

博士論文

代謝変化に基づく尿毒症性サルコペニアの
発症機序の解明

佐藤 恵美子

平成 29 年度
博士論文
代謝変化に基づく尿毒症性サルコペニアの
発症機序の解明

By Emiko Sato
(Bachelor of Arg. And Life Sci., Hirosaki University, 2001)
(Master of Life Sci., Tohoku University, 2003)
(Doctor of Life Sci., Tohoku University, 2007)

This study was published
in Scientific Reports, 6, 36618, 2016

目次

1. 要約.....	5
2. 研究背景	7
2.1 慢性腎臓病 (Chronic kidney disease; CKD).....	7
2.2 尿毒症物質とサルコペニア	8
2.3 インドキシル硫酸.....	9
3. 研究目的	11
4. 研究方法	12
4.1 動物実験.....	12
4.2 マウス骨格筋の組織学的変化.....	12
4.3 臨床研究.....	13
4.4 細胞実験.....	13
4.5 骨格筋のイメージング質量分析	14
4.6 ヒト血漿インドキシル硫酸の測定	15
4.7 骨格筋細胞内インドキシル硫酸の測定	16
4.8 細胞生存率と増殖能の評価	17
4.9 細胞外フラックスアナライザーを用いたミトコンドリア機能の評価.....	17
4.10 ATP アッセイ	18
4.11 ミトコンドリアの形態解析	19
4.12 キャピラリー電気泳動(CE)-MS 代謝プロファイル	19
4.13 PCR (polymerase chain reaction)による遺伝子発現定量解析	20
4.14 ウェスタンブロット解析	21
4.15 電子スピン共鳴による活性酸素の検出	22
4.16 統計解析.....	23
5. 研究結果	24
5.1 CKD マウス骨格筋の組織学的変化とインドキシル硫酸の蓄積	24
5.2 C2C12 細胞を用いたインドキシル硫酸の細胞増殖・生存能に与える影響.....	24
5.3 インドキシル硫酸が筋細胞に与える代謝変化.....	25
5.4 インドキシル硫酸が与える解糖系および酸化的リン酸化活性の変化.....	28
5.5 筋細胞における Nrf2 を介したペントースリン酸経路の活性.....	29
5.6 筋細胞におけるインドキシル硫酸によるミトコンドリア障害.....	32
5.7 インドキシル硫酸によるミトコンドリアの形態異常	33
5.8 インドキシル硫酸による酸性条件下での代謝変化.....	34
5.9 インドキシル硫酸による筋細胞の筋タンパク質の合成経路の阻害	34
5.10 CKD 患者における血中インドキシル硫酸濃度と骨格筋量の関係.....	35
6. 結論.....	41
7. 参考文献	42

8. 謝辞.....88

1. 要約

慢性腎臓病 (chronic kidney disease; CKD)では、筋量・筋力が低下するサルコペニアが死亡率と強く関連する。CKDにおける骨格筋量の減少(尿毒症性サルコペニア)の発症機構は不明な点が多く残っており、根本的な治療法がないのが現状である。そこで本研究では、尿毒症物質が筋細胞に与える代謝変化に着目し、尿毒症性サルコペニアの発症機序を解明することを目的とした。CKDモデルマウスで筋肉形態・インドキシル硫酸蓄積の評価を行い、C2C12筋芽細胞・筋管細胞で、代表的な尿毒症物質であるインドキシル硫酸による代謝機能の変化をメタボロミクスおよびフラックスアナライザーで評価を行い、さらに酸化ストレス応答関連転写因子(Nrf2)およびその標的遺伝子関連酵素(グルコース 6リン酸脱水素酵素等)の発現について評価した。またCKD患者を対象とし、血中インドキシル硫酸濃度と筋量等の体成分値との関連を検討した。本研究の結果から、CKDモデルマウスで組織中へのインドキシル硫酸の蓄積が確認され、骨格筋の横断面も有意に小さくなっていることが確認された。また筋細胞内ではインドキシル硫酸による抗酸化応答経路の過剰亢進とATP産生量・エネルギー産生関連代謝経路の低下を認め、インドキシル硫酸による酸化ストレス応答としてNrf2およびその標的遺伝子酵素の発現が増加していた。CKD患者では血中インドキシル硫酸と骨格筋量の減少に有意な関連が認められた。以上からCKDでは蓄積した尿毒症物質が筋細胞で酸化ストレスを惹起し、そのことによる代謝フローが過剰な抗酸化応答経路へと変化し、その代償としてTCA回路が停滞しATP産生の低下をき

たしサルコペニアを起こすことが示された。

2. 研究背景

2.1 慢性腎臓病 (Chronic kidney disease; CKD)

CKD は高血圧や糖尿病のような生活習慣病を原因とし、慢性進行性に徐々に腎機能が低下する病態を示す。日本においては成人 8 人に 1 人が罹患する国民病となっている。CKD は悪化すると末期腎不全(ESRD)となり、透析治療が必要となる。2013 年までに、300,000 人の患者が維持透析を受けており、毎年 1 万人ずつ患者数が増加している。CKD は世界的にみても、人種や民族に関わらず、高齢化社会に伴い主要なヘルスケアの項目となっている¹⁾。CKD では心血管疾患による死亡リスクが、健康な人と比較し 8-10 倍と高くなっており、リスク軽減が重要な課題である。しかし CKD では心血管疾患の合併のみならず、他の合併症も大きな問題となっている。

サルコペニアとは、進行性の筋量・筋力低下を示すが、通常加齢に伴い進行する²⁾。CKD の患者や透析治療を受けている CKD 患者の大半の患者でサルコペニアが確認され、身体障害のリスクを高め、生活の質(QOL)を著しく低下させている³⁾。アジアにおけるサルコペニアの診断基準は握力が男性で 26.0 kg、女性で 18.0 kg 未満、または歩行速度が 0.8 m 以下とされており、確定診断はエックス線を用いた(DXA; Dual X-ray absorptiometry)で筋量を測定し、男性 7.0 kg/m²、女性 5.4 kg/m² 未満となった場合、サルコペニアと診断される⁴⁾。

CKD におけるサルコペニアは“尿毒症性サルコペニア”と呼ばれており、死亡率と強い関連があり、重大な臨床問題である⁵⁾。日本における尿毒症性サルコペニアの患

者の正確な人数は把握されていない。しかし、炎症の亢進、インスリン抵抗性、蛋白異化の亢進等多くの因子を包括した概念であるカヘキシーについて、調べた報告がある。この報告によると、ヨーロッパ、アメリカ、日本において CKD 患者の半数はカヘキシーとされている⁶⁾。また、高齢者の身体機能や認知機能が低下した状態やタンパク・エネルギー消費状態を示すフレイルや Protein-energy wasting (PEW) についての報告もある。フレイルや PEW は年齢とは独立し高齢の末期腎不全患者において高頻度で認められ、PEW は維持透析患者では 18-75% とされている⁷⁾。このように高頻度で認められる病態であるにも関わらず、発症機序が不明であり治療法が確立されていない。

2.2 尿毒症物質とサルコペニア

CKD では腎機能が低下しているが、腎機能が低下すると体内に様々な尿毒症物質が蓄積する⁸⁾。この老廃物の中には、体内で毒性を示すものがあり、これを尿毒症物質という。尿毒症物質は3つのタイプに分けられている。1つ目は分子量 500 Da 以下の水溶性の化合物、2つ目はタンパク質に結合する化合物、3つ目は分子量 500 Da 以上の化合物である。尿毒症物質は毒性を持っており、体内に蓄積することで CKD における合併症の発症に寄与している⁹⁾。高血圧、心血管疾患、神経障害、骨障害などの CKD の合併症は、尿毒症物質の関与が考えられている^{10,11,12,13)}。尿毒症性サルコペニアの発症にも、体内に蓄積した尿毒症物質の関与が考えられているが、その詳細は

不明である。尿毒症物質の蓄積は体内において代謝の変化をもたらす。CKD の患者では、体内の状態が酸性に傾く代謝性アシドーシスなどがある¹⁴⁾。代謝性アシドーシスでは、タンパク質の分解が増加し、タンパク質合成を減少させ筋タンパク質の減少を促進する^{15,16,17)}。筋肉におけるタンパク質の分解シグナルは炭水化物の酸化の障害を誘導し、結果的にサルコペニアとなる¹⁸⁾。また近年、CKD モデルである片側尿細管結紮(Unilateral ureteral obstruction: UUO)モデルを対象とし、イメージング質量分析で腎臓内の代謝変化を検討した研究が報告された¹⁹⁾。この研究では、解糖系、トリカルボン酸(TCA)回路、ATP 代謝、脂質代謝、抗酸化物質等を含む 21 の化合物が UUO モデルで変化していた。このことから、CKD における代謝変化は筋肉内でも起きていると考えられる。以上のことから、筋肉細胞における代謝の変化は尿毒症性サルコペニア発症で重要な役割を果たしていると考えた。

そこで本研究では CKD において、体内に蓄積した尿毒症物質は骨格筋の減少や尿毒症性サルコペニア発症のトリガーとなる、と仮説を立てた。この仮説を検証するため、また尿毒症性サルコペニア発症のメカニズムを解明するため、本研究では代表的な尿毒症物質であるインドキシル硫酸の骨格筋に対する影響について、細胞内代謝変化およびミトコンドリア機能に着目して検討を行う事とした。

2.3 インドキシル硫酸

尿毒症物質の中でタンパク質に結合する化合物が最も病態生理学的に重要である。

インドキシル硫酸はタンパクに結合する尿毒症物質であり、最も毒性が強く、CKDの進行に関与していることが報告されている²⁰⁾。インドキシル硫酸は食事由来のトリプトファンが腸内においてインドールとなり、インドールが腸内から血中へ吸収され、肝臓で硫酸抱合されることで合成される(図 1)。正常な状態であれば、尿に排泄されるが、CKDにおいては腎機能低下により CKD ステージに伴って体内に蓄積する¹³⁾。インドキシル硫酸は、体内において有機アニオントランスポーター(OAT)を介して細胞内に取り込まれ、活性酸素産生を誘導し、細胞障害を引き起こし、CKD 進行や心疾患発症に関与すると報告されている²¹⁾(図 2)。

インドキシル硫酸は細胞に多面的な影響（酸化還元ホメオスタシスの崩壊、代謝変化、ミトコンドリア障害等）を持っているため、本研究ではキャピラリー電気泳動-質量分析（capillary electrophoresis – mass spectrometry; CE-MS）を用いた網羅的代謝物解析、細胞外フラックスアナライザーを用いたミトコンドリア機能の評価、酸化ストレスに関連する化合物や酸化ストレスに関わる経路の評価をそれぞれ行った。加えて、本研究では CKD 患者における血中インドキシル硫酸と骨格筋量の状態との関連について検討を行った。

3. 研究目的

本研究では代表的な尿毒症物質であるインドキシル硫酸を用いて、細胞内代謝変化およびミトコンドリア機能に着目し、骨格筋に対する影響を検討することで尿毒症性サルコペニア発症のメカニズムを解明する。

4. 研究方法

4.1 動物実験

全ての動物実験は国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規定に従って行った。実験のプロトコールと動物の管理は東北大学の委員会で認められている(承認番号;2016 薬-019)。本研究では7-8週齢のオス C57BL/6 を日本クレア(株)から購入し、1週間慣らし飼育を行い、ランダムに2群に分けた。CKDモデルとしてアデニン誘発腎不全マウスを用いた。アデニンはキサンチン脱水素酵素 (xanthine dehydrogenase: XDH)により、8-ヒドロキシアデニン(8-hydroxyadenine)となり、さらに2,8-ジヒドロキシアデニン(2,8-dihydroxyadenine)へと代謝される。2,8-ジヒドロキシアデニンは難溶性化合物であり、尿細管で結晶化することで炎症・線維化を引き起こすとされている(図3)²²⁾。

アデニン誘発腎不全マウスは、腎不全を誘発させるため0.2%アデニン(Wako)を含有したMF(アデニン食)を7週間与えた。0.2%アデニン含有MFはオリエンタル酵母にて調整した。コントロール群には、アデニンを含まないMF食を7週間与えた。本研究ではコントロール群と、CKD群に2群を作成した(図4)。

4.2 マウス骨格筋の組織学的変化

マウスの腓腹筋を2%パラホルムアルデヒドで固定し、2 μmの厚さでスライドを作成し、Hematoxylin Eosin(HE)染色を行った。HE染色したスライドは、BZ9000(株)

式会社キーエンス、大阪) で撮影し、撮影した写真を Image J(NIH)で筋束横断面を計測し、比較を行った。

4.3 臨床研究

全ての実験は国立大学法人東北大学大学院医学系研究科の倫理委員会にて承認(受付番号:2016-1-107)されており、ヘルシンキ宣言を遵守している。

本研究は、東北大学病院に通院している 14 名の腹膜透析患者を対象として行った。腹膜透析患者は、透析導入時から少なくとも 3 回以上腹膜平衡化試験(peritoneal equilibration tests: PET)を行った患者を対象としている。サンプルは、PET の際の血液を使用した。血液サンプルは、採取した後解析直前まで -80°C で保管した。健常人は 16 名(男性 8 名、女性 8 名、 32.9 ± 7.0 歳)を対象とした。本研究では対象者から研究の同意を得ている。本研究で対象となった患者は、65.0 歳(年齢の範囲:44-83 歳)であり、原疾患として糖尿病性腎症、高血圧、慢性糸球体腎炎、IgA 腎症である。患者情報については Table 1 にまとめた。体成分は、InBody 720 (Biospace, Tokyo, Japan) を用いて、体重、body mass index (BMI)、骨格筋量、脂肪率を計測した。

4.4 細胞実験

マウス筋芽細胞株 C2C12 は American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA)から購入した。C2C12 は 10%仔牛血清(FBS)(ATCC)、100 IU/mL ペニシリン、

100 IU/mL ストレプトマイシンを含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (ATCC)を使用し、5%CO₂ 下で 37°C培養を行った。C2C12 の筋管細胞への分化は、2% ウマ血清を含む DMEM で 4~5 日培養することで行った。筋管細胞へ分化した C2C12 に、4%ウシ血清アルブミン(BSA)存在下で、様々な濃度のインドキシル硫酸を添加してインドキシル硫酸の影響を検討した。

4.5 骨格筋のイメージング質量分析

イメージング質量分析測定は、九州大学 先端融合医療レドックスナビ研究拠点の三浦 大典 准教授および一瀬 智美さんに測定を依頼した。凍結したマウスの筋組織をクリオスタットで 10 μm の厚さで薄切する。薄切した切片は、酸化インジウムすず(Indium tin oxide: ITO)コートガラススライドに乗せる。600 mg の 9-アミノアクリジン (Merk Schuchardt, Hohenbrunn, Germany)を 0.5 μm の厚さで iMLayer (Shimadzu, Kyoto, Japan)を使用してスライドに塗布し、蒸着させる。本研究では、Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometer (MALDI-TOFMS, AXIMA Confidence, Shimadzu)を用いた。337 nm N₂ レーザーを使用した。測定は、ネガティブモードで行い、 m/z 50 – m/z 1,000 の範囲を高分解能モードで行った。Laser power、detection voltage、accumulated number of MADLI-TOF-MS は、それぞれ 115 kV、3.0 kV、1/pixel である。

4.6 ヒト血漿インドキシル硫酸の測定

インドキシル硫酸は Sigma Chemical Co. (13875, lot: BCBJ1497V St Louis, MO)、3-インドキシル硫酸-d₄ は Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada)から購入した。

ヒトの血漿 50 μ L に対して、0.1%ギ酸メタノールを 150 μ L 添加し、ボルテックで混ぜる。その後、超音波処理を 5 分間行い、16,400 \times g で 20 分間、4°C で遠心を行い、得られた上清を 0.22 μ m (Millipore, Billerica, MA, USA) のフィルターでろ過し、液体クロマトグラフィータンデム型質量分析(LC-MS/MS)の測定サンプルとした。

骨格筋細胞では、50 mg に対し、800 μ L の 0.1%ギ酸メタノール(2.5 μ g/mL インドキシル硫酸-d₄ を含む)を添加し、Percellys 24 lysing and homogenisation system (M&S Instruments Inc., Osaka, Japan)で 6000 rpm、30 秒間ホモジナイズした。その後、超音波処理を 5 分間行い、16,400 \times g で 20 分間、4°C で遠心を行い、得られた上清を 0.22 μ m (Millipore, Billerica, MA, USA) のフィルターでろ過し、上清を測定サンプルとした。

LC-MS/MS は、それぞれ Prominence LC system (Shimadzu)と TSQ-Quantum-Ultra (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA)であり、測定はネガティブモードで行った。前処理を行ったサンプルのうち、4 μ L を使用した。測定に用いたカラムは 100 \times 2.0 mm SeQuant ZIC-HILIC (Merck Schuchardt)であり、移動相は溶媒 A) 98/2/0.1 = H₂O/アセトニトリル/ギ酸と溶媒 B) 2/98/0.1 = H₂O/アセトニトリル/ギ酸である。流速を 0.4 mL/min とし、以下の勾配で測定を行った。0–1 min: 10% 溶媒 B; 1.1–2 min: 10–55% 溶媒 B; 2.1–4 min: 55–90% 溶媒 B; 4.1–6 min: 90–100% 溶媒 B; 6.1–11 min: 100% 溶

媒 B; 11.1–15 min: 10% 溶媒 B。インドキシル硫酸および3-インドキシル硫酸-d₄は、SRM(selected reaction monitoring: 選択反応モニタリング)で行い、それぞれ *m/z* 212 と 80、*m/z* 216 と 80 で検出した。Spray 電圧, vaporizer 温度、イオントランスファーチューブはそれぞれ、3500 V、275°C、350°Cである。今回用いた測定系は、日内および日間の真度は 0.2 µg/mL で 0.049%、4.03%、であり、日内および日間の精度は 0.2 µg/mL で 3.1%、8.62%である。

4.7 骨格筋細胞内インドキシル硫酸の測定

骨格筋細胞 50 mg に対し、800 µL の 0.1%ギ酸メタノール(2.5 µg/mL インドキシル硫酸-d₄ を含む)を添加し、Percellys 24 lysing and homogenisation system (M&S Instruments Inc., Osaka, Japan)で 6000 rpm、30 秒間ホモジナイズした。その後、超音波処理を 5 分間行い、16,400 ×g で 20 分間、4°Cで遠心を行い、得られた上清を 0.22 µm(Millipore, Billerica, MA, USA)のフィルターでろ過し、上清を測定サンプルとした。LC-MS/MS は、それぞれ Nanospace SI-II HPLC platform (Shiseido, Tokyo, Japan)と TSQ Quantiva mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)であり、測定はネガティブモードで行った。前処理を行ったサンプルのうち、3 µL を使用した。測定に用いたカラムは 100 × 2.0 mm CAPCELL PAK C18 MG III 3-µm column (Shiseido)であり、移動相は溶媒 A) 10 mM 酢酸アンモニウムと溶媒 B) アセトニトリルである。流速を 0.3 mL/min とし、以下の勾配で測定を行った。0–1 min: 0–10% 溶媒 B; 1.1–2 min:

10–40% 溶媒 B; 2–3 min: 40–80% 溶媒 B; 3–5 min: 80–100% 溶媒 B; 5–7 min: 100% 溶媒 B; 7–10 min: 0% 溶媒 B。インドキシル硫酸および3-インドキシル硫酸-d₄は、SRM(selected reaction monitoring: 選択反応モニタリング)で行い、それぞれ *m/z* 212 と 80、*m/z* 216 と 80 で検出した。Spray 電圧, vaporizer 温度、イオントランスファーチューブはそれぞれ、2500 V、320°C、350°Cである。

4.8 細胞生存率と増殖能の評価

インドキシル硫酸の筋細胞への影響を検討するため、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)アッセイ(10009365; Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA)を行った。C2C12 細胞を 96 穴プレートに播種し、インドキシル硫酸を添加後、24 時間、48 時間の生存率を評価した。

細胞増殖能への影響については、C2C12 細胞を 96 穴プレートに 1×10^6 cells を播種し、インドキシル硫酸を添加後、24 時間、48 時間の細胞数をカウントした。

4.9 細胞外フラックスアナライザーを用いたミトコンドリア機能の評価

ミトコンドリア機能は Seahorse XF24 細胞外フラックスアナライザー(Seahorse Bioscience, North Billerica, NA, USA)を使用して評価した。フラックスアナライザーは細胞等の酸素濃度や水素濃度の変化をルミネッセンス法により検知し、酸素消費速度(oxygen consumption rate; OCR)と細胞外酸性化速度(extracellular acidification rate;

ECAR)を算出し(図 5)、ミトコンドリア呼吸 \rightleftharpoons 酸素消費速度(OCR)(図 6)、解糖系 \rightleftharpoons 細胞外酸性化速度(ECAR)として評価する(図 7)。C2C12 筋芽細胞を 2.0×10^4 cells/well で Seahorse XF-24 プレート(100777-004、lot:09715、Seahorse Bioscience)に播種し、先述した方法にて筋管細胞に分化させた。C2C12 筋管細胞に 1 mM インドキシル硫酸もしくは溶媒である 50 mM Tris-HCl を添加し、24 時間培養を行った。測定の 24 時間前に、測定で使用する sensor cartridge を 37°C でインキュベートする。測定直前に DMEM(5.6 mM グルコース、1 mM sodium pyruvate、32 mM NaCl、2 mM GlutaMax pH7.4 を含む)に培地を交換し、37°C で 30 分間インキュベートする。ミトコンドリアの機能の測定は、下記阻害剤を順次入れることで計測した。使用した阻害剤は、1 μ M オリゴマイシン(04876, lot:SLBF2946V, Sigma) : ATP 合成酵素阻害剤、2 μ M carbonyl cyanide 4phenylhydrazone (FCCP)(C2920, lot:122M4004V, Sigma) : ミトコンドリア呼吸鎖脱共役剤、1 μ M アンチマイシン A(A8674、lot:063M4075, Sigma)とロテノン(R8875、lot:SLBG7568V, Sigma):ミトコンドリア電子伝達阻害剤である(図 8)。またペントースリン酸経路の阻害剤として、1 mM 6-アミノニコチン酸アミド(6-aminonicotinamide、6-ANA) (A68203、lot: SHBC8376V, ALDRICH) を使用した。

