

令和元年5月24日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09599

研究課題名(和文) イメージングMS可視化によるウレミックサルコペニアの機構解明と治療薬の探索

研究課題名(英文) Uremic sarcopenia induced by uremic toxins in chronic kidney disease

研究代表者

佐藤 恵美子 (Sato, Emiko)

東北大学・薬学研究科・助教

研究者番号：20466543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病(CKD)における筋消耗(サルコペニア)は死亡率を増大させる。しかし、CKDにおけるサルコペニアの病態は明らかではなく、予防や治療法が確立されていない。そのため、発症機序を明らかにし、予防・治療法を確立することが重要な課題となっている。本研究では、マウス筋芽細胞由来C2C12、アデニン誘発腎不全マウス、CKD患者を対象とし、尿毒素とサルコペニアとの関係、またサルコペニアの発症機序の解明を行った。本研究で得られた結果として、尿毒素の中でもインドキシル硫酸が筋細胞に毒性を強く示し、インドキシル硫酸濃度がCKD患者のサルコペニア発症に深く関与す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は高血圧や糖尿病同様の生活習慣病などを原因として慢性的に徐々に腎機能が低下する病態であり、国民病になっている。CKD患者では筋量が低下しやすく、寝たきりや死亡リスクも高める。しかし、CKD患者で筋力が低下する原因は明らかではなく、予防・治療法がないのが現状である。本研究では、尿毒素が筋細胞内の代謝変化を引き起こし、そのことがCKDにおける筋量低下の引き金になっていることを明らかにした。この結果は、CKD患者における筋量低下を抑制する新たな予防法や治療法の開発につながることを期待され、またCKD以外にも加齢、がん、炎症性疾患などほかの原因による筋萎縮の病態解明への寄与も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Sarcopenia is associated with increased morbidity and mortality in chronic kidney disease (CKD). Pathogenic mechanisms of skeletal muscle loss in CKD remains unclear. Renal dysfunction results in the accumulation of various uremic toxins in the circulation. The accumulation of uremic toxins has been proposed as a contributing factor for sarcopenia in CKD. In this study, we examined the association between uremic toxins and sarcopenia using myoblast cell line C2C12, adenine-induced renal failure model mouse, and CKD patients. From our results, it indicated that uremic toxin indoxyl sulfate is a pathogenic factor for sarcopenia in CKD. Furthermore, we revealed that causative pathological mechanism of uremic sarcopenia is metabolic alteration causes ATP shortage in muscle cells.

研究分野：臨床代謝分析

キーワード：サルコペニア

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

1. 研究開始当初の背景

現在慢性腎臓病(CKD)患者は1330万人以上いると推定され、このうち600万人は治療が必要とされる国民病である。CKDにおける骨格筋の減少(ウレミックサルコペニア)については、50年以上前から報告されているが、その病態生理は明らかではない。透析患者の約半数はウレミックサルコペニアに罹患しているにもかかわらず、予防法や治療法は確立されていない。CKD患者における骨格筋量減少・筋力低下は容易に転倒を引き起こし、寝たきりとなる可能性が高く、患者のQOLを低下し、国の医療費負担増大につながる。そのため、ウレミックサルコペニアの機序を解明し、予防法および治療法を開発することが重要である。申請者は2011年に血液透析患者の透析前後の血中代謝物の網羅的解析をLC-MSで行い、インドキシル硫酸が血液透析治療で十分に除去できないことを報告した(Sato E et al. Eup J Clin Invest 2011)。さらに申請者はMSを用いた標的メタボロミクスにより、腹膜透析治療によるインドキシル硫酸の除去について検討を行った結果、腹膜透析でもインドキシル硫酸はクレアチニンと比較し、約2割程度しか除去していないことを明らかにした。また、我々の結果から、腹膜透析患者において血中インドキシル硫酸は腎機能の低下と共に体内に蓄積していることがわかり、この蓄積が体内骨格筋量の減少と強く関係していることがわかった。このことから、CKDにおける骨格筋量減少は尿毒症物質の蓄積が関与していると考え、本研究において尿毒症物質蓄積(CKD病態)がウレミックサルコペニアを引き起こす機序を解明し、その治療法を確立するための研究基盤を構築することとした。

