

博士論文

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

和田 英治

目次

略語一覧	1~3
序論	4~15
デュシェンヌ型筋ジストロフィー	4
デュシェンヌ型筋ジストロフィーを取り巻く環境の変化	5
DMD モデルマウス (<i>mdx</i> マウス)	6
DMD の骨格筋とマクロファージ	7
リン代謝とリン過剰摂取に関連する疾患について	8
修士課程における研究：リン過剰摂取が <i>mdx</i> マウスの	10
骨格筋内異所的石灰化と筋機能に与える影響	
本研究について	13
実験材料と方法	16~29
実験動物と特殊飼料	16
血液サンプルと組織サンプル採取	17
組織切片染色と免疫染色	17
ヘマトクリット値測定	19
尿サンプルの採取	19
回転ケージを用いた自発的運動	20
CTX による筋再生評価	20
骨格筋中へのリン酸投与	20
腎不全マウスの作製とリン食摂取による異所的石灰化への影響	21
細胞培養（リン酸添加実験）と免疫染色	21

腎臓刷子縁膜分画の単離	22
ウエスタンブロット用サンプルの作製	23
ウエスタンブロット	23
RT-PCR	24
血液中・尿中成分分析	25
ELISA による血中 PTH, FGF-23, BALP, CTx, cystatin C 濃度の定量	26
透過型電子顕微鏡による骨格筋内異所的石灰化の観察	26
脛骨の骨密度と骨形態の 3 次元解析	27
ダイナミックスキャンを用いた腎臓代謝機能測定	28
リン吸着薬（レナジェル）による筋ジストロフィー症状への影響	28
統計処理	29
研究 1：リン摂取による筋ジストロフィー骨格筋症状への影響	30~62
概要と目的	30
結果	32~
骨格筋異所的石灰化の起源とそのメカニズム	32
高リン食摂取により <i>mdx</i> マウス骨格筋の壊死筋線維は増加する	35
リン摂取量増加による <i>mdx</i> マウス骨格筋内 M1 マクロファージの増加	39
高リン食摂取による炎症と骨化マーカーの遺伝子発現の増加	42
高リン食摂取と急性運動ストレスの負の相乗効果による筋変性の悪化	43
高リン食摂取は筋変性を増加させるが、筋再生には影響しない	50
低リン食摂取により <i>mdx</i> マウス骨格筋壊死や変性領域は抑制される	52
リン吸着薬による <i>mdx</i> マウスの骨格筋変性への影響	54
研究 1 のまとめ	60

研究 2：リン摂取による筋ジストロフィーの骨代謝への影響	63~74
概要と目的	63
結果	65~
<i>Mdx</i> マウスにおける骨密度の低下と骨代謝異常（正常対照マウスとの比較）	65
高リン食摂取による骨密度と骨代謝低下（リン食群間の比較）	71
低リン食摂取による <i>mdx</i> マウスの骨密度と骨代謝の改善	72
研究 2 のまとめ	73
 研究 3：筋ジストロフィーのリン代謝と腎機能について	 75~95
概要と目的	75
結果	78~
高リン食摂取による <i>mdx</i> マウスのリン代謝異常	78
<i>Mdx</i> マウスの腎機能低下	86
<i>Mdx</i> マウスは高カルシウム血症による脱水が原因で腎機能低下に陥る	87
腎機能不全と骨格筋内異所的石灰化の関係	90
研究 3 のまとめ	93
 総括	 96~103
<i>Mdx</i> マウス骨格筋内異所的石灰化のメカニズムについて	98
リン過剰摂取は骨格筋変性を悪化させる	99
リン過剰摂取は骨代謝を低下させ、骨密度を減少させる	99
低リン食摂取により骨格筋変性や骨密度の低下は改善する	100
<i>Mdx</i> マウスは腎機能が低下している	101
<i>Mdx</i> マウスの腎機能低下の原因について	102

引用文献 104~118

謝辞 119

略語一覧

ALB,	albumin (アルブミン)
ATP,	adenosine triphosphate (アデニン三リン酸)
BALP,	bone specific alkaline phosphatase (骨型アルカリフォスファターゼ)
BBMV,	brush border membrane vesicles (腎臓刷子縁膜)
BCA,	bicinchoninic acid (ビスニコニン酸)
BMD,	bone mineral density (骨密度)
BUN,	blood urea nitrogen (血中尿素窒素)
Ca,	calcium (カルシウム)
Ccr,	creatinine clearance (クレアチニンクリアランス)
CK,	creatine kinase (クレアチンキナーゼ)
CRE,	creatinine (クレアチニン)
CT,	computed tomography (コンピュータ断層撮影)
CTX,	cardiotoxin (カルジオトキシン)
CTx,	C-terminal collagen crosslinks (I型コラーゲン架橋 C-テロペプチド)
dKO,	double knockout (ダブルノックアウト)
DMD,	Duchenne Muscular Dystrophy (デュシェンヌ型筋ジストロフィー)
DMEM,	Dulbecco's modified Eagle medium (ダルベッコ改変イーグル培地)
DNA,	deoxyribonucleic acid (デオキシリボ核酸)
DPR,	dystrophin-related proteins (ジストロフィン関連タンパク質)
EBD,	evans blue dye (エバンスブルー色素)
EDTA,	ethylenediaminetetraacetic acid (エチレンジアミン四酢酸)
ELISA,	enzyme linked immunosolvent assay

eMyHC, embryonic myosin heavy chain (胎児型ミオシン重鎖)

FBS, fetal bovine serum (ウシ胎児血清)

FGF, fibroblast growth factor (線維芽細胞増殖因子)

FITC, fluorescein isothiocyanate (フルオレセインイソチオシアネート)

GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素)

H&E, hematoxylin & eosin (ヘマトキシリン&エオジン)

IL-6, interleukin-6 (インターロイキン-6)

IL-17, interleukin-17 (インターロイキン-17)

iNOS, inducible nitric oxide synthase

IP, inorganic phosphorus (無機リン)

mdx, C57BL/10ScSn-*mdx*

NaPi, sodium-dependent phosphate transporter (ナトリウム依存性リン酸トランスポーター)

NO, nitric oxide (活性酸素種)

OCT, optimal cutting temperature (凍結組織切片作製用包埋剤)

PBS, phosphate-buffered saline (リン酸緩衝生理食塩水)

PDVF, polyvinylidene difluoride (ポリフッ化ビニリデン)

PTH, parathyroid hormone (副甲状腺ホルモン)

QOL, Quality of Life (生活の質)

RNA, ribonucleic acid (リボ核酸)

RANKL, receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (破骨細胞分化因子)

TBS, tris buffered saline (トリス塩酸緩衝液)

T-CHO, total cholesterol (総コレステロール)

TNF, tumor necrosis factor (腫瘍壊死因子)

TP, total protein (総タンパク)

UA, uric acid (尿酸)

序論

デュシェンヌ型筋ジストロフィー

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、主に新生男児約 3,500 人に 1 人の割合で発症する重篤な筋疾患である (Moser, 1984)。DMD は Xp21 にあるジストロフィン遺伝子 (79 個のエキソンを持つ) の欠損によって起こり、1987 年に Koenig らによってクローニングされ (Koenig et al., 1987)、1991 年に Ervasti らによって初めて骨格筋からジストロフィンタンパクが精製された (Ervasti et al., 1991)。ジストロフィンはアミノ酸 3,685 個、427 キロダルトンの非常に巨大なタンパク質であり (Hoffman et al., 1987)、正常筋細胞の外膜である基底膜と細胞内にある細胞骨格を繋ぎ止める役割を担う (Watkins et al., 1988)。しかし、DMD ではジストロフィンが欠損しているため、機械的刺激に対する筋細胞膜の抵抗性が弱く、次第に筋細胞膜が破壊される。さらに筋変性の際に慢性的な炎症が起こり、炎症の拡大がさらなる筋線維壊死を引き起こすことが報告されている (Villalta et al., 2011)。

乳児期の DMD 患者は身体的異常がほとんど認められないが、多くの患者は歩行開始時期が遅く、3~5 歳頃には歩行・走行がぎこちなく、転びやすいといった症状が認められる (van Ruiten et al., 2014)。この年齢ではすでに骨格筋収縮の際にエネルギー代謝に関与する酵素であるクレアチンキナーゼ (creatine kinase, CK) が血中に漏れ出し、血中 CK 値が大幅に増加するため骨格筋損傷の指標として用いられる (Ebashi et al., 1959)。また、下腿部のふくらはぎ (腓腹筋) が筋肉質で一見発達しているように見られるが、これは仮性肥大といい、筋細胞が崩壊した部位が脂肪組織によって置換して起こる、男児 DMD の特徴的な症状である (Kornegay et al., 2012)。さらに症状が進行すると、足の屈伸運動から立ち上がる際に膝に手をつけて体を支えながら立位する、ガワーズ徴候と