4.10 ATP アッセイ

細胞内 ATP 産生は、Luminometric ATP assay kit (Toyo B-net, Tokyo, Japan)を使用した。 5×10^4 cells/well となる様に 96 穴プレートに播種する。様々な濃度のインドキシ

ル硫酸をグルコースもしくはガラクトース含有の DMEM で 24 時間培養し、ATP 反応液を添加し、23°C で 10 分間静置し、発光強度を Lumino Skan Ascent (Thermo Scientific) で計測した。

4.11 ミトコンドリアの形態解析

ミトコンドリアの形態は、Mitotracker Red CMXRos (Invitrogen) を使用した。細胞を 1×10^5 cells/well となる様に 24 穴プレートに細胞を播種した。先述の方法で C2C12 を筋管細胞に分化させ、200 nM Mitotracker Red CMXRos を入れ、30 分間室温で静置し、4%パラホルムアルデヒドで固定した。ミトコンドリアの形態観察は、All-in-one fluorescence microscope (BZ-X710, Keyence, Osaka, Japan) で行った。

4.12 キャピラリー電気泳動(CE)-MS 代謝プロファイル

CE-MS を使用した標的定量代謝物解析は、Human Metabolome Technologies Inc. (Yamagata, Japan) に測定を依頼した。解糖系、ペントースリン酸経路、TCA 回路、尿素回路、ポリアミン、クレアチニン、プリン、グルタチオン、ニコチンアミド、コリン、アミノ酸等の 116 個 (Table 2) の代謝物を測定し、定量を行った。 1×10^6 cells の C2C12 筋芽細胞を 6 cm dish に播種し、先述の方法にて筋管細胞に分化させた。24 時間飢餓状態にしたのち、1 mM インドキシル硫酸を添加し 24 時間培養した。その後、100 nM インスリンを添加し、60 分間培養し、5%マンニトール 1 mL で洗浄し、675

μL のメタノールで細胞を回収した。回収した細胞は、2,300 ×g で 5 分間遠心し、5 kD 分画フィルター (Milipore) で 9,100 ×g で 90 分間、4°C で遠心した。得られたろ過液を測定サンプルとして使用した。陽イオン化合物は、CE-TOFMS (Agilent CE-TOFMS system Machine No.3 fused silica capillary, i.d. 50 μm × 80 cm) を使用しポジティブモードで測定し、陰イオン化合物は CE-MS/MS (Agilent CE system and Agilent 6400 TripleQuad LC/MS Machine No.1, fused silicacapillary, i.d. 50 μm × 80 cm) でポジティブおよびネガティブモードにて測定を行った。

4.13 PCR (polymerase chain reaction) による遺伝子発現定量解析

細胞の RNA は RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) を使用して、添付文書に従って抽出を行った。抽出した RNA は SuperScript III First-standard Synthesis SuperMix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を使用して、cDNA に逆転写を行った。定量 PCR は適量の cDNA、0.4 μM の各プライマー、SYBR Premix EX Taq II (Takara Bio, Kusatsu, Japan) を含む Total 25 μL の溶液を作成する。ネガティブコントロールには、cDNA の代わりに超純水を使用した。定量 PCR は BioRad-CFX (BioRad) を用いた。熱変性、アニーリング、伸長反応はそれぞれ、5°C で 30 秒、95°C で 5 秒、60°C で 20 秒間、39 回繰り返して行った。グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Gapdh*) mRNA を内部標準物質とした。本研究では、*NFE2L2*, *G6PD2*, *PGD*, *ME1*, *NQO1*, *TALDO1*, *HMOX1*, *GCLC*, and *PPAT* に

特異的なプライマーを Takara Bio から購入した。プライマー情報を Table 3 にまとめた。

4.14 ウェスタンブロット解析

タンパク質発現解析に用いるサンプルは、protease inhibitor (Roche Diagnostics K.K, Tokyo, Japan)、phosphatase inhibitor cocktail (Sigma Aldrich)、1 mM PMSF (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)を含む 1 × RIPA buffer (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) で抽出し、Quick Start protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を用いてタンパク定量を行った後、2-メルカプトエタノールを含む 4×Laemmli Sample Buffer (BIO RAD)と混和し、ウェスタンブロットティング用のサンプルとした。Nrf2 タンパク質は不安定であり、分解しやすいため、抽出する際に 10 μM MG132 (Sigma Aldrich)を前述の抽出バッファーに添加した。25 μg のタンパク質を 7.5% Mini-Pro TEAN Precast Gel (Bio-Rad)にて分離をし、Trans-Blot® Turbo™ (BIO RAD)で PVDF メンブレンに転写を行った。PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal® (NYPBR01、TOYOBO)を用いて 1 時間室温でブロッキングを行った。ブロッキングの後、1 次抗体と 4°Cで一晩インキュベートした。1 次抗体はそれぞれ anti-NRF2 (1:200, #14596, Cell Signaling)、anti-p70S6 Kinase (1:1000, #9202, Cell Signaling)、anti-Phospho p70S6 Kinase (1:1000, #9205, Cell Signaling)、anti-PGD (1:1000, ab96225, Abcam)、anti-G6PD (1:1000, #12263, Cell Signaling)を用い、Solution1 for

primary antibody (NKB-101、TOYOBO)で希釈した。1次抗体後、メンブレンを洗浄し、2次抗体と室温で1時間インキュベートした。2次抗体は anti-rabbit IgG (1:5000, sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)、 anti-mouse IgG (1:5000, sc-2005, Santa Cruz)、 anti-rat IgG (1:5000, sc-2032, Santa Cruz)を用い、Solution 2 for primary antibody (NKB-101、TOYOBO)で希釈した。β-actin (1:5000, sc-47778, Santa Cruz) を内部標準とした。Super signal west Dura Extended Duration Substrate kit (Thermo Fisher Scientific)で検出し、Versa Doc 5000MP (BioRad)で撮影した。

4.15 電子スピン共鳴による活性酸素の検出

C2C12 から産生される活性酸素種は電子スピン共鳴 (electron spin resonance: ESR) にて解析を行った。C2C12 筋芽細胞を 5×10^5 cells/well で24穴プレートに播種し、筋管細胞に分化させた。C2C12 筋管細胞を5 mM D-グルコースを含むPBSで洗浄し、5 mM D-グルコースを含むPBSで30分間室温でインキュベートした。その後、様々な濃度のインドキシル硫酸を含む5 mM D-グルコースを含むPBSで37°C、1時間インキュベートした。2.97 M 5,5-1-ジメチル-1-ピロリン N-オキサイド(5,5-1-dimethyl-1-pyrroline N-Oxide: DMPO)を30 μL添加し、さらに10分間インキュベートした。ESR spectrometer (JES-FA-100; Jeol, Tokyo, Japan)を用いて細胞培養の培地を測定した。ESR測定条件は microwave frequency: 9.4 GHz; microwave power: 8.0 mW; time constant: 0.03 s; sweep time: 120 s, center field: 337.1 mT; scan range: ± 5 mT; modulation frequency: 100

kHz; field modulation width: 0.1 mT; amplitude: $\times 800$ である。

4.16 統計解析

統計解析は、JMP Pro 12 で行った。4 群での検討には、分散分析(Analysis of variance; ANOVA)で検討を行い、ANOVA で有意差が認められた場合、Tukey-Kramer 法により群間の解析を行った。相関回帰分析は、Spearman の順位相関で行った。

5. 研究結果

5.1 CKD マウス骨格筋の組織学的変化とインドキシル硫酸の蓄積

尿毒症性サルコペニアの骨格筋の変化を評価するため、アデニン誘発 CKD モデルマウスの骨格筋を調べた。アデニン誘発 CKD マウスの血中インドキシル硫酸は有意に上昇していた (図 9)。CKD マウスの骨格筋の組織学的変化を図 10 に示した。腓腹筋の筋束横断面は、CKD マウスで有意($p < 0.001$)に小さくなっており、筋萎縮が起きていることが確認された。次に血中に蓄積したインドキシル硫酸が骨格筋に与える影響を調べるため、LC-MS/MS とイメージング質量分析を用いて骨格筋内のインドキシル硫酸について検討した。図 11 上図に LC-MS/MS で骨格筋細胞内に蓄積したインドキシル硫酸濃度を示した。CKD マウスで骨格筋細胞内のインドキシル硫酸が有意に高値を示した。またイメージング質量分析では細胞内インドキシル硫酸は、 m/z 212 で検出されるが、コントロール群のマウス骨格筋では、インドキシル硫酸のシグナルはわずかにしか検出されないのに対し、CKD マウス骨格筋ではインドキシル硫酸のシグナルが強く検出された(図 11)。これらの結果から、CKD では血中に蓄積したインドキシル硫酸は骨格筋内に取り込まれ、筋萎縮が起きていることが示された。

5.2 C2C12 細胞を用いたインドキシル硫酸の細胞増殖・生存能に与える影響

インドキシル硫酸の骨格筋に与える影響を調べるため、マウス筋芽細胞株 C2C12 と分化させた C2C12 筋管細胞を使用した。C2C12 筋芽細胞を用いて、インドキシル

硫酸の骨格筋内への取り込みについて、LC-MS/MS で調べた(図 12)。コントロールマウスと同様に、通常の培地で培養した C2C12 筋芽細胞ではインドキシル硫酸が検出されなかったが、1 mM インドキシル硫酸を含む培地で培養した C2C12 筋芽細胞ではおよそ $4 \mu\text{g}/1 \times 10^6 \text{ cells}$ が検出され、細胞外インドキシル硫酸が、培養している筋芽細胞内に取り込まれることが示唆された。次に、C2C12 筋芽細胞および筋管細胞を用いてインドキシル硫酸が与える骨格筋細胞増殖と生存能への影響について調べた。通常状態で培養すると、C2C12 筋芽細胞は、24 時間、48 時間で 2.4 倍、5.7 倍に増殖していた。一方、1 mM インドキシル硫酸存在下の培地で培養すると、細胞増殖が有意に抑制された(図 13)。C2C12 筋芽細胞および筋管細胞の生存能は、インドキシル硫酸存在下では、24 時間、48 時間ともに濃度依存的に有意に低下した(図 13)。以上の結果から、インドキシル硫酸は細胞増殖および生存能を抑制することで骨格筋細胞において毒性を示すことが示唆された。

5.3 インドキシル硫酸が筋細胞に与える代謝変化

本研究では、インドキシル硫酸が C2C12 筋管細胞に与える細胞内代謝変化を、CE-MS で検討を行った。本研究では、解糖系、ペントースリン酸経路、TCA 回路、尿素回路、ポリアミン、クレアチニン、プリン、グルタチオン、ニコチンアミド、コリン、アミノ酸の 116 個化合物の標的定量をおこなった (Table 2)。図 14 に CE-MS のヒートマップを示した。インドキシル硫酸で刺激した細胞では、解糖系およびペント

ースリン酸経路やグルタチオン代謝等の抗酸化応答関連経路の代謝物が有意に上昇していた。一方、インドキシル硫酸で刺激することで、TCA 回路やグルタミンーグルタミン酸などのエネルギー関連経路の代謝物が有意に減少していた。

次にインドキシル硫酸で刺激した際の、個々の代謝物の変化を検討した。図 15 に C2C12 筋管細胞の解糖系、TCA 回路、ペントースリン酸経路、グルタチオン代謝のそれぞれの代謝物を定量した結果を示した。ヒートマップの結果と同様に、インドキシル硫酸で 24 時間刺激した細胞において、解糖系の中間代謝物である 3-ホスホグリセリン酸(3-phosphoglyceric acid: 3-PG)と 2-ホスホグリセリン酸 (2-phosphoglyceric acid: 2-PG)、ペントースリン酸経路の中間代謝物である 6-ホスホグルコン酸 (6-phosphogluconic acid: 6-PG)、リブローズ-5-リン酸 (ribulose 5-phosphate: Ru5P)、リボース-5-リン酸 (ribose 5-phosphate: R5P)、キシルロース 5-リン酸 (xylulose 5-phosphate: X5P)、セドヘプツロース-7-リン酸 (sedoheptulose 7-phosphate: S7P)、グルタチオン代謝の reduced glutathione (GSH)、oxidized glutathione (GSSG)、嫌気代謝の乳酸が有意に高値を示した。一方、インドキシル硫酸で 24 時間刺激した細胞において TCA 回路の 2-オキソグルタミン酸 (2-oxoglutarate: 2-OG)、フマル酸、リンゴ酸、またアミノ酸のルタミンとグルタミン酸 が有意に低値を示した。

次に、インドキシル硫酸で刺激したことによる細胞内代謝変化を確認するため、パラメーター解析を行った(図 16)。インドキシル硫酸で刺激をした細胞において、細胞内酸化ストレスを示す全グルタチオンレベル(GSH + 2GSSG) ($p < 0.01$)が有意に高値を

示し、グルタチオン酸化還元比(GSH/GSSG ratio) ($p < 0.01$)は有意に低値を示した。つまり、インドキシル硫酸で刺激した細胞では酸化ストレスが亢進していることが示された。また低酸素代謝の指標となる乳酸/ピルビン酸比 (lactate/pyruvate ratio) ($p < 0.05$)は有意に高値を示し、アミノ酸の合成または分解の度合いを間接的に示すグルタミン/2-オキソグルタル酸比 (glutamine/2-oxoglutarate ratio) ($p = 0.127$) はインドキシル硫酸で刺激した細胞内で上昇傾向を示した。つまりインドキシル硫酸で刺激した細胞では、低酸素状態であり、アミノ酸の分解が亢進していることが示された。ペントースリン酸経路の入り口の反応であるグルコース 6 リン酸からリボース 5 リン酸への変換は、解糖系またはペントースリン酸経路の活性度合いを示す。グルコース 6 リン酸/リボース 5 リン酸比 (glucose-6-phosphate/ribose-5-phosphate: G6P/R5P ratio) ($p < 0.05$)は有意に低値を示した。つまり、インドキシル硫酸で刺激した細胞では、ペントースリン酸経路が活性化していることが示された。主にグルタミンへ異化されるアミノ酸である(Arg + Gln + Glu + His) ($p < 0.05$), 主にオキザロ酢酸へ異化されるアミノ酸である(Asn + Asp) ($p < 0.05$), またリンゴ酸とアスパラギン酸の比(malate/Asp ratio) ($p < 0.05$)はインドキシル硫酸で刺激した細胞において、有意に低値を示した。つまり、インドキシル硫酸で刺激した細胞では、アミノ酸の TCA 回路に関連した代謝物への異化が抑制されていることが示された。ここまでの結果から、筋細胞内ではインドキシル硫酸が解糖系、ペントースリン酸経路、グルタチオン代謝を亢進させ、TCA 回路やグルタミンの同化を抑制させていることが分かった。

5.4 インドキシル硫酸が与える解糖系および酸化リン酸化活性の変化

骨格筋においてインドキシル硫酸が与える代謝機能への影響を、ミトコンドリア機能と解糖系の活性に着目し、細胞外フラックスアナライザーを用いて調べた。生化学的経路およびミトコンドリア電子伝達系の概略図を図5に示した。ミトコンドリアにおける電子伝達系の活性とATP産生率を調べるため、細胞酸素消費速度 (oxygen consumption rate: OCR) を計測した。ATP合成や電子伝達系の活性を評価するため、オリゴマイシン、carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP)、ロテノンアンチマイシンAを順次添加し、リアルタイムでOCRを計測した。

図17に1 mM インドキシル硫酸で0、1、6、24時間刺激をした際の、C2C12筋管細胞内の細胞内OCRの変化を示した。インドキシル硫酸で刺激した細胞において、基礎呼吸量 ($p < 0.01$)、ATP合成関連呼吸量 ($p < 0.01$)、 H^+ リーク ($p < 0.01$)、最大呼吸能 ($p < 0.01$)が、刺激時間6時間までは時間依存的に有意に低下した。興味深いことに、インドキシル硫酸で刺激した細胞において、刺激時間24時間でATP合成関連呼吸量 ($p < 0.0001$)、最大呼吸能 ($p < 0.01$)が有意に回復した。

図18に1 mM インドキシル硫酸で0、1、6、24時間刺激をした際の、C2C12筋管細胞内の細胞外酸性化速度 (extracellular acidification rate: ECAR) の変化を示した。最大解糖系能 (Max glycolysis capacity) は6時間まで時間依存的にインドキシル硫酸刺激で有意に低下した ($p < 0.001$)。ECARから、インドキシル硫酸で24時間刺激す

ることで最大解糖系能が低下しているが、オリゴマイシンを投与して Complex V を阻害した際に、解糖系が代償的に活性化していることが示された。Complex V を阻害した際の代償的な解糖系の活性 (Area under the curve: AUC) は 6 時間まで時間依存的に減少するが、24 時間で有意に上昇した。インドキシル硫酸の 24 時間刺激で見られた回復は、細胞内 OCR でも認められていた(図 17)。今回の結果から、筋細胞ではインドキシル硫酸刺激 6 時間までは、インドキシル硫酸はミトコンドリア機能および解糖系を時間依存的に障害しているが、その後、24 時間では障害されたミトコンドリア ATP 産生を代償するように解糖系が上方調整されていることが示唆された。

5.5 筋細胞における Nrf2 を介したペントースリン酸経路の活性

本研究では、筋細胞においてインドキシル硫酸刺激 24 時間でどのような成分が解糖系の上方調整に関与しているか調べた。前述した代謝物解析において、インドキシル硫酸で刺激した C2C12 筋管細胞ではペントースリン酸経路の代謝物が有意に高値を示していた(図 15)。ペントースリン酸経路では、酸化ストレス下で NADPH 産生が亢進する。細胞質における NADPH のような還元因子の産生は ECAR の上昇に寄与し、つまりこれは解糖系の上方調整を示すこととなる。このことから我々はインドキシル硫酸刺激でペントースリン酸経路が亢進し NADPH の産生が増加し、その結果 ECAR が上昇した、と考えた。そこでインドキシル硫酸刺激による解糖系の上方調整において、ペントースリン酸経路の亢進が寄与しているかについて、ペ

ントースリン酸経路の阻害剤である 6-アミノニコチン酸アミド (6-aminonicotinamide: 6-ANA)を用いてフラックスアナライザーで調べた。図 19 にインドキシル硫酸の刺激の有無、6-ANA の有無の OCR の結果を示した。コントロール細胞において、6-ANA によるペントースリン酸経路の阻害は、最大呼吸能を有意に低下させたが、インドキシル硫酸刺激した細胞ではさらに最大呼吸能が減少した。図 20 にインドキシル硫酸の刺激の有無、6-ANA の有無の ECAR の結果を示した。 コントロール細胞では、6-ANA によるペントースリン酸経路の阻害で ECAR に変化は認められなかったが、インドキシル硫酸で刺激した細胞では ECAR の低下が認められた。以上の結果から、インドキシル硫酸の刺激による ECAR の上昇は、ペントースリン酸経路の亢進が寄与していることが明らかとなった。

そこで、インドキシル硫酸の刺激によるペントースリン酸経路の亢進の分子機構を調べるため、本研究では酸化ストレス応答因子である nuclear factor (erythroid-2-related factor)-2 (Nrf2)と Nrf2 の直接標的因子、さらにペントースリン酸経路を調節している遺伝子の発現について検討した^{23) 24)}。最初に本研究では、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するかを調べるため、C2C12 筋管細胞をインドキシル硫酸で刺激をし、産生される活性酸素を直接検出することが可能である電子スピン共鳴 (electron spin resonance: ESR)で解析を行った。インドキシル硫酸で刺激をした細胞の培養液を測定した ESR スペクトルを図 21 に示した。ESR スペクトルは、典型的な 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO)がヒドロキシルラジカル (\cdot

OH) をトラップした DMPO-OH のスペクトルを示した。DMPO-OH の産生は、インドキシル硫酸濃度依存的に有意に増加した。DMPO-OH の産生は、インドキシル硫酸刺激後、早期段階の 15 分から 6 時間まで恒常的に産生されていた(図 22)。

