HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Exercise capacity in chronic kidney disease
Author(s)	西川, 幹人
Description	配架番号：2161
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11679号
Issue Date	2015-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11679
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59718
Type	doctoral thesis
File Information	Mikito_Nishikawa.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

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

学位論文

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

目次

発表論文目録および学会発表目録 1

1. 緒言 2

2. 本研究で使用する略語と記号 6

3. 実験方法 7

3.1 実験 1. CKD モデルマウスの運動能力とミトコンドリア機能, 及び AST-120 の効果の検討 7

3.1.1 実験デザイン 7

3.1.2 血圧測定 8

3.1.3 血液生化学検査 8

3.1.4 運動能力テスト 9

3.1.5 自発的身体活動度の測定 10

3.1.6 運動前後での乳酸値 10

3.1.7 心エコー検査 10

3.1.8 糖負荷試験，インスリン負荷試験 10

3.1.9 免疫ブロット法 11

3.1.10 骨格筋における組織学的な検討，免疫組織化学染色 15

3.1.11 骨格筋クエン酸合成酵素（Citrate synthase：CS）活性 15

3.1.12 骨格筋ミトコンドリアの単離 16

3.1.13 ミトコンドリア電子伝達系複合体活性 16

3.1.14 骨格筋 superoxide 産生量 17

3.1.15 定量的 RT-PCR 法 18

3.2 実験 2. 培養骨格筋細胞における IS の影響の検討 21

3.2.1 培養細胞の実験デザイン 21

3.2.2 培養骨格筋細胞における NAD(P)H oxidase 活性 21

3.2.3 培養骨格筋細胞における NAD(P)H oxidase サブユニット，PGC-1α の遺伝子発現 21

3.3 統計学的解析 22

4. 実験結果.....23

4.1 実験1. CKDモデルマウスの運動能力とミトコンドリア機能, 及びAST-120の効果の検討.....23

4.1.1 動物特性.....23

4.1.2 血漿インドキシル硫酸（IS）値.....25

4.1.3 運動能力および身体活動度.....26

4.1.4 心エコー検査.....27

4.1.5 糖代謝.....28

4.1.6 血中及び骨格筋のレニン・アンジオテンシン系（RAS）.....29

4.1.7 骨格筋横断面積と毛細血管密度の評価.....30

4.1.8 骨格筋ミトコンドリア機能.....31

4.1.9 骨格筋 Superoxide.....32

4.2 実験 2. 培養骨格筋細胞（C2C12 細胞）における IS の影響の検討.....33

4.2.1 培養細胞における IS の NAD(P)H oxidase への影響.....33

4.2.2 培養細胞における IS のミトコンドリア生合成への影響.....34

5. 考察.....35

6. 総括および結論.....39

謝辞.....40

引用文献.....41

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である.

1) Mikito Nishikawa, Naoki Ishimori, Shingo Takada, Akimichi Saito, Tomoyasu Kadoguchi, Takaaki Furihata, Arata Fukushima, Shouji Matsushima, Takashi Yokota, Shintaro Kinugawa, Hiroyuki Tsutsui. AST-120 Ameliorates Lowered Exercise Capacity and Mitochondrial Dysfunction in the Skeletal Muscle from Mice with Chronic Kidney Disease via Reducing Oxidative Stress. Nephrology Dialysis Transplantation.

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1) Mikito Nishikawa, Naoki Ishimori, Shingo Takada, Akimichi Saito, Tomoyasu Kadoguchi, Takaaki Furihata, Arata Fukushima, Shouji Matsushima, Takashi Yokota, Shintaro Kinugawa, Hiroyuki Tsutsui. AST-120 Ameliorates Lowered Exercise Capacity and Mitochondrial Dysfunction of the Skeletal Muscle in Mice with Chronic Kidney Disease via Reducing Oxidative Stress. 87th Scientific Sessions of American Heart Association, Nov 17, 2014, Chicago, USA.

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 [1]．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 [2, 3]．Reese らは，歩行速度・筋力・疲労度などの運動能力の指標を，Frailty（骨格筋の脆弱性）として定義し，腎機能の悪化に伴い骨格筋の Frailty が増強することを示した（**図 1-1**）[3]．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 [4, 5]．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 [6, 7]．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．

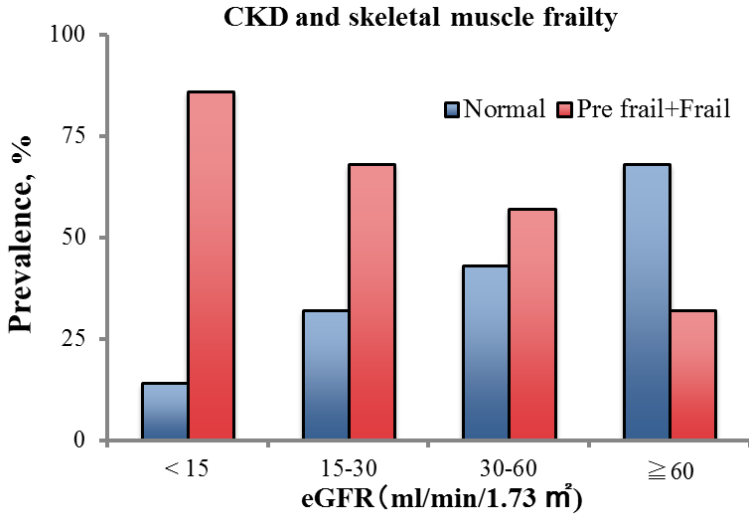

図 1-1. CKD 患者における腎機能と骨格筋の脆弱性（文献 3 より引用・改変）

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[8]．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[9-13]．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[14-16]．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（**図 1-2**）[17]．

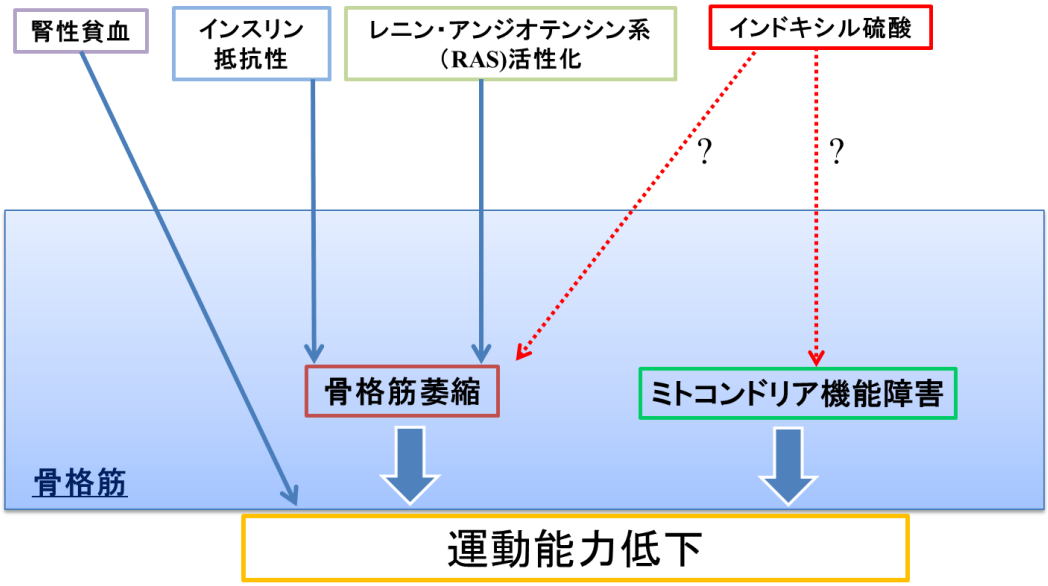

図 1-2. CKD における運動能力低下の原因

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 [18]．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 [19, 20]．IS が ROS を誘導する経路としては，腎臓のメサンギ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 [21-23]．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ことが明らかとされた [24]．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（**図 1-3**）[18]．

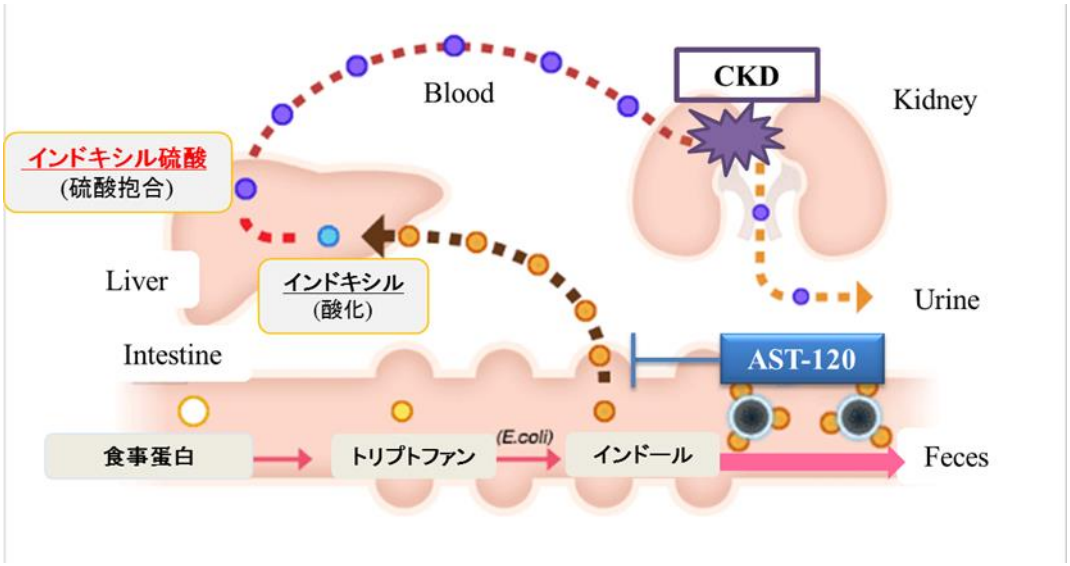

図 1-3. インドキシル硫酸と AST-120（文献 18 より引用・改変）

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 [19, 25, 26]，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（**図 1-4**）．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．

