HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	慢性腎臓病による骨質異常と骨粗鬆症治療薬による治療効果および安全性に関する研究
Author(s)	太田, 昌博
Description	配架番号：2365
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12986号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12986
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70262
Type	doctoral thesis
File Information	Masahiro_Ohta.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文

慢性腎臓病による骨質異常と
骨粗鬆症治療薬による治療効果および安全性に関する研究

(Studies on the bone quality abnormality and the safety and efficacy of osteoporosis medications in chronic kidney disease)

2018 年 3 月

北 海 道 大 学

太田　昌博
Ota Masahiro

学 位 論 文

慢性腎臓病による骨質異常と
骨粗鬆症治療薬による治療効果および安全性に関する研究

(Studies on the bone quality abnormality and the safety and efficacy of osteoporosis medications in chronic kidney disease)

2018 年 3 月

北 海 道 大 学

太田　昌博
Ota Masahiro

目　　次

発表論文目録および学会発表目録 …… 1 頁

緒言 …… 3 頁
略語表 …… 7 頁

第一章
緒言 …… 8 頁
実験方法 …… 10 頁
実験結果 …… 12 頁
考察 …… 13 頁

第二章
緒言 …… 14 頁
実験方法 …… 15 頁
実験結果 …… 18 頁
考察 …… 23 頁

統括及び結論 …… 26 頁
謝辞 …… 28 頁
引用文献 …… 29 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した.

1. M. Ota, M. Takahata, T. Shimizu, Y. Kanehira, H. Kimura-Suda, Y. Kameda, H. Hamano, S. Hiratsuka, D. Sato, N. Iwasaki

   Efficacy and safety of osteoporosis medications in a rat model of late-stage chronic kidney disease accompanied by secondary hyperparathyroidism and hyperphosphatemia

   Osteoporosis International 2017 Apr; 28(4):1481-1490.

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1. 太田昌博　髙畑雅彦　清水智弘　兼平祐也　木村-須田廣美　亀田裕亮　濱野博基　平塚重人　佐藤大　岩崎倫政
   慢性腎臓病による骨脆弱性発症のメカニズムと骨代謝改善薬による治療効果
   第 131 回北海道整形災害外科学会
   平成 28 年 6 月 4 日-5 日
   函館アリーナ（函館）

2. 太田昌博　髙畑雅彦　清水智弘　兼平祐也　木村-須田廣美　亀田裕亮　濱野博基　平塚重人　佐藤大　岩崎倫政
   慢性腎臓病に伴うミネラル代謝異常がもたらす骨質異常と骨代謝改善薬による治療効果と安全性ーラット前臨床モデルを用いた検討ー
   第 34 回日本骨代謝学会
   平成 28 年 7 月 20 日-23 日
   大阪国際会議場（大阪）

3. 太田昌博　髙畑雅彦　清水智弘　兼平祐也　木村-須田廣美　亀田裕亮　濱野博基　平塚重人　佐藤大　岩崎倫政

慢性腎臓病に伴うミネラル代謝異常がもたらす骨質異常と骨代謝改善薬による治療効果と安全性ーラット前臨床モデルを用いた検討ー

第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会

平成 28 年 10 月 13 日-14 日

福岡国際会議場（福岡）

4. Ota M, Takahata M, Shimizu T, Kanehira Y, Kimura-Suda H, Kameda Y, Hamano H, Hiratsuka S, Sato D, Iwasaki N.

Efficacy and safety of osteoporosis medications in a rat model of late-stage chronic kidney disease accompanied by secondary hyperparathyroidism and hyperphosphatemia

The Orthopaedec Research Society 2017 Annual Meeting

March 19-22, 2017

San Diego Convention Center (San Diego)

緒 言

1. 慢性腎臓病は続発性骨粗鬆症をきたす原因疾患の一つである

慢性腎臓病（Chronic kidney disease: CKD）は慢性に経過するすべての腎臓病を指し，腎臓の障害（血尿や蛋白尿など），もしくは GFR（糸球体濾過量）60mL/分/1.73m^2 未満の腎機能低下が 3 ヶ月以上持続するもの，と定義される[1]．腎臓は，副甲状腺ホルモン（parathyroid hormone: PTH）をはじめとする様々なホルモンの標的臓器になると同時に，自ら骨・ミネラル代謝に重要なビタミン D の活性化を行っており[2]，生体のミネラルバランスの維持に重要な臓器である．したがって，腎機能が障害されるとミネラルバランスの異常が生ずることになり，進行すれば骨の異常や骨折を生ずるようになる．このことは今から 50 年以上前に，尿毒症患者で著名な副甲状腺腫大を伴う骨の病気として初めて認識された[3,4]（図 1）．

図 1．CKD による二次性副甲状腺機能亢進症患者のレントゲン写真

指骨の骨膜下骨吸収（左）とラガージャージ様脊椎（右）．

（文献 4 より引用）

骨粗鬆症は全身の骨強度が低下して骨折しやすくなった状態のことであり，世界保健機関 WHO により「低骨量と骨組織の微細構造の異常を特徴とし，骨の脆弱性が増大し，骨折の危険性が増大する疾患である」と定義されている[5]．本邦における骨粗鬆症患者は約 1260 万人にのぼると推定されており，高齢人口の増加とともに罹患患者は増加の一途をたどっている．遺伝的素因や閉経および加齢によって骨代謝障害が生じる原発性骨粗鬆症がもっとも多いが，副甲状腺機能亢進症やクッシング症候群を始めとする内分泌疾患，糖尿病・CKD・慢性閉塞性肺疾患に代表される生活習慣病，関節リウマチ，ステロイド薬などによって，骨量減少や骨質劣化という骨粗鬆症の病態を惹起する原因が認められるものは続発性骨粗鬆症と称されている．

CKD は，加齢に伴う腎機能障害を含め慢性に経過するすべての腎障害を包括する疾患概念であり，本邦では約 1,330 万人（20 歳以上の成人の 8 人に 1 人）の患者が

いると推測されている [6]．原発性骨粗鬆症と同様に高齢者では罹患率が上昇していて [6]，新たな国民病として認識されるようになってきた．CKD は糖尿病と並んで二次的に骨折リスクを上昇させる疾患とされており [7]，CKD 罹患で大腿骨近位部骨折リスクは上昇し，CKD 患者で 5.2%と上昇している [8]．その早期から骨折リスクが上昇する [9] ことを考慮すると, CKD を原因とする続発性骨粗鬆症の患者は相当数いると考えられている．

2. 新しい概念としての CKD-MBD

CKD は近年になって，その早期から骨や副甲状腺だけでなく，心血管系にも異常を生じ，生命予後に悪い影響を与える全身の病気として認識されてきた [10,11]．このことより，CKD に伴うカルシウム／リン代謝異常を，骨の病気ではなく，血管石灰化なども含む全身の病気としてとらえようというパラダイムシフトが起き，“CKD-MBD”（慢性腎臓病に伴う骨・ミネラル代謝異常：chronic kidney disease-mineral and bone disorder）という新しい用語が提唱された [12]（図 2）．図に示すように，CKD-MBD は，Ca，P，PTH などの検査値異常，骨の異常，血管石灰化の 3 種類の以上の組み合わせによって構成される．それぞれの異常を有効に予防，治療する努力をするところは従来と同じであるが，その結果として心血管イベントの低下，骨折率の低下，そして生存率の改善を最終的な目標にしているところが，その趣旨である．

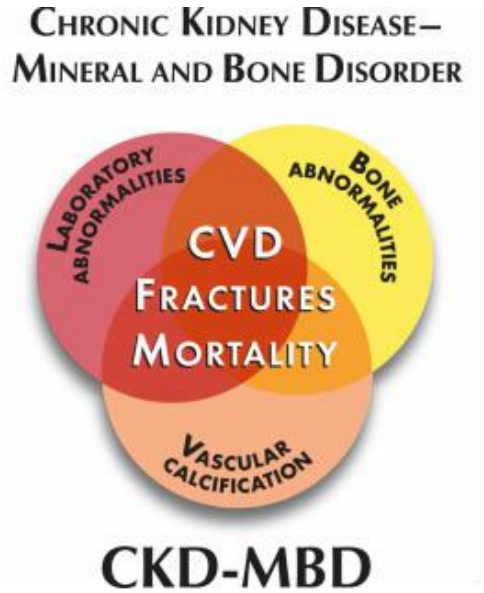

図 2．CKD-MBD は，Ca, P, PTH などの検査値異常，骨の異常，血管石灰化の 3 種類の異常の組み合わせによって構成される．(KDIGO より引用)

※KDIGO (Kidney Disease: Improbing Global Outcome) 欧米，オーストラリアの各ガイドライン機構が中心となって共通した国際的腎臓病ガイドラインを構築するために設立された非営利団体.

3. 慢性腎臓病による「骨の異常」の詳細はわかっていない

CKD 患者の骨脆弱性を考える上で重要な要素のひとつは骨質劣化という概念である．というのも，CKD の骨脆弱性は骨量減少よりも骨質異常に起因するところが大き

く，CKD の骨折リスクは骨密度から予測することができない[9,13,14]とされているからである.

2001 年に米国国立衛生研究所(NIH)より骨密度では説明がつかない骨強度を規定する複合要素を総括した「骨質」の概念が提唱[15]されてから 15 年経過している．骨質はその重要性は認識されているものの，規定する因子の複雑さや多様性から分析が難しい．しかしながら，骨密度から推定されるよりも高頻度に骨折を引き起こす続発性骨粗鬆症における骨質異常の制圧は，骨折予防・寝たきり予防という目標を達成するために避けては通れない事項である.