次に本研究では、Nrf2 の発現とペントースリン酸経路の NADPH 産生に関わる酵素であるグルコース-6-リン酸 (glucose-6-phosphate dehydrogenase: G6PD) とホスホグルコン酸脱水素酵素 (phosphogluconate dehydrogenase: PGD) などの発現について検討を行った²³⁾。その結果、インドキシル硫酸で刺激をすることで筋細胞内の Nrf2 の発現が 6 時間で有意に上昇した(図 23)。Nrf2 タンパク質の発現と同様に、Nrf2 によって直接調節されている抗酸化酵素であるヘムオキシゲナーゼ(heme oxidase-1: Hmox-1)と NAD(P)H-キノンオキシドレダクターゼ-1 (NAD(P)H-quinone oxidoreductase-1: Nqo-1)の mRNA 発現もインドキシル硫酸の刺激によって筋細胞内で有意に上昇していた(図 24)。さらに、G6PD と PGD のタンパク質の発現もインドキシル硫酸の刺激によって筋細胞内で有意に上昇した(図 25)。G6PD や PGD 以外にも、NADPH 産生に関わるリンゴ酸酵素(malic enzyme 1: ME 1)、トランスアルドラーゼ(transaldolase: TALDO)、 γ -グルタミン酸システインリガーゼ(γ -glutamate-cysteine ligase: γ -GCL) の mRNA 発現 (*Me1*、*Taldo*、 *γ -Gcl*)が、インドキシル硫酸の刺激によって筋細胞内で有意に上昇した(図 26)。しかし、ホスホリボシルピロリン酸アミドトランスフェラーゼ (phosphoribosyl pyrophosphate amidetransferase: PPAT) の mRNA 発現 (*Ppat*)はインドキシル硫酸の刺激によって筋細胞内で有意な上昇は認められな

かった。これらの結果から、筋細胞ではインドキシル硫酸の刺激による酸化ストレスに対して、Nrf2 活性化を介したペントースリン酸経路の NADPH 産生関連酵素の発現が上昇することで抗酸化応答が亢進していることが示唆された。

5.6 筋細胞におけるインドキシル硫酸によるミトコンドリア障害

細胞外フラックスアナライザーの結果から、インドキシル硫酸の刺激によって OCR が低下することを前述した。つまり、筋細胞ではインドキシル硫酸の刺激によってミトコンドリア機能が低下していることを示している。そこで、インドキシル硫酸の筋細胞内ミトコンドリアへの毒性を評価するため、C2C12 細胞をグルコースの代わりにガラクトースを添加した培地で培養した。細胞はガラクトースを解糖系に用いることができないため、ガラクトース培地で培養された細胞は ATP の産生をミトコンドリアの酸化的リン酸化で行う。そのため、細胞をガラクトース培地で培養することでミトコンドリアの毒性を評価することが可能となる^{25,26,27)}。図 27 にガラクトース培地で培養した細胞のフラックスアナライザーの結果を示した。ガラクトース培地で培養した細胞の最大呼吸能および解糖系能が、グルコース培地で培養した細胞よりも低下しており、インドキシル硫酸で刺激することで、さらに低下していた。また先にも述べたが、グルコース培地で培養した細胞の場合、オリゴマイシンによる阻害で、ECAR が増加していた。しかしガラクトース培地で培養した細胞ではオリゴマイシンによる阻害で、ECAR の増加が消失していた。つまり、オリゴマイシンによる阻害に

よる ECAR の増加が、解糖系およびペントースリン酸経路に由来していることを示している。またこの ECAR の増加の消失は、インドキシル硫酸で刺激した細胞の方がより顕著であった。

さらに本研究では、グルコース培地およびガラクトース培地で培養した筋細胞の ATP 産生量についての検討も行った(図 28)。インドキシル硫酸で刺激した細胞では、ATP 産生量が有意に減少していたが、この減少はガラクトース培地で培養した筋細胞の方がより顕著であった。以上の結果から、筋細胞においてインドキシル硫酸によって起こったミトコンドリア障害は、ATP 産生の減少を誘導することが明らかとなった。

5.7 インドキシル硫酸によるミトコンドリアの形態異常

フラックスアナライザーの結果から、インドキシル硫酸が筋細胞のミトコンドリア障害を引き起こすことが分かった。そこで、本研究では、Mitotracker Red を用いてミトコンドリアの形態について観察を行った(図 29)。インドキシル硫酸で刺激した細胞では、筋細胞のミトコンドリアネットワークの長さが通常の細胞よりも短くなっており、ミトコンドリアの分裂が亢進していた。ミトコンドリアネットワークと各々のミトコンドリアの長さについて計測を行ったところ、どちらの長さもインドキシル硫酸で刺激した細胞において、濃度・時間依存的に有意に短くなっていた。以上の結果から、筋細胞においてインドキシル硫酸はミトコンドリアの分裂を

亢進し、ミトコンドリアネットワーク崩壊を誘導することが明らかとなった。

5.8 インドキシル硫酸による酸性条件下での代謝変化

進行した CKD では、インドキシル硫酸が代謝性アシドーシスや筋肉の消耗の原因となる体液の酸性化を誘導する^{16,17)}。そこで本研究では、生理条件下である pH7.4 と酸性条件下である pH7.0 でフラックスアナライザーを用いて筋細胞の代謝の変化を検討した(図 30)。pH7.4 の生理条件下ではオリゴマイシンによる阻害で解糖系の亢進が、インドキシル硫酸刺激で抑制されるが、この解糖系の亢進の抑制は pH7.0 の酸性条件下では、より強く抑制されていた。つまり、インドキシル硫酸による代謝変化は、酸性条件下ではより増強されることを示している。

5.9 インドキシル硫酸による筋細胞の筋タンパク質の合成経路の阻害

ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ/p70S6 キナーゼ(p70S6K)の活性化を介したインスリンシグナルは、筋タンパク質合成において重要である²⁸⁾。筋細胞におけるインドキシル硫酸によるインスリンシグナルへの影響を調べるため、筋タンパク質合成経路である p70S6K のリン酸化レベルについて評価を行った。C2C12 筋管細胞における p70S6K のリン酸化レベルは、インスリン刺激後 30 分で最大となった(図 31)。このリン酸化レベルはインドキシル硫酸で刺激することで、半分となった(図 32)。これらの結果から、インドキシル硫酸は筋細胞において筋タンパク質の合

成経路を阻害することが明らかとなった。

5.10 CKD 患者における血中インドキシル硫酸濃度と骨格筋量の関係

本研究では腹膜透析治療を受けている CKD 患者を対象とし、血中インドキシル硫酸濃度と筋量について調べた。今回対象とした 14 名の CKD 患者の詳細を Table 1 にまとめた。図 33 に健常人と CKD 患者の血中インドキシル硫酸濃度を比較した結果を示した。健常人では、血中インドキシル硫酸濃度が $0.88 \pm 0.44 \mu\text{g/mL}$ であり、CKD 患者では $18.8 \pm 6.8 \mu\text{g/mL}$ であり、CKD 患者で有意 ($p < 0.01$) に高値を示した。CKD 患者を対象とし、InBody で得られた体成分データとの関連について検討を行った。その結果、血中インドキシル硫酸濃度と骨格筋量に有意な負の相関 ($r = -0.57$, $p < 0.05$)、筋肉量に有意な負の相関 ($r = -0.56$, $p < 0.05$) が認められた (図 34)。年齢 ($r = -0.31$, $p = 0.28$) や体脂肪率 ($r = -0.04$, $p = 0.88$) では相関は認められなかった。年齢、性別を補正項目とし標準最小 2 乗法で多変量解析を行った結果、インドキシル硫酸濃度と骨格筋量に関連があることが確認された ($\beta = -3.8$, $p = 0.03$)。さらに、透析導入時のインドキシル硫酸濃度と透析治療 2 年後の骨格筋量を調べた結果、透析導入時に血中インドキシル硫酸濃度が高い患者ほど、2 年後の骨格筋量がより減少していることが分かった (図 35)。これらの結果は、体内に蓄積したインドキシル硫酸は CKD 患者における筋量減少に関連していることを示している。

考察

本研究では、インドキシル硫酸が筋細胞において抗酸化応答として代謝変化を引き起こし、これらの過剰な抗酸化応答への代謝変化が CKD における尿毒症性サルコペニアの発症に寄与していることを明らかにした (図 36)。本研究の新規所見は、筋細胞においてインドキシル硫酸が①Nrf2 関連の抗酸化応答経路 (ペントースリン酸経路やグルタチオン代謝) の上方調整、②エネルギー産生経路 (TCA 回路、グルタミン代謝、ミトコンドリアの酸化的リン酸化) の下方調整、③ミトコンドリアネットワークの崩壊、④ATP 産生の減少、⑤筋タンパク質の合成経路の阻害することを明らかにしたことである (図 37)。

インドキシル硫酸は疎水性有機アニオンの物質であるため、組織内への取り込みは、有機アニオントランスポーター(OAT)を介している。腎臓においては近位尿細管の基底外側膜に発現し、血液からインドキシル硫酸を取り込んでいる。腎臓以外に OAT は血液脳関門、単球、骨芽細胞、筋細胞に発現している^{29,30,31,32)}。今回 CKD モデルマウスの骨格筋細胞内にインドキシル硫酸の蓄積が確認されたが、筋細胞に発現している OAT を介して血中に蓄積したインドキシル硫酸が筋細胞内に取り込まれ蓄積したと考えられる。

CKD における筋肉の消耗では、炎症性細胞や脂肪組織で生成された TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカインにより、骨格筋の主要なタンパク分解系のユビキチン・プロテアソーム系のユビキチンリガーゼ (MuRF1、Atrogin1)を増加させることにより筋分解を促進することが報告されている^{33,34,35)}。しかし本研究において IL-6 など

の炎症性サイトカインの発現について検討したが、変化は認められなかった。そのため本研究では炎症系の経路とは異なった経路があると考え、尿毒症性サルコペニアの発症機構について評価を行った。

インドキシル硫酸の筋細胞への蓄積は酸化ストレスと代謝変化を誘導し、またエネルギー産生の低下とミトコンドリアネットワークの崩壊を引き起こす。本研究では、インドキシル硫酸によって活性酸素が産生され、また活性酸素のスキャベンジャーであるグルタチオン代謝が亢進していることを明らかにした。グルタチオン代謝では、GSSGはGSSG還元酵素によってGSHに還元される。この過程では、NADPからNADPHが産生される。本研究ではインドキシル硫酸で刺激した筋細胞では、十分な量のグルタチオンがGSH合成に使用されており、 γ -GCL（グルタチオン合成の律速酵素³⁶⁾）の発現が上昇していた。さらにNADPH産生に関連する、Nrf2の標的酵素であるG6PDやPGDの発現もインドキシル硫酸で刺激した細胞で増加していた。

本研究では、インドキシル硫酸刺激で筋細胞内では、ペントースリン酸経路が亢進し、TCA回路が停滞し、その結果ATPの不足が生じることを明らかにした。ペントースリン酸経路は、酸素を必要としないグルコース酸化経路であり、ATPも産生する。ペントースリン酸経路はこのほかに、酸化ストレスから保護するためNADPHを産生する経路でもあり、核酸合成につながる経路でもある³⁷⁾。細胞内においてグルコースがグルコース6リン酸(G6P)に変換され、G6Pがペントースリン酸経路で使

用されるか、または解糖系で使用されるかについては、細胞内の NADPH、核酸合成、ATP の要求性に依存する³⁷⁾。本研究では、酸化的小よび非酸化的小ペントースリン酸経路のどちらもインドキシル硫酸で刺激をした筋細胞で亢進していた。酸化的小ペントースリン酸経路は NADPH を産生し、非酸化的小ペントースリン酸経路はペントースリン酸経路と解糖系を可逆的につないでいる。今回の結果から、インドキシル硫酸刺激によって生じた酸化ストレスで NADPH 要求性が筋細胞で高まり、筋細胞がその要求性に応じてペントースリン酸経路を活性化させたと考えられる。

骨格筋は非常に活発な代謝が起きており、心臓、肝臓や腎臓で見られるように、ATP 産生のために膨大なミトコンドリアを必要とするため、生体異物誘発性のミトコンドリア毒性を起こしやうい^{38) 39) 40)}。本研究では、インドキシル硫酸刺激で筋細胞において TCA 回路の停滞、ATP 産生とミトコンドリア機能の低下、ミトコンドリアネットワークの崩壊が確認された。さらにガラクトース培地で培養した筋細胞では ATP 産生量が低下し、またオリゴマイシンによる阻害後の ATP レベルを維持するための代償的な解糖系亢進も認められなかった。つまりこれらの結果は、筋細胞ではインドキシル硫酸がミトコンドリア毒性を誘導し、ATP の不足を引き起こすことを示している。

サルコペニアは多くの CKD 患者に罹患しており、透析治療中の患者の死亡率増加のリスク因子となっているにも関わらず^{3,41)}、サルコペニアの進行におけるインドキシル硫酸の骨格筋やミトコンドリア動態に与える影響よくわかっていなかった。

本研究でインドキシル硫酸が脂肪に作用することなく、筋肉へ作用し、またミトコンドリアネットワークの崩壊を介してサルコペニアを進行させる可能性を示した。

CKD 患者には体内に尿毒症物質が蓄積しているが、これまでに血中尿毒症物質濃度と骨格筋量との関連は調べられていなかった。本研究で血中インドキシル硫酸濃度が年齢や死亡率とは関連がないが、筋量低下に関連していることを見出した。特に、透析治療導入時の血中インドキシル硫酸濃度と、透析治療 2 年後の骨格筋減少量に関連を見出したことは新規知見である。

筋量の低下やカヘキシーはこれまでにガン⁴²⁾、AIDS^{42,43)}、糖尿病^{43,44)}において多数観察されてきた。カヘキシーはサルコペニアのような基礎エネルギー消費の上昇や脂肪や筋組織が失われる消耗症候群である。ガン細胞はグルコース、グルタミンのようなたくさんの栄養を消費し、代謝物を異化経路へ切り替え、Nrf2 活性化によるペントースリン酸経路の活性化を通して増殖する²³⁾。

さらに本研究では、インドキシル硫酸刺激がグルタミンの減少および Nrf2 活性化によるペントースリン酸経路の活性を誘導することを明らかにした。これらのことから、過剰なペントースリン酸経路の活性のような代謝変化は、様々な病気において筋量を低下させ、基礎エネルギー消費量を増加させる可能性がある。

Klotho は酸化ストレスから組織や細胞を保護するタンパク質である⁴⁵⁾。近年、腎臓においてインドキシル硫酸が活性酸素の産生を介した NFκB の活性化を介して Klotho の発現を減少させることが報告された^{46,47)}。加えて、いくつかの研究では

Klotho レベルと骨格筋の生理学に臨床的な関連を報告している^{46,48,49})。これらのことから、CKD における骨格筋量の低下には Klotho の下方調整が関与している可能性も考えられる。

本研究では、尿毒症物質であるインドキシル硫酸によって誘導された代謝の変化とミトコンドリアネットワークの崩壊が尿毒症性サルコペニアの重大な原因であることを示し、これらの代謝変化は尿毒症性サルコペニアの治療や予防の標的となる可能性を示した。

本研究における細胞実験から得られた所見は、CKD モデルマウスや CKD 患者の筋肉組織を対象として、同様の代謝変化を確認して検証する必要がある。

6. 結論

CKD では蓄積したインドキシル硫酸が筋細胞で酸化ストレスを惹起し、そのことによる代謝フローが過剰な抗酸化応答経路へと変化し、その代償として ATP 産生および蛋白同化反応の低下をきたしサルコペニアを引き起こす。

7. 参考文献

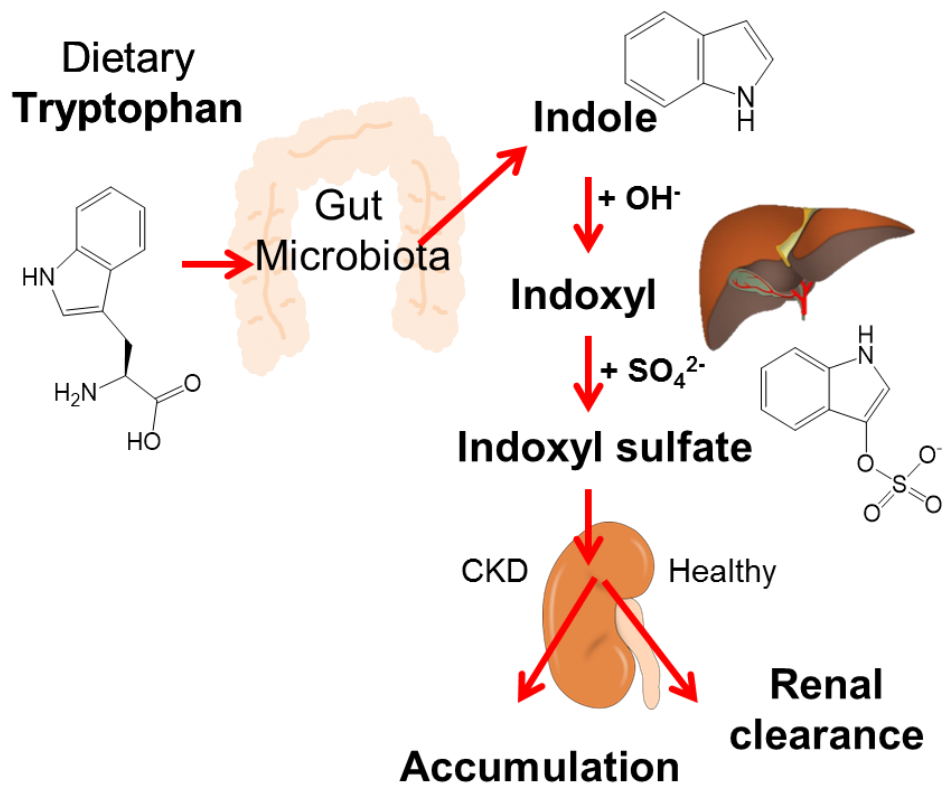
- 1 Zhang, Q. L. & Rothenbacher, D.: Prevalence of chronic kidney disease in population-based studies: systematic review. *BMC Public Health* 2008; 8: 117
- 2 Baumgartner, R. N. *et al.*: Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *Am J Epidemiol* 1998; 147: 755-763
- 3 Stenvinkel, P. *et al.*: Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int* 1999; 55: 1899-1911
- 4 Arai, H., Akishita, M. & Chen, L. K.: Growing research on sarcopenia in Asia. *Geriatr Gerontol Int* 2014; 14 Suppl 1: 1-7
- 5 Souza, V. A., Oliveira, D., Mansur, H. N., Fernandes, N. M. & Bastos, M. G.: Sarcopenia in chronic kidney disease. *J Bras Nefrol* 2015; 37: 98-105
- 6 von Haehling, S., Anker, M. S. & Anker, S. D.: Prevalence and clinical impact of cachexia in chronic illness in Europe, USA, and Japan: facts and numbers update 2016. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2016; 7: 507-509
- 7 Kim, J. C., Kalantar-Zadeh, K. & Kopple, J. D.: Frailty and protein-energy wasting in elderly patients with end stage kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2013; 24: 337-351
- 8 Sato, E. *et al.*: Metabolomic analysis of human plasma from haemodialysis patients. *Eur J Clin Invest* 2011; 41: 241-255
- 9 Vanholder, R. *et al.*: Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int* 2003; 63: 1934-1943
- 10 Barreto, F. C., Barreto, D. V., Liabeuf, S., Drueke, T. B. & Massy, Z. A.: Effects of uremic toxins on vascular and bone remodeling. *Semin Dial* 2009; 22: 433-437
- 11 Kazama, J. J., Iwasaki, Y. & Fukagawa, M.: Uremic osteoporosis. *Kidney Int*

- Suppl (2011) 2013; 3: 446-450
- 12 Liabeuf, S., Druke, T. B. & Massy, Z. A.: Protein-bound uremic toxins: new insight from clinical studies. *Toxins (Basel)* 2011; 3: 911-919
 - 13 Ellis, R. J. *et al.*: Indoxyl sulphate and kidney disease: Causes, consequences and interventions. *Nephrology (Carlton)* 2016; 21: 170-177
 - 14 Kraut, J. A. & Kurtz, I.: Metabolic acidosis of CKD: diagnosis, clinical characteristics, and treatment. *Am J Kidney Dis* 2005; 45: 978-993
 - 15 Bailey, J. L. *et al.*: The acidosis of chronic renal failure activates muscle proteolysis in rats by augmenting transcription of genes encoding proteins of the ATP-dependent ubiquitin-proteasome pathway. *J Clin Invest* 1996; 97: 1447-1453
 - 16 Caso, G. & Garlick, P. J.: Control of muscle protein kinetics by acid-base balance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2005; 8: 73-76
 - 17 Verove, C., Maisonneuve, N., El Azouzi, A., Boldron, A. & Azar, R.: Effect of the correction of metabolic acidosis on nutritional status in elderly patients with chronic renal failure. *J Ren Nutr* 2002; 12: 224-228
 - 18 Crossland, H., Constantin-Teodosiu, D., Gardiner, S. M., Constantin, D. & Greenhaff, P. L.: A potential role for Akt/FOXO signalling in both protein loss and the impairment of muscle carbohydrate oxidation during sepsis in rodent skeletal muscle. *J Physiol* 2008; 586: 5589-5600
 - 19 Liu, H. *et al.*: Mass Spectrometry Imaging of Kidney Tissue Sections of Rat Subjected to Unilateral Ureteral Obstruction. *Sci Rep* 2017; 7: 41954
 - 20 Vanholder, R., Schepers, E., Pletinck, A., Nagler, E. V. & Glorieux, G.: The uremic toxicity of indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate: a systematic review. *J Am Soc Nephrol* 2014; 25: 1897-1907