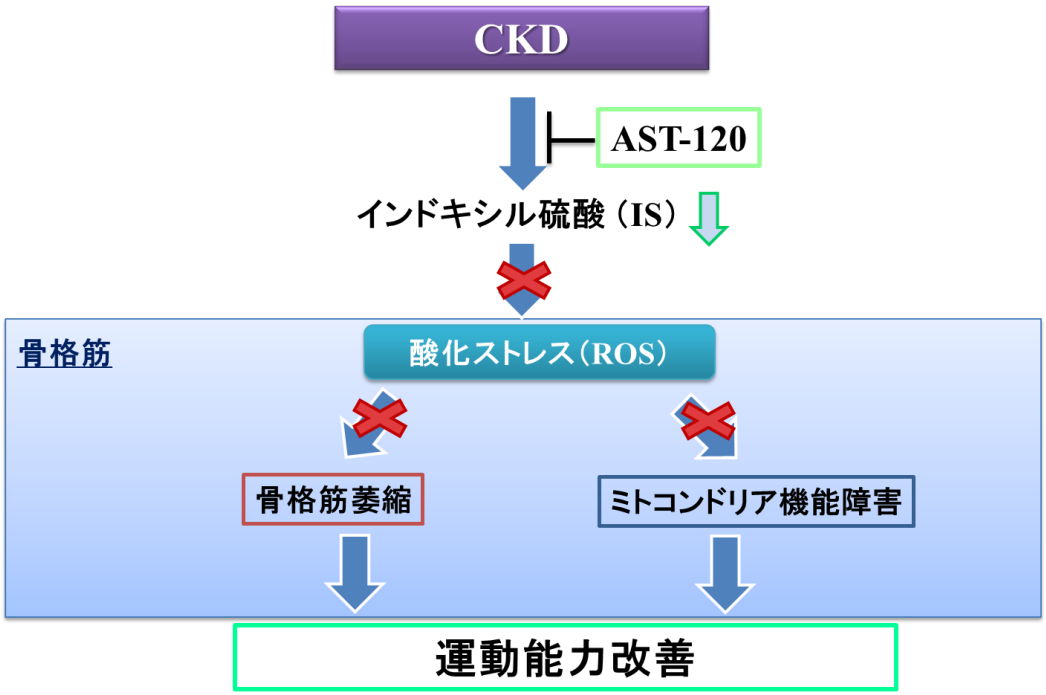

図 1-4. 本研究の仮説

2. 本研究で使用する略語と記号

AT1R：Angiotensin II type 1 receptor；アンジオテンシン受容体タイプ I
AUC：Area under the curve；曲線下面積
BCA：Bicinchoninic acid；ビシンコニン酸
BSA：Bovine Serum Albumin；牛血清アルブミン
CKD：Chronic kidney disease；慢性腎臓病
CS：Citrate synthase；クエン酸合成酵素
CSA：Cross-sectional area；横断面積
ETC：Electron transport chain：電子伝達系
GAPDH：Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase；グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素
HE：Hematoxylin and eosin；ヘマトキシリン・エオシン
HRP：Horseradish peroxidase；西洋ワサビペルオキシダーゼ
IS：Indoxyl sulfate；インドキシル硫酸
NEFA：Nonesterified fatty acid；遊離脂肪酸
PBS：Phosphate buffered saline；リン酸緩衝生理食塩水
PGC-1α：Peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1α；ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体–γ 共活性化剤 1−α
QOL：Quality of life；生活の質
RAS：Renin-angiotensin system ；レニン・アンジオテンシン系
ROS：Reactive oxygen species; 活性酸素種
SD：Standard diet；標準食

3. 実験方法

全ての動物実験手技並びに飼育保管は,「北海道大学動物実験に関する規程」,「北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規程」に沿って実施した.

3.1 実験 1. CKD モデルマウスの運動能力とミトコンドリア機能，及び AST-120 の効果の検討

3.1.1 実験デザイン

雄性 C57BL/6J マウスを，粉末標準食（Standard Diet；SD）にて飼育．既報を参考に 8 週齢で，麻酔下で背部より切開し右腎臓を露出し，上極 1/3 および下極 1/3 にて結紮の後，右腎臓を亜全摘し，10 週齢で左腎臓を露出・腎動静脈及び尿管を結紮の後に左腎臓を全摘出する腎亜全摘出（CKD）モデルを作成した[27]．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．11 週齢で，腎亜全摘術と Sham 手術を行ったマウスを，8%(w/w) の AST-120 混餌群と AST-120 非混餌群の 4 群, すなわち①Sham (n=12), ②Sham+AST-120 (n=12), ③CKD（n=12），④CKD+AST-120（n=12）に分けて検討した．AST-120 の投与量は既報を参考とした[25,28]．腎亜全摘 18～20 週後（28～30 週齢）で，心エコー検査，トレッドミルテストによる運動能力の評価後，麻酔下に採血後，屠殺し，組織重量測定，骨格筋組織採取を行った.

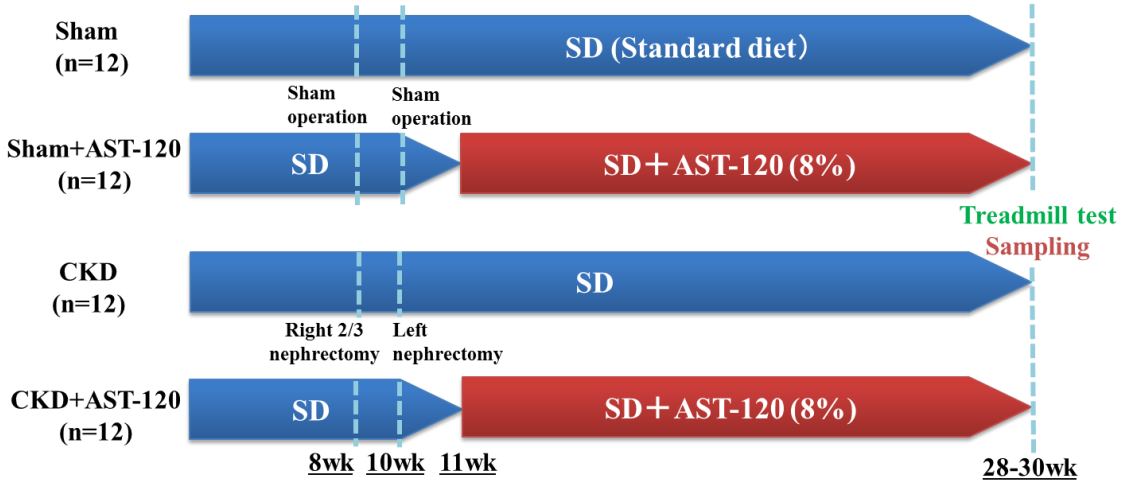

図 3-1. 実験プロトコール

麻酔

手術時・屠殺時の麻酔には，塩酸メデトミジン 0.15 mg/kg 体重，ミダゾラム 2 mg/kg 体重，酒石酸ブトルファノール 2.5 mg/kg 体重を用い，これを腹腔内注射し十分な麻酔深度になったことを確認した後に処置を開始した.

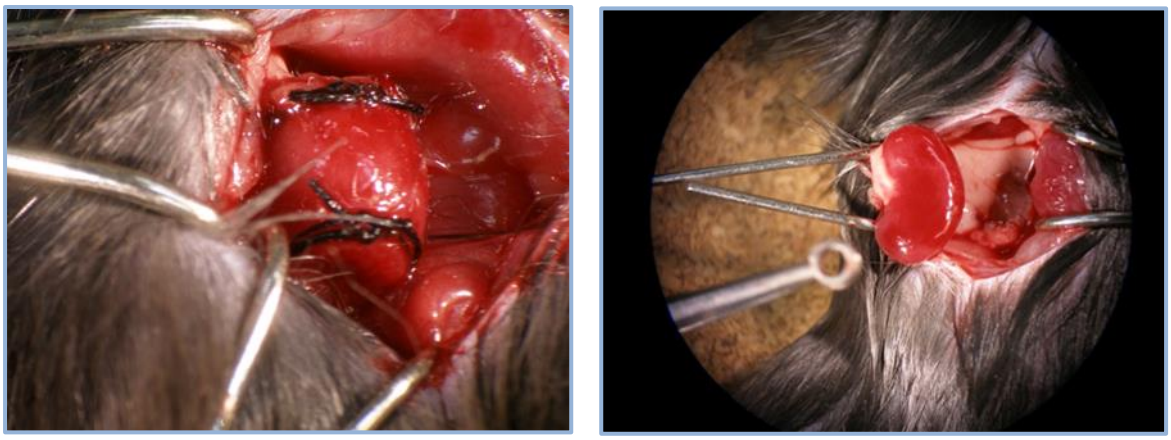

図 3-2. 右腎亜全摘（左図）および左腎全摘出（右図）の代表的写真

3.1.2 血圧測定

覚醒下で非観血的 tail-cuff システム（BP-98A, Softron, Tokyo, Japan）を用いて，収縮期血圧，心拍数を測定した.

3.1.3 血液生化学検査

屠殺時に下大静脈穿刺により採血を行い，血漿中の尿素窒素，総コレステロール，中性脂肪，遊離（非エステル型）脂肪酸，アンジオテンシン II，インドキシル硫酸，及び全血中のヘモグロビン濃度の測定を行った．総コレステロール（コレステロール E-テスト），中性脂肪（トリグリセライド E-テスト），遊離（非エステル型）脂肪酸（NEFA C-テスト），ヘモグロビン（ヘモグロビン B-テスト）は，いずれも各アッセイキット（Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan）を用いて測定した．アンジオテンシン II は，EIA キット（Peninsula Laboratories, Inc., San Carlos, CA, USA）によって測定した．血漿インドキシル硫酸値は，クレハ株式会社に測定を依頼し，高速液体クロマトグラフィー法による定量分析を行った.

3.1.4　運動能力テスト

運動能力は小動物用トレッドミル（Oxymax system 2, Columbus Instruments, Columbus, OH, USA）を用いた漸増負荷運動にて持久能力評価を行った（**図 3-3**）. まず, トレッドミル上にマウスを置き 10 分間の安静の後, トレッドミル傾斜角度を 0 度として速度 6 m/min でウォーミングアップ運動を開始した. 10 分後, トレッドミルの傾斜角度を 10 度として 2 分毎に 2 m/min ずつ速度を漸増した. 漸増負荷運動中にマウスが途中で休まないようにトレッドミル後方に位置するショッカープレートで電気刺激を与えた. その際, 最大の電気刺激を与えても 10 秒以上電気刺激板から動かなくなった時点をマウスが「疲労困憊」に至ったと定義して測定を終了した. 持久能力の指標として, 走行時間と速度の積から走行距離を算出した. また, マウスの体重を考慮した垂直方向の仕事量（＝ 体重 × 重力加速度 × 垂直方向の走行距離）を算出した.

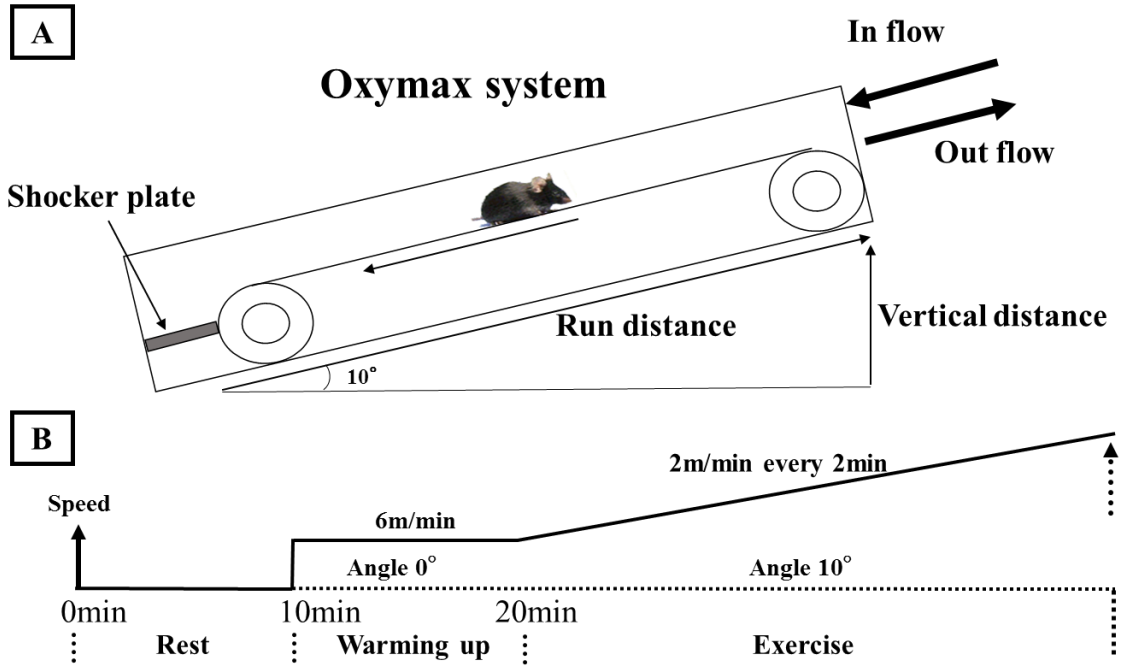

図 3-3. 小動物用トレッドミル（A）と運動プロトコール（B）

3.1.5　自発的身体活動度の測定

自発的身体活動度の測定は, 自発運動量測定装置（Actimo System, Shintechno, Fukuoka, Japan）を用いて測定した．同システムは壁面に 2 cm 間隔で赤外線センサーを有し，それぞれのセンサーは 0.5 秒に 1 回動物の移動を記録し，連続 2 光軸遮蔽を 1 カウントとした．それぞれのマウスは，測定環境へ慣れさせるために，3 時間以上装置内のケージにて安静にされ，その後に測定を開始した．各群 8 匹ずつ測定した.

