

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23617015

研究課題名(和文)慢性腎臓病における栄養障害としての骨格筋萎縮機序の解明と治療戦略

研究課題名(英文)The mechanisms of muscle wasting and its treatment in chronic kidney diseases

研究代表者

熊谷 裕通(Kumagai, Hiromichi)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：40183313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病が進展すると、たんぱく質エネルギー栄養障害により、骨格筋萎縮が生じる。その骨格筋萎縮の機序を明らかにし、治療法を確立するための検討を行なった。腎不全モデルラットを用いた研究では、腎不全は筋蛋白合成を抑制して筋萎縮を起こすことが明らかになったが、腎不全の治療に用いられる低たんぱく食療法の影響は軽微であった。透析患者における研究では、テストステロンや筋蛋白分解に関わるプロテアソームの血中濃度が筋肉代謝の指標となることが明らかとなった。以上より、慢性腎臓病患者では、これら適切なバイオマーカーを指標として、尿毒症状態を改善することが、骨格筋萎縮の予防・治療になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The skeletal muscle atrophy is a serious complication of chronic kidney diseases (CKD). This study has been conducted to elucidate the mechanism of muscle atrophy and to establish the treatment of this complication in CKD. In rats with renal failure, the muscle atrophy was induced by the suppression of muscle protein synthesis while the influence of protein restriction for treating renal failure was small. Serum testosterone and proteasome concentrations were useful indicators for muscle mass in dialysis patients. In conclusion, the improvement of uremic condition is one of the strategies to prevent muscle atrophy, and these biomarkers of muscle metabolism were useful for expecting muscle atrophy in CKD.

研究分野：臨床栄養学

科研費の分科・細目：統合栄養科学

キーワード：栄養障害 骨格筋 筋萎縮 筋蛋白 テストステロン プロテアソーム

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病患者には骨格筋萎縮を含む栄養障害が高頻度に見られる。特にステージ5D(透析患者)では、全体の約4割の患者にたんぱく質エネルギー栄養障害(PEM)が見られる。透析患者のPEMは、予後に悪影響を及ぼすことが知られており、その対策は急務である。透析患者のPEMの原因には、食事制限なども関与するが、最大の原因は尿毒素の蓄積やアシドーシス、さらにはこれらや透析療法に関連する炎症反応であることが示されてきた。しかし、尿毒素・炎症・アシドーシスなどが、どのような機序で骨格筋萎縮を誘導するのかは未だ十分に明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、慢性腎臓病の患者において、骨格筋萎縮が如何なる機序で生じるのかを解明しようとするものである。すでに筋細胞に対するミオスタチンやプロテアソームなどの作用機序は明らかにされつつあるが、それらの相互作用や、尿毒症、炎症、アシドーシスなどとの関連は明らかにされていない。また、慢性腎臓病におけるこれらの筋代謝関連物質の動態は、血中濃度の変化こそ調べられているものの、栄養状態や筋萎縮との関連といった視点で行われた研究はない。そこで、本研究では培養筋肉細胞や慢性腎不全モデル動物(5/6腎摘ラット)を用いて、これらの筋代謝関連物質の腎不全状態における動態を検討するとともに、骨格筋内の蛋白合成や骨格筋組織像との関係を明らかにする。さらに、透析患者を中心とする慢性腎臓病患者において、これまでに蓄積した透析患者の大腿部および腹部CT画像の筋肉量とこれらの筋代謝関連物質の血中濃度を比較検討して、骨格筋萎縮におけるこれらの筋代謝関連物質の意義を明らかにする。そして、その結果を利用して慢性腎臓病患者の骨格筋萎縮を含む栄養障害に対する総合的な治療戦略を立案する。

3. 研究の方法

(1) 培養筋細胞における生理活性物質の動態とその作用に関する基礎的研究

ラット骨格筋由来の培養細胞であるL6細胞をmyotubeに分化させ、さまざまな条件で24時間培養し、Angiopoietin like protein 4 (ANGPTL4)の発現量をReal Time RT-PCRで測定した。(実験1)炎症物質であるLPS(10 μg/ml)またはTNF-α(10 ng/ml)を添加した。(実験2)アシドーシスにするため、培地のpHを7.4、7.2、7.0に調整し添加した。(実験3)低酸素の影響を見るため、化学的無酸素培地を添加した。(実験4)グルコースまたはアミノ酸を欠乏させた培地を添加した。(実験5)対照として、細胞の生存に好都合な条件になるようにグルコースとインスリンを添加した。さらに、PPAR(α、β、γ)と

