

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860644

研究課題名(和文)腎筋連関のエピゲノム解析とホルモンを用いた最適治療によるCKD患者の身体能力改善

研究課題名(英文)Epigenetic analysis for reno-muscular correlation and optimal hormonal treatment for physical decline in patients with chronic kidney disease

研究代表者

田蒔 昌憲 (TAMAKI, MASANORI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90528902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病(CKD)では早期から骨格筋変調を伴い身体能力が低下する(腎筋連関)。軽度CKDモデルである5/6腎摘マウスでは、骨格筋ミトコンドリア減少(マイトペニア)を伴う持久力低下が骨格筋量と筋力の低下に先行した。マイトペニアの一因としてCKD早期から上昇するTNF- α の関与が示唆された。消化管ホルモンであるアシルグレリン投与にて、5/6腎摘マウスの骨格筋量と筋力は増加し、さらにエピゲノム制御を介したPGC-1 α 遺伝子発現増加に伴いマイトペニアと持久力を改善した。一方、代表的な筋肉増強因子であるIGF-1では骨格筋量と筋力を増加したが、マイトペニアは改善せず、持久力改善は不十分であった。

研究成果の概要(英文)：A physical decline not only led to lowering quality of life, but also raised risk of all-cause mortality. Chronic kidney disease (CKD) impaired physical performance associated with muscle alteration (reno-muscular correlation) since the early stage. 5/6 nephrectomized mice (5/6Nx mice), a mild CKD model, was shown that decrease in exercise endurance associated with decrease in muscular mitochondria (mitopenia) preceded decrease in muscle strength associated with muscle atrophy. TNF- α , a representative inflammatory cytokine which was increased since the early stage of CKD, was supposed as a candidate of mitopenia. Acylated ghrelin treatment, a gastric hormone, not only increased muscle strength and muscle mass, but improved exercise endurance and mitopenia through epigenetic modification of PGC-1 α gene in 5/6Nx mice. Meanwhile, IGF-1 treatment, a muscle anabolic factor, hardly improved exercise endurance and did not improve mitopenia, though increased muscle strength and muscle mass.

研究分野：腎臓学・内分泌学

キーワード：慢性腎臓病 グレリン PGC-1 ミトコンドリア エピゲノム マイトペニア TNF-

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性腎臓病 (CKD) では単に腎機能が低下するのみならず多臓器に悪影響が現れる。すなわち CKD は臓器連関を呈する疾患である。たとえば、CKD に伴う心機能の低下は “心腎連関” としてよく知られている。申請者はこれまで CKD における骨格筋の退行性変化をもたらす “腎筋連関” に着目し、その機構を明らかにした。[Tamaki Met al. Kidney Int. 2014] CKD ではその初期から身体能力が低下し、CKD 患者における身体能力の低下は腎機能悪化リスクであるのみならず心血管病発症率ならびに死亡率に対して大きな影響を与える。それゆえ、CKD 患者のライフロングケアーにおいて、身体能力の維持は極めて重要である。

(2) これまで CKD 患者における身体能力低下の主たる原因は骨格筋分解の亢進に伴う骨格筋量低下であると考えられていた。申請者は軽症 CKD を模倣する動物モデルである 5/6 腎摘マウスを用いた検討で、CKD に伴う身体能力低下に骨格筋ミトコンドリア機能不全および骨格筋ミトコンドリア量の減少 (マイトペニア) が大きく関与し、筋力低下よりも持久力低下が先行することを見出した。さらに、CKD で増加する TNF- などの炎症性サイトカインが骨格筋に作用し、ミトコンドリア生合成因子である PGC-1 の発現を制御して、マイトペニアが惹起されることを明らかにした [Tamaki Met al. Kidney Int. 2014]。

(3) 従来の身体能力改善を目的とした治療は筋肉量および筋力の改善について着目されてきた。実際、成長ホルモンや、代表的な骨格筋増加因子である IGF-1 を用いた治療は様々な骨格筋萎縮モデルにおける骨格筋量の増加に有用であった。しかし、これらの治療法による持久力の改善は容易でない。

