

学位授与番号：乙 3 1 6 9 号

氏 名：内山 威人

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 29 年 1 月 11 日

学位論文名：

Hypermethylation of the CaSR and VDR genes in the parathyroid glands in chronic kidney disease rats with high phosphate diet.

学位論文名（翻訳）：

(慢性腎不全モデルラットへの高リン食負荷は、副甲状腺カルシウム感知受容体、ビタミン D 受容体の高メチル化を引き起こす)

学位審査委員長：教授 松浦知和

学位審査委員：教授 柳澤裕之 教授 武山浩

論文要旨

論文提出者名	内山 威人	指導教授名 横尾 隆
<p>主論文題名</p> <p>Hypermethylation of the <i>CaSR</i> and <i>VDR</i> genes in the parathyroid glands in chronic kidney disease rats with high-phosphate diet.</p> <p>(慢性腎不全モデルラットへの高リン食負荷は、副甲状腺カルシウム感知受容体、ビタミン D 受容体の高メチル化を引き起こす)</p> <p>Taketo Uchiyama, Norifumi Tatsumi, Sahoko Kamejima, Tsuyoshi Waku, Ichiro Ohkido, Keitaro Yokoyama, Takashi Yokoo, Masataka Okabe.</p> <p>Human Cell, Sep. 2, 2016 DOI: 10.1007/s13577-016-0143-9</p> <p>[はじめに] 慢性腎臓病(chronic kidney disease: CKD)はミネラル恒常性を破綻させ、その主病態は副甲状腺ホルモンの持続的上昇と副甲状腺過形成を特徴とする二次性副甲状腺機能亢進症(secondary hyperparathyroidism: SHPT)である。SHPT は腎障害のごく早期から発症、進行し、死亡率、心血管系イベントと関連している。SHPT は CKD の進行に伴い、副甲状腺におけるカルシウム感知受容体(calcium sensing receptor: CaSR)とビタミン D 受容体(vitamin D receptor: VDR)の発現低下を引き起こすが、その発症機序は不明である。そこで本研究では、SHPT の副甲状腺における <i>CaSR</i>、<i>VDR</i> の遺伝子発現低下と DNA メチル化に着目し、そのメカニズムを解明する事を目的とし、解析を行った。</p> <p>[方法] CKD は二段階腎切除法を用いた。偽手術(sham)、腎切除後(CKD)、2 種類のリン(Pi)含有濃度の食餌(正 Pi 食: NP、高 Pi 食: HP)をそれぞれの群(sham NP、sham HP、CKD NP、CKD HP)に 8 週間与えた後、副甲状腺摘出術を施行した。CaSR、VDR 遺伝子発現解析は切除した副甲状腺より RNA を抽出した後、taqman probe を用い、<i>CaSR</i>、<i>VDR</i> の蛋白発現解析は免疫組織化学染色を用いて行った。DNA メチル化は切除した副甲状腺よりゲノム DNA を抽出した後、メチル化感受性制限酵素処理を行い、リアルタイム PCR で解析する restriction digestion and quantitative PCR 法(qAMP 法)を用いて行った。</p> <p>[結果] Ki67 の発現は CKD HP で有意に上昇しており、CKD HP は SHPT の状態である事を確認、また <i>CaSR</i>、<i>VDR</i> の遺伝子発現、及び蛋白発現は CKD HP においてのみ低下していた。そして <i>CaSR</i>、<i>VDR</i> のメチル化は CKD HP のみ高メチル化の状態であり、つまり SHPT では <i>CaSR</i>、<i>VDR</i> の高メチル化が認められた。しかしその %methylation は低かった。</p> <p>[結語] 慢性腎不全モデルラットへの高 Pi 食負荷により、副甲状腺における <i>CaSR</i>、<i>VDR</i> の高メチル化が引き起こされた。しかしそのメチル化率は低く、SHPT の副甲状腺における <i>CaSR</i>、<i>VDR</i> 発現低下は、他の要因の寄与が大きい可能性が示唆された。</p> <p>さらに慢性腎不全モデルラットへの高 Pi 食負荷により、副甲状腺の <i>Gcm2</i> 遺伝子発現低下が認められ、これにより SHPT の副甲状腺における <i>CaSR</i> 発現の低下に <i>Gcm2</i> が寄与している可能性が示唆された。</p>		

学位審査の結果の要旨

口頭発表及び質疑 2016年12月19日 月曜日 18:00-19:00

(東京慈恵会医科大学附属病院 B 棟 6 階 C 会議室)