2. 研究の目的

CKDにおいて共通の症状であるサルコペニア(筋減弱症)は死亡率および心血管合併症のリスクを増加させる。しかしCKDにおけるサルコペニアの病態は明らかではなく予防および治療法は確立されていない。本研究はCKD病態がサルコペニアを引き起こす機序を解明し、ウレミックサルコペニア治療法開発へと展開するための研究基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、MSメタボロミクスおよびイメージングMSを駆使してCKDにおける代謝経路変化を可視化することで骨格筋量減少のメカニズムの明確化、細胞、組織(筋肉・腎臓等)および個体レベル(腎不全マウス)での代謝経路変化のモニタリングを行ない治療薬の探索を行った。

4. 研究成果

(1)尿毒素の中でも毒性に強いインドキシル硫酸を用いて、尿毒素による筋芽細胞株C2C12への影響を評価し、尿毒素による骨格筋量減少のメカニズムの明確化を行った。サルコペニアの発症には、骨格筋におけるインスリン抵抗性の関与が考えられるため、インドキシル硫酸が与えるインスリン刺激による筋合成シグナル経路への影響を調べた結果、インドキシル硫酸により筋合成シグナル経路のp70s6キナーゼのリン酸化が阻害されることが明らかとなった。またキャピラリー電気泳動質量分析(CE-MS)によりC2C12細胞内メタボロミクス解析から、インドキシル硫酸刺激により、抗酸化応答経路であるペントースリン酸経路が亢進し、TCA回路が停滞していることが分かった。さらにインドキシル硫酸による酸化ストレスとサルコペニアの関連を調べるため、Nrf2とその関連因子についても評価した結果、インドキシル硫酸刺激によりNrf2およびその関連因子であるグルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ(G6PD)の発現も上昇することが分かった。さらに代謝経路解析器であるSeahorseを用いて、インドキシル硫酸刺激による代謝への影響を評価した結果、解糖系が亢進し、ミトコンドリア機能が障害しTCA回路が停滞していることが明らかとなった。C2C12細胞におけるATPを測定した結果、インドキシル硫酸刺激をすることでATP産生も低下することが分かった。以上の結果から、筋細胞においてインドキシル硫酸は酸化ストレスを誘導し、その結果、Nrf2を介してペントースリン酸経路を亢進させていることが明らかとなり、インスリン抵抗性以外にインドキシル硫酸による過剰な酸化ストレスが筋細胞内代謝変調を誘導し、サルコペニア発症の引き金になっていることを明らかにした(図1)。

さらに臨床検体を対象とし、血中インドキシル硫酸と骨格筋量との関係を調べた。その結果、血中インドキシル硫酸濃度が高い患者ほど、骨格筋量が少なく、さらに2年後の骨格筋減少量

