

マグネシウムがもたらす健康長寿・サルコペニア予防のメカニズム解明

大阪大学大学院 医学系研究科 腎臓内科学

特任助教 山本 毅士

(共同研究者)

大阪大学大学院 医学系研究科 遺伝学

教授 吉森 保

大阪大学大学院 医学系研究科 老年総合内科学

特任研究員 竹下 ひかり

大阪大学大学院 医学系研究科 腎疾患臓器連関制御学

助教 坂口 悠介

はじめに

慢性腎臓病 (CKD) は、高血圧や糖尿病といった生活習慣病・心不全・悪性腫瘍とともに、サルコペニア (筋肉量減少・筋力低下) を引き起こす疾患の1つである。サルコペニアは、日常生活動作を低下させ、転倒骨折・誤嚥・心血管疾患の増加に深く関わり医療経済を圧迫する要因である。CKD患者が呈するウレミックサルコペニア (uremic sarcopenia) が近年注目されているのは、高齢化したCKD患者のQOL改善が急務であることや、その改善が腎や生命予後の改善につながることを期待されるからであるが、その病態解明は十分に進んでいない。

一般的にサルコペニア発症のメカニズムは、骨格筋細胞内のタンパク分解と産生のバランスの異常の他、筋サテライト細胞や神経筋接合部の異常などがあげられる。オートファジーは、細胞質成分分解の総称であり、細胞恒常性維持に働き疾患に対抗する⁽¹⁾。筆者らの検討により、老化や肥満、CKDの一部ではオートファジーの役割がより重要になるにもかかわらず、オートファジーリソソーム系の後期段階が停滞し、疾患に十分対抗できないことが判明している⁽²⁻⁵⁾。吉森らが2009年に同定したRubiconは、オートファゴソームとリソソームの融合の抑制を通じてオートファジーを負に制御する制御因子であり、その発現量によりオートファジーは活性調節を受ける⁽⁶⁾。さらに線虫やハエを用いた研究によりRubiconが加齢によって増加し加齢によるオートファジー低下の原因となり、Rubicon発現抑制により寿命が延伸し、かつ加齢による活動量低下を抑制する⁽⁷⁾。

一方、近年血清リン濃度上昇が心血管疾患や死亡のリスクを増大させることが明らかとなり、リン管理が健康長寿を支える上で重要であることが解明されてきた。筆者らは、CKDにおける高リン腎毒性に着目し、オートファジーがミトコンドリア品質管理を介して腎を保護する。しかし次第にオートファジー障害を起こし、その保護作用を打ち消すことを見出した⁽⁸⁾。坂口らは、1) CKD患者の腎不全進行リスクは血中高リン・低マグネシウム値の患者群で上昇する、2) 高リン負荷による尿細管細胞死が低マグネシウム濃度下で増悪する⁽⁹⁾、3) 低マグネシウム食はP負荷によるマウス腎障害を悪化させる⁽¹⁰⁾、さらに、4) マグネシウ

ムがCKD患者の血管石灰化を抑制する⁽¹¹⁾などを報告し、高リン毒性に対するマグネシウムの保護効果を報告してきた。

本研究では、「マグネシウムによるオートファジー調節により高リン毒性は解除できる」という仮説をたて、高リン負荷がCKD患者のサルコペニアに及ぼす影響を解明し、オートファジー不全を解消し筋力低下を抑制する分子を模索し、食とオートファジーを通じて、筋力維持、ひいては健康長寿実現につなげることを目的とした。

