

慢性腎臓病が誘発するサルコペニアの分子機構解析
～病態進展因子並びに診断マーカーとしての酸化型アルブミンの可能性～

医療薬学専攻 薬剤学分野 加藤 大雅

慢性腎臓病（CKD）は早期老化の表現型であり、高頻度で筋萎縮・筋力低下（サルコペニア）を合併する。事実、CKDにおけるサルコペニアの有病率は保存期 CKD（GFR 区分 G3～G5）で 5%～14%、血液透析時においては 13%～34%と高い値を示し、CKD 病態進行に伴いサルコペニア合併の頻度が増加している。加えて、サルコペニアの病態進行は寝たきりや転倒、骨折リスクのみならず、死亡リスクも高めることが知られている。その為、超高齢社会を迎えた本邦においても、CKD が誘発するサルコペニア対策は喫緊の課題であるものの、その病態形成機構(腎筋連関)については未だ不明な点が多く、病態形成機序に基づいた新たな診断と治療戦略の開発が希求されている。近年、CKD が誘発する筋萎縮のトリガーとして、酸化ストレスの関与が注目されている。酸化ストレスは活性酸素種(ROS)に起因する酸化損傷力と抗酸化防御システムの均衡が崩れた状態を指し、筋細胞内での ROS 産生の増大は筋萎縮因子の誘導や慢性的な炎症を誘発する。そこで私は、CKD の進行に伴い血中濃度が上昇する中分子尿毒症物質の 1 つである蛋白質過酸化物(advanced oxidation protein products: AOPPs)に着目した。AOPPs とは、CKD 病態下で上昇する ROS が好中球のミエロペルオキシターゼを介して次亜塩素酸(hypochlorous acid: HOCl)を産生し、HOCl が血清蛋白質(主にアルブミン)を酸化することで生成する酸化損傷生成物である。AOPPs は酸化損傷生成物としてだけでなく、スカベンジャーレセプターの 1 つである CD36 を介して細胞内に取り込まれ、NADPH oxidase を活性化することで、過剰に ROS 産生を亢進し、尿細管障害や慢性肝炎、クローン病など慢性炎症性疾患の病態進展に関与することが知られている。以上の知見から CKD 病態時に増加する AOPPs は、筋組織に対しても悪影響を及ぼす可能性が推察されるが、これまでに AOPPs が筋組織に与える影響を評価した報告はない。本研究では、CKD が誘発するサルコペニアの分子機構解明とそれに基づく新たな診断と治療戦略の開発を最終目標とし、その病態進展因子としての AOPPs の関与並びに診断マーカーとしての可能性について検討した。

最初に透析患者 83 名（内訳：サルコペニア 48 名、プレサルコペニア 16 名、非サルコペニア 19 名）を対象に血清 AOPPs 活性と透析患者におけるサルコペニア進展の関係性を評価した。血清 AOPPs 活性はサルコペニア進展に伴い増加した。次に血清 AOPPs 活性及びアルブミン酸化度(システイン付加アルブミン: Cys-albumin)とサルコペニア診断に用いられる握力及び骨格筋量指数(SMI)の関係性を評価した。血清 AOPPs 活性は男女ともに握力及び SMI と有意な負の相関を示した。一方で、アルブミン酸化度は握力と有意な負の相関を示し、SMI とは相関傾向を示した。

次に、AOPPs がサルコペニアの病態進展因子になるか否かについて検討した。まず、5/6 腎臓摘出 CKD マウスを用いて検討した結果、CKD マウスにおいて筋組織中 AOPPs

活性は上昇し、筋組織中 AOPPs 活性は筋萎縮因子である atrogen-1 及び myostatin 発現と有意な正の相関を示した。そこで AOPPs による筋萎縮機構を解明すべく、C2C12 筋芽細胞を用いて評価を行った。AOPPs は C2C12 筋芽細胞における ROS 産生を濃度依存的に上昇させ、AOPPs による ROS 産生の亢進は NADPH oxidase 阻害剤や抗 CD36 中和抗体により抑制された。加えて、C2C12 筋芽細胞においても、AOPPs は atrogen-1、myostatin 及び TNF- α 発現を上昇させ、これら AOPPs の作用は抗酸化剤共存下において抑制された。一方で AOPPs はタンパク質合成系である Akt のリン酸化レベルには影響を及ぼさなかった。以上より AOPPs は CD36/NADPH oxidase/ROS 経路を介してタンパク質分解系を亢進することで筋萎縮を惹起することを明らかにした。次に AOPPs が C2C12 細胞の筋管形成に及ぼす影響を評価した。AOPPs は筋分化因子である myogenin 発現と骨格筋分化の最終マーカーであるミオシン重鎖(myosin heavy chain)の発現を抑制した。事実、AOPPs は筋管数及び筋管径を低下させ筋管形成を抑制した。近年、運動能力の低下には筋組織中のミトコンドリアの関与が明らかにされた。そこで AOPPs がミトコンドリアに及ぼす影響を評価した。AOPPs はミトコンドリア生合成に関与する PGC-1 α の発現を低下させた。この結果を裏付ける様に AOPPs はミトコンドリア量の指標である MitoGreen 染色並びにミトコンドリア DNA を低下させた。さらにミトコンドリア機能の評価として細胞外フラックスアナライザーを使用して酸素消費速度を評価したところ、基礎呼吸量及び ATP 産生量、最大呼吸量を AOPPs は低下させた。以上より AOPPs はミトコンドリア量及び機能を低下させることを明らかにした。最後に、細胞実験の結果を *in vivo* で検証すべく、健常マウスに対して AOPPs を 7 週間連日負荷することで検討を行った。AOPPs 負荷は筋重量の低下に加えて筋線維径並びに筋分化マーカーであるミオシン重鎖を低下させた。また AOPPs 負荷は骨格筋中の PGC-1 α 発現を低下させた。その際、トレッドミル試験及び wire hang test により筋持久力の低下が観察された。また、AOPPs 負荷においても、骨格筋の atrogen-1、myostatin 及び TNF- α 発現が上昇し、筋蛋白質分解系の亢進が認められた。加えて、AOPPs 負荷は Akt のリン酸化レベルを低下させ、筋蛋白質合成系にも影響を与えることが示唆された。以上の結果より、健常マウスにおいても、AOPPs の負荷は筋組織に対して蛋白質分解系の亢進並びに蛋白質合成系を低下させることで、筋分化に障害を与え、筋萎縮を惹起することで筋力を低下させることが明らかとなった。

本研究成果は、これまで未解明な点が多かった CKD 誘発サルコペニアの分子機構の一端を明らかにするとともに、診断マーカーや治療標的を提案するものであり、本病態に対する新たな治療戦略へ繋がることが期待される。