- 21 Niwa, T. & Shimizu, H.: Indoxyl sulfate induces nephrovascular senescence. *J Ren Nutr* 2012; 22: 102-106
- 22 Story, D. L. *et al.*: Effects of dietary protein, adenine, and allopurinol on growth and metabolism of rats. *J Nutr* 1977; 107: 1044-1052
- 23 Mitsuishi, Y. *et al.*: Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell* 2012; 22: 66-79
- 24 Kuehne, A. *et al.*: Acute Activation of Oxidative Pentose Phosphate Pathway as First-Line Response to Oxidative Stress in Human Skin Cells. *Mol Cell* 2015; 59: 359-371
- 25 Marroquin, L. D., Hynes, J., Dykens, J. A., Jamieson, J. D. & Will, Y.: Circumventing the Crabtree effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants. *Toxicol Sci* 2007; 97: 539-547
- 26 Dott, W., Mistry, P., Wright, J., Cain, K. & Herbert, K. E.: Modulation of mitochondrial bioenergetics in a skeletal muscle cell line model of mitochondrial toxicity. *Redox Biol* 2014; 2: 224-233
- 27 Rana, P., Nadanaciva, S. & Will, Y.: Mitochondrial membrane potential measurement of H9c2 cells grown in high-glucose and galactose-containing media does not provide additional predictivity towards mitochondrial assessment. *Toxicol In Vitro* 2011; 25: 580-587
- 28 Conejo, R. & Lorenzo, M.: Insulin signaling leading to proliferation, survival, and membrane ruffling in C2C12 myoblasts. *J Cell Physiol* 2001; 187: 96-108
- 29 Deguchi, T. *et al.*: Major role of organic anion transporter 3 in the transport of indoxyl sulfate in the kidney. *Kidney Int* 2002; 61: 1760-1768

- 30 Enomoto, A. *et al.*: Role of organic anion transporters in the tubular transport of indoxyl sulfate and the induction of its nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1711-1720
- 31 Motojima, M., Hosokawa, A., Yamato, H., Muraki, T. & Yoshioka, T.: Uremic toxins of organic anions up-regulate PAI-1 expression by induction of NF-kappaB and free radical in proximal tubular cells. *Kidney Int* 2003; 63: 1671-1680
- 32 Sekine, T., Watanabe, N., Hosoyamada, M., Kanai, Y. & Endou, H.: Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter. *J Biol Chem* 1997; 272: 18526-18529
- 33 Cheung, W. W., Paik, K. H. & Mak, R. H.: Inflammation and cachexia in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2010; 25: 711-724
- 34 Raj, D. S. *et al.*: Interleukin-6 modulates hepatic and muscle protein synthesis during hemodialysis. *Kidney Int* 2008; 73: 1054-1061
- 35 Du, J. *et al.*: Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J Clin Invest* 2004; 113: 115-123
- 36 Lu, S. C.: Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 2009; 30: 42-59
- 37 Wamelink, M. M., Struys, E. A. & Jakobs, C.: The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: a review. *J Inherit Metab Dis* 2008; 31: 703-717
- 38 Dykens, J. A., Marroquin, L. D. & Will, Y.: Strategies to reduce late-stage drug attrition due to mitochondrial toxicity. *Expert Rev Mol Diagn* 2007; 7: 161-175
- 39 Neustadt, J. & Pieczenik, S. R.: Medication-induced mitochondrial damage and disease. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52: 780-788
- 40 Fahal, I. H.: Uraemic sarcopenia: aetiology and implications. *Nephrol Dial*

- Transplant 2013; 29: 1655-1665
- 41 Bergstrom, J., Furst, P., Alvestrand, A. & Lindholm, B.: Protein and energy intake, nitrogen balance and nitrogen losses in patients treated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Kidney Int* 1993; 44: 1048-1057
- 42 Berger, J. R. *et al.*: Oxandrolone in AIDS-wasting myopathy. *AIDS* 1996; 10: 1657-1662
- 43 Severinsen, K., Obel, A., Jakobsen, J. & Andersen, H.: Atrophy of foot muscles in diabetic patients can be detected with ultrasonography. *Diabetes Care* 2007; 30: 3053-3057
- 44 Pupim, L. B. *et al.*: Increased muscle protein breakdown in chronic hemodialysis patients with type 2 diabetes mellitus. *Kidney Int* 2005; 68: 1857-1865
- 45 Kuro-o, M. *et al.*: Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997; 390: 45-51
- 46 Adijiang, A., Shimizu, H., Higuchi, Y., Nishijima, F. & Niwa, T.: Indoxyl sulfate reduces *klotho* expression and promotes senescence in the kidneys of hypertensive rats. *J Ren Nutr* 2011; 21: 105-109
- 47 Shimizu, H. *et al.*: Indoxyl sulfate downregulates renal expression of *Klotho* through production of ROS and activation of nuclear factor- κ B. *Am J Nephrol* 2011; 33: 319-324
- 48 Avin, K. G. *et al.*: Skeletal muscle as a regulator of the longevity protein, *Klotho*. *Front Physiol* 2014; 5: 189
- 49 Semba, R. D. *et al.*: Low Plasma *Klotho* Concentrations and Decline of Knee Strength in Older Adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2016; 71: 103-108



【インドキル硫酸合成経路】

図1 体内におけるインドキル硫酸の合成経路

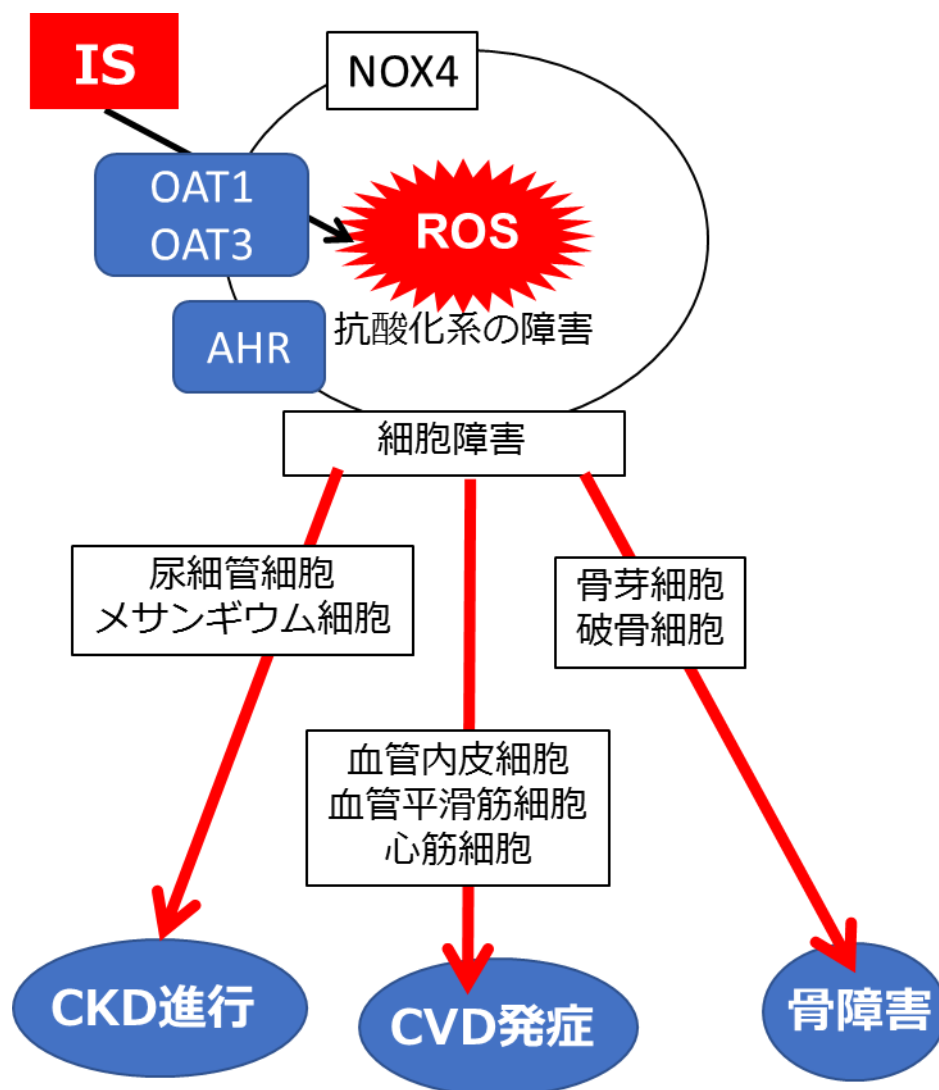


図2 インドキシル硫酸(IS)による細胞障害と臓器障害

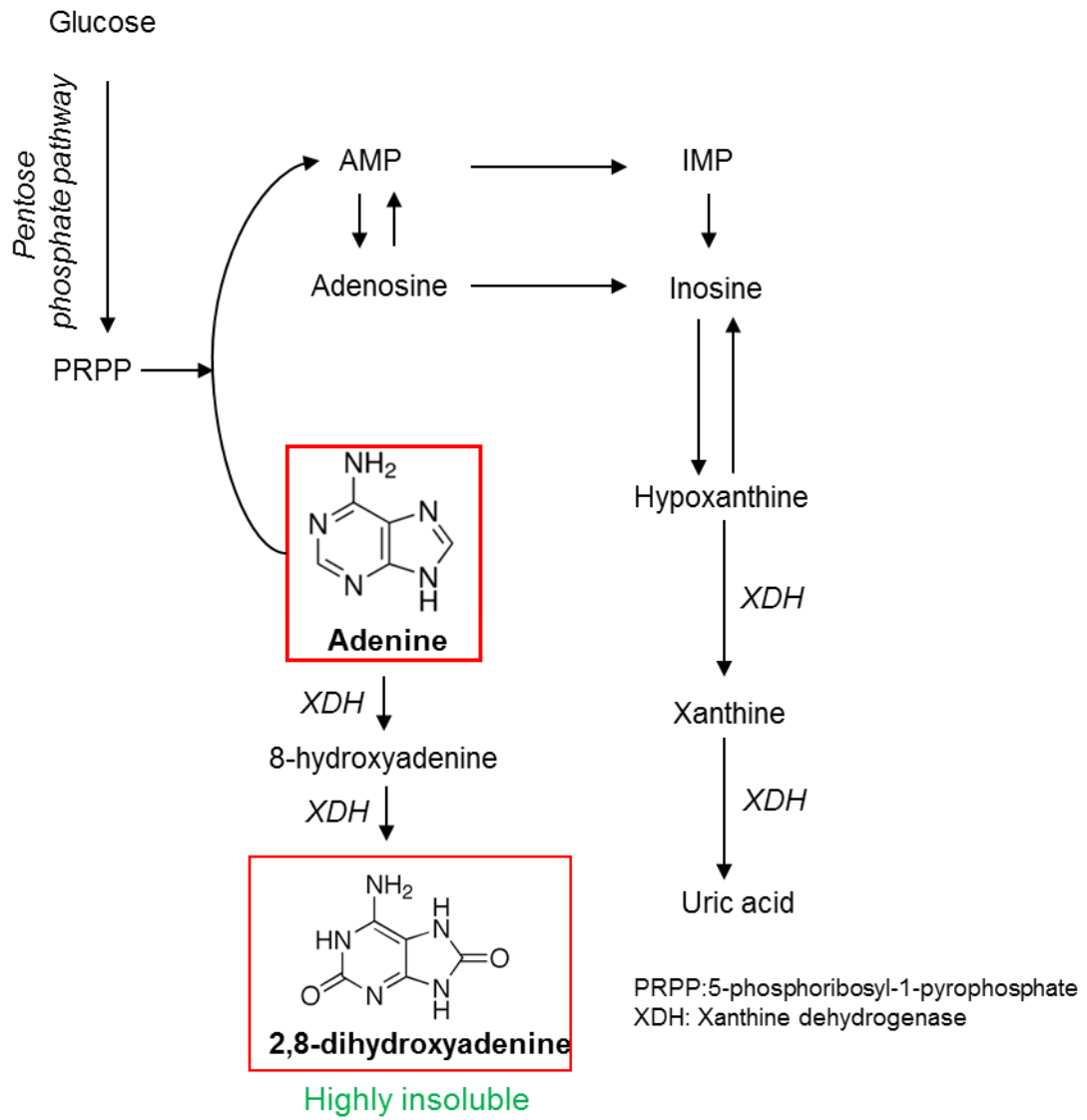


図3 アデニンから2,8-ジヒドロキシアデニンへの代謝経路

Mouse: C57BL/6 (7~8週齢)