(4) DNA メチル化、ヒストン脱アセチル化などのクロマチンエピゲノム修飾は環境に応じて徐々に蓄積し、かつ長期間安定して記憶される遺伝子発現調節機構である。細胞分化や加齢に伴う発現変化の分子的本態であるのみならず、悪性腫瘍、生活習慣病などの疾患にも強く関与する。CKD においても、代表的な DNA メチル化修飾であり遺伝子発現制御に重要な役割を果たす、CpG ジヌクレオチドのシトシンメチル化の変化は、腎機能増悪と死亡率増加に関連することが示唆されている [Dwivedi et al. Kidney Int 2011]。また、高血糖や塩分負荷などの CKD に関連した臓器ストレスが遺伝子のエピゲノム変化を介して糖尿病合併症や高血圧症を発症させる一方で、エピゲノム変化の抑制によってその発症が抑えられることも報告されている。さらに、CKD の骨格筋退行性変化において重要な意義を有する PGC-1 遺伝子の発現もエピジェネティックに制御され、CKD で増加す

る炎症性サイトカインが PGC-1 遺伝子の特定部位をメチル化し、その発現を低下させる機構が報告されている [Barres Cell Metab 2009]。

2. 研究の目的

(1) 申請者らのこれまでの検討により、CKD モデルマウスの身体能力改善には抗マイトペニア治療が重要であることが示唆された [Tamaki KI 2014]。そこで、申請者は抗マイトペニア治療を実践するため、筋肉量増加作用に加えて近年骨格筋における酸素利用亢進作用が報告された、消化管由来ペプチドホルモンであるグレリンに着目した [Barazzoni et al. KI 2010]。グレリンは主に胃で産生される 28 個のアミノ酸で構成され、3 番目のアミノ酸であるセリンがオクタン酸によるアシル化をうけてアシルグレリンとなる。本研究において、アシルグレリン投与による CKD モデルマウスの身体能力改善を試みた。

(2) CKD モデルマウス骨格筋におけるマイトペニアは TNF- などの炎症性サイトカインが惹起する PGC-1 発現低下に起因することが示唆された [Tamaki KI 2014]。しかし、その詳細なメカニズムは明らかでなかった。そこで、申請者はエピゲノムの観点から腎筋連関を解析し、CKD における骨格筋退行性変化に特徴的であるマイトペニアの原因となるエピゲノム修飾を同定し、ホルモンを用いたエピジェネティック制御で CKD おける身体能力低下に関連したエピゲノム変化を是正する本研究を着想した。

3. 研究の方法

(1) 雄マウス (C57Bl/6) に 5/6 腎摘を 6,7 週齢にて 2 期的に施行し、軽度 CKD モデルである 5/6 腎摘マウスを作成した。8 週齢から 1 か月間アシルグレリンを 0.1 nmol/gBW ずつ週 3 回腹腔内投与した。また、骨格筋量増加による身体能力改善と比較するため、グレリンとは別に IGF-1 を 8 週齢から 1 か月間 0.1 nmol/gBW ずつ週 3 回腹腔内投与し、その効果を比較した。

(2) マウス身体能力は 12-16 週齢にて評価した。具体的にはマウス用握力計を用いて筋力 (握力) を、マウス用トレッドミルを用いて持久力 (走行距離) をそれぞれ測定した。16 週齢にて採血および採尿を行い、クレアチニンクリアランス、血清 TNF- 濃度を計測した。その後、16 週齢にて屠殺し、骨格筋量として腓腹筋重量を計測した。定量 PCR 法にてマウス腓腹筋における PGC-1 遺伝子発現量を評価した。さらに定量 PCR 法にてミトコンドリア 16SrRNA 発現量を細胞核ヘキサキナーゼ 2 発現量にて補正し、ミトコンドリア量を評価した。ミトコンドリア活性として、吸光度計を用いてシトクロームオキシダーゼ C 活性を

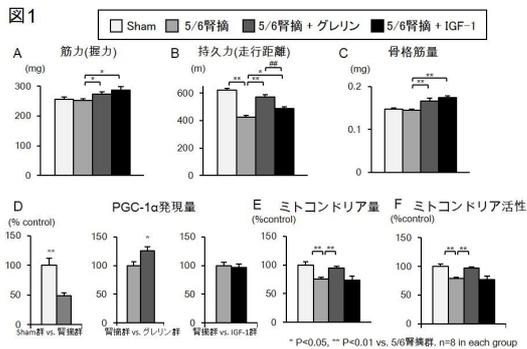
測定した。

(3) 1%FBS にて分化誘導した培養骨格筋細胞 C2C12 を用い、アシルグレリン 10~1000 nM または IGF-1 10~1000nM を 24 時間添加した。その後、PGC-1 発現量、ミトコンドリア量とミトコンドリア活性を in vivo と同様の方法で評価した。さらに PGC-1 遺伝子を標的とした siRNA をトランスフェクションし、ミトコンドリア量、ミトコンドリア活性、酸素消費量への影響を評価した。

