

【要約】

博士学位論文 2024 年度

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

慶應義塾大学大学院薬学研究科

本 間 杏 花

論文内容の要約

第1章 緒言

世界的な超高齢社会の波が押し寄せる中、骨格筋萎縮（サルコペニア）は転倒や要介護リスクを招き、健康寿命を脅かす疾患として関心が高まっている。日本の高齢者におけるサルコペニア有病率は12%～21%に上り、年齢と共に上昇する。また、サルコペニアは加齢、栄養不良、不活動、疾患等の様々な原因により発症し、原因ごとに筋萎縮病態は異なる。しかし、サルコペニア治療の中心は運動療法及び食事療法であり、薬物治療は存在しない。その要因の一つとして、未だ個々の疾患におけるサルコペニア病態の詳細な機序が明らかになっていないことが挙げられる。したがって、サルコペニアに対する新規治療戦略の構築のために、個々の病態に基づいた疾患機序の解明が必要である。

慢性腎臓病（CKD）は、持続的に腎機能が低下した病態と定義される疾患であり、日本人成人の約8人に1人が罹患している国民病である。多くのCKD患者が心血管疾患や呼吸器疾患、サルコペニア等を合併し、これら合併症は死亡率の増加を引き起こすことが問題視されている。CKDでは、過剰な酸化ストレスや炎症によって糸球体障害が生じ、更には尿管管線維化が進行していく。そのため、尿毒症物質や線維化関連因子が遠隔臓器障害の発症に関与している可能性が明らかにされている。本研究では、CKDによる遠隔臓器障害として骨格筋に及ぼす影響について注目し、CKD誘発サルコペニアについて検討した。CKD患者の13～25%がサルコペニアを発症していると報告されているが、現在のサルコペニア治療において推奨されるタンパク質摂取や運動は腎機能の悪化に繋がる可能性があるため、CKD誘発サルコペニアの治療管理は容易ではない。しかしながら、サルコペニアはCKD患者の腎予後不良及び死亡率の増加をもたらすことが報告されているため治療の必要性が認識されている。以上のように、腎機能障害とサルコペニアが密接に関係し、相互に悪循環を形成している可能性が考えられることから、この悪循環を断ち切る必要がある。そのためにCKDとサルコペニアが相互に作り出す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誘導機序に関して、その全貌は明らかになっていない。

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、腎線維化の主要

制御因子である 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 誘発サルコペニア病態における筋線維サブタイプ構成変化に及ぼす影響を検証した。最後に、TGF- β による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。

第2章 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

【背景と目的】

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 患者の死因や予後不良因子となる。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、腎臓が線維化することでその機能がさらに低下していく。CKD モデル動物においても、尿毒症物質の蓄積と腎臓の線維化が観察され、さらに腎外組織が線維化していく。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。また、CKD に伴う遠隔臓器障害の一つであるサルコペニアは CKD 患者の 13~25%が発症し、腎予後不良や死亡率の増加を引き起こす重大な合併症である。このように、CKD は様々な合併症を伴うため多様な遠隔臓器障害の理解を深める研究が求められており、様々な CKD モデル動物を用いた研究がなされている。しかし、現在汎用されている CKD モデルには課題が存在する。最も一般的な CKD モデルである 5/6 腎臓摘出 (5/6 Nx) モデルは、器質的に腎臓ネフロンを削減することでヒトの進行性腎不全を模倣し、腎機能低下により尿毒症物質の蓄積を誘導するモデルである。しかし、腎線維化の誘導には数か月要し、遠隔臓器障害の誘導には更なる時間が必要である。そのため、加速的に腎障害を進行させることで遠隔臓器障害を誘導する CKD モデルに関する報告もあり、例えば 5/6 Nx モデルに対する高タンパク質食や高リン酸食の負荷モデルがある。しかし、CKD の臨床患者は食事制限や薬物療法による血中リン濃度管理が実施されており、これらの CKD モデルは臨床における CKD 病態を十分に再現していない。また、片側尿管結紮 (UUO) モデルは、水腎症により加速的に腎線維化を誘導できる CKD モデルであるが、非結紮側の腎臓が正常であるために尿毒症物質の全身への蓄積を伴わず臨床特性と異なる。そこで本章の目的は、臨床病態を十分に模倣し、さらに早期から腎-遠隔臓器障害のクロストークを再現できる新規 CKD モデルとして、5/6 Nx モデルと UUO モデルを組み合わせた 2/3 Nx + UUO モデルを着想し、CKD に伴う遠隔臓器障害モデルを構築することである。さらに、この新規 CKD モデルを用いて CKD 誘発サルコペニアの筋萎縮病態を検討した。

