

高齢者の腎排泄能低下がサルコペニアに与える影響

代表研究者 東京大学医学部附属病院 腎臓・内分泌内科 病院講師 西 裕志
 共同研究者 東京大学大学院医学系研究科 博士課程 東原 崇明
 東京大学医学部附属病院 腎臓・内分泌内科 竹村 浩至
 東京大学大学院医学系研究科 教授 南学 正臣

【まとめ】

高齢者の糸球体濾過率が生理的に低下することに着目し、腎排泄能低下に伴う尿毒素蓄積が高齢者サルコペニアの一因であると仮説立てた。片腎摘後のマウスにインドキシル硫酸を投与すると、腓腹筋の湿重量やミオシン蛋白発現は減少し、トレッドミル走行耐容能や握力も低下した。また、インドキシル硫酸はマウス筋芽細胞 C2C12 の筋管細胞への分化を抑制した。尿毒素貯留が高齢者サルコペニアの一因である可能性がある。

1. 研究の目的

1-1 はじめに

腎臓の主たる生理作用は体内の水分と老廃物を尿の構成成分として排泄することであり、その能力は糸球体濾過率として数理的に表現される。高齢者では糸球体濾過率が生理的に低下し、実際 80 歳代の約 20%が 50 mL/分/1.73m²を下回る（日本腎臓学会編: CKD 診療ガイド 2012）。申請者はこの事実と、腎機能低下患者にサルコペニアが広くみられる（Huang: *Transplant Proc* 2012）点から、高齢者サルコペニアの病因のひとつとして、尿中排泄低下に伴う体内蓄積物質（尿毒症物質）があるのではないかと仮説立てた。糸球体濾過率低下と共に体内に蓄積する尿毒素としては尿素、クレアチニン、p-クレゾール、インドキシル硫酸等が知られる（Vanholder: *J Am Soc Nephrol* 2014）。中でもインドキシル硫酸はとくに腎臓（Palm: *Am J Physiol Renal Physiol* 2010）や血管内皮（Ito: *J Bio Chem* 2010）、最近では免疫系（Nakano: *Circulation* 2019）に与える影響が分子生物学的に研究されてきている一方で、骨格筋に与える影響の報告は依然として数少ないことから、申請者はインドキシル硫酸が骨格筋に与える影響について、とくに高齢者サルコペニアの病因解明に寄与できるかという視点に立って、実験動物及び培養細胞系を用いて実験的な解析を進めることとした。

1-2 尿毒素とマウス骨格筋

マウスやラットなどの実験動物において腎障害が自然発生またはそれを薬物や外科的操作で人工的に惹起するモデルは数多く知られている。その一方で、腎排泄能低下によって蓄積する尿毒素がもつ独立の作用を検証するために、尿毒素を負荷するモデルを採用した。代表的尿毒素であるインドキシル硫酸をマウスに一定量、一定期間投与して（Enoki: *Sci Rep* 2016）、骨格筋に及ぼす影響を筋湿重量・サイズなどの物理的側面と筋力などの生理的側面の両面から評価する方針とした。とくに、マウスの運動耐容能を評価する標準手法である実験動物トレッドミル装置を貴団体助成金の援助で購入させていただき、使用する方針とした。また、骨格筋組織における主要タンパクであるミオシンの発現を評価することとした。骨格筋は速筋と遅筋に分類され、マウス個体としては速筋が主体と言われるが、実際は、腓腹筋や前脛骨筋が速筋を主体とする一方、ヒラメ筋は遅筋も多く含まれる。また、高齢者サルコペニアでは速筋が優位に脱落するという知見（Larsson: *Acta Physiol Scand Suppl* 1978; Nilwik: *Exp Gerontol* 2013）、速筋と遅筋それぞれが独自のペースで萎縮するという知見（Narici: *Br Med Bull* 2010）の両者があるが、いずれにせよ筋線維のタイプはサルコペニアを分析するうえでの評価項目の一つとなる。

1-3 尿毒素とマウス骨格筋培養細胞

インドキシル硫酸の生体投与は骨格筋のみならず非特異的に多臓器・多組織に到達する可能性がある。インドキシル硫酸の骨格筋に与える影響について生体を模式化した実験系で繰り返し種々の条件で検討できるよう、また、将来的な遺伝改変操作も視野に入れて、培養細胞系の実験を計画した。骨格筋の培養細胞には、不死化細胞株としてマウス筋芽細胞 C2C12 やラット L6 細胞が知られるほか、ヒト、マウスなど各動物種の骨格筋から骨格筋幹細胞としての性質をもつ衛生細胞を採取してこれを分

化させる方法がある．今回はこのうちマウス C2C12 筋芽細胞を低濃度血清で培養することによって筋管細胞に分化させる比較的一般的な実験系を用いて，培地添加されたインドキシル硫酸が与える影響を評価する方針とした．