CKD 患者に生じる骨代謝異常 CKD-MBD は，二次性副甲状腺機能亢進症(secondary hyperparathyroidism: SHPT)や無形成骨，ビタミン D 欠乏，低 Ca 血症，高 P 血症，酸化ストレスなどを引き起こすことがわかっているが，それらによって骨の分子，構造体，組織の各々の階層レベルにどのような変化（骨質異常）が生じ，骨の強度特性にどのような影響を生じるのかについてはまだ十分な知見が蓄積されていない.

4. 進行期慢性腎臓病の「骨の異常」に対する薬物治療は未確立である

CKD 患者は高齢者や閉経後女性を多く含んでおり，老人性骨粗鬆症，あるいは閉経後骨粗鬆症の骨代謝異常を併せ持っている患者は少なくない．CKD-MBD の「骨の異常」に対する予防，治療に着目すると，ステージの進んだ進行期 CKD 患者では原発性骨粗鬆症の中心的治療薬であるビスフォスフォネート（bisphosphonate: BP）製剤と PTH 製剤テリパラチド（teriparatide: TPD）はいずれも腎代謝の薬剤であり，使用が制限される．そのため進行期 CKD 患者の骨粗鬆症に対する治療に関しては，ほとんどエビデンスがないのが現状である. 具体的には生化学異常を有するステージ 3 の患者，および CKD ステージ 4~5 の患者では，これらの骨粗鬆症治療薬はその有効性が十分には検証されておらず，また長期的な影響が明らかでないことから，骨量減少の治療に用いることは推奨されていない[16].

骨脆弱性が問題となる進行期 CKD の患者に対する骨粗鬆症治療薬の有効性については，安全性の観点や倫理的な側面からも臨床試験を実際に行うことは難しく，動物モデルなどを用いた代替手段による検証を行う以外には検証が難しい．そこでわれわれは，CKD モデルラットを用いて治療効果および副反応の検証などを多面的に行い，骨折予防効果と副作用の検証を行うこととした.

5. 本研究の目的

第一章では CKD ステージ 4 相当のモデル動物作製のプロトコルを確立するため，ラットに対して 5/6 腎摘を行ったあとに採血を行い，モデル動物の妥当性の検証を行った．第二章では，第一章で作製したモデルラットを用いて，CKD によって生じる骨質異常の詳細と，実臨床では検証困難なステージ 4 の CKD に対する BP 製剤および TPD 製剤の治療効果と安全性について調査した．

略 語 表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

ALN	alendronate
BMD	bone mineral density
BUN	blood urea nitrogen
Ca	calcium
CKD	chronic kidney disease
CKD-MBD	chronic kidney disease-mineral and bone disorder
CRE	creatinine
CT	computed tomograpphy
eGFR	estimated glomerular filtration rate
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FGF23	fibloblast growth factor 23
FTIR	Founrier transform infrared spectroscopy
GFR	glomerular filtration rate
IP	inorganic phosphorus
i-PTH	intact parathyroidhormone
Nx	nephrectomy
PTH	parathyroidhormone
P1NP	procollagen-type 1 N-terminal propeptide
SHPT	secondary hyperparathyroidism
TPD	teriparatide

第 一 章
進行期 CKD モデルラットの作製

緒 言

透析となる CKD ステージ 5 の患者を除くと，骨の異常に対する治療が問題となるのは主に CKD ステージ 4 の患者であり，骨粗鬆症治療薬の有効性と安全性を検証するためには CKD ステージ 4 相当のモデル動物を用いた実験が妥当であると考えられる.

腎機能に影響を及ぼす因子としては，直接的な腎臓へのダメージ（腎摘出や薬剤投与など）以外に食料に含まれる栄養素によってかかる腎臓への負担も考慮しなければならない [17,18]．よって動物モデルの作製には腎摘出の程度と，食餌内容を検討する必要がある．Miller らはラットに対して部分腎摘出を行い，食餌に含まれるカルシウムとリンの含有量を調整することで，腎摘ラットが様々な程度の腎機能障害とミネラルバランス異常や SHPT を呈することを報告している [19]．本研究では，この先行研究を参考に CKD ステージ 4 相当のモデル動物を作成することとした.

ヒトにおける CKD のステージングは，年齢と性別および採血で血清クレアチニン値（creatinine: CRE）を計測することによって，推算糸球体濾過量（estimated glomerular filtration rate: eGFR）を計算し（日本人の eGFR 計算式 : $eGFR(ml/分/1.73m^2)=194\times Cr^{-1.094}\times 年齢(歳)^{-0.287}$，女性はこの値に 0.739 を乗ずる）[20]，その値に応じて病期分類を行う．しかし，動物モデルにおいては eGFR を算出する手法がないため，CRE の計測では CKD ステージを決定することができない.

実際の臨床においては CKD ステージ 2 からすでに線維芽細胞増殖因子 23（fibloblast growth factor 23: FGF23）が上昇し始め [21]，CKD ステージ 3 から PTH が上昇，CKD ステージ 4 から高リン血症，CKD ステージ 5 から低カルシウム血症を呈するということがわかっている [22]（図 3）ので，本章では血清学的検査を行うことでモデル動物の CKD ステージングを行い，目的とする CKD ステージ 4 相当のモデルラットが作製されたかどうかを調査した.

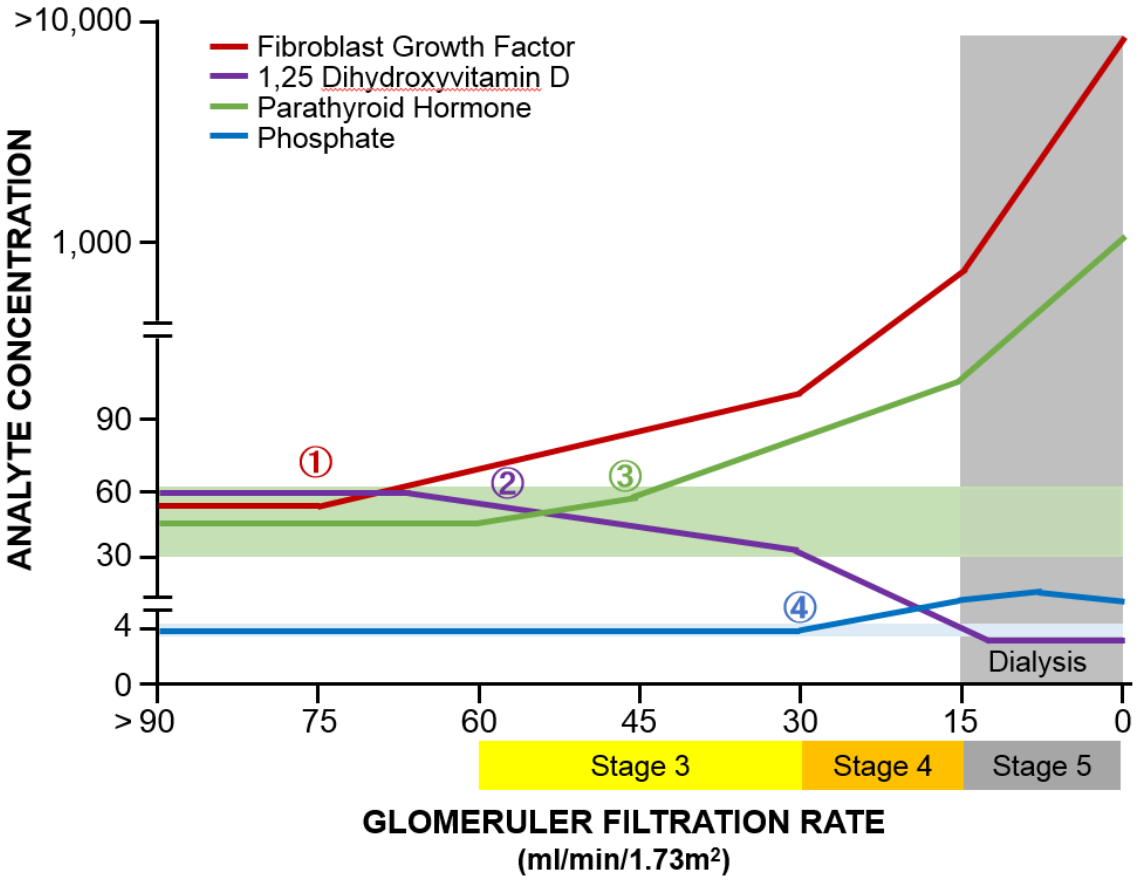

図 3. 糸球体濾過量と各検体濃度との関係

FGF-23 は CKD 早期から上昇し始め，副甲状腺ホルモンは CKD ステージ 3 から上昇する．血清リン値は CKD ステージ 4 になって上昇する．

（文献 22 より引用改変）

実 験 方 法

倫理規定

本研究のために実施した動物実験はすべて北海道大学動物実験に関する規程に従って実施した.

実験動物

Miller らの方法に準じて雄性 SD ラット(日本クレア，東京，日本)に対して 5/6 腎摘出（nephrectomy; Nx）する群（CKD）と後腹膜切開のみを行う群（Sham）とに分けた．食餌は本学の動物実験施設で通常使用されているカルシウム含有 0.98%，リン含有 0.80%のラボ MR ストック(日本農産工業，神奈川，日本)で飼育し，8 週齢で左腎臓を 2/3 摘出し，2 週間の回復期間をおいた後に，10 週齢で右腎臓を全摘してトータル 5/6Nx（図 4）とし，14 週後の 24 週齢で尾静脈採血を行い CKD モデルの検証をした.