結 果

3.1 高リン負荷がオートファジーリソソーム系に及ぼす影響の検討

CKD患者は個体レベルで、サルコペニアのみならず、認知症・心血管疾患・骨粗鬆症・皮膚萎縮などの老化が実年齢以上に進行した状態となっており、「腎性早老症」という概念が提唱されている。その機序として、CKDにおいて体内に蓄積するリンが腎性早老症を引き起こす可能性、言い換えるとリンが最大の尿毒症物質と考えられている。CKD患者において高リン血症は頻度の高い合併症であり、総死亡および心血管疾患発症の独立した危険因子である。またCKD進行に伴い腎尿細管におけるリン負荷が増大し、さらなる腎障害進展に寄与する。以上より、CKDにおける高リン腎毒性に着目し、片腎摘 高リン負荷CKDモデルマウスの解析を開始した。まず、近位尿細管のオートファジー（特に、傷害ミトコンドリアを除去するマイトファジー）が亢進しミトコンドリア品質管理を介して腎保護に働くことを報告した⁽⁸⁾。このように高リン負荷によりオートファジー（マイトファジー）が亢進した腎では、p62タンパクが増加しており、ここでもやはりオートファジー活性化が必要な状態であるにもかかわらず相対的に不十分であることが示唆された。続いて筆者らが樹立した野生型近位尿細管培養細胞に、リン負荷（2.5mM）を行い、オートファジー活性（LC3-II）を検討したところ、オートファジーはいったん活性化するものの、長時間のリン負荷ではその活性が消失することが判明した。免疫染色を用いた評価により、長時間リン負荷にさらされた培養細胞では、次第にオートファジー後期段階のオートファゴソームとリソソームの融合不全を起こしてしまうことを見出した。

3.2 高リン負荷によるRubicon増加とサルコペニア

吉森らは、オートファゴソームとリソソームの融合抑制を通じてオートファジーを負に制御する因子Rubiconを同定していたため、高リン負荷におけるRubiconに着目した。高リン負荷により腎臓や肝臓においてRubiconのタンパク発現量が増加しオートファジー不全が生じること、近位尿細管特異的にRubiconをノックアウトすると高リン負荷による腎尿細管障害が改善することが明らかとなった（図1 A, B）。そこで続いて、全身Rubiconノックアウトマウスと野生型コントロールマウスに対し、8週齢より高リン負荷（リン2%）を3カ

月間行いgrip testにより筋力を評価したところ、高リン負荷により筋力低下が起こること、全身Rubiconノックアウトマウスでは筋力低下が緩和されることを見出した(図1 C)。実際、全身Rubiconノックアウトマウスでは前脛骨筋や腓腹筋の筋肉重量が維持されていた。以上により、全身におけるRubicon発現抑制が、高リン負荷による筋力低下を抑制できることが判明した。

図1 高リン負荷によるRubiconの増加とRubiconノックアウトによる筋力の改善

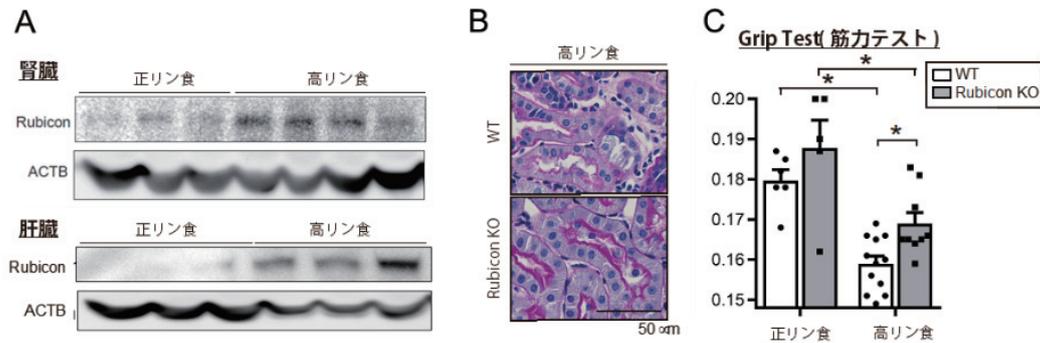
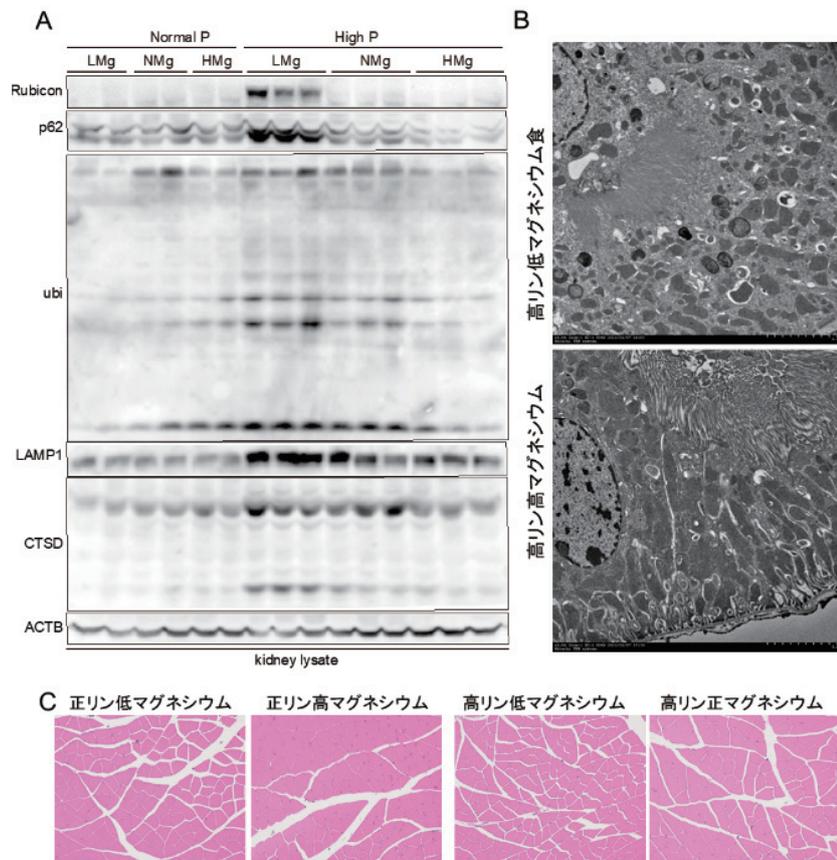


