

88. 六君子湯の筋腎連関を介した腎保護効果の検討

金口 翔

*横浜市立大学附属病院 腎臓・高血圧内科

Key words : 慢性腎臓病, サルコペニア, 六君子湯, グレリン, 筋腎連関

緒言

本邦の慢性腎臓病 (CKD) 患者は 1,330 万人超と推計され、CKD から末期腎不全に至り透析療法を施行される患者数は年々増加し 34 万人を超えた。現状の CKD に対する治療薬はレニン・アンジオテンシン系 (R-A 系) 阻害薬を中心とした降圧薬が中心であり、最近では SGLT2 阻害薬が注目されているものの治療薬の充実は十分ではなく、CKD の新たな治療手段の開発・創出が望まれる。

CKD では、尿毒素の蓄積、代謝亢進、炎症、酸化ストレスなど複数の要因が関与して、エネルギー源 (体脂肪) が減少する消耗状態にある。さらに CKD 患者では、高齢化、運動不足に加え、蛋白分解系の亢進状態にあり、体蛋白 (骨格筋) が減少するサルコペニアの合併が問題となっている。

運動療法などによる筋力の維持は、腎臓の炎症を抑制することによる腎保護作用を発揮する可能性があり、「筋腎連関」と呼ばれる。そのメカニズムとして、いくつかの基礎的検討から、骨格筋から分泌される体液因子 (マイオカイン) が腎に作用する可能性が報告されている [1]。

グレリンは摂食促進ホルモンで、低栄養状態において食事摂取量・栄養状態を改善させる。さらに、尿細管ミトコンドリア機能の維持、酸化ストレス・炎症の抑制などを介して、直接的に腎保護作用を発揮する可能性が報告されている [2, 3]。これらを統合すると、生体内におけるグレリンの活性化は低栄養状態の改善と腎保護作用により CKD の治療手段になる可能性が考えられるが、現状のグレリン活性化療法は注射の剤形が基本であり、経口療法の確立が臨床応用上の課題となる。

本研究では、グレリン活性化作用を有する経口薬として、漢方薬の六君子湯に着目した。六君子湯は消化・栄養吸収系の異常に対して使用され、近年はその効能の科学的根拠としてグレリン活性化機序が報告されている。六君子湯はヒト、シスプラチン誘発性食欲不振モデル動物のいずれにおいてもグレリン分泌を促進することが報告されている [4, 5]。さらに、血中グレリン濃度が高いにも関わらず摂食量が増加しないグレリン抵抗性の病態において、六君子湯によるグレリン感受性の改善作用も報告されている [6]。以上から、CKD に対する新規治療法として、漢方薬の六君子湯が有効である可能性が考えられた。本研究では、『六君子湯によるグレリンとその受容体への効果はサルコペニアを伴う CKD 病態を改善する』という仮説をたて、サルコペニア合併 CKD モデル動物、グレリン受容体阻害薬、ヒト腎生検組織を用いて、分子レベルでの作用機序を明らかにすることを目的として立案した。今回、まずサルコペニア合併 CKD モデル動物におけるグレリン系の発現調節の検討を行うため、サルコペニア合併 CKD モデルを作製することとした。

CKD モデル動物として、129/Sv マウス雄を用いて、5/6 腎臓摘出マウスを作製すると、慢性的な腎機能障害 (血中尿素窒素、血中クレアチニンの上昇) に加え、サルコペニアの特徴 (筋萎縮、トレッドミル耐久力低下、握力低下、夜間歩行距離の低下、泳ぐ速度の低下など) を有することが報告されている [7, 8]。先行研究を参考に、5/6 腎臓摘出マウスに、高蛋白食負荷を加えることで、CKD モデルを作製した。5/6 腎臓摘出術は、血圧上昇、腎機能低下、糸球体障害と尿細管障害といった組織学的な腎障害を生じさせ、さらに、高蛋白食負荷を加えることで、5/6 腎臓摘出マウスの体重増加量を減少させ、アルブミン尿や糸球体障害を増悪させることを報告した [9]。以上から、今回作製した 5/6 腎臓摘出術+高蛋白食負荷モデルは、サルコペニア合併 CKD モデルとな

りうると考えられた。今後、同モデルの骨格筋機能関連指標、骨格筋における関連分子発現解析、サルコペニア関連指標を解析し、六君子湯の治療効果について比較検討する方針である。

