

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08669

研究課題名(和文)臓器内代謝物変化から紐解くCKD合併認知機能低下・筋消耗の発症機序の解明

研究課題名(英文)Elucidating the pathogenic mechanism of CKD-associated cognitive dysfunction and muscle wasting as revealed by metabolic changes in organs

研究代表者

佐藤 恵美子 (Sato, Emiko)

東北大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：20466543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、慢性腎臓病(CKD)合併の認知機能障害および筋消耗の発症機序の解明を行った。我々はまず、マウス由来筋芽細胞株C2C12とマウス海馬神経細胞株HT-22を対象とし、様々な尿毒素の影響について評価をおこなった。我々の検討からインドキシル硫酸、インドールが海馬神経細胞株に悪影響を及ぼすこと、さらにメチルグリオキサールは筋芽細胞でのみ、細胞内代謝変化を誘導しATP産生を減少させることを明らかにした。さらに、CKD病態では腎臓でも細胞内代謝変調が誘導され、ニコチンアミドを投与することで、病態の進行が抑制されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CKDでは本来体外へと排泄すべき尿毒素が体内に蓄積し、この尿毒素蓄積は腎臓や心臓に悪影響を及ぼし心血管疾患を増加させる。尿毒素蓄積は骨代謝異常、腎性貧血など種々のCKD関連合併症にも関与するが、尿毒素蓄積が認知機能低下・筋消耗にどのように関与しているかはいまだ不明な点が多い。本研究は尿毒素蓄積が海馬神経細胞株および筋芽細胞株に悪影響を及ぼすこと、またその機序を明らかにした。CKD関連-認知機能障害・筋消耗の発症進展に関与する機序の解明は、それに基づいた治療法の開発が可能となる

研究成果の概要(英文)：Chronic kidney disease (CKD)-associated cognitive dysfunction and muscle wasting are important problems with the aging of the patients with CKD. In this study, we elucidated the pathogenesis of CKD-associated cognitive dysfunction and muscle wasting using cell line and animal disease model. We first evaluated the effects of various uremic toxins on the mouse myoblast cell line C2C12 and the mouse hippocampal neuronal cell line HT-22. We found that indoxyl sulfate and indole negatively affected the hippocampal neuronal cell line, and that methylglyoxal induced intracellular metabolic changes and decreased ATP production in only myoblasts. Furthermore, we found that intracellular metabolic changes are also induced in the kidney in CKD model mouse, and that nicotinamide treatment protect the progression of the CKD dysfunction.

研究分野：臨床薬学

キーワード：ウレミックサルコペニア 認知機能障害 尿毒素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本において慢性腎臓病(CKD)患者は 1330 万人以上いると推定されており、日本社会の超高齢化に伴い CKD 患者層も高齢化している。我が国の CKD 患者の 4 割弱が記憶保持や実行機能の障害を中心とした中等度から重度の認知機能障害が合併することが報告されている。さらに、高齢 CKD 患者では筋消耗・サルコペニアの合併頻度が極めて高い。これら CKD における認知機能障害および筋消耗は日常生活に支障をきたすだけでなく死亡率増加のリスクになるため、超高齢化社会における CKD 患者の管理において、認知機能障害および筋消耗は重要な問題である。しかし CKD における認知機能障害・筋消耗の発症・進展機序はいまだ不明な点が多いため、治療介入法も有効な予防策のエビデンスも不十分である。したがって CKD 関連-認知機能障害・筋消耗の発症進展に関与するメカニズムを解明し、それに基づいた治療介入法の開発は早急に解決すべき課題である。

CKD では本来体外へと排泄すべき尿毒素が体内に蓄積し、この尿毒素蓄積は腎臓や心臓に悪影響を及ぼし心血管疾患を増加させる。さらに尿毒素蓄積は骨代謝異常、腎性貧血など種々の CKD 関連合併症にも関与するため認知機能障害・筋消耗にも関与している可能性がある。しかし尿毒素蓄積が認知機能低下・筋消耗にどのように関与しているかはいまだ不明な点が多い。したがって尿毒素蓄積が CKD 関連-認知機能障害・筋消耗の発症進展に関与するメカニズムを解明できれば、それに基づいた治療法の開発が可能となる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、尿毒素が認知機能障害および筋消耗を引き起こす機序を解明し、CKD 合併症の予防・治療法開発へ展開することである。

