atobe, Takamichi, Nagami, Shuji Muramatsu, Takeshi Ohno, Masayuki Kitagawa, Hiroko Suzuki, Masashi Ishiguro, Atsushi Watanabe and Masashi Kawanishi. (2019). Discovery of Novel Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) Agonists as Regulators of Chondrogenic Differentiation: Identification of Quinazolin-4(3H)-ones and in Vivo Studies on a Surgically Induced Rat Model of Osteoarthritis. J. Med. Chem. 62, 3, 1468-1483

## 謝辞

本件研究をまとめるにあたり、終始温かい励ましと懇切丁寧な御指導を賜りました、東京農業大学大学院農学研究科食品栄養学専攻／東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科の中江 大 教授に心より感謝申し上げます。

また、本研究の実施にあたり、御指導・御助言を賜りました東京農業大学大学院農学研究科食品栄養学専攻／東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科の上原 万里子 教授、東京農業大学大学院農学研究科食品栄養学専攻／東京農業大学応用生物科学部栄養科学部の勝間田 真一 教授、さらに昭和大学医学部の安齋 享征 客員教授に深くお礼申し上げます。

最後に、本研究へ御協力いただいたすべての関係者の皆様、御助言・御協力をいただきました東京農業大学大学院農学研究科食品栄養学専攻／東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科の美谷島 克宏 教授、東京農業大学応用生物学部食品安全健康学科の煙山 紀子 助教および東京農業大学大学院農学研究科食品栄養学専攻・食品安全健康学専攻／東京農業大学農学研究科 食品安全性評価研究室関係の皆様心よりお礼申し上げます。

## 利益相反 (COI)

本論文に関して開示すべき利益相反は、存在しません。

# Abstract

The present study was conducted in order to obtain basic information that can contribute to the establishment of the strategy to prevent or treat osteoporosis.

## Effect of the dietary phosphorus and calcium concentrations on osteoporosis

The internal balance of minerals, especially phosphorus and calcium, is one of the major factors for the onset and progress of osteoporosis. It is known that damage occurring in the kidney accelerates the disease process, and that the dietary mineral balance also essentially influences, but their detailed background has largely remained obscure. This study thus aimed to establish a rat chronic kidney disease (CKD) model by studying the effects of a high-phosphorus diet in rats that had undergone partial ligation of the renal arteries (RL).

Separate groups of 10-week-old male Slc:Sprague-Dawley rats underwent RL and were fed diets with varying phosphorous levels for a period of 48 days. A marked suppression of body weight gain necessitating humane euthanization occurred on day 28 in rats that had undergone RL and were given high-phosphorus feed. By contrast, the group of intact animals on a high-phosphorus feed exhibited a slightly decreased body weight gain from day 21 and survived until scheduled euthanization. In rats with RL, hematological, blood biochemical, and histopathological analyses demonstrated the presence of CKD-like conditions, particularly in the group that were fed a high-phosphorus diet. Hyperphosphatemia and hypocalcemia were induced by a high-phosphorus diet in both the RL and intact groups, both of which had high levels of FGF23 and parathyroid hormone in the blood. Rats with RL on a high-phosphorus diet showed decreased hematopoiesis by the hematopoietic cell area being narrower in the medullary cavity, proliferation of mesenchymal cells and osteoblasts/osteoclasts, and expansion of the osteoid area, a furthermore generalized vascular lesions, such as calcification, were observed.

These findings demonstrate that the partial ligation of the renal arteries combined with a calcium-phosphorus imbalance induced by a high-phosphorus diet serves as an animal model for CKD-like conditions accompanied by bone lesions, helping to elucidate this clinical condition and its underlying molecular

mechanisms.

New strategy of the treatment of osteoporosis by its existing its therapeutic pharmaceutical

Teriparatide (PTH(1-34)) is an only therapeutic pharmaceutical of osteoporosis by inducing the osteogenesis, but currently it is allowed to use only once throughout the lifetime because of its potential carcinogenicity detected in a nonclinical carcinogenicity study in rats. Recent studies have, however, revealed a possibility to avoid the carcinogenic risk of teriparatide by modifying the way of its administration. This study thus aimed to comparatively examine effects of different ways of the administration of teriparatide on its enhancing action on the osteogenesis, and their rationale in the treatment of osteoporosis.

Teriparatide was administered to rats subcutaneously for the duration of 3 months, at a frequency of either once weekly or once daily to demonstrate the varying levels of anabolic action the drug can have on bone depending on the dosing frequency. The levels of biomarkers in the blood were compared and found to vary in osteocalcin (OC), a biomarker of bone formation, and cross-linked N-telopeptide of type 1 collagen (NTx), a biomarker of bone resorption, according to the dosing frequency. In the once-weekly regimen, teriparatide did not affect NTx levels at any of the doses studied, while OC levels increased with dose, peaking at 72 hrs, then returning to normal before the next injection (after 1 week). Bone mineral density (BMD) levels increased moderately with no difference between doses. This was thought to result from the steady state achieved following increases in bone formation and bone absorption. In the once-daily dosing regimen, meanwhile, NTx levels increased with dose, and OC levels were markedly higher when compared to those with the once-weekly dosing. BMD levels were higher than those with the once-weekly dosing, but with no difference between doses. This was considered a result of unlimited, excessive increases in bone formation due to daily administration of the drug.

These results suggest that teriparatide promotes normal bone metabolism ("stationary remodeling") when administered once weekly, and has an anabolic action with high metabolic turnover ("high-turnover remodeling") when administered once daily.

The above-mentioned achievements of the present study can contribute to draw

a strategic picture for the prevention and treatment of osteoporosis, and it is safe to say that the aim of the present study has well been accomplished.