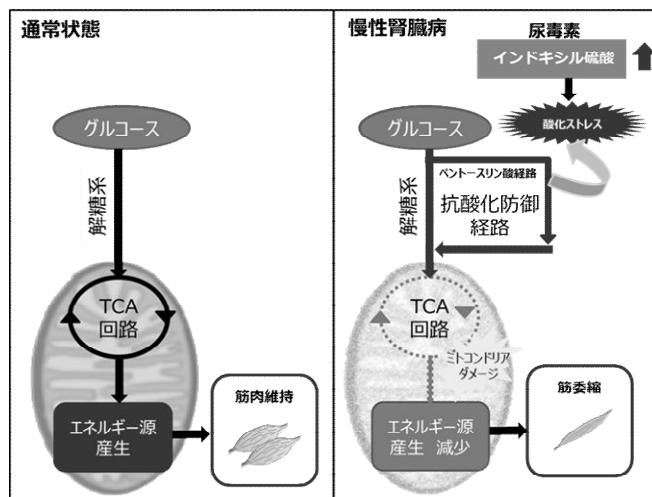


図1 尿毒素による細胞内代謝変化

と血中インドキシル硫酸濃度に関連があることを明らかにした。

(2) アデニン誘発腎不全マウスを対象とし、腎不全における臓器内代謝変化経路のモニタリングと治療薬候補の検討を行った。アデニン誘発腎不全マウスは、0.2%アデニン食を7週間投与することで作製した。さらに治療薬候補として、経口吸着炭であるAST-120を4週間投与した。尿毒素としてインドキシル硫酸とp-クレシル硫酸を対象とし、各組織(脳、心臓、肝臓、腎臓、筋肉、すい臓、脾臓、白色脂肪、褐色脂肪、精巣、胸腺、肺、小腸、大腸、盲腸)へ蓄積するかについてLC-MSで評価した。その結果、インドキシル硫酸とp-クレシル硫酸は腎不全時に脳を含むすべての臓器に蓄積することが明らかになった。またAST-120投与で腎臓、筋肉、精巣、脾臓に蓄積したインドキシル硫酸が有意に減少することが分かった。一方、p-クレシル硫酸は全ての臓器においてAST-120投与で蓄積が有意に減少した。さらに組織に蓄積した尿毒素と代謝物の分布についてイメージングMSで評価を行った。しかしながら組織中の代謝物の変化については、イメージングMSの感度が足りず変化をとらえることが困難であった。組織中に蓄積したインドキシル硫酸とp-クレシル硫酸については、腎臓と筋肉は検出することができたが、ほかの組織では検出できなかった。腎臓でのインドキシル硫酸とp-クレシル硫酸の蓄積の観察結果から、腎臓の障害を受けている部分に蓄積が多いことが明らかとなった(図2)。この結果は、免疫染色の結果と一致した。

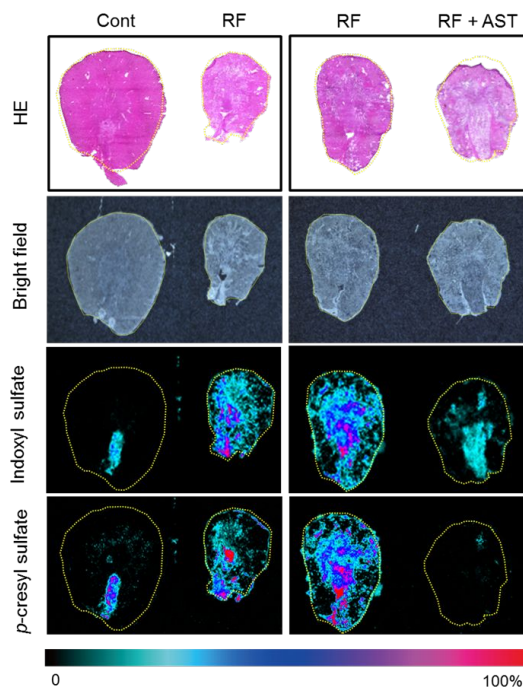


図2 腎臓に蓄積したインドキシル硫酸とp-クレシル硫酸

さらに、AST-120により臓器内に蓄積した尿毒素を除去した際の骨格筋への影響についても評価を行った。その結果、AST-120を投与することで腎不全時の腎機能、線維化の回復は認められないものの、筋組織で骨格筋筋束横断面の面積が改善していることを明らかにした。今回の結果から、腎不全時に尿毒素は全身臓器に蓄積し、AST-120投与によりその蓄積が軽減し、腎機能は回復しないが、骨格筋の萎縮が抑制されることが分かった。

以上の結果から、腎不全では蓄積した尿毒素が筋細胞で酸化ストレスを惹起し、そのことによる代謝フローが過剰な抗酸化応答経路へと変化し、その代償としてATP産生低下をきたし、サルコペニアを引き起こす。また体内インドキシル硫酸の除去がサルコペニアの症状を改善することを明らかにした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 22 件)