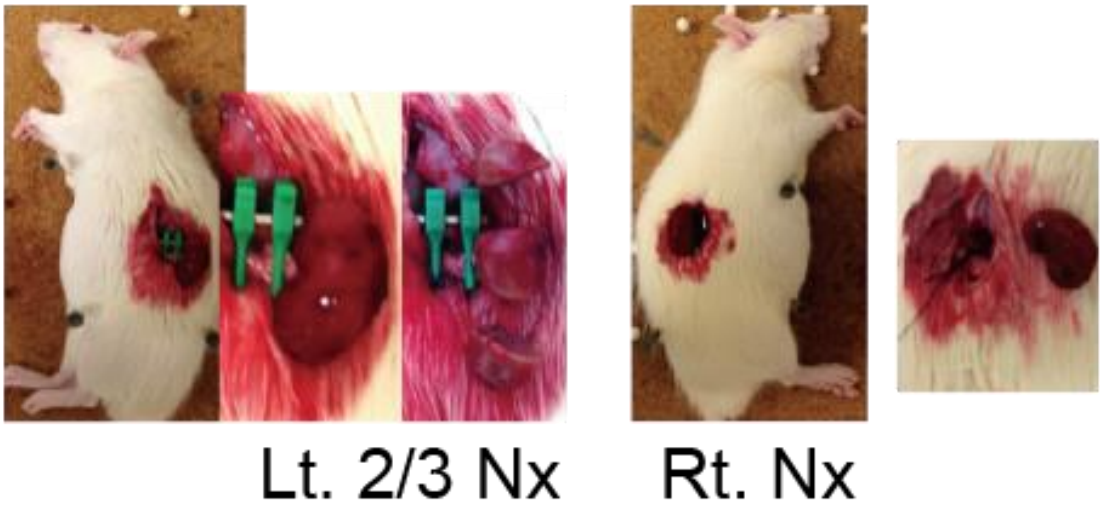

図 4. 5/6 腎摘モデルラットの作製

8 週齢で左腎 2/3 の摘出を行い（左図），2 週間の回復期間の後に右腎全摘を行い（右図）

トータル 5/6 腎摘とした.

血清電解質と腎機能，リン利尿ホルモンの測定

24 週齢時点で麻酔下に尾静脈採血を行った．採取した静脈血は遠心分離機で 4℃，3000rpm で 5 分遠心し，血清のみを抽出した．PTH の半減期は短いため，採取後速やかに抽出するようにした．

血清電解質(Ca, IP)と腎機能(BUN, CRE)測定はオリエンタル酵母工業株式会社長浜ライフサイエンスラボラトリー（滋賀，日本）に委託検査を依頼した．リン利尿ホルモンは ELISA キットにより血清 intact-PTH (Immutopics, San Clemente, CA)，血清 FGF-23 (カイノス，東京，日本)濃度を測定した．

統計分析

得られたデータは，Student's T-test を用いて有意差検定を行い，判定は P 値＜0.05 で有意差ありとした．データは mean±SD で表した．

実 験 結 果

5/6Nx とラボ MR ストックの飼育でモデルラットは CKD ステージ 4 に相当する腎障害を呈した

10 週齢時の 5/6Nx と，カルシウム含有 0.98%，リン含有 0.80%の通常飼料による 14 週間の飼育後, CKD の重症度がどの程度進んでいるかを評価するために血清学的検査を行った．24 週齢時点の採血で，Sham 群と比較し CKD 群は腎機能障害と高リン血症を認め，血清 Ca 値に変化はなかった．リン利尿ホルモンである FGF-23 と i-PTH は上昇した（図 5）.

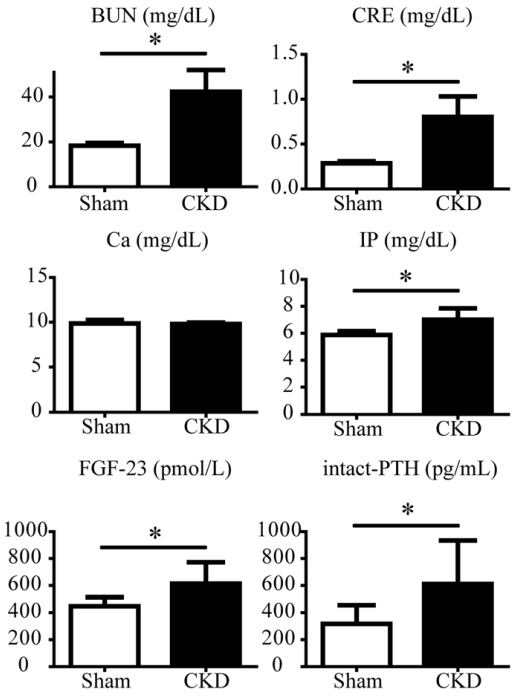

図 5. 24 週齢時の腎機能，ミネラル，リン利尿ホルモンの結果
CKD 群は腎機能障害，高リン血症，高 FGF-23 血症，高 i-PTH 血症を呈したが，血清 Ca 値に変化はなかった.

考 察

Miller らの報告によると，10 週齢で 5/6Nx を施行したラットに対してカルシウム含有 1%，リン含有 0.7%で飼育すると，24 週齢の時点で高 PTH 血症となるが高リン血症は呈さず，カルシウム含有 0.6%，リン含有 0.8%の場合ではより重度の高 PTH 血症と高リン血症を呈するが低カルシウム血症は呈さないとなっていたため，本動物モデル（カルシウム含有 0.98%，リン含有 0.80%）ではその中間程度の腎不全となることが予想された．実際に CKD 群では血清 Ca 濃度は変化なく，mild な高リン血症と高 PTH 血症を呈する状態となり，実験の再現性が得られた．i-PTH の上昇と，高リン血症を認めるが，血清 Ca 値は変化しないという結果から，SHPT を呈する CKD ステージ 4 に相当する腎不全モデル動物を，単純な外科的処置と通常の飼育飼料で作製するプロトコルを確立した．

	CKD stage				
	1	2	3	4	5
CRE	→	→	↑	↑	↑
FGF-23	→	↑	↑	↑	↑
i-PTH	→	→	↑	↑	↑
IP	→	→	→	↑	↑
Ca	→	→	→	→	↓

図 6. CKD ステージングとリン利尿ホルモン，ミネラル値の関係
臨床においては，CKD ステージ 2 から FGF-23 は上昇し始め，ステージ 3 から高 i-PTH 血症（二次性副甲状腺機能亢進症）が始まる．一方，IP や Ca などのミネラル値はステージ 3 までは保たれることがわかっており，IP はステージ 4 から上昇，Ca はステージ 5 になって減少する．
本章で作製した動物モデルは CKD ステージ 4 に相当する．

第 二 章

進行期 CKD モデルラットの骨質異常と骨粗鬆症治療薬の治療効果と安全性の検討

緒 言

CKD 患者は一般人口に比べて 2~14 倍の骨折リスクを有する[8,23]とされており, CKD が進行するにつれて骨折率も上昇する[24,25]．CKD の骨脆弱性は，骨量減少よりも骨質異常に起因するところが大きいため, CKD の骨折リスクは骨密度から予測することができない[9,13,14]．CKD 患者では骨の分子，構造体，組織の各々の階層レベルにどのような骨質異常が生じ，骨の強度特性にどのような影響を生じるのかについてはまだ十分な知見が蓄積されていない.

また，CKD 患者における骨粗鬆症の管理の問題は，とくに易骨折性が問題となる進行期 CKD 患者に対する安全かつ効果的な薬物療法が確立していない点である．ステージ 1~3 の CKD 患者では，一般人と同様に BP 製剤や TPD 製剤などの骨粗鬆症治療薬により骨折リスクを低下させる[26]ことがわかっている．しかし，進行期・末期となるステージ 4 や 5 での骨粗鬆症治療薬の安全性や効果については，安全面・倫理面の問題から臨床治験が行われておらず, 慎重投与あるいは禁忌となっている薬剤が多い. したがって，動物実験によってこれら薬剤の効果を検証することで得られる知見は，進行期 CKD 患者の骨粗鬆症に対する治療戦略を立てるための重要な参考情報となりうる.

そこで，本章では第一章で作製した CKD モデルラットを用いて骨の解析と治療薬の効果および副反応の検証などを多面的に行い，骨質異常の詳細や骨折予防効果および副作用の検証を行うこととした.

実 験 方 法

使用動物及び CKD モデルの作製

本研究のために実施した動物実験はすべて北海道大学動物実験に関する規程に従って実施した．SD ラット(日本クレア，東京，日本) 24 匹を用いて実験を行った.

治療スケジュール

24 週齢で CKD モデルとした後，すべてのラットを無作為に Vehicle control 群，alendronate（ALN）投与群，TPD 投与群に分け，Sham 群と合わせて 4 群に分けた．ALN (LKT Laboratories, Inc, MN)は 50μg/kg/day，TPD (Forteo®; Eli Lilly, Ltd.，神戸，日本)は 40 μg/kg/day で 4 週間毎日皮下投与した（図 7）.