3.1.6　運動前後での乳酸値

運動前，運動能力テスト実施直後に尾静脈から採血を行い，Lactate Pro（Arkray, Kyoto, Japan）を用いて血中乳酸濃度を測定した.

3.1.7　心エコー検査

心エコー検査は，短時間作用型であり心抑制の少ない麻酔下（2.5%トリブロモエタノール（以下 アバーチン）8 μL/体重 g，腹腔内投与）にて行った．2D 胸骨傍短軸像の乳頭筋レベルで観察し, 最良な像が描出されるレベルで M モードへ切り替え，記録紙スピード 50 mm/sec で記録の上，左室内径，壁厚，左室内径短縮率を計測した.

3.1.8　糖負荷試験，インスリン負荷試験

マウスを 6 時間の絶食後，覚醒下にグルコース（1 mg/g body weight）を腹腔内投与．負荷前および 15, 30, 60, 90, 120 分後に尾静脈より血液を採取しグルテストセンサー（Glutest Ace, Sanwa Kagaku Kenkyusho, Nagoya, Japan）を用いて血糖値を測定した. また同様に 6 時間絶食後, ヒトインスリン（0.50 IU/kg, Humulin R, Eli Lilly, Japan）を腹腔内投与し投与前および 15, 30, 45, 60, 90, 120 分後に血糖値を測定した. 糖負荷，インスリン負荷に対する血糖反応性はそれぞれの群で得られた血糖反応曲線下面積（area under the curve；AUC）を Sham 群との比として算出した.

3.1.9　免疫ブロット法

麻酔下に，両下肢骨格筋を迅速に摘出し液体窒素で凍結し-80℃で保存した．骨格筋からのタンパク抽出，電気泳動，および免疫ブロットを以下の手順で行った．

蛋白抽出

1) 凍結保存した骨格筋サンプルを氷上で解凍した．
2) ホモジナイズ用と保存用の1.5 mLエッペンドルフチューブをそれぞれサンプル数分用意した．
3) x 10 Cell Lysis Buffer*[1]（Cell Signaling, Danvers, MA, USA）を蒸留水で10倍希釈し，99.5%エタノール（Wako, Japan）で希釈した1 mM Phenylmethanesulfonyl fluoride（PMSF, Sigma-Aldrich, USA）および1錠complete Mini（Roche, Indianapolis, IN, USA）を添加した後，ホモジナイズ用のエッペンチューブにそれぞれ250 µl入れた．

   *1 1 x Cell Lysis Buffer の組成: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na_2EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β-glycerophosphate, 1 mM Na_3VO_4, 1 µg/mL leupeptin

4) 解凍した骨格筋サンプルを30 mgに切り揃え，氷上でホモジナイザーを用い，サンプルをホモジナイズした．
5) ホモジナイズしたサンプルを遠心分離し（15000 rpm×20分），ペレットを拾わないように上清を新しいエッペンドルフチューブに移した．長期保存する場合は，-80℃で冷凍保存した．

蛋白濃度測定

抽出したサンプル蛋白の濃度測定は，以下の手順の通り，ビシンコニン酸（Bicinchoninic acid：BCA）法にて測定を行った.

1) 96 穴プレートを準備した.
2) GREINER 96-Well CELLSTAR® Cell Culture Plates sterile, F-bottom（Greiner bio-one, Monroe, NC, USA）に 6000 μL の BCA™ Protein Assay Reagent A と 120 μL の BCA™ Protein Assay Reagent B（Thermo Scientific, Meridian Rd, Rockford, USA）を混合し，混合液を各ウェルに 200 μL ずつ分注した.
3) ブランクとして 1 穴空白を置き，2 mg/mL Bovine Serum Albumin （BSA） Standards（Thermo Scientific）をスタンダードとして 2, 4, 8, 16, 32 μL ずつウェル注入し，次のウェルから 2 μL ずつ，測定するサンプルを注入した.
4) 37℃で 30 分反応させた.
5) プレートリーダー（ImmunoMini NJ-2300）で 540 nm 波長の吸光度を計測した.
6) スタンダードの吸光度から得られる検量線を元にして，サンプル蛋白濃度を算出した.
7) 50 μg の等量の蛋白を用いて以下の手順通り, 電気泳動・免疫ブロットを行った.

サンプルの調整

1) サンプルと等量の 2×サンプルバッファー（Sodium dodecylsulfate：SDS）と還元剤 2-Mercaptoetanol）を加え，ボルテックスを行った.
2) MULTI HEATER TYPE MH-36（WAKAMORI CO., LTD. Tokyo）にて 100℃で 3 分間加温した.
3) 短時間遠心してエッペンドルフの蓋に付着した水滴を落とし，ボルテックスミキサーで撹拌した.

電気泳動

1) AnykD ミニプロティアン TGX ゲル（BIO-RAD，Hercules，CA）からシリコンチューブとコームを外し，泳動槽にセットした.
2) 泳動槽のに泳動バッファー*[2] を注入した.
3) 10 µL のサンプルをピペットマンで各ウェルに注入し，必要に応じて分子量マーカーである SDS-PAGE 用マーカー（Cruz Marker Molecular Weight Standards, Santa Cruz Biotechnology），カラーマーカー（Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range, BIO-RAD）を注入した.
4) POWER PAC 300（BIO-RAD）にて 40 mA/ゲル（定電流）で 60 分間泳動した.
5) サンプルがゲルの先端まで移動したのを確認の上，電流を止め，泳動バッファーを廃棄後にゲル板を外した.

*[2] 泳動バッファーの組成：3.03 g Tris, 14.4 g Glycine, 1 g SDS, 81.57 mL 蒸留水

免疫ブロット

1) ゲルを PVDF メンブレンである Trans-Blot Turbo™（BIO-RAD）の上に乗せた.
2) Trans-Blot Turbo™ Transfer System（BIO-RAD）によって，7 分間でゲルからメンブレンにタンパクを転写した.
3) 電源を切り，メンブレンを外した.
4) メンブレンを 0.1% Tween-TBS*[3] で振盪した.
5) 3% BSA*[4] にてブロッキング処理した.
6) 0.1% Tween-TBS にて振盪（10 分間×3 回）した.
7) 1 次抗体（3% BSA で希釈）を 4℃で一晩反応させた.
8) 0.1% Tween-TBS にて振盪（10 分間×3 回）した.
9) 2 次抗体（Tween-TBS で希釈）を 1 時間反応させた.
10) 0.1% Tween-TBS にて振盪（10 分間×3 回）した.

*[3] 0.1% Tween TBS の組成：5 mL 10% Tween, 50 mL x 10 TBS, 445 mL 蒸留水

*[4] 3%BSA の組成：0.6 g BSA, 20 mL 0.1% Tween TBS

リブロット

1) x 10 Re-Blot Plus Strong Solution（MILLPORE, California, CA）を蒸留水で希釈し，メンブレンを室温で 15 分間振盪させた.
2) 0.1%Tween-TBS で 2 回洗浄し，3% BSA でブロッキング処理した.
3) その後の過程は前項：免疫ブロットの 7) 以下と同様に施行した.

現像，解析

ECL Western Blottting Analysis System（Amercham Pharmacia, Biotech, Bucks, UK）を用い化学発光法で標識した後，ChemiDoc XRS system（BIORAD Laboratories） で検出し可視化されたバンドを画像解析ソフト Image J（National Institutes of Health, Bethesda, MD）を用いて集積光濃度を定量して解析した．内部コントロールとして抗 GAPDH 抗体を用いて目的タンパクの発現量を標準化した.

レニン・アンジオテンシン系（RAS）に関わる蛋白の測定

1 次抗体には Gαq protein（Cell Signaling, Danvers, MA, USA）および AT1R（Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA）を用い, 2 次抗体には horseradish peroxidase（HRP）標識抗ウサギ免疫グロブリン抗体（Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA）を用い，ECL キット（GE healthcare, Buckinghamshire, England）にて発光させ，シグナルを検出した．GAPDH の測定は，同じメンブレンに前述のリブロット処理を行い，一次抗体に Rabbit anti-mouset GAPDH（1:3000, Cell Signaling Technology）を使用して行った.

3.1.10　骨格筋における組織学的な検討，免疫組織化学染色

麻酔後，直ちに腓腹筋およびヒラメ筋を摘出し，液体窒素で冷却したイソペンタンによって瞬間凍結した．その後，クリオスタットを用いて，筋腹部より，厚さ 8 μm の連続横断切片を作成した．HE（hematoxylin and eosin）染色は凍結切片を風乾させ，アセトンとエタノールの等量混合溶液に 3 分間浸透させた．その後，3 分間 ddH_2O にて洗浄し，ヘマトキシリン溶液に 2 分間浸透させた．ddH_2O にて 2 分間洗浄し，0.5%HCl + 70%アルコール溶液に浸透させた．ddH_2O にて 1 分間洗浄後，0.5%HCl + 70%アルコール溶液，エオジン溶液，100%エタノール，キシレンの順に浸透させ，透徹した．HE 染色を施したサンプルより，画像処理ソフト（Image J）を用いて各筋細胞の平均横断面積を算出した．各個体の筋線維横断面積の測定サンプル数は，全ての筋線維から無作為に一横断面積あたり 50 個以上とした．なお，小径線維は横断面積の計測から除外した．CD31 の免疫染色は，4℃にて，4%PFA で 7 分間固定後，PBS で洗浄し，1%過酸化水素メタノールを添加し，室温で 30 分間静置された．再度洗浄後，50 倍希釈した一次抗体 CD31（Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark）にて 4℃で一晩反応させた．PBS で洗浄後，二次抗体である Envision を添加し，室温下で 30 分間静置後，DAB（DAB 基質キット，Dako）にて発色させ，ヘマトキシリンで核染色し，脱水，透徹，封入された．各個体の CD31 陽性細胞数は，無作為に視野を選択し，3 視野中の CD31 陽性細胞数の平均値として算出した．