(4) PGC-1 遺伝子転写開始点から 260 塩基上流に位置する、プロモーター領域内のシトシン(C-260)は、そのメチル化により PGC-1 遺伝子発現量を負に制御する代表的な部位である [Barres et al. Cell Metab. 2009]。5/6 腎摘マウス腓腹筋における C-260 メチル化率を、Methylation Specific PCR 法(MSP 法)および Bisulfite Genomic Sequence 法(BGS 法)にて評価した。さらに、腎不全で早期から上昇する代表的な炎症性サイトカインである TNF- α による DNA メチル化制御とグレリンの意義を明らかにするため、培養骨格筋細胞 C2C12 に TNF- α 1ng/ml、アシルグレリン 100 nM、デスアシルグレリン(非アシル化グレリン) 100 nM を添加し、24 時間後の C-260 メチル化率を MSP 法にて評価した。

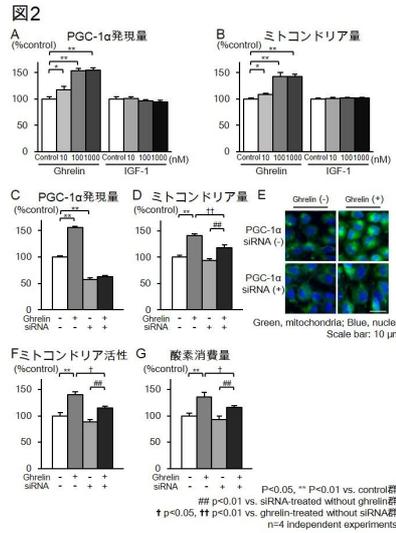
4. 研究成果

(1) マウスの身体能力と骨格筋を評価した。5/6 腎摘マウスの筋力は sham マウスと有意差を認めず、アシルグレリンおよび IGF-1 投与にて増加した(図 1A)。一方、持久力は 5/6 腎摘マウスにて低下し、アシルグレリン投与にて改善したが IGF-1 投与での改善は不十分であった(図 1B)。5/6 腎摘マウス骨格筋量は sham マウスと有意差を認めず、アシルグレリンおよび IGF-1 投与にて増加した(図 1C)。PGC-1 遺伝子発現量、ミトコンドリア量、ミトコンドリア活性は 5/6 腎摘マウスにて低下し、アシルグレリン投与にて改善したが IGF-1 投与では改善しなかった(図 1D-F)。

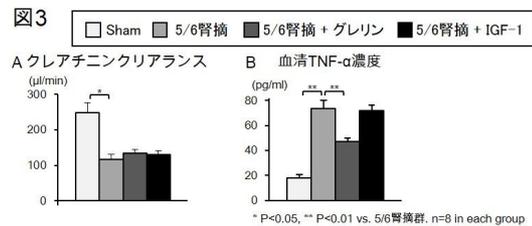


(2) 培養骨格筋細胞 C2C12 を用いてアシルグレリンおよび IGF-1 によるミトコンドリアへの影響を評価した。PGC-1 遺伝子発現量およびミトコンドリア量はアシルグレリン投与にて濃度依存的に増加したが、IGF-1 投与

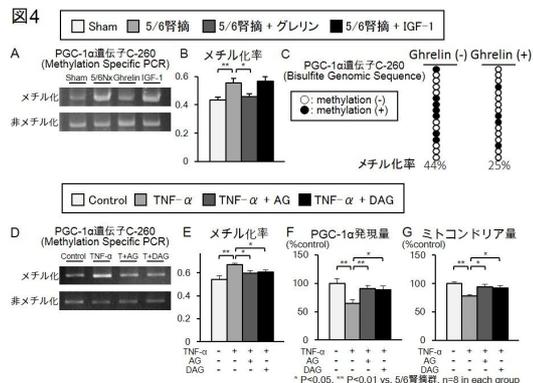
では変化しなかった(図 2A, B)。PGC-1 遺伝子を標的とした siRNA のトランスフェクションにて、アシルグレリン 100 nM 投与によるミトコンドリア量、ミトコンドリア活性、酸素消費量の亢進作用はいずれも減弱した(図 2C-G)。



