

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09732

研究課題名(和文)慢性腎不全の栄養障害・慢性炎症における細胞老化とDNA修復機構の役割の解明

研究課題名(英文)Cellular aging and DNA Damage in Protein Energy Wasting in Chronic Kidney Disease

研究代表者

木津 あかね (KIZU, AKANE)

大阪市立大学・大学院医学研究科・登録医

研究者番号：30623201

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)：慢性腎臓病(CKD)・透析患者におけるPEWと呼ばれる栄養異常は、加齢による老化と類似し低体重サルコペニアを認める。PEWでは、非肥満であっても慢性炎症因子が高く、動脈硬化に関連し生命予後を悪化させる。しかし、その病態機序は不明である。近年、DNA損傷・修復機構が老化関連疾患や代謝異常に関わることが明らかになっている。本研究では、腎不全患者においてサルコペニアが進行していることを示し、腎不全病態でのストレスが、DNA損傷機構を活性化していることを明らかにした。腎不全病態では、DNA損傷はPEWの病態進展メカニズムの一つであることが推測される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病(CKD)・透析患者における栄養異常は、PEWと呼ばれ、低体重、筋肉量低下、老化が進行させ、動脈硬化に関連し生命予後を悪化させる。これまで、DNA損傷による病態制御については、癌や放射線領域での研究が中心であったが、DNA修復遺伝子欠損の遺伝病に、早老症や耐糖能異常の表現型を持つものも多いことを考慮すると、DNA修復機構をターゲットとした新たな慢性腎不全病態の治療への貢献も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Metabolic and nutritional abnormalities in patients with chronic kidney disease (CKD) is called PEW. PEW is associated with accelerated aging and sarcopenia. In PEW, chronic inflammatory factors are progress atherosclerosis even in lean patients. However, its pathological mechanism is unknown. In recent years, it has been revealed that the DNA damage mechanism is involved in aging-related diseases and metabolic disorders. In this present study, we showed that sarcopenia is progressed in CKD patient, and revealed that CKD stress increase DNA damage. The result suggest that DNA damage in CKD patient is one of the mechanisms of PEW progression.

研究分野：代謝内分泌

キーワード：PEW 慢性腎不全 維持透析 サルコペニア DNA損傷

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(CKD)・透析患者における栄養異常は、PEW(protein-energy wasting)と呼ばれ、加齢による老化と類似し、若年であっても、筋肉量や筋力の低下(サルコペニア)を認め、慢性炎症や動脈硬化などの合併症と関連し生命予後を悪化させる。またその特徴は「やせ」でも肥満関連の炎症因子は高いことである。しかし、この炎症惹起の機序は不明である。一方、生体では、ゲノムDNAの恒常性安定を保つため、様々なDNA修復機構を持つ。中でも、ヒストンH2AXは、放射線などによる重篤なDNA損傷であるDNA二本鎖切断を修復する因子である。近年の高感度検出法の発達により、活性型のリン酸化ヒストンH2AXは、糖尿病の臓器や末梢単核球でも増加することが分かってきた。これらの報告より、日常的な軽度の酸化ストレスにおいても、ヒストンH2AXが活性化されることが示唆され、ヒストンH2AXを介したDNA修復機構による疾病の発症進展における役割が注目されつつある。

### 2. 研究の目的

CKD・透析患者におけるPEWとよばれる栄養異常は、加齢による老化と類似した筋肉量低下を認めるため、透析患者のサルコペニアの実態を明らかにする。腎不全病態での尿毒症症状などのストレスが生体内において、DNA損傷とその修復機構を活性化して細胞老化と炎症惹起を導くことを検討し、さらに遺伝子改変マウスを用いて、DNA損傷・修復機構の慢性腎不全でのPEWの発症進展における役割を解明することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 慢性腎不全患者におけるPEWの病態とDNA損傷修復機構の活性化