図2 マグネシウム充足は、高リン負荷による腎オートファジー不全と筋サイズ低下を軽減する



3.3 マグネシウムによる高リン毒性解除

低マグネシウム血症は、CKD患者において最も頻度の高い電解質異常であり、進行したCKD患者の約15%に低マグネシウム血症が存在する、また尿蛋白による尿細管障害というありふれた病態自体が低マグネシウム血症のリスクとなり、腎障害進展に向かう悪循環に陥る⁽¹²⁾。さらに、低マグネシウム血症はCKD患者の腎機能低下や透析患者の死亡リスク上昇と関連する^(9, 10)。そこで、片腎摘野生型マウスに対して、正(リン=0.29%) or 高リン(リン=1.29%) × 低(マグネシウム=0.01%) or 正(マグネシウム=0.05%) or 高マグネシウム(マグネシウム=0.2%) 食を与え、腎機能・腎組織障害に加え、筋力測定・筋組織の評価を行った。まず、興味深いことに、高リン低マグネシウム食はRubiconを著増させ、オートファゴソームとリソソームの融合不全からオートファゴソーム・p62・ユビキチンの蓄積を起こした。リソソームの数・機能は亢進していた。それに対し、マグネシウムを充足させるとこれらのオートファジー障害と腎尿細管障害・炎症所見が改善した(図2 A, B)。高リン低マグネシウム食負荷群では、腎臓におけるオートファジー障害・腎尿細管障害に加え、筋力低下・骨格筋重量・筋線維のサイズ低下が認められたが、マグネシウム補充によってこれらは有意に改善した(図2 C)。マグネシウムの充足により、全身におけるRubicon増加が適切なレベルにまで抑制され、全身の高リン毒性が解除された可能性が推測された。

