

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16514

研究課題名（和文）慢性腎臓病，老化によるサルコペニアの診断バイオマーカーの探索と分子病態の解明

研究課題名（英文）Biomarkers and therapeutic targets for chronic kidney disease and sarcopenia

研究代表者

萬代 新太郎（Mandai, Shintaro）

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50824330

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）：サルコペニア（骨格筋量・筋力の低下）は加齢や慢性腎臓病（chronic kidney disease, CKD）など多様な慢性疾患によって発症し、著しく健康寿命・生命寿命を損なう。世界的に未踏の超高齢化社会を迎え患者数は増加の一途を辿っており、未だに達成されていない病態解明と実用的な診断・治療法の確立は医療経済的に喫緊の課題である。最近申請者は、CKDによるサルコペニアの新たな分子病態・シグナルを発見した。本研究ではさらに、疾患モデル動物、患者検体を用いて、CKDによるサルコペニアの診断バイオマーカーを見出し、機能解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は2022年度内に複数の論文発表を予定している。これらの成果が、臨床応用の実現性の高い、サルコペニアの新たな治療戦略とバイオマーカー創出に繋がることが期待される。超高齢化社会を迎え、サルコペニア、フレイルの病態解明・克服は世界的に喫緊の課題である。今後のさらなる研究により、CKD患者の透析以外の新たな治療選択肢のみならず、健康寿命を延伸するためのバイオマーカー、治療薬シーズの同定を目指す。

研究成果の概要（英文）：Chronic kidney disease (CKD) is a major public health problem that globally affects 700 million people. Emerging evidence has revealed the relationship between CKD and risks for cardiovascular disease, frailty, and sarcopenia, defined as a loss of muscle mass and strength, which impair healthspan and lifespan. However, molecular mechanism explaining the inter-organ communications between kidneys and skeletal muscle has yet to be determined. This study aimed to determine target molecules and biomarkers of sarcopenia in CKD model rodents and humans. The study findings would provide novel insights into the mechanisms and treatment strategies in CKD and sarcopenia.

研究分野：細胞生物学，腎臓病学，内科学

キーワード：慢性腎臓病 サルコペニア 老化

### 1. 研究開始当初の背景

骨格筋は、運動器と代謝・内分泌器官の役割を兼ねた人体最大の臓器である。人類は未踏の高齢化社会を迎え、サルコペニア（加齢、慢性疾患による骨格筋量・筋力の低下）への注目が高まっている。高齢者のサルコペニア、寝たきりの予防対策は、人的、社会福祉的資源が有限であるという観点からも喫緊の課題である。本邦でも高齢者の3人に1人が罹患し、新たな国民病とも言われる慢性腎臓病（chronic kidney disease, CKD）患者

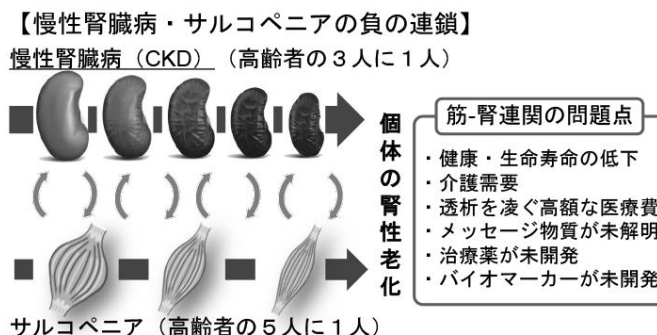


図1. 慢性腎臓病(CKD)・サルコペニアの分子メカニズムの解明

においても、サルコペニアの合併率が非常に高く大きな問題となっている。しかしながら未だ病態解明が不十分であり、現状運動や食事療法他に有効な治療法が確立していない(図1)。

