

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15069

研究課題名（和文）筋作動因子-尿毒症物質クロストークを標的としたCKD誘発サルコペニアの治療戦略

研究課題名（英文）Strategy for the treatment of CKD-induced sarcopenia based on the crosstalk between myokine and uremic toxins

研究代表者

榎木 裕紀（ENOKI, YUKI）

慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・助教

研究者番号：50813854

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：慢性腎臓病（CKD）モデルマウスでは、CKD処置後の経過に伴って骨格筋重量、断面積の減少が認められ、筋作動因子の一つであるapelinの骨格筋における発現減少が認められた。このapelinの発現減少は尿毒症物質吸着剤である活性吸着炭の投与によって抑制された。さらにCKDマウスに対して、apelinを投与した結果、骨格筋重量および断面積の減少が抑制された。以上のことからCKD誘発サルコペニアにおいて、apelinは尿毒症物質を介した発現減少によるサルコペニア病態への関与が示唆され、さらにapelinはCKD誘発サルコペニアに対する新規治療薬とな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

本研究は、慢性腎臓病に伴う骨格筋の減少（サルコペニア）の病態発症メカニズムの解明と病態メカニズムに基づいた新たなサルコペニア治療法の確立を目的としている。慢性腎臓病の病態の進行に伴って、骨格筋の量や機能を維持するために必要な生理因子（アペリン）が低下することを明らかにし、このアペリンを補充することで慢性腎臓病によるサルコペニアを治療、予防することが可能である可能性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In a mouse model of chronic kidney disease (CKD), the skeletal muscle weight and the cross-sectional area of the muscle fiber appeared to gradually decrease after the CKD surgery; expression of apelin-a skeletal muscle-derived secretory factor also decreased in the skeletal muscles. The administration of charcoal, a uremic toxin adsorbent, suppressed the decrease in apelin and skeletal muscle mass. Furthermore, apelin suppressed the decrease in skeletal muscle mass in CKD mice. The findings suggest that uremic toxin-mediated downregulation of apelin may play an important role in the pathophysiology of CKD-induced sarcopenia. Apelin, therefore could be a promising therapeutic target for CKD-induced sarcopenia.

研究分野：医療薬学

キーワード：慢性腎臓病 サルコペニア 尿毒症物質 筋作動因子 apelin

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

サルコペニアは加齢に伴う筋肉の萎縮によって筋量・筋力が低下する病態を指し、1989年に Rosenberg によって提唱された概念である。2016年に ICD-10の疾病分類に加えられたことにより疾患としての認知が高まってきた反面、運動療法や食事療法といった従来の治療が存在するのみで、様々な疾患に関連したサルコペニアについては有効かつ確立された治療法に乏しいといった現状がある。その原因としてサルコペニア病態の全容が明らかになっていないことが問題点として挙げられる。

我々はサルコペニア合併症として慢性腎臓病 (CKD) に着目した。CKD は本邦における患者数が 1300 万人を超える国民病として認知され、サルコペニアは CKD 患者生命予後や腎機能の予後と関連することが数多く報告されている。現在 CKD 患者におけるサルコペニアの予防・治療はサルコペニアの改善のみならず、原疾患である CKD 発症進展の抑制にもつながる新たな治療戦略となると考えられており、CKD 誘発サルコペニア病態の解明は窮迫した課題である。これまでに我々は CKD 時に腎機能低下に伴って体内に蓄積する内因性物質 (尿毒症物質) に着目し、尿毒症物質の中でもインドキシル硫酸 (IS) が筋萎縮を強力に誘導することを明らかにした。これら報告は他の研究者らによっても支持されている。さらに近年、骨格筋は分泌組織としての認識が広く知られるようになり、骨格筋由来の分泌因子を “myokine/筋作動因子” と表現し、これまでにいくつもの筋作動因子が報告されている。筋作動因子には骨格筋の肥大や異化亢進など様々な機能を有するものが報告されており、これらは生理的条件下で骨格筋量のバランス維持を担うと考えられており、その有用性から筋作動因子はサルコペニア治療や代謝性疾患の新たな治療薬候補や治療標的因子としても期待され、生理機能が数多く研究されている。また CKD においてもいくつかの筋作動因子発現変動が報告されており、サルコペニアとの関連性が研究されている。そこで我々は CKD 誘発サルコペニア病態における尿毒症物質と筋作動因子の発現変動に基づくサルコペニア病態の解明がサルコペニア治療において有用ではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、CKD マウスの骨格筋における筋作動因子発現変動と尿毒症物質の関係を明らかにするとともに筋作動因子の CKD 誘発サルコペニアに対する新規治療薬としての有用性を明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