3.1.11　骨格筋クエン酸合成酵素（Citrate synthase：CS）活性

骨格筋標本を phosphate buffer（20 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4, 5 mM β-mercaptoethanol, 0.5 mM EDTA, pH 7.4）を用いてホモジネートし，800 *g* で 10 分間遠心分離を行った後，上澄み溶液を採取した．上澄み溶液のタンパク量は，BSA をスタンダードとした BCA 法で測定した後，phosphate buffer にて 1 mg/mL に調整し，酵素活性の酵素溶液として使用した．CS 活性は，先行研究を参照し，分光光度計（SmartSpec 3000 spectrophotometer, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA）を用いて測定した．30 μL タンパク溶液に反応溶液として 3.33 mM K_2HPO_4，0.1 mM DTNB および 0.1 mM actyl-CoA を含む 100 mM Tris-HCl buffer（pH 8.0）加えた後，0.5 mM oxaloacetate を添加し，412 nm における吸光度の変化を 3 分間にわたって測定した．酵素活性は，分光光度計から得られた吸光度の変化をタンパク量によって補正することによって活性量を算出した．同じく，後述する骨格筋より単離したミトコンドリアの CS 活性に関しても，上記方法を用い測定を行った．

3.1.12　骨格筋ミトコンドリアの単離

麻酔下で両下肢の骨格筋を摘出し，リン酸緩衝生理食塩水下で血液および結合組織を除去して使用時まで－80℃にて凍結保存した. 骨格筋標本（約 500～800 mg）を細分化し，単離用 buffer（10 mmol/L HEPES, 150 mmol/L Sucrose, 0.5 mmol/L EDTA-2Na, 0.5 mmol/L EGTA-K, 1 mg/mL bovine serum albumin, 1 mL/L Protease Inhibitor Cocktail, pH 7.4）内にてホモジナイズした．そのホモジネートを 800 *g* で 10 分間遠心分離した後，上澄み液を採取した．次に得られた上澄み液を 10000 *g* で 10 分間遠心分離を行い，ミトコンドリアペレット分画を獲得した．ミトコンドリアペレット分画を同 buffer で回収し，ミトコンドリアタンパク分画を得た．ミトコンドリアタンパク濃度は，BSA をスタンダードとする BCA 法で測定した．得られたタンパク濃度に基づきミトコンドリア溶液は，1 mg/mL に調整して使用時まで-80℃にて凍結保存した.

3.1.13　ミトコンドリア電子伝達系複合体活性

ミトコンドリア電子伝達系の複合体 I（NADH - ユビキノン還元酵素），複合体 II（コハク酸 - ユビキノン還元酵素），複合体 III（ユビキノール - シトクローム C 還元酵素）および複合体 IV（シトクローム C 酸化酵素）の活性は分光光度計を用いて測定した．複合体 I 活性は，40 μg ミトコンドリアタンパク溶液に反応溶液として 1 mM EDTA, 250 mM sucrose, 0.01 mMdecyl-ubiquinone および 2 mM KCN を含む 50 mM Tris-HCl buffer（pH 7.4）を加えた後，5 mM NADH を添加して反応を開始させた．反応開始後，3 分間にわたって 340 nm にて吸光度の変化を測定した．複合体 II 活性は, 20 μg ミトコンドリアタンパク溶液に反応溶液として 1 mM EDTA, 20mM succinate, 2 μg/mL rotenone, 2 μg/mL antimycin A, 2 mM KCN および 0.05 mM DCPIP を含む 50 mM potassium phosphate（K_2HPO_4/KH_2PO_4）buffer（pH 7.4）を加えた後，0.05 mM decyl-ubiquinone を添加して反応を開始させた．反応開始後，3 分間にわたって 600 nm にて吸光度の変化を測定した．複合体 III 活性は，30 μg ミトコンドリアタンパク溶液に反応溶液として 1 mM EDTA, 250 mM sucrose, 2 mM KCN および 0.05 mM cytocrome C を含む 50 mM Tris-HCl buffer（pH 7.4）加えた後，0.05 mM DBH_2 を添加して反応を開始させた．反応開始後，3 分間にわたって 550 nm にて吸光度の変化を測定した．複合体 IV 活性は，30 μg ミトコンドリアタンパク溶液に反応溶液として 0.02 mM 還元型 cytochrome C を添加した後，直ちに 1 分間にわたって 550 nm にて吸光度の変化を測定した．これらのミトコンドリア電子伝達系における複合体活性量は，分光光度計（SmartSpec 3000 spectrophotometer, Bio-Rad）から得られた吸光度の変化をミトコンドリアタンパク量によって補正することにより算出した.

3.1.14　骨格筋 superoxide 産生量

骨格筋における酸化ストレスの評価として superoxide の測定を行った．麻酔下で摘出した骨格筋を, リン酸緩衝生理食塩水下で血液および結合組織を除去し, 組織重量を計量した. その後, 即座に骨格筋標本を Krebs/Hepes buffer（119 mM NaCl, 4.6 mM KCl, 1.2 mM $CaCl_2$, 0.4 mM KH_2PO_4, 1 mM $MgSO_4$, 0.15 mM Na_2HPO_4, 25 mM $NaHCO_3$, 5.5 mM glucose, 20 mM Hepes, pH 7.2）に入れて 10 分間にわたって 37℃で加温した. 加温後, 骨格筋標本を 5 μM lucigenin に移して再度 10 分間にわたって 37℃で加温した後，ルミノメーター（AccuFLEX Lumi 400, Aloka, Tokyo, Japan）を用いて 5 分間にわたって発光量を測定した．さらに，この化学発光が superoxide に由来するものであることを確かめるために superoxide の消去薬である Tiron を 10 mM 添加して，5 分間にわたって発光量を測定した．骨格筋 superoxide の産生量は，Tiron を添加する前後の発光量の差を単位時間と組織重量で補正することによって算出した.

3.1.15　定量的 RT-PCR 法

定量的 RT-PCR 法は，以下の手順で，RNA 抽出，逆転写，PCR を行った.

RNA 抽出

RNA 抽出には QuickGene-810（FujiFilm, Tokyo, Japan）を用いた.

1) 深麻酔下でマウスを屠殺後，下肢骨格筋を摘出し，RNAlater（Life technologies, Tokyo, Japan）に 4℃の冷蔵庫内一晩浸した.
2) ハサミで細断した骨格筋組織を，メルカプトエタノール入りの lysis バッファー 500 μL の入ったチューブに移した．ボールミル型ホモジナイザーでホモジナイズを行うため各チューブにはあらかじめ 5mm ϕ のジルコニアボールを数個入れた.
3) 組織はトミー精工製 Micro Smash MS-100 を用い，毎分 3,800 回転 300 秒で 4 回（氷上で各インターバルは 20 秒）ホモジナイズした.
4) 組織破片を分離除去するため ≥17,000 *g* で 3 分間，室温で遠心した．その後，ホモジネート上清 350 μL を新しい 1.5 mL マイクロチューブに移した.
5) Solubilization バッファーを 175 μL 添加し，最大回転数で 15 秒間ボルテックスを行った.
6) 特級エタノール（>99%）を 175 μL 添加し再び最大回転数で 15 秒間ボルテックスを行い，遠心分離器で数秒間スピンダウンしてマイクロチューブの蓋や壁に付着した液を収集した.
7) 抽出液完成後, 調整した抽出液を全量, QuickGene-810 のカートリッジへ添加し, “RNA TISSUE PLUS” ボタンを選択して機械を作動させた.
8) 数分後に RNase-Free DNase set（QIAGEN, Tokyo, Japan）を添加して DNase 処理を行った後に機械を再始動させ RNA 抽出を再開し total RNA を回収した.
9) Nanodrop spectrophotometer（NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer）を用いて, RNA 量を測定し，抽出した RNA は次ステップの使用まで-80ºC で凍結保存した.

逆転写

High capacity cDNA reverse transcription kit（Applied Biosystems, Foster City, CA, USA）を用いて以下の手順で RNA から cDNA を合成した.

1) 総量で 10 μL の 2x Reverse Transcription（RT）マスターミックスを以下の構成で作成し各々のウェルに添加した.

コンポーネント	ボリューム/ウェル (μL)
10x RT Buffer	2.0
25x dNTP Mix (100 mM)	0.8
10x RT Random Primers	2.0
MultiscribeTM Reverse Transcriptase	1.0
RNase Inhibitor	1.0
Nuclease-free H_2O	3.2
総量	10.0

2) 10 μL の RNA サンプルを各ウェルに加え 2 回ピペッティング行い良く混合させた後に遠心分離でスピンダウンさせ空胞を除去した.

3) 逆転写反応は，以下のサーマルサイクラーの設定で行った.

	ステップ 1	ステップ 2	ステップ 3	ステップ 4
温度 (^oC)	25	37	85	4
時間	10 分	120 分	5 秒	∞

4) 合成した cDNA は長期保存の際には -15 から -25^oC で保存した.

定量的 RT-PCR

目的の cDNA を増幅させるため，TaqMan™ アッセイによる定量的 PCR を 7300 Real Time PCR system （Applied Biosystems）を用いて以下の手順で行った．また，すべての primer は Applied Biosystems から購入した．

1) qPCR マスターミックスを以下の構成で作成した．

コンポーネント	ボリューム/ウェル (μL)
TaqMan Universal Master Mix (2X)	12.5
TaqMan Gene Expression Assays	1.25
Control Assays (GAPDH)	1.25
蒸留水	5
総量	20

2) 作成したマスターミックスを 20 μL ずつ PCR ウェルに分注した．
3) 蒸留水を用いて希釈した各サンプルの cDNA 溶液を， 5 μL ずつ PCR ウェルに添加し, 2 回ピペッティング行い良く混合させた後に遠心分離でスピンダウンさせ空胞を除去した．
4) リアルタイム PCR 反応のサイクル条件は以下の設定で行った．

Step 1	50°C　2 分
Step 2	95°C　10 分
Step 3（40 サイクル）	95°C　15 秒 60°C　1 分

5) 内部標準として GAPDH を用い，蛍光標識された PCR 産物の増幅曲線上の閾値線を元にサイクル数（CT 値）を求め，ΔCT 法を用いて遺伝子発現を定量化した．実験 1，及び後述する実験 2 で使用したプライマーは，以下の通りである．Peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1α（PGC-1α, Mm01208835_m1），$p22^{phox}$（Mm00514478_m1），Nox2（Mm01287743_ml），$p47^{phox}$（Mm00447921_ml），$p67^{phox}$（Mm00726636_ml），$p40^{phox}$（Mm00476300_ml），and Rac-1（Mm01201653_mH）. すべての primer は Applied Biosystems から購入した．

3.2　実験 2.　培養骨格筋細胞における IS の影響の検討

3.2.1　培養細胞の実験デザイン

C2C12 マウス骨格筋芽細胞株をフラスコに 5×10^5 cells/mL 播種し，10%ウシ胎児血清（FBS＋1%ペニシリン/ストレプトマイシン）を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium（DMEM, Sigma Aldorich）を用いて 37℃，5% 二酸化炭素環境下のインキュベーター内において増殖させた．90%コンフルエントを確認し，2%ウマ胎児血清（FCS）に取換え，筋管細胞への分化を誘導した．筋管細胞に分化誘導後 5 日目に無血清メディウムに交換し，異なる濃度の IS（Sigma Aldorich）を添加し 24 時間培養した．IS の濃度に関しては既報を参考にした [29].