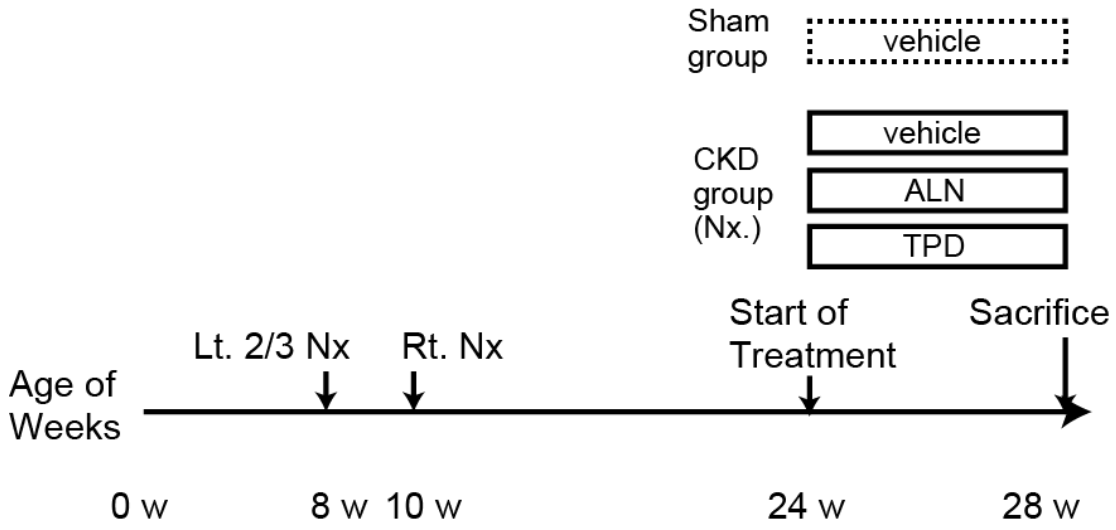

図 7. 治療スケジュール（研究デザイン）

血清電解質と腎機能，リン利尿ホルモンの測定

治療開始前と終了時の差を見るために，24 週齢から 4 週間投薬後の 28 週齢の時点で麻酔下に尾静脈採血を行った. 採取した静脈血は遠心分離機で 4℃，3000rpm で 5 分遠心し，血清のみを抽出した．PTH の半減期は短いため，採取後速やかに抽出するようにした.

血清電解質(Ca, IP)と腎機能(BUN, CRE)測定はオリエンタル酵母工業株式会社長浜ライフサイエンスラボラトリー（滋賀，日本）に委託検査を依頼した．リン利尿ホルモンは ELISA キットにより血清 intact-PTH (Immutopics, San Clemente, CA)，血清 FGF23 (カイノス，東京，日本)濃度を測定した.

マイクロ CT

右大腿骨，および第 5 腰椎をマイクロ CT (CT, R_mCT2; Rigaku, Tokyo, Japan)を用いて 1 ピクセルあたり 20 μm の解像度で撮影した．骨微細構造や 3 次元的骨形態計測の解析はアメリカ骨代謝学会のガイドラインに従い，ラトック社の骨量解析ソフト TRI/3D-BON (Ratoc System Engineering 社, Tokyo, Japan)を用いて行った[27]．大腿骨の測定関心領域は成長板から 500 μm 近位の 2000 μm の範囲とし，第 5 腰椎の測定関心領域は上端と下端の成長板までの間の海綿骨領域とした．

海綿骨領域の評価の指標として骨密度(volumetric bone mineral density: vBMD)，骨量(Bone Volume/ Tissue Volume: BV/TV)，骨梁幅(Trabecular Thickness: TbTh)，骨梁数(Trabecular Number: TbN)，また皮質骨領域の評価の指標として皮質骨幅(Cortical Thickness: CtTh)，極慣性モーメント(polar moment of inertia: J)を算出した．

力学試験

マイクロ CT 撮像後，右大腿骨を力学試験に供した．骨幹部における 3 点曲げ破壊試験を万能力学試験器(RTC-1310, AND Corp., Tokyo, Japan)を用いて行った．大腿骨は 14mm の間隔で，大腿骨の前面を治具の上方向にして骨折部における力学試験を行えるように設置した．押し込みは 0.2mm/min の速度で破壊するまで行った．破断強度(N)と剛性(N/mm)を強度 - 変位曲線より算出した．また弾性率や曲げ応力などの材料そのものの力学強度も算出した[28]．

組織学的検討

左大腿骨を 70 %エタノールで 3 日間浸漬固定した後，Villaneuva Bone 染色を行い，非脱灰硬組織標本を作製した．安楽死させる 10 日前，3 日前にカルセイン(20 mg/kg ; Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) をそれぞれ皮下投与し，骨形成を観察するための骨標識を行った．非脱灰硬組織標本の作製は新潟骨の科学研究所(新潟，日本)で行った．

Villaneuva Bone 染色は非脱灰骨組織標本の染色法として用いられ，類骨や石灰化骨の観察に適している．また，カルセインやテトラサイクリンで標識する事により，骨形成の動的な指標の測定が可能である．以下に標本の作製方法の概略を述べる．

摘出した大腿骨を 70 %エタノールで固定後，Villaneuva Bone Stain に 4 日間浸透させる．Villaneuva Bone stain の調整は以下の通りである．

Azull II1.5 g

酢酸 Na 三水和物 13.6 g

ベーシックフクシン 5 g

Fast Green FCF1.5 g
Orange G3.75 g
95 %エタノール 100 ml
酢酸 6 ml
蒸留水 900 ml
染色後，エタノールで脱水し，メチルメタクリレートモノマー樹脂に包埋し，30-40℃で約 10 日間重合させる．出来上がったブロックを成型し，ミクロトームを用いて厚さ 5μm の薄切切片を切り出し，封入する．

骨切り周囲の仮骨の組織量，骨量，類骨量，骨面，骨芽細胞数，骨芽細胞面，カルセインで標識された面，標識幅を測定した．得られたパラメータから，破骨細胞数/骨面，骨吸収面/骨面，骨芽細胞面，骨石灰化速度，骨形成速度/骨面，骨石灰化面/骨面を算出した[29].

フーリエ変換型赤外分光(FTIR)イメージング

FTIR イメージングを用いて骨の組成の変化を解析した. 組織形態学的評価用に作成した左大腿骨の厚さ 3μm の冠状断未脱灰薄切切片をフッ化バリウム基板(ピアオプティックス) にマウントし, Spectrum Spotlight 400 Imaging System (Perkin Elmer, MA, USA) により赤外イメージングと赤外スペクトルを得た. 骨質解析では, $PO4^{3-}$(1,183～985 cm^{-1}), CO_3^{2-}(895～849 cm^{-1}), Amide I (1,707～1,599 cm^{-1})バンドの高さや面積を用いて石灰化度($PO3^{4-}$/Amide I), 炭酸塩含有率($CO3^{2-}/PO3^{4-}$)を大腿骨遠位において測定した[30] .

統計分析

Sham 群と CKD 群の群間検定には Student's T-test を用いて有意差検定を行い，CKD のそれぞれの治療群間の検定には Newman-Kuels tests を用いて有意差検定を行った. 判定は P 値＜0.05 で有意差ありとした．データは mean±SD で表した.

実 験 結 果

骨粗鬆症治療薬による腎機能とミネラル代謝に対する影響（図 8）

腎機能に対する骨粗鬆症治療薬投与の影響を評価するため，血清 BUN,と CRE を測定した．溶媒のみを 4 週間投与した Vehcle 群では BUN と CRE はほぼ横ばいで経過し，薬剤投与開始時点からの経時的な腎機能の悪化はみられなかった．薬剤を 4 週間投与した後の BUN 値と CRE 値は，Vehcle 群，ALN 群，TPD 群の間に有意差はなかったことから，CKD ステージ 4 に相当する状態においても 4 週間の ALN あるいは TPD 投与は腎機能に悪影響は及ぼさない可能性が示唆された.

ミネラル代謝については血清 Ca, IP に加えて，リン利尿ホルモンである FGF-23 と i-PTH を測定した．無治療の CKD 群に相当する Vehcle 群では血清 IP, FGF-23，i-PTH は高値のまま，薬剤投与開始時点から 4 週間の間，横ばいで経過した．ALN を 4 週間投与すると血清 Ca 値は Vehcle 群と比較して有意に低下した．血清 IP 値の変化は統計学的に有意なものではなかったが，ALN 投与によって高リン血症が是正され，Sham 群（健常ラット）の血清 IP 値と同等のレベルまで低下した．ALN 投与によって FGF-23 と i-PTH は増加傾向を示した．一方，TPD を 4 週間投与しても血清 Ca, IP 値ともに有意な変化は生じず，高リン血症の状態のまま経過した．リン利尿ホルモンである FGF-23 と i-PTH は，いずれも TPD 投与によって減少傾向を示したことから，高リン血症にとっては不利な状況と考えられた.

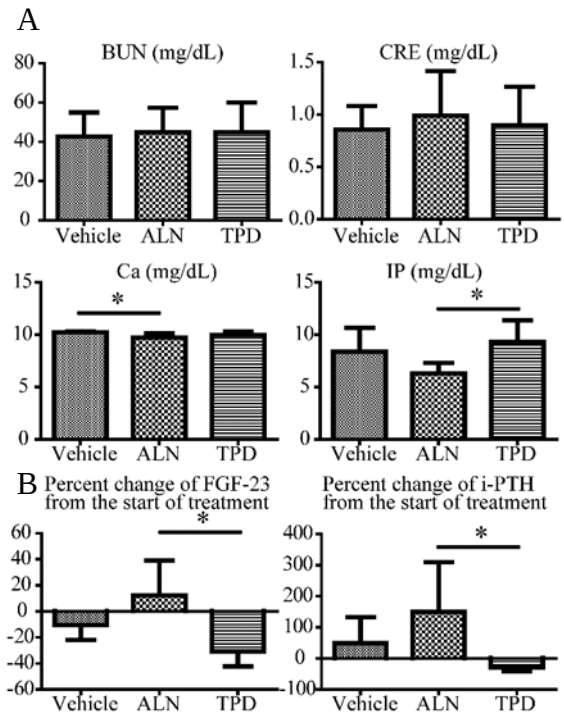

図 8. ALN と TPD 投与による腎機能, ミネラル代謝, リン利尿ホルモンに対する影響の評価

A) 薬剤投与 4 週間後の血清 BUN, CRE, Ca, IP．両群とも腎機能の悪化はなく, ALN 群でのみ血清 Ca 値が低下した.

