

令和元年5月28日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19910

研究課題名（和文）慢性腎臓病における脂質代謝異常による筋萎縮発生機序の解明

研究課題名（英文）The pathogenesis of sarcopenia induced by abnormal lipid metabolism in chronic kidney disease

研究代表者

増田 真志（MASUDA, Masashi）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・助教

研究者番号：50754488

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、慢性腎臓病（CKD）に伴う筋萎縮発症機序の解明を目指す。まず、CKDモデルラットの筋萎縮を確認した腓腹筋における脂肪酸不飽和化酵素（SCD）遺伝子発現量の低下を見出した。また、CKDモデルマウスに不飽和脂肪酸（オレイン酸：OA）が多い餌を与えると、CKD群で減少した握力は改善傾向を示した。筋芽細胞株C2C12細胞を用いた実験では、SCD阻害剤により増加した筋分解系遺伝子発現量およびSCD阻害剤により観察されるオートファジー障害はOA添加により改善した。以上より、CKDの骨格筋で起きる脂質代謝異常がオートファジー障害等の筋分解機構を亢進して筋萎縮を誘発する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病（CKD）が悪化して発症する筋萎縮に関する基礎研究の実験系は確立されておらず、発症メカニズム等を理解するために必要な基礎的なデータが圧倒的に足りないのが現状である。しかしながら、本研究結果からCKDの骨格筋で起きる脂質代謝異常がオートファジー障害等の筋分解機構を亢進して筋萎縮を誘発する可能性が示唆されたことは、発展途上の筋萎縮研究分野の大きな飛躍の第一歩となると確信している。また、世界的に急速に高齢化を迎える中、健康寿命の延伸は喫緊の課題であるため、老化に伴う筋萎縮発症機序の新しい発見にもつながれば、現代人や次の世代の人々が抱える大きな問題解決に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the pathogenesis of muscle atrophy in chronic kidney disease. First, we found out that CKD model rats had decreased stearoyl-CoA desaturase (SCD) gene expression in muscle gastrocnemius. Next, the treatment CKD model mice with unsaturated fatty acids, oleate, exhibited slight improvements of impaired grip strength in CKD rats. In addition, oleate ameliorated upregulation of muscle atrophy relative genes expression and autophagy impairment induced by SCD inhibitor. Taken together, these results suggested that abnormal lipid metabolism in myocyte may provoke muscle atrophy through autophagy impairment in CKD.

研究分野：慢性腎臓病

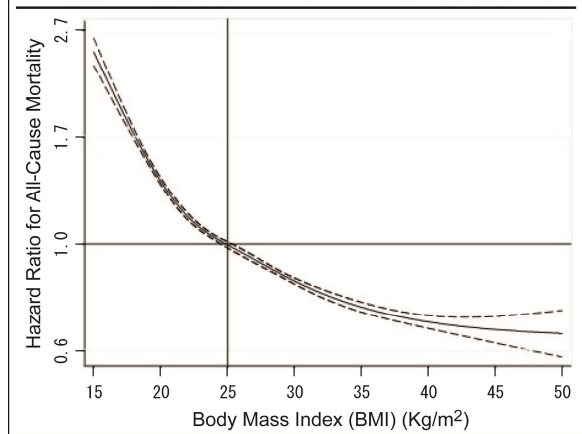
キーワード：脂質代謝異常

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

1. 研究開始当初の背景

(1) わが国の慢性腎臓病 (CKD) 患者は年々増加傾向で推定 1,300 万人を超え、CKD は新たな「国民病」とも言われている。そのCKDに併発するProtein-energy wasting syndrome (CKD-PEW) は筋肉や脂肪の蓄積が減少し低栄養状態を引き起こす病態で、適切な管理が行われなければ重篤化して生存率に大きく関与する。健常者においてはBody Mass Index (BMI 値) が高くなると生活習慣病などの罹患率が高くなるが、CKDの透析患者においてはBMI値と致死率には負の相関関係があることが近年報告された(図1)。そのため、CKD-PEWにおける筋肉分解機序を正しく理解し、それを予防・抑制することは非常に重要な課題である。PEWの原因として栄養素摂取不足等があるが、栄養補給だけでは完全に病態が改善されないことから、新しい治療法の確立が求められている。

図1. 末期慢性腎臓病(CKD)の透析患者におけるObesity-Paradox (末期CKDの透析患者のBMIと致死率には負の相関関係がある)