3. 研究の方法

本研究では、MS-メタボロミクおよびイメージング MS を駆使し、CKD における各臓器(脳、筋など)の細胞内代謝変化を培養細胞およびモデル動物を対象として同定する。さらに 組織内代謝変化に着目した予防・治療薬の探索・評価を行った。

4. 研究成果

(1) CKD 時は腎機能の低下にともない尿毒素が体内に蓄積する。この尿毒素は脳神経細胞や筋細胞に悪影響を及ぼすとされているが、不明な点が多い。毒性の強い尿毒素であるインドキシル硫酸や *p*-クレシル硫酸は、腸内細菌叢の代謝を介して産生される。インドキシル硫酸は、トリプトファンが腸内細菌によりインドールへ代謝され、*p*-クレシル硫酸はチロシンが腸内細菌により *p*-クレゾールへ代謝され、肝臓で硫酸抱合されることで産生される。AST-120 とは球形の活性吸着炭であり、大腸内で尿毒素の前駆体(インドール、*p*-クレゾール)を吸着し便として排泄させる作用があり、CKD の進行抑制効果がある。我々のこれまでの研究から、AST-120 は全身臓器に蓄積した尿毒素を減少させ、サルコペニアを改善させることが明らかにしている¹。しかしながら、AST-120 が腸内細菌叢に与える影響は不明な点が多く残っている。本研究では、アデニン誘発腎不全マウスに AST-120 を投与した際の腸内細菌叢の変化を調べた。初めに、便中のインドールと *p*-クレゾールを調べた結果、便インドールは AST-120 を投与した際に増加していたが、*p*-クレゾールは AST-120 を投与すると検出されないことが分かった(図 1)。

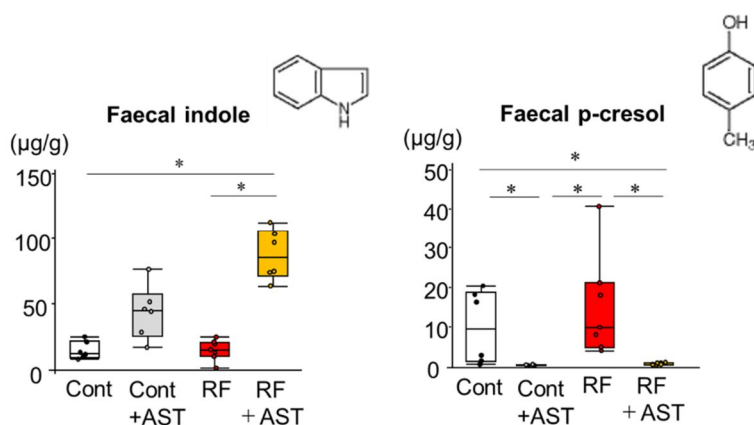


図 1 便中インドールと *p*-クレゾール

Cont:コントロール群、Cont + AST: コントロール + AST-120 投与、RF:

腎不全マウス、RF+AST-120: 腎不全マウス AST-120 投与

さらに、腸内細菌叢を調べた結果、AST-120 を投与したマウスにおいて *Clostridium sensu stricto 1* が検出されないレベルにまで減少していた(図2)。 *Clostridium sensu stricto 1* は *p*-クレゾール産生経路に関する酵素 4-hydroxyphenylacetate decarboxylase の遺伝子を保有していることから、*p*-クレゾールの産生に関与する可能性がある。つまり、AST-120 を投与することで、尿素産生に関係する腸内細菌に影響を与え、尿素の産生を減少させることが示唆された。

本研究の結果から、AST-120 には大腸内で尿素の毒素を吸着するだけでなく、尿素産生に関わる腸内細菌叢を減少させるという新しい機序があることが明らかとなった²。