B) リン利尿ホルモン FGF-23，i-PTH．同一個体毎の 4 週間投与の変化率の平均値を示す. ALN 群で増加傾向，TPD 群で減少傾向を示した.

骨量や骨微細構造に対する影響

マイクロ CT を用いて，大腿骨遠位と第 5 腰椎の骨量と骨微細構造の変化を評価した（図 9）.

Vehicle 群（CKD ラット）の海綿骨骨密度(volumetric bone mineral density: vBMD)は大腿骨遠位，第 5 腰椎ともに Sham 群（健常ラット）と比較して有意な変化はみられなかった．また，骨量(Bone Volume/ Tissue Volume: BV/TV)については Vehicle 群で有意に増加していた．これらの変化は CKD における骨脆弱性が骨密度よりも骨質劣化が主体であるとする実臨床における観察研究結果と合致する．骨量が Vehicle 群で増加したのは SHPT による石灰化度の低い新生骨の形成を反映していると考えられた.

次に薬剤投与の影響について検討した．ALN 群では Vehicle 群と比較して大腿骨遠位部の BV/TV が有意に増加した．ほかの骨微細構造パラメータも有意差はなかったが，増加傾向を示した．TPD 群ではマイクロ CT で視覚的にはっきりわかるほど骨量と骨微細構造における改善効果が得られた．大腿骨遠位と第 5 腰椎の両方において，Vehicle 群と比較して vBMD，BV/TV，骨梁幅(TbTh)，皮質骨幅(CtTh)，極慣性モーメント(J)が統計学的に有意に増加した.

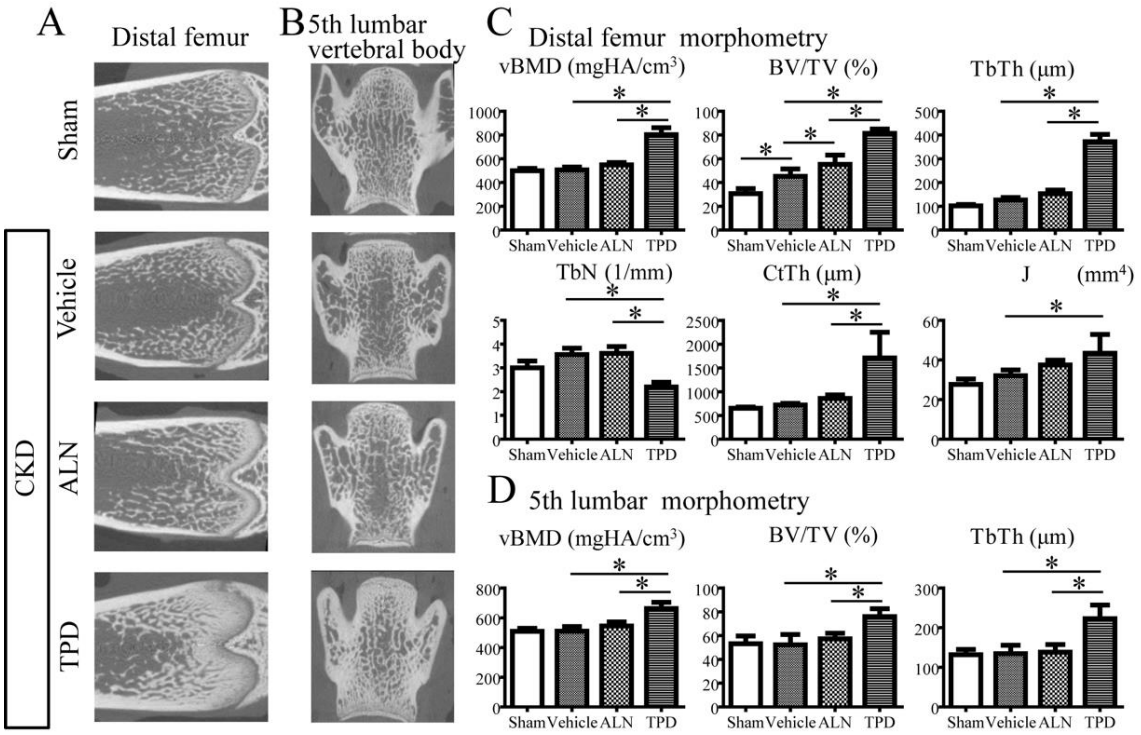

図 9. 骨量，骨微細構造の評価

A,B) 28 週齢時の大腿骨遠位および第 5 腰椎のマイクロ CT イメージ．C,D) Vehicle 群(CKD)は大腿骨遠位の骨量増加を認めた．ALN 群では大腿骨遠位のみ骨量(BV/TV)の上昇を認め，TPD 群では骨密度(vBMD)，骨量，海綿骨構造(TbTh，TbN)，皮質骨構造(CtTh，J)それぞれの上昇を認めた.

力学的特性に対する影響

次いで, CKD によって骨の強度がどのように変化するかを大腿骨 3 点曲げ試験によって評価した（図 10）.

Vehicle 群の最大荷重(Ultimate load)と剛性(Stiffness)は Sham と同等であった. しかし, 材質特性をあらわす弾性率(Elastic modulus)と曲げ強度(Bending strength)は，いずれも Vehicle 群で低下しており，CKD によって材質劣化が生じることが明らかとなった.

薬剤による骨強度改善効果については TPD でのみ有意な治療効果が観察された. TPD 群では，Vehicle 群と比較して最大荷重と弾性率，曲げ強度がそれぞれ有意に高値であった．一方，ALN 群ではいずれのパラメータも増加傾向ではあったが有意な増加ではなかった.

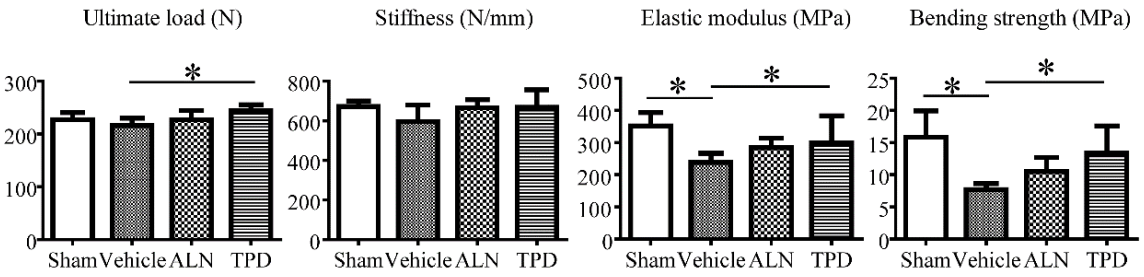

図 10. 大腿骨 3 点曲げ試験による力学的特性に対する影響の評価

CKD による骨質異常は材質特性である弾性率(Elastic modulus)と曲げ強度(Bending strength)を低下させる劣化が起こっていた．ALN の投与による変化は認めなかったが，材質特性の劣化を改善させる傾向を認めた．TPD 投与では最大荷重(Ultimate load)を増加させ，弾性率と曲げ強度も優位に改善した.

骨代謝に対する影響

CKD による骨代謝への影響と薬剤の効果を明らかにするために, 我々は投与 4 週間後の大腿骨遠位を用いて組織学的評価を行った. 明視野で赤紫色に観察される部分は, 骨を作る細胞である骨芽細胞が分泌した類骨であり，類骨はカルシウムやリンなどのミネラル成分が沈着して硬い骨に置換される．その際，類骨に取り込まれるカルシウムにカルセインが結合するため，動物の屠殺前に間隔をあけて投与されたカルセインは，骨が形成されている部分では二重にラベリングされ，その間隔から骨形成の速度を算出することができる．形態計測では骨量(BV/TV: Bone Volume/ Tissue Volume)，吸収パラメータとして吸収面(ES/BS: Erosion Surface/ Bone Surface)，形成パラメータとして類骨量(OV/TV: Osteoid Volume/ Bone Volume)，骨芽細胞面(Ob.S/BS: Osteoblast Surface/ Bone Surface)，骨石灰化速度(MAR: Mineral Apposition Rate)，骨形成速度(BFR/BS: Bone

Formation Rate/ Bone Surface)を計測した．Sham 群と比較して Vehicle 群は類骨が多くなっており，カルセインの 2 重標識間隔も広がっていることから二次性副甲状腺機能亢進症を反映した高骨代謝回転になっていることがわかったが，骨形態計測の定量的評価では有意差はなかった．ALN 群は骨量に変化を認めず，吸収パラメータと形成パラメータのいずれも有意に抑制し，骨代謝回転を抑えていることがわかった．TPD 群はさらに骨形成パラメータを上昇させ，有意な骨量の増加を認めた．