1. "Nicotinamide alleviates kidney injury and pregnancy outcomes in lupus-prone MRL/lpr mice treated with lipopolysaccharide" Kenta Imaruoka, Yuji Oe, Tomofumi Fushima, **Emiko Sato**, Akiyo Sekimoto, Hiroshi Sato, Junichi Sugawara, Sadayoshi Ito, **Nobuyuki Takahashi**, Biochemical and Biophysical Research Communications, 510(4), 587-592, 2019, doi: 10.1016/j.bbrc.2019.01.110. 査読有
2. "Protease-activated receptor 2 exacerbates cisplatin-induced nephrotoxicity" Mari Watanabe, Yuji Oe, **Emiko Sato**, Akiyo Sekimoto, Hiroshi Sato, Sadayoshi Ito, and **Nobuyuki Takahashi**, American Journal of Physiology Renal Physiology, 316(4), F654-F659, 2019, doi: 10.1152/ajprenal.00489.2018. 査読有
3. "Hydrochlorothiazide ameliorates polyuria caused by tolvaptan treatment of polycystic kidney disease in PCK rats." Anyi Wang, Takuo Hirose, Yusuke Ohsaki, Chika Takahashi, **Emiko Sato**, Ikuko Oba-Yabana, Satoshi Kinugasa, Yoshikazu Muroya, Sadayoshi Ito, **Takefumi Mori**,

Clinical and Experimental Nephrology, 23(4), 455-464, 2019, doi: 10.1007/s10157-018-1669-9.

査読有

4. “Pathogenesis of uremic sarcopenia based on metabolic alteration”, Emiko Sato, 国際文献社、2、2-10, 2018, http://www.jsbms.jp/english/publish/2-1_sato.pdf, 査読有
5. “Vitamin B3 Nicotinamide: A Promising Candidate for Treating Preeclampsia and improving Fetal Growth” Nobuyuki Takahashi, Feng Li, Tomofumi Fushima, Gen Oyanagi, Emiko Sato, Yuji Oe, Akiyo Sekimoto, Daisuke Saigusa, Hiroshi Sato, Sadayoshi Ito, The Tohoku Journal of Experimental Medicine, 244, 243-248, 2018, doi: 10.1620/tjem.244.243. 査読有
6. “Pathophysiological and molecular mechanisms involved in renal congestion in a novel rat model” Satoshi Shimada, Takuo Hirose, Chika Takahashi, Emiko Sato, Satoshi Kinugasa, Yusuke Ohsaki, Kiyomi Kisu, Hiroshi Sato, Sadayoshi Ito, Takefumi Mori, Scientific Reports, 8, 16808, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-35162-4. 査読有
7. “Hepatic dysfunction and thrombocytopenia induced by excess sFlt-1 in mice lacking endothelial nitric oxide synthase” Yuji Oe, Mie Ko, Tomofumi Fushima, Emiko Sato, S. Ananth Karumanchi, Hiroshi Sato, Junichi Sugawara, Sadayoshi Ito, Nobuyuki Takahashi, Scientific Reports, 8, 102, 2018, doi: 10.1038/s41598-017-18260-7. 査読有
8. “(Pro)renin receptor is involved in mesangial fibrosis and matrix expansion” Kaori Narumi, Emiko Sato, Takuo Hirose, Tae Yamamoto, Takashi Nakamichi, Mariko Miyazaki, Hiroshi Sato, Sadayoshi Ito, Scientific Reports, 8, 16, 2018, doi: 10.1038/s41598-017-18314-w, 査読有
9. “Acidic organelles mediate TGF- β 1-induced cellular fibrosis via (pro)renin receptor and vacuolar ATPase trafficking in human peritoneal mesothelial cells” Ikuko Oba-Yabana, Takefumi Mori, Chika Takahashi, Takuo Hirose, Yusuke Ohsaki, Satoshi Kinugasa, Yoshikazu Muroya, Emiko Sato, Geneviève Nguyen, Rémi Piedagnel, Pierre M. Ronco, Kazuhito Totsune, and Sadayoshi Ito, Scientific Reports, 8, 2648, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-20940-x. 査読有
10. “Urinary angiotensinogen excretion level is associated with elevated blood pressure in the normotensive general population” Emiko Sato, Wang An Yi, Michihiro Satoh, Yoko Nishikiori, Ikuko Oba-Yabana, Mai Yoshida, Hiroshi Sato, Sadayoshi Ito, Wataru Hida, Takefumi Mori, American Journal of Hypertension, 31(6), 742-749, 2018, doi: 10.1093/ajh/hpy020 査読有
11. “Pathogenesis of uremic sarcopenia based on metabolic alteration” Emiko Sato, Medical Mass Spectrometry, 2(1), 2-10, 2018, 査読有
12. “Impact of the Oral Adsorbent AST-120 on organ-specific accumulation of uremic toxins: LC-MS/MS and MS imaging techniques” Emiko Sato, Daisuke Saigusa, Eikan Mishima, Taeko Uchida, Daisuke Miura, Tomomi Morikawa-Ichinose, Kiyomi Kisu, Akiyo Sekimoto, Ritsumi Saito, Yuji Oe, Yotaro Matsumoto, Yoshihisa Tomioka, Takefumi Mori, Nobuyuki Takahashi, Hiroshi Sato, Takaaki Abe, Toshimitsu Niwa, and Sadayoshi Ito, Toxins, 10 (1), 19, 2018, doi: 10.3390/toxins10010019, 査読有
13. “腎不全時におけるサルコペニア” 佐藤 恵美子, 科学評論社、第 82 巻、第 4 号、358-364, 2017, 査読無
14. “Nicotinamide ameliorates a preeclampsia-like condition in mice with reduced uterine perfusion pressure”, Tomofumi Fushima, Akiyo Sekimoto, Yuji Oe, Emiko Sato, Sadayoshi Ito, Hiroshi Sato, Nobuyuki Takahashi, American Journal of Physiology Renal Physiology, 312(2), F366-F372, 2017, 査読有