Clostridium sensu stricto 1

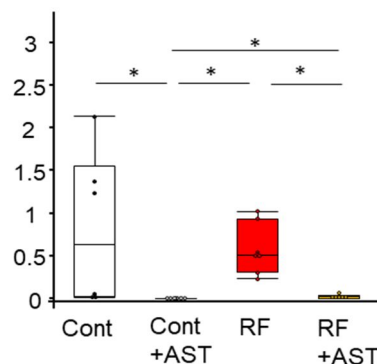


図2 AST-120 投与群で減少した *Clostridium sensu stricto 1*

(2)CKD 患者では認知機能障害の合併が多くみられる。しかしその発症機序には不明な点が多く残されている。我々のこれまでの研究から、CKD 病態では脳内に尿素が蓄積することを明らかにしている³。そこで、本研究では認知機能障害と関連があると報告されている尿素 10 種類のマウス海馬神経細胞株 HT-22 に対する毒性を MTT アッセイにて評価した。その結果、メチルグリオキサール、インドール、インドール 3-酢酸(IAA)、インドキシル硫酸、*p*-クレシル硫酸が HT-22 の生存率を有意に減少させた(図3)。

MTT assay

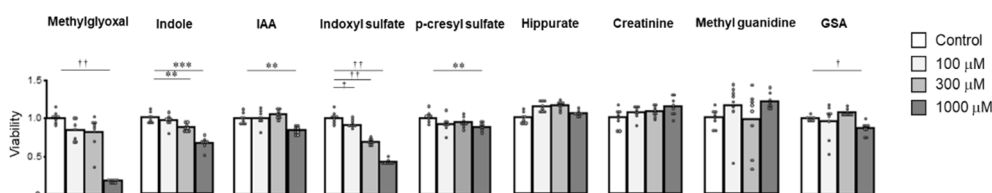
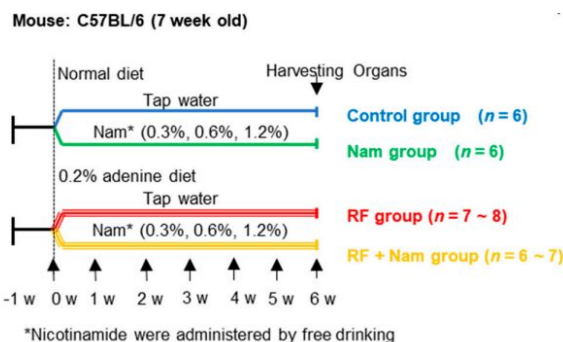


図3 尿素のマウス海馬神経細胞株 HT-22 に対する影響

さらにインドキシル硫酸の HT-22 への毒性について、作用機序を調べた結果、インドキシル硫酸で暴露すると Nrf-2 の活性化が認められ、*p47phox* と *Il-6* の mRNA 発現が上昇することが分かった⁴。現在、腎不全モデルマウスを対象として、尿素の認知機能障害に及ぼす影響について調べている。

(3) CKD 患者では体内で TCA 回路代謝物が変化し、また β 酸化関連酵素がしていることが報告されている。筋細胞においては腎機能の低下とともに循環血流に蓄積したインドキシル硫酸が筋肉内に蓄積し、細胞内代謝失調を誘導しサルコペニアの発症・進展に関わる¹。このように CKD では臓器内代謝変調が起きており、それが病態の進行に関わることが明らかである。我々は腎臓に尿素が蓄積していることも明らかにしているが、CKD 病態における腎臓の代謝変化については不明な点が残っている。そこで本研究では、CKD 病態における腎臓内代謝変化の解明と、その治療法の開発を行った。我々の筋を対象とした研究から、尿素誘導の臓器内代謝失調には代謝に関わる NAD⁺や NADP⁺が関わることを見出している。さらに急性腎不全のモデルマウスへの NAD⁺前駆体のニコチンアミドモノヌクレオチド(NMN)の投与が腎障害を緩和する事、また NAD⁺前駆体のニコチンアミドの投与がグループ腎炎妊娠モデルマウスの腎障害を緩和することが報告されている^{5,6}。本研究ではアデニン誘発腎不全マウスを対象とし腎臓の代謝変化と、ニコチンアミドを投与した時のその変化について評価した。アデニン誘発腎不全マウスは 0.2%アデニン食を 6 週間投与することで作製し、ニコチンアミドはアデニン食を摂取させた6週間に飲水で投