研究代表者は以前、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集を用い20%のヒトが保有する SPAK キナーゼの高血圧感受性一塩基多型(SNP) rs3754777の生理機能を初めて明らかにした(Mandai et al. *Hypertension* 2015)。SPAKは、遺伝性高血圧疾患の偽性低アルドステロン症II型の原因遺伝子WNK(with-no-lysine)キナーゼによってリン酸化を受け、腎尿細管上皮細胞で塩分排出、血圧の生理的制御を介して生体の恒常性維持に深く関わる(図2左)。このSPAKの遺伝子多型が糖尿病、メタボリック症候群の発症にも関わることから、腎臓と代謝臓器の連関に着目して研究を進めたところ、骨格筋の肥大・再生を制御する新たな分子シグナルを発見した(Mandai et al. *Sci Rep* 2017/2018)(図2右)。骨格筋においては、WNK1キナーゼが長寿遺伝子としても知られるForkhead box protein 0(FOXO4)をリン酸化し骨格筋肥大を促進すること(Mandai et al. *Sci Rep* 2018)、SPAKの基質Na-K-2Cl共輸送体1が筋形成を促進すること(Mandai et al. *Sci Rep* 2017)を報告した。この知見は、当大学病院に外来通院していた約300人のCKD患者の解析で、実際にNa-K-2Cl共輸送体の阻害剤であるループ利尿薬がサルコペニアのリスク因子である、という臨床研究結果に繋がった(Ishikawa S. *PLoS ONE* 2018)。

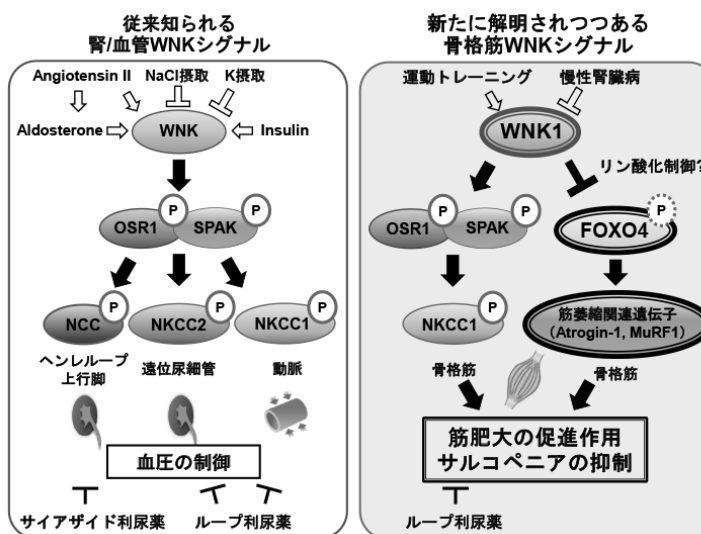


図2. WNK1による腎疾患・サルコペニアのクロストーク

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、CKDにおけるサルコペニアの分子病態、筋腎連関メカニズムの解明である。骨格筋 WNK シグナルに影響を与える生理的、病的刺激とその調節機構を明らかにすることと、WNK シグナルを始めとした骨格筋形成(myogenesis)、再生を制御する分子シグナルに影響を及ぼす血液中のバイオマーカーを同定することである。これらの解明が、サルコペニアの病態解明と新たな治療法の開発に繋がることが期待される。

### 3. 研究の方法

- (1) 疾患モデル動物(複数のCKDモデル動物、サルコペニアモデル動物)の樹立と解析
- (2) WNK1 ノックアウトマウスの解析
- (3) 疾患モデル動物の血液検体を用いたオミクス解析
- (4) *In vitro* 筋形成アッセイと生細胞イメージング
- (5) CKD患者を対象とした前方視的コホート研究の開始と解析

### 4. 研究成果

- (1) WNKシグナルのCKD病態形成への関与  
腎尿細管上皮細胞におけるWNKシグナルは、食事の塩分やカリウム、angiotensin II、インスリンなどの多彩な刺激に応じて塩分排出及び血管トーン調整を行う、生体に重要な血圧制御シグナルである(図2左)。研究代表者は以前、WNK1が骨格筋WNKのmajor isoformであり、FOXO4のリン酸化を調節することで筋萎縮関連遺伝子(atrogene) atrogin-1, MuRF1の転