(2) オートファジーは、細胞が自らの細胞内タンパク質を分解する主要メカニズムで、細胞の自食作用とも呼ばれている。オートファジーは飢餓時における栄養源確保だけでなく、細胞内での異常なタンパク質の蓄積を防ぐことにより生体の恒常性維持に関与しており、アルツハイマー病などの原因タンパク質の分解除去作用を有している。つまり、オートファジー障害は、異常タンパク質の蓄積により生体の恒常性が崩れ、様々な疾患に寄与することが分かってきた。

2. 研究の目的

本研究は、筋肉中の脂質代謝異常による『オートファジー障害』を介したCKD-PEW発症機序を解明し、CKD-PEWだけでなくその他の筋萎縮の新規治療法開発のための研究基盤の確立を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) CKD-PEWにおける筋肉中の脂肪酸組成を評価するために、8週齢雄性Wistar ratにアデニン食を6週間与えてCKDモデルラットを作製した。その後5週間通常食で飼育した後に骨格筋(腓腹筋、ヒラメ筋、前脛骨筋、長趾伸筋)を採取し、各骨格筋の筋線維をHE染色、各遺伝子発現変化をReal-time PCR法、脂肪酸組成をGas-liquid chromatographyを用いて解析した。

(2) 細胞レベルで詳細に脂肪酸代謝による筋萎縮への影響を評価するために、マウス筋芽細胞株C2C12細胞を筋管細胞に分化させた細胞を用いた。この細胞にStearoyl-CoA Desaturase (SCD) 阻害剤(CAY10566)および不飽和脂肪酸であるオレイン酸(OA)を添加して、筋管細胞の形態を顕微鏡撮影、各遺伝子発現変化をWestern blotting法またはReal-time PCR法を用いて解析した。さらに、オートファジーの評価に関しては、遺伝子発現変化だけでなくEGFP融合LC3B発現ベクターを用いて解析した。

(3) 細胞レベルで得られたOAの効果をCKDモデル動物でも検討するために、7週齢雄性C57BL6/Jマウスを5/6腎摘出によりCKDモデルマウスを作製した。このマウスに飽和脂肪酸であるステアリン酸(SA)もしくはOAを多く含む餌を9週間与えた後に、筋力を握力測定、腓腹筋の各遺伝子発現変化をReal-time PCR法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) Normal群と比してCKD群の腓腹筋は筋重量の減少および筋線維の萎縮が確認されたが、他のヒラメ筋、前脛骨筋、長趾伸筋では差はみられなかった。また、筋萎縮関連遺伝子(Atrogin1、MuRF1)、小胞体ストレス応答関連遺伝子(BiP、ATF4、CHOP)、アポトーシス関連遺伝子(Bcl2、Bax2)のmRNA発現量がCKD群の腓腹筋で増加した。さらに、腓腹筋の脂肪酸組成はCKD群において不飽和化指数は低下し、SCD1およびSCD2 mRNA発現量もCKD群で低下した。

(2) 筋芽細胞株C2C12細胞を筋管細胞に分化させてSCD阻害剤を添加すると、筋管細胞のサイズが縮小したがOA同時添加によりその縮小は改善された。同様に、SCD阻害剤により増加した筋萎縮関連遺伝子(Atrogin1、MuRF1)、小胞体ストレス応答関連遺伝子(BiP、ATF4、CHOP)、アポトーシス関連遺伝子(Bcl2、Bax2)のmRNA発現量はOAの同時投与により抑制された。オートファジー関連遺伝子LC3B-IIのタンパク質発現量はSCD阻害剤添加により減少したが、OAの同時添加によりその減少は抑制された。逆に、オートファジーの分解基質に結合するp62タンパク質の発現量はSCD阻害剤により増加したが、OAの同時添加によりその増加は減少した。

(3) CKDモデルマウスへのOA食投与はSA食と比較して腓腹筋重量への影響は見られなかったが、CKD群で減少した握力はOA食を与えると改善傾向がみられた。

以上より、CKDの骨格筋でみられる脂質代謝異常によるオートファジー障害が筋萎縮に寄与する可能性が示唆された。

引用文献

Park J, Ahmadi SF, Streja E, Molnar MZ, Flegal KM, Gillen D, Kovesdy CP, Kalantar-Zadeh K. Obesity paradox in end-stage kidney disease patients. *Prog Cardiovasc Dis*. 56:415-425. 2014

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

Fukuda-Tatano S, Yamamoto H, Nakahashi O, Yoshikawa R, Hayashi M, Kishimoto M, Imi Y, Yamanaka-Okumura H, Ohnishi K, **Masuda M**, and **Taketani Y**. Regulation of alpha-Klotho Expression by Dietary Phosphate During Growth Periods. *Calcif Tissue Int* 104: 667-678, 2019.