2. 研究方法と経過

2-1 動物実験

6-8 週齢の C57BL/6J マウス(日本クレア，日本) に対してインドキシル硫酸 500mg/kg を週 5 日，又は 600 mg/kg を連日腹腔内投与した．また，必要な場合はさらに 1 週間前に外科的片腎摘出術を先行させた．マウス・ラット用トレッドミルシステム TMS-8B (メルクエスト，日本) を使用した．走行傾斜角度 0 度，電気刺激強度 0.3 mA，走行速度 0 m/min で開始．10 分かけて 10 m/min まで緩徐に速度を上昇させた後，その後は，2 分間で 3 m/min ずつ速度を上昇させ，マウスが走行不能になる最大走行速度を測定した．走行不能の判定は，各レーン最後方にあるグリッドに 10 秒以上触れる，或いは滞在することとした．また四肢グリップ強度の測定にはフォースゲージ (イマダ，日本) を用いた．吸入麻酔薬イソフルラン過剰吸入後の頸椎脱臼にて安楽死させ，両側腎臓，腓腹筋，ヒラメ筋を採材して重量を計測し，免疫染色や分子生物学的解析に用いた．

本研究において使用した全ての動物は東京大学大学院医学系研究科の実験動物規則に従い飼育，使用した．また，本研究は同動物実験委員会の審査，承認を受けて行った．

2-2 細胞実験

マウス骨格筋由来筋芽細胞 C2C12 株を使用した．培養は 37°C，湿度 95%，5% CO₂ で行った．増殖培地には 10%ウシ胎児血清を含むダルバッコ改変イーグル培地を用い，分化誘導培地には 2%ウマ血清を含む上記培地を使用した．

2-3 免疫染色・ウェスタンブロット

腓腹筋は OCT 包埋した凍結標本として薄切後に，速筋ミオシン抗体 (Sigma-Aldrich，米国)，遅筋ミオシン抗体 (Sigma-Aldrich，米国)，ラミニン抗体 (Merck Millipore，米国) で染色し，蛍光顕微鏡 (キーエンス BZ-X710，日本) で観察した．腎臓は中性ホルマリン固定液にて 12 時間浸漬固定後に 70%エタノールで置換した．その後，パラフィン包埋し薄切した．脱パラフィンし，100%から 70%エタノー

ルおよび精製水にて再水和後，Periodic acid-Schiff (PAS) 染色を行い，脱水・透徹を行った後，封入し組織学的観察を行った (Nishi: *Am J Pathol* 2011)．

ウェスタンブロットは腓腹筋組織を分解酵素処理し，SDS 電気泳動及び PVDF メンブレンに転写後に先述のミオシン抗体を用いて染色した．

3. 研究の成果

3-1 インドキシル硫酸を投与されたマウスの骨格筋は萎縮し運動能も低下する

インドキシル硫酸が生体骨格筋に影響を与えるかどうか評価するため，まず，インドキシル硫酸 500mg/kg を週 5 日，8 週間腹腔内注射を行ったところ，対象群と比較しても有意な体重及び骨格筋湿重量変化を認めなかった．インドキシル硫酸は通常の腎機能では速やかに体外排泄されることから，尿毒素の体内蓄積が不十分であることが予想された．次に，片腎摘を先行して行い理論上の腎排泄能を低下させたうえでインドキシル硫酸 600 mg/kg の腹腔内投与を連日行ったところ，7 日目で対照群に比較して，腓腹筋湿重量が減少した．一方，同時点でヒラメ筋には同様の結果が見られなかった．

サルコペニアは，筋量低下だけでなく，筋力や歩行速度の低下で定義付けられるが，今回のインドキシル硫酸投与マウスにおいても，トレッドミル走行テストで運動耐容能の低下が認められた．また，四肢グリップテストで測定された握力も低下していた．こうした筋力低下は，全身性要素の影響も考えられる．とくに，インドキシル硫酸投与によって腎組織障害が生じることが知られている (Ichii: *PLoS ONE* 2014)．しかし，投与期間・投与量を調整した今回の実験プロトコルでは，腎臓に組織学に顕著な異常は見られず，血中の尿素窒素値で評価した腎機能は正常なままであった．

3-2 インドキシル硫酸を投与されたマウスの骨格筋は速筋優位に萎縮する

腓腹筋は主に速筋で構成され，ヒラメ筋は遅筋の成分量も高い．インドキシル硫酸は主として速筋の重量に影響を与えると仮定し，さらに上記マウスからサンプリングした腓腹筋の凍結標本を速筋構成ミオシン及び遅筋構成ミオシンをそれぞれに対する特異抗体を用いて免疫染色し，単一の筋線維の断面積の分