方法

1. サルコペニア合併 CKD モデル動物の作製

雄の 129/Sv マウス (8~11 週齢) に対し、5/6 腎臓摘出術または Sham 手術を施行した。術後 2 週間後より、マウスを通常食 (ND、蛋白 24%、炭水化物 59%、脂肪 17%) 飼育を継続する群と高蛋白食 (HPD、蛋白 45%、炭水化物 38%、脂肪 17%) 飼育する群に振り分けを行った。すなわち、マウスを以下の 4 群用意した；①Sham 手術+ND (N=5)、②Sham 手術+HPD (N=4)、③5/6 腎臓摘出術 (5/6Nx) +ND (N=6)、④5/6Nx+HPD (N=6)。5/6 腎臓摘出術に関しては、過去に報告している [10] ように、右腎臓を摘出し、さらに左腎の上 1/3、下 1/3 を外科的に摘出した。そして、食事を HPD へ変更もしくは ND 継続を 12 週間行った後に解剖を行った。観察期間中に体重や血圧などの生理学的データを取得し、解剖時の標本で腎機能、腎病理所見に加え、腎臓における尿細管障害関連蛋白発現や線維化関連遺伝子発現について解析した (図 1)。組織学的解析において、糸球体のメサンギウムの拡張や糸球体硬化といった糸球体障害の半定量的評価 (糸球体硬化指数) は、PAS 染色切片で以下のスコアリングシステムに基づいて決定した。糸球体硬化指数、0：正常糸球体、1：メサンギウム拡大もしくは糸球体係蹄の 25% までの硬化、2：糸球体係蹄の 25% から 50% までの硬化、3：糸球体係蹄の 50% から 75% までの硬化、4：糸球体係蹄の 75% 以上の硬化。尿細管障害の半定量的評価 (尿細管障害スコア) は、皮質から皮質髄質接合部において、尿細管拡張、尿細管萎縮、尿細管円柱、尿細管上皮細胞の空胞化や変性、尿細管上皮細胞の剥離または冊子縁の消失、および尿細管基底膜の肥厚を呈する尿細管の割合に基づいて、以下のようにスコア化した。尿細管障害スコア、0：なし、1：10% 以下、2：11~25% まで、3：26~45% まで、4：46~75% まで、5：76% 以上。

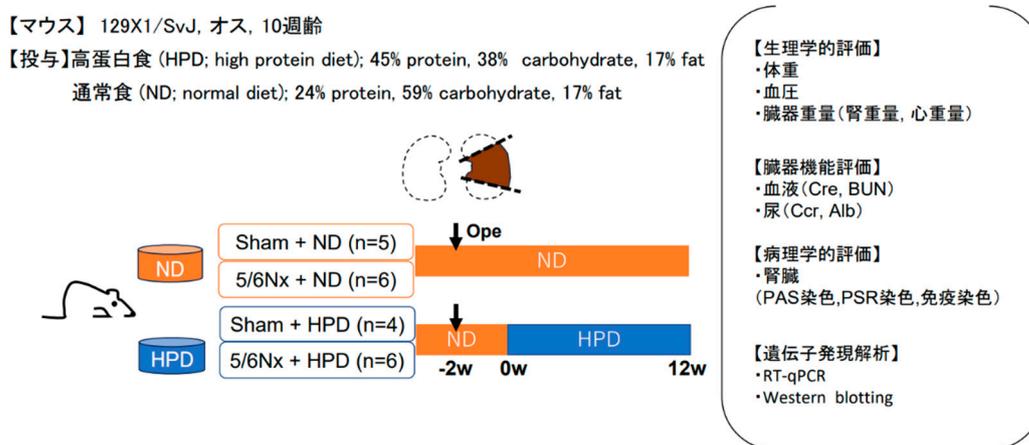


図 1. 実験計画

結果

1. 高蛋白食負荷による sham 群と 5/6Nx (腎臓摘出術) 群の生理学的所見への影響

マウスを sham+ND (通常食) 群、sham+HPD (高蛋白食) 群、5/6Nx+ND 群、5/6Nx+HPD 群の 4 群に分けて飼育した。sham 手術もしくは 5/6Nx を施行した後に、通常食もしくは高蛋白食を与え、12 週間後に解剖し解析を行った。5/6Nx+HPD 群の体重増加量は sham+HPD 群または 5/6Nx+ND 群と比較して、有意に少なかった (図 2a)。さらに 5/6Nx 群の収縮期血圧は sham 群に比べ有意に高かった (図 2b)。しかし、高蛋白食負荷は sham 群および 5/6Nx 群の収縮期血圧を上昇させることはなかった (図 2b)。