いう筋力低下の明らかなサインが認められるようになる (Chang and Mubarak, 2012)。

患者の多くは 10 歳頃に歩行困難になり小学校高学年から車椅子での移動を余儀なくされる。特にこの時期から筋再生が筋変性速度に追いつかず、筋細胞が結合組織や脂肪組織に置き換わることで筋肉の伸張性が失われ、関節可動域が制限される。そのため、小学生から成長期にかけて関節拘縮や脊椎の変形などが認められる。

デュシェンヌ型筋ジストロフィーを取り巻く環境の変化

1990 年代の DMD は、20 代まで生きられない重篤な病気として知られ、患者は主に呼吸不全（全体の 2/3）や心不全で亡くなっていた。また、対処療法も確立されておらず過度な運動療法も積極的に取り入れられていたようである。

現在の DMD 患者を取り巻く環境は以前から比較して、大きく進展している。近年では人工呼吸器の普及に伴う呼吸管理 (Villanova et al., 2014) や、心筋保護治療、さらには適切なリハビリテーションが、生活の質 (quality of life, QOL) の向上や寿命の延長（平均寿命は 30 歳以上）をもたらした (Liew and Kang, 2013)。骨格筋量維持や炎症の抑制には副腎皮質ホルモン（ステロイドホルモン）の有効性が証明されており、補完治療法として用いられている (Khan, 1993)。また、ステロイドの長期投与についても、日本での臨床研究により、患者の歩行可能時期を延長することが報告されている (Takeuchi et al., 2013)。

しかし一方で、若年 DMD 患者の多くは肥満か痩せの傾向にあり、QOL の低下が懸念されている (Davidson and Truby, 2009)。近年、肥満の傾向にある患者が増加しており、その背景として筋量の低下に伴う運動量低下、過度のエネルギー摂取（食べ過ぎ、カロリー過多）、さらにステロイド治療の副作用が挙げられる (Davidson et al., 2014)。過度な体重増加は心臓への負担も大きくなるので注意が必要である。

現在、人工核酸を用いたエキソンスキッピングや抗生物質あるいは新規化合物を用いたリードスルーなどの治療戦略が、モデル動物で実証され、DMD 患者に対する臨床試験が進められている (Welch et al., 2007; Hoffman et al., 2011)。さらに、ステロイド治療の副作用である骨密度の低下を抑制するためカルシウムやビタミン D のサプリメントが有効であることが報告されている (Bianchi et al., 2011)。基礎研究では、骨格筋保護や筋変性に伴う炎症の軽減のため、アミノ酸や抗酸化作用の高い緑茶エクストラクトやレスベラトロールなどの有効性が明らかにされ、患者の QOL を向上するための補完治療法の開発が着目されている (Zdanowicz et al., 1995; Buetler et al., 2002; Passaquin et al., 2002; Barton et al., 2005; Yoshida et al., 2006; Payne et al., 2006)。しかしながら、未だに根本的治療法は確立されておらず、ステロイド治療も副作用や投与期間の問題から効果が長続きしない。そのため現在までのところ DMD 患者は誰一人として救われておらず、根本的治療法の開発のみならず、症状を遅延させ患者の QOL を向上させるための補完治療法の研究も重要である。

DMD モデルマウス (*mdx* マウス)

DMD モデル動物である C57BL/10ScSn-*mdx* (*mdx*) マウスは Bulfield らによって発見された (Bulfield et al., 1984)。*Mdx* マウスは X 連鎖劣性遺伝でエクソン 23 にストップコドンが生じたためジストロフィンが欠損している (Sicinski et al., 1989)。そのため DMD の筋病態をよく再現しており DMD 治療の基礎研究において重要な役割を果たしている。*Mdx* マウスは持続的な筋変性を生じ、筋張力や運動量が低下しており、骨密度も有意に減少する (Anderson et al., 1993; Bianchi et al., 2011)。しかしながら、高週齢になるまで筋線維の萎縮や結合組織・脂肪組織への置換は認められない (Luz et al., 2002; Sacco et al., 2010)。外見も正常対照マウスと変わらず、寿命も多少短い程度である。ま

た、*mdx* マウスは骨格筋変性部位に線維化や脂肪化はほとんど認められないが、異所的石灰化（リン酸カルシウムの沈着）が起こることが特徴的な筋病理である（Coulton et al., 1988; Kikkawa et al., 2009）（図 1 A）。

Mdx マウスは DMD を発症しているにもかかわらず繁殖能があり、非常に実験に用いやすい。また、DMD 患者とは異なり、寿命は正常対照マウスと比較すると短いものの、2 年以上生きる（Chamberlain et al., 2007）。さらに、最も異なる特徴としてマウス特有の非常に高い筋再生能が挙げられる。DMD 患者では幼児期からすでに筋変性後に線維化や脂肪化といった置換が認められる。この置換が DMD 症状の重篤化に大きく寄与するが、*mdx* マウスでは 1 年齢以上に達しないと線維化の増加は認められない（Chamberlain et al., 2007）。カルジオトキシン（cardiotoxin, CTX）を 1 週間に 1 度骨格筋に連続投与しても筋壊死後に筋再生は正常に起こり、先行研究では約 50 回（50 週）にわたり CTX を投与して遂に筋線維萎縮や線維化が顕著になることを報告している（Luz et al., 2002）。*Mdx* マウスの高い筋再生能力にはテロメアが関与している報告があり、実験用マウスはテロメアが非常に長い。テロメラーゼを欠損した *mdx* マウスでは筋再生能が低く、線維化が悪化し、さらに寿命も短くなる（Sacco et al., 2010）。このように通常の *mdx* マウスより症状が重篤化したマウスを用い、遺伝子治療や新規薬剤の効果を検討する試みが行われている。また、dystrophin のホモログである utrophin を欠損させた *mdx* マウス（double knockout マウス、dKO マウス）は、平均寿命が約半年と短く、さらに脊椎の変形や後肢の筋萎縮が認められる（Grady et al., 1997）。

DMD の骨格筋とマクロファージ

DMD の骨格筋は連続的な壊死が起こり、変性タンパクは主に貪食細胞であるマクロファージによって取り除かれる。マクロファージには、筋壊死の急性期に見られる貪食

作用と共に炎症反応を亢進する作用を持つ I 型マクロファージ (M1) と、筋再生に寄与する II 型マクロファージ (M2) が知られている (Villalta et al., 2009)。この M1 マクロファージは、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF) の一種である TNF- α やインターロイキン-6 (interleukin-6, IL-6) などの炎症性サイトカインを産生し、骨格筋で筋変性を悪化させることが知られている。筋変性が顕著な若齢 *mdx* マウスの骨格筋においては M1 マクロファージが占める割合が増加している (Villalta et al., 2011a)。一方、M2 マクロファージは骨格筋の再生段階で筋修復に寄与することが分かっている。筋変性と再生のサイクルが落ち着いてくる約 12 週齢頃からの *mdx* マウス骨格筋では M2 マクロファージの占める割合が増加することが報告されている (Villalta et al., 2011b)。先行研究では、魚に豊富に含まれる不飽和脂肪酸の一種であるエイコサペンタエン酸を *mdx* マウスに与えると、骨格筋で M2 マクロファージが占める割合が増加し、炎症が抑制されることで筋症状が緩和することを報告している (Carvalho et al., 2013)。このように、筋変性による炎症の拡大を抑制することで、DMD 症状が遅延することが分かっている。

リン代謝とリン過剰摂取に関連する疾患について

リンは生命維持に必要不可欠であり、体内で 2 番目に多いミネラルである。そのほとんど (体内の総リン量の 80% 以上) が骨や歯の主成分でカルシウムと結合している (Osuka and Razzaque, 2012)。また、リンはデオキシリボ核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) やリボ核酸 (ribonucleic acid, RNA)、生物のエネルギー源であるアデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate, ATP) の成分としても必須である。リンは主に小腸で吸収され、腎臓によって排出される。リン代謝については近年研究が進んでおり、腎臓の遠位尿細管に発現する *klotho*、近位尿細管に発現するナトリウム依存性リン酸トランスポーター (sodium-dependent phosphate transporter, NaPi) である NaPi 2a と NaPi 2c、副甲状