(1) CKD マウスのサルコペニア病態における骨格筋中筋作動因子発現変動の評価

CKD マウスは 6 分の 5 腎臓摘出術により作成した。術後 12 時間の明暗サイクル下、自由摂食飲水で 4 週間飼育することで CKD モデルとした。マウスを術後 4、8、12 週で安楽死を行い、血液及び臓器を回収し各種評価を行った。遺伝子発現変動は定量的 RT-PCR により行った。

(2) CKD マウスの筋作動因子発現変動に対する尿毒症物質の影響評価

CKD マウスに対し、術後 4 週目から活性炭 (AST-120) を 4 g/kg BW となるように混餌投与した。AST-120 投与 8 週後に安楽死後、血液及び臓器を回収し各種評価を行った。遺伝子発現変動は定量的 RT-PCR により行った。

(3) apelin の体内動態評価

CKD マウスに対し、術後 4 週目に apelin を 1 $\mu\text{mol/kg}$ BW の投与量で投与後、任意の時間で安楽死を行い、血液及び臓器を回収し apelin の体内動態を評価した。血中 apelin 濃度は ELISA 法により検討した。

(4) CKD マウスに対する apelin の有効性評価

CKD マウスに対し、術後 8 週目から apelin を 1 $\mu\text{mol/kg}$ BW の投与量で 1 日 1 回腹腔内投与を 4 週間行った。その後安楽死を行い、血液及び臓器を回収し各種評価を行った。遺伝子発現変動は定量的 RT-PCR により行った。

4. 研究成果

(1) CKD マウスのサルコペニア病態における骨格筋中筋作動因子発現変動の評価

これまでに 6 分の 5 腎臓摘出 CKD マウスでは、骨格筋量の減少ならびに運動機能が低下することでサルコペニアが誘導されることが報告されている。しかしながら CKD 後の骨格筋萎縮病態の形成と筋作動因子発現変動に関する時間的な経過は明らかでない。そこでまず CKD 誘発サルコペニア病態の形成と骨格筋における筋作動因子発現変動について検討した。その結果 Sham マウスと比較して、CKD マウスでは術後 4 週から腓腹筋重量の減少が認められ、8 週目では前脛骨筋、さらに 12 週目ではヒラメ筋においても有意な減少が認められた。また 12 週では骨格筋断面積も CKD マウスで減少傾向が認められた。筋萎縮関連遺伝子である atrogen-1 の発現は 12 週に

において有意な上昇が認められた (Figure 1)。次に筋作動因子発現変動について評価した。骨格筋萎縮と関連性の報告されている筋作動因子として知られる myostatin は 8 週から有意に上昇し、12 週目においても発現上昇が持続していた。また CKD 時に発現が減少することが報告されている irisin は 8 週目において一過性の上昇ののち、12 週において減少した。Apelin は加齢によって発現が減少し、加齢性サルコペニアにおいて重要な役割を担う筋作動因子の一つであることが報告されている。そこで apelin の遺伝子発現変動について評価したところ 8 週で一過性の上昇ののち、12 週において減少し、irisin と類似した挙動を示した (Figure 1)。

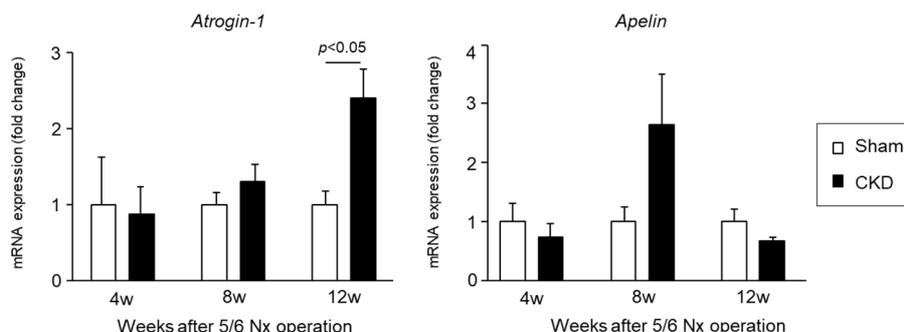


Figure 1 CKDマウスの骨格筋におけるatrogin-1及びapelinの遺伝子発現変動

(2) CKD マウスの筋作動因子発現変動に対する尿毒症物質の影響評価

次に CKD 誘発サルコペニアマウスで観察された筋作動因子の発現変動に対する、尿毒症物質の関与について検討した。CKD マウスに対して AST-120 を投与した結果、CKD で観察された骨格筋重量の減少が抑制された。また骨格筋における myostatin の発現上昇は AST-120 の投与によって抑制されていた。同様に irisin および apelin の発現減少も AST-120 の投与により抑制された (Figure 2)。本検討において AST-120 の投与は血中尿素窒素や血清クレアチニンといった腎機能には影響は認めなかったものの、尿毒症物質であるインドキシル硫酸は有意に減少していた。従って、骨格筋における apelin の発現減少に尿毒症物質が一部関与している可能性が示唆された。