それらの上流に位置するとされるMAPK(Mitogen-activated protein kinase)のp38およびp38のキナーゼであるMKK3/6(Mitogen-activated protein kinase 3/6)をReal Time RT-PCRで測定した。

(2) 慢性腎不全モデルラットにおける筋萎縮の機序の検討

5/6腎摘手術を行った慢性腎不全モデルラット(5/6Nx群)および開腹術のみ行ったコントロールラット(Control群)を、エネルギー比率23%の普通たんぱく食(NPD)と5%の低たんぱく食(LPD)の2群に分け、8週間ペアフィーディングを行った。実験終了時に、体重、筋肉重量、筋線維断面積、ヒラメ筋における筋肉異化因子MuRF-1、Atrogin-1のmRNA発現量をリアルタイムPCRで測定した。

(3) 血液透析患者における筋萎縮の検討

血液透析患者約300名を対象として、X線CT像から求めた大腿部および腹部筋肉量、および筋肉量の指標であるクレアチニン動態モデルから求めたクレアチニン産生量と、血漿テストステロン、プロテアソームなどとの関連を調べた。

4. 研究成果

(1) 培養骨格筋細胞における腎不全関連栄養障害誘導因子のANGPTL4発現調節機序

(実験1) Lipopolysaccharides (LPS)またはTNF-αを添加した細胞は、コントロールよりANGPTL4の発現が有意に増加した(LPS: コントロール100±40%, LPS 1564±254%, P<0.05) (TNF-α: コントロール100±17%, TNF-α 489±93%, P<0.01)。(実験2)アシドーシスによりANGPTL4の発現が有意に増加した(pH7.4: 100±14%, pH7.2: 142±16%, pH7.0: 285±22%, p<0.01)。(実験3)化学的無酸素培地を添加した細胞では、コントロールよりANGPTL4の発現が著しく増加した。(コントロール: 100±16%, 化学的無酸素培地: 32404±2413% p<0.01) (実験4)グルコースまたはアミノ酸を欠乏させた細胞では、コントロールよりANGPTL4の発現が有意に増加した。(コントロール: 100±27%, グルコース(-): 16588±1750%, アミノ酸(-): 18489±1332%, p<0.01) (実験5)糖・インスリンを負荷した細胞では、ANGPTL4の発現に影響は見られなかった。以上の結果から、培養骨格筋細胞においてANGPTL4の発現は、炎症やアシドーシス、化学的低酸素、糖・アミノ酸欠乏の条件下で増加した。一方、糖・インスリン負荷では、影響がなかった。このことから骨格筋は、栄養障害を引き起こす条件下でANGPTL4の発現を増加させ、自らにエネルギー供給を行うような機序が存在すると考えられた。

核内因子については、グルコースとアミノ酸の両方を欠乏させた培地で培養した細胞ではすべてのPPARの発現が増加したが、特

に PPAR の発現量が有意な増加を示した。グルコース、アミノ酸のいずれかを欠乏させた培地で培養した細胞でも PPAR の発現量の有意な増加が見られた。TNF および LPS 添加による細胞内各遺伝子の発現量はいずれも統計的に有意な変化はなかった。アシドーシスでは pH の低い培地ほど PPAR、p38 が高い発現をしていたが、統計的に有意な増加ではなかった。以上の結果から、筋肉細胞において、グルコースとアミノ酸の欠乏により PPAR を介して ANGPTL4 が発現する機序の存在が明らかとなった。炎症、アシドーシス、低酸素状態により ANGPTL4 が発現する機序は今回の検討では明らかとならなかった。骨格筋は、飢餓による栄養障害を引き起こす条件下でその状態を回避し、エネルギーの供給・保持を行うための経路を活性化させており、PPAR を介して ANGPTL4 の発現を増加させる機序もその一部と考えられた。