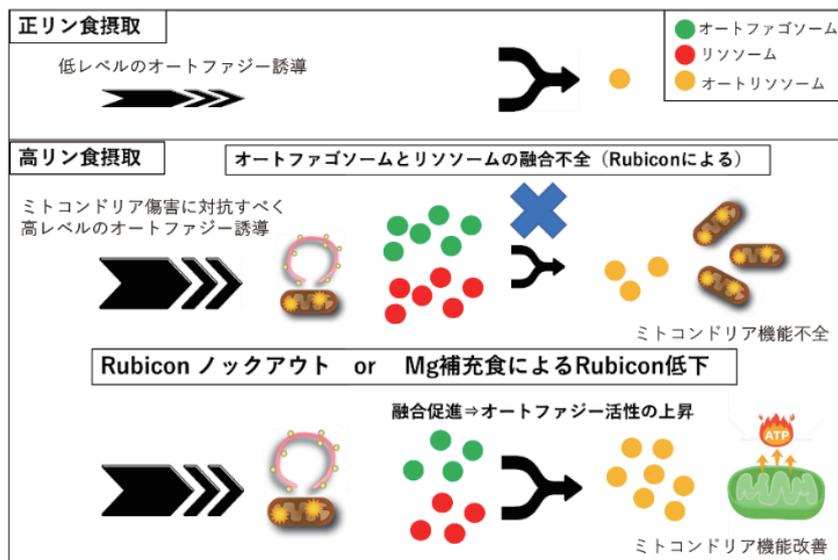
考 察

本研究では、①高リン負荷は、全身の種々の臓器でRubiconを増加させ、オートファジー後期段階の障害をもたらすこと、②全身におけるRubiconの抑制は高リン負荷による筋力低下を予防すること、③低マグネシウム食は高リン毒性を増悪させるが、その充足によって筋力維持につながることを見出した(図3)。これまでオートファジーを扱った多くの基礎研究では、人工的にオートファジー(オートファゴソーム形成の前期段階)を不全にしたマウス(Atg5ノックアウト)が使用され、酵母から哺乳類におけるオートファジーの重要な役割が証明されてきたが、筆者らの検討により、老化や肥満・糖毒性により、さらにヒト肥満患者でも、特にオートファジー後期段階の不具合によりオートファジー不全(病態に対抗するために必要な活性が不十分である状態)が生じ、病態に寄与していることが判明した。つまりこれまでのオートファジー研究の成果は、空想上のものではなく人々の健康・実臨床に深く関係することを証明した^(2, 3, 13)。吉森らは、オートファジーの負の制御因子Rubiconを世界で初めて同定し⁽⁶⁾、加齢に伴い全身の種々の臓器でRubiconが増加すること、Rubiconを抑制すると加齢に伴う老化現象の改善と寿命延伸が見られることを報告している⁽⁷⁾。今回、全身におけるRubiconノックアウトが高リン負荷マウスのサルコペニア改善にも寄与することが判明した。

現在、オートファジーを亢進させる薬剤の開発が世界的に進められている。筆者は、オートファジーを本来体に備わっている生体恒常性維持機構と捉え、食生活を通じてオートファ

ジー調節を行うことこそが健康長寿の秘訣と考えている。その観点から、最近オートファジー障害を解除する食品成分を探索し、魚食に多く含まれるエイコサペンタエン酸（EPA）がオートファジーを回復し腎脂肪毒性を軽減することを見出した⁽¹³⁾。抗炎症作用があり、副作用が比較的少ないことから、EPAを含む ω -3脂肪酸のサルコペニアへの作用が期待されており、骨格筋のミトコンドリアへ好影響を及ぼす可能性がある⁽¹⁴⁾。マグネシウムもまた伝統的な日本食に豊富に含まれる。対照的に、現在わが国でも広く流通している加工食品・ファストフード・コンビニ食などでは、食品添加物に用いられる無機リンの消化管吸収率が極めて高くほぼすべて吸収されてしまう一方、精製過程で大半のマグネシウムが失われてしまう、すなわち高リン低マグネシウム食である。実際、厚生労働省『国民栄養調査』によるとマグネシウム推定摂取量の平均値（男性、50-59歳）は2002年から2019年の間に299mgから265mgへ減少し、推奨量である370mgを大きく下回っている。このように、リン毒性を増強させる典型的な食事が現代社会に広く流布しており、今後改めて、マグネシウムの有効性の確立・提唱を推進していきたい。