【方法】

CKD モデルとして、5/6 Nx モデル、UUO モデル及び両者を組み合わせた新規 CKD モデルを作製した。5/6 Nx モデルは、まず右側腎臓の 3 分の 2 を摘出し、1 週間後に左側腎臓を全摘出した。UUO モデルは、左腎側尿管を結紮することで作製した。新規 CKD モデルは、まず右側腎臓の 3 分の 2 を摘出し (2/3 Nx)、1 週間後に左腎側尿管を結紮

(UUO) した。いずれも最終処置の 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（ヒラメ筋、長趾伸筋、前脛骨筋、腓腹筋）を回収し組織線維化及び尿毒症物質（IS）の蓄積、さらに筋萎縮病態を評価した。また、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ヒト肝癌細胞（HepG2）を用いて検討した。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】

最終処置から 4 週間後において新規 CKD モデル（2/3 Nx + UUO）は、5/6 Nx モデルと同等の腎機能の低下を示し、UUO モデルと同等の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、2/3 Nx + UUO では肝臓及び心臓は線維化が確認されたが、肺組織では線維化の進行が確認されなかった。しかし、5/6 Nx モデルおよび UUO モデルではいずれの臓器でも線維化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 の臓器への蓄積性の違いについて評価した。その結果、線維化の認められた肝臓および心臓では、臓器中と血中の IS 及び TGF- β 濃度に相関関係が確認された。また、臓器の線維化と M2 マクロファージ発現についても相関関係が見られた。そこで、*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、これらの併存によって線維化が強く誘導された。以上から 2/3 Nx + UUO モデルは IS と TGF- β の組織への効率的な蓄積と組織マクロファージによる線維化促進によって、遠隔臓器線維化が効率的に誘導されていることが示唆された。そこで本モデルの作製から 4 週間後における体重、筋力及び下肢骨格筋重量を評価したところ、いずれも有意な減少を認め、サルコペニア病態の誘導を確認した。次に、筋線維サブタイプの組成が異なる 2 つの下肢骨格筋の筋断面積変化を評価した。その結果、2/3 Nx + UUO モデルでは、酸化系筋線維が豊富な骨格筋（ヒラメ筋、前脛骨筋深部）において筋断面積が有意に減少した。一方で解糖系筋線維が豊富な骨格筋（長趾伸筋、前脛骨筋表層部）の筋断面積はほとんど変化が認められなかった。さらに、筋線維サブタイプごとの筋線維サイズ変化について MyHC アイソフォームに基づく解析の結果、酸化系筋線維である MyHC I 及び IIa が有意に萎縮し、酸化系筋線維の筋線維サブタイプ構成が減少することを明らかにした。

以上の結果より、2/3 Nx + UUO モデルは、遠隔臓器への IS 及び TGF- β の効率的な波及により、CKD に伴う遠隔臓器障害を加速的に進行するモデルを構築した。さらに、CKD 誘発サルコペニアでは酸化系筋線維である MyHC I 及び IIa が優先的に萎縮し、筋線維サブタイプの構成比が攪乱されることを明らかにした。

