



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Exercise capacity in chronic kidney disease [an abstract of entire text]
Author(s)	西川, 幹人
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号 : 2161 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11679号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58941
Type	doctoral thesis
File Information	Mikito_Nishikawa_summary.pdf



学位論文（要約）

Exercise capacity in chronic kidney disease

（慢性腎臓病における運動能力）

2015 年 3 月

北海道大学

西川 幹人

1. 緒言

慢性腎臓病（Chronic kidney disease ; CKD）は、全人口の 10%近くを占める頻度の高い疾患であり、早期発見とその管理の重要性が広く認識されつつある。CKD 患者においては、その病初期より運動能力の低下が認められ、CKD の進行に伴い増悪する。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 (QOL) 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の一つである。CKD 患者の骨格筋機能を改善し、運動能力を改善する方法として運動療法が有用であるが、車いすや寝たきりの患者など運動療法の施行自体が困難なケースも少なくない。そのため CKD 患者における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。

運動能力は、心機能や血流、骨格筋を含む複数の因子によって規定される。CKD に伴う運動能力低下の原因としては、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活性化並びに身体的不活動自体による骨格筋萎縮などが報告されている。また近年、CKD を有する患者や CKD 動物モデルにおいて、骨格筋のミトコンドリア機能が障害されていることも報告された。CKD においては、インドキシル硫酸（Indoxyl sulfate ; IS）に代表される様々な尿毒素が蓄積しており、骨格筋ミトコンドリア障害や骨格筋萎縮を生じ、その運動能力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。

IS はトリプトファン由来のインドールが腸管で吸収された後に、肝臓で酸化硫酸抱合を受け生成される。CKD においては、腎臓からの IS の排泄が障害されるため、血中濃度が上昇し、組織において活性酸素種増加による酸化ストレス (ROS) を誘導することにより臓器障害をもたらす。IS が ROS を誘導する経路としては、腎臓のメサングウム細胞や血管内皮細胞、血管平滑筋細胞などにおいて NAD(P)H oxidase (Nox) を介することが報告されている。そのため IS は腎機能を増悪させるのみならず、近年、ROS を介して心筋障害や動脈硬化などの心血管病にも関わり、生命予後悪化につながる事が明らかとされた。一方、経口吸着薬である AST-120（クレメジン®）は腸管において、トリプトファンから変換されたインドールに結合し、腸管吸収を抑制し、腎不全における IS の血中濃度を低下させる。

AST-120 は、IS で誘導された ROS の増加を軽減し、腎臓のみならず心臓・血管においても臓器保護効果を示すことが報告されているが、骨格筋に対する効果はこれまで検討されていない。そこで「AST-120 は、CKD における骨格筋ミトコ

ンドリア機能や骨格筋萎縮を改善し運動能力低下を抑制する」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、レニン・アンジオテンシン系に影響を与えている可能性もあり、これらに関しても併せて検討を行った。また IS の骨格筋細胞への直接的な作用を検討するため、培養骨格筋細胞を用いた実験を行った。

2. 方法

雄性 C57BL/6J マウスに腎下垂全摘出 (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。腎下垂全摘術と 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。腎下垂全摘 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として CS 活性・ミトコンドリア電子伝達系複合体活性の測定を行った。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 サブユニットの遺伝子発現及び NAD(P)H oxidase の活性に関して検討した。

3. 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、腎下垂全摘出群 (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。骨格筋におけるレニン・アンジオテンシン系の評価として骨格筋の AT1R, Gαq のタンパク発現を免疫ブ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・電子伝達系複合体活性に関しては、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-1 α 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 NAD(P)H oxidase のサブユニットの遺伝子発現と NAD(P)H oxidase 活性を有意に増加させた。またインドキシル硫酸は、PGC-1 α の遺伝子発現を抑制した。

4. 考察

CKD 患者における運動能力の低下は、その病初期より認められ、予後悪化と関連する。本研究において、CKD マウスは、血漿インドキシル硫酸の上昇を示し、運動能力の低下を呈した。また CKD マウスの骨格筋において、ミトコンドリア機能の障害と酸化ストレスの亢進を認めた。本研究における重要な知見として、IS 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することができたことが挙げられる。さらに培養骨格筋細胞を用いた検討において、IS 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、IS 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。

・CKD における運動能力と骨格筋ミトコンドリア

運動能力は、心機能、血中ヘモグロビン濃度、骨格筋量、骨格筋毛細血管血流に加え骨格筋ミトコンドリアを含む複数の因子によって規定される。本研究の結果より、AST-120 による CKD マウスの運動能力の改善効果は、心機能、ヘモグロビン濃度、骨格筋量、骨格筋毛細血管血流に依存せず、骨格筋におけるミトコンドリア生合成の改善に由来することが明らかとなった。CS 活性は、ミトコンドリアの量・機能を反映する代表的な指標であり、CKD 患者や CKD 動物モデルにおいて骨格筋の CS 活性が低下していることが報告されている。本研究においても、CKD の誘導により骨格筋細胞全体での CS 活性の低下を認め、AST-120 の投与により CS 活性の低下が抑制された。しかし単離したミトコンドリアでの CS 活性に関しては 4 群間に有意差が無く、また複合体活性 (I~IV) についても、4 群間での有意差は認めなかった。一方で、ミトコンドリア生合成をつかさどる PGC-1 α の骨格筋における遺伝子発現は、CKD で低下を認め、AST-120 の投与により改善を認めた。これらの結果は、AST-120 の投与が、CKD で低下した骨格筋ミトコンドリア生合成の改善

を介し、ミトコンドリア量の減少を抑制することにより、運動能力の改善に寄与したことを示唆している。

・酸化ストレスと NAD(P)H oxidase, 及びミトコンドリアとの関連

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た. 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 C2C12 細胞を用いた検討において, CKD 患者に相当する IS の添加で, PGC-1 α の遺伝子発現が抑制された. これらの結果より, IS 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. 腎臓のメサングウム細胞や, 血管内皮細胞において IS は, NAD(P)H oxidase を介して酸化ストレスを誘導していることが報告されている. NAD(P)H oxidase は細胞質構成要素および細胞膜構成要素からなり, 様々な刺激で細胞質構成要素が細胞膜へ移動し, 細胞膜構成要素と複合体を形成することによって活性化される. C2C12 細胞における IS の添加培養にて, IS は NAD(P)H oxidase のサブユニットの遺伝子発現と NAD(P)H oxidase の活性を増加させた. よって IS が, 酸化ストレスを誘導する経路の一つとして NAD(P)H oxidase を介していると考えられる.

5. 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.