図3 マグネシウムはRubicon抑制・オートファジー改善により高リン負荷毒性を軽減する



要 約

本研究では、腎臓病におけるサルコペニアとオートファジーの関係を検討した。①リンはRubiconを増加させオートファジー障害をもたらす、②Rubicon抑制は筋力低下を予防しうる、③マグネシウム欠乏はリン毒性を増悪させるがその充足は筋力維持につながる、の結果を得て、『マグネシウムがもたらす健康長寿の細胞生物学的機序』の一端を明らかにした。今後、さらにオートファジー研究が進展し、マグネシウムによるリン毒性軽減の機序が解明され、CKD患者の予後改善、超高齢化社会における健康長寿に寄与することが望まれる。

文 献

1. Mizushima, N, Levine, B: Autophagy in Human Diseases. *N Engl J Med* 383: 1564-1576, 2020
2. Yamamoto, T, Takabatake, Y, Kimura, T, Takahashi, A, Namba, T, Matsuda, J, et al.: Time-dependent dysregulation of autophagy: Implications in aging and mitochondrial homeostasis in the kidney proximal tubule. *Autophagy* 12: 801-813, 2016
3. Yamamoto, T, Takabatake, Y, Takahashi, A, Kimura, T, Namba, T, Matsuda, J, et al.: High-Fat Diet-Induced Lysosomal Dysfunction and Impaired Autophagic Flux Contribute to Lipotoxicity in the Kidney. *J Am Soc Nephrol* 28: 1534-1551, 2017
4. Takabatake, Y, Yamamoto, T, Isaka, Y: Stagnation of autophagy: A novel mechanism of renal lipotoxicity. *Autophagy* 13: 775-776, 2017
5. Sakai, S, Yamamoto, T, Takabatake, Y, Takahashi, A, Namba-Hamano, T, Minami, S, et al.: Proximal Tubule Autophagy Differs in Type 1 and 2 Diabetes. *J Am Soc Nephrol* 30: 929-945, 2019
6. Matsunaga, K, Saitoh, T, Tabata, K, Omori, H, Satoh, T, Kurotori, N, et al.: Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol* 11: 385-396, 2009
7. Nakamura, S, Oba, M, Suzuki, M, Takahashi, A, Yamamuro, T, Fujiwara, M, et al.: Suppression of autophagic activity by Rubicon is a signature of aging. *Nat Commun* 10: 847, 2019
8. Fujimura, R, Yamamoto, T, Takabatake, Y, Takahashi, A, Namba-Hamano, T, Minami, S, et al.: Autophagy protects kidney from phosphate-induced mitochondrial injury. *Biochem Biophys Res Commun* 524: 636-642, 2020
9. Sakaguchi, Y, Iwatani, H, Hamano, T, Tomida, K, Kawabata, H, Kusunoki, Y, et al.: Magnesium modifies the association between serum phosphate and the risk of progression to end-stage kidney disease in patients with non-diabetic chronic kidney disease. *Kidney Int* 88: 833-842, 2015
10. Sakaguchi, Y, Hamano, T, Matsui, I, Oka, T, Yamaguchi, S, Kubota, K, et al.: Low magnesium diet aggravates phosphate-induced kidney injury. *Nephrol Dial Transplant* 34: 1310-1319, 2019
11. Sakaguchi, Y, Hamano, T, Obi, Y, Monden, C, Oka, T, Yamaguchi, S, et al.: A Randomized Trial of Magnesium Oxide and Oral Carbon Adsorbent for Coronary Artery Calcification in Predialysis CKD. *J Am Soc Nephrol* 30: 1073-1085, 2019
12. Oka, T, Hamano, T, Sakaguchi, Y, Yamaguchi, S, Kubota, K, Senda, M, et al.: Proteinuria-associated renal magnesium wasting leads to hypomagnesemia: a common electrolyte abnormality in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 34: 1154-1162, 2019
13. Yamamoto, T, Takabatake, Y, Minami, S, Sakai, S, Fujimura, R, Takahashi, A, et al.: Eicosapentaenoic acid attenuates renal lipotoxicity by restoring autophagic flux. *Autophagy* 17: 1700-1713, 2021
14. Tachtsis, B, Camera, D, Lacham-Kaplan, O: Potential Roles of n-3 PUFAs during Skeletal Muscle Growth and Regeneration. *Nutrients* 10, 2018