(3) 5/6 腎摘マウスのクレアチニンクリアランスは sham マウスの 50%程度に低下し、アシルグレリンおよび IGF-1 投与にて変化しなかった。一方、血清 TNF- α 濃度は 5/6 腎摘マウスにて上昇し、グレリン投与にて低下したが IGF-1 投与では変化しなかった(図 3A, B)。

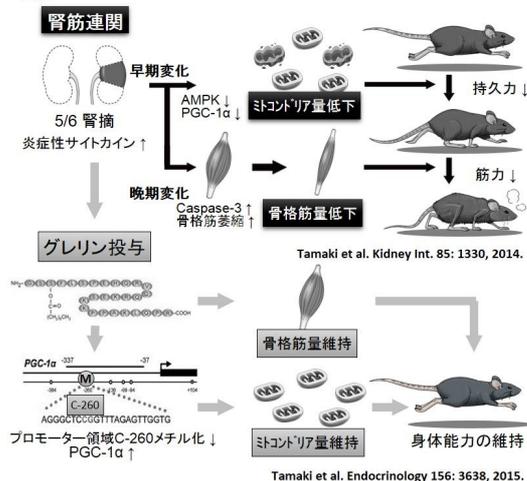


(4) マウス骨格筋における C-260 メチル化率を評価した。MSP 法では、5/6 腎摘にてメチル化率は上昇し、グレリン投与にて低下したが IGF-1 投与では変化しなかった(図 4A, B)。BGS 法では、5/6 腎摘マウス骨格筋のメチル化クローンの数がアシルグレリン投与にて減少した(図 4C)。引き続き、培養骨格筋細胞における C-260 メチル化率を評価した。C-260 メチル化率は TNF- α にて上昇し、アシルグレリンおよびデスアシルグレリンにてそれぞれ低下した(図 4D, E)。PGC-1 遺伝子発現量およびミトコンドリア量もメチル化と矛盾しない変化を示した(図 4F, G)。



(5) 以上、アシルグレリン投与は5/6腎摘マウス骨格筋量と筋力の増加にとどまらず、マイトペニアと持久力も改善した。マイトペニア改善の機序として、グレリン投与によるPGC-1 遺伝子プロモーター領域脱メチル化が関与することが示唆された。一方、IGF-1投与は骨格筋量および筋力の増加には有用であったが、マイトペニアは改善せず、持久力の改善は不十分であった(図5)。本研究を通じて、マイトペニアと持久力低下が特徴であるCKDにおける身体能力低下において、アシルグレリン投与による抗マイトペニア治療が有効であることが示唆された。今後、臨床応用が期待できる[Tamaki Endocrinol 2015]。

図5



<引用文献>

Masanori Tamaki, Kazutoshi Miyashita, Shu Wakino, Masanori Mitsuishi, Koichi Hayashi, Hiroshi Itoh, Chronic kidney disease reduces muscle mitochondria and exercise endurance and its exacerbation by dietary protein through inactivation of pyruvate dehydrogenase, *Kidney International*, Vol. 85, 2013, 1330-1339

Rama S. Dwivedi, James G. Herman, Timothy A. McCaffrey, Dominic S.C. Raj, Beyond genetics: epigenetic code in chronic kidney disease, *Kidney International*, Vol. 79, 2011, 23-32

Romain Barres, Megan E. Osler, Jie Yan, Anna Rune, Tomas Fritz, Kenneth Caidahl, Anna Krook, Julieen R. Zierath, Non-CpG methylation of the PGC-1 promoter through DNMT3B controls mitochondrial density, *Cell Metabolism*, Vol. 10, 2009, 189-198

Rocco Barazzoni, XinXia Zhu, Mark DeBoer, Rakesh Datta, Michael D. Culler, Michela Zanetti, Gianfranco Guarnieri, Daniel L. Marks, *Kidney International*, Vol. 77, 2010, 23-28