布を評価した。その結果、インドキシル硫酸投与群では速筋成分を主体とする筋線維の狭小化が認められた一方、遅筋成分を主体とする筋線維のサイズには大きな変化は認められなかった。さらに、ウェスタンブロットでは、インドキシル硫酸投与マウスの腓腹筋において速筋構成ミオシンが選択的に減少していた。近年の報告ではサルコペニアにおけるユビキチン・プロテアソーム系の蛋白分解の亢進が重要な病因として注目されている (Glass: *Trends Mol Med* 2003)。インドキシル硫酸投与マウスの腓腹筋を用いたリアルタイム PCR によれば、ユビキチン化に関連する *Atrogin-1*, *Myositin*, *MuRF-1* などの遺伝子発現が亢進する傾向にあった。一方、蛋白の発現は合成と分解のバランスによって調節される。速筋・遅筋を特徴づけるミオシン重鎖のアイソフォームに着目して遺伝子発現を解析したところ、インドキシル硫酸投与マウスでは速筋を特徴づける遺伝子の一つ *MYH2* mRNA の発現が低下していた。

3-3 インドキシル硫酸はマウス筋芽細胞の分化を抑制する

マウス筋芽細胞に低血清培地で培養することによって筋管細胞に分化させる過程において、インドキシル硫酸を培地添加したところ、細胞サイズとくに短径の短縮と核融合率の低下が認められた。また、細胞分化に寄与する *MyoG* の遺伝子の発現低下が認められ、*MYH* 各アイソフォームの遺伝子発現が抑制されていた。これらはいずれもインドキシル硫酸が骨格筋細胞の分化を阻害する可能性を示している。

4. 今後の課題

尿毒素として代表的なインドキシル硫酸が生体内及び培養細胞においてその形質を負に変化させることを明らかにした。高齢者のサルコペニアは高齢者の脆弱性を規定する重要な生物学的因子であり、また、腎クリアランス低下とサルコペニアの関連は臨床的には観察されるが、機序解明が進んでいない。

動物実験モデルは筋萎縮に対するインドキシル硫酸の効果を直接評価できるという点で優れている。一方、より低用量かつ長期間のインドキシル硫酸投与が片腎マウスに行われ、体重量と腓腹筋に加えて、前脛骨筋、ヒラメ筋の重量の減少も観察されている (Enoki: *Sci Rep* 2016)。この差異が投与プロトコルの差異によるものか検証が必要である。また、同報告では

骨格筋内のユビキチン化に関連する遺伝子に加えて、*IL-6*, *TNF- α* などの炎症性サイトカインの発現増加も観察している点は興味深い。

培養細胞系ではインドキシル硫酸が骨格筋分化を抑制した。そのメカニズムについては、インドキシル硫酸が *MyoG* 遺伝子の発現も抑制していることからさらに上流のシグナルに影響していることを想定してノックダウン実験を継続している。並行して細胞内低酸素シグナルの関与も解析を進めている。

また、筋分化は生体内の定常状態で起きている現象ではなく、サルコペニアと直接関連づけていることは早計である。一方、高齢者や慢性腎臓病患者の骨格筋の創傷治癒やリハビリテーションに伴う骨格筋リモデリングにおいては意義がある可能性がある。これらに焦点を当てた動物実験の計画が必要と考えている。

以上、尿毒症物質がサルコペニアに寄与する可能性が示された。加齢に伴う腎クリアランス低下を改善する手立ては現代医学では依然乏しいが、上記物質を選択的に除去する方法は、腸内フローラの改善 (Kikuchi: *Nat Commun* 2019), 代謝拮抗薬 (Ising: *Am J Pathol* 2016), 消化管活性炭吸着 (Yamamoto: *Sci Rep* 2015) 等の手段で試みられており、これらが高齢者サルコペニアの治療としても有用である可能性がある。

5. 研究成果の公表方法

【これまでの学会発表】

1. Nishi, Takemura, Higashihara, Nangaku: HIF stabilizer decreases mitochondrial oxygen consumption in skeletal C2C12 myotube. The 56th European Renal Association – European Dialysis and Transplant Association Congress, Budapest, Hungary. June 13-16, 2019.

2. Takemura, Nishi, Higashihara, Nangaku: HIF stabilizer decreases mitochondrial oxygen consumption in skeletal C2C12 myotube. American Society of Nephrology. Washington, DC, USA. November 7-10, 2019.

3. Higashihara, Nishi, Takemura, Nangaku: β 2-receptor agonism averts indoxyl sulfate-induced sarcopenic phenotype of mouse skeletal C2C12 myotube. American Society of Nephrology. Washington, DC, USA. November 7-10, 2019.

【今後の予定】

日本腎臓学会学術総会での発表, 米国腎臓学
会での発表, 査読付き英語論文発表を予定して
いる.

以上