DOI: 10.1007/s00223-019-00525-0. (査読有)

Imi Y, Yabiki N, Abuduli M, **Masuda M**, Yamanaka-Okumura H, and **Taketani Y**. High phosphate diet suppresses lipogenesis in white adipose tissue. *J Clin Biochem Nutr* 63: 181-191, 2018.

DOI: 10.3164/jcbrn.17-141. (査読有)

Kagawa T, Kozai M, **Masuda M**, Harada N, Nakahashi O, Tajiri M, Yoshikawa R, Nakao M, Takei Y, Iwano M, Takeda E, **Taketani Y**, and Yamamoto H. Sterol regulatory element binding protein 1 trans-activates 25-hydroxy vitamin D3 24-hydroxylase gene expression in renal proximal tubular cells. *Biochem Biophys Res Commun* 500: 275-282, 2018.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.04.058. (査読有)

Miyazaki-Anzai S, **Masuda M**, Kohno S, Levi M, Shiozaki Y, Keenan AL, and Miyazaki M. Simultaneous inhibition of FXR and TGR5 exacerbates atherosclerotic formation. *J Lipid Res* 59: 1709-1713, 2018.

DOI: 10.1194/jlr.M087239. (査読有)

Yamaguchi C, Yamanaka-Okumura H, Esumi H, **Masuda M**, Katayama T, and **Taketani Y**. Investigation of dose-dependent effects of fat on blood glucose, serum insulin, and appetite sensation. *J Med Invest* 65: 203-207, 2018

DOI: 10.2152/jmi.65.203. (査読有)

Yoshikawa R, Yamamoto H, Nakahashi O, Kagawa T, Tajiri M, Nakao M, Fukuda S, Arai H, **Masuda M**, Iwano M, Takeda E, and **Taketani Y**. The age-related changes of dietary phosphate responsiveness in plasma 1,25-dihydroxyvitamin D levels and renal Cyp27b1 and Cyp24a1 gene expression is associated with renal alpha-Klotho gene expression in mice. *J Clin Biochem Nutr* 62: 68-74, 2018.

DOI: 10.3164/jcbrn.17-20. (査読有)

Sugihara K, **Masuda M**, Nakao M, Abuduli M, Imi Y, Oda N, Okahisa T, Yamamoto H, Takeda E, and **Taketani Y**. Dietary phosphate exacerbates intestinal inflammation in experimental colitis. *J Clin Biochem Nutr* 61: 91-99, 2017.

DOI: 10.3164/jcbrn.16-117. (査読有)

[学会発表](計 17 件)

Maiko Sakai, Kohta Ohnishi, Teppei Fukuda, **Masashi Masuda**, Naomi-Abe-Kanoh, Hisami Yamanaka-Okumura, Yoshichika Kawai, **Yutaka Taketani**. mTORC2 signaling is critical for lysosomal activation by isorhamnetin treatment in J774.1. 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress. March 28-31, 2019

藤元萌、大西康太、坂井麻衣子、福田哲平、大西愛花、**増田真志**、奥村仙示、河合慶親、**竹谷豊** オートファジー活性を制御する食品成分の探索 日本農芸化学会2019年度大会、2019年3月24-27日

吉澤和香、中尾真理、伊美友紀子、矢引紀江、新井田裕樹、**増田真志**、奥村仙示、**竹谷豊** 慢性腎臓病に伴う骨ミネラル代謝異常 (CKD-MBD) における骨筋関連 第3回日本CKD-MBD研究会学術集会、2019年3月2日

Serina Kabutoya, **Masashi Masuda**, Yuichiro Adachi, Yilimulati Yimamu, Hisami Yamanaka-Okumura, Hironori Yamamoto, **Yutaka Taketani**. Hypervitaminosis A contributes to abnormal iron metabolism in CKD. American Society Nephrology Kidney Week. October 23-28, 2018

Mayu Hayashi, Shiori Fukuda, Maki Kishimoto, Hironori Yamamoto, **Masashi Masuda**,

