

令和元年6月18日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01828

研究課題名(和文) 老化によるサルコペニアの機序の解明-慢性腎臓病モデルを利用して-

研究課題名(英文) A study on the mechanism of skeletal muscle atrophy in chronic kidney disease as aging-related sarcopenia

研究代表者

園生 智広 (SONOU, Tomohiro)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：70614866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の結果として、実験動物を使用した慢性腎臓病(CKD)モデルによる研究では、CKDとサルコペニアの関係を明確に検討できたとは言えないが、通常CKDモデルを作成するために最低10週以上かかる場所、4週間で十分なカヘキシーとみなせる病態を観察することができた。このような急激な腎機能低下を伴うミネラル代謝異常は、骨折リスクを増大させるため、さらに短期間でも十分な実験モデルとして使えるかもしれない。さらに、培養骨格筋細胞を用いた研究によっては、近年注目されている尿毒素であるインドール-3-酢酸およびインドキシル硫酸よりも、高リン状態がより筋萎縮刺激として強いことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋量と生命予後の関係性が様々な状態で報告されてきており、骨格筋量を維持・増加させるためにも、サルコペニアのメカニズムを明らかにすることは重要である。本研究では、老化現象の一つとしての腎機能の低下に着目し、腎機能低下(慢性腎臓病)モデルを利用することで、サルコペニア研究の比較的短期間での実験手法を提示することができた。また、今回採用した尿毒素は骨格筋に対する直接的な影響を認めなかったが、高リン状態が筋萎縮を誘導したことから腎機能低下による液性因子がサルコペニアの一因であることが明らかになり、今後のサルコペニア研究に対する有用な知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：We examined the effect of mineral metabolism disorders with chronic kidney disease (CKD) on skeletal muscle atrophy (sarcopenia), using in vivo and in vitro study. Our in vivo study, we adopted animal CKD model induced hyperparathyroidism in 5/6 nephrectomized (Nx) rats. In spite of a relatively short period (only 4 weeks), rats fed high-phosphate and low-calcium diet in the Nx group were almost observed cachexia in CKD. This result might suggest this model was a useful tool to investigate sarcopenia associated with CKD. In vitro study, we examined myotubes differentiated from rat L6 myoblasts were harvested in DMEM containing 2% horse serum with/without uremic toxins such as Indole-3-acetic acid (IAA) or Indoxyl sulfate (IS). These experiments were implemented in both normal- and high-phosphate conditions. These results might suggest uremic toxins using the present study cannot dramatically harm myotubes and phosphate control is crucial to prevent sarcopenia in CKD.

研究分野：健康科学

キーワード：サルコペニア 慢性腎臓病 尿毒素 骨格筋

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

老化によるサルコペニアは、様々な観点から問題視されその機序が研究されているが、未だ不明な点が多い。特に、骨格筋の同化・異化シグナルは、運動刺激のみならず、食事内容によっても変化することが知られているため、正確な調節因子を明らかにする実験モデルの確立が困難である。一般的に、老化による骨格筋の萎縮の要因としては、身体活動の低下、必要量に対する相対的な摂取エネルギーおよびタンパク質の不足が考えられているが、これら複数の要因により、加齢が骨格筋に及ぼす影響を明らかにすることを困難にしている。腎臓は加齢とともに不可逆的に機能が低下し、それゆえ老化を制御している臓器であると考えられている。すなわち、慢性腎臓病(CKD)などの腎機能が著しく低下している状態での骨格筋の同化・異化作用を評価することは、老化によるサルコペニアの機序の少なくとも一部を明らかにすることである。

実験動物を用いた CKD モデルとしては、物理的に腎臓の容積を減少させ、負荷を増大させることで、腎機能の低下を迅速に発症させる 5/6 腎切除術(Nx)が広く用いられているが、その方法は 10 週以上の期間を要し、障害の程度も比較的コントロールしにくい。そこで我々は、CKD に関する骨代謝の研究に用いられている高代謝回転骨モデルに着目した。このモデルは、慢性腎臓病の内 1/3~半分程度が合併する二次性副甲状腺機能亢進症のモデルであり、Nx と特別食(高リン・低カルシウム食)の組み合わせによって作成でき、筋同化・異化作用に影響を及ぼすタンパク質の割合を変化させない。また、予備実験や先行研究から、このモデルでは長くとも 8 週間で、かなり重篤な腎機能の低下を招くため、腎機能低下とサルコペニアの研究を遂行する上で有効であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1)Nx と特別食を組み合わせた二次性副甲状腺機能亢進症モデルを用いて、腎機能低下がサルコペニアに及ぼす影響を *in vivo* で評価すること、および(2)腎機能低下によって変動する因子が、実際に骨格筋にどのような機序を経て影響を及ぼすのかを *in vitro* で検討することであった。