第 3 章 CKD 誘発サルコペニアの筋萎縮機序の解明

【背景】

骨格筋は人体の約半分を占め、姿勢維持や運動において必要不可欠である。近年、骨格筋はマイオカインと呼ばれる因子を分泌し全身の代謝恒常性を調節する役割を担

っていることが明らかになってきた。そのため、骨格筋の量や機能の維持が生体恒常性を維持する上で重要な機能を果たすと考えられる。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つの筋線維サブタイプ(MyHC I, IIa, IIb, IIx)に分類される。また筋線維は可塑性に富んでおり、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ことが報告されている。前章において、CKDに伴う遠隔臓器障害の主要な誘導因子の一つとして腎線維化の主要病理因子であるTGF- β の関与を明らかにした。しかし、CKD誘発サルコペニアにおいてTGF- β が骨格筋へ及ぼす影響や機序について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(低分子, <3 kDa; 中高分子, ≥ 3 kDa)、熱不活化処理血漿(100°C, 15分)及びTGF- β 受容体阻害剤(R-268712, 2.5 nM)の検討を行った。次に、候補因子として絞り込んだTGF- β (50 ng/day)を健常マウスに腹腔内投与し、TGF- β が骨格筋に及ぼす影響を検証した。さらに、CKDマウス(2/3 Nx + UUO)に対するTGF- β 受容体阻害剤(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投与開始から4週間後に、体重及び握力の測定並びに血液及び骨格筋(ヒラメ筋、長趾伸筋、前脛骨筋、腓腹筋)を回収し、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の発現制御に関与することを確認し、CKD誘発サルコペニアにおける酸化系筋線維の萎縮誘導に関わ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、MyHCアイソフォームに基づく筋萎縮病態解析により、TGF- β 投与はMyHC I及びIIaを優先的に萎縮し、筋線維サブタイプ構成を攪乱させることを明らかにした。これはCKD誘発サルコペニアと同様の筋線維サブタイプ構成変化であり、CKDマウス及びTGF- β 投与のいずれにおいても酸化系筋線維の代謝活性に重要なミトコンドリアの合成調節因子である peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator (PGC)-1 α のタンパク質発現の減少が確認された。続いて、CKDマウスに対してTGF- β 受容体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 受容体阻害剤投与により抑制され、筋線維サブタイプ構成の攪乱を改善した。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。加えて、CKD誘発サルコペニアの治療において、骨格筋代謝を反映する筋線維サブタイプ構成を正常に維持することの重要性が示唆された。

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。

第4章 miR-206 を介した CKD 誘発サルコペニア治療の提案

【背景】

第3章の検討において、CKD 病態における優先的な酸化系筋線維の萎縮に 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。したがって、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 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、内在性の RNA サイレシング機構である microRNA による遺伝子発現制御が注目されており、遅筋表現型の決定においても microRNA が関与することが報告されている。その一つに、骨格筋特異的に発現する microRNA (myomiR) の miR-206 がある。miR-206 の発現が TGF- β によって抑制されることがこれまでに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 マウスに対するアテロコラーゲン処理した mimic-miR-206-3p (0.17nmol/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、体重及び握力の測定並びに骨格筋（ヒラメ筋、長趾伸筋、前脛骨筋、腓腹筋）を回収し、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*) の活性が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 を過剰発現した C2C12 細胞における筋線維タイプ発現を評価した結果、MyHC I, IIa, IIb 発現が有意に増加し、CKD マウス血漿存在下では MyHC I 発現が有意に増加した。さらに、CKD マウスに対して miR-206 を筋注投与したところ、投与開始から4週間後において筋力は有意に増加し、miR-206 を筋注した骨格筋

部位の筋量はわずかに増加した。また、miR-206 投与によって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。

第5章 総括

本研究では、CKD 誘発サルコペニアに特徴的な骨格筋の酸化系表現型の減少に着目し、CKD 誘発サルコペニアにおける酸化系筋線維の萎縮機序の解明並びに治療戦略の提案を試みた。

第2章では、遠隔臓器障害を加速的に進行させる新規 CKD モデルを開発した。この新規 CKD モデルを用いた筋萎縮病態の検討により、CKD 誘発サルコペニアは尿毒症物質及び腎線維化因子の全身への蓄積を介して優先的に酸化系筋線維である MyHC I 及び IIa を萎縮誘導することを明らかにした。

第3章では、CKD 病態における酸化系筋線維萎縮の主要制御因子として TGF- β を *in vitro* 実験により絞り込み、さらに健常マウスに対する TGF- β 投与実験および CKD マウスへの TGF- β 受容体阻害剤投与実験により明らかにした。また、筋線維サブタイプ構成の攪乱を抑制することで運動機能の低下も抑制し、筋線維サブタイプ構成を正常に保つことが CKD 誘発サルコペニアの治療標的となる可能性を示した。

第4章では、*in vitro* 及び *in vivo* 実験により、CKD 誘発サルコペニアにおける miR-206 の関与を明らかにし、miR-206 の補充が CKD に伴う酸化系筋線維の萎縮を抑制することを明らかにした。

以上より、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 誘発サルコペニアの治療戦略として、破綻した筋線維サブタイプ構成の正常化の重要性を示した。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。

<主論文に関する原著論文>

Homma K, Enoki Y, Uchida S, Taguchi K, Matsumoto K. A combination of 5/6-nephrectomy and unilateral ureteral obstruction model accelerates progression of remote organ fibrosis in chronic kidney disease. *FASEB BioAdvances*. 2023;5(10):377-94.