腺ホルモン（parathyroid hormone, PTH）、骨から分泌される線維芽細胞増殖因子（fibroblast growth factor, FGF）-23（FGF-23）等によって厳密に調整されていることが明らかとなっている（Kuro-o, 2010）。

リンは大半の食べ物に含有されているため、摂取するリンが不足することはほとんどない。体内からリンが欠乏すると骨や歯の形成障害が起こりやすくなるが、現代の食生活ではむしろリン過剰摂取が問題視されている（Calvo, 1993）。リンは有機リンと無機リンがあり、動物性や植物性食品には有機リンが、加工食品や食品添加物には無機リンが多く含まれている（Ritz et al., 2012）。乳製品、魚介類、さらに豆類には有機リンが多く含まれているが、これらはカルシウムも同程度含まれている。しかしファストフードやインスタント食品には食品添加剤や防腐剤として無機リンが含まれており、近年無機リンの摂取量が増加している。有機リンと無機リンの小腸での吸収率は大きく異なり、有機リンが 40~60%ほど吸収されるのに対し、無機リンはほぼ 100%吸収される（Takeda et al., 2012）。日本では、無機リンを多く含む食品添加物には表示義務がないため（条件による）、正確なリン摂取量は不明だが、平成 21 年度の国民健康栄養調査（厚生労働省）によると、日本人は 1 日あたりのリン摂取量が男性で平均 1,043 mg、女性で平均 908 mg と報告されており、有機リンのみで成人 1 日の必要リン摂取量を摂取していることになる。この調査では、無機リンからの摂取量を考慮しておらず、そのため現代の食生活では推奨リン摂取量の 2~3 倍を過剰摂取していると推測されている。

摂取した過剰なリンは主に腎臓で排出されるが、長期間のリン過剰摂取は腎機能を低下させ血中リン酸濃度を増加させる。血液中のリンとカルシウムは均等なバランスで保たれており、リンをカルシウムより多く摂り過ぎるとバランスを保つためにカルシウムが骨から溶け出し、結果的に骨密度の低下を引き起こす。さらに、腎不全患者では血中リン酸濃度が増加すると心筋梗塞や心循環系の不全などの死亡リスクが増加することを示す報告もある（Gross et al., 2014）。

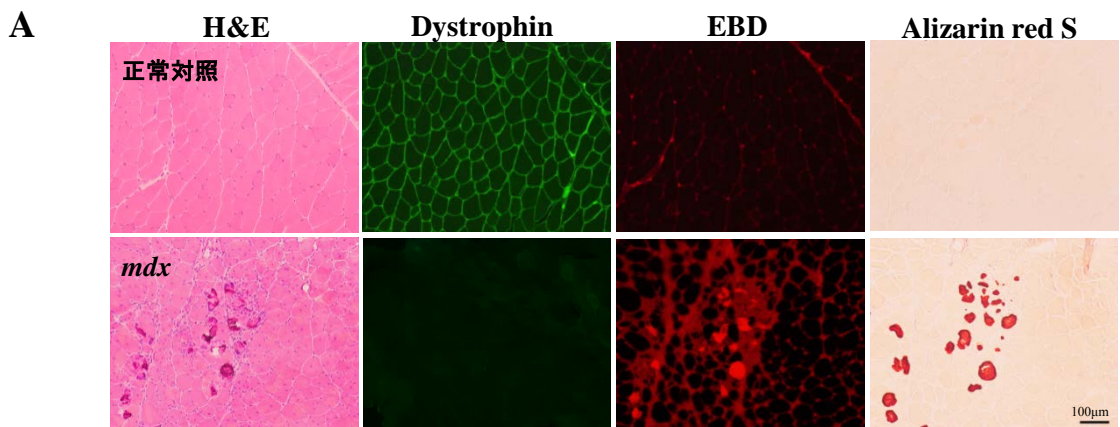
近年、過剰なリンはヒトや動物または培養細胞を用いた実験において Phosphate Toxicity として報告されている (Razzaque, 2011)。高リン環境下で骨格筋細胞を培養すると筋分化が抑制され骨分化が促進されることが明らかとなっている (Kikkawa et al., 2009)。またマウスにおいてリン代謝異常は成長遅延や早老症に関係し、さらに血管石灰化や腎臓石灰化を起こす報告もある (Kuro-o et al., 1997; Ohnishi and Razzaque, 2010)。

修士課程における研究：

リン過剰摂取が *mdx* マウスの骨格筋内異所的石灰化と筋機能に与える影響

リン過剰摂取の健康被害は動物実験や臨床で明らかになってきているが、DMD などの筋疾患への影響についてはこれまで報告がない。そこで、私は正常対照マウスと *mdx* マウスにリン含有量を変化させた特注餌を与え、リン摂取量の変化が骨格筋変性に与える影響を検討した。市販のマウス飼育・繁殖用飼料 (CE-2: クレア) を参考に、リンが 1.0 g/100 g、カルシウムが 1.2 g/100 g のものを通常リン食とし、リン含有量を 2 倍の 2.0 g/100 g に増加させたものを高リン食、さらにリンを 0.7 g/100 g に減量したものを低リン食とし、正常対照マウスと *mdx* マウスにそれぞれ離乳時 (20 日齢) から最長 90 日齢まで与えた (図 1 B)。

その結果、正常対照マウスと *mdx* マウスは 3 種類のリン食による体重増加率や骨格筋重量に変化は認められなかった (図 1 C)。Mdx マウスでは、高リン食摂取により骨格筋内異所的石灰化が有意に増加し (図 2 A, B)、心筋や腎臓においてもその沈着が認められた。当研究室で作成した *in situ* でマウス個体の骨格筋張力を測定できる筋張力測定システムを用い、*mdx* マウスの下腿三頭筋の筋張力を測定した結果、高リン食摂取の *mdx* マウスでは最大単収縮と最大強収縮が有意に低下した。回転ケージを用いた自発的運動量測定では、高リン食摂取の *mdx* マウスでは 7 日間の総運動量が有意に減少した。



B

	100g	低リン食	通常リン食	高リン食
脱脂粉乳	%	5.00	5.00	5.00
魚粉	%	5.00	5.00	5.00
脱脂大豆	%	11.75	11.75	11.75
アルファルファ	%	4.00	4.00	4.00
グルテンミール	%	3.00	3.00	3.00
トウモロコシ	%	24.50	24.50	24.50
小麦粉	%	38.20	37.00	32.80
食塩	%	0.380	0.380	0.380
炭酸Ca	%	1.700	1.700	1.700
塩化Mg	%	0.120	0.120	0.120
炭酸亜鉛	%	0.004	0.004	0.004
Ca	g	1.21	1.21	1.20
P	g	0.71	1.00	2.01
K	g	0.95	1.18	1.99
Na	g	0.30	0.38	0.66
Mg	g	0.25	0.25	0.24
Zn	mg	6.9	6.7	6.4
総カロリー	kcal	367	362	345

通常リン食の組成は市販されているマウスの飼料組成(CE-2)と同じ配合

C

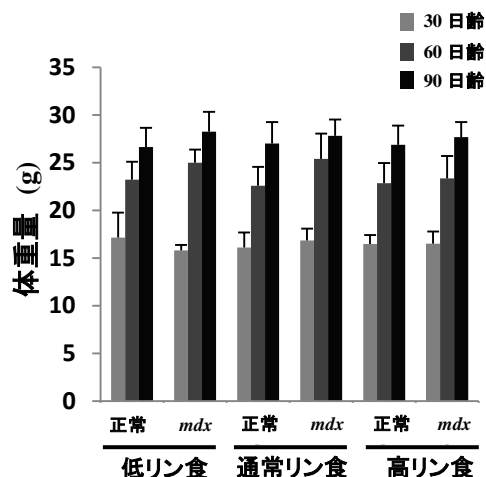
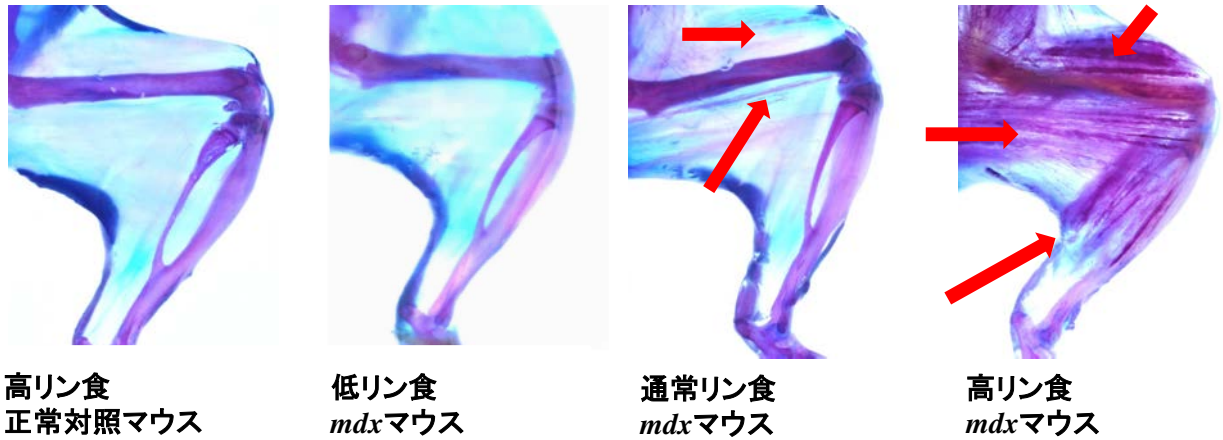