3. 研究の方法

(1)二次性副甲状腺機能亢進症モデルを用いた、腎機能低下がサルコペニアに及ぼす影響
10 週齢の雄性 Wistar ラットを通常食(S)と特別食(H;高リン低カルシウム食)に分け、それぞれの食餌群をさらにコントロール、擬手術(sham)、Nx の 3 群ずつに分け 4 週および 8 週間飼育した。Nx 群は、飼育期間開始 2 週前より 5/6 腎切除術(片腎摘出、1 週の回復期、残りの腎臓の 2/3 切除、1 週の回復期)を行った。Nx+特別食の食餌量が少ないため、その他の群には、実験期間 2 週目より徐々に食餌量を調節し、体重当たりの食事摂取量を調整した。飼育後、採血した後に下肢および腰部骨格筋を摘出し、血中の腎機能関連指標、組織重量を測定した。また、ヒラメ筋および前脛骨筋では筋分化調節因子発現量を測定した。

(2)腎機能低下により増加する尿毒素が骨格筋培養細胞に及ぼす影響

ラット筋芽細胞 L6 を 2%ウマ血清含有の培養液を用いて多核細胞である筋管細胞へと分化させたのち、尿毒素であるインドール-3-酢酸(IAA)とインドキシル硫酸(IS)を添加して 3-10 日間培養し、骨格筋の構成タンパクであるミオシン重鎖を筋萎縮のマーカーとしてウエスタンブロット法にて測定した。また、この条件を通常リン濃度(0.9mM)および高リン濃度(3.8mM)の 2 条件下で実施した。

4. 研究成果

(1)二次性副甲状腺機能亢進症モデルを用いた、腎機能低下がサルコペニアに及ぼす影響
4 週間および 8 週間の実験期間終了時において、Nx 群であっても通常食を摂取していると腎機能を含む測定した項目に関してコントロール群および sham 群と比較してほぼ同値を示したため、Nx 群の 2 群のみで比較を行なった(表 1)。

食餌量を調整しようとしたが、NX-H 群の食餌量は少なく、4 週間でも有意に低値を示しており、摂取タンパク量の違いが筋萎縮の原因である可能性を排除することが出来なかった。また、手技的に全ての骨格筋を採取・計測することは出来ないが、採取した下腿の骨格筋の主要な部位において、絶対値としては NX-H 群が有意に低値を示し、体重の差および血液指標での腎機能の評価と合わせて、二次性副甲状腺機能亢進

表 1 : 体重・食餌量・血清データ・骨格筋重量

	Nx-4wks		Nx-8wks	
	Standard-diet	High phosphorus-diet	Standard-diet	High phosphorus-diet
BW(g)	419 ± 21	307 ± 104 *	501 ± 12	323 ± 70 *
Total food intake(g)	459 ± 12	331 ± 116 *	997 ± 11	581 ± 80 *
Relative food intake(g/100g BW/day)	4.6 ± 0.2	3.9 ± 0.9 *	4.5 ± 0.1	3.4 ± 0.3 *
TP (g/dL)	5.6 ± 0.2	5.4 ± 0.7	5.9 ± 0.3	5.4 ± 0.6 *
ALB (g/dL)	3.8 ± 0.2	3.3 ± 0.5 *	3.9 ± 0.1	3.3 ± 0.4 *
BUN (mg/dL)	31.7 ± 6.4	95.6 ± 76.1 *	32.7 ± 4.3	141.8 ± 127.9 *
CRE (mg/dL)	0.57 ± 0.08	1.55 ± 0.99 *	0.51 ± 0.11	2.73 ± 2.50 *
UA (mg/dL)	1.1 ± 0.3	1.0 ± 0.2	1.4 ± 1.3	1.8 ± 2.4
Na (mEq/L)	146.9 ± 2.0	150.5 ± 1.6 *	149.0 ± 1.7	151.2 ± 2.0 *
K (mEq/L)	4.1 ± 0.2	4.1 ± 0.5	4.5 ± 1.9	4.5 ± 1.5
Cl (mEq/L)	103.4 ± 2.1	104.9 ± 3.7	103.9 ± 1.4	100.4 ± 5.8
Ca (mg/dL)	11.0 ± 0.3	7.9 ± 2.0 *	11.4 ± 0.5	7.4 ± 1.6 *
IP (mg/dL)	8.3 ± 1.1	22.1 ± 13.5 *	7.6 ± 1.5	20.9 ± 7.8 *
Heart(mg)	1308 ± 169	1078 ± 301 *	1465 ± 187	1220 ± 217 *
Relative Heart(mg/100gBW)	312 ± 40	362 ± 65	293 ± 42	387 ± 79 *
psos major(mg)	3255 ± 531	2183 ± 943 *	4322 ± 487	3007 ± 819 *
Relative psos major(mg/100gBW)	776 ± 115	704 ± 145	865 ± 112	925 ± 114
soleus(mg)	492 ± 22	373 ± 65 *	568 ± 59	386 ± 55 *
Relative soleus(mg/100gBW)	118 ± 9	129 ± 24	114 ± 12	122 ± 17
plantaris(mg)	977 ± 54	696 ± 223 *	1169 ± 124	762 ± 181 *
Relative plantaris(mg/100gBW)	233 ± 13	229 ± 18	234 ± 26	236 ± 18
EDL(mg)	443 ± 35	342 ± 108 *	492 ± 31	377 ± 77 *
Relative EDL(mg/100gBW)	106 ± 6	113 ± 11	98 ± 8	117 ± 8 *
TA(mg)	1628 ± 42	1273 ± 401 *	1844 ± 134	1398 ± 251 *
Relative TA(mg/100gBW)	389 ± 21	419 ± 52	369 ± 32	437 ± 26 *