3.2.2　培養骨格筋細胞における NAD(P)H oxidase 活性

筋管細胞に分化誘導後 5 日目に無血清メディウムに交換し，IS（0，100，250，500，1000 μM）を添加し 24 時間培養した．その後，培地吸引し，PBS にて洗浄．セルスクレイパーを用い，少量の Krebs/Hepes buffer にて細胞を回収．10000 *g* で 20 分間遠心分離した. 遠心分離後， BSA をスタンダードとする BCA 法を用い，上澄み溶液のタンパク量を測定して 1 mg/ml に調整した. タンパク溶液の 100 μl（100 μg）を，2 ml のエッペンに入った 5 μM lucigenin 溶液に加えて懸濁し，100 μM NADPH を添加した後，即座にルミノメーターで 3 分間にわたって発光量を測定した．この測定によって得られた発光量を 5 μM lucigenin 溶液自体の発光量（バックグランド信号）で除した値を単位時間およびタンパク濃度で補正することにより NAD(P)H オキシターゼ活性として算出した.

3.2.3　培養骨格筋細胞における NAD(P)H oxidase サブユニット，PGC-1α の遺伝子発現

筋管細胞に分化誘導後 5 日目に無血清メディウムに交換し，IS（0，100，250 μM）を添加し 24 時間培養した．その後，培地吸引し，PBS にて洗浄．セルスクレイパーを用い，少量の PBS にて細胞をエッペンに回収．遠心を行い，上清吸引の後，細胞ペレットの入ったエッペンに，lysis バッファーを添加し，実験方法 3.1.15 に準じて，RNA 抽出，逆転写，PCR を行った.

3.3　統計学的解析

統計処理は，統計解析ソフトウェア GraphPad Prism 5（GraphPad Software, San Diego, CA, USA）を用いて行った．データは，平均値±標準誤差で表した．多群間の平均値の差の検定は analysis of variance（ANOVA）を用いて行い，有意差が認められた場合に post hoc test として Turkey の多重比較法により検定した．$P<0.05$ をもって統計学的に有意と判定した．

4. 実験結果

4.1 実験 1. CKD モデルマウスの運動能力とミトコンドリア機能, 及び AST-120 の効果の検討

4.1.1 動物特性

表 4-1 に動物特性を示す．体重，心重量，血圧，心拍数は，4 群間で有意差を認めなかった．また骨格筋重量（大腿四頭筋，腓腹筋，ヒラメ筋）についても各群間で差異は認めなかった．血液生化学検査では，尿素窒素（BUN）は，腎亜全摘出群（CKD,CKD+AST-120）において Sham 群と比較し，有意に増加していており，既報[30]と同程度の腎不全が誘導されていることを確認した．CKD 群と CKD+AST-120 群間では，BUN 値に有意差を認めなかった．また血漿中の遊離脂肪酸と中性脂肪は，各群に差異は認めなったが，総コレステロールは，腎亜全摘出群（CKD，CKD+AST-120）において Sham 群と比較し，有意に増加していた．血中の空腹時血糖値及びヘモグロビン値は，各群間で有意差を認めなかった．

表 4-1　動物特性

	Sham (n=12)	Sham +AST-120 (n=12)	CKD (n=12)	CKD +AST-120 (n=12)
体重および組織重量				
体重, g	29.6 ± 0.9	28.6 ± 0.6	29.8 ± 0.4	29.4 ± 0.5
心重量, mg	125 ± 7	120 ± 4	125 ± 4	123 ± 4
大腿四頭筋重量, mg	217 ± 10	212 ± 6	210 ± 8	218 ± 5
腓腹筋重量, mg	193 ± 7	191 ± 6	186 ± 2	187 ± 5
ヒラメ筋重量, mg	11.5 ± 0.4	10.9 ± 0.5	11.3 ± 0.5	11.2 ± 0.4
血行動態				
収縮期血圧, mmHg	121 ± 2	122 ± 3	119 ± 4	118 ± 3
心拍数, bpm	548 ± 34	564 ± 19	559 ± 41	535 ± 37
血液生化学検査				
尿素窒素, mg/dL	35 ± 2	34 ± 2	68 ± 4*	61 ± 2*
総コレステロール, mg/dL	59 ± 3	54 ± 3	82 ± 2*	75 ± 2*
遊離脂肪酸, mEq/L	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1
中性脂肪, mg/dL	38 ± 4	37 ± 3	45 ± 6	46 ± 6
空腹時血糖, mg/mL	95 ± 6	96 ± 4	102 ± 7	91 ± 4
ヘモグロビン, g/dL (n=8)	14.6 ± 0.4	14.2 ± 0.4	14.4 ± 0.6	14.2 ± 0.5

データはすべて平均値±標準誤差.　*P<0.05 vs. Sham.

4.1.2　血漿インドキシル硫酸（IS）値

図 4-1 に血漿インドキシル硫酸値を示す. 血漿 IS 値は, Sham 群に比べ CKD 群で有意に上昇し，CKD+ AST-120 群で IS の上昇は有意に抑制された.

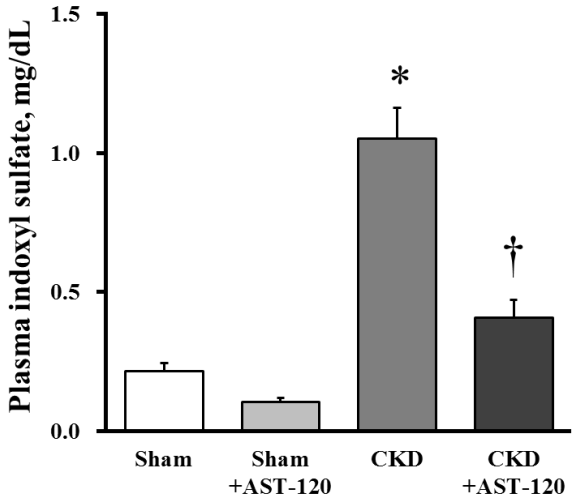

図 4-1.　血漿インドキシル硫酸値.

データは平均値±標準誤差.（各群 n=10-11）. *P<0.05 vs. Sham，†P<0.05 vs. CKD.

4.1.3　運動能力および身体活動度

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仕事量，走行距離および走行時間は，Sham 群に比較し，CKD 群で有意に減少し，AST-120 投与にてそれらの指標は有意に改善した（**図 4-2 A-C**）．また身体活動度は，各群間で有意差を認めなった（**図 4-2 D**）．

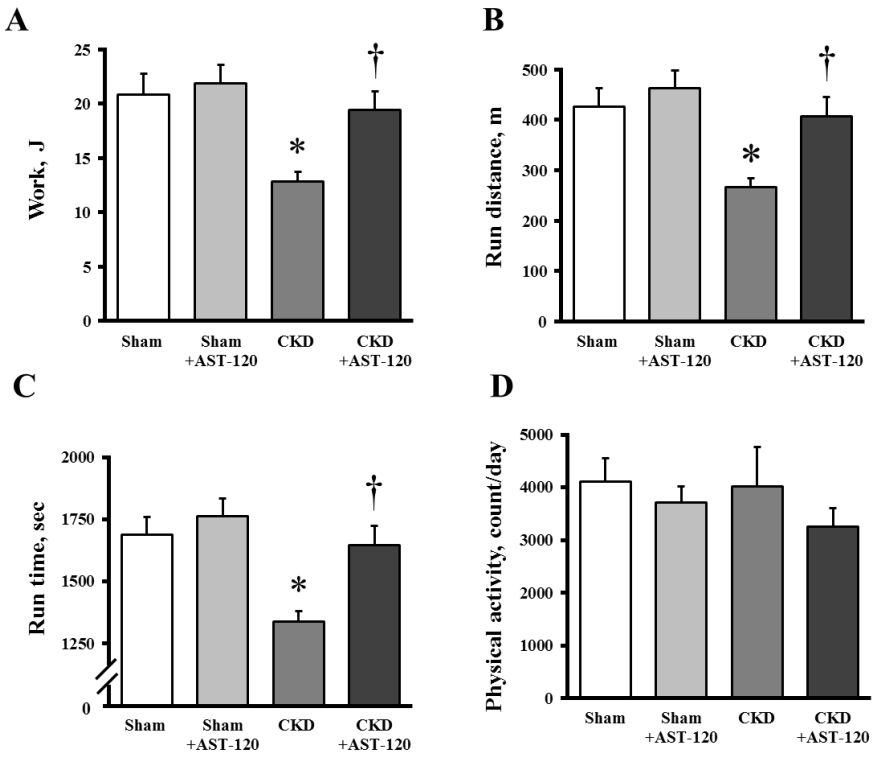

図 4-2.　4 群の運動能力（A；仕事量，B；走行距離，C；走行時間）および身体活動度（D）．データは平均値±標準誤差.（A-C：各群 n=12，D：各群 n=8）．*P<0.05 vs. Sham 群，†P<0.05 vs. CKD 群.

4.1.4　心エコー検査

表 4-2 に心エコー結果，**図 4-3** に代表的なエコー画像を示す．左室径，左室壁厚，左室収縮能いずれも各群で有意差を認めなかった．

表 4-2　心エコー結果

	Sham	Sham +AST-120	CKD	CKD +AST-120
左室拡張末期径, mm	3.5 ± 0.1	3.4 ± 0.1	3.5 ± 0.1	3.5 ± 0.1
左室収縮末期径, mm	2.3 ± 0.1	2.3 ± 0.1	2.4 ± 0.1	2.3 ± 0.1
左室短縮率, %	33.4 ± 2.0	32.9 ± 0.8	32.7 ± 0.5	34.3 ± 1.2
心室中隔壁厚, mm	0.84 ± 0.01	0.81 ± 0.03	0.82 ± 0.02	0.80 ± 0.03
左室後壁厚, mm	0.82 ± 0.02	0.79 ± 0.02	0.79 ± 0.05	0.80 ± 0.02

データはすべて平均値±標準誤差．（各群 n=4-5）．

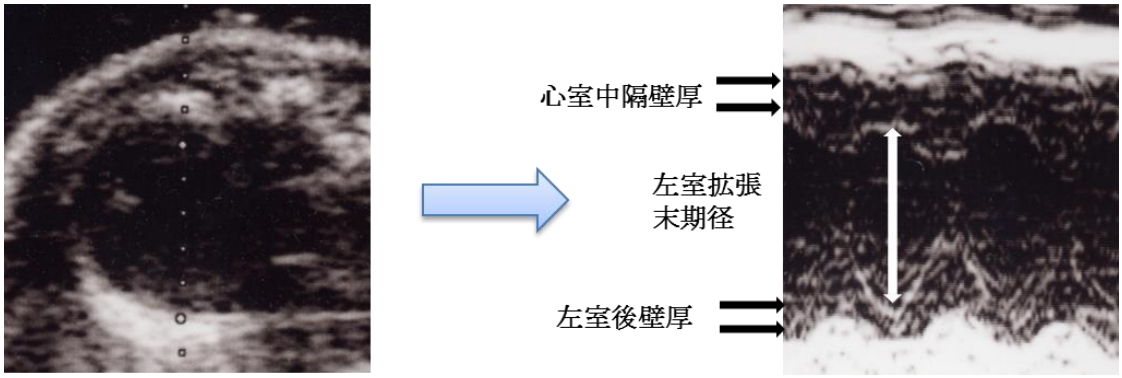

図 4-3.　代表的な心エコー画像

4.1.5　糖代謝

インスリン抵抗性を検討するために，糖負荷およびインスリン負荷検査を行った. 糖負荷, インスリン負荷ともに血糖曲線下面積は 4 群間で差を認めなった. （図 **4-4**）