写, 筋肥大を制御することを発見した。さらに, CKD・サルコペニアモデル動物の樹立し解析すると, 骨格筋 WNK1 のタンパク質発現量が CKD 環境により低下し, atrogene の mRNA 発現量が増加することを明らかにした。この時 WNK1 の mRNA 発現量は変化しておらず, タンパク分解系により制御されるものと考えられた。

坐骨神経切除術によるサルコペニアモデル動物を解析すると, 逆に WNK1 タンパク質発現量は顕著に増加した。これは従来知られる FOXO1, FOXO3 を介在した atrogene 発現誘導に拮抗するための代償機構が働いているものと推測され, 筋量の恒常性維持に骨格筋 WNK1 の重要な役割を果たすことが示唆された。さらに WNK1 ヘテロノックアウトマウスの骨格筋量, 筋線維サイズを解析した結果, 野生型マウスと比較して有意な変化を認めなかった。WNK1 の両アリル欠損マウスは胎生致死であるため解析は出来なかった。今後, WNK1 ヘテロノックアウトマウスにおいて坐骨神経切除術への反応や, 筋傷害モデルにおける骨格筋再生能を評価する事で, より詳細な解析を行う必要がある。

一方で, WNK キナーゼは生体内の塩分制御のみならず, 細胞周期の制御や細胞の分化においても重要な役割を担っている。我々は, マクロファージにおいて WNK1 が LPS 誘導性の免疫応答をどのように修飾するかを検討した。shWNK1 と WNK1 ヘテロノックアウトマウスを用いて, LPS 誘導性のサイトカイン産生に対する WNK1 の役割を検討した。その結果, WNK1 silencing により LPS 誘導性のサイトカイン産生が増加し, 炎症性マクロファージのマーカーである NOS2 の発現が増加することを発見した。WNK1 ヘテロノックアウトマウスにおいては, LPS 腹腔内投与により誘導される血中のサイトカインが増加することを示した。このことから WNK1 はマクロファージにおいて LPS 誘導性サイトカイン産生を抑制することが明らかになった (Arai Y. *Biochem Biophys Res Commun.*2020)。

また本研究期間中, 腎尿細管上皮細胞における WNK1 の役割についても我々は新たな知見を得て報告した (Furuho T. *Kidney Int.* 2020)。複数の CKD モデルマウスを作成した結果, アリストロキア酸腎症モデル, アデニン腎症モデルの腎臓において WNK1-SPAK-NCC シグナルが活性化し, 塩分感受性高血圧の発症に寄与することが分かった。この時, TNF が WNK1 タンパク質の発現量を制御することも明らかにした。腎臓遠位尿細管上皮培養細胞に TNF を投与すると WNK1 タンパク質発現量が増加した。さらに TNF 阻害薬エタネルセプトがアリストロキア酸腎症モデルにおける腎 WNK1-SPAK-NCC シグナルの亢進を抑制し, 塩分感受性を是正することが明らかになった。WNK シグナルの腎臓・塩分感受性と免疫シグナルとのクロストークの理解も進む知見を得た。

## (2) CKD モデル動物, 患者におけるバイオマーカーの探索

生理的的刺激や疾患モデルによる骨格筋 WNK1 タンパク質発現量の制御機構の一つに, microRNA (miRNA) による転写, 翻訳制御が推測された。In silico の解析により, WNK1 の 3' UTR 内で種を超え保存された配列を標的とする miRNA 候補は複数挙げられる。まずはこれらの miRNA が CKD モデル動物骨格筋で発現量が変動するか検証した。しかしながら, 有意に変化する miRNA は同定されなかった。このため血液中の miRNA が影響をおよぼす可能性が示唆された中で, CKD モデル動物の血清検体を用いた網羅的スクリーニングを実施した。

候補として同定された複数の miRNA の中に WNK1 の制御 miRNA は同定されなかったものの, in vitro 筋形成アッセイ (図 3) を実施すると, 筋形成を促進する効果を発揮する miR-A, miR-B, miR-C が明らかとなった。これらの標的分子 (群) について, 引き続き解析を行っている。

