

論文の内容の要旨

論文題目

リン過剰摂取による筋ジストロフィー症状の重篤化とそのメカニズムの解明

氏名 和田英治

背景と目的

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy, DMD) は、X 染色体劣性遺伝であり、新生男児約 3,500 人に 1 人の割合で発症する重篤な筋疾患である。この病気は、骨格筋や心筋などの基底膜と細胞骨格を繋ぎ止める役割を担うジストロフィンタンパク質の欠損を原因とする。そのため、DMD の骨格筋は機械的刺激に対する抵抗性が弱く、次第に筋細胞膜が破壊される。未だ DMD に対する有効的な治療法は確立されていないが近年、医療の発展により DMD 患者の寿命は著しく延びている。また、運動療法による骨格筋保護が困難な DMD 患者において、食事は病気の進行抑制や quality of life (QOL) 向上にとって非常に重要な役割を担う。しかし、DMD 患者は幼児期から肥満が増加しており、偏食やカロリー過多が問題視されている。根本的治療法の確立と共に、患者の QOL 向上を見据えた食事療法の確立は重要な意味を持つ。

本研究の目的は、近年の食生活で問題視されているリン過剰摂取が DMD 症状に与える影響を、DMD モデル動物である *mdx* マウスを用いて明らかにすることである。リンは人体にとって必要不可欠な栄養素であるが、現代の食生活により天然食品からの有機リンと加工食品に含まれる防腐剤や食品添加剤からの無機リンの摂取量が共に増加しており、健康へ及ぼす悪影響が懸念されている。ヒトや動物または培養細胞を用いた実験において高リン（リン酸）は Phosphate Toxicity として報告されている。このような条件で骨格筋細胞を培養すると筋分化が抑制され骨分化が促進されることや、軟骨細胞

では細胞死が起こることが分かっている。またマウスにおいてリン代謝異常は成長遅延や早老症に関係し、血管石灰化や腎臓石灰化を生じる。

そこで、本研究では食餌中リン含有量を 0.7 g/100 g（低リン食）、1.0 g/100 g（通常リン食）、2.0 g/100 g（高リン食）とした特注飼料を用い、正常対照マウスと *mdx* マウスに離乳時（20 日齢）から最長 90 日齢に達するまで自由摂取させた。また、市販されている食餌（CE-2）を与えた正常対照マウスと *mdx* マウスも同様に飼育した。これらの飼料を用いて、リン摂取量が DMD の骨格筋や骨代謝さらにリン代謝に与える影響を検討した。

実験結果と考察

骨格筋内異所的石灰化（リン酸カルシウムの沈着）は筋変性に伴って起こる *mdx* マウスの特徴的な筋病理である。これまでに高リン食摂取によって骨格筋内異所的石灰化が有意に増加することが分かっている。しかし、骨格筋内にリン酸カルシウムが沈着するメカニズムについては不明であった。そこで本研究ではまず、透過型電子顕微鏡を用いて異所的石灰化が起こるメカニズムの解明を行った。その結果、初期のリン酸カルシウム沈着は変性したミトコンドリアなどの器官に観察できた。また、巨大化した異所的石灰化を観察すると、内部にミトコンドリアの様な構造物が無数に確認できた。さらに筋変性部位周辺に浸潤したマクロファージは、変性タンパクだけでなくリン酸カルシウムが沈着した器官も貪食していた。すなわち、*mdx* マウス骨格筋内の異所的石灰化は、変性したミトコンドリアなどに初期のリン酸カルシウムが沈着し、マクロファージがそれらを貪食することで集合体となり、マクロファージが細胞死を起こした結果、巨大化したリン酸カルシウムが骨格筋内に沈着すると考えられる。

次に、骨格筋変性が顕著な *mdx* マウスにおいてリン過剰摂取が変性筋線維領域とマクロファージ浸潤領域を有意に増加させることを明らかにした。先行研究と一致して、通常リン食 *mdx* マウス骨格筋内に存在するマクロファージは炎症性（M1）と抗炎症性（M2）の割合がほぼ等しかったが、高リン食 *mdx* マウスの骨格筋内では M1 マクロファージの占める割合が有意に増加しており、筋再生を助長する M2 マクロファージが有意に減少した。自発的運動量増加による機械的ストレスが加わると、高リン食摂取 *mdx* マウスの骨格筋変性とマクロファージの浸潤はさらに増加した。高リン環境は DMD の骨格筋に対して筋変性を拡大させ、炎症性マクロファージを増加させることで慢性的な炎症が生じ、筋変性が悪化したと考えられる。

低リン食摂取により *mdx* マウスの筋変性は抑制され、M1 マクロファージが減少し、

M2 マクロファージが増加することが明らかとなった。また、低リン食 *mdx* マウスは運動負荷による筋変性の拡大が抑制され、運動後も M2 マクロファージの局在が増加した。低リン食摂取による *mdx* マウス骨格筋症状の改善が、リン吸着薬を用いても再現できるかを調べるため、塩酸セベレマー（レナジェル錠）を離乳時から 60 日齢、さらに 45 日齢から 90 日齢まで *mdx* マウスに与えた。その結果、骨格筋内マクロファージの浸潤が低下し、筋壊死と再生の指標となる中心核を有する筋線維数が有意に減少した。マクロファージの表現型を確認したところ、やはり M2 マクロファージの占める割合が増加した。このことから、低リン食摂取だけでなくリン吸着薬投与によっても DMD 骨格筋症状が改善されることが明らかとなった。これらの結果からリンは、過剰摂取による骨格筋変性の重篤化と摂取制限による筋変性の抑制効果という濃度依存的な影響があると考えられる。また、リン負荷は直接的に脆弱な筋細胞を崩壊させ（細胞毒性）、さらに炎症性マクロファージを増加させるメカニズムが存在すると示唆した。