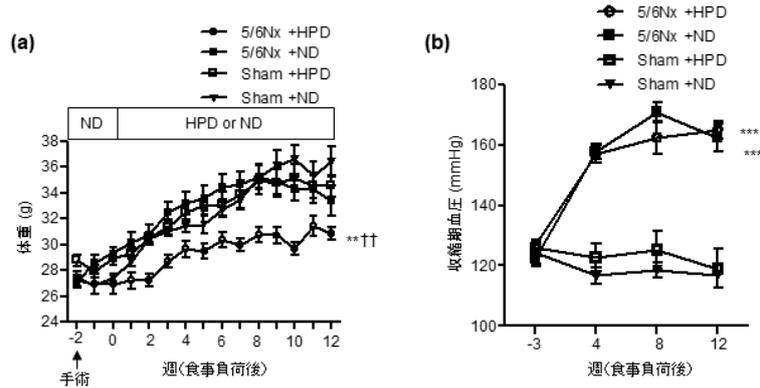


図 2. 体重、血圧に対する Sham 手術および 5/6 腎摘出術後の高蛋白食負荷の影響

- a) sham 群および 5/6 腎摘出 (Nx) 群における通常食 (ND) または高蛋白食 (HPD) 負荷時の体重変化量。
 b) sham+ND 群、sham+HPD 群、5/6Nx+ND 群、5/6Nx+HPD 群におけるベースライン時および ND または HPD 負荷 4、8、12 週間後の収縮期血圧。平均値±SEM (各群 n=4~6)。** $P<0.01$ 、*** $P<0.001$ vs. sham group ; † $P<0.01$ vs. ND group (two-way repeated measures ANOVA with Bonferroni's post-hoc test)。

[1] より引用、改変。

2. 高蛋白食負荷による sham 群と 5/6Nx 群の腎機能や尿中アルブミン排泄量への影響

次に血漿クレアチニン濃度および血漿尿素窒素濃度を測定することにより、腎機能を評価した。5/6Nx 群の血漿クレアチニン濃度は、sham 群の血漿クレアチニン濃度に比べて有意に高かった。しかし、HPD 負荷は sham 群および 5/6Nx 群の血漿クレアチニン濃度を上昇させなかった (図 3a)。同様に 5/6Nx 群の血漿尿素窒素濃度は、sham 群よりも有意に高かった。しかし、HPD 負荷は sham 群および 5/6Nx 群の血漿尿素窒素を増加させなかった (図 3b)。5/6Nx 群のクレアチンクリアランスは、sham 群よりも有意に低かった。しかし、HPD 負荷によりクレアチンクリアランスが上昇したのは sham 群のみであった (図 3c)。さらに、尿中アルブミン排泄量は 5/6Nx+HPD 群で sham+HPD 群および 5/6Nx+ND 群に比べ有意に高かった (図 3d)。

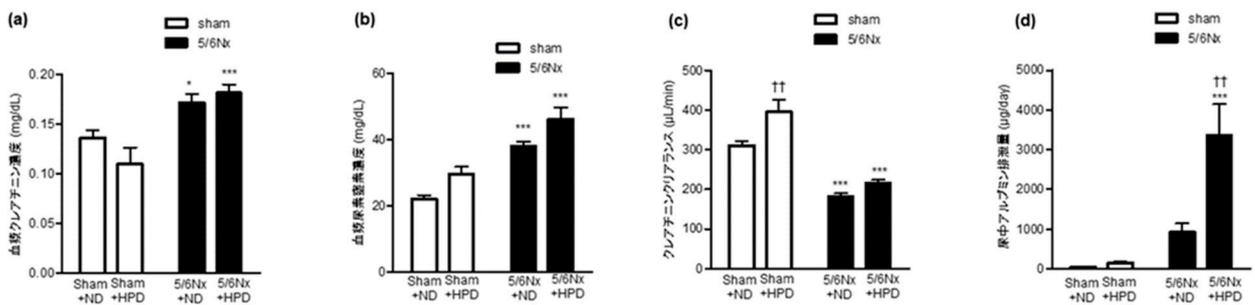


図 3. 血漿クレアチニン濃度、血漿尿素窒素濃度、クレアチンクリアランスおよび尿中アルブミン排泄量に対する Sham 手術および 5/6 腎摘出術後の高蛋白食負荷の影響