質問 1. 二段階腎切除法(5/6 腎摘術)による CKD ラットモデルに高リン食を与えることで、二次性副甲状腺機能亢進症(SHPT)は再現され、副甲状腺組織での CaSR と VDR の発現低下も明確に再現されている。しかも、両遺伝子のメチル化亢進状態も証明されている。しかし、それぞれの遺伝子制御部位の高メチル化状態と、CaSR については上流遺伝子の Gcm2 発現の低下のみで、CaSR や VDR の発現低下を説明できるだろうか？

ーおそらく、ヒストン修飾なども寄与している可能性があり、さらに解析が必要である。

質問 2. CaSR 発現の調節では Gcm2 よりも上流の転写因子である GATA-3, Eya1 の発現を解析し、sham HP, CKD NP, CKD HP において、sham NP (コントロール) に比較して、共に発現が上昇している。これはポジティブ・フィードバックといえるのだろうか？

ーそれぞれの病態で Gcm2 の低下を補填する意味ではフィードバックであるが、所謂、ポジティブ・フィードバックではない。

ーCKD 初期の病態解析には、今回のモデルよりも重い腎障害モデルであるアデニン経口投与によるラット CKD モデルで検討することも考えている。高 P 食を投与しなくても CaSR, VDR は低下する。

質問 3. 副甲状腺 VDR 低下は腎不全状態での単なる結果か？ PTH 上昇が原因か？

ー腎不全初期で副甲状腺を採取することは不可能なので、臨床的にどちらが先か確かめることができない。また、CaSR と VDR は別々に制御されていると思う。

質問 4. 本研究を臨床的にどのように生かすことができるか？

ーCaSR や VDR のヒストン修飾がそれぞれの発現低下に関与しているようであれば、CKD 初期よりそこを分子標的とした治療介入が可能になるかもしれない。例えば、バルプロ酸に代表される Histon Deacetylase (HDAC)阻害剤などでの治療も可能になるかもしれない。

質問 5. eGFR 60 以下に低下した CKD 初期患者への Ca, P の含有量を調整した食餌療法などの工夫をすることで、CKD や骨粗鬆症の進展を遅らせることはできないか？

ーガイドラインなどの修正はないが、食事内容の工夫で可能性はあると思われる。

質問 6. 免疫組織学的 Ki67 陽性細胞増加が観られるため、SHPT は細胞増殖を反映してい

ると結論しているが、臨床的には細胞腫大が関与しているのではないか？

－臨床的にも副甲状腺細胞の増加でよい。

質問 7. 副甲状腺での VDR 低下に関して、CKD による高リン血症が FGF-23 を増加させ、活性型 VD を低下させ、その補填のため PTH 産生細胞を増やすことで対応しているという解釈も成り立つか？

－そのように考える。

質問 8. CaSR の低下は epigenetical な要因のみだろうか？遺伝子異常は本当はないのか？

－腎不全のみでは genetical な変化が起こるとは考えづらい。

質問 9. 腎臓 5/6 切除の CKD モデル作製は技術的に難しいと思うが、研究中の生存状況はどうだったか？

－実際、40 匹のモデルを作製し、そのうち 7-8 匹は術後死亡し、さらに高リン食投与後数匹死亡する。このため、SHPT まで解析できるのは各グループ 7 匹程度となる。

質問 10. CaSR や VDR 蛋白については免疫組織の結果で示しているが、Western blot 法での検討は行っているか？

－副甲状腺が小さいので 1 mm 径ほどの副甲状腺を 3 匹分合わせて Western blot は行い、免疫染色と同じ傾向を確認している。

質問 11. 血中 FGF-23 測定は SHPT の早期診断に役立たないのか？

－実際に、FGF-23 測定は CKD や SHPT の進行の指標となる可能性があり、測定も行われている。また、抗 FGF-23 抗体がクル病や腎不全治療に応用される可能性もある。

コメント：CKD における二次性副甲状腺機能亢進症(SHPT)の進行に関して、エピジェネティックなメカニズムが関与することを示した貴重な研究である。実験的にも、5/6 腎臓切除といった作製が難しい CKD モデルで、さらにわずか 1mm 径の副甲状腺を主要な解析材料として行った研究であり、その努力も評価できる。本研究論文は、SHPT に関する基礎的研究論文であるが、診断・治療両面から臨床的応用にも繋がる価値が高い内容である。

以上