

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K11588

研究課題名(和文)慢性腎臓病の栄養障害・サルコペニアの発症・進展とエピゲノム異常の関係

研究課題名(英文) Association of epigenetics with nutrition and sarcopenia in CKD patients.

研究代表者

本田 浩一 (Hirokazu, Honda)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：70297000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：血液透析患者176例、保存期CKD患者42例、健康被験者20例において抗老化関連因子遺伝子の後成的変化についてCOBRA、MSP法でメチル化の頻度を検討した。また、最終年度はdroplet digital (dd) PCR解析にてDNAメチル化について絶対定量を行なった。健康被験者との比較ではCKD患者のDNAメチル化の頻度が高くなることを見出した。保存期CKD患者では約85%、血液透析患者では約70%においてKlotho/FGF23、Sirtuin1のDNAメチル化が、完全にメチル化された場合とメチル化/非メチル化混在型に分かれ、DNAメチル化の程度とmRNAレベルやタンパクレベルが関係した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では栄養障害やサルコペニアと関連する抗老化関連因子遺伝子の後成的遺伝子変性について検討を行った。標的遺伝子の後成的変化と栄養障害の関係が明らかとなれば、栄養障害に対するDNAメチル化診断が可能となる。さらにDNAの後成的変化は可逆的である為、後成的変化に対する新規治療戦略へ展開が可能となる。その結果、予防医療や在宅医療の推進につながるなど、医療費の削減が見込める学術的に意義のある研究課題である。

研究成果の概要(英文)：Epigenetic abnormalities of anti-aging related factors, Klotho/FGF23, Sirtuin 1, in CKD patients, 176 under hemodialysis and 42 not on dialysis, and 20 healthy subjects were assessed by COBRA, MSP and droplet digital (dd) PCR. CKD patients showed high frequency of epigenetic abnormalities of Klotho/FGF23, Sirtuin 1, compared with healthy subjects. Complete and mixed pattern of the DNA methylation were observed in those patients and the pattern were related with messenger RNA and production levels of anti-aging related factors.

研究分野：栄養学

キーワード：後成的遺伝子変性 抗老化関連因子遺伝子 栄養障害 サルコペニア 慢性腎臓病

## 1. 研究開始当初の背景

一般に加齢に伴い体内環境が変化し、動脈硬化や栄養障害を生じやすい環境となる。特に高齢者では筋肉量と筋力の進行性で全身性の減少に特徴づけられるサルコペニア（加齢性サルコペニア）を発症し、QOL 低下や死亡のリスクとなることが知られている。一方、CKD 患者では、高齢者に認められるサルコペニアのリスク因子に加えて、CKD に特有の合併症が加わるため、栄養障害の病態が加速的に進展した**病的なサルコペニア**を発症する。また、サルコペニアの発症には蛋白質摂りやエネルギー不足が関係するが、CKD 患者では食事療法として蛋白質摂取が制限されるため、栄養管理からサルコペニアの発症や進行を抑制することは困難なことが多い。結果、CKD 患者の身体機能や QOL の低下が進行し、在宅治療から施設入院治療を要する患者が増加する問題が生じている。

CKD 患者では心血管病や栄養障害などの合併症の発症・進展に**慢性炎症・酸化ストレス**が密接に関係することを示唆するエビデンスが、申請者の研究成果を含めて蓄積している。さらに、動脈硬化や栄養障害の発症や進展機構には、**細胞寿命や長寿に関連する抗加齢因子**の異常が関係する。抗加齢因子の異常は CKD 患者でも認められており、CKD 患者の合併症や予後に慢性炎症・酸化ストレスと相乗して関係することが推測される。

また、これまでに特定の遺伝子の**後成的遺伝子変性 (DNA メチル化)** が糖尿病や高血圧症、心血管病の発症・進行に関係することが報告されている。DNA メチル化は高齢、慢性炎症・酸化ストレス環境で生じ易いが、CKD 患者は尿毒症から慢性炎症・酸化ストレスが亢進した状態にあり、さらに尿毒素は DNA メチルトランスフェラーゼ (DNMT) の発現を亢進させて、DNA メチル化を促進させることが報告されている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、CKD における栄養障害の重要な関連因子である**慢性炎症・酸化ストレスや長寿に関連する抗加齢因子(長寿関連因子)**の異常の病態を臨床的に解析することである。つまり、何故、慢性炎症・酸化ストレスが生じると栄養障害の頻度が高くなるのか、長寿関連因子の異常が起こる原因はどこにあるのか、そして、長寿関連因子の異常は栄養障害とどのように関連するのか、を解析することである。