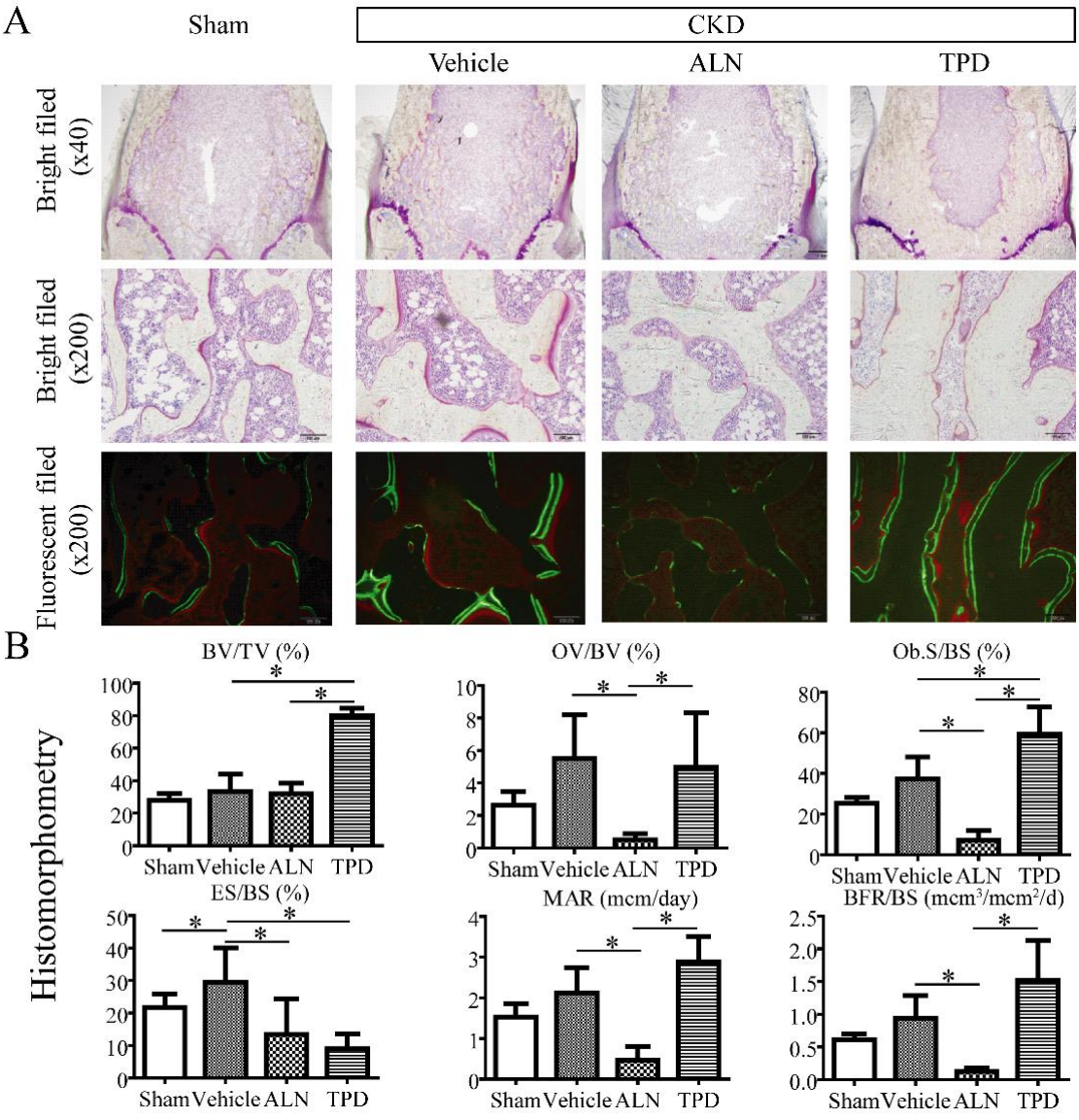

図 11. 大腿骨遠位の組織を用いた骨形態計測結果

A) ビラヌーバ染色における冠状断像（上中段：自然光，下段：蛍光）．Vehicle 群は二次性副甲状腺機能亢進症を反映した高骨代謝回転となっていた．ALN 群は骨代謝回転を抑制し，TPD 群は骨代謝回転を亢進させて骨量を増加させた．

B) 骨形態計測結果．

骨質に対する影響

骨の材質を可視化する手法である FTIR イメージングを用いて，骨質への影響を評価した．大腿骨遠位の海綿骨と皮質骨を用いて骨質のパラメータである石灰化度($PO3^{4-}$/Amide I)と炭酸塩含有率($CO3^{2-}$/$PO3^{4-}$)を計測した．Vehicle 群は海綿骨と皮質骨のいずれにおいても炭酸塩含有率が低下しており，CKD による代謝性アシドーシスを反映した結果と考えられた[31 32]．ALN 群では海綿骨と皮質骨で炭酸塩含有率が増加しており，代謝性アシドーシスが改善している可能性が示唆された．TPD 群は皮質骨の石灰化度と，海綿骨の炭酸塩含有率を有意に上昇させたが，皮質骨の炭酸塩含有率には影響を及ぼさなかった．

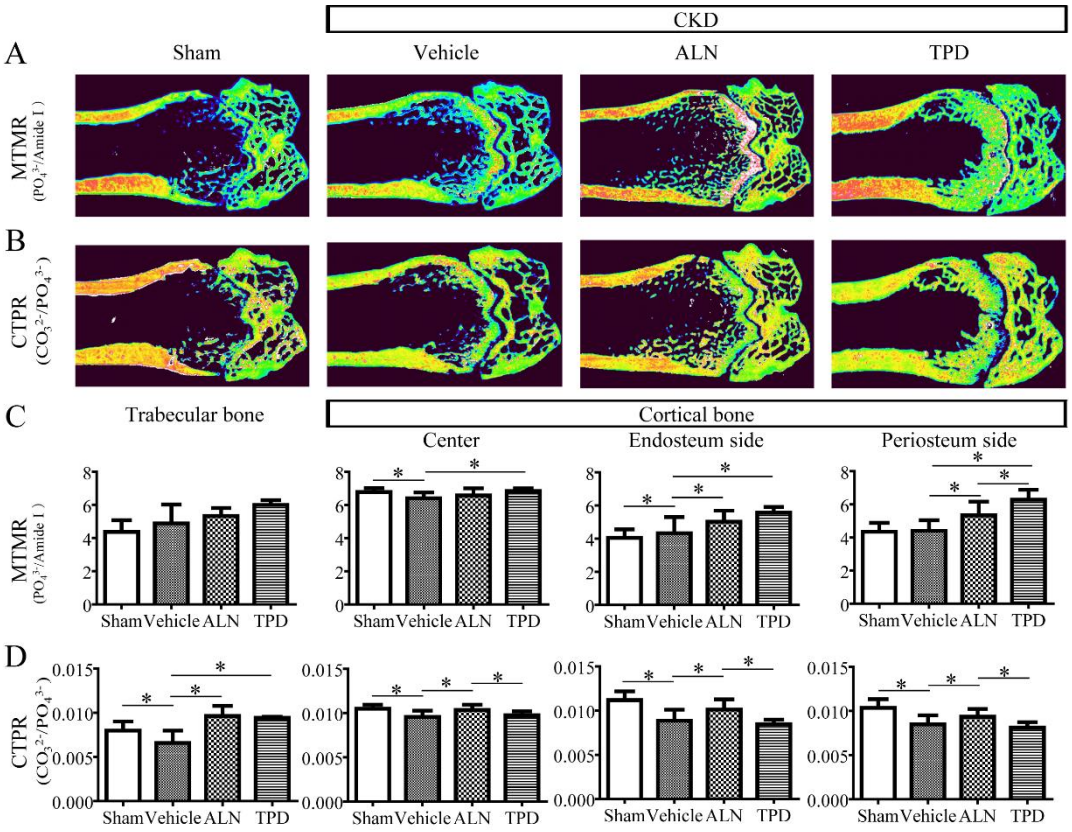

図 12. FTIR の結果

A,B) 大腿骨遠位部の石灰化度と炭酸塩含有率を表す FTIR イメージ像.

C,D) 海綿骨と皮質骨における定量的な解析結果．CKD による炭酸塩含有率の低下（代謝性アシドーシス）を認め，ALN 投与によって炭酸塩含有率の低下が回復した.

考 察

本章の第一の目的は CKD によって引き起こされる「骨の異常」を明らかにすることである．本研究結果で解析を行った CKD モデルラットは，SHPT を伴った高骨代謝回転の CKD ステージ 4 に相当するモデルである．このモデルでは骨密度や骨量の減少はないが，炭酸塩含有率低下などの骨質異常が生じ，弾性率や曲げ強度といった骨の材質強度特性が劣化していた．これらの知見は，CKD の骨脆弱性は，骨量減少よりも骨質異常に起因するところが大きいため, CKD の骨折リスクは骨密度から予測することができない[9,13,14]とする報告と矛盾しなかった．これらの変化は主に CKD の代謝性アシドーシスや高骨代謝回転の結果もたらされると推測された.

本研究の次なる目的は，安全性や倫理的な面から臨床試験を行うことが難しい進行期 CKD に対する骨粗鬆症治療薬の有効性と安全性を解明することである[33,34]. 一般的には，CKD-MBD の治療として，食品中のリン摂取制限およびリン吸着薬の投与が中等度から比較的重度となるステージ 3 および 4 の CKD における初期治療として使用される[35]．これらの治療によって血清の i-PTH を下げられない場合は次の治療として活性型ビタミン D 製剤の投与が行われる[36]．シナカルセト塩酸塩は calcium sensing receptor (CaSR) に対して allosteric agonist に作用し，PTH 分泌を抑制する化合物である．シナカルセト塩酸塩は SHPT に対して有効な治療法であるが，透析に至っていない保存期 CKD ステージ 3 および 4 の患者に対する投与は認可されていない[37]. また，これらの治療は，骨折予防に対する有効性がはっきりしていない．一方，BP 製剤や TPD 製剤を含む骨粗鬆症治療薬は，CKD ステージ 1 から 3 の患者の骨折予防に有効性が確認されていることから，ステージ 4 の患者に対しても骨折予防効果を発揮すると予想される．すなわち，進行期 CKD 患者に対してこれらの治療薬が安全に使用できるのであれば，脆弱性骨折のリスクを有する閉経後骨粗鬆症やステロイド性骨粗鬆症などを併存する患者に対する骨折予防の治療として，有効な治療選択の一つとなりうる[38].