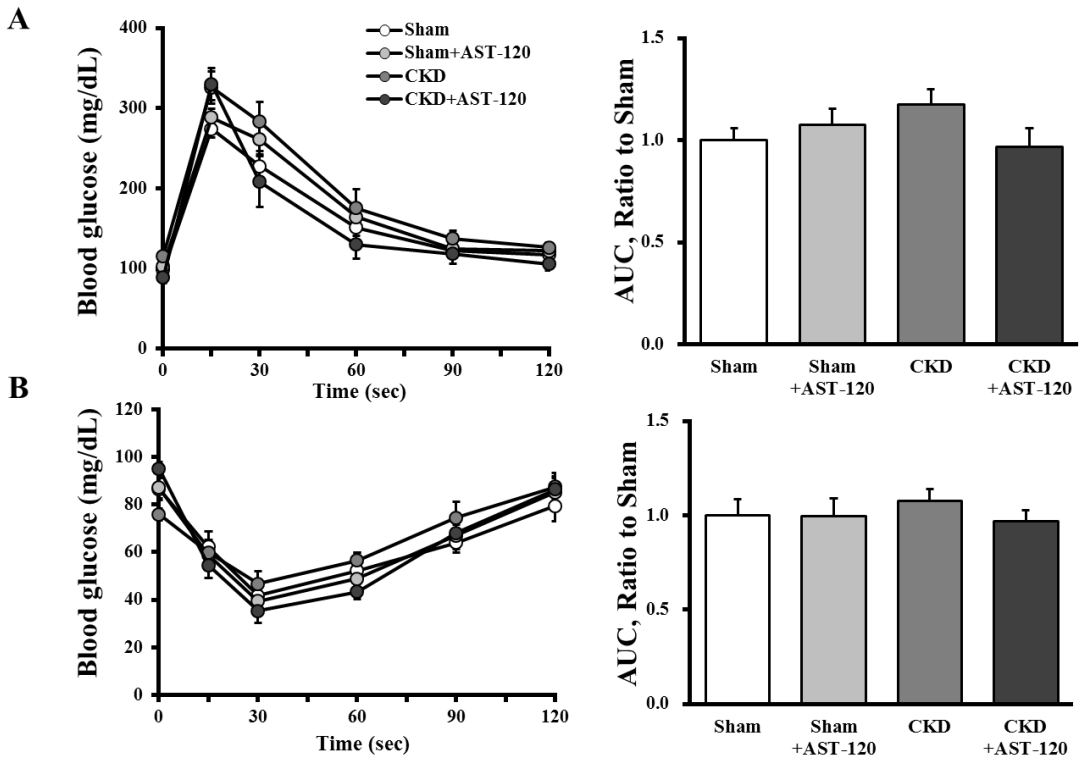

図 4-4.　グルコース投与前後での血糖値変化率（A 左）および血糖曲線下面積（A 右），インスリン投与前後での血糖値変化率（B 左）および血糖曲線下面積（B 右）. データは平均値±標準誤差. (各群 n=7-8).

4.1.6　血中及び骨格筋のレニン・アンジオテンシン系（RAS）

血漿 Angiotensin II に関しては,腎亜全摘出群で上昇を認めたが，AST-120 の投与では抑制されなかった（**図 4-5 A**）．また腎不全の誘導で骨格筋における RAS が活性化される可能性を検討するため，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（**図 4-5 B, C**）.

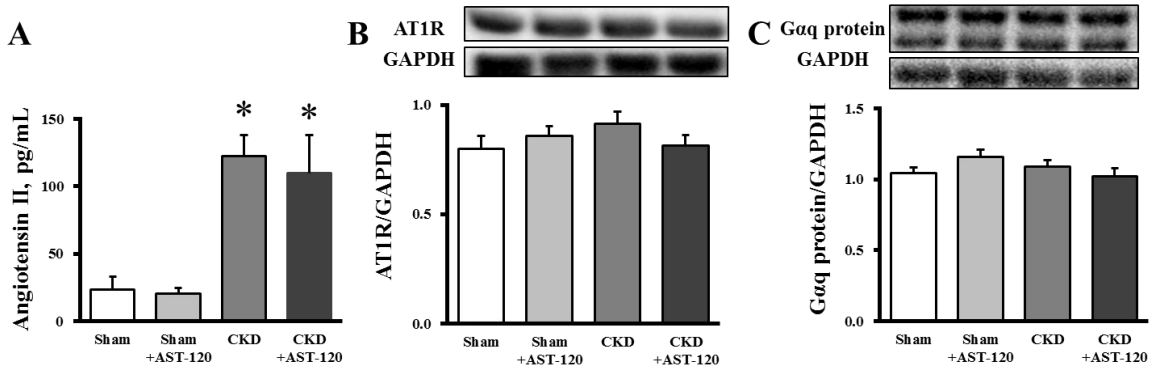

図 4-5.　血漿 Angiotensin II（A）および骨格筋 RAS のタンパク発現レベル（B）.
データは平均値±標準誤差.（A：各群 n=10-11，B：各群 n=9）．*P<0.05 vs. Sham.

4.1.7　骨格筋横断面積と毛細血管密度の評価

図 4-6 A に各群の代表的な骨格筋 HE 染色像を示す. 骨格筋横断面積（CSA）は各群間に有意差を認めず, 腎不全の誘導に伴う骨格筋萎縮は認めなかった（**図 4-6 B**）. **図 4-7 A** に各群の代表的な骨格筋 CD31 免疫染色像を示す. 単位面積当たりの CD31 陽性細胞数も各群間で有意差は認めず, 腎不全の誘導に伴う骨格筋での血管新生の抑制は否定的であった（**図 4-7 B**）.

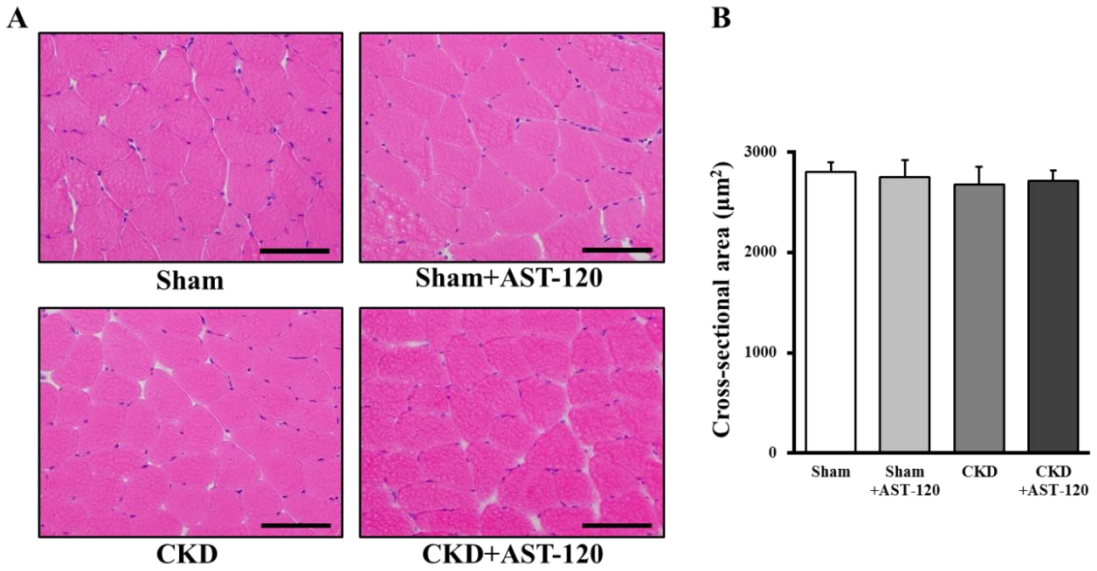

図 4-6.　代表的な骨格筋 HE 染色像（A）および定量化した骨格筋横断面積（B）. データは平均値±標準誤差. (各群 n=6).

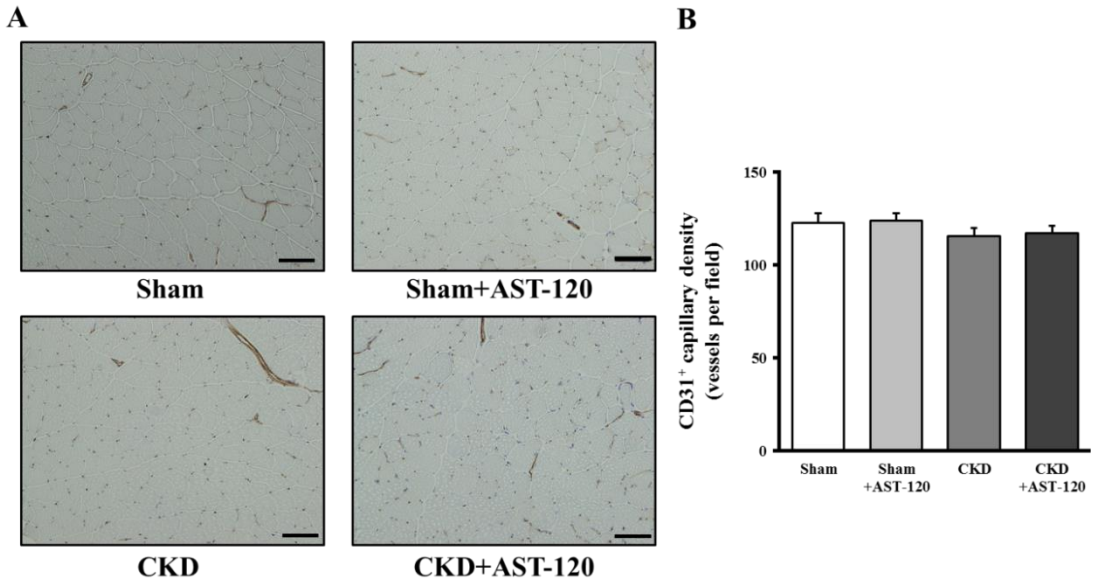

図 4-7.　代表的な骨格筋 CD31 免疫染色像（A）および単位面積当たりの CD31 陽性細胞数（B）. データは平均値±標準誤差. (各群 n=6).

4.1.8　骨格筋ミトコンドリア機能

嫌気的な解糖の指標として，トレッドミル終了直後に血中乳酸値を測定した．トレッドミルテストにおける仕事量当たりの血中乳酸値は，Sham 群に比較し CKD 群で有意に高値であり，AST-120 投与で有意に改善した（**図 4-8 A**）．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（**図 4-8 B**）. 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（**図 4-8 C**）．またミトコンドリア電子伝達系複合体活性についても，4 群間で差を認めなかった（**図 4-8 E**）．一方，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（**図 4-8 D**）.