(2) 慢性腎不全モデルラットにおける筋萎縮の機序の検討

5/6Nx-NPD 群はたんぱく質の負荷によって腎不全が進行し、尿毒症、アシドーシス状態となっていた。5/6Nx-LPD 群ではたんぱく質の制限により腎不全の程度は軽減されていた。5/6Nx 群の体重、腓腹筋、ひらめ筋、精巣上体脂肪、肝臓、肝臓 TG 含量は、C 群に比べて有意に低値を示し、腎不全による筋肉量の減少(図 1)および脂肪量の減少が確認された。

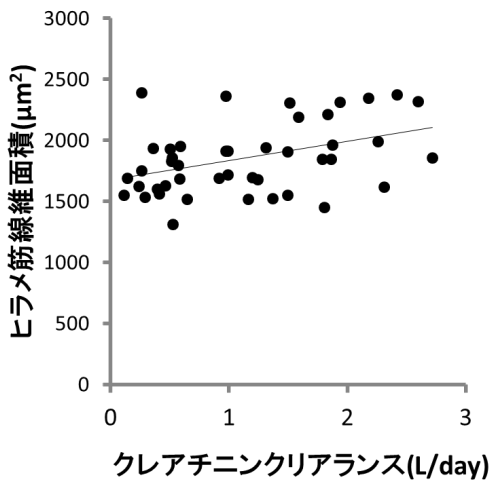


図 1 腎機能と筋線維面積との相関

特に、精巣上体脂肪、肝臓、肝臓 TG 含量の減少が著明であり、5/6Nx 群で観察された体重減少には筋肉量の減少より体脂肪の減少が大きく影響していると考えられた。5/6Nx-NPD 群と 5/6Nx-LPD 群との間で、体組成に有意な差はみられず、低たんぱく食は筋萎縮の原因ではないと考えられた。筋肉内 IGF-1 mRNA 発現は 5/6Nx 群で低値を示し、腎機能の低下に伴い筋蛋白の合成低下が生ずることが示唆されたが、MuRF-1 および

atrogin-1 の mRNA 発現は、すべての群において有意差がなく、腎不全による筋蛋白分解の亢進は確認されなかった。

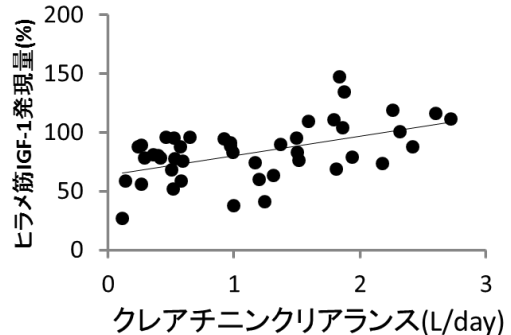


図 2 腎機能と筋 IGF-1 発現との相関

以上の結果から、腎不全は筋蛋白合成を抑制して筋萎縮を起こすことが明らかになったが、腎不全の治療に用いられる低たんぱく食療法の影響は軽微であると考えられた。

(3) 血液透析患者における筋萎縮関連因子の検討

血漿テストステロン値と筋肉量との関連

男性透析患者の血漿テストステロン値は、日本人男性の平均値と差はなかった。男性透析患者の血漿テストステロン値は、大腿部筋肉量、腹部筋肉量(図 3)、血清クレアチニン値、クレアチニン産生量と有意な正の相関が見られた。一方、年齢、CRP、IL-6 とは有意な負の相関が見られた。重回帰分析では、年齢と血漿テストステロン値が筋肉量の予測因子であった。しかし、血漿テストステロン値は、5年間の生存率に影響を与えていなかった。