本研究結果は，原発性骨粗鬆症の第一選択薬である BP 製剤[39]は， CKD ステージ 4 の患者にも安全かつ有効に使用できる可能性があることを示した．4 週間の ALN 投薬では，骨強度は増加する傾向を認めるのみであったが，FTIR やマイクロ CT による解析では皮質骨の骨質を改善し，大腿骨遠位の骨量を増加させた．この結果から，より長期に投与すれば骨強度も改善しうると考えられる．BP 製剤治療の安全性に関しては，ALN は腎機能を悪化させることなく高リン血症を是正した．さらに ALN 群では海綿骨と皮質骨の炭酸塩含有率を上昇させたことから ALN は CKD の代謝性アシド

ーシスを改善する可能性が示唆された．これらの結果は，いくつかの臨床研究において，BP が CKD ステージ 4 の患者の腎機能を悪化させることなく骨折リスクを効果的に低減させるという知見と一致している[40,41].

本研究におけるもう一つの重要な研究課題は，TPD 製剤が SHPT 条件下でも骨代謝に対するアナボリックな作用を示すかどうかという点である．我々のデータは SHPT 条件下においても，TPD の間欠的投与がさらに全身の骨代謝回転を骨形成優位に亢進させ，アナボリックな作用を発揮することを示した．これまでに軽度から中等度の腎機能障害である CKD ステージ 1 から 3 までの閉経後骨粗鬆症患者に対する TPD 製剤治療の有効性は報告されていたが[42], SHPT 条件下の CKD のステージ 4 に対する TPD 製剤治療がアナボリックに作用することを明確にしたのは本研究が初めてである．著明な骨量増加に加えて，石灰化度の増加，骨微細構造の改善などのデータも，これを支持する結果となっている．

TPD 製剤治療の安全性に関しては, CKD ステージ 4 に相当するラットに 4 週間 TPD を投与しても腎機能障害のさらなる悪化は生じなかった．骨代謝回転のさらなる亢進が観察されたことから，血清 Ca, IP に異常が生じることが懸念されたが，血清 Ca は正常のままで，高リン血症についても明らかな増悪は観察されなかった．しかしながら，リン利尿ホルモンである FGF-23 と i-PTH は TPD 投与によって減少傾向を示したことから，リンの排泄が減少して高リン血症の増悪につながる可能性が示唆された．間欠的な TPD 製剤投与の応答として，血清の FGF-23 のレベルが減少するか否かについては意見が分かれている．そのため，進行期 CKD 患者に対する TPD 間欠的投与療法の適応については慎重になるべきと考えられた[43 44 45].

本研究の限界点として，第一には CKD-MBD に関連する血清ビタミン D やスクレロスチンの濃度を計測していない点があげられる．これらのパラメータを測定することができれば骨粗鬆症治療薬によるリン利尿ホルモン等が変化する分子メカニズムが解明できるかもしれない. 5/6Nx による腎機能障害によって 1α ヒドロキシラーゼ活性が抑制されるため，CKD ラットの活性型ビタミン D 血清濃度は減少しているはずであるが，進行期 CKD における BP 製剤または TPD 製剤治療がビタミン D 及びスクレロスチン濃度にどのような影響をあたえるかは, 今後の研究課題である. 本研究では, ラットを生かしたまま採取できる血清の量には限界があるため，これらの血清濃度を測定することができなかった．第二に，この研究で使用した TPD 投与量は，FDA に認可されている骨粗鬆症治療の投与量である 20μg/日の数十倍から数百倍の用量に相当することがある．げっ歯類において有意な影響を観察するためには，より高用量の

TPD 投与が必要となるため，1 日あたり 40μg/ kg 体重 TPD の用量を選択した．第三には本研究で得られた知見は，SHPT による高骨代謝回転亢進を伴う CKD-MBD に適用可能であるが，他の骨障害には適用できないことがあげられる．CKD ステージ 3 以降では 75%以上に骨の組織学的変化が観察されることが知られていて，臨床では多彩な骨代謝異常が観察されることがわかっている．CKD の骨代謝異常は骨代謝回転亢進による線維性骨炎ばかりでなく，低骨代謝回転による無形成骨の頻度が高いことも報告されている [46]．5/6Nx ラットを用いて，二次性副甲状腺機能亢進症による高骨代謝回転を模したモデルを使用していることから，本研究で得られた知見は，骨代謝回転亢進による骨代謝異常を呈する CKD-MBD に適用可能であるが，他の骨障害には適用できないことに留意すべきである．

本章の研究をまとめると，CKD ステージ 4 の骨粗鬆症に対する治療として，BP 製剤投与は安全かつ効果的であることが示された．BP 製剤は高骨代謝回転を抑えるだけでなく高リン血症や代謝性アシドーシスも改善しうる．間欠的な TPD 製剤投与は二次性副甲状腺機能亢進症の存在下でもアナボリックに作用し，著明な骨量増加や石灰化度，微細構造の改善をもたらし，骨に対する治療効果は非常に優れたものであるが，高リン血症を増悪させる可能性がありうるため，進行期 CKD に対する使用はより慎重かつ注意深くならなければならない．

総括および結論

- 慢性腎臓病（CKD）ステージ 4 に相当するラットモデルを，5/6 腎摘と通常飼料での飼育で作成するプロトコルを確立した．このラット CKD モデルは，二次性副甲状腺機能亢進症(SHPT)による高骨代謝回転骨を再現したモデルである．

- この CKD モデルでは炭酸塩含有率低下などの骨質異常が生じ，弾性率や曲げ強度といった骨の材質強度特性が劣化した．これらの変化は代謝性アシドーシスや高骨代謝回転の結果もたらされると推測された．

- SHPT による高骨代謝回転状態にある CKD ステージ 4 ラットに，BP 製剤を投与すると，高骨代謝回転が抑制されるだけでなく，高リン血症や代謝性アシドーシスも是正された．

- SHPT による高骨代謝回転状態にある CKD ステージ 4 ラットに，TPD を間欠投与すると，骨代謝回転は骨形成優位にさらに亢進し，骨量が増加し，石灰化度が上昇した．

- TPD の投与が高リン血症を助長するかどうかについては結論が得られていないが，本研究では TPD 投与によりリン利尿ホルモン FGF-23 の低下が観察されたことから，進行期 CKD 患者に使用する際には慎重に投与すべきと考えられた．

本研究は，CKD による骨脆弱性発症のメカニズムのひとつとして炭酸塩含有率低下などの骨質異常が関与することを明らかにした．また，安全性の観点から臨床試験を行うことが難しい進行期慢性腎臓病患者に対する骨粗鬆症治療薬の安全性および有効性についてラットモデルを用いて検証した．代表的な骨吸収抑制剤である BP 製剤は，SHPT による高骨代謝回転状態にある進行期 CKD 患者に対しても，安全かつ有効に使用できる可能性が示唆された．骨形成促進剤である TPD の間欠的投与は，SHPT による高骨代謝回転状態にある進行期 CKD 患者においても，さらに骨形成優位に骨代謝回転を亢進させ，著明に骨量を増加させ，骨微細構造の改善や石灰化度の増加をもたらすことを明らかにした．しかしながら，TPD の投与で高リン血症を助長する懸念が払拭されていないことから進行期 CKD 患者に対する投与は慎重になるべきと考えられた．

CKD-MBD では骨の異常や検査値の異常を是正するだけでなく，血管石灰化の予防

や治療も重要であるが，本研究では血管の異所性石灰化などは評価していない．BP 製剤または TPD 製剤が石灰化におよぼす影響は非常に興味深いところであり，CKD ステージ 4 の患者における骨粗鬆症治療薬が，心血管組織にどのように影響するかについても今後の研究課題である．

謝辞

本論文は，筆者が北海道大学大学院医学研究院　専門医学系部門　機能再生医学分野　整形外科学教室博士課程在学中に行った研究をまとめたものです．本研究に関して終始ご指導ご鞭撻を頂きました整形外科学分野教授　岩崎倫政先生に心より感謝いたします.

本研究を行うにあたり，骨質の材質特性の測定および解釈にご助言・ご指導頂いた千歳科学技術大学理工学部　応用生物学科　木村-須田廣美教授, 兼平祐也様に深い感謝の意を表します.

これまでの研究課程において数々のご指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院　専門医学系部門　機能再生医学分野　整形外科学教室准教授の高畑雅彦先生をはじめ，整形外科学分野の諸先生方，研究にご助力頂きました皆様に心よりの感謝を申し上げます.

引 用 文 献

1 KDIGO. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney. Int* **3** (2013).

2 Fukagawa, M., Hamada, Y., Nakanishi, S. & Tanaka, M. The kidney and bone metabolism: Nephrologists' point of view. *J. Bone. Miner. Metab.* **24**, 434-438 (2006).

3 Albright F, D. T. & Sulkowitch HW. Renal osteitis fibrosa cystica : Report of a case with discussion of metabolic aspects. *John Hopkins Med. J.* **60**, 377-385 (1937).

4 Lacativa, P. G., Franco, F. M., Pimentel, J. R., Patricio Filho, P. J., Goncalves, M. D. & Farias, M. L. Prevalence of radiological findings among cases of severe secondary hyperparathyroidism. *Sao Paulo Med. J.* **127**, 71-77 (2009).

5 Kanis, J. A. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. *Osteoporos. Int.* **4**, 368-381 (1994).

6 日本腎臓学会. CKD 診療ガイド. (2012).