- sham+ND 群、sham+HPD 群、5/6 Nx+ND 群、5/6Nx+HPD 群における (a) 血漿クレアチニン濃度、(b) 血液尿素窒素 (BUN)、(c) クレアチンクリアランスおよび (d) 尿中アルブミン排泄量。平均値±SEM (各群 n=4~6)。* $P<0.05$ 、*** $P<0.001$ vs. sham group ; † $P<0.01$ vs. ND group (two-factorial ANOVA with Bonferroni's post-hoc test)。[1] より引用、改変。

3. 高蛋白食負荷による sham 群と 5/6Nx 群の糸球体や尿細管障害への影響

PAS 染色による腎組織の組織学的解析の結果、5/6Nx 群では sham 群と比較して、糸球体傷害が悪化していることが確認された。さらに、5/6Nx 群では HPD 負荷により糸球体硬化指数の増悪（糸球体傷害の悪化）が認められた（図 4a）。尿細管傷害についても、尿細管障害スコアにて判定量的に評価したところ sham 群と比較して 5/6Nx 群で増悪することが確認された（図 4b）。

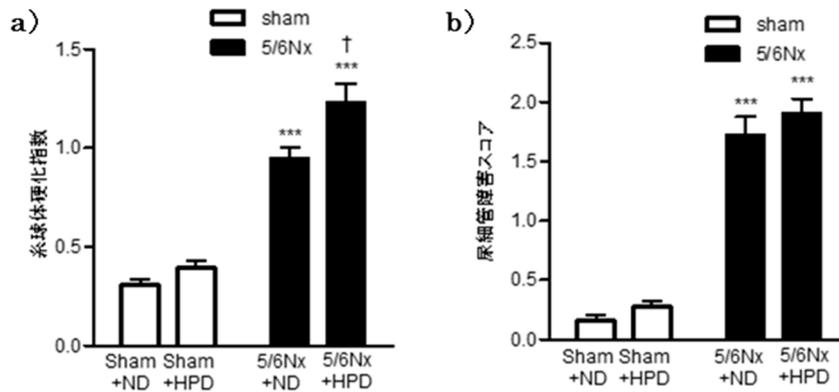


図 4. 糸球体傷害、尿細管傷害に対する Sham 手術および 5/6Nx 後の HPD 負荷の影響 Sham+ND 群、sham+HPD 群、5/6Nx+ND 群、5/6Nx+HPD 群における (a) 糸球体硬化指数、(b) 尿細管障害スコア。平均値±SEM (各群 n=4~6)。* $P<0.05$ 、*** $P<0.001$ vs. sham 群; † $P=0.05$ vs. ND 群 (two-factorial ANOVA with Bonferroni's post-hoc test)。

[1] より引用、改変。

考 察

今回、129/Sv マウスに 5/6Nx+HPD 負荷を行うことで、CKD モデルの作製に成功した。5/6Nx 群では Sham 手術群と比較して、血圧上昇、腎機能低下、糸球体障害と尿細管障害といった組織学的な腎障害を認めた。さらに、高蛋白食負荷は、5/6Nx 群の体重増加量を減少させ、アルブミン尿や糸球体障害の増悪を引き起こすことを報告した [9]。先行研究では、こうした 5/6 腎臓摘出マウスに、高蛋白食負荷を加えることで、慢性的な腎機能障害に加え、サルコペニアの特徴（筋萎縮、トレッドミル耐久力低下、握力低下、夜間歩行距離の低下、泳ぐ速度の低下など）を有することが報告されている [7, 8]。今後、今回作製した CKD モデルの骨格筋機能関連指標、骨格筋における関連分子発現解析、サルコペニア関連指標を解析し、六君子湯の治療効果について比較検討する方針である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、横浜市立大学大学院医学研究科病態制御内科学教室の田中翔平、田村功一、涌井広道、小豆島健護である。