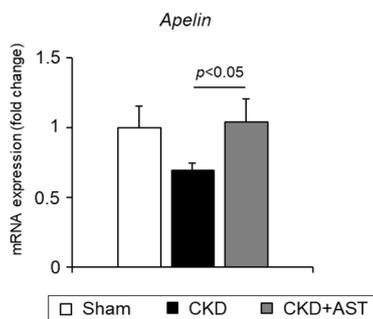


Figure 2 CKD誘発サルコペニアマウスの骨格筋における apelin発現変動に対するAST-120の影響評価

(3) apelin の体内動態評価

CKD マウスでは apelin を腹腔内投与後約 5 分で最大となったのち、速やかに血中より消失し、投与後 30 分では投与前と同等であった。さらに apelin の投与後、骨格筋組織を回収し、各種遺伝子発現変動を評価したところ、筋萎縮関連遺伝子である atrogin-1 の発現が経時的に減少することが確認された。

(4) CKD マウスに対する apelin の有効性評価

これまでの検討から、CKD マウスでは 8 週から 12 週にかけて骨格筋における apelin の発現が低下し、さらに筋萎縮が進行することが示されたことから、apelin による治療介入を 8 週目に設定し、4 週間投与した。その結果、骨格筋重量の減少が改善し、その作用は特にヒラメ筋において顕著に認められた (Figure 3)。また骨格筋断面積の減少も抑制されていた。さらにトレッドミル試験による筋持久力を評価した結果、apelin 投与で回復する傾向が認められた (Figure 3)。

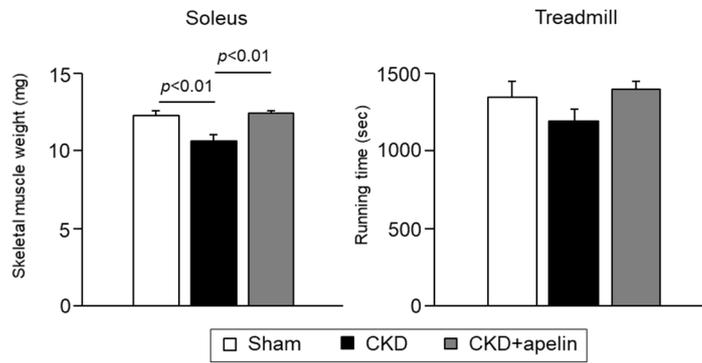


Figure 3 CKD誘発サルコペニアに対するapelinの有効性評価

以上のことから、CKD 誘発サルコペニアにおいて、骨格筋における筋作動因子の一つである apelin は尿毒症物質を介してその発現が減少することが示唆された。さらに CKD 誘発サルコペニアに対して apelin は骨格筋重量の減少と運動機能の減少を抑制したことから新規治療薬となることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Watanabe Hiroshi, Enoki Yuki, Maruyama Toru	4. 巻 42
2. 論文標題 Sarcopenia in Chronic Kidney Disease: Factors, Mechanisms, and Therapeutic Interventions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1437 ~ 1445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b19-00513	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 Taguchi Kazuaki, Ogaki Shigeru, Nagasaki Taisei, Yanagisawa Hiroki, Nishida Kento, Maeda Hitoshi, Enoki Yuki, Matsumoto Kazuaki, Sekijima Hidehisa, Ooi Kazuya, Ishima Yu, Watanabe Hiroshi, Fukagawa Masafumi, Otagiri Masaki, Maruyama Toru	4. 巻 372
2. 論文標題 Carbon Monoxide Rescues the Developmental Lethality of Experimental Rat Models of Rhabdomyolysis-Induced Acute Kidney Injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics	6. 最初と最後の頁 355 ~ 365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/jpet.119.262485	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 -

1. 著者名 Tanaka Shoma, Watanabe Hiroshi, Nakano Takehiro, Imafuku Tadashi, Kato Hiromasa, Tokumaru Kai, Arimura Nanaka, Enoki Yuki, Maeda Hitoshi, Tanaka Motoko, Matsushita Kazutaka, Fukagawa Masafumi, Maruyama Toru	4. 巻 12
2. 論文標題 Indoxyl Sulfate Contributes to Adipose Tissue Inflammation through the Activation of NADPH Oxidase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins12080502	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 榎木裕紀、渡邊博志、荒毛里歩、異島優、松元一明、小田切優樹、丸山徹
2. 発表標題 慢性腎臓病病態の骨格筋萎縮における尿毒素の関与と新規治療戦略に関する検討
3. 学会等名 第2回日本老年薬学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永井智也、榎木裕紀、中村秀明、田口和明、松元一明
2. 発表標題 慢性腎臓病誘発サルコペニアに対するapelinの有用性評価
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hiroshi Watanabe, Hiromasa Kato, Yuki Enoki, Hitoshi Maeda, Toru Maruyama	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 180
3. 書名 Uremic Toxins and Organ Failure	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------