

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 西川 幹人

学 位 論 文 題 名

Exercise capacity in chronic kidney disease

(慢性腎臓病における運動能力)

【背景と目的】 慢性腎臓病 (Chronic kidney disease ; CKD) 患者においては、病初期より運動能力の低下を認め、病期に伴って進行する。CKD 患者における運動能力の低下は、患者の活動度を低下させ **quality of life** を悪化させるのみならず、心血管疾患などの発症にも関与し、独立した生命予後規定因子とされている。そのため、運動能力の低下を抑制しうる新たな治療戦略が必要とされている。CKD に伴う運動能力低下の原因として、心血管病や腎性貧血に伴う骨格筋への酸素供給の減少、インスリン抵抗性やレニン・アンジオテンシン系 (RAS) 活性化による骨格筋萎縮、骨格筋ミトコンドリア機能障害などが挙げられる。さらに、インドキシル硫酸に代表される様々な尿毒素が体内に蓄積し、骨格筋ミトコンドリア障害や骨格筋萎縮を介して運動能力の低下に関与している可能性が想定されるが、これまで詳細な検討は行われていない。一方、経口吸着薬である AST-120 (クレメジン®) はインドキシル硫酸の血中濃度を低下させ、組織の酸化ストレス産生を抑制し臓器保護的な効果をもたらすことが報告されている。今回、「AST-120 は、CKD における骨格筋ミトコンドリア機能を改善し運動能力の低下を抑制する」という仮説を立てて本研究を立案した。AST-120 の投与が、心機能や耐糖能、貧血、RAS に影響を与えている可能性も考え、これらについても併せて検討を行った。

【材料と方法】 雄性 C57BL/6J マウスに腎全摘出 (5/6 腎摘出) を行い、CKD モデルを作成した。また副腎剥離、尿管剥離のみ行い、腎を摘出しない偽手術 (Sham 手術) も同様に行った。腎全摘術と Sham 手術を行ったマウスを、手術後より 8%(w/w) の AST-120 混餌群と AST-120 非混餌群に分け、Sham 群、Sham+AST-120 群、CKD 群、CKD+AST-120 群の 4 群で検討した。腎全摘 18~20 週後 (28~30 週齢) にて、トレッドミルテストによる運動能力評価、糖負荷・インスリン負荷によるインスリン抵抗性評価、心エコー検査、血液生化学検査、骨格筋の病理組織学的検討、骨格筋酸化ストレスとして superoxide の測定、骨格筋ミトコンドリア機能評価を行った。また培養骨格筋細胞にインドキシル硫酸 (0-1000 μ M) を 24 時間暴露し、NAD(P)H oxidase の活性及び NAD(P)H oxidase サブユニットの遺伝子発現の解析を行った。

【結果】 体重、血圧、骨格筋重量、心重量及び心機能は、4 群間で有意差を認めなかった。尿素窒素で評価した腎機能は、腎全摘出群 (CKD, CKD+AST-120) において Sham 群と比較し、有意に増加しており、既報と同程度の腎不全が誘導されていることを確認した。血

漿インドキシル硫酸値は、Sham 群に比べ CKD 群で有意に上昇し (0.21 ± 0.03 vs. 1.05 ± 0.11 mg/dL, $P < 0.05$), AST-120 の投与で有意に抑制された (0.41 ± 0.06 mg/dL, $P < 0.05$). トレッドミルテストにおける運動開始から疲労困憊に至るまでの走行距離は、Sham 群に比較し、CKD 群で有意に減少し (427 ± 36 vs. 267 ± 17 m, $P < 0.05$), AST-120 投与にて有意に改善した (407 ± 38 m, $P < 0.05$). 糖負荷・インスリン負荷試験への反応は、各群間で差異は認めなかった. また HE 染色にて評価した骨格筋横断面積及び CD31 免疫染色にて評価した毛細血管密度に関しても 4 群間で有意差を認めなかった. 骨格筋における RAS の評価として骨格筋の AT1R, Gαq のタンパク発現を免疫プロット法で検討したが、両者とも各群間で有意差は認めなかった. ミトコンドリアの機能の指標である CS 活性は、骨格筋組織からの抽出液を用いた測定において、CKD 群で有意に低下し、AST-120 の投与により有意に改善が得られた. 一方、骨格筋よりミトコンドリアを単離した抽出液で測定した CS 活性では、全ての群間で差を認めなかった. ミトコンドリアの生合成をつかさどる PGC-1α の遺伝子発現は、CKD 群で有意に低下し、AST-120 の投与により有意に改善が得られた. また骨格筋における superoxide 産生は Sham 群に比較し、CKD 群で有意に増加し、AST-120 投与により有意に抑制された. 培養骨格筋細胞を用いた検討においては、インドキシル硫酸は濃度依存性に NAD(P)H oxidase 活性と NAD(P)H oxidase のサブユニットの遺伝子 (p22^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox}, Rac1) を有意に増加させた. またインドキシル硫酸は、PGC-1α の遺伝子発現を抑制した.

【考察】本研究において CKD マウスでは、心機能、ヘモグロビン濃度、骨格筋量、骨格筋毛細血管密度に依存せずに運動能力の低下を呈した. CKD マウスは血漿インドキシル硫酸の上昇を示し、骨格筋の酸化ストレス産生の亢進とミトコンドリア機能障害を呈した. 本研究の重要な所見として、インドキシル硫酸産生抑制薬である AST-120 を CKD マウスに投与することで、骨格筋における酸化ストレスを減じ、ミトコンドリア機能を改善し、運動能力の低下を阻止したことが挙げられる. AST-120 は、CKD の誘導で低下した骨格筋の CS 活性と PGC-1α の遺伝子発現を改善させており、AST-120 は CKD における骨格筋でのミトコンドリア生合成を改善する効果を有するものと考えられる. 以前、我々は 2 型糖尿病マウスモデルにおいて、骨格筋の酸化ストレスが、ミトコンドリア機能障害を生じ、運動能力低下に関与していることを報告している. 本研究において、酸化ストレスの代表的な指標である superoxide 産生は、CKD マウスの骨格筋で増加しており、AST-120 の投与はその増加を抑制した. また本研究の培養骨格筋細胞を用いた検討において、CKD 患者に相当するインドキシル硫酸の添加で、PGC-1α の遺伝子発現が抑制された. これらの結果より、インドキシル硫酸が骨格筋において酸化ストレスを誘導し、ミトコンドリア障害に関与していることが示唆された. さらに培養骨格筋細胞を用いた検討において、インドキシル硫酸が酸化ストレスを誘導する機序として、NAD(P)H oxidase の関与が確認され、インドキシル硫酸が CKD における運動能力低下・ミトコンドリア機能障害に深く関与していることが示唆された.

【結論】本研究では AST-120 による薬物療法が、CKD モデルマウスにおける運動能力の低下を有意に改善することを示した. AST-120 は、CKD における骨格筋機能異常や運動能力の低下に対して有効な治療薬になりうると考えられる.