Yutaka Taketani. High phosphate diet before pregnancy dysregulates phosphate metabolism in neonatal offspring mice. American Society Nephrology Kidney Week. October 23-28, 2018

吉田里沙、**増田真志**、森優樹、新井田裕樹、足立雄一郎、大西康太、河合慶親、二川健、山本浩範、**竹谷豊** スルフォラファンのリポファジーを介した脂肪分解効果 第23回日本フードファクター学会、2018年9月7日-8日

Risa Yoshida, **Masashi Masuda**, Yuki Mori, Yuki Niida, Yuichiro Adachi, Kohta Ohnishi, Hisami Yamanaka-Okumura, Yoshichika Kawai, **Yutaka Taketani**. Sulforaphane induces lipolysis via lipophagy in mouse adipocyte. Kern lipid conference 2018. August 13-15, 2018

Shohei Kohno, Shinobu Miyazaki-Anzai, **Masashi Masuda**, Yuji Shiozaki, Audrey L. Keenan, Makoto Miyazaki. Simultaneous inhibition of FXR and TGR5 exacerbates atherosclerotic formation. Kern lipid conference 2018. August 13-15, 2018

山本浩範、中尾真理、中橋乙起、**増田真志**、**竹谷豊** CKDラットにおいてリンは鉄代謝および腎性貧血の憎悪に影響を与える 第6回日本腎栄養代謝研究会、2018年7月14日-15日

新井田裕樹、**増田真志**、吉澤和香、足立雄一郎、内田貴之、大西康太、河合慶親、二川健、山本浩範、**竹谷豊** 慢性腎臓病に伴う骨格筋の飽和脂肪酸蓄積はオートファジー不全を介して筋萎縮を誘発する 日本ビタミン学会第70回大会、2018年6月22日-23日

甲谷芹奈、**増田真志**、イリムラティイマム、奥村仙示、山本浩範、**竹谷豊** 慢性腎臓病における鉄代謝異常に対するレチノイン酸の影響 日本ビタミン学会第70回大会、2018年6月22日-23日

吉田里沙、新井田裕樹、足立雄一郎、酒井晶子、奥村仙示、大西康太、内田貴之、河合慶親、山本浩範、二川健、**竹谷豊**、**増田真志** スルフォラファンのリポファジーを介した脂肪分解効果 第72回日本栄養・食糧学会大会、2018年5月11日-13日

酒井晶子、阿部航太郎、伊美友紀子、Yilimulati Yimamu、竹内綾乃、**増田真志**、奥村仙示、神戸大朋、山本浩範、**竹谷豊** 慢性腎臓病における亜鉛代謝異常と亜鉛補充食の効果 第21回日本病態栄養学会年次学術集会、2018年1月12日-14日

Yuki Niida, **Masashi Masuda**, Aika Yoshizawa, Yuichiro Adachi, Yilimulati Yimamu, Serina Kabutoya, Risa Yoshida, Hisami, Yamanaka-Okumura, Yoshichika Kawai, Makoto Miyazaki, Hironori Yamamoto, **Yutaka Taketani**. Abnormal lipid metabolism in skeletal muscle mediates chronic kidney disease-induced sarcopenia. American Society of Nephrology Kidney Week 2017. November 2-5, 2017

増田真志、宮崎淳 慢性腎臓病におけるSCD遺伝子発現変化による血管石灰化発症機序 メタルバイオサイエンス研究会2017、2017年10月13日-14日

新井田裕樹、**増田真志**、足立雄一郎、イリムラティイマム、奥村仙示、山本浩範、**竹谷豊** 骨格筋脂質代謝異常に伴う尿毒症性サルコペニア(筋萎縮)を誘発する 第64回日本栄養改善学会学術集会、2017年9月13日-15日

新井田裕樹、**増田真志**、吉澤和香、Ilimulati Yimamu、吉田里沙、甲谷芹奈、奥村仙示、河合慶親、**竹谷豊**、山本浩範 骨格筋脂質代謝異常が慢性腎臓病に伴うProtein Energy Wasting (CKD-PEW) を誘発する 第71回日本栄養・食糧学会大会、2017年5月19日-21日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔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：竹谷 豊

ローマ字氏名：TAKETANI, yutaka

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部（医学域）

職名：教授

研究者番号（8桁）：30263825

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：新井田 裕樹

ローマ字氏名：(NIIDA, yuki)

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。