症およびCKDカヘキシーと考えることは妥当である。体重当たりの相対重量で評価した時、逆にNX-H群が高値となる部位もあり、重量のみでサルコペニアを評価することが困難である可能性が示唆された。

予備実験の時と異なり、筋分化調節因子発現量に関して、いずれの実験期間においてもNx-S群とNx-H群との間に有意差を認めることができなかった。その点に関しては、5/6腎切除術が同一術者による処置だとしても、個体差が比較的大きくなること、またそれに関連して、今回の実験では、予備実験と比較して腎機能の悪化スピードが早い個体が多く、実験終了時まで生存できなかった個体が多かったことが影響していると考えられる。さらに、数値化することは出来ないが、サンプリング時のメモとして、Nx-H群においてのみ、脛・腓骨に骨折もしくは骨折が治癒したと思われる個体が認められた。骨折とその回復過程の周辺の骨格筋への影響は不明であるが、骨折による骨格筋への負荷の変動が、筋合成・分解シグナルへの不規則な影響を及ぼし、結果として筋萎縮が想定される群での筋分化調節因子発現量の低下が認められなかったと思われる。これらの考察をまとめると、もっと短期(1-2週間)での検討が必要であるが、サルコペニア研究において、二次性副甲状腺機能亢進症モデルは、迅速に病態を誘導することができる可能性が示された。

(2)腎機能低下により増加する尿毒素が骨格筋培養細胞に及ぼす影響

先行研究および予備実験によりIAA 50uM、IS 1mMを添加濃度に決定し、まず10日の培養を実施した。他の培養条件では、10日間の培養が可能であるにも関わらず、IAAおよびISを添加した場合、8-10日目で細胞が剥がれる現象が確認されたことから、骨格筋細胞への何らかの悪影響はあると考えられたため、3、5、7日間の培養後に、サルコペニアの指標としてミオシン重鎖(MHC)のタンパク発現量をウエスタンブロット法にて検討した。その結果、IAA、ISいずれにおいても有意な差を認めなかったが、IAA添加のみ3日間の培養期間ではMHCに減少傾向が認められたため、再現性を確認する実験を行なったが、再現性が認められなかった。それと同時に、3日間の培養サンプルでは、筋分化調節因子であるmyogeninおよびMyoD遺伝子発現量も検討した。その結果、IAAによるMHCタンパク発現量に対する影響は認められず、いずれの筋分化調節因子の遺伝子発現量にも影響は認められなかった。筋管細胞へと分化した骨格筋細胞では、尿毒素であるIAAおよびISは、骨格筋の構造タンパクであるMHCを減少させるような筋萎縮作用は、無いもしくは非常に小さい可能性が示唆された。

また、同様の実験において、別の尿毒素である高リン(3.8mM)条件下で、7日間培養した場合、筋分化調節因子であるmyogenin遺伝子発現量が低下傾向、MyoD遺伝子発現量が有意に低下していた(図1)。したがって、腎機能低下によるサルコペニア予防に関しては、(1)のin vivo実験の血中指標でも腎機能の低下として顕著に増加するリン濃度を正常に維持することが最も重要である可能性が示唆された。

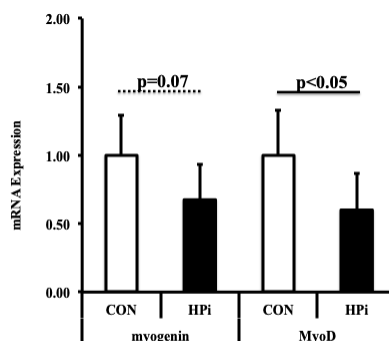


図1：筋分化調節因子の遺伝子発現量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：重松 隆

ローマ字氏名：(SHIGEMATSU, Takashi)

所属研究機関名：和歌山県立医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 30187348

研究分担者氏名：大矢 昌樹

ローマ字氏名：(OHYA, Masaki)

所属研究機関名：和歌山県立医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁): 90550301

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。