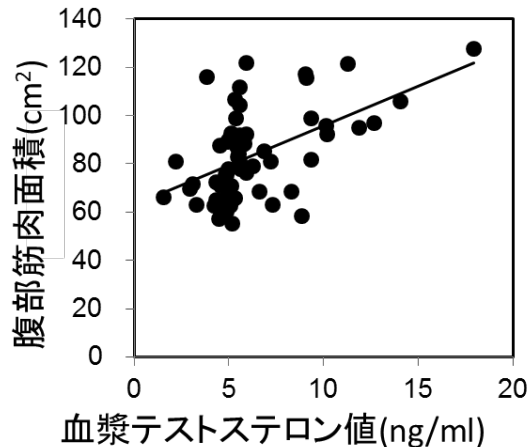


図 3 血漿テストステロン値と腹部筋肉面積との相関

血漿プロテアソーム値と筋肉量との関連

血漿プロテアソーム濃度は、腹部筋肉面積 ($r=-0.26$, $p<0.05$; 図 4) とクレアチニン産生速度(CGR) ($r=-0.23$, $p<0.05$) との間に有意

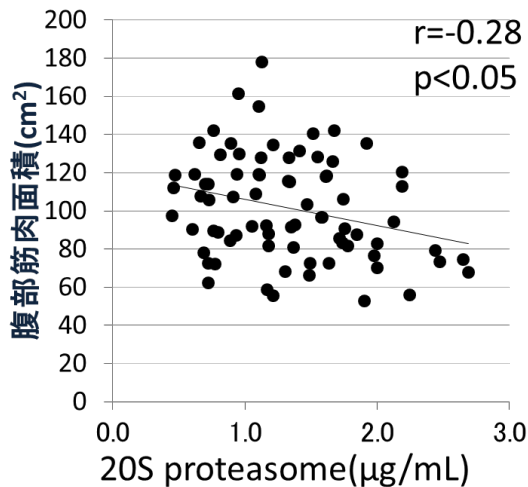


図4 血漿プロテアソーム値と腹部筋肉面積との相関

な負の相関が認められた。また、大腿筋面積 ($r = -0.20$, $p = 0.07$) 及び透析前血中クレアチニン濃度 ($r = -0.20$, $p = 0.09$) は負の相関傾向にあることが示された。以上の結果から、維持血液透析患者における腹部筋肉面積及び大腿部面積、また筋肉量関連指標である透析前血中クレアチニン濃度およびクレアチニン産生速度は、血中プロテアソーム濃度が高いほど減少することが示された。この結果より維持血液透析患者において血中プロテアソーム濃度は筋肉代謝障害の指標になる可能性が示唆された。

血液透析患者における血中ミオスタチンの測定

血液透析患者では、血中ミオスタチン濃度が上昇していることは確認できたが、多量の検体を測定するためのELISAの開発には成功せず、今後の課題として残された。

以上の結果を以下のように総括した。腎不全モデルラットを用いた研究では、腎不全は筋蛋白合成を抑制して筋萎縮を起こすことが明らかになったが、腎不全の治療に用いられる低たんぱく食療法の影響は軽微であった。透析患者における研究では、テストステロンや筋蛋白分解に関わるプロテアソームの血中濃度が筋肉代謝の指標となることが明らかとなった。以上より、慢性腎臓病患者では、これら適切なバイオマーカーを指標として、尿毒症状態を改善することが、骨格筋萎縮の予防・治療になると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計8件)

(1)Kojo G1, Yoshida T, Ohkawa S, Odamaki M, Kato A, Takita T, Maruyama Y, Kumagai H. Association of serum total testosterone

concentration with skeletal muscle mass in men under hemodialysis. *Int Urol Nephrol*. 2013 Aug 25. 査読有[Epub ahead of print] <http://www.springer.com/medicine/nephrology/journal/11255>

(2)Shioya M, Yoshida T, Kasai K, Furuya R, Kato A, Mori N, Matsumoto Y, Kumagai H. Inflammatory factors for hypoalbuminemia in Japanese peritoneal dialysis patients. *Nephrology (Carlton)*. 18, 539-44 (2013) 査読有 doi: 10.1111/nep.12106.

(3)Ohkawa S, Yanagida M, Uchikawa T, Yoshida T, Ikegaya N, Kumagai H. Attenuation of the activated mammalian target of rapamycin pathway might be associated with renal function reserve by a low-protein diet in the rat remnant kidney model. *Nutr Res*. 33:761-71 (2013) 査読有 doi: 10.1016/j.nutres.2013.06.003.