7 日本骨粗鬆学会. 生活習慣病骨折リスクに関する診療ガイド. *ライフサイエンス出版* (2011).

8 Nickolas, T. L., McMahon, D. J. & Shane, E. Relationship between moderate to severe kidney disease and hip fracture in the United States. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 3223-3232 (2006).

9 Ensrud, K. E., Lui, L. Y., Taylor, B. C., Ishani, A., Shlipak, M. G., Stone, K. L., Cauley, J. A., Jamal, S. A., Antoniucci, D. M. & Cummings, S. R. Renal function and risk of hip and vertebral fractures in older women. *Arch. Intern. Med.* **167**, 133-139 (2007).

10 Dhingra, R., Sullivan, L. M., Fox, C. S., Wang, T. J., D'Agostino, R. B., Sr., Gaziano, J. M. & Vasan, R. S. Relations of serum phosphorus and calcium levels to the incidence of cardiovascular disease in the community. *Arch. Intern. Med.* **167**, 879-885 (2007).

11 Wolf, M., Molnar, M. Z., Amaral, A. P., Czira, M. E., Rudas, A., Ujszaszi, A., Kiss, I., Rosivall, L., Kosa, J., Lakatos, P., Kovesdy, C. P. & Mucsi, I. Elevated fibroblast growth factor 23 is a risk factor for kidney transplant loss and mortality. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 956-966 (2011).

12 Moe, S., Drueke, T., Cunningham, J., Goodman, W., Martin, K., Olgaard, K., Ott, S., Sprague, S., Lameire, N. & Eknoyan, G. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* **69**, 1945-1953 (2006).

13 Jamal, S. A., Gilbert, J., Gordon, C. & Bauer, D. C. Cortical pQCT measures are

associated with fractures in dialysis patients. *J. Bone. Miner. Res.* **21**, 543-548 (2006).

14 Nickolas, T. L., Leonard, M. B. & Shane, E. Chronic kidney disease and bone fracture: a growing concern. *Kidney Int.* **74**, 721-731 (2008).

15 NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, March 7-29, 2000: highlights of the conference. *South. Med. J.* **94**, 569-573 (2001).

16 日本透析医学会. 慢性腎臓病に伴う骨・ミネラル代謝異常の診療ガイドライン. *透析会誌* **45**, 301-356 (2012).

17 Handu, D., Moloney, L., Wolfram, T., Ziegler, P., Acosta, A. & Steiber, A. Academy of Nutrition and Dietetics Methodology for Conducting Systematic Reviews for the Evidence Analysis Library. *J. Acad. Nutr. Diet* **116**, 311-318 (2016).

18 Gansevoort, R. T., de Zeeuw, D. & de Jong, P. E. Additive antiproteinuric effect of ACE inhibition and a low-protein diet in human renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **10**, 497-504 (1995).

19 Miller, M. A., Chin, J., Miller, S. C. & Fox, J. Disparate effects of mild, moderate, and severe secondary hyperparathyroidism on cancellous and cortical bone in rats with chronic renal insufficiency. *Bone* **23**, 257-266 (1998).

20 Matsuo, S., Imai, E., Horio, M., Yasuda, Y., Tomita, K., Nitta, K., Yamagata, K., Tomino, Y., Yokoyama, H. & Hishida, A. Revised equations for estimated GFR from serum creatinine in Japan. *Am. J. Kidney. Dis.* **53**, 982-992 (2009).

21 Isakova, T., Wahl, P., Vargas, G. S., Gutierrez, O. M., Scialla, J., Xie, H., Appleby, D., Nessel, L., Bellovich, K., Chen, J., Hamm, L., Gadegbeku, C., Horwitz, E., Townsend, R. R., Anderson, C. A., Lash, J. P., Hsu, C. Y., Leonard, M. B. & Wolf, M. Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney Int.* **79**, 1370-1378 (2011).

22 Diniz, H. & Frazao, J. M. The role of fibroblast growth factor 23 in chronic kidney disease-mineral and bone disorder. *Nefrologia* **33**, 835-844 (2013).

23 Alem, A. M., Sherrard, D. J., Gillen, D. L., Weiss, N. S., Beresford, S. A., Heckbert, S. R., Wong, C. & Stehman-Breen, C. Increased risk of hip fracture among patients with end-stage renal disease. *Kidney Int.* **58**, 396-399 (2000).

24 Cummings, S. R., Black, D. M., Nevitt, M. C., Browner, W., Cauley, J., Ensrud, K., Genant, H. K., Palermo, L., Scott, J. & Vogt, T. M. Bone density at various sites for prediction of hip fractures. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Lancet* **341**, 72-75 (1993).

25 Naylor, K. L., McArthur, E., Leslie, W. D., Fraser, L. A., Jamal, S. A., Cadarette, S. M.,

Pouget, J. G., Lok, C. E., Hodsman, A. B., Adachi, J. D. & Garg, A. X. The three-year incidence of fracture in chronic kidney disease. *Kidney Int.* **86**, 810-818 (2014).

26 Jiang, Y., Zhao, J. J., Mitlak, B. H., Wang, O., Genant, H. K. & Eriksen, E. F. Recombinant human parathyroid hormone (1-34) [teriparatide] improves both cortical and cancellous bone structure. *J. Bone. Miner. Res.* **18**, 1932-1941 (2003).

27 Bouxsein, M. L., Boyd, S. K., Christiansen, B. A., Guldberg, R. E., Jepsen, K. J. & Muller, R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J. Bone. Miner. Res.* **25**, 1468-1486 (2010).

28 Komatsubara, S., Mori, S., Mashiba, T., Nonaka, K., Seki, A., Akiyama, T., Miyamoto, K., Cao, Y., Manabe, T. & Norimatsu, H. Human parathyroid hormone (1-34) accelerates the fracture healing process of woven to lamellar bone replacement and new cortical shell formation in rat femora. *Bone* **36**, 678-687 (2005).

29 Dempster, D. W., Compston, J. E., Drezner, M. K., Glorieux, F. H., Kanis, J. A., Malluche, H., Meunier, P. J., Ott, S. M., Recker, R. R. & Parfitt, A. M. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J. Bone. Miner. Res.* **28**, 2-17 (2013).

30 Boskey, A. & Pleshko Camacho, N. FT-IR imaging of native and tissue-engineered bone and cartilage. *Biomaterials* **28**, 2465-2478 (2007).

31 Green, J. & Kleeman, C. R. Role of bone in regulation of systemic acid-base balance. *Kidney Int.* **39**, 9-26 (1991).

32 Yerramshetty, J. S., Lind, C. & Akkus, O. The compositional and physicochemical homogeneity of male femoral cortex increases after the sixth decade. *Bone* **39**, 1236-1243 (2006).

33 Miller, P. D. Diagnosis and treatment of osteoporosis in chronic renal disease. *Semin. Nephrol.* **29**, 144-155 (2009).

34 Gordon, P. L. & Frassetto, L. A. Management of osteoporosis in CKD Stages 3 to 5. *Am. J. Kidney. Dis.* **55**, 941-956 (2010).

35 KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int. Suppl.*, S1-130 (2009).

36 Melamed, M. L. & Thadhani, R. I. Vitamin D therapy in chronic kidney disease and end stage renal disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **7**, 358-365 (2012).

37 Bolasco, P. Treatment options of secondary hyperparathyroidism (SHPT) in patients with chronic kidney disease stages 3 and 4: an historic review. *Clin. Cases. Miner. Bone*

Metab. **6**, 210-219 (2009).

38 Miller, P. D. Chronic kidney disease and the skeleton. *Bone Res.* **2**, 14044, (2014).

39 Favus, M. J. Bisphosphonates for osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* **363**, 2027-2035 (2010).

40 Miller, P. D., Roux, C., Boonen, S., Barton, I. P., Dunlap, L. E. & Burgio, D. E. Safety and efficacy of risedronate in patients with age-related reduced renal function as estimated by the Cockcroft and Gault method: a pooled analysis of nine clinical trials. *J. Bone. Miner. Res.* **20**, 2105-2115 (2005).

41 Jamal, S. A., Bauer, D. C., Ensrud, K. E., Cauley, J. A., Hochberg, M., Ishani, A. & Cummings, S. R. Alendronate treatment in women with normal to severely impaired renal function: an analysis of the fracture intervention trial. *J. Bone. Miner. Res.* **22**, 503-508 (2007).

42 Miller, P. D., Schwartz, E. N., Chen, P., Misurski, D. A. & Krege, J. H. Teriparatide in postmenopausal women with osteoporosis and mild or moderate renal impairment. *Osteoporos. Int.* **18**, 59-68 (2007).

43 Sridharan, M., Cheung, J., Moore, A. E., Frost, M. L., Fraser, W. D., Fogelman, I. & Hampson, G. Circulating fibroblast growth factor-23 increases following intermittent parathyroid hormone (1-34) in postmenopausal osteoporosis: association with biomarker of bone formation. *Calcif. Tissue Int.* **87**, 398-405 (2010).

44 Samadfam, R., Richard, C., Nguyen-Yamamoto, L., Bolivar, I. & Goltzman, D. Bone formation regulates circulating concentrations of fibroblast growth factor 23. *Endocrinology* **150**, 4835-4845 (2009).

45 Lu, Y., Qin, C., Xie, Y., Bonewald, L. F. & Feng, J. Q. Studies of the DMP1 57-kDa functional domain both in vivo and in vitro. *Cells Tissues Organs* **189**, 175-185 (2009).

46 Elder, G. Pathophysiology and recent advances in the management of renal osteodystrophy. *J. Bone. Miner. Res.* **17**, 2094-2105 (2002).