Masanori Tamaki, Aika Hagiwara, Kazutoshi Miyashita, Shu Wakino, Hiroyuki Inoue, Kentaro Fujii, Chikako Fujii, Masaaki Sato, Masanori Mitsuishi, Ayako Muraki, Koichi Hayashi, Toshio Doi, Hiroshi Itoh, Improvement of physical decline through combined effects of muscle enhancement and mitochondrial activation by a gastric hormone ghrelin in male 5/6Nx CKD model mice, *Endocrinology*, Vol. 156, 2015, 3638-3648

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1件)

Masanori Tamaki, Aika Hagiwara, Kazutoshi Miyashita, Shu Wakino, Hiroyuki Inoue, Kentaro Fujii, Chikako Fujii, Masaaki Sato, Masanori Mitsuishi, Ayako Muraki, Koichi Hayashi, Toshio Doi, Hiroshi Itoh, Improvement of physical decline through combined effects of muscle enhancement and mitochondrial activation by a gastric hormone ghrelin in male 5/6Nx CKD model mice, *Endocrinology*, 査読有, Vol. 156, 2015, pp. 3638-3648, 10.1210/en.2015-1333

[学会発表](計6件)

田蒔 昌憲、萩原 あいか、宮下 和季、脇野 修、土井 俊夫、伊藤 裕、グレリンによる慢性腎臓病マウスの身体能力改善におけるミトコンドリアエピゲノム制御の意義、第89回日本内分泌学会学術集会、2016年4月21日~2016年4月23日、国立京都国際会館(京都府京都市)

田蒔 昌憲、萩原 あいか、宮下 和季、脇野 修、井上 博之、藤井 健太郎、藤井 千華子、佐藤 正明、三石 正憲、村木 絢子、林 晃一、土井 俊夫、伊藤 裕、Improvement of physical decline through combined effects of muscle enhancement and mitochondrial activation by a gastric hormone ghrelin in male 5/6Nx CKD model mice、第38回日本高血圧学会総会、2015年10月9日~2015年10月11日、愛媛県県民文化会館(愛媛県松山市)

田蒔 昌憲、宮下 和季、脇野 修、三石 正憲、林 晃一、伊藤 裕、グレリンによるミトコンドリアエピゲノム制御を介したCKDモデルマウスの身体能力改善、第58回日本腎臓学会学術総会、2015年6月5日~2015年6月7日、名古屋国際会議場

(愛知県名古屋)

Masanori Tamaki, Kazutoshi Miyashita, Shu Wakino, Masanori Mitsuishi, Koichi Hayashi, Hiroshi Itoh, Improvement of physical performance in 5/6 nephrectomized CKD model mice through epigenetic modulation of PGC-1 expression by ghrelin treatment, 52th European Renal Association - European Dialysis Therapy Association Congress, 2015年5月28日~2015年5月31日, ロンドン(イギリス)

田蒔 昌憲、宮下 和季、脇野 修、三石 正憲、林 晃一、伊藤 裕、グレリンはミトコンドリアエピゲノム制御を介して慢性腎臓病マウスの身体能力を改善する、第18回日本心血管内分泌代謝学会総会、2014年11月21日~2014年11月22日、横浜市開港記念会館(神奈川県横浜市)

Masanori Tamaki, Kazutoshi Miyashita, Shu Wakino, Masanori Mitsuishi, Koichi Hayashi, Hiroshi Itoh, Exercise endurance of 5/6 nephrectomized mice was improved by gastric hormone ghrelin through PGC1 -dependent activation of muscle mitochondria, 16th International Congress of Endocrinology, The Endocrine Society 's 96th Annual Meeting & Expo, 2014年6月21日~2014年6月24日, シカゴ(アメリカ合衆国)

[図書](計2件)

田蒔 昌憲、宮下 和季、伊藤 裕、医薬ジャーナル社、最新透析医療：先端技術との融合、2016年、860頁(561-569頁)

宮下 和季、田蒔 昌憲、脇野 修、伊藤 裕、中外医学社、Annual Review 腎臓 2015、2015年、230頁(164-172頁)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.keio-emn.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田蒔 昌憲 (TAMAKI, Masanori)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：90528902

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

宮下 和季 (MIYASHITA, Kazutoshi)

脇野 修 (WAKINO, Shu)

伊藤 裕 (ITOH, Hiroshi)