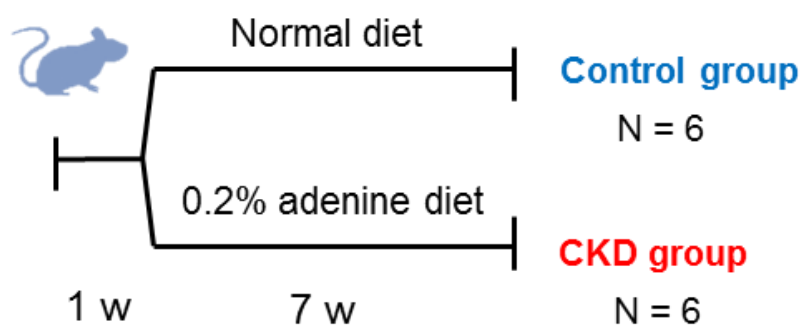


図4 CKDモデルマウスの作製スケジュール

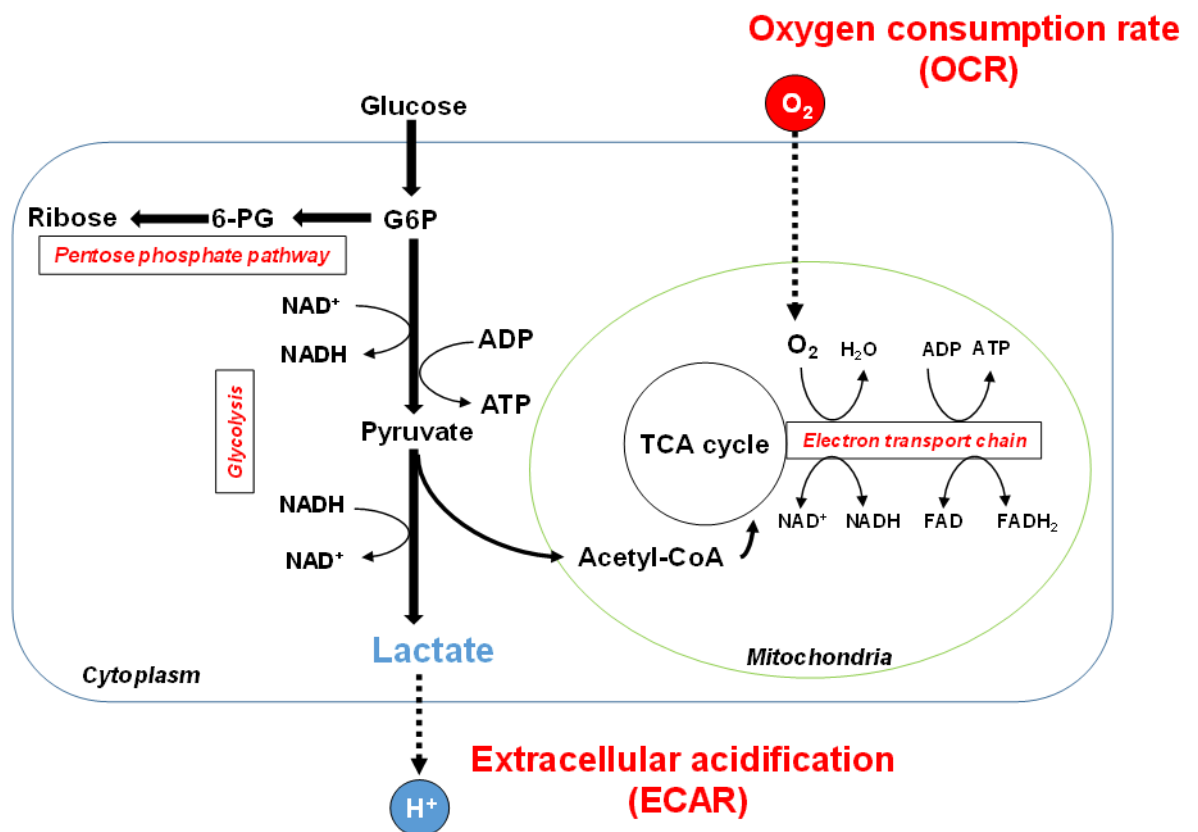


図5 フラックスアナライザーで評価する生化学的経路

Mitochondrial respiration

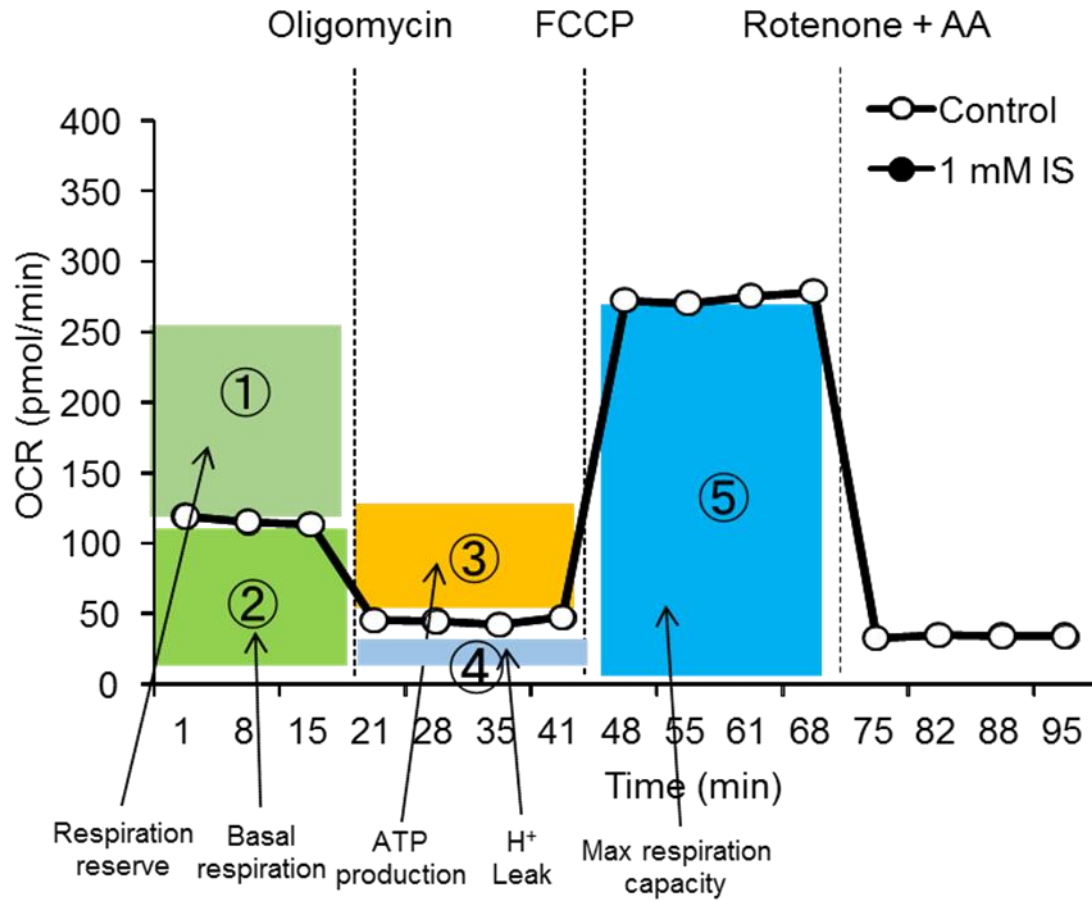


図 6 フラックスアナライザーの代表的な酸素消費率(OCR)の結果

Glycolysis

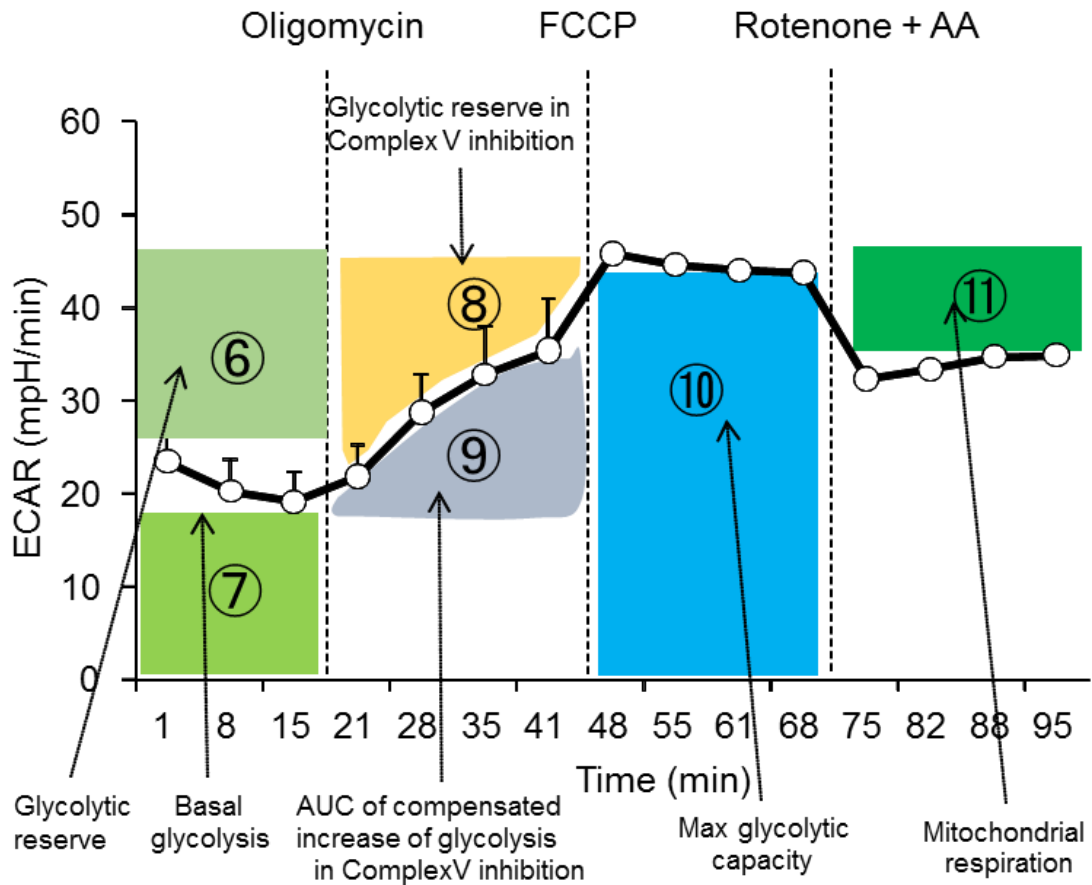


図7 フラックスアナライザーの代表的な細胞外酸化速度(ECAR)の結果

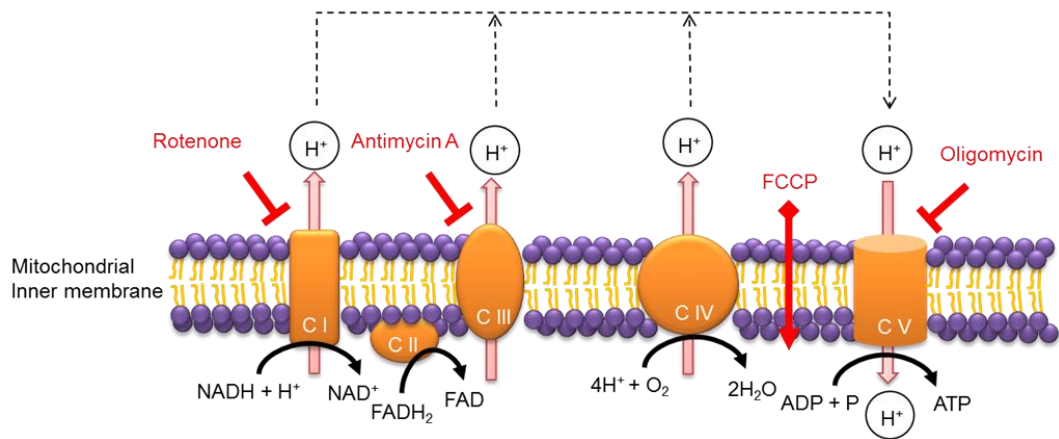


図 8 フラックスアナライザーで使用する阻害剤

【血中インドキシル硫酸濃度】

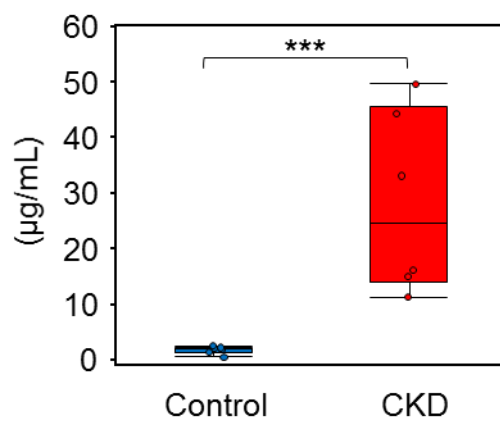


図9 血中インドキシル硫酸濃度

***; $p < 0.0001$ を示しており、各群 $n = 6$ である。

【骨格筋 (腓腹筋) 筋束横断面の面積】

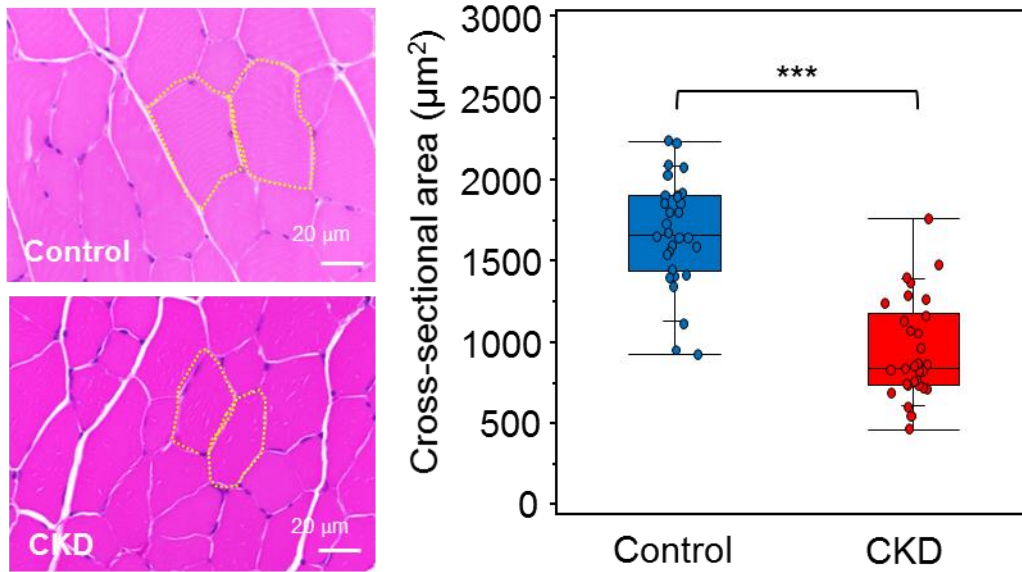
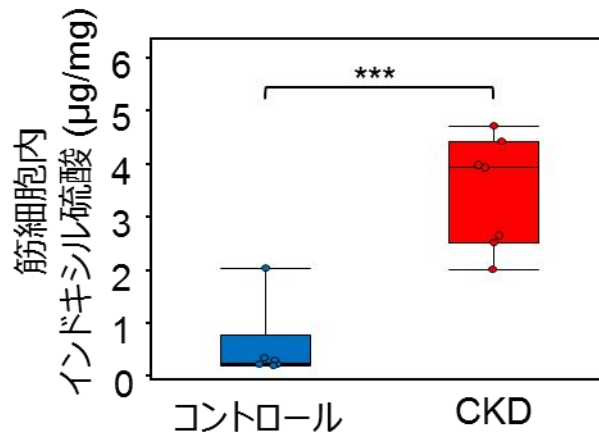


図 10 骨格筋(腓腹筋)の筋束横断面面積の比較

***; $p < 0.0001$ を示しており、ランダムに筋束横断面を 30 個計測した。

【筋細胞内へのインドキシル硫酸の取り込み】



【イメージングMSによる筋細胞内IS分布】

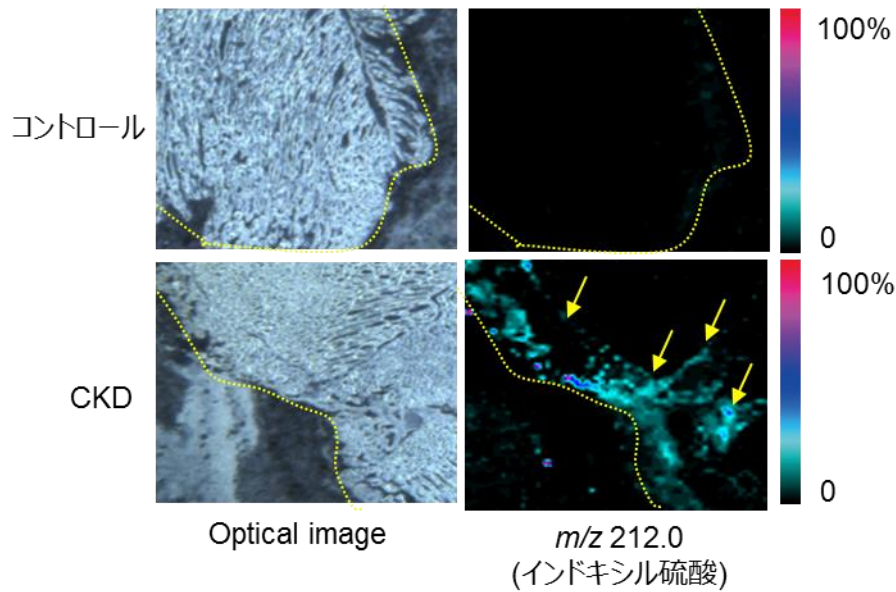


図 11 骨格筋内インドキシル硫酸(IS)濃度とイメージング質量分析を用いた骨格筋 (大腿筋)内インドキシル硫酸の分布

***; $p < 0.001$ を示しており、各群 $n = 6$ である。

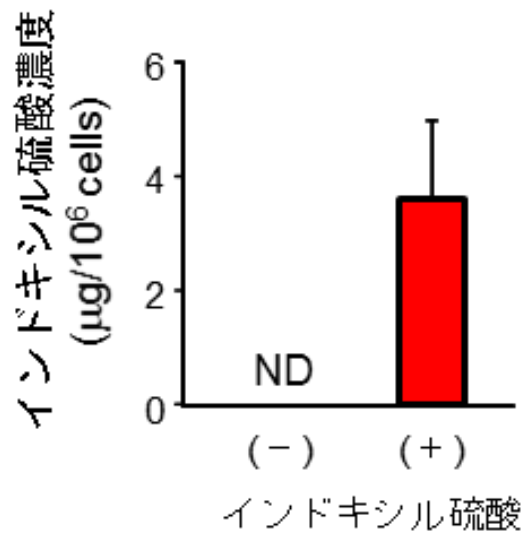


図 12 インドキシル硫酸の C2C12 細胞への取り込み

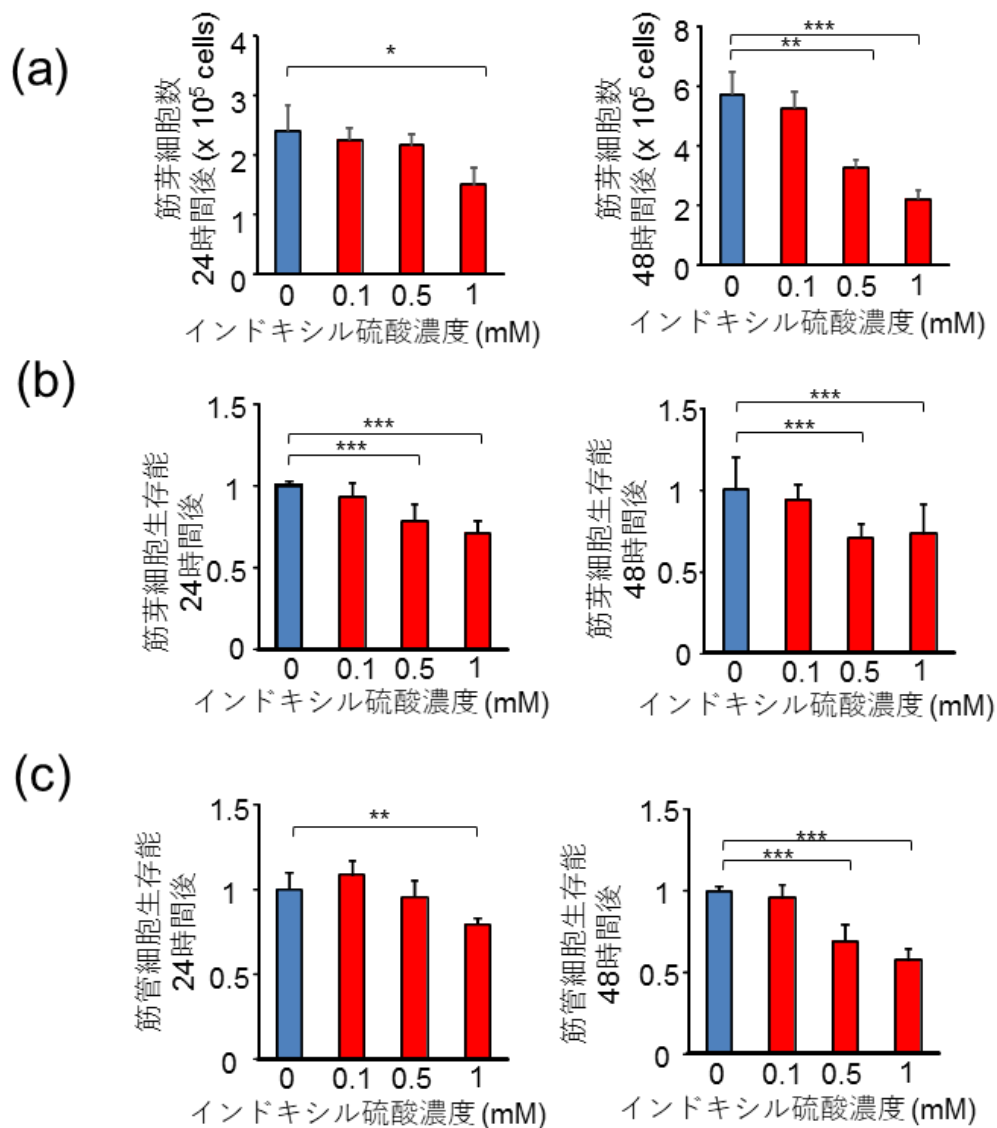


図 13 C2C12 細胞を用いたインドキシル硫酸が与える細胞増殖・生存能への影響

(a) C2C12 筋芽細胞の細胞増殖、(b) C2C12 筋芽細胞の生存能、(c) C2C12 筋管細胞の生存能。

*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.0001$ を示しており、各群 $n = 7 - 8$ である。

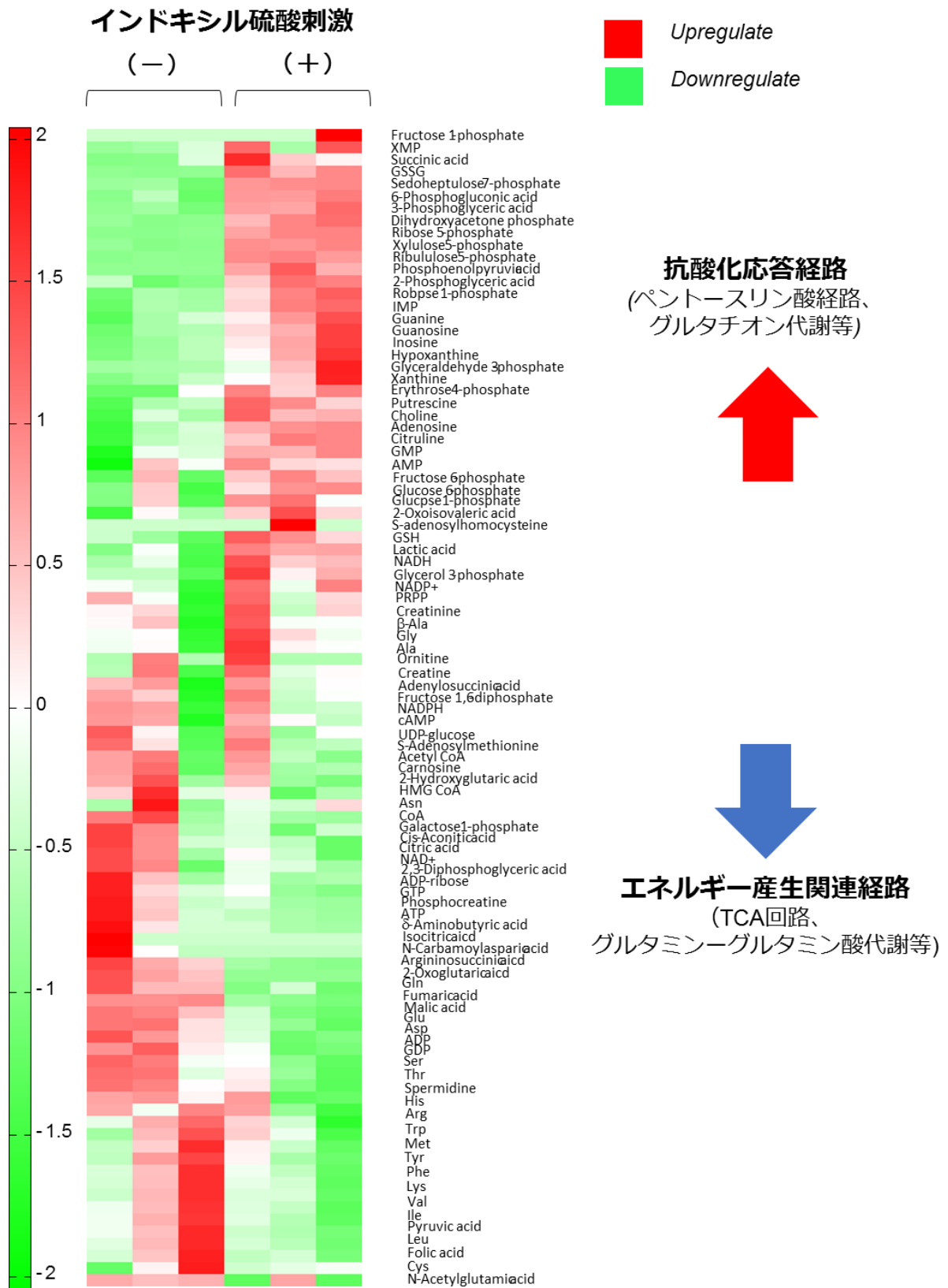


図 14 インドキシル硫酸の C2C12 筋管細胞に与える代謝変化のヒートマップ

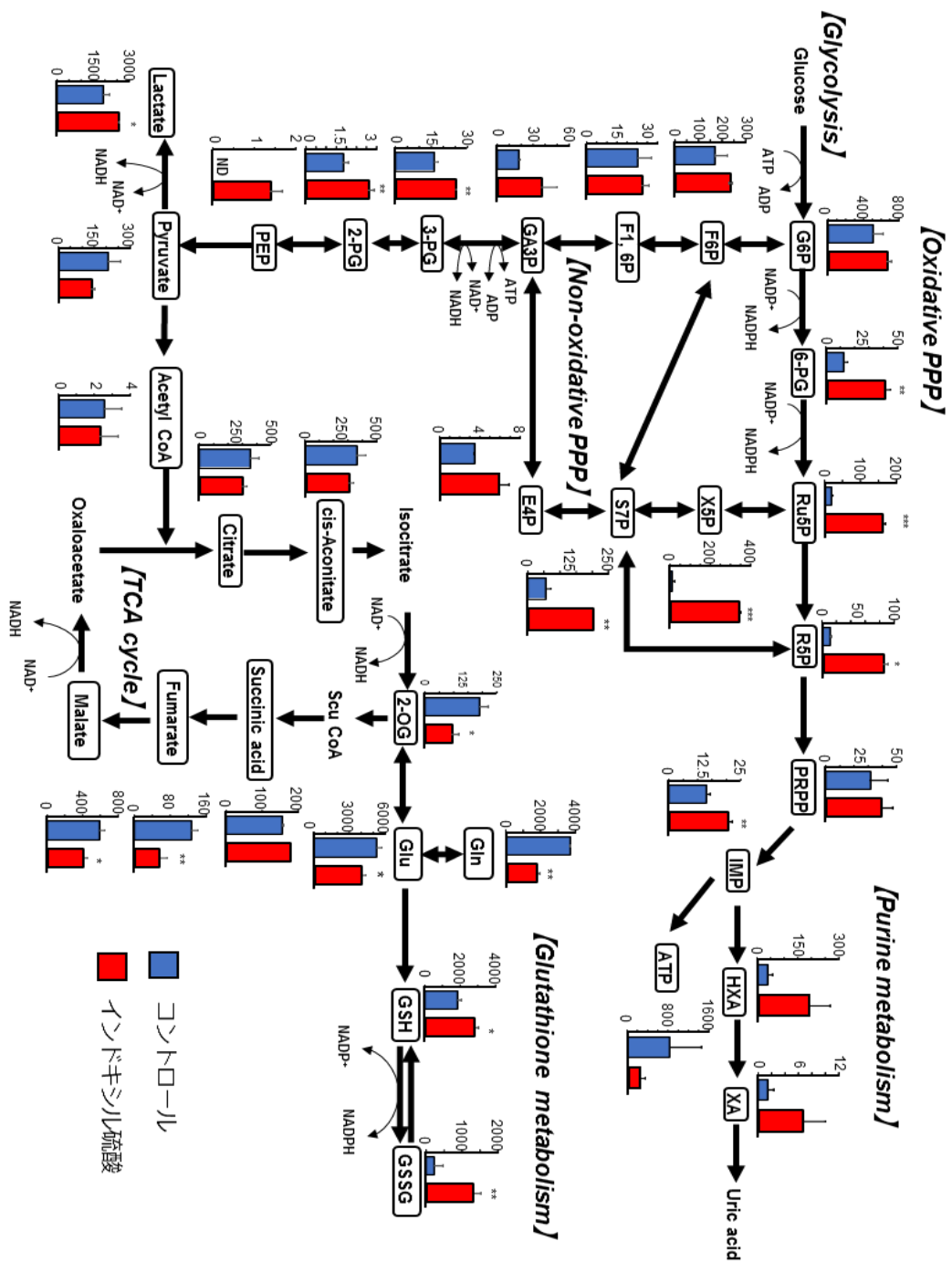


図 15 インドキシル硫酸の C2C12 筋管細胞に与える代謝変化
 解糖系、TCA 回路、ペントースリン酸経路、グルタリオン代謝、核酸代謝の各代謝物の比較。Welch t-test、*、p < 0.05, **、p < 0.01, ***、p < 0.0001 を示しており、各群 n = 3 である。