15. “筋細胞における尿毒素性酸化ストレスは代謝変化を引き起こしサルコペニアの原因となる”,佐藤 恵美子, 東北医学会雑誌, 129, 80, 2017, 査読無
16. “Protease-activated receptor 2 exacerbates adenine-induced renal tubulointerstitial injury in mice”
Sakiko Hayashi, Yuji Oe, Tomofumi Fushima, Emiko Sato, Hiroshi Sato, Sadayoshi Ito,
Nobuyuki Takahashi, Biochemical and Biophysical Research Communications, 483, 547-552,
2017, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.108. 査読有
17. “Metabolic alteration by indoxyl sulfate in skeletal muscle induce uremic sarcopenia in chronic kidney disease”, Emiko Sato, Takefumi Mori, Eika Mishima, Arisa Suzuki, Sanae Sugawara,
Naho Kurasara, Daisuke Saigusa, Daisuke Miura, Tomomi Morikawa-Ichinose, Ritsumi Saito,
Ikuko Oha-Yabana, Yuji Oe, Kiyomi Kisu, Eri Naganuma, Kenji Koizumi, Takayuki Mokudai,
Yoshimi Niwano, Tai Kudo, Chitose Suzuki, Nobuyuki Takahashi, Hiroshi Sato, Takaaki Abe,
Toshimitsu Niwa, Sadayoshi Ito, Scientific Reports,6, 36618, 2016, doi: 10.1038/srep36618. 査読有
18. “Urinary angiotensinogen excretion is associated with blood pressure in obese young adults”
Emiko Sato, Takefumi Mori, Michihiro Sato, Mutsuko Fujiwara, Yoshimi Nakamichi, Ikuko Oba,
Susumu Ogawa, Yoshitaka Kinouchi, Hiroshi Sato, Sadayoshi Ito, Wararu Hida. Clinical and
Experimental Hypertension, 38(2), 203-208, 2016, doi: 10.3109/10641963.2015.1081219. 査読有
19. “Reduced Uterine Perfusion Pressure (RUPP) model of preeclampsia in mice”, Tomofumi Fushima,
Akiyo Sekimoto, Takahiro Minato, Yuji Oe, Kiyomi Kisu, Emiko Sato, Kenichi Funamoto,
Toshiyuki Hayase, Yoshitaka Kimura, Sadayoshi Ito, Hiroshi Sato, Nobuyuki Takahashi, PLoS
One, 11(5), e0155426, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0155426. 査読有
20. “Coagulation factor Xa and PAR2 as novel threptic targets for diabetic nephropathy.”, Yuji Oe,
Sakiko Hayashi, Tomofumi Fushima, Emiko Sato, Kiyomi Kisu, Hiroshi Sato, Sadayoshi Ito,
Nobuyuki Takahashi, Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 36(8), 1525-1533, 2016,
doi: 10.1161/ATVBAHA.116.307883. 査読有
21. “Nicotinamide benefits both mothers and pups in two contrasting mouse models of pre-eclampsia
“Feng Li, Tomofumi Fushima, Gen Oyanagi, H.W. Davin Townley-Tilson, Emiko Sato, Hironobu
Nakada, Yuji Oe, John R Hagaman, Jennifer Wilder, Manyu Li, Akiyo Sekimoto, Daisuke Saigusa,
Hiroshi Sato, Sadayoshi Ito, J Charles Jennette, Nobuyo Maeda, S Ananth Kramanchi, Oliver
Smithies, Nobuyuki Takahashi. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United
States of America, 113(47), 13450-13455, 2016, doi: org/10.1073/pnas.1614947113 査読有
22. “腹膜透析治療腎不全患者におけるグアニジン化合物の意義, 佐藤 恵美子, 東北医学会
雑誌, 128, 70, 2016, 査読無