次に *mdx* マウスの骨密度と骨形成さらに骨代謝について検討した。リン摂取量に関わらず *mdx* マウスは正常対照マウスと比較して脛骨の海綿骨と皮質骨の骨密度が有意に低下した。さらに骨形態においても *mdx* マウスでは顕著に悪化しており、骨粗鬆症であることが明らかになった。*Mdx* マウスは正常対照マウスよりも運動量が低下していることを明らかにし、骨へのストレスが減少していることが原因で骨密度が低下していると示唆した。高リン食摂取 *mdx* マウスは低リン食や通常リン食 *mdx* マウスよりも運動量が有意に低下していた。骨形成マーカーである血中 BALP 濃度が有意に低下したことから、高リン食 *mdx* マウスは低回転性骨粗鬆症に陥ることが明らかとなった。高リン食摂取により、正常対照マウスの骨密度も低下したことから、骨からカルシウムが溶出したことも、*mdx* マウスの骨密度が大幅に低下した要因であると考えられる。

リン代謝を比較するため、血中リン酸濃度とカルシウム濃度、さらにリン代謝因子である副甲状腺ホルモン（PTH）、線維芽細胞増殖因子（FGF-23）を測定した。通常リン食 *mdx* マウスは血中 PTH と FGF-23 濃度が有意に増加していたため、リン代謝が亢進していることが明らかとなった。また、*mdx* マウスは正常対照マウスと同様に高リン食摂取によって血中 PTH や FGF-23 が有意に増加したにも関わらず、血中リン酸濃度が有意に増加しており、高リン酸血症を引き起こした。腎臓内のリン代謝因子である *klotho* と NaPi 2a, NaPi 2c の発現量は正常対照マウスと *mdx* マウスで変わらず、リン過剰摂取によってこれらの発現量は同様に低下した。

以上の結果から、*mdx* マウスはリン代謝因子（PTH, FGF-23, *klotho*, NaPi 2a, NaPi 2c）の発現や機能に異常はないが、高リン食摂取によって高リン酸血症に陥ることから、腎機能低下が疑われた。腎臓は全長ジストロフィンを発現しておらず他の膜タンパクの発

現も正常対照マウスと変わらないため、骨同様にジストロフィン遺伝子の欠損は直接的な影響をもたらさないと考えられる。そこで骨格筋量に依存しない血中 cystatin C を用いて腎機能を比較した結果、*mdx* マウスは全てのリン食群で cystatin C が有意に増加しており、腎機能が低下していることが明らかとなった。また、一般的に使用されている食餌（CE-2）を摂取した *mdx* マウスの腎機能についても検討した結果、90 日齢正常対照マウスと比較して、*mdx* マウスの血中ならびに尿中 cystatin C 濃度は有意に増加した。さらに X 線 μ CT スキャナーを用いて、腎臓をダイナミックスキャン（腎臓での造影剤代謝速度を測定）した結果からも、*mdx* マウスは腎代謝機能が低下していることが支持された。すなわち、*mdx* マウスは腎機能が低下しているため、リン過剰摂取によって血中リン酸濃度が調整できなかったことが明らかとなった。

腎機能低下の原因を解明するため、正常対照マウスと *mdx* マウスの血液分析を行い、さらに 24 時間飲水量と尿量、ヘマトクリット値を比較した。*Mdx* マウスは血中カルシウム濃度が有意に増加しており、高カルシウム血症であることが分かった。さらに飲水量が変わらないにも関わらず尿量が有意に増加した。代謝老廃物である血中総タンパクやアルブミン、血中尿素窒素、尿酸が増加し、さらにヘマトクリット値も有意に増加しており、*mdx* マウスは脱水症状であると考えられる。*Mdx* マウスは骨格筋変性が原因で運動量が低下し、骨密度が有意に低下した。高カルシウム血症を併発すると、浸透圧利尿が起こり、脱水症状を引き起こす。脱水症状が続くと循環血中量の低下に伴い腎臓の血流量が低下し、糸球体でろ過する血液量が減るため、腎機能が低下したと示唆した。

本研究では、*mdx* マウスが高カルシウム血症のため脱水症状を起こすことが原因で腎機能が低下することを初めて見出した。さらに腎機能が低下することで血中リン酸濃度が調整できず、体内の高リン環境が骨格筋変性を拡大する可能性が示唆された。しかし腎臓と骨格筋の関係についてはこれまであまり着目されていない。本研究では、腎機能が低下した正常対照マウスの骨格筋に対し、意図的に筋損傷を誘発すると筋再生過程で異所的石灰化が起こることを突き止めた。今後、筋ジストロフィーだけでなく、腎不全患者における骨格筋の萎縮、さらに高齢者における加齢性筋肉減弱症（サルコペニア）に対しても、腎機能低下が骨格筋に与える影響を解明することが望まれる。

リン過剰摂取が *mdx* マウスの DMD 症状を重篤化させること、対照的に低リン食摂取やリン吸着薬投与によって症状が改善されることを明らかにした。DMD 患者がすぐにも実践できる補完治療法であり、さらに DMD と同様な症状を引き起こす他の筋疾患に対しても有効であると考えられる。