図1 *Mdx*マウスの筋病理的特徴と特注リン食組成ならびにマウスの体重変化

- (A) 正常対照マウスと比較して、*mdx*マウス骨格筋は膜裏打ちタンパクであるジストロフィンが欠損しており、EBD陽性の変性した筋線維が認められる。さらにalizarin red S(カルシウム染色)で染め分けたリン酸カルシウムの沈着(異所的石灰化)は*mdx*マウスの特徴的な筋病理である。
- (B) 本研究で用いた特注リン食は市販されているマウス飼料(CE-2, クレア)の組成をベースにリン酸一ナトリウム(無水)とリン酸一カリウムを用いてリン含有量を増加させた。
- (C) 20日齢から特注飼料を与え、30日齢、60日齢、90日齢の体重増加を示した。正常対照(正常)マウスと*mdx*マウスは全てのリン食群で同様の体重増加率であった。

A



B

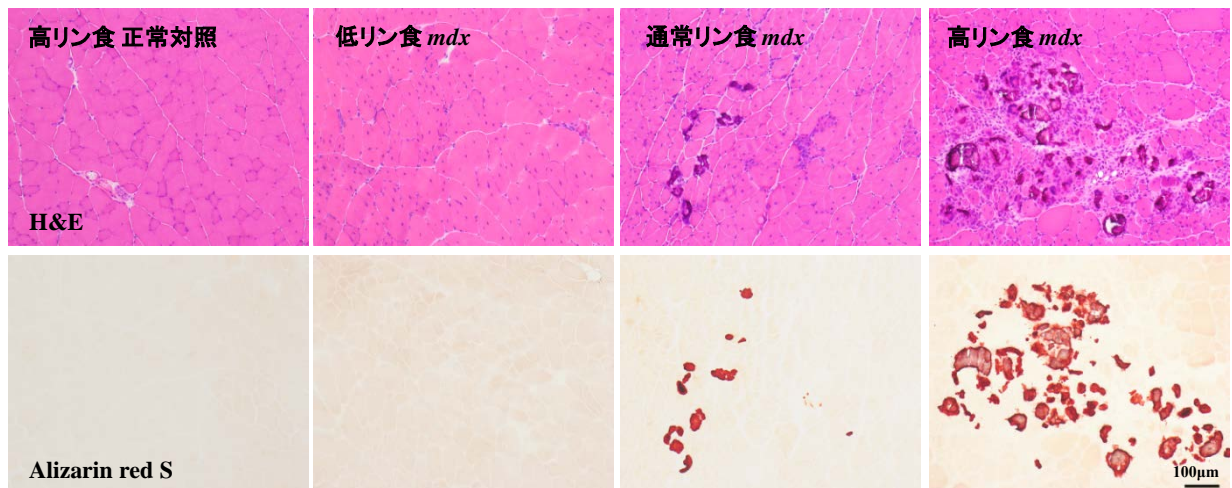


図2 リン摂取による*mdx*マウス骨格筋内異所的石灰化への影響

- (A) これまでに高リン食摂取*mdx*マウスは異所的石灰化が有意に増加すること、また低リン食摂取によりそれらが減少することが分かった。正常対照マウスでは、高リン食を摂取しても骨格筋内に異所的石灰化は認められない。写真はalizarin red Sとalcian blueで2重染色をしたマウス下腿の透明標本。異所的石灰化を赤い矢印で示した。
- (B) 大腿四頭筋の凍結切片を作成し、H&E染色とalizarin red S染色を用いて異所的石灰化を同定した。高リン食*mdx*マウスでは異所的石灰化が増加しており、炎症が亢進していることが分かった。

通常、正常対照マウスでは骨格筋内に異所的石灰化は認められないが、高リン食を摂取させた正常対照マウスに筋損傷を促すヘビ毒である CTX を骨格筋に注射すると、14 日後に再生筋線維とともに異所的石灰化が起こる事を見出した。さらにこのマウスの筋張力を測定した結果、同様に筋肉中に CTX を注射した通常食摂取の正常対照マウス (14 日間後、骨格筋内異所的石灰化は認められなかった) のものと比較し、最大強収縮が有意に低下した。このことから、骨格筋内異所的石灰化は変性・再生過程で生じ、筋張力の低下に寄与することが明らかとなった。

一方で、異所的石灰化は *mdx* マウスにリン摂取制限をさせることで改善することを見出した。さらに離乳時から 60 日齢まで高リン食を摂取させた *mdx* マウスの下腿を動物実験用 X 線コンピューター断層撮影 (computer tomography, CT) 装置 (Latheta LCT200, 日立アロカメディカル, 東京) で撮影したのち、低リン食群と高リン食群に分け、30 日後に同個体の下腿を撮影した結果、高リン食摂取群では異所的石灰化が増加するのに対し、30 日間低リン食摂取に変更した *mdx* マウスでは、60 日齢まで高リン食を与えたことで増加した異所的石灰化が減少することが分かった。

本研究について

本研究はリン過剰摂取が *mdx* マウスの骨格筋変性と骨・ミネラル代謝に与える影響について詳細な検討を行い、*mdx* マウスにおけるリン代謝異常の原因を解明することを目的とした。また、腎機能低下が骨格筋変性や異所的石灰化に与える影響について検討した。

研究 1 では透過型電子顕微鏡を用い、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観察を行った。また、リン摂取による *mdx* マウス骨格筋変性とマクロファージの浸潤とその表現型への影響を検討した。筋変性の顕著な骨格筋の 1 つである大

腿直筋（大腿四頭筋）断面積における壊死筋線維領域、マクロファージ浸潤領域を測定し、マクロファージの表現型を調べた。筋ジストロフィー症状に対するリン摂取と運動ストレスの影響を検討するため、リン食を摂取し、回転ケージ内で自発的運動を行った *mdx* マウスと通常ケージ内飼育の *mdx* マウスの前脛骨筋の筋病理を比較した。これまでに明らかになった低リン食摂取による筋ジストロフィー症状への改善効果が、リン吸着薬投与により再現可能であることを検討した。リン吸着薬投与は臨床で透析患者の血中リン酸濃度のコントロールに用いられている塩酸セベラマーを *mdx* マウスに与え、筋病理に及ぼす影響について検討した。

研究 2 ではリン過剰摂取が骨へ及ぼす影響を検討するため、X 線 μ CT 装置を用いて脛骨の海綿骨と皮質骨の骨密度と骨形態を解析した。さらに骨形成因子と骨吸収因子を調べ、正常対照マウスと *mdx* マウスの比較と異なるリン食を摂取した *mdx* マウス間で比較した。

研究 3 では *mdx* マウスの腎臓を中心にリン代謝について詳細に検討した。リン代謝に関与する血中リン酸、カルシウム、PTH、FGF-23 濃度さらに尿中リン酸排泄を調べ、腎臓でリン排泄を担う *klotho*、*NaPi 2a*、*NaPi2c* の発現量を確認した。腎機能測定には、筋肉量に依存しない腎機能マーカーである血中 *cystatin C* 濃度を用いて比較した。これらの結果から *mdx* マウスは腎機能が低下していることが分かった。*Mdx* マウスの腎機能低下の原因を明らかにするため、血液分析、尿排泄量、骨密度や骨形態、運動量を総合的に検討した。最後に、腎機能低下が骨格筋損傷と異所的石灰化に与える影響を調べるため、腎障害を誘発するシスプラチンを投与した正常対照マウスに筋損傷を引き起こし、筋再生段階におけるリン酸カルシウムの沈着について検討した。