実際の CKD 患者コホートでこれらの miRNA を定量評価したところ, 腎機能が低下するにつれ, 相関して miR-A, miR-B, miR-C 発現量が低下することが明らかとなった。これらの miRNA が CKD 環境で低下することで, 骨格筋形成が抑制されるというサルコペニアの発症機序の一端が明らかとなった。

本研究により, CKD とサルコペニアの分子メカニズムについて, 新たな知見が得られた。今後さらに研究を推進することで, CKD とサルコペニアの有効な治療戦略構築とバイオマーカー創出により健康寿命を延伸する新機軸の医療実現を目指す。

### 【CKDモデル動物由来のEVIによる筋形成の抑制】

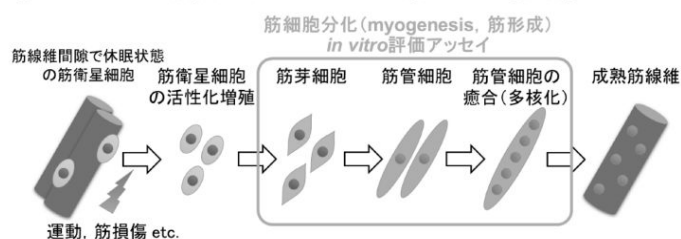


図3. 骨格筋肥大, 再生における筋形成の役割

### 【microRNA模倣体の骨格筋形成への影響】

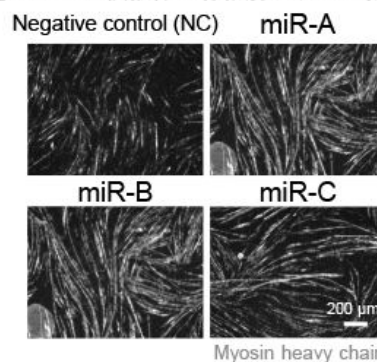


図4. CKD によるサルコペニアの病態形成に関与し筋形成を促進する microRNA の同定

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Furusho Taisuke, Sohara Eisei, Mandai Shintaro, Kikuchi Hiroaki, Takahashi Naohiro, Fujimaru Takuya, Hashimoto Hiroko, Arai Yohei, Ando Fumiaki, Zeniya Moko, Mori Takayasu, Susa Koichiro, Isobe Kiyoshi, Nomura Naohiro, Yamamoto Kohei, Okado Tomokazu, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi	4. 巻 97
2. 論文標題 Renal TNF activates the WNK phosphorylation cascade and contributes to salt-sensitive hypertension in chronic kidney disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 713 ~ 727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2019.11.021	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 Nakano Yuta, Susa Koichiro, Yanagi Tomoki, Hiraoka Yuichi, Suzuki Takefumi, Mori Takayasu, Ando Fumiaki, Mandai Shintaro, Fujiki Tamami, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi, Sohara Eisei	4. 巻 58
2. 論文標題 Generation of NPHP1 knockout human pluripotent stem cells by a practical biallelic gene deletion strategy using CRISPR/Cas9 and ssODN	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal	6. 最初と最後の頁 85 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11626-022-00655-0	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 Mandai Shintaro, Ando Fumiaki, Mori Takayasu, Susa Koichiro, Iimori Soichiro, Naito Shotaro, Sohara Eisei, Uchida Shinichi, Fushimi Kiyohide, Rai Tatemitsu	4. 巻 16
2. 論文標題 Burden of kidney disease on the discrepancy between reasons for hospital admission and death: An observational cohort study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0258846 ~ 0258846
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0258846	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 Fujimaru Takuya et al.	4. 巻 6
2. 論文標題 Genetic Background and Clinicopathologic Features of Adult-onset Nephronophthisis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kidney International Reports	6. 最初と最後の頁 1346 ~ 1354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ekir.2021.02.005	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 Nanamatsu Azuma, Mori Takayasu, Ando Fumiaki, Furusho Taisuke, Mandai Shintaro, Susa Koichiro, Sahara Eisei, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi	4. 巻 77
2. 論文標題 Vasopressin Induces Urinary Uromodulin Secretion By Activating PKA (Protein Kinase A)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hypertension	6. 最初と最後の頁 1953 ~ 1963
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.17127	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 Mandai Shintaro, Yamada Tetsuo, Uchihara Toshiki, Iida Tadatsune, Ito Takashi, Sato Hidehiko, Sato Keiko, Chida Yoshiko, Hirokawa Katsuiku, Noda Yumi	4. 巻 80
2. 論文標題 Severe Dialysis-Related Amyloidosis Spared the Brain: An Autopsy Case of a Patient Receiving Hemodialysis for 41 Years	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neuropathology & Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 997 ~ 999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jnen/nlab022	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 Takahashi Naohiro, Kikuchi Hiroaki, Usui Ayaka, Furusho Taisuke, Fujimaru Takuya, Fujiki Tamami, Yanagi Tomoki, Matsuura Yoshiaki, Asano Kenichi, Yamamoto Kouhei, Ando Fumiaki, Susa Koichiro, Mandai Shintaro, Mori Takayasu, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi, Arita Makoto, Sahara Eisei	4. 巻 25
