

報告番号	甲 乙 第	号	氏 名	本間 杏花
主 論 文 題 名 : 慢性腎臓病誘発骨格筋萎縮における酸化系筋線維の優先的な萎縮機序の解明				
(内容の要旨)				
【緒言】 近年、慢性腎臓病 (CKD) 患者における骨格筋萎縮 (サルコペニア) の有病率は13~25%にも上り、サルコペニアを合併した CKD 患者は腎予後不良をもたらすことが報告されている。そのため、腎機能障害と骨格筋萎縮が密接に関係し、相互に悪循環を形成する可能性が考えられる。この悪循環を断ち切るためには CKD とサルコペニアの関係性についてその病態の悪循環メカニズムの解明が必要であり、さらに病態に基づいた治療戦略の構築が重要である。 骨格筋は複数の筋線維で構成され、エネルギー基質の利用能の代謝特性や収縮特性に基づき myosin heavy chain (MyHC) I (slow-oxidative)、MyHC IIa (fast-oxidative-glycolytic)、MyHC IIb (fast-glycolytic)、MyHC IIx (fast-intermediate) に分類される。さらに筋線維は可塑性に富んでおり、運動や病態によってその筋線維サブタイプの構成が変化する。CKD 患者では筋線維サブタイプ構成が I 型から IIb 型に移行することが報告されている。しかし、CKD 誘発サルコペニアにおける酸化系筋線維の萎縮や筋線維サブタイプ構成変化が誘導される機序に関して、その全貌は明らかではない。 このような背景から本研究では、CKD 誘発サルコペニアにおける筋線維サブタイプ構成変化に焦点を当て、その機序解明並びに治療戦略の探索を目的とした。まず、腎臓と遠隔臓器のクロストークを評価可能な新規 CKD モデルを開発し、CKD の病理因子である transforming growth factor β (TGF- β) 及び代表的な尿毒症物質のインドキシル硫酸 (IS) が腎外組織の線維化や筋萎縮に及ぼす影響を評価した。次に、TGF- β が CKD 病態における筋線維サブタイプ構成変化の制御因子であると仮説を立て、TGF- β と CKD 誘発サルコペニアとの関係性を検証した。続いて、TGF- β に続く酸化系筋線維の萎縮機序について検討し、その機序に基づいて CKD 誘発サルコペニアに対する新規治療戦略の構築を試みた。以下に得られた知見を要約する。				
新規 CKD 誘発サルコペニアマウスモデルの開発及び筋萎縮病態の評価				
【背景】 CKD は心血管疾患や呼吸不全、サルコペニアなどの合併症を引き起こし、これらの合併症が CKD 患者の直接的な死因となる。CKD 患者は、腎機能の低下に伴い血中の尿毒症物質が増加し、CKD モデル動物においても、尿毒症物質の蓄積による腎外組織の線維化が報告されている。線維化した組織は正常な機能を持たず、組織が硬化し機能不全の原因となる。そのため、遠隔臓器の線維化は CKD で懸念される病態である。CKD に伴				

う遠隔臓器障害に関する報告はいくつか存在するが、CKD モデルは複数のモデルが存在し、モデルごとに腎障害の進行は異なる。さらには、遠隔臓器障害の進行も臓器間や CKD モデル間で異なり、一般的に1か月以上の期間を有する。そこで本研究では、早期から腎-遠隔臓器障害のクロストークを実現できる新規 CKD モデルとして、ヒトの進行性腎不全を模倣した 5/6 腎臓摘出 (5/6 Nx) モデルと水腎症により加速的に腎線維化を誘導する片側尿管閉塞 (UUO) モデルを組み合わせた 2/3 Nx + UUO モデルを着想した。さらに、このモデルを用いて CKD に伴う遠隔臓器障害モデルを構築し、CKD 誘発サルコペニアの筋萎縮病態を検討した。

【方法】

2/3 Nx + UUO モデルマウスは、まず右側腎臓の3分の2を摘出し、1週間後に左側尿管を結紮することで作製した。比較対象として、通常の 5/6 Nx および UUO モデルも作製した。最終処置の4週間後に、体重及び握力を測定し、血液、腎臓、肝臓、肺、心臓、骨格筋の回収により組織線維化及び尿毒症物質の蓄積度、筋萎縮病態を評価した。さらに、IS、TGF- β 及びマクロファージによる遠隔臓器線維化への影響に関してもヒト肝癌細胞 (HepG2) を用いて検証した。なお、本研究における動物実験は「慶應義塾動物実験規定」を遵守し、慶應義塾動物実験委員会の承認を得た実験計画に則って実施した (承認番号: A2022-060, A2022-037)。