以上の研究結果から、リン過剰摂取は *mdx* マウス骨格筋内の筋変性ならびに M1 マクロファージを増加させることで DMD 症状を悪化させることが明らかとなった。リン過剰摂取と運動量が減少することが原因で骨形成が著しく低下し、低回転性骨粗鬆症に陥

ることを見出した。腎機能マーカーである血中 cystatin C 濃度を測定した結果、*mdx* マウスは腎機能が低下していることが分かった。そのため高リン食摂取によって、*mdx* マウスは血中リン酸濃度を調整できなかった。骨格筋変性に伴う運動量低下によって骨密度が減少し、高カルシウム血症を合併した結果、脱水症状に陥ったことが腎機能低下の要因であると考えられる。また、シスプラチン投与により腎機能を低下させた正常対照マウスは、筋損傷後の再生時に骨格筋内に異所的石灰化が起こることを明らかにした。すなわち、*mdx* マウスの骨格筋内リン酸カルシウムの沈着は、腎機能低下が関与しており、リン過剰摂取によって筋変性が悪化した結果、異所的石灰化の増加につながったと考えられる。

本研究では、低リン食またはリン吸着薬投与によって *mdx* マウスの骨格筋症状は改善された。特に炎症が抑制され、M2 マクロファージの占める割合が増加したことが大きく寄与した。この結果、リン摂取制限またはリン吸着薬の投与は DMD の新たな補完治療法として臨床応用が期待できる。

実験材料と方法

実験動物と特殊飼料

正常対照である C57BL/10ScSn (B10) と DMD モデルの C57BL/10ScSn-mdx (*mdx*) は、独立行政法人国立精神・神経医療研究センター神経研究所から供与して頂いたマウスを当研究室で交配・維持して実験に使用した。マウスの飼育と繁殖には市販のマウス餌 CE-2 を用い、水と同様に自由摂取させた。リン含有量を変えた特注飼料は、CE-2 の組成を参考にオリエンタル酵母工業株式会社（東京）が作製した。CE-2 と同じ組成でリンが 1.0 g/100 g のものを通常リン食とし、リン含有量を 2 倍の 2.0 g/100 g に増加させたものを高リン食、さらにリンを 0.7 g/100 g に減量したものを低リン食とし、正常対照マウスと *mdx* マウスにそれぞれ離乳時（20 日齢）から最長 90 日齢まで与えた。本研究で用いた低リン飼料は魚粉および脱脂粉乳に由来するリンのみを含み、通常リン飼料と高リン飼料にはリン酸一ナトリウム（無水）とリン酸一カリウムを添加してリン含有量の調整をした。そのため、リン含有量が増えることでカリウムやナトリウムの含有量も増加した。先行研究では 12% 塩化ナトリウム食が *mdx* マウスの骨格筋変性を抑制すること（Yoshida et al., 2006）、またマウスに 5% 塩化カリウム添加食を与えた実験では、マウスのエサと水の摂取量が増加するという報告があることから（Murai et al., 2010）、本研究で用いた高リン食内のナトリウム（0.66%）とカリウム（1.99%）はマウスの骨格筋に影響を及ぼす量ではないと判断した。また、飲料用の水にリンは含まれていない。マウスは雄のみを実験に使用した。本研究で用いたマウスは、東京大学が定めた動物実験実施規則に従い適切な手技で実験に使用した。

血液サンプルと組織サンプル採取

マウスはジエチルエーテル過剰吸引で安楽死させ体重を測定後、25 ゲージの注射針付きシリンジを用いて、腹部後大静脈から血液サンプルを 0.5~0.8 ml 採取した。採取した血液は即座に 1.5 ml マイクロチューブに移し、室温で 2 時間放置した後、3,500 rpm で 15 分間 4°C で遠心した。その後、血清部分を他のマイクロチューブに移しかえ、実験に使用するまでは-80°C で保存した。血漿サンプルは、採血した血液に 1 mg/ml エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) を含むリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) を血液量の 10% 入れ、マイクロチューブ中で軽く混合した。その後 1,200 rpm で 30 分間 4°C で遠心し、血漿部分のみを他のマイクロチューブに移しかえ、実験に使用するまでは-80°C で保存した。

Mdx マウスの大腿四頭筋は摘出したのち、トラガカントゴムでコルク栓片上に倒れないように固定し、液体窒素で冷却したイソペンタン内で急速凍結した。また、*mdx* マウスの前脛骨筋と横隔膜、さらに正常対照マウスと *mdx* マウスの腎臓は摘出後、optimal cutting temperature (OCT) コンパウンド (凍結用包埋剤) に包埋し液体窒素内で急速凍結した。

残った片側の腎臓は摘出後、1.5 ml マイクロチューブに入れて直接、液体窒素で凍結し、実験に使用するまでは-80°C で保存した。マウスの脛骨は摘出後、10%ホルムアルデヒドを含む PBS (10%ホルマリン) にカルシウムを加えた溶液内で室温保存した。

組織切片染色と免疫染色

クライオスタット (Microm HM550, Thermo Fisher Scientific, MI, USA) を用い、8 μ m の連続凍結切片 (横断面) を作成し、組織学的に検討した。コルクに立てて凍結した大

腿四頭筋はクライオスタット内の温度を-23°C で、OCT コンパウンドで包埋した組織サンプルは-19°C で切り出し、剥離防止加工したスライドガラスに貼り付けた。筋病理解析に大腿四頭筋(そのうち大腿直筋)と前脛骨筋を用いた理由は、比較的大きな筋肉で、組織切片の全領域を測定可能であったからである。全ての凍結切片は、組織構造の全体像を把握するためヘマトキシリン&エオジン (hematoxylin & eosin, H&E) で染色した。H&E 染色はヘマトキシリンで核を青藍色で染め分け、エオジンで細胞質や線維類を淡い赤色に染め分ける。骨格筋内異所的石灰化を同定するためには、カルシウムに結合する alizarin red S 染色液を用いた。さらに骨格筋内の線維化領域を染め分ける目的でマッソン・トリクローム (Masson Trichrome) 染色を行った。この染色方法では、コラーゲンを含む結合組織(膠原線維)をアニリンブルーで青く染色し、核を鉄ヘマトキシリンで黒紫色に、さらに細胞質を酸フクシンで赤色に染色する。

免疫染色は、8 μ m の凍結切片を 10%ホルマリンで固定した後に、10%馬血清と 0.05% Tween 20 を含む PBS で 15 分間、室温でブロックングを行った。なお、ジストロフィンなどの膜タンパク質については-20°C に冷却したアセトンを用いて固定を行った。抗胎児型ミオシン重鎖 (embryonic myosin heavy chain, eMyHC) モノクローナル抗体を用いた免疫染色は 10%ホルムアルデヒドを含む PBS で固定した後に、10 mM クエン酸緩衝液 (pH 7.0) に浸し、オートクレーブによる熱処理 (120°C、10 分間) で抗原賦活化ならびに内在性 IgG を失活させた。その後、1 次抗体を 37°C で 1 時間反応させ、PBS で洗浄後、2 次抗体 (Alexa Fluor 488 または Alexa Fluor 594; Molecular Probes, OR, USA) に Hoechst 33258 を加えて、同様に 37°C で 1 時間反応させた。免疫染色した切片を洗浄後に封入剤を用いてカバーガラスで包埋し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

免疫染色で用いた1次抗体は以下の通りである。抗体は0.5% BSAを含むPBSで希釈して使用した。フルオレセインイソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate, FITC) で標識されたマウス抗アルブミン抗体 (Cappel, PA, USA)、ラット抗F4/80抗体 (AbD Serotec,

Kidlington, UK)、マウス抗eMyHC抗体 (American Type Culture Collection, VA, USA)、ラット抗inducible nitric oxide synthase (iNOS) 抗体 (Upstate Biotechnology, NY, USA)、ウサギ抗CD206抗体 (AbD Serotec)、ラット抗klotho抗体 (KM2076; TransGenic Inc., 熊本)。ウサギ抗NaPi 2a抗体ならびにウサギ抗 NaPi 2c抗体は徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス部の瀬川博子先生より恵与された。ウサギ抗dystrophin抗体、ウサギ抗utrophin抗体、ウサギ抗 α -sarcoglycan抗体、ウサギ抗 β -dystroglycan抗体は独立行政法人国立精神・神経医療研究センター神経研究所の今村道博先生より恵与された。