〔学会発表〕(計 10 件)

Emiko Sato, Metabolomics analysis of preeclampsia in mouse overproducing soluble fms-like tyrosine kinase 1, 5th CWRU-TOHOKU Joint Workshop, 2018
佐藤 恵美子, 腎不全における全身臓器への尿毒素蓄積と AST-120 による蓄積減少効果、第 2 回日本 Uremic Toxin 研究会、2018 年
佐藤 恵美子, 腎不全マウスの尿内細菌叢と腸内腐敗物の変化と AST-120 による影響、第 43 回日本医用マススペクトル学会年会、2018 年
佐藤 恵美子, 慢性腎臓病患者においてインドキシル硫酸による骨格筋内代謝変化がウレミックサルコペニアを誘導する、第 42 回日本医用マススペクトル学会年会、2017 年
佐藤 恵美子, LC-MS/MS とイメージ MS による腎不全における尿毒素臓器蓄積と AST-120 による治療効果の評価、第 42 回日本医用マススペクトル学会年会、2017 年
佐藤 恵美子, 代謝変化に基づく尿毒素性サルコペニアの発症機序の解明、第 60 回日本

腎臓学会、2017年

佐藤 恵美子、尿毒素による細胞内代謝変化は慢性腎臓病においてサルコペニアを引き起こす、第137回日本薬学会、2016年

佐藤 恵美子、骨格筋細胞内への尿毒素蓄積によるサルコペニア発症機序の解明、第7回腎不全研究会、2016年

佐藤 恵美子、筋細胞における尿毒素性酸化ストレスは代謝変化を引き起こしサルコペニアの原因となる、第69回日本酸化ストレス学会、2016年

佐藤 恵美子、妊娠高血圧腎症の病態解明を目指した sFlt-1 過剰発現妊娠高血圧腎症モデルマウスのメタボロミクス解析、第39回日本高血圧学会、2016年

〔図書〕(計1件)

佐藤 恵美子、森 建文 他、東京医学社、vol.83
別冊“腹膜透析とグアニジン化合物”、2017、46-50

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：高橋 信行

ローマ字氏名：Nobuyuki Takahashi

所属研究機関名：東北大学

部局名：薬学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：40588456

研究分担者氏名：森 建文

ローマ字氏名：Takefumi Mori

所属研究機関名：東北医科薬科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：40375001

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。