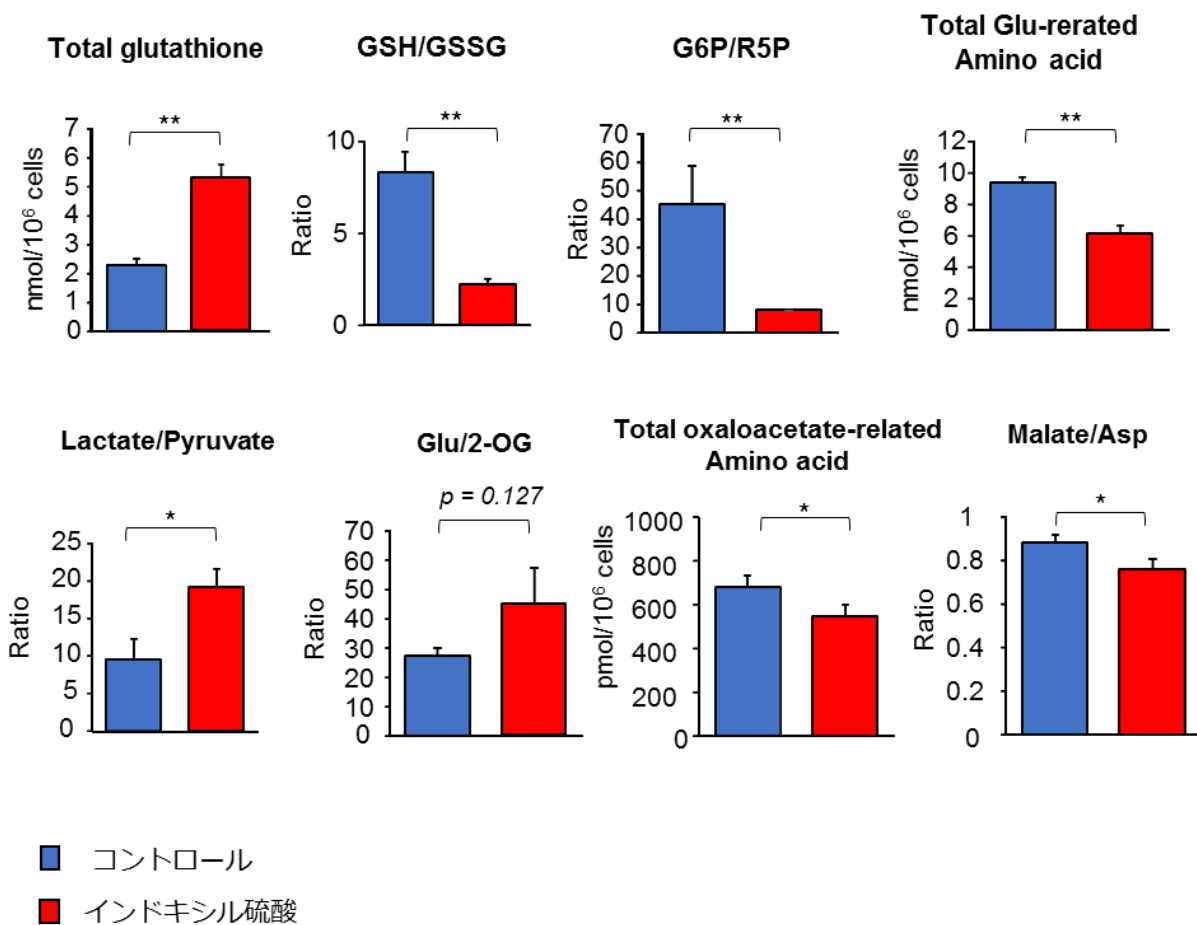


図 16 インドキシル硫酸の C2C12 筋管細胞に与える代謝変化におけるパラメーター解析

Welch t-test、 *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.0001$ を示しており、各群 $n = 3$ である。

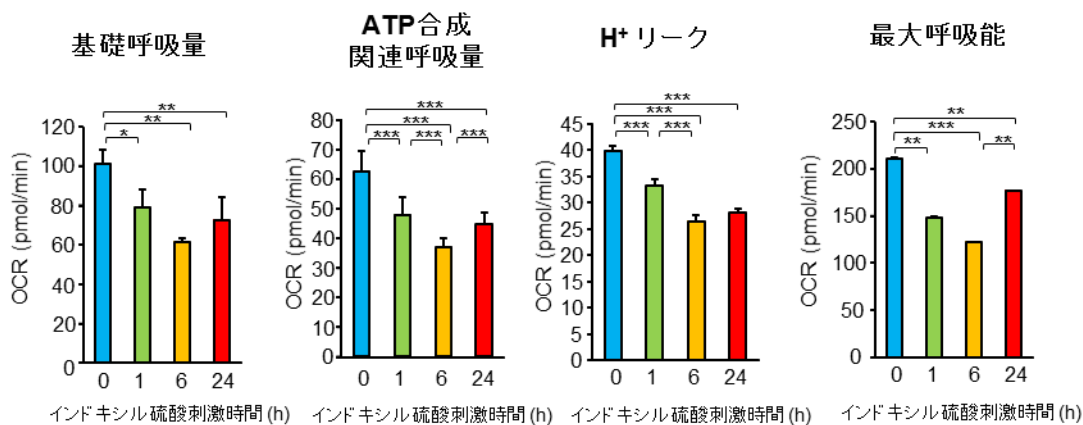
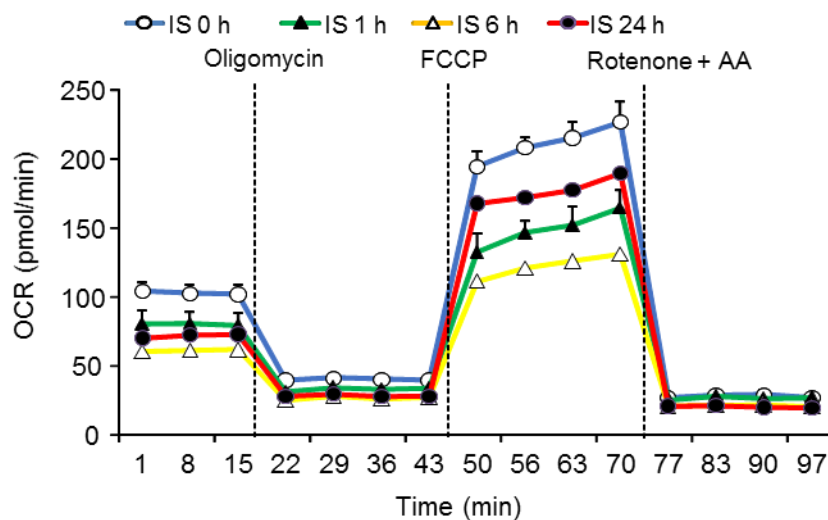


図 17 酸素消費速度(OCR)によるインドキシル硫酸(IS)の C2C12 筋管細胞に与えるミトコンドリア機能の評価

*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.0001$ を示しており、各群 $n = 3$ である。

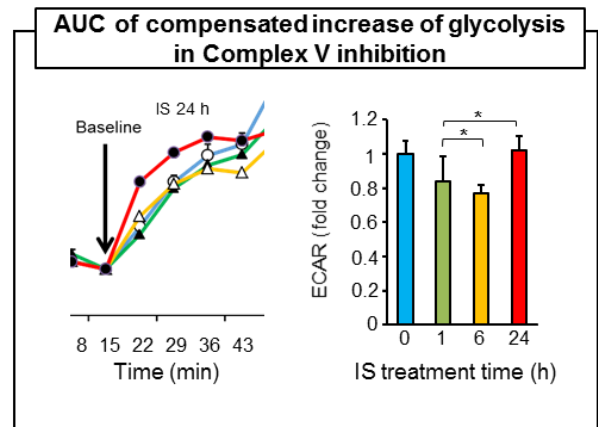
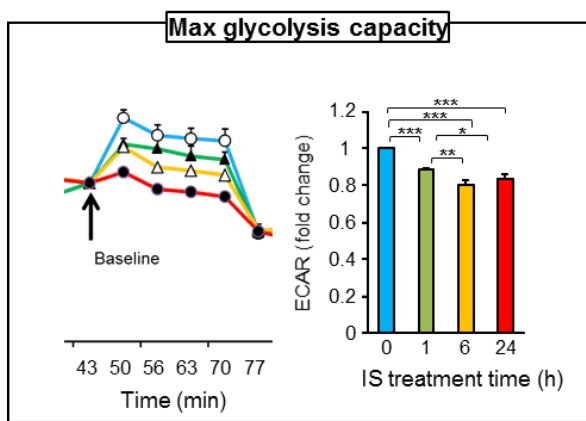
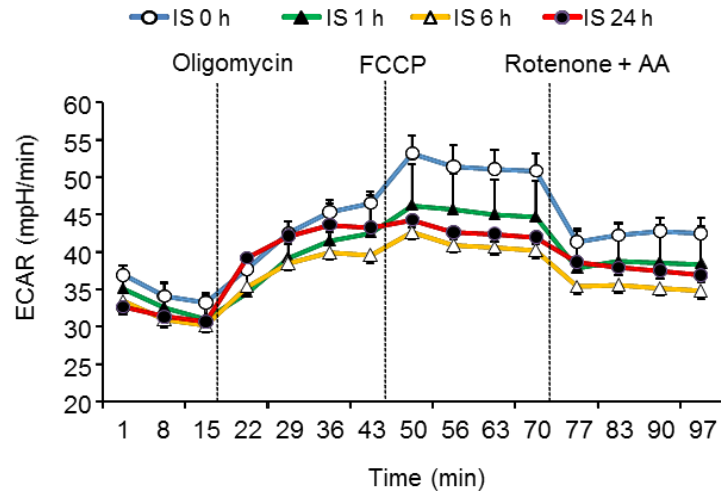
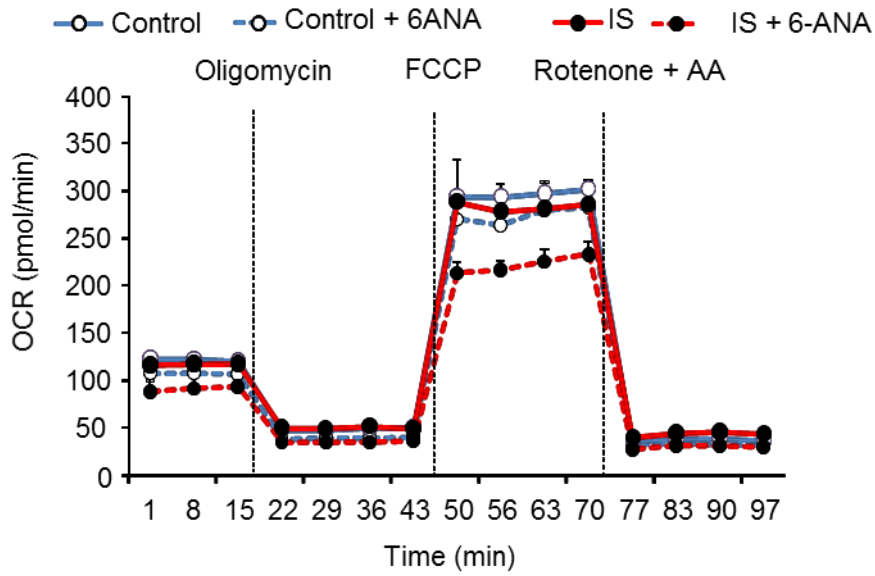


図 18 細胞外酸性化速度(ECRA)によるインドキシル硫酸(IS)の C2C12 筋管細胞
に与える解糖系への影響

*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.0001$ を示しており、各群 $n = 3$ である。



Max respiration capacity

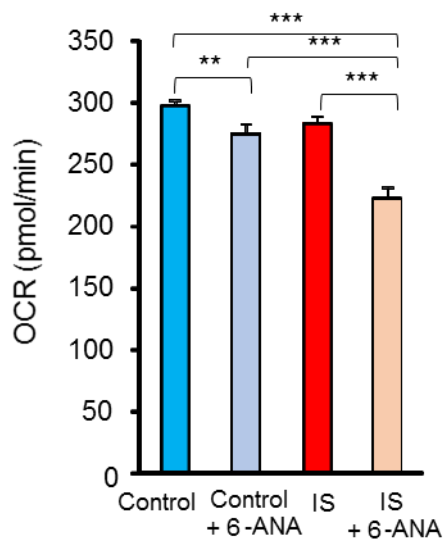


図 19

ペ ン

トースリン酸経路の阻害剤(6-ANA)を使用した際の酸素消費速度(OCR)の変化

*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.0001$ を示しており、各群 $n = 3$ である。

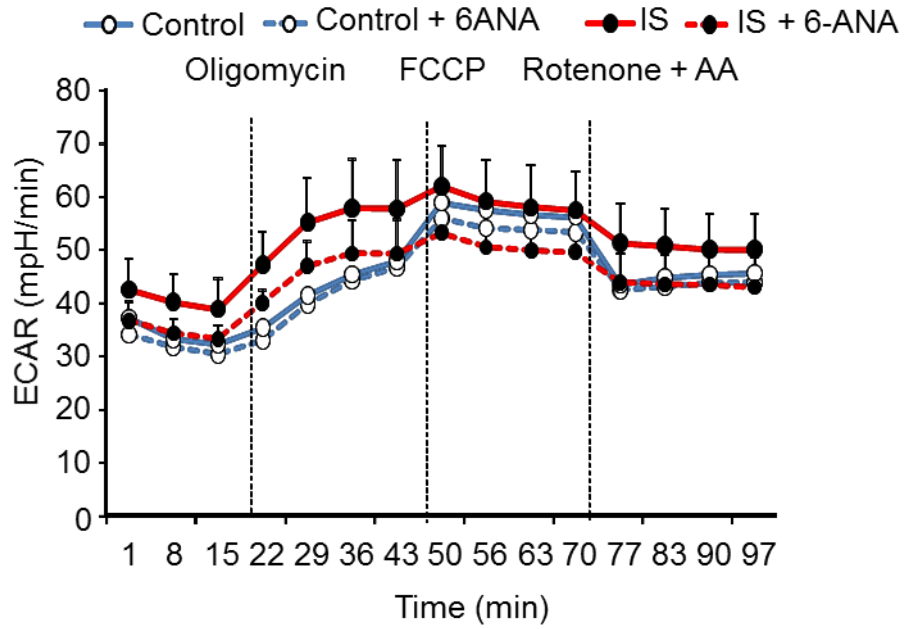


図 20 ペントースリン酸経路の阻害剤(6-ANA)を使用した際の細胞外酸性化速度 (ECAR)の変化、IS;インドキシル硫酸

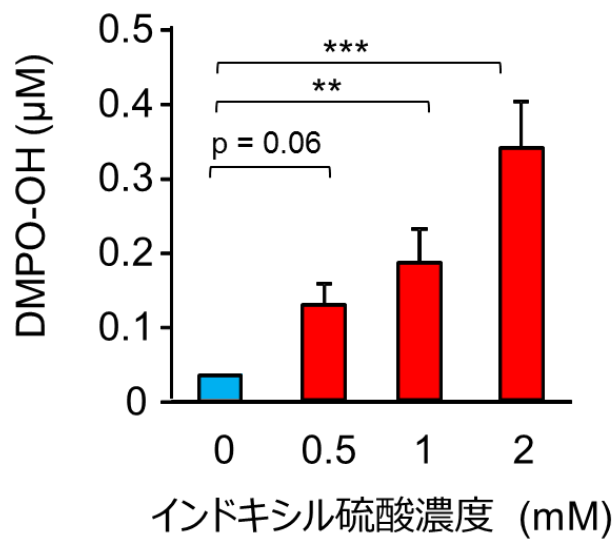
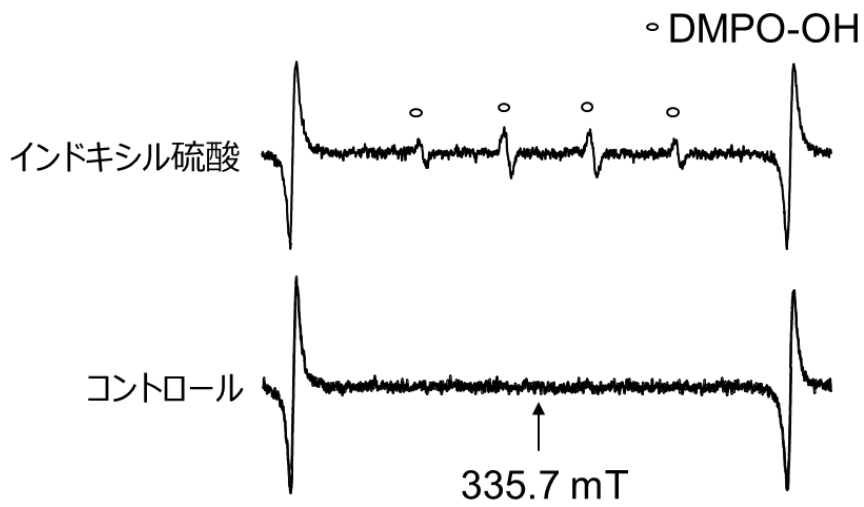


図 21 電子スピン共鳴 (ESR)による C2C12 筋管細胞から産生される活性酸素の

検出 *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.0001$ を示しており、各群 $n = 3$ である。

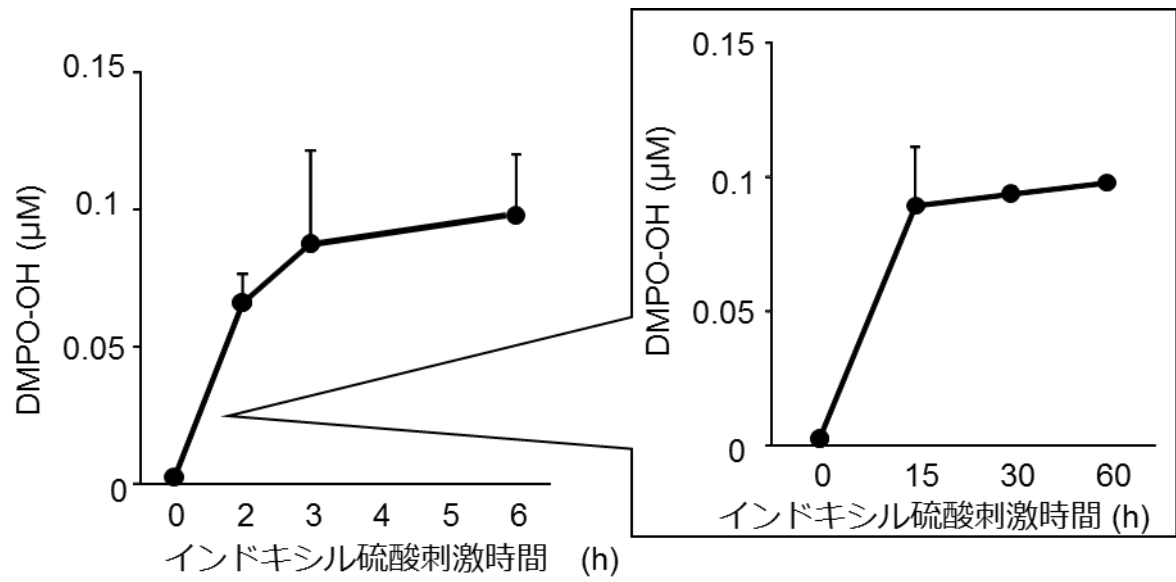


図 22 電子スピン共鳴 (ESR)による C2C12 筋管細胞から産生される活性酸素の
 継時的変化

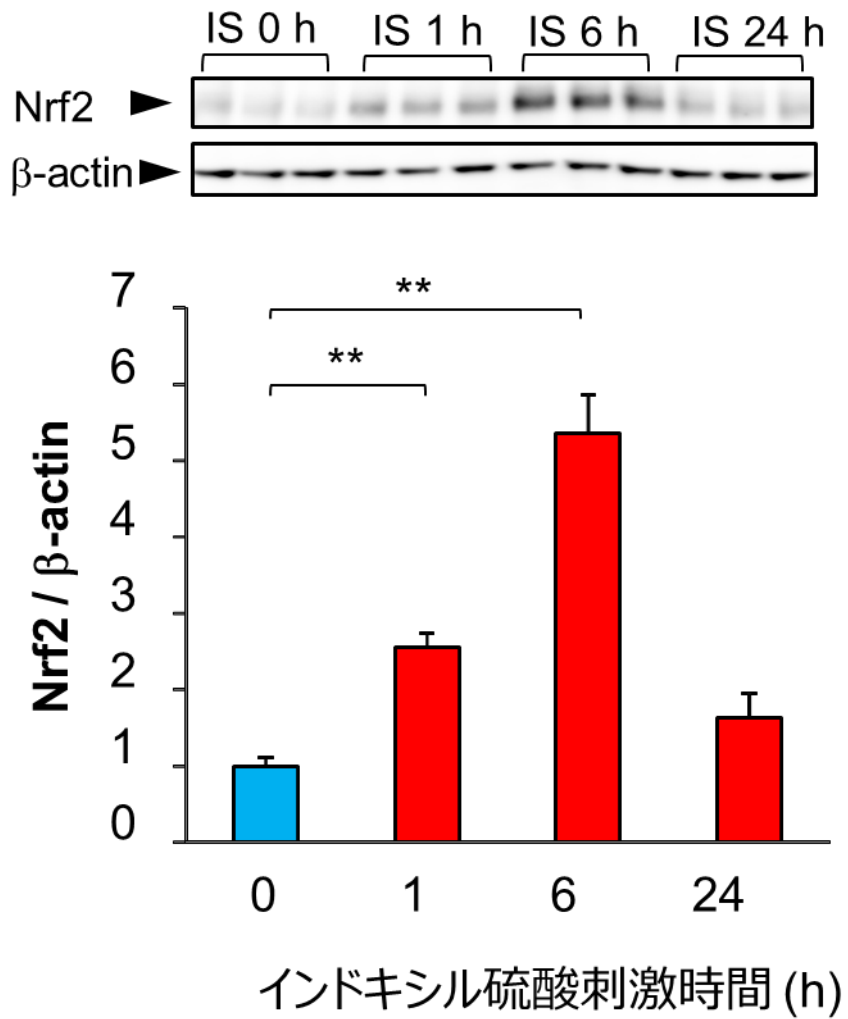


図 23 C2C12 筋管細胞における Nrf2 のタンパク質発現の継時的変化

*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.0001$ を示しており、各群 $n = 3$ である。