与した。ニコチンアミドの濃度は1.2%、0.6%、0.3%とした。その結果、0.6%以上のニコチンアミド投与で腎機能が改善し、0.3%ニコチンアミドは有意な改善を認めなかった。腎病理解析においても、0.6%以上のニコチンアミド投与で間質線維化が抑制されていた。さらに腎臓における炎症関連の遺伝子の発現もニコチンアミド投与により抑制されていた。

次に腎臓の代謝変化を調べるため、ガスクロマトグラフィー質量分析(GC-MS)を用いて腎臓のメタボロミクスを行った。その結果、アデニン誘発腎不全マウスの腎臓では解糖系やペントースリン酸経路、TCA 回路の代謝物が変化していることが分かった。またニコチンアミドを投与したアデニン誘発腎不全マウスの腎臓では、これらの変化した代謝物が正常レベルになり、代謝経路が是正されていた。さらにアデニン誘発腎不全マウスの腎臓内で変化し、ニコチンアミド投与で是正された代謝物を解析した結果、NAD⁺が代謝に関与する代謝物であった。この結果から、アデニン誘発腎不全マウスの腎臓ではNAD⁺が変化していることが考えられたため、腎臓内NAD⁺を測定した。その結果、アデニン誘発腎不全マウスの腎臓ではNAD⁺量が非常に少なくなっており、ニコチンアミドを投与することでNAD⁺量が改善していることが分かった。

腎臓の近位尿細管においては、様々な物質の再吸収を行っており、主に尿細管に存在するミトコンドリアで産生されるATPをエネルギー源としている⁷。また、急性腎不全ではネフロンのうち近位尿細管が障害を受けやすく、近位尿細管の障害の程度が予後に大きく関与する。さらに細胞内のNAD⁺が枯渇すると細胞内の解糖系が停滞し、細胞死を引き起こすことが報告されている⁸。以上のことから、アデニン誘発腎不全マウスの腎臓ではNAD⁺が不足していることから、解糖系やTCA回路が停滞しているが、ニコチンアミドを投与することでNAD⁺が増加し代謝が是正されたことが示唆された。

つまり本研究ではアデニン誘発腎不全マウスの腎臓では代謝変調が起きており、ニコチンアミドを投与することで臓器内代謝変化が是正され、CKDの進行を抑制することをあきらかに示した⁹。