ヘマトクリット値測定

通常飼育（食餌：CE-2）の正常対照マウスと *mdx* マウス（ $n = 5$ ）をイソフルランで麻酔し、ヘパリンコートしたガラス毛细管（Drummond Scientific Company, PA, USA）を用いて眼窩から採血を行った。眼窩採血はマウスへの負担や苦痛軽減を考慮して、麻酔下で行った（Sharma et al., 2014）。ガラス毛细管を 11,000 rpm で 5 分、4°C で遠心することによって、血球成分と血漿成分を分離した。ヘマトクリット値は総血液量から赤血球成分量の割合を比率で求め、算出した。

尿サンプルの採取

マウスの尿サンプルは単独飼育用の代謝ゲージ（3600M21, 株式会社三商、東京）内で 24 時間蓄尿したものを使用した。蓄尿中は食餌を制限させ、水のみを摂取させた。24 時間後に尿を採取し、尿量を測定後に 3,500 rpm で 10 分間、4°C 遠心を行い-80°C で保存した。

回転ケージを用いた自発的運動

回転ケージと飼育ケージが組み合わさった回転運動量測定装置（SN-450、シナノ製作所、東京）の中でマウスを単独で飼育し、3日間環境適応させ、その後7日間にわたり1日の回転数を付属のカウンターで測定した。なお10日間の実験中、食餌はそれまで与えていたものと同じリン食を与え、水と共に自由摂取させた。10日後、マウスをジエチルエーテル過剰吸引により安楽死させ、前脛骨筋を凍結切片用に摘出した。切片は全体の筋変性領域と中心核数を測定するためH&E染色を用い、マクロファージ浸潤領域は抗F4/80抗体で、再生筋線維は抗eMyHC抗体を用いて反応させた。

CTXによる筋再生評価

リン食を摂取させた90日齢*mdx*マウスをイソフルランで麻酔した後、下腿部の剃毛を行い前脛骨筋に、27ゲージの注射針付きシリンジを用いて10 μ M CTXを含むPBSを100 μ l注射した。14日後にマウスを安楽死させ前脛骨筋を摘出し、凍結切片を作成した。その後、H&E染色を行いリン食摂取による筋再生への影響を観察した。

骨格筋中へのリン酸投与

通常食（CE-2）を摂取させた90日齢正常対照マウスをイソフルランで麻酔した後、下腿部の剃毛を行い、27ゲージの注射針付きシリンジを用いて前脛骨筋にそれぞれ1 mM、10 mM、100 mMのリン酸ナトリウムを含む生理食塩水（pH 7.4）を50 μ l筋中した（各3匹ずつ）。4日後にマウスを安楽死させ、前脛骨筋を凍結切片用に摘出した。組織切片は抗F4/80抗体と抗eMyHC抗体を用いて免疫染色を行い、顕微鏡を用い撮影

し、それぞれの陽性領域を求めた。

腎不全マウスの作製とリン食摂取による異所的石灰化への影響

Johnsson らの方法に準じて、通常飼育した 90 日齢正常対照マウスに 10 mg/kg シスプラチン（和光純薬工業、東京）/PBS 混合液を 300 μ l 腹腔内投与し、腎不全マウスを作製した（Johnsson and Wennerberg, 1999）。シスプラチン投与日から通常リン食または高リン食を摂取させ、さらに 1 日後にマウスを麻酔下におき、前脛骨筋に 5 μ M CTX を 100 μ l の PBS に混合して注入した。なお、コントロール群にはシスプラチンを含まない PBS のみを腹腔内注射した。7 日後にマウスを安楽死させ前脛骨筋を摘出し、筋病理を観察した。なお、サンプルを摘出する 1 日前に PBS で希釈した 1% エバンスブルー色素（Evans blue dye, EBD）をマウスの腹腔から体重 10 g あたり 100 μ l 投与した。前脛骨筋は凍結切片を作成し、H&E と alizarin red S で染色した。

細胞培養（リン酸添加実験）と免疫染色

マウス筋芽細胞株 C2C12 を直径 35 mm のゼラチンコート組織培養皿（IWAKI、静岡）に 5×10^4 個播いて、37°C、5% 二酸化炭素インキュベーター内で培養した。増殖培地には 20% ウシ胎児血清（Fetal bovine serum, FBS）を含むダルベッコ改変イーグル培地（Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM; Gibco）を用い（20% FBS/DMEM）、分化培地には ITS（10 μ g/ml インスリン、5 μ g/ml トランスフェリン、5 ng/ml 亜セレン酸ナトリウムの混合溶液；Sigma-Aldrich, Missouri, USA）と 0.1% ウシ血清アルブミンを含む DMEM を用いた（ITSB/DMEM）。C2C12 細胞は増殖培地で 24 時間培養し、その後分化培地に交換した。なお、DMEM にはあらかじめ培地添加用の抗生物質であるペニ

シリリン (50 IU/ml、Gibco) とストレプトマイシン (50 µg/ml、Gibco) を加えた。

リン酸が分化した骨格筋細胞に与える影響を調べるため、分化 2 日目に分化培地中にリン酸二水素ナトリウム二水和物を最終リン濃度が 3 mM、5 mM、7 mM になるように加えた。なお、リン酸添加前の分化培地 (ITSB/DMEM) には 1 mM のリンが含まれていた。培養した細胞は PBS で洗浄した後、10%ホルマリンを含む PBS 溶液で 30 分間室温にて固定した。PBS で洗浄後、0.5% TrironX-100 を含む PBS 溶液で 10 分間透過処理を行い、1 次抗体としてマウス抗横紋型ミオシン重鎖(MyHC)抗体 MF20 (Developmental Studies Hybridoma Bank, IA, USA) を 1 時間室温で反応させた。2 次抗体 (Alexa Fluor 488) に Hoechst 33258 を加えて 1 時間室温で反応させた後、蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。顕微鏡観察では、ランダムに選択した 5 視野について写真撮影を行い(各条件 n = 3)、全筋核数の中の融合した筋細胞における筋核数の割合を fusion index (%) として求めた。

腎臓刷子縁膜分画の単離

腎臓でリンの再吸収を担う NaPi 2a と NaPi 2c をウエスタンブロットで定量するため、これらのタンパク質が発現する近位尿細管刷子縁膜分画 (brush border membrane vesicles, BBMV) の単離を行った (Biber et al., 2007; Breusegem et al., 2009)。安楽死させたマウスから腎臓 (片側) を採取し、ハサミで細かく切断した後、2 ml チューブ内で 0.8 ml の BBMV 用 isolation buffer (300 mM D-mannitol, 5 mM EDTA, 15 mM Tris-HCl, pH7.4, complete mini; 250 ml per one tablet, Roche Diagnosis, Basel, Switzerland) と混合し、ソニケーターを用い粉砕した。さらに 1.2 ml の milliQ と最終濃度が 12 mM になるように塩化マグネシウムを加え、氷上で 15 分放置した。その後、4,500 rpm で 15 分間、4°C で遠心を行い、上清を新しいマイクロチューブに移した。15,000 rpm で 30 分間 4°C 遠心した後、上清を取り除き、沈殿物に 1 ml の BBMV 用 sample buffer (300 mM D-mannitol,

16 mM HEPES, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, complete mini; 50 ml per one tablet) を加えて懸濁した。Bicinchoninic acid (BCA) 法によりタンパク質濃度測定を行い、電気泳動用の sample buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% sodium dodecyl sulfate, 10% glycerol, 50 mM dithiothreitol, 0.0025% bromophenol blue) に 20 μ g/10 μ l になるように溶解した。

ウエスタンブロット用サンプルの作製

凍結した腎臓サンプルを液体窒素内で粉砕して粉末状にし、1 ml の complete mini protease inhibitor cocktail 入り PBS に溶解させ、ソニケーターにかけて粉砕した。14,000 rpm で 20 分間 4°C 遠心を行い、上清を他のチューブに回収し、BBMV 同様に BCA 法によりタンパク質濃度を測定した後、電気泳動用 sample buffer に 20 μ g/10 μ l になるように溶解した。

培養細胞は 1 度 PBS で洗浄し、収量を得るため 1 ml の 10% トリクロロ酢酸溶液で 30 分間 4°C で固定した。0.1% Tween-20 を含むトリス塩酸緩衝液 (tris buffered saline, TBS) (TBST) を用い洗浄を 3 度行い、セルスクレーパーで固定した培養細胞を掻き集め、1.5 ml マイクロチューブに回収した。15,000 rpm で 5 分間 4°C 遠心をして上清を除き、残った沈殿に 2% SDS を含む Complete Lysis-M Reagent (Roche Diagnosis, Basel, Switzerland) を 40 μ l 加えた。その後、BCA 法によりタンパク質濃度を測定した後、電気泳動用 sample buffer に 10 μ g/10 μ l になるように溶解した。