IS;インドキシル硫酸

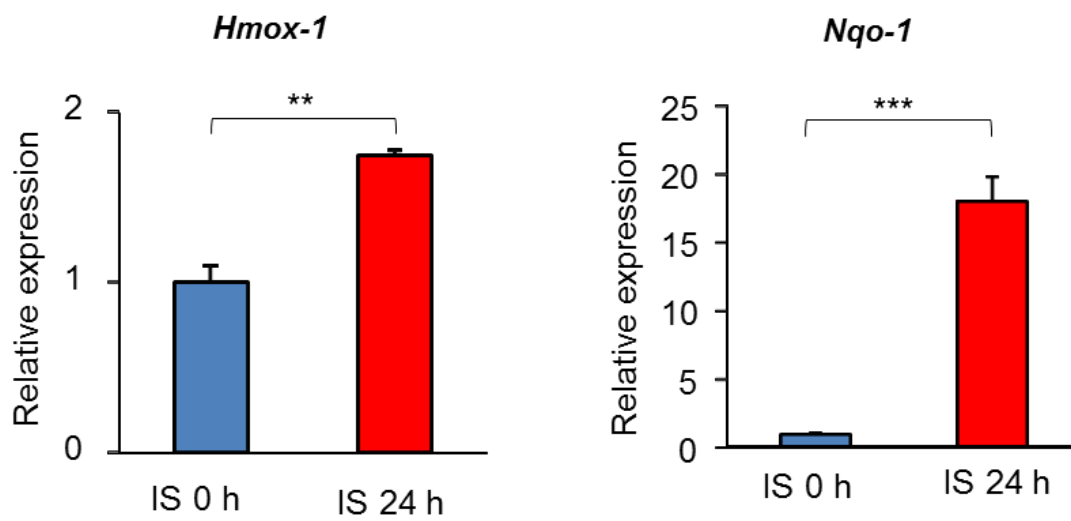


図 24 C2C12 筋管細胞における Nrf2 の標的酵素である *Hmox-1* と *Nqo-1* の mRNA

発現の変化

; $p < 0.01$, *; $p < 0.0001$ を示しており、各群 $n = 3$ である。

IS; インドキシル硫酸

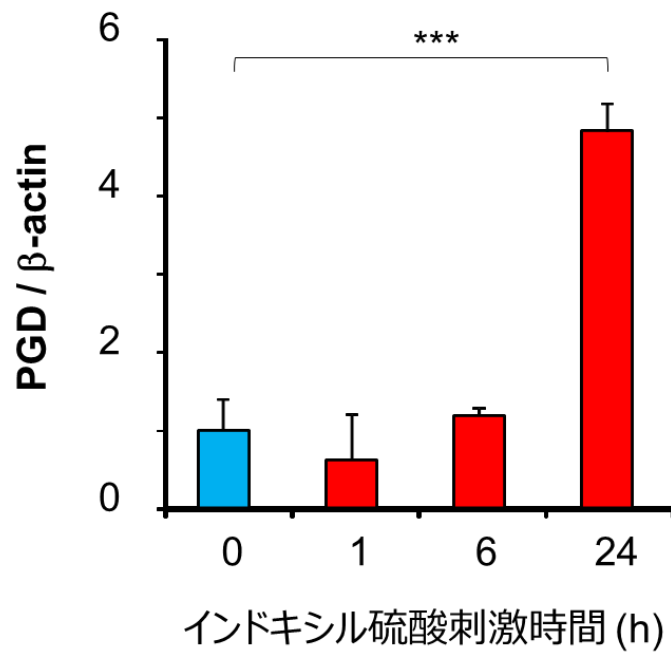
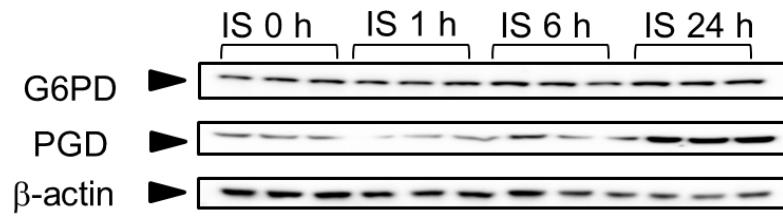


図 25 C2C12 筋管細胞における Nrf2 標的酵素のタンパク質発現の継時的変化

***; $p < 0.0001$ を示しており、各群 $n = 3$ である。IS; インドキシル硫酸

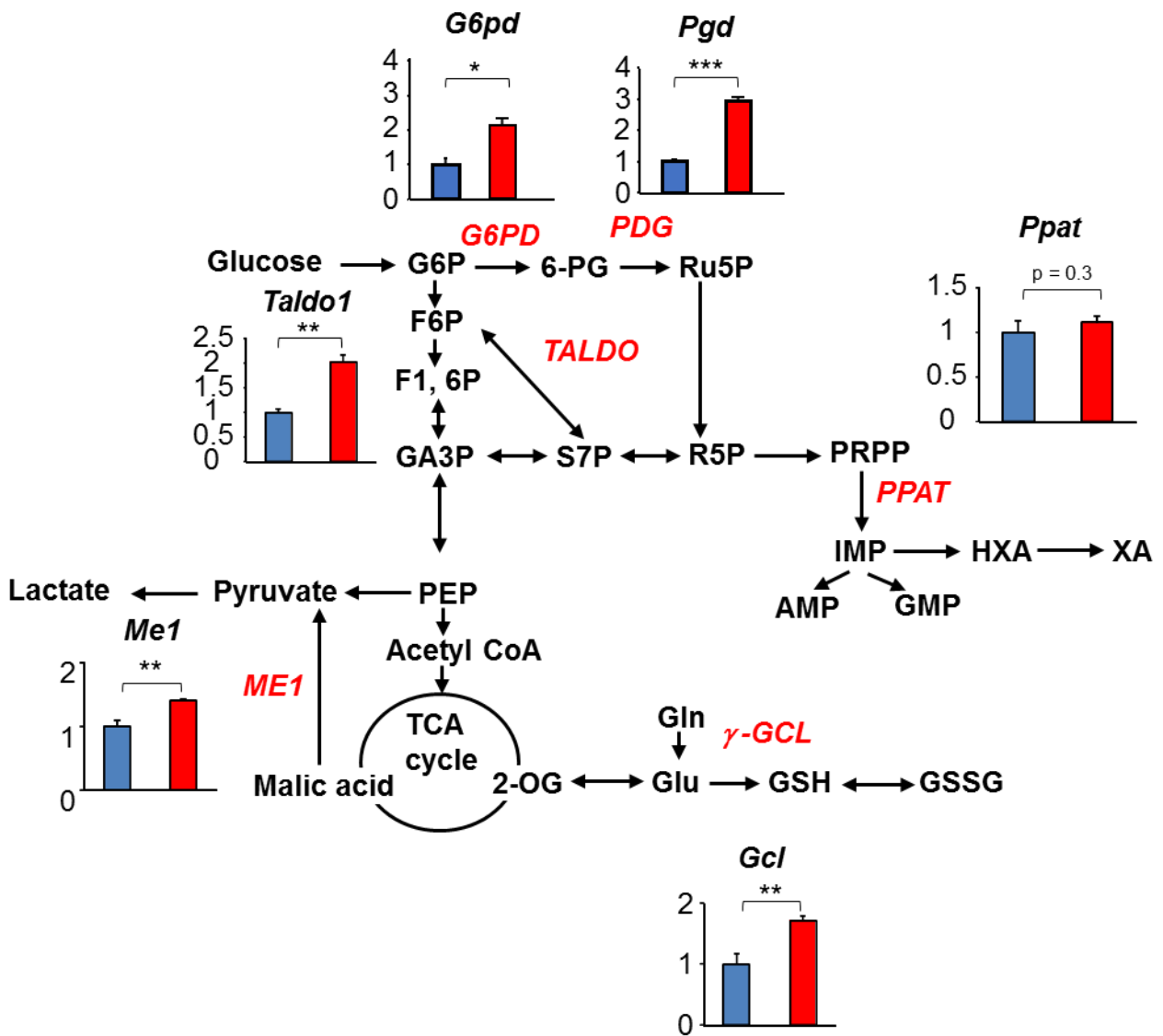


図 26 C2C12 筋管細胞における Nrf2 標的酵素の mRNA 発現の継時的変化

*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.0001$ を示しており、各群 $n = 3$ である。

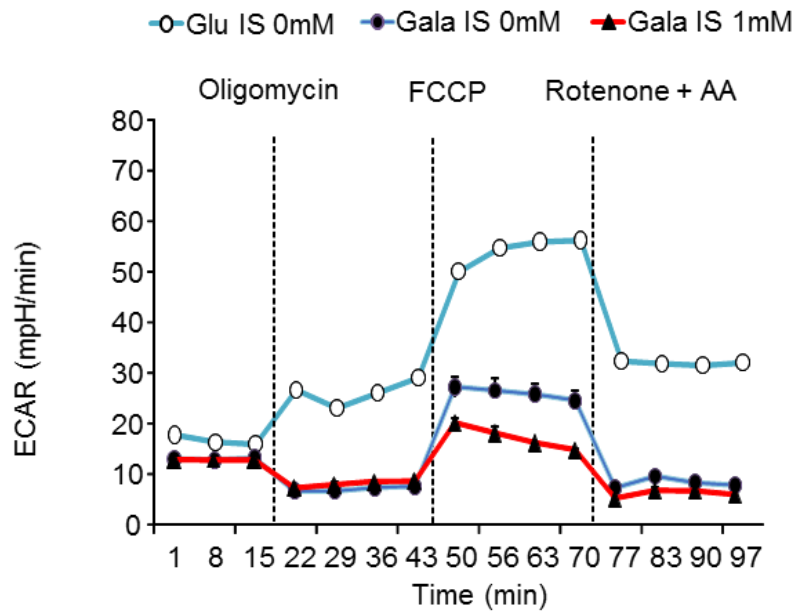
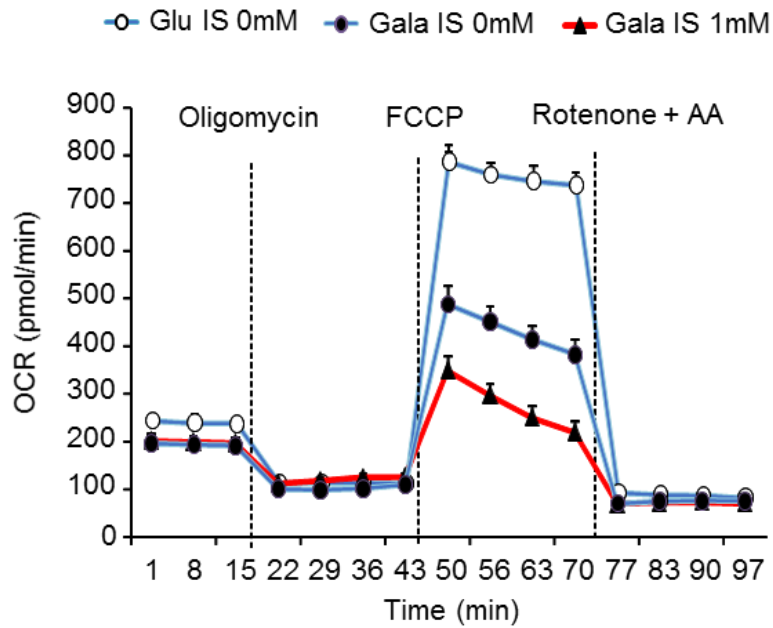


図27 ガラクトース培地で培養したC2C12筋管細胞における酸素消費速度(OCR)

と細胞外酸性化速度(ECAR)、IS; インドキシル硫酸

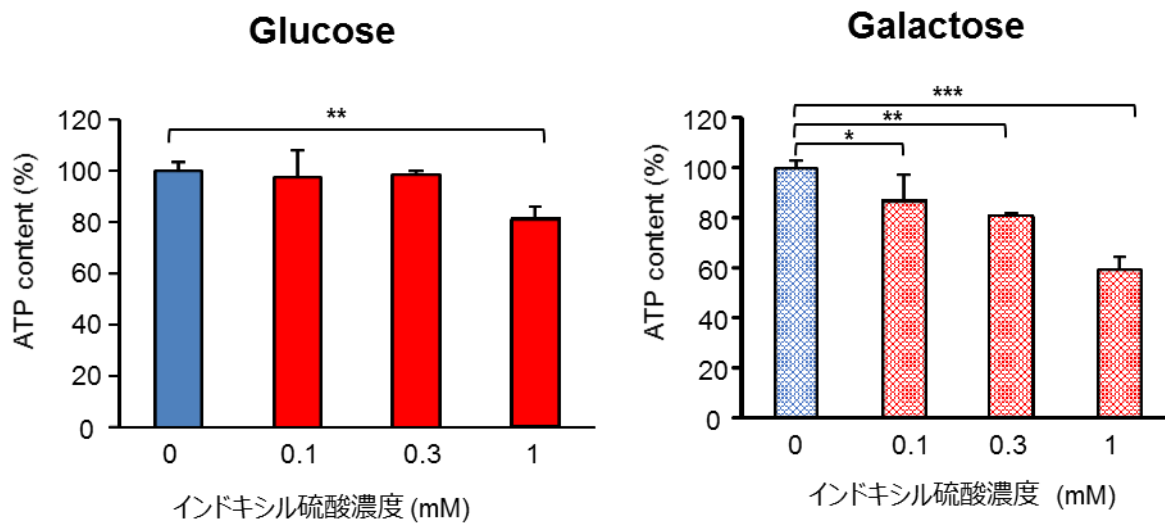


図 28 インドキシル硫酸が与える C2C12 筋管細胞の ATP 産生への影響

*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.0001$ を示しており、各群 $n = 6-7$ である。

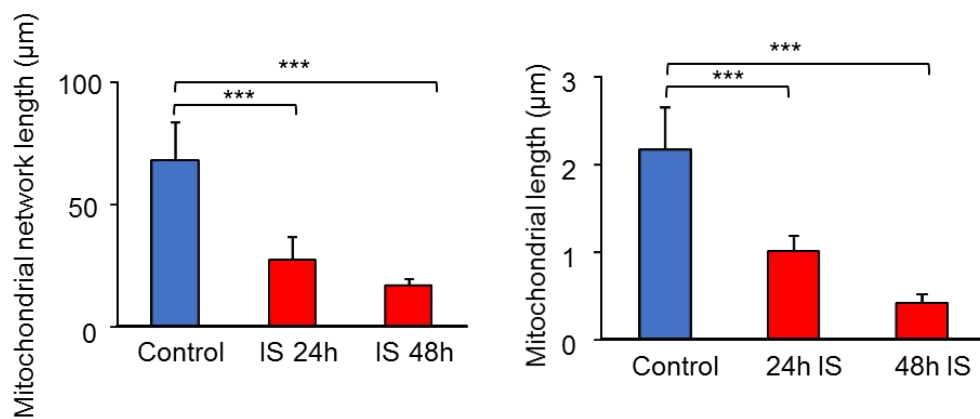
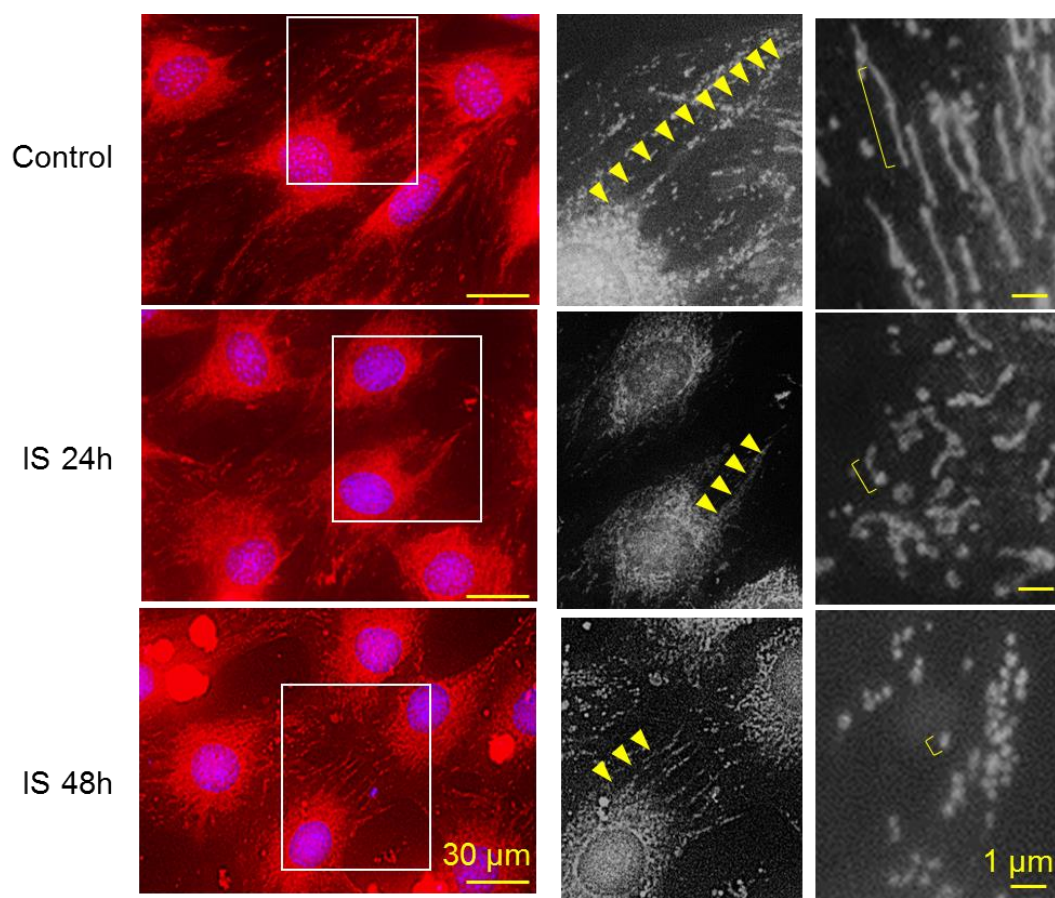