<引用文献>

1. Sato E, Mori T, Mishima E et al. Metabolic alterations by indoxyl sulfate in skeletal muscle induce uremic sarcopenia in chronic kidney disease. *Sci Rep* 2016; 6: 36618.
2. Sato E, Hosomi K, Sekimoto A et al. Effects of the oral adsorbent AST-120 on fecal p-cresol and indole levels and on the gut microbiota composition. *Biochem Biophys Res Commun* 2020; 525: 773.
3. Sato E, Saigusa D, Mishima E et al. Impact of the oral adsorbent AST-120 on organ-specific accumulation of uremic toxins: LC-MS/MS and MS imaging techniques. *Toxins (Basel)* 2017; 10: 19.
4. Watanabe K, Sato E, Mishima E et al. Effect of uremic toxins on hippocampal cell damage: analysis in vitro and in rat model of chronic kidney disease. *Heliyon* 2021; 7: e06221.
5. Imaruoka K, Oe Y, Fushima T et al. Nicotinamide alleviates kidney injury and pregnancy outcomes in lupus-prone MRL/lpr mice treated with lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun* 2019; 510: 587.
6. Guan Y, Wang SR, Huang XZ et al. Nicotinamide Mononucleotide, an NAD(+) Precursor, Rescues Age-Associated Susceptibility to AKI in a Sirtuin 1-Dependent Manner. *J Am Soc Nephrol* 2017; 28: 2337.
7. Ralto KM, Rhee EP, Parikh SM. NAD(+) homeostasis in renal health and disease. *Nature reviews Nephrology* 2020; 16: 99.
8. Yamamoto S, Yamamoto M, Nakamura J et al. Spatiotemporal ATP Dynamics during AKI Predict Renal Prognosis. *J Am Soc Nephrol* 2020; 31: 2855.
9. Kumakura S, Sato E, Sekimoto A et al. Nicotinamide Attenuates the Progression of Renal Failure in a Mouse Model of Adenine-Induced Chronic Kidney Disease. *Toxins (Basel)* 2021; 13.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kumakura Satoshi, Sato Emiko, Sekimoto Akiyo, Hashizume Yamato, Yamakage Shu, Miyazaki Mariko, Ito Sadayoshi, Harigae Hideo, Takahashi Nobuyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Nicotinamide Attenuates the Progression of Renal Failure in a Mouse Model of Adenine-Induced Chronic Kidney Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 50～50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/toxins13010050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe Kimio, Sato Emiko, Mishima Eikan, Watanabe Mayu, Abe Takaaki, Takahashi Nobuyuki, Nakayama Masaaki	4. 巻 7
2. 論文標題 Effect of uremic toxins on hippocampal cell damage: analysis in vitro and in rat model of chronic kidney disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e06221～e06221
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2021.e06221	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Emiko Sato, Koji Hosomi, Akiyo Sekimoto, Eikan Mishim, Yuji Oe, Daisuke Saigusa, Sadayoshi Ito, Takaaki Abe, Hiroshi Sato, Jun Kunisawa, Toshimitsu Niwa, Nobuyuki Takahashi	4. 巻 525
2. 論文標題 Effects of the oral adsorbent AST-120 on fecal p-cresol and indole levels and on the gut microbiota composition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 773-779
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.02.141.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Todoriki Sota, Hosoda Yui, Yamamoto Tae, Watanabe Mayu, Sekimoto Akiyo, Sato Hiroshi, Mori Takefumi, Miyazaki Mariko, Takahashi Nobuyuki, Sato Emiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Methylglyoxal Induces Inflammation, Metabolic Modulation and Oxidative Stress in Myoblast Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 263～263
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/toxins14040263	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 佐藤 恵美子
2. 発表標題 尿毒素誘導細胞内代謝変調とウレミックサルコペニア
3. 学会等名 第12回日本腎臓リハビリテーション学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 細田 祐衣、佐藤 恵美子、高橋 信行
2. 発表標題 Methylglyoxalが筋芽細胞の代謝に与える影響の検討
3. 学会等名 第46回日本医用マンスペクトル学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 恵美子、渡辺 真由、熊倉 慧、高橋 信行
2. 発表標題 尿毒素暴露による神経細胞と腎不全マウス脳の細胞内代謝変調の評価
3. 学会等名 第46回日本医用マンスペクトル学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 恵美子
2. 発表標題 尿毒素誘導細胞内代謝変調とウレミックサルコペニア
3. 学会等名 第12回日本腎臓リハビリテーション学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡辺 真由、佐藤 恵美子、三島 英換、阿部 高明、高橋 信行
2. 発表標題 腎障害で蓄積するインドキシル硫酸は酸化ストレスを誘導し神経細胞障害の一因となる
3. 学会等名 第74回酸化ストレス学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡辺 真由、佐藤 恵美子、三島 英換、阿部 高明、高橋 信行
2. 発表標題 CKDにおける脳細胞内代謝変調とインドキシル硫酸による海馬神経細胞障害機序の解明
3. 学会等名 Japan Kidney Council 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 恵美子
2. 発表標題 質量分析が明らかにした腎疾患における尿毒素の脅威
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会年會年次學術集會（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 恵美子
2. 発表標題 CKDにおける腸内環境不全時の尿毒素蓄積とサルコペニア
3. 学会等名 第11回日本腎臓リハビリテーション学会學術集會（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤恵美子、等々力 崇太、山本 多恵、宮崎 真理子、森 建文、伊藤 貞嘉、佐藤 博、高橋 信行
2. 発表標題 カルボニルストレス誘導筋細胞内代謝変化のGC-MSによる評価
3. 学会等名 第44回 日本医用マスペクトル学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Emiko Sato
2. 発表標題 Muscle wasting syndrome in renal failure
3. 学会等名 The Second Tohoku Conference on Global Japanese Studies (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Emiko Sato
2. 発表標題 Uremic Toxins Accumulate in Systemic Organs and Contribute to Organ Failure
3. 学会等名 6th Japan-Taiwan Joint Symposium for Pharmaceutical Sciences (国際学会)
4. 発表年 2021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	高橋 信行 (Takahashi Nobuyuki) (40588456)	東北大学・薬学研究科・教授 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------