文 献

- 1) Peng H, Wang Q, Lou T, Qin J, Jung S, Shetty V, Li F, Wang Y, Feng XH, Mitch WE, Graham BH, Hu Z. Myokine mediated muscle-kidney crosstalk suppresses metabolic reprogramming and fibrosis in damaged kidneys. *Nat Commun.* 2017 Nov 14;8(1):1493. doi: 10.1038/s41467-017-01646-6. PMID: 29138395; PMCID: PMC5686208.
- 2) Fujimura K, Wakino S, Minakuchi H, Hasegawa K, Hosoya K, Komatsu M, Kaneko Y, Shinozuka K, Washida N, Kanda T, Tokuyama H, Hayashi K, Itoh H. Ghrelin protects against renal damages induced by angiotensin-II via an antioxidative stress mechanism in mice. *PLoS One.* 2014 Apr 18;9(4):e94373. doi: 10.1371/journal.pone.0094373. PMID: 24747517; PMCID: PMC3991592.
- 3) Sun GX, Ding R, Li M, Guo Y, Fan LP, Yue LS, Li LY, Zhao M. Ghrelin attenuates renal fibrosis and inflammation of obstructive nephropathy. *J Urol.* 2015 Jun;193(6):2107-15. doi: 10.1016/j.juro.2014.11.098. Epub 2014 Dec 3. PMID: 25481038.
- 4) Takeda H, Sadakane C, Hattori T, Katsurada T, Ohkawara T, Nagai K, Asaka M. Rikkunshito, an herbal medicine, suppresses cisplatin-induced anorexia in rats via 5-HT₂ receptor antagonism. *Gastroenterology.* 2008 Jun;134(7):2004-13. doi: 10.1053/j.gastro.2008.02.078. Epub 2008 Feb 29. PMID: 18439428.
- 5) Matsumura T, Arai M, Yonemitsu Y, Maruoka D, Tanaka T, Suzuki T, Yoshikawa M, Imazeki F, Yokosuka O. The traditional Japanese medicine Rikkunshito increases the plasma level of ghrelin in humans and mice. *J Gastroenterol.* 2010 Mar;45(3):300-7. doi: 10.1007/s00535-009-0166-z. Epub 2009 Dec 10. PMID: 19997944.
- 6) Terawaki K, Sawada Y, Kashiwase Y, Hashimoto H, Yoshimura M, Suzuki M, Miyano K, Sudo Y, Shiraishi S, Higami Y, Yanagihara K, Kase Y, Ueta Y, Uezono Y. New cancer cachexia rat model generated by implantation of a peritoneal dissemination-derived human stomach cancer cell line. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014 Feb 15;306(4):E373-87. doi: 10.1152/ajpendo.00116.2013. Epub 2013 Dec 17. PMID: 24347053.
- 7) Nishi H, Takemura K, Higashihara T, Inagi R. Uremic Sarcopenia: Clinical Evidence and Basic Experimental Approach. *Nutrients.* 2020 Jun 18;12(6):1814. doi: 10.3390/nu12061814. PMID: 32570738; PMCID: PMC7353433.
- 8) Hu L, Klein JD, Hassounah F, Cai H, Zhang C, Xu P, Wang XH. Low-frequency electrical stimulation attenuates muscle atrophy in CKD--a potential treatment strategy. *J Am Soc Nephrol.* 2015 Mar;26(3):626-35. doi: 10.1681/ASN.2014020144. Epub 2014 Sep 16. PMID: 25228359; PMCID: PMC4341478.
- 9) Tanaka S, Wakui H, Azushima K, Tsukamoto S, Yamaji T, Urate S, Suzuki T, Abe E, Taguchi S, Yamada T, Kobayashi R, Kanaoka T, Kamimura D, Kinguchi S, Takiguchi M, Funakoshi K, Yamashita A, Ishigami T, Tamura K. Effects of a High-Protein Diet on Kidney Injury under Conditions of Non-CKD or CKD in Mice. *Int J Mol Sci.* 2023 Apr 24;24(9):7778. doi: 10.3390/ijms24097778. PMID: 37175483; PMCID: PMC10177820.
- 10) Kobayashi R, Wakui H, Azushima K, Uneda K, Haku S, Ohki K, Haruhara K, Kinguchi S, Matsuda M, Ohsawa M, Toya Y, Nishiyama A, Yamashita A, Tanabe K, Maeshima Y, Umemura S, Tamura K. An angiotensin II type 1 receptor binding molecule has a critical role in hypertension in a chronic kidney disease model. *Kidney Int.* 2017 May;91(5):1115-1125. doi: 10.1016/j.kint.2016.10.035. Epub 2017 Jan 10. PMID: 28081856.