透析患者においてPEWやサルコペニアの病態が若年より進行しているかを検討するため維持透析患者を対象に上下肢筋力測定と筋肉量を測定した。サルコペニアの診断は、AWGS2019を用いた。

#### (2) 腎不全モデルマウスを用いたin vivo研究と培養細胞を用いたin vitro研究

左腎動脈分枝結紮と右腎臓摘出による腎不全モデルを、野生型と腎不全の高リン血症因子の遺伝子改変マウスで作製した。組織や末梢血でのDNA損傷の程度はリン酸化ヒストンH2AXの免疫染色を行った。また、HepG2細胞を用いて、尿毒症毒素であるインドキシル硫酸と、高リン血症因子であるリン酸化カルシウムコロイドCPPの添加後、ウェスタンブロッティング法によるリン酸化ヒストンH2AXレベルの測定をおこなった。

### 4. 研究成果

(1) 二重エネルギーX線吸収測定法(DXA法)による筋肉量測定を行った維持透析患者459名のうち、筋肉量低下をみとめた割合は男性65.5%、女性44.3%であった。男性の方が筋肉量低下の割合が多かった。65歳未満においても、すでに筋肉量低下は男性47.0%、女性48.2%に認められ、腎不全病態では筋肉量の低下が進行していることが分かった。

筋肉量に加え、サルコペニアの割合を検討するため、サルコペニアの診断基準である握力、歩行速度、Short Physical Performance Battery(SPPB)の測定のできた311名(男性213名、女性98名)を対象に、サルコペニアの頻度を検討したところ、男性52.6%、女性20.4%であり、男性のほうが、女性に比べてサルコペニアの頻度が高かった。65歳未満においても、男性27.6%、女性11.8%がサルコペニアの診断基準を満たしており、若年からサルコペニアを認めていた。図1にサルコペニア群において、より高齢、BMI低値であり、また歩行速度などの身体計測値も低値であることを示した。

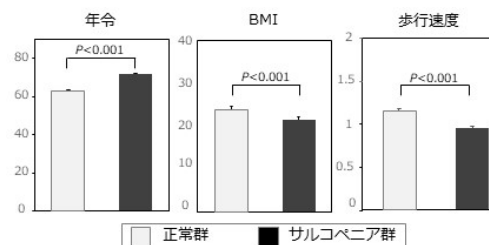


図1. 正常群とサルコペニア群における年齢、BMI、歩行速度の比較

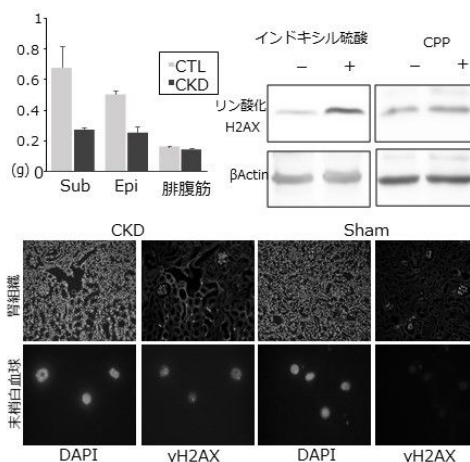


図2. 腎不全病態による脂肪量の低下とリン酸化ヒストンH2AXの活性化

不全マウスで低下していた。このことより、腎不全での尿毒症毒素などのストレスにより、ヒストン H2AX などの DNA 修復機構が活性化され、PEW の病態に関連することが示唆された。

慢性腎不全の病態特有のストレス(尿毒症毒素・高リン血症)が組織において DNA 損傷修復機構を活性化させるかを *in vitro* で検討したところ、尿毒症毒素であるインドキシル硫酸の添加や、高リン血症因子であるリン酸カルシウムコロイド CPP の添加によって、リン酸化ヒストン H2AX が増加すること示した(図2)。また、近年、CPP は、高リン血症の老化促進し慢性炎症および早期老化などの PEW に寄与する因子であるといわれている。そこで、CPP 形成に必要な FetuinA に注目し、そのタンパクを欠損した遺伝子改変マウスを作成し、腎動脈分枝結紮による腎不全モデルを用いて、慢性腎不全病態において、CPP が DNA 損傷や PEW に影響するかの検討を行った。体重低下や DNA 損傷の程度は野生型と欠損型との差は認めず、腎不全病態での PEW の病態への影響は、高リン血症因子以外の因子の影響も考えられた。