2. 論文標題 Deletion of Alox15 improves kidney dysfunction and inhibits fibrosis by increased PGD2 in the kidney	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 445 ~ 455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-021-02021-y	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 Hashimoto Hiroko, Shikuma Satomi, Mandai Shintaro, Adachi Susumu, Uchida Shinichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Calcium-based phosphate binder use is associated with lower risk of osteoporosis in hemodialysis patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-81287-4	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 Mori Takayasu, Chiga Motoko, Fujimaru Takuya, Kawamoto Ryosuke, Mandai Shintaro, Nanamatsu Azuma, Nomura Naohiro, Ando Fumiaki, Susa Koichiro, Sohara Eisei, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi	4. 巻 42
2. 論文標題 Phenotypic differences of mutation negative cases in Gitelman syndrome clinically diagnosed in adulthood	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Mutation	6. 最初と最後の頁 300 ~ 309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/humu.24159	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 Arai Yohei, Asano Kenichi, Mandai Shintaro, Ando Fumiaki, Susa Koichiro, Mori Takayasu, Nomura Naohiro, Rai Tatemitsu, Tanaka Masato, Uchida Shinichi, Sohara Eisei	4. 巻 533
2. 論文標題 WNK1-TAK1 signaling suppresses lipopolysaccharide-induced cytokine production and classical activation in macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1290 ~ 1297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.10.007	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 Sekine Akinari, Hoshino Junichi, Fujimaru Takuya, Suwabe Tatsuya, Mizuno Hiroki, Kawada Masahiro, Hiramatsu Rikako, Hasegawa Eiko, Yamanouchi Masayuki, Hayami Noriko, Mandai Shintaro, Chiga Motoko, Kikuchi Hiroaki, Ando Fumiaki, Mori Takayasu, Sohara Eisei, Uchida Shinichi, Sawa Naoki, Takaichi Kenmei, Ubara Yoshifumi	4. 巻 51
2. 論文標題 Genetics May Predict Effectiveness of Tolvaptan in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Nephrology	6. 最初と最後の頁 745 ~ 751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000509817	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 Noda Shohei, Mandai Shintaro, Oda Takashi, Shinoto Tomoko, Sato Hidehiko, Sato Keiko, Hirokawa Katsuiku, Noda Yumi, Uchida Shinichi	4. 巻 99
2. 論文標題 Asymptomatic sinusitis as an origin of infection-related glomerulonephritis manifesting steroid-resistant nephrotic syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e20572 ~ e20572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000020572	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 Mandai Shintaro, Sato Hidehiko, Imori Soichiro, Naito Shotaro, Tanaka Haruna, Ando Fumiaki, Susa Koichiro, Isobe Kiyoshi, Mori Takayasu, Nomura Naohiro, Sohara Eisei, Okado Tomokazu, Uchida Shinichi, Fushimi Kiyohide, Rai Tatemitsu	4. 巻 130
2. 論文標題 Nationwide in-hospital mortality following major fractures among hemodialysis patients and the general population: An observational cohort study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115122 ~ 115122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2019.115122	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 -

〔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 (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
---------	---------