ウエスタンブロット

サンプルはジスルフィド結合を切断して一本鎖にするため 5 分間煮沸したあと (BBMV サンプルは 15 分間 37°C でインキュベートした)、12.5% ポリアクリルアミド

ゲルで電気泳動した。その後、タンパク質はセミドライ式ブロッティング装置でポリフッ化ビニリデン (Polyvinylidene difluoride, PDVF) メンブレンに転写した。PDVF メンブレンは Odyssey Blocking Buffer (LI-COR Biosciences, Inc. NB, USA) を用い室温で 3 時間ブロッキングを行い、1 次抗体を一晩 4°C で反応させ、一度 TBST で洗浄後、2 次抗体 (Alexa Fluor 680、1/2000) を 1 時間室温で反応させた。なお、1 次抗体と 2 次抗体は Odyssey Blocking Buffer で希釈した。ブロッキング後と抗体反応後にはそれぞれ TBST で洗浄を行った。ウエスタンブロットで使用した 1 次抗体は以下の通りである。Klotho 抗体、NaPi 2a 抗体、NaPi 2c 抗体、MyHC 抗体 (すべて組織免疫染色で用いた同様の抗体)、 β -tubulin (Abcam, Cambridge, United Kingdom)、 β -actin (GeneTex, CA, USA)。

RT-PCR

リン食を摂取した *mdx* マウスの大腿四頭筋 (各群 $n=3$) を液体窒素で凍結し、液体窒素を入れたステンレス製の容器内で粉砕した。粉砕したサンプルを 1.5 ml チューブに入れて RNAiso-plus (タカラバイオ株式会社、滋賀) を加えて total RNA を抽出した。この RNA を鋳型としてオリゴ (dT) をプライマーに、逆転写反応は Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, CA, USA) を用いて 50°C で 50 分間行い、cDNA を合成した。その後、Emerald Amp PCR Master Mix (タカラバイオ株式会社) を用い、cDNA を鋳型にしてプライマーを加え、サーマルサイクラーを用いて PCR 反応を行った。1 サイクルは、94°C で 15 秒、55°C で 15 秒、72°C で 30 秒とし、IL-6 と TNF- α 、破骨細胞分化因子 (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, RANKL) は 30 サイクル、インターロイキン-17 (Interleukin-17, IL-17) は 36 サイクル、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) は 22 サイクル行った。PCR 産物は SYTO60 (Molecular Probes, OR, USA) を含む 2% アガ

ロースゲルを用いて電気泳動を 30 分間行い、Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences) を用いてバンドを検出した。

プライマーは、以下の配列を使用した。

IL-6 forward primer, 5'- agttgccttcttgggactga-3'

IL-6 reverse primer, 5'- tccacgattcccagagaac-3'

TNF- α forward primer, 5'- ccaccacgctcttctgtcta-3'

TNF- α reverse primer, 5'- cacttggtggttgctacga-3'

IL-17 forward primer, 5'- tctctgatgctgttgctgct-3'

IL-17 reverse primer, 5'- cgtggaacggttgagg-3'

RANKL forward primer, 5'- cgctctgttcctgtactttcgagcg-3'

RANKL reverse primer, 5'- tcgtgctccctccttcacacaggtt-3'

GAPDH forward primer, 5'- cccatcaccatcttccaggagc-3'

GAPDH reverse primer, 5'- ccagtgagctcccgttcagc-3'

血液中・尿中成分分析

ディスクリット方式臨床化学自動分析装置 (7180 形日立自動分析装置、日立ハイテクノロジーズ、東京) を用い、マウス血中無機リン (inorganic phosphorus, IP)、カルシウム (calcium, Ca)、総タンパク (total protein, TP)、アルブミン (albumin, ALB)、血中尿素窒素 (blood urea nitrogen, BUN)、尿酸 (uric acid, UA)、総コレステロール (total cholesterol, T-CHO)、クレアチニン (creatinine, CRE) を測定した。さらに尿中 IP とクレアチニン (U-CRE) を測定した。クレアチニークリアランス (creatinine clearance, Ccr) は 24 時間蓄尿して採取した尿中 U-CRE 濃度を血中 CRE 濃度で割って、その割合を比率で求めた。

ELISA による血中 PTH, FGF-23, BALP, CTx, cystatin C 濃度の定量

マウスの血清（または血漿）中 PTH と FGF-23、骨型アルカリフォスファターゼ（bone specific alkaline phosphatase, BALP）、I 型コラーゲン架橋 C-テロペプチド（C-terminal collagen crosslinks, CTx）、cystatin C 濃度は市販されている Enzyme Linked Immunosolvent Assay（ELISA）キットを用いて定量した。本研究で用いた ELISA キットは以下の通りである。Mouse PTH 1-84 ELISA kit（Immutopics, CA, USA）、FGF-23 ELISA kit（Kainos Laboratories, Tokyo, Japan）、mouse BALP ELISA kit（Cusabio, Wuhan, China）、CTx RatLaps EIA（Immunodiagnostic systems, Boldon, United Kingdom）、mouse/rat cystatin C quantitative ELISA kit（R&D systems, MN, USA）。実験手順は付属する説明書をもとに忠実にを行った。そのため、血中 BALP と CTx 濃度を測定するための血清サンプルは、血液を採取する 24 時間前からマウスに食餌を与えず、水のみ自由摂取にさせた。

透過型電子顕微鏡による骨格筋内異所的石灰化の観察

30日齢と60日齢の通常リン食または高リン食を与えた mdx マウスから前脛骨筋、大腿四頭筋（断片）、長趾伸筋と横隔膜（断片）を摘出し、2.5% グルタルアルデヒドを含む 0.1 mol/L カコジル酸ナトリウム溶液で2時間室温固定し、骨格筋の方向性が分かるように長方形に切り整えた。固定液（4 % Osmium Tetroxide, 0.2 mol/L collidine, 3 % lanthanum nitrate）に2時間浸透させ、その後、濃度の違うエタノールを用い筋組織の脱水を行い、エポン樹脂に包埋した。

全サンプルの準超薄切片を作成し、トルイジンブルーで染色した後、光学顕微鏡で観察した。目的の部位を特定した後、エポン包埋した筋組織をナイフでトリミングし、電子顕微鏡観察用の超薄切片（100 nm）を作成した。超薄切片は専用のグリッドメッシュ

に貼り付け、酢酸ウラニルと鉛で染色した後、透過型電子顕微鏡（FEI Tecnai Spirit, OR, USA）を加速電圧120 kVで用い、筋組織の観察を行った。撮影した画像は、写真に現像し、スキャナーでコンピューターに取り込んだ。

脛骨の骨密度と骨形態の3次元解析

卓上型 X 線 μ CT スキャナー（SkyScan-1074, Bruker, Kontich, Belgium）を用いて、ホルマリン固定したマウス脛骨の連続水平断層画像を撮影した。撮影は、管電圧 40 kV、管電流 1000 μ A、露光時間 960 ミリ秒、ステージ回転ピッチ 0.9° で行った。取得した画像は専用の再構成ソフトウェア（NRecon, Bruker）で3次元構築した。再構築後の画像は画像解析ソフトウェア（CT-An, Bruker）を用い、海綿骨と皮質骨の骨密度（Bone Mineral Density, BMD）と骨形態評価に使用した。海綿骨密度の解析領域は脛骨遠位骨幹端から下へ連続 30 スライスと、皮質骨密度はそのさらに下へ連続 100 スライスを対象とし、骨形態解析領域は脛骨遠位骨幹端から下へ連続 100 スライス（海綿骨）とさらに下へ連続 50 スライス（皮質骨）を対象とした。なお、解析対象領域は手順書（東陽テクニカ、東京）を参考に決定した。海綿骨形態では、骨密度 (g/cm^3)、骨量(%)、総体積 (mm^3)、骨体積 (mm^3)、骨表面積 (mm^2)、骨表面積/体積比 (mm^{-1})、骨表面密度 (mm^{-1})、骨梁幅 (mm)、骨梁間隔 (mm)、骨梁数 (mm^{-1})、骨梁の凹凸構造を示す骨パターンファクター (mm^{-1})を測定した。また皮質骨形態については、骨密度 (g/cm^3)、骨量 (%)、全骨断面領域 (mm^2)、断面幅 (um)、皮質骨断面領域 (mm^2)、皮質骨外膜面 (mm)、骨髓腔領域 (mm^2)、皮質骨内外膜面 (mm)、皮質骨内膜面 (mm)を計測した。