一方、DNA 損傷と PEW の慢性炎症や動脈硬化への影響を検討するため、少サンプル数であるが、末梢白血球のリン酸化ヒストン H2AX の免疫染色を行ない、リン酸化 H2AX のフォーカス数によって検出される DNA 損傷の程度と動脈硬化病変との関連を調べた。図3に示すように末梢白血球のリン酸化 H2AX フォーカス数を、高出現群(6例)と低出現群(4例)の2群に分けたところ、高出現群は動脈硬化の機能的な進展の指標である脈波伝播速度(PWV)と器質的な進展の指標である頸動脈の内膜中膜肥厚度(IMT)ともに高値の傾向であることが示された。以上の結果から、慢性腎不全の病態は、低体重や筋肉量の低下を引き起こし、腎不全患者ではサルコペニアが若年より進行している。その病態には DNA 損傷の関連が示唆され、動脈硬化に影響し、PEW の病態進展メカニズムの一つであることが推測される。

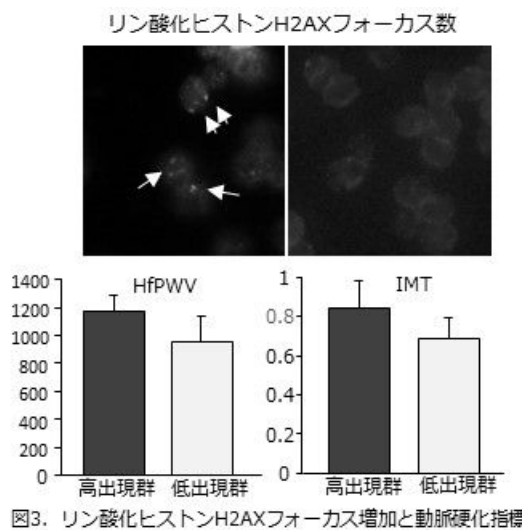


図3. リン酸化ヒストンH2AXフォーカス増加と動脈硬化指標

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hayashi M, Yoshida K, Kitada K, Kizu A, Tachibana D, Fukui M, Morita T, Koyama M.	4. 巻 35
2. 論文標題 Low-dose Irradiation of Mouse Embryos Increases Smad-p21 Pathway Activity and Preserves Pluripotency	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Assisted Reproduction and Genetics	6. 最初と最後の頁 1061-1069
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10815-018-1156-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 辻本 吉広, 庄司 哲雄, 佐々木 けやき, 土蔵 尚子, 下村 菜生子 木津 あかね, 森 克仁, 西澤 良記, 絵本 正憲, 稲葉 雅章
2. 発表標題 透析患者のサルコペニックオベシティと生命予後についての検討
3. 学会等名 第64回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮部 美月, 辻本 吉広, 松藤 勝太, 西村 真理, 庄司 哲雄, 佐々木 けやき, 土蔵 尚子, 木津 あかね, 森 克仁, 西澤 良記, 絵本 正憲, 稲葉 雅章
2. 発表標題 膝伸展筋力の経年変化に関連する因子の特定と予後への影響
3. 学会等名 第64回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木津 あかね, 松藤 勝太, 西村 真理, 辻本 吉広
2. 発表標題 透析患者の血清マグネシウム濃度と 骨密度、筋肉量及び筋力との関連について
3. 学会等名 第39回 一般社団法人日本マグネシウム学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	吉田 佳世  (YOSHIDA KAYO)  (30311921)	大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授    (24402)	