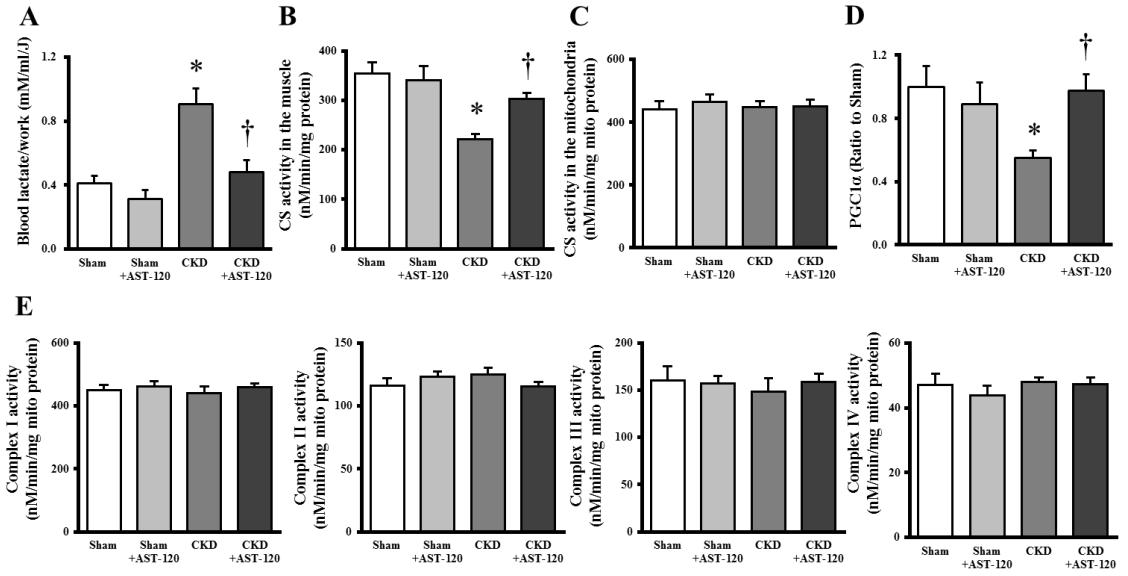

図 4-8.　トレッドミルテストにおける仕事量当たりの血中乳酸値（A），骨格筋細胞全体での CS 活性（B）および単離したミトコンドリアでの CS 活性（C），骨格筋における PGC-1α 遺伝子発現（D），ミトコンドリア電子伝達系複合体活性（I, II，III，IV）（E）. データは平均値±標準誤差.（A：各群 n=12，B,C：各群 n=9-11, D：各群 n=12，E：各群 n=10-12）．*P<0.05 vs. Sham 群，†P<0.05 vs. CKD 群.

4.1.9　骨格筋 Superoxide

腎不全の誘導による骨格筋での酸化ストレス産生に与える影響を評価するため，骨格筋の superoxide を測定した．骨格筋における superoxide 産生は Sham 群に比較し，CKD で有意に増加し，AST-120 投与により有意に抑制された（**図 4-9**）.

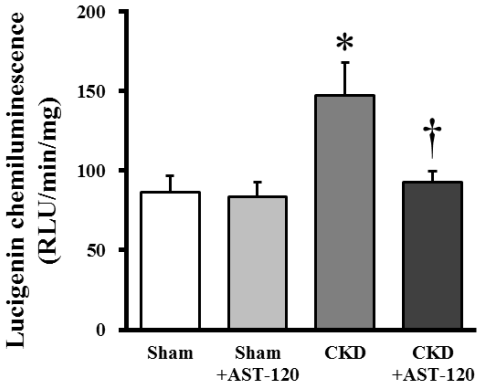

図 4-9.　骨格筋 superoxide

データは平均値±標準誤差.（各群 n=9-10）. **P*<0.05 vs. Sham 群，†*P*<0.05 vs. CKD 群.

4.2　実験 2. 培養骨格筋細胞（C2C12 細胞）における IS の影響の検討

4.2.1　培養細胞における IS の NAD(P)H oxidase への影響

培養骨格筋細胞におけるルシジェニン化学発光法で測定した NAD(P)H oxidase 活性は IS 濃度依存性に増加し, 250 μM の IS の刺激で統計学的に有意な増加を認めた（**図 4-10 A**）. また NAD(P)H oxidase のサブユニットの遺伝子発現に関して検討を行った結果，$p22^{phox}$，$p47^{phox}$，$p40^{phox}$，Rac1 の遺伝子発現は，IS の刺激で有意に増加した．Nox 2，$p67^{phox}$ は，IS の刺激で遺伝子発現が増加傾向であったが, 統計学的な有意差は認めなかった（**図 4-10 B-G**）.

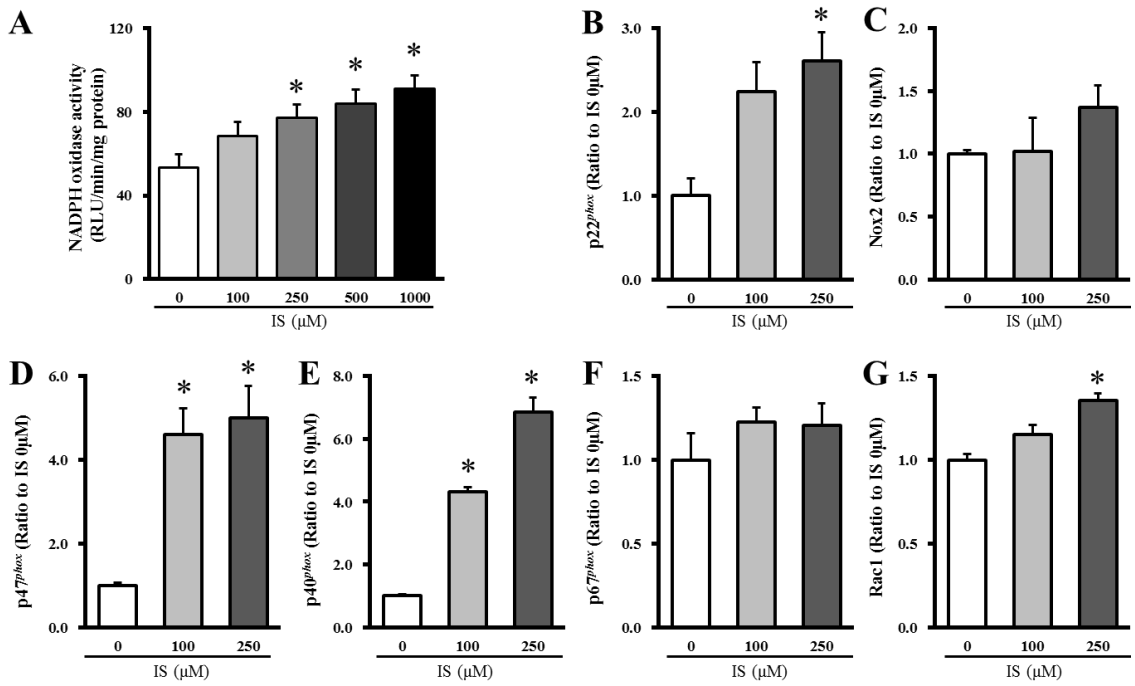

図 4-10.　IS 刺激下（0-1000 μM）の培養骨格筋細胞における NAD(P)H oxidase 活性（A）および IS 刺激下（0-250 μM）での NAD(P)H oxidase のサブユニットの遺伝子発現（$p22^{phox}$，Nox 2，$p47^{phox}$，$p40^{phox}$，$p67^{phox}$，Rac1）. データは平均値±標準誤差.（A：各群 n=6，B-G：各群 n=4-5）*P<0.05 vs. IS (0 μM).

4.2.2　培養細胞における IS のミトコンドリア生合成への影響

IS 刺激下（0-250 μM）で，培養骨格筋細胞におけるミトコンドリアの生合成をつかさどる PGC-1α の遺伝子発現について検討した．IS 刺激下で PGC-1α の遺伝子発現は有意に低下した（**図 4-11**）.

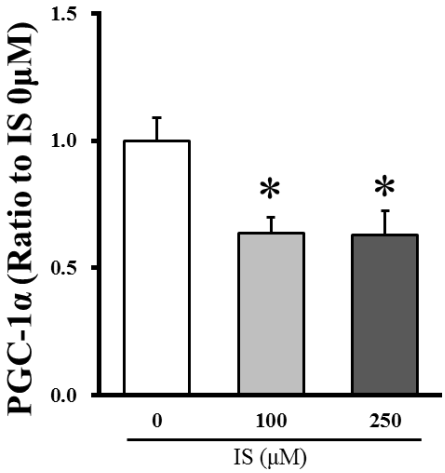

図 4-11.　IS 刺激下（0-250 μM）の培養骨格筋細胞における PGC-1α の遺伝子発現.
データは平均値±標準誤差.（各群 n=4-5）*P<0.05 vs. IS (0 μM).

5. 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[3,5]．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[8,9]．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[14,31]．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（**図 4-8 B**）．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（**図 4-8 C, E**）．一方で, ミトコンドリア生合成をつかさどる PGC-1α 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（**図 4-8 D**）．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[32]. 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（**図 4-9**）．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-1α の遺伝子発現が抑制された（**図 4-11**）．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. 腎臓のメサンギウム細胞や，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[21,22]．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 は濃度依存性に NAD(P)H oxidase の活性と NAD(P)H oxidase のサブユニットの遺伝子発現を増加させた（**図 4-10**）．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.

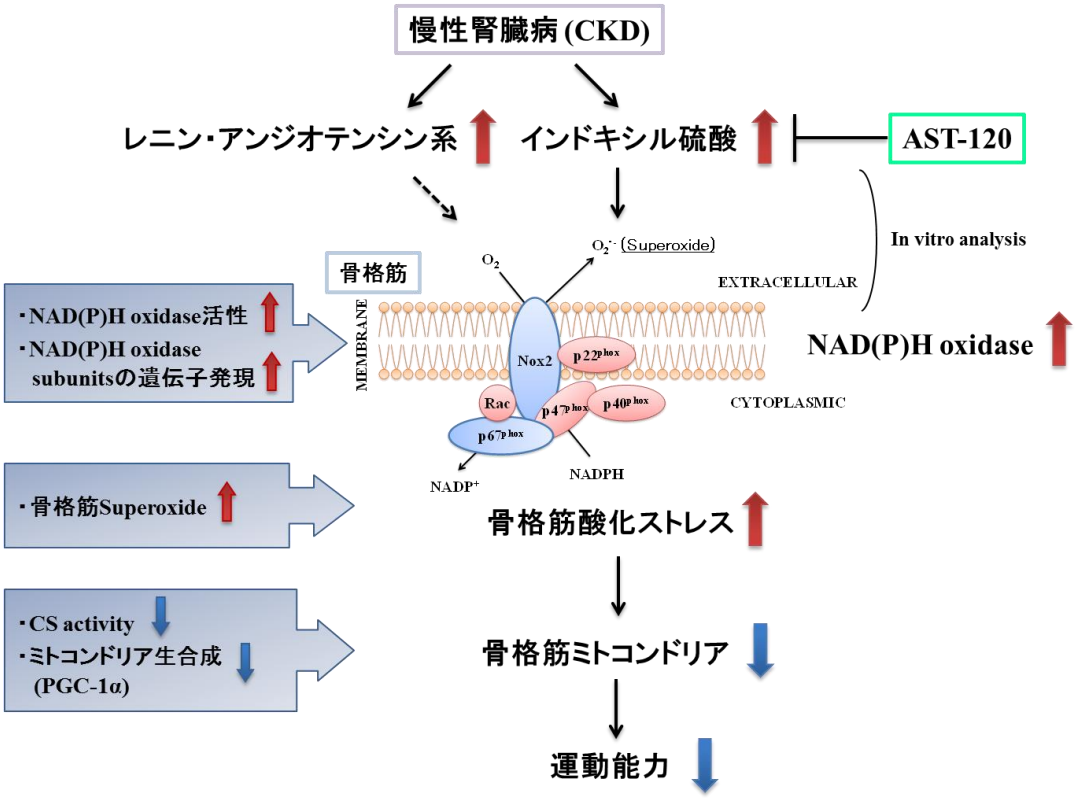

図 5-1.　本研究のまとめ

・本研究の臨床的意義

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 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標的とした新たな治療戦略が必要とされている．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．現在，AST-120 は腎不全の進行を抑制する目的で使用されているが， CKD 患者で認められ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．