図 29 インドキシル硫酸によるミ C2C12 筋管細胞のトコンドリア形態への影響

; $p < 0.01$, *; $p < 0.0001$ を示しており、ランダムにミトコンドリアネットワ

ーク長およびミトコンドリア長を 10 か所計測した。IS; インドキシル硫酸

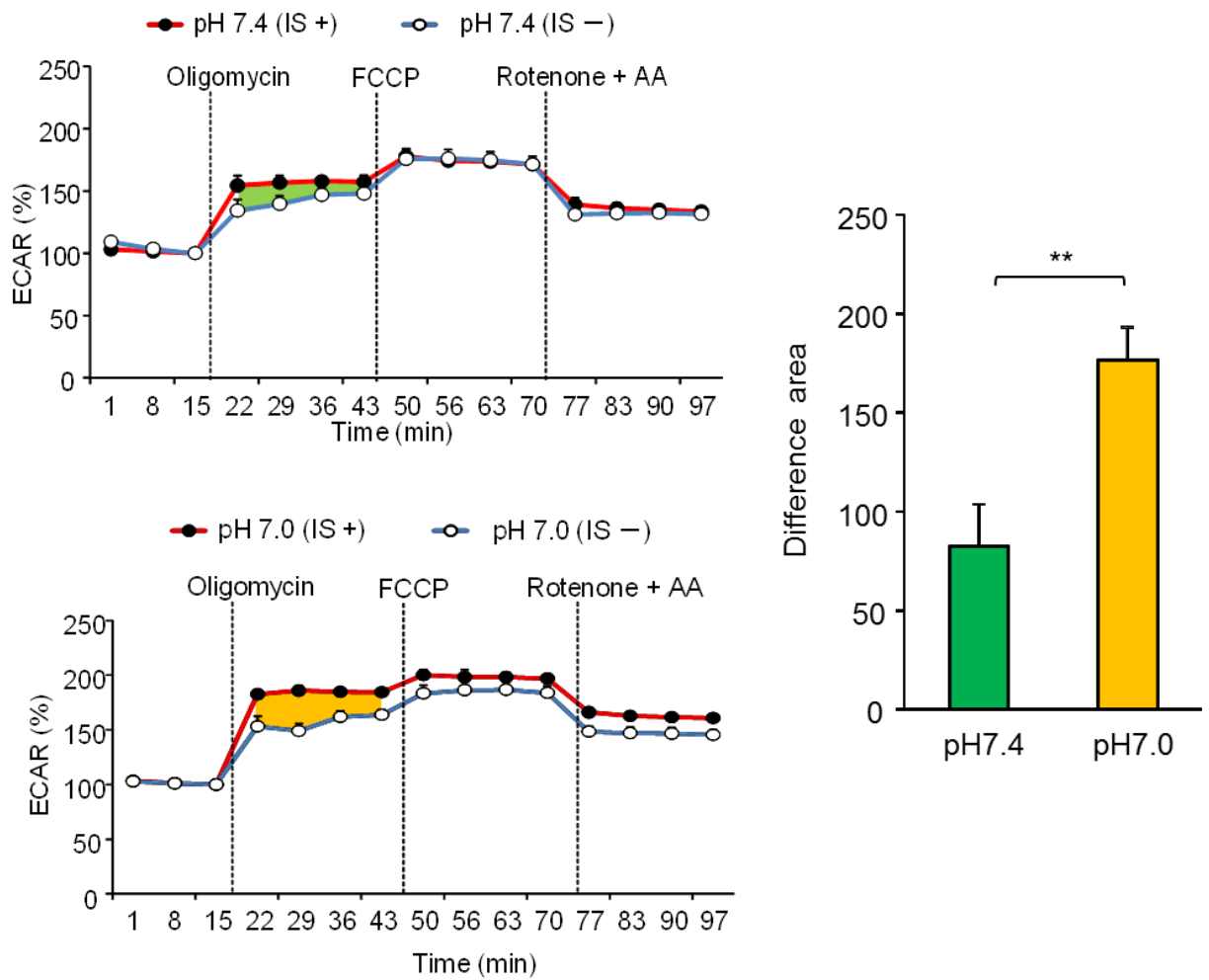


図 30 酸性条件下での C2C12 筋管細胞における酸素消費速度(OCR)と細胞外酸性化速度(ECAR)、IS;インドキシル硫酸

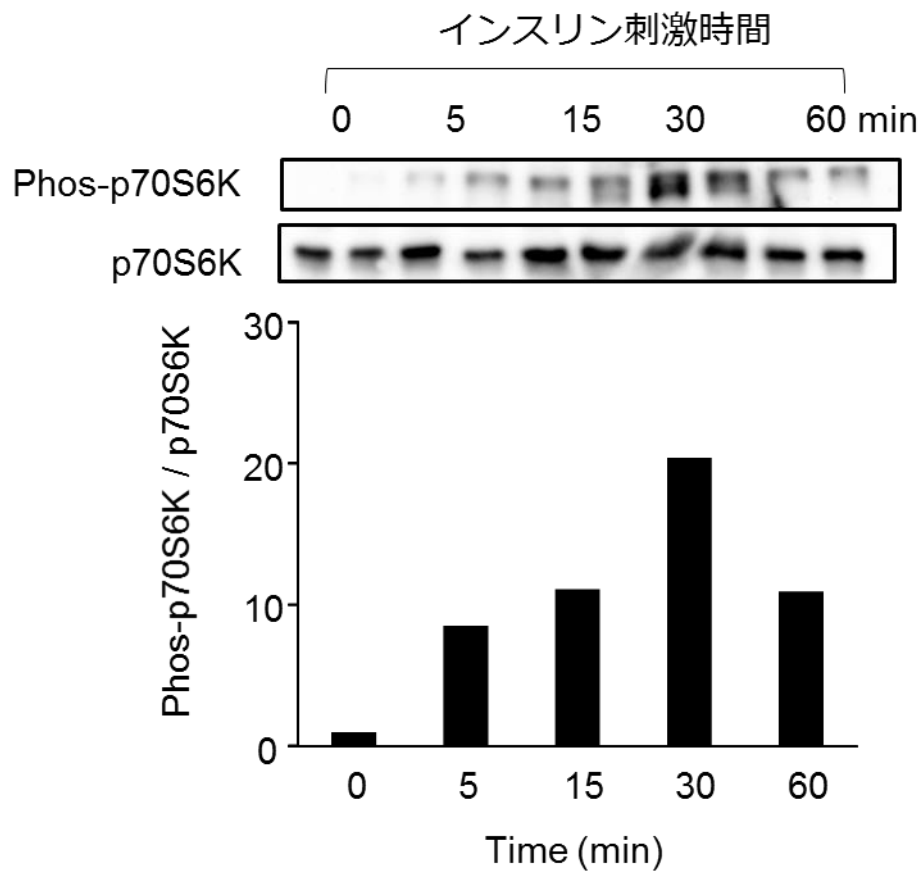


図 31 C2C12 筋管細胞における p70S6K のリン酸化の継時的変化

*; $p < 0.05$, を示しており、各群 $n = 3$ である。

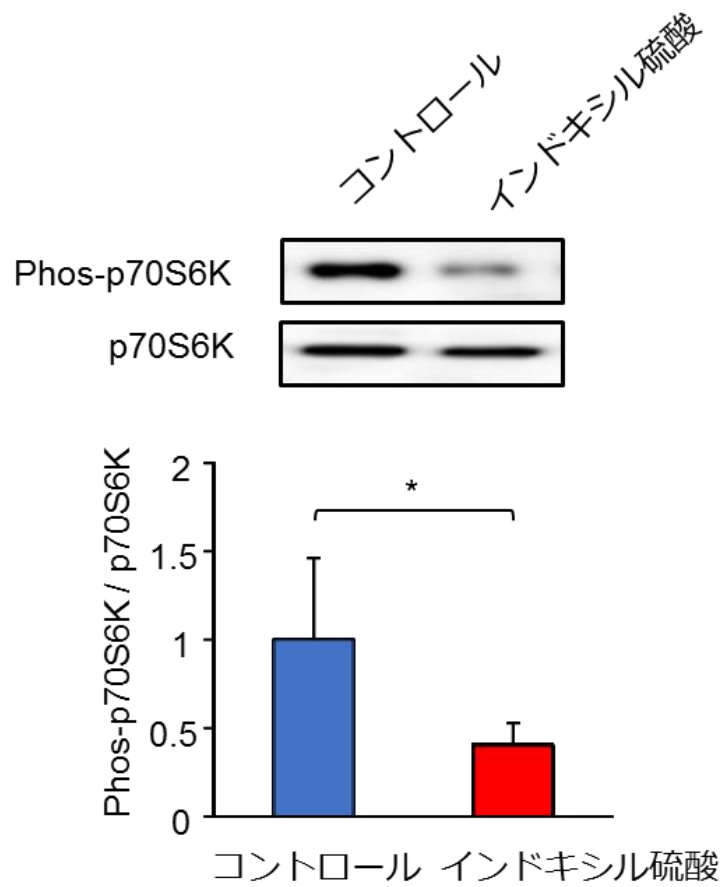


図 32 インドキシル硫酸刺激による p70S6K のリン酸化への影響

*; $p < 0.05$, を示しており、各群 $n = 3$ である。

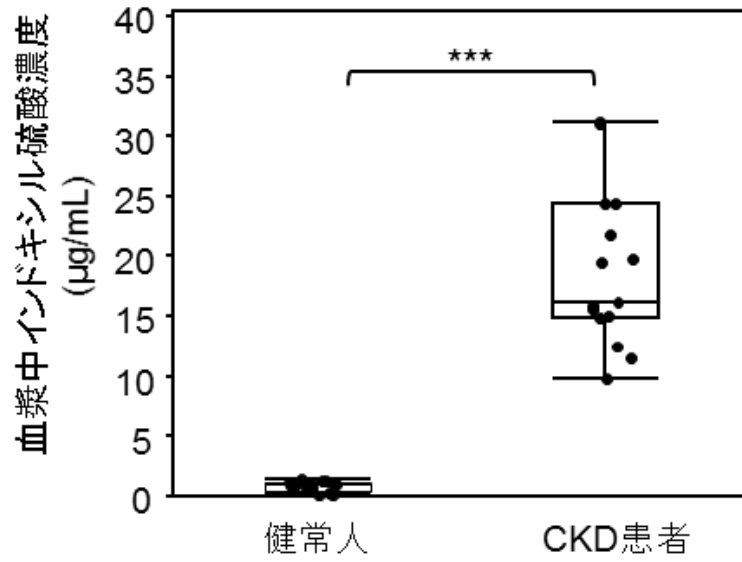


図 33 血中インドキシル硫酸濃度の比較

***; $p < 0.0001$, を示しており、健常人 $n = 16$ 、CKD 患者 $n = 14$ 名である。

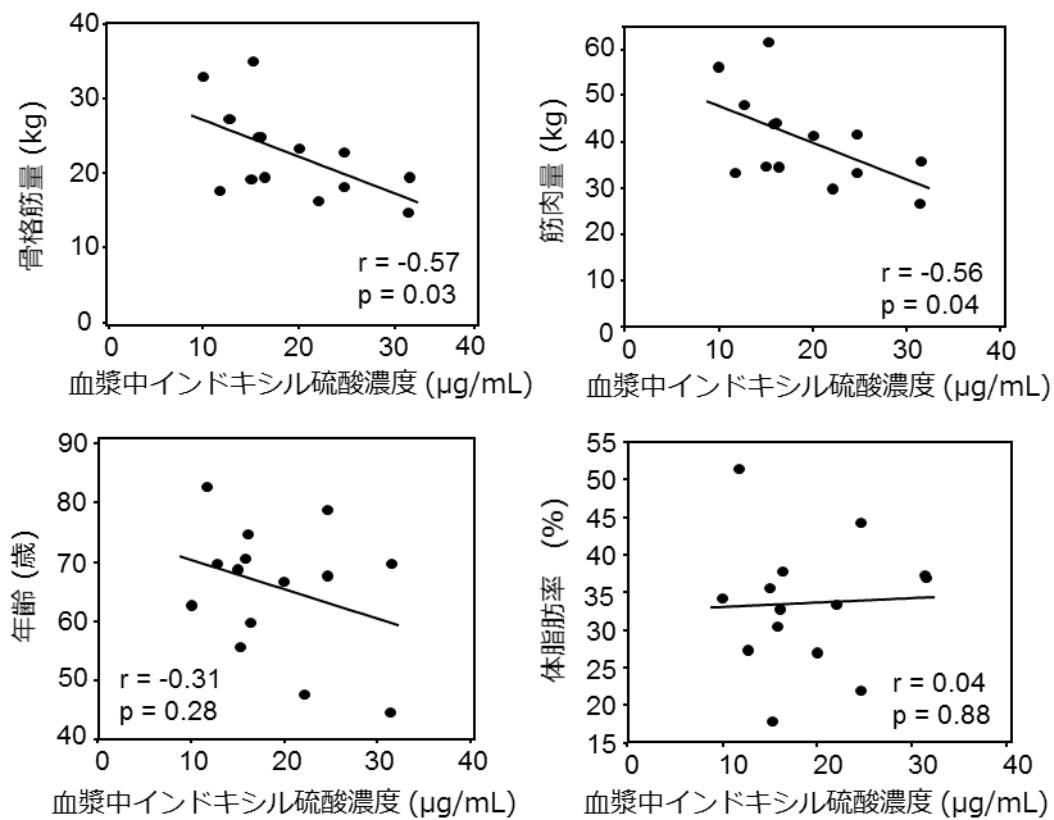


図 34 血中インドキシル硫酸濃度と体成分との関連

相関回帰分析は、Spearman の順位相関係数で行った。

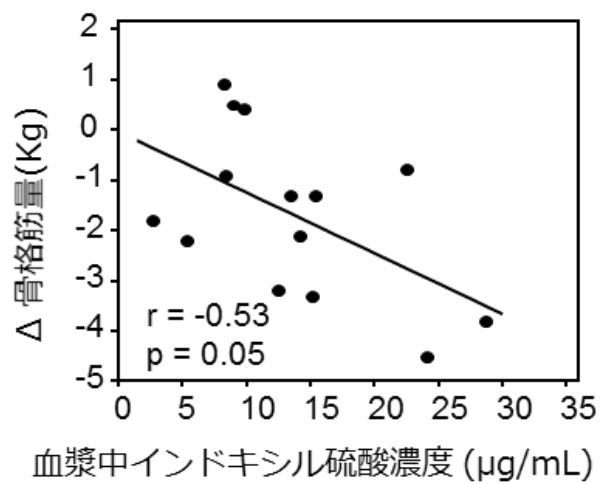


図 35 透析導入時の血中インドキシル硫酸濃度と 2 年後の骨格筋量変化の関係

相関回帰分析は、Spearman の順位相関係数で行った。

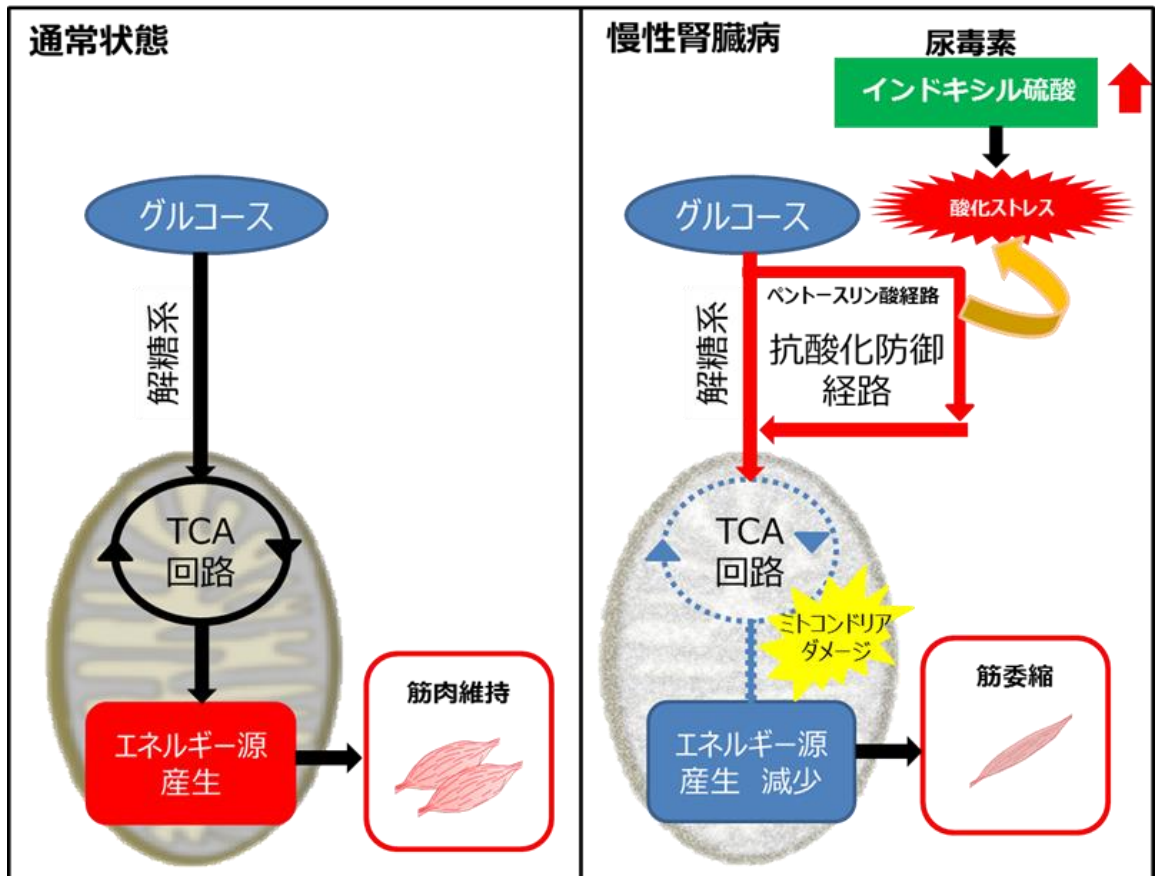


図 36 想定される CKD における尿毒症性サルコペニアの発症機序

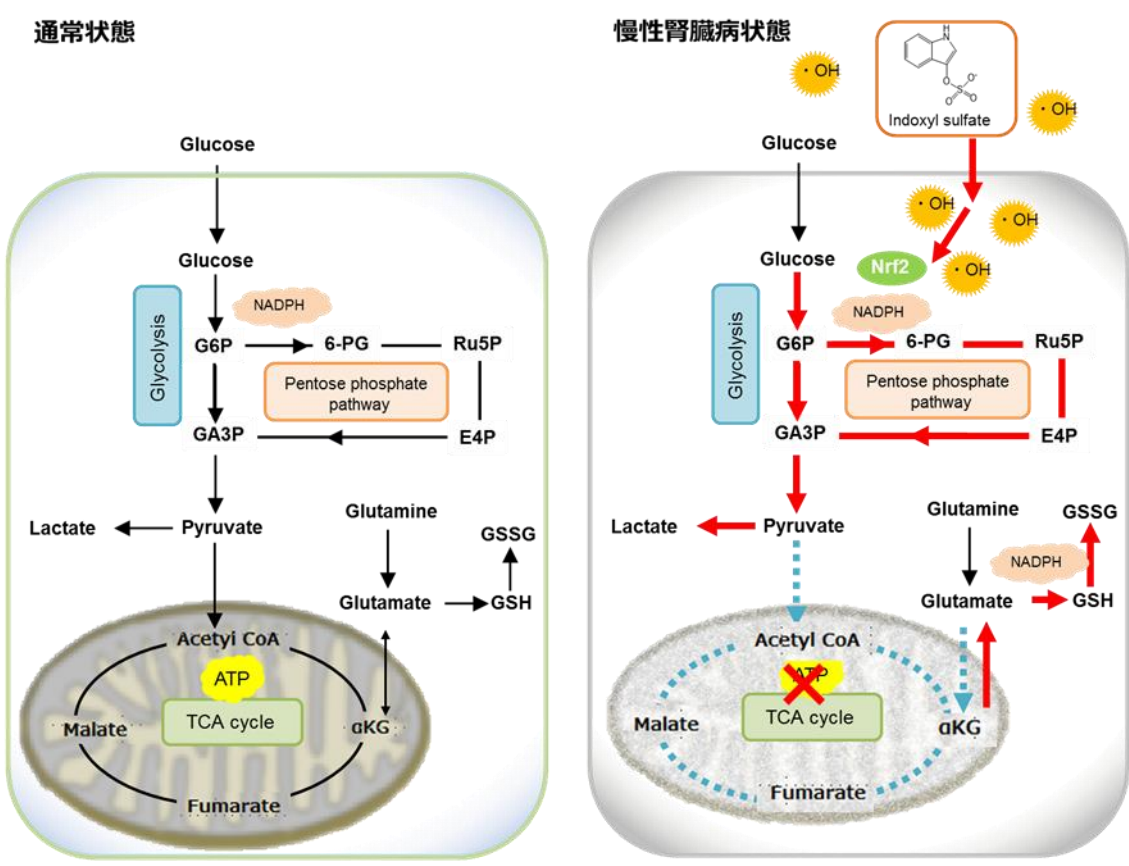


図 37 本研究で明らかとした尿毒症性サルコペニアの発症における分子機構

Table 1 対象となった患者の年齢、性別、原疾患

No.	Age	Gender	Primary disease
1	74	M	Hypertension
2	77	M	Hypertension
3	69	F	Diabetic nephropathy
4	69	F	Hypertension + Diabetic nephropathy
5	70	M	Diabetic nephropathy
6	62	M	Diabetic nephropathy
7	66	M	Diabetic nephropathy
8	83	F	Diabetic nephropathy
9	44	F	Chronic glomerulonephritis
10	59	F	Diabetic nephropathy
11	46	F	IgA nephropathy
12	55	M	Diabetic nephropathy
13	66	M	Nephrosclerosis + Diabetic nephropathy
14	70	M	Hypertension + Diabetic nephropathy
Average	65.0 ± 11.0		
	Healthy control	n=16	32.9 ± 7.0 years old

Table 3 PCR 解析で使した Primer 情報

Gene name	Primer ID
<i>Nre2l2</i>	MA159309
<i>G6pd2</i>	MA137680
<i>Pgd</i>	MA123400
<i>Me1</i>	MA138553
<i>Nqo1</i>	MA121914
<i>Taldo1</i>	MA030331
<i>Hmox1</i>	MA141757
<i>Gclc</i>	MA147506
<i>Ppat</i>	MA158026
<i>Tktl2</i>	MA116217
<i>Gapdh</i>	MA050371

8. 謝辞

本研究の実施に当たり、御指導、御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科医療薬学講座臨床薬学分野 教授 佐藤博先生、同 准教授 高橋 信行先生に心より感謝申し上げます。また本研究を行う上で、研究の指導、測定・解析を支援していただきました東北大学大学院医学系研究科 腎・高血圧・内分泌学分野 教授 伊藤 貞嘉先生、森 建史先生、三島 英換先生、矢花 郁子先生、小泉 賢治先生、大江 佑治先生、金須 清美先生、鈴木 千登世さん、倉澤 奈穂さん、永沼 絵理さん、高橋 知香さん、堰本 晃代さん、東北大学大学院医学研究科 教授 阿部 高明先生、東北大学医学部 保健学科の菅原 真恵さん、鈴木 亜里沙さん、東北大学メディカル・メガバンク機構 講師 三枝大輔先生、齋藤 律水さん、東北大学大学院医学研究科 教授 庭野 吉己先生、目代 貴之さん、九州大学先端融合医療レドックスナビ研究拠点 准教授 三浦 大典先生、一瀬 知美さん、修文大学 学長 丹羽 利充先生に心より感謝いたします。

また、研究に際し技術的御支援および多大なる御助力を頂きました臨床薬学分野および腎・高血圧・内分泌学分野の皆様、そして御支援いただきましたすべての方に心より感謝申し上げます。