【結果と考察】

2/3 Nx + UUO モデルは4週間後において、腎機能の低下及び尿細管線維化を認めた。また、遠隔臓器の線維化を評価したところ、肝臓及び心臓の線維化が確認された。しかし肺組織では線維化の進行は確認されなかった。このように臓器ごとに線維化誘導の進捗が異なった原因の一つとして、CKD の主要病理因子である IS 及び TGF- β の臓器特異的な蓄積性の違いを評価した。肝臓および心臓では、臓器中と血中の IS 濃度及び TGF- β 濃度に相関関係が示され、更には臓器の線維化と M2 マクロファージ発現に相関関係が認められた。加えて、*in vitro* 実験において IS、TGF- β 及びマクロファージの肝線維化に対する影響を評価した結果、これらの併存が特に線維化を誘導した。以上から 2/3 Nx + UUO モデルは IS と TGF- β の蓄積及び組織マクロファージによって、遠隔臓器線維化が誘導されていることが示唆された。次にサルコペニアの評価では、2/3 Nx + UUO モデルは4週間後において、体重、筋力及び下肢筋重量の有意な減少を認め、筋萎縮病態の解析において、酸化系筋線維である MyHC I 及び IIa が有意に萎縮し、筋線維サブタイプ構成が攪乱されることを明らかにした。以上の結果より、TGF- β 及び IS の遠隔臓器への効率的な波及によって、加速的に CKD による遠隔臓器線維化を誘導できる CKD モデルとして 2/3 Nx + UUO モデルを開発した。さらに、CKD 誘発サルコペニアでは酸化系筋線維が優先的に萎縮することを明らかにした。

CKD 誘発サルコペニアの筋萎縮機序の解明

【背景】

骨格筋は複数の筋線維で構成され、収縮特性や代謝特性に基づき4つの筋線維タイプ (MyHC I, IIa, IIb, IIx) に分類される。また筋線維は可塑性に富んでいることから、CKD 患者では筋線維サ

ブタイプ構成がI型からIIb型に移行し、それに伴って持久運動能が低下すると報告されている。さらに、CKDで進行する腎線維化の主要な病理因子であるTGF- β は、骨格筋に対しては筋分化抑制作用を示すが、骨格筋量及び機能への影響は十分に明らかにされていない。そこで本研究では、TGF- β がCKDに伴う筋線維サブタイプ構成変化の病理因子であると仮説を立て、TGF- β とCKD誘発サルコペニアの関係性を検証した。

【方法】

マウス筋芽細胞(C2C12細胞)に対してCKDマウス血漿の添加実験を行い、筋萎縮誘導因子の絞り込みを行った。具体的には分子サイズ分画血漿、熱処理血漿及びTGF- β 阻害剤(R-268712)の検討を行った。次に、候補因子として同定されたTGF- β (50 ng/day)を健常マウスに腹腔内投与し、骨格筋に対するTGF- β の影響を検証した。さらに、CKDマウス(2/3 Nx+UUO)に対するTGF- β 阻害剤(R-268712, 3 mg/kg/day)の経口投与により、CKD誘発サルコペニアとTGF- β の関係性を検証した。いずれの動物実験も開始から4週間後に、体重及び握力を測定し、血液及び骨格筋の回収により筋萎縮病態を評価した。本研究における動物実験は「慶應義塾動物実験規定」を遵守し、慶應義塾動物実験委員会の承認を得た実験計画に則って実施した(承認番号: A2023-008)。