・本研究の限界と今後の課題

本研究にはいくつかの限界が存在している．1 点目として，IS は尿毒素の中で生体に与える影響が最も解析されている強力な毒性を有する尿毒素であるが，経口吸着薬である AST-120 は，IS 以外の尿毒素の元となる物質も吸着する．今回の実験で，CKD マウスに AST-120 を投与した際，骨格筋での酸化ストレスの減少，ミトコンドリア機能の改善並びに運動能力の改善効果を認めたが，IS 以外の尿毒素の産生が抑制されたことが関与している可能性は否定できない. 今回の実験系では，CKD マウスの血漿 IS 値と，骨格筋における酸化ストレス・ミトコンドリア機能の間に直接的な因果関係を証明することはできないが，培養骨格筋細胞を用いた検討において IS は，直接的に NAD(P)H oxidase を活性化し，ミトコンドリア生合成を低下させることを確認した.

2 点目として, 今回作製した腎亜全摘出モデルでは骨格筋の萎縮を確認できなかった点が挙げられる．田蒔らは，腎亜全摘出モデルを用いて CKD と骨格筋萎縮の関係を検討し，腎亜全摘早期の段階において運動能力やミトコンドリア機能の低下を認めたが，この時点では骨格筋の萎縮は認めなかったと報告している [16]．しかし一年経過した時点で骨格筋の萎縮が確認され，運動能力の低下は，骨格筋の形態学的変化（骨格筋萎縮）に先行して出現すると解釈している [16]．今回，定法に従って腎亜全摘出術を行うことにより既報と同程度の腎不全を呈する CKD モデルを作製し，運動能力の低下を示していた．さらに腎亜全摘直後より，CKD マウスに AST-120 を投与することで，骨格筋のミトコンドリア機能障害と運動能力を有意に改善させることを示したが，骨格筋萎縮に対する AST-120 の効果は，今後検討されるべき課題である.

6. 総括および結論

・本研究の結果から明らかになった事項の要約を以下に述べる.

1. CKD マウスへの AST-120 の投与は，血漿 IS を低下させ，腎機能，心機能，血中ヘモグロビン濃度，骨格筋量および骨格筋毛細血管密度に依存せずに，その運動能力の低下を有意に改善させた.
2. CKD マウスの骨格筋では，ミトコンドリア生合成が低下しており，AST-120 を投与することで，ミトコンドリア生合成の低下を阻止することができた.
3. AST-120 は，CKD で誘導された骨格筋での酸化ストレスの産生亢進を有意に抑制した.
4. IS は，C2C12 筋管細胞における NAD(P)H 活性及び NAD(P)H サブユニットの遺伝子発現を，濃度依存性に増加させた.
5. IS は，C2C12 筋管細胞における PGC-1α の遺伝子発現を抑制した.

謝辞

本研究を遂行し学位論文を作成するに当たり，本研究の機会を与えて頂くとともに，多くの御指導と御支援を賜りました北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学　筒井裕之教授に深謝申し上げます．また北海道大学病院卒後臨床研修センター　石森直樹准教授には博士課程での研究全般･学位論文作成に,御多忙の中,多くの御指導をして頂き大変感謝しております.

また本論文作成に当たり，御多忙の中御助言頂きました審査委員の先生に深く感謝いたします.

本研究に当たり，日頃より多くの御指導・御助力を頂きました北海道大学大学院医学研究科 循環病態内科学講座，高田真吾先生，齋藤晶理先生，野澤篤史先生，門口智泰先生，降旗高明先生，福島新先生，正木芳宏先生，水島航先生，横田卓助教，松島将士助教，絹川真太郎講師に感謝申し上げます.

本研究の実験遂行にあたり，多大な御助力を頂きました循環病態内科学講座実験助手の會田晶子様，藤井美和子様，三浦志保様，池田則子様，木村友紀様，また秘書室の皆様に深く感謝申し上げます．最後に，本研究は多くの実験動物の尊い生命の犠牲の賜物であることをここに銘記いたします.

引用文献

1 James, M. T., Hemmelgarn, B. R. & Tonelli, M. Early recognition and prevention of chronic kidney disease. *Lancet* **375**, 1296-1309 (2010).

2 Fried, L. F. *et al.* Chronic kidney disease and functional limitation in older people: health, aging and body composition study. *J. Am. Geriatr. Soc.* **54**, 750-756 (2006).

3 Reese, P. P. *et al.* Physical performance and frailty in chronic kidney disease. *Am. J. Nephrol.* **38**, 307-315 (2013).

4 Sietsema, K. E., Amato, A., Adler, S. G. & Brass, E. P. Exercise capacity as a predictor of survival among ambulatory patients with end-stage renal disease. *Kidney Int.* **65**, 719-724 (2004).

5 Roshanravan, B. *et al.* A prospective study of frailty in nephrology-referred patients with CKD. *Am. J. Kidney Dis.* **60**, 912-921 (2012).

6 Storer, T. W., Casaburi, R., Sawelson, S. & Kopple, J. D. Endurance exercise training during haemodialysis improves strength, power, fatigability and physical performance in maintenance haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* **20**, 1429-1437 (2005).

7 Wang, X. H. & Mitch, W. E. Mechanisms of muscle wasting in chronic kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **10**, 504-516 (2014).

8 Joyner, M. J. & Coyle, E. F. Endurance exercise performance: the physiology of champions. *J. Physiol.* **586**, 35-44 (2008).

9 Fahal, I. H. Uraemic sarcopenia: aetiology and implications. *Nephrol. Dial. Transplant.* **29**, 1655-1665 (2014).

10 Baraldi, E. *et al.* Exercise tolerance after anaemia correction with recombinant human erythropoietin in end-stage renal disease. *Pediatr. Nephrol.* **4**, 623-626 (1990).

11 Flisinski, M. *et al.* Influence of different stages of experimental chronic kidney disease on rats locomotor and postural skeletal muscles microcirculation. *Ren. Fail.* **30**, 443-451 (2008).

12 Bailey, J. L. *et al.* Chronic kidney disease causes defects in signaling through the insulin receptor substrate/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway: implications for muscle atrophy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 1388-1394 (2006).

13 Sakkas, G. K. *et al.* Changes in muscle morphology in dialysis patients after 6 months of aerobic exercise training. *Nephrol. Dial. Transplant.* **18**, 1854-1861 (2003).

14 Adey, D., Kumar, R., McCarthy, J. T. & Nair, K. S. Reduced synthesis of muscle proteins in chronic renal failure. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **278**, E219-225 (2000).

15 Yazdi, P. G. *et al.* Skeletal muscle mitochondrial depletion and dysfunction in chronic kidney disease. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **6**, 532-539 (2013).

16 Tamaki, M. *et al.* Chronic kidney disease reduces muscle mitochondria and exercise endurance and its exacerbation by dietary protein through inactivation of pyruvate dehydrogenase. *Kidney Int.* **85**, 1330-1339 (2014).

17 Yokoi, H. & Yanagita, M. Decrease of muscle volume in chronic kidney disease: the role of mitochondria in skeletal muscle. *Kidney Int.* **85**, 1258-1260 (2014).

18 Niwa, T. Role of indoxyl sulfate in the progression of chronic kidney disease and cardiovascular disease: experimental and clinical effects of oral sorbent AST-120. *Ther. Apher. Dial.* **15**, 120-124 (2011).

19 Nakagawa, N. *et al.* An oral adsorbent, AST-120, suppresses oxidative stress in uremic rats. *Am. J. Nephrol.* **26**, 455-461 (2006).

20 Yisireyili, M. *et al.* Indoxyl sulfate promotes cardiac fibrosis with enhanced oxidative stress in hypertensive rats. *Life Sci.* **92**, 1180-1185 (2013).

21 Gelasco, A. K. & Raymond, J. R. Indoxyl sulfate induces complex redox alterations in mesangial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **290**, F1551-1558 (2006).

22 Dou, L. *et al.* The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells. *J. Thromb. Haemost.* **5**, 1302-1308 (2007).

23 Muteliefu, G. *et al.* Indoxyl sulphate induces oxidative stress and the expression of osteoblast-specific proteins in vascular smooth muscle cells. *Nephrol. Dial. Transplant.* **24**, 2051-2058 (2009).

24 Barreto, F. C. *et al.* Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **4**, 1551-1558 (2009).

25 Fujii, H. *et al.* Oral charcoal adsorbent (AST-120) prevents progression of cardiac damage in chronic kidney disease through suppression of oxidative stress. *Nephrol. Dial. Transplant.* **24**, 2089-2095 (2009).

26 Yu, M., Kim, Y. J. & Kang, D. H. Indoxyl sulfate-induced endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease via an induction of oxidative stress. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **6**, 30-39 (2011).

27 Phan, O. *et al.* Effect of oral calcium carbonate on aortic calcification in apolipoprotein

E-deficient (apoE-/-) mice with chronic renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* **23**, 82-90 (2008).

28 Lekawanvijit, S. *et al.* Chronic kidney disease-induced cardiac fibrosis is ameliorated by reducing circulating levels of a non-dialysable uremic toxin, indoxyl sulfate. *PLoS One* **7**, e41281 (2012).

29 Tumur, Z. & Niwa, T. Indoxyl sulfate inhibits nitric oxide production and cell viability by inducing oxidative stress in vascular endothelial cells. *Am. J. Nephrol.* **29**, 551-557 (2009).

30 Leelahavanichkul, A. *et al.* Angiotensin II overcomes strain-dependent resistance of rapid CKD progression in a new remnant kidney mouse model. *Kidney Int.* **78**, 1136-1153 (2010).

31 Adams, G. R., Zhan, C. D., Haddad, F. & Vaziri, N. D. Voluntary exercise during chronic renal failure in rats. *Med. Sci. Sports Exerc.* **37**, 557-562 (2005).

32 Yokota, T. *et al.* Oxidative stress in skeletal muscle impairs mitochondrial respiration and limits exercise capacity in type 2 diabetic mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **297**, H1069-1077 (2009).