## 3. 研究の方法

本研究課題では健康被験者、保存期および透析期 CKD 患者を対象とした後成的遺伝子変性に関する臨床研究、分子疫学研究を行う。

標的遺伝子は長寿関連遺伝子(Klotho/FGF23、Sirtuin1)、炎症関連因子(interleukin-6、TNF- $\alpha$ )、DNA メチル化関連因子(DNMT1、3a、3b)のプロモーター領域の後成的変性を解析する。DNA メチル化は DNA 抽出キットを用いて白血球からゲノム DNA を抽出し、バイサルファイト処理後 PCR 増幅し、電気泳動解析(COBRA、MSP 法) droplet digital(dd)PCR で解析する。また、RNA 抽出キットを用いて標的遺伝子のメッセンジャー(m)RNA を抽出して RT-PCR で定量し、各因子の血清蛋白レベルを ELISA で測定する。

CKD 患者の標的遺伝子の後成的遺伝子変性と栄養障害およびサルコペニアの関係を検討する目的で、2 年間の前向き研究を行い、栄養関連バイオマーカー(アルブミン、プレアルブミン)、dual-energy X-ray absorptiometry 及び CT による脂肪・筋肉量、ハンドグリップテストにより筋力を測定し、評価・診断する。バイオマーカー、脂肪・筋肉量、筋力は観察開始時と 12 ヶ月、

24 ヶ月目に測定・評価する。尚、解析結果は既に凍結保存済みの血液透析患者 DNA サンプルでの結果と比較する。

#### 4 . 研究成果

健康被験者 20 名、血液透析患者 176 名（新規患者サンプル 49 例、凍結保存サンプル 127 例）、保存期 CKD 患者 42 名において抗老化関連因子遺伝子の後成的変化を検討した。

これまでに実施した血液透析患者 127 名を対象とした研究成果では、透析患者では約 15% の患者で Klotho や Sirtuin1 の完全メチル化を、70% でメチル化と非メチル化が混在した状態（混在型）であった。今回の研究では、健康被験者は DNA メチル化を認めず、保存期 CKD 患者 42 名および血液透析患者 49 名では高頻度に抗老化関連因子遺伝子の DNA メチル化が混在型であった。現在、メチル化の定量的解析を行う目的で droplet digital (dd)PCR を行い、混在型の詳細を解析中である。抗老化関連因子の mRNA レベルや血清蛋白レベルは、完全メチル化例では低値を示したが、混在型では高値～低値を示し、遺伝子発現が維持される場合と低下する場合がある。

血液透析患者 49 名における栄養障害と DNA メチル化の関係は、観察期間 12 ヶ月での体脂肪や筋肉量と抗老化関連因子遺伝子の混在型 DNA メチル化との間に有意な変化は認めていないが、Sirtuin1 mRNA レベルが血液透析患者の観察期間 12 ヶ月での筋力低下と関係する結果が得られている。ddPCR の解析結果も踏まえて混在型の詳細、DNA メチル化と栄養障害・サルコペニアとの関係を解析する。尚、コロナ禍から前向き研究の開始時期に遅れが生じ、2024 年度中に 24 ヶ月目の栄養障害・サルコペニアの測定・評価を行うところであり、今後、抗老化関連因子遺伝子の DNA メチル化と栄養障害、サルコペニアの関係について解析を進める予定である。また、保存期 CKD 患者における栄養障害と DNA メチル化の関係の検討も、コロナ禍から研究参加者が徐々に増加した為、研究自体に遅れが生じ、現時点では標的遺伝子の DNA メチル化解析に止まっている。

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〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                         | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)          | 備考 |
|-------|---|--------------------------------|----|
| 研究分担者 | 内田 直樹<br><br>(Naoki Uchida)<br><br>(00286775)     | 昭和大学・医学部・教授<br><br><br>(32622) |    |
| 研究分担者 | 木庭 新治<br><br>(Shinji Koba)<br><br>(20276546)      | 昭和大学・医学部・教授<br><br><br>(32622) |    |
| 研究分担者 | 小林 靖奈<br><br>(Yasuna Kobayashi)<br><br>(20276611) | 昭和大学・薬学部・教授<br><br><br>(32622) |    |

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 |
|---------|---------|
|         |         |