【結果と考察】

C2C12細胞に対する各種処理を施した血漿添加実験の結果、TGF- β がMyHC IIaの発現制御を担っていることを確認し、CKD誘発サルコペニアの筋萎縮に関与する可能性が示された。次に、健常マウスに対してTGF- β を連日投与したところ、体重及びヒラメ筋重量が有意に減少した。また、TGF- β 投与による筋萎縮病態はCKDマウスと同様に、MyHC I及びIIaが優先的に萎縮し、筋線維サブタイプ構成の攪乱が確認された。さらに、CKDマウスに対してTGF- β 阻害剤を投与したところ、CKDに伴う体重及び筋重量の減少が抑制された。また、CKD病態下で誘導されるMyHC I及びIIaの萎縮がTGF- β 阻害剤投与により是正され、筋線維サブタイプ構成の攪乱が抑制された。同時に、CKD病態で認められた持久運動能の低下も抑制され、CKD誘発サルコペニアにおけるTGF- β の関与を明らかにした。以上の結果より、TGF- β はCKD誘発サルコペニアで認められるMyHC I及びIIaの萎縮誘導を制御する因子の一つであり、筋線維サブタイプ構成の攪乱に伴い運動機能の低下を誘導することを明らかにした。したがって、TGF- β がCKD誘発サルコペニアの治療標的となる可能性を示唆した。

miR-206を介したCKD誘発サルコペニア治療の提案

【背景】

上記検討において、CKD病態における優先的な酸化系筋線維の萎縮はTGF- β が関与することを明らかにした。しかし、TGF- β は多臓器に発現し広範な生物学的プロセスを担っているため、TGF- β を標的とした治療戦略の構築は困難である。従って骨格筋特異的な機序に基づく治療戦略の構築が必要である。これまでに、CKD病態において骨格筋の酸化系代謝能が低下する機序としてミトコンドリアの制御因子であるperoxisome proliferator-activated receptor γ coactivator (PGC)-1 α の減少が報告されているが、TGF- β とPGC-1 α の関係性を詳述したものはない。近年、遅筋表現

型の決定において microRNA が関与することが報告されており、その一つに骨格筋特異的に発現する microRNA (myomiR) の miR-206 がある。さらに、TGF- β が miR-206 の発現を抑制することが明らかになっている。そのため、CKD によって過剰産生された TGF- β が miR-206 の発現調節を介して遅筋型筋線維の表現型構成を攪乱している可能性があるのではないかと考えた。そこで本研究では、CKD 誘発サルコペニアにおける miR-206 の関与と miR-206 の CKD 誘発サルコペニア治療戦略としての有用性を評価した。

【方法】

CKD マウス (2/3 Nx + UUO) を作製し、前脛骨筋における myomiR 及び筋萎縮関連遺伝子の発現を定量した。次に、CKD 誘発サルコペニアに対する miR-206 の効果を検証するために、miR-206 を過剰発現させた C2C12 細胞に対する CKD マウス血漿の添加実験並びに CKD マウスに対する miR-206 (0.17 nmol/TA/week) の筋注投与実験を実施した。miR-206 の投与開始から 4 週間後に、体重及び握力を測定し、骨格筋の回収により筋萎縮病態を評価した。なお、本研究における動物実験は「慶應義塾動物実験規定」を遵守し、慶應義塾動物実験委員会の承認を得た実験計画に則って実施した (承認番号: A2023-008)。

【結果と考察】

CKD マウスの骨格筋において、筋萎縮関連遺伝子及び myomiR の発現を評価したところ、miR-206 の発現が有意に減少し、酸化系筋線維合成経路 (*Hdac4*, *Mef2*) の活性も抑制されたことから、CKD に伴う酸化系筋線維萎縮における miR-206 の関与が示唆された。そこで、miR-206 を過剰発現させた C2C12 細胞に対して CKD マウス血漿を添加した結果、酸化系筋線維である MyHC I の発現が増加した。さらに、CKD マウスに対して miR-206 を筋注投与したところ、酸化系筋線維である MyHC IIa の萎縮が抑制された。以上の結果より、CKD 誘発サルコペニアにおいて骨格筋における miR-206 の発現低下が酸化系筋線維の優先的な萎縮病態機序の一端であることを明らかにし、miR-206 が CKD 誘発サルコペニアの治療標的の一つとなる可能性を見出した。

【総括】

本研究により、CKD 誘発サルコペニアにおける酸化系筋線維の優先的な萎縮に CKD の病理因子である TGF- β が関与することを明らかにし、その下流制御因子である miR-206 が CKD 誘発サルコペニアの治療標的になり得る可能性を明らかにした。加えて、CKD 誘発サルコペニアにおいて破綻した筋線維サブタイプ構成の正常化は CKD に伴う運動機能の低下を抑制し得ることを明らかにし、サルコペニア治療に繋がる基盤的な情報を提供した。これらの知見は、CKD 誘発サルコペニアにおける新たな筋萎縮機序と治療戦略を提供するものであり、将来的なサルコペニア治療への貢献が期待される。