(4)Kato A, Tsuji T, Sakao Y, Ohashi N, Yasuda H, Fujimoto T, Takita T, Furuhashi M, Kumagai H. A comparison of systemic inflammation-based prognostic scores in patients on regular hemodialysis. *Nephron Extra*. 3, 91-100 (2013) 査読有 doi: 10.1159/000355148.

(5)熊谷裕通:「透析患者の栄養障害とNSTの可能性 透析患者の栄養障害とは?」臨床透析, 29巻8号, 1169-1174 (2013)

(6)小田巻真理, 吉田卓矢, 遠藤佑希乃, 熊谷裕通, 田北貴子, 古橋三義, 丸山行孝, 加藤明彦「透析と栄養 病態、評価から患者指導まで-血液透析患者におけるサルコペニアの成因と予後について-」日本透析医学会雑誌, 46巻1号, 91-92 (2013)

(7)塩谷益世, 吉田卓矢, 熊谷裕通, 腹膜透析患者における低蛋白血症への炎症の関与. *腹膜透析* 2012, 95-96 (2012) 査読有

(8)熊谷裕通: 慢性腎臓病における骨格筋減少のメカニズム *臨床透析* 27, 1299-1304 (2011)

〔学会発表〕(計12件)

(1)Gloria Kojo, 吉田卓矢, 加藤明彦, 田北貴子, 丸山行隆, 小田巻真理, 熊谷裕通 「Association between serum testosterone and skeletal muscle wasting in hemodialysis men.」第16回日本病態栄養学会年次学術集会(京都)2013年1月

(2)野毛さち子, 杉本敏子, 松浦留巳, 大石達夫, 吉田卓矢, 熊谷裕通 「高齢者の筋肉量と体力および運動習慣との関連」第16回日本病態栄養学会年次学術集会(京都)2013年1月

(3)長谷川亜季, 服部加世子, 吉田卓矢, 熊谷裕通 「慢性腎不全モデルラットにおいて低たんぱく食が筋肉代謝に及ぼす影響」腎臓病と栄養・代謝・食事フォーラム2013(東京)2013年3月

(4)熊谷裕通 「栄養のスクリーニング法」第6

回血液浄化 Step Up セミナー（名古屋）2013年10月

(5)Gloria Kojo、吉田卓矢、池谷直樹、小田巻真理、加藤明彦、田北貴子、熊谷裕通：Association between serum testosterone and skeletal muscle atrophy in male hemodialysis patients.」第55回日本腎臓学会学術総会（横浜）2012年6月

(6)小田巻真理、高林弥生、藪悠加、加藤明彦、田北貴子、古橋三義、丸山行隆、吉田卓矢、遠藤佑希乃、熊谷裕通、田北貴子、加藤明彦：「血液透析患者のサルコペニアにおける Follistatin の関与」第39回静岡県腎不全研究会（静岡）2012年3月

(7)遠藤佑希乃、吉田卓矢、小林晶子、熊谷裕通「培養骨格筋細胞における angiopoietin like protein 4 の発現調節」第15回日本病態栄養学会年次学術集会（京都）2012年1月

(8)Gloria Kojo, Kumagai H. Low serum testosterone is association with skeletal muscle atrophy in male hemodialysis patients. 10th China-Japan international symposium on health sciences, Hangzhou, China (June, 2012)

(9)小田巻真理、熊谷裕通、田北貴子、加藤明彦：シンポジウム 透析と栄養 病態、評価から患者指導まで 「血液透析患者におけるサルコペニアの成因と予後について」第57回日本透析医学会学術集会（札幌）2012年6月

(10)Gloria Kojo, Kumagai H.: The association between serum myostatin and muscle atrophy in patients with chronic kidney diseases. 4th ICHALS, Shizuoka, 2011.10

(11)熊谷裕通：透析患者における栄養障害の原因・評価・治療 第11回中部透析勉強会（静岡）2011年4月

(12)熊谷裕通：透析患者における栄養障害の評価法と対策について 第10回尾張北透視セミナー（小牧）2011年6月

6. 研究組織

(1)研究代表者

熊谷 裕通 (KUMAGAI HIROMICHI)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：40183313