ダイナミックスキャンを用いた腎臓代謝機能測定

実験小動物用 X 線 μ CT 装置 (Latheta LCT-200, 日立アロカメディカル、東京) を用い、腎臓断面のダイナミックスキャン (検体の同一断面を繰返し断層撮影) で腎臓代謝機能の測定を行った。この方法は、日立アロカメディカル・東哲男氏と木村真輔氏のご協力・ご指導のもと、私が初めてマウスの腎臓機能測定法として用いた (Latheta LCT-200 アプリケーションノート 8, 日立アロカメディカル)。正常対照マウスと *mdx* マウスにイソフルランを吸引させ麻酔し、27 ゲージの注射針付シリンジを用いて 100 μ l の造影剤 (イオパミオン, Beyer, Leverkusen, Germany) を尾静脈から注射した。直後にマウスを Latheta LCT-200 にセットし、撮影を開始した。なお、尾静脈注射から撮影開始までの時間は平均 90 秒であった。マウスを装置にセットして撮影を開始した後、装置外部から尾静脈注射で造影剤を投与する方法が好ましいが、技術的に困難だったため、上記の方法で行った。撮影開始位置を腰椎 L2 と L3 間に設定し、撮影条件は時相間隔を 15 秒、時相数を 90 回 (1 回で 3 か所撮影) とした。解析する腎臓の面積と目的の CT 値領域 (0 から 4,000) を設定し、付属の計測機能で 15 秒毎に 90 回測定した腎臓の平均 CT 値を経過時間とともにグラフ化した。

リン吸着薬 (レナジェル) による筋ジストロフィー症状への影響

リン吸着薬には様々な種類が販売されており、代表的なものに非 Ca 含有のリン吸着薬の塩酸セベラマーであるレナジェル錠 (中外製薬、東京) やフォスブロック (協和発酵キリン、東京)、さらに炭酸ランタン (ホスレノール, Bayer, Leverkusen, Germany) や炭酸カルシウム (カルタン、扶桑薬品工業株式会社、大阪) などが挙げられる。本研究ではレナジェル錠剤 (250 mg) と通常リン食を、それぞれ電気ミルで粉末上にし、レ

ナジェルの含有量が 0.5%（離乳時から体重が 20 g に達するまで）と 1.0%（体重 20 g 以上）になるよう通常リン食と混合した（レナジェル食）。粉末状の食餌に水を含ませ練り固め、通常の固形食餌同様にケージの上網に入れた。この練り食餌を *mdx* マウス（ $n = 6$ ）に 20 日齢から 60 日齢に達するまで自由摂取させた。体重を測定し、TA の凍結切片を用いて筋病理の評価を行った。また、投与量を増加するため 45 日齢で体重が 20 g 以上の *mdx* マウスに 1.0% レナジェル食を 90 日齢に達するまで与えた。対照群は通常リン食を与えた 90 日齢 *mdx* マウスとし、本研究中で得られた結果を用いた。レナジェル食 *mdx* マウスの前脛骨筋と大腿四頭筋の凍結切片を用いて、筋組織の全面積における筋変性領域、マクロファージの浸潤領域、再生筋線維領域、さらに中心核線維数を評価した。

統計処理

本研究中では、2 群間（正常対照マウスと *mdx* マウス）の比較を Student's *t* test（*t* 検定）を行い、有意水準は $p < 0.05$ とした。さらに 3 群間（低リン食、通常リン食、高リン食）の比較では統計ソフト（Prism 5, GraphPad, CA, USA）を使用し Tukey 法による多重検定を行った。なお、数値は平均値±標準偏差で示した。

研究1：リン摂取による筋ジストロフィー骨格筋症状への影響

概要と目的

近年、*mdx* マウスの骨格筋内異所的石灰化は筋ジストロフィー症状悪化の指標として確立されている (Liu J et al., 2004; Verma et al., 2010)。異所的石灰化は DMD モデル動物の筋ジス犬でも確認されており (Wong and Christopher, 2002)、DMD 患者においても稀に見つかるが (Zanotti et al., 2011)、その存在や機序については未だよく分かっていない。さらに DMD モデル動物のみならず、ジストロフィン以外の筋膜タンパク質をノックアウトしたマウスや (Hack et al., 1998)、サルカグリカノパチーモデルハムスターでも心筋の異所的石灰化が知られている。DBA/1J または 2J マウスや BALB/c マウスは心筋や大動脈、さらに舌筋にリン酸カルシウムの沈着が起こることが知られている (Matsushima et al., 1984; Korff et al., 2006)。興味深いことに、*mdx* マウス (B10 background) と DBA/2 マウスを戻し交配させ作製した DBA/2-*mdx* マウスは骨格筋内異所的石灰化や線維化が悪化することが報告されている (Fukada et al., 2010)。しかし、骨格筋内異所的石灰化のメカニズムについては分かっていない。先行研究では、この異所的石灰化の主な成分がハイドロキシアパタイト (リン酸カルシウム) であると報告している (Kikkawa et al., 2009)。私はこれまでに、高リン食摂取が *mdx* マウス骨格筋内異所的石灰化を顕著に増加させること、またそれにより筋機能が有意に低下することを見出した。そこで本研究ではまず、透過型電子顕微鏡を用い、異所的石灰化の起源とメカニズムについて詳細に観察した。

Mdx マウスにおいて、骨格筋の崩壊を増加させる要因に運動が挙げられる。トレッドミルを用いて強制的な運動負荷を与えたり、回転ケージを用いて自発的運動を促進させると筋線維の壊死が顕著になる。対照的に尾部懸垂で後肢の運動負荷を軽減すると *mdx*

マウスの筋変性は抑制されることから（Mokhtarian et al., 1999）、骨格筋への負荷が *mdx* マウスの骨格筋壊死に与える影響は大きい。しかし、運動以外で筋変性を悪化させる要因はあまり知られていない。

高リン酸が骨格筋以外の細胞へ与える影響については、特に腎臓や血管には培養細胞や動物実験を用いた実験において、炎症の増加や細胞死を引き起こすことが報告されている（Razzaque, 2011）。マウス骨格筋細胞株 C2C12 細胞においては、分化誘導した細胞にリン酸を添加すると濃度依存的に筋分化が抑制され、骨分化が促進することが分かっている（Kikkawa et al., 2009）。本研究ではリン摂取が *mdx* マウスの骨格筋変性に与える影響を検討した。さらに骨格筋に対するリン毒性を評価するため、筋管形成をした C2C12 細胞と正常対照マウスの正常筋を用い、高リン酸投与が骨格筋へ与える影響について検討した。

骨格筋が崩壊すると、変性した筋線維はマクロファージによって貪食される。マクロファージの表現型には主に炎症性マクロファージ（M1）と抗炎症性マクロファージ（M2）の2種類が存在する（Villalta et al., 2009）。骨格筋において M1 マクロファージは、筋変性に対し TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカイン、さらに活性酸素種（Nitric oxide, NO）を産生し、Th1 型細胞の免疫応答を誘導することが報告されている（Villalta et al., 2011a）。一方で、M2 マクロファージは M1 マクロファージから移行すると考えられており、骨格筋の修復に寄与することが報告されている（Villalta et al., 2011b）。そこで、リン食を摂取させた *mdx* マウスの大腿四頭筋の筋変性領域とマクロファージの浸潤領域ならびに表現型について調べた。

修士論文においてリン食を摂取した 90 日齢 *mdx* マウスの自発的運動量を 7 日間測定したが、正常対照マウスは回転ケージ内飼育で運動量が増加し、通常飼育と比較して骨格筋量が増加することが分かっている。しかし運動量の増加は *mdx* マウスにとって、筋変性の増加に寄与することが報告されている（Smythe and White, 2011）。一方で、低

負荷で長時間の運動負荷は *mdx* マウスの筋肥大を促進するという報告があることから (Carter et al., 1995)、計 10 日間の回転ケージ内での運動は急性ストレスとなる骨格筋変性増加に寄与すると考えられる。そこで、運動量測定実験をした *mdx* マウスの前脛骨筋の連続凍結切片を作成し、急性運動ストレスとリン食摂取の関係について検討した。

結果

骨格筋異所的石灰化の起源とそのメカニズム

骨格筋内にリン酸カルシウムの沈着が認められる場合、*mdx* マウスを解剖し皮膚を露出させると、目視野でも容易に確認することができる。横隔膜と大臀筋は筋変性も顕著で、さらに眼で見て分かるほど骨格筋内異所的石灰化が起こりやすい部位である。骨格筋には大きく分けて速筋線維（白筋、Type II 線維）と遅筋線維（赤筋、Type I 線維）が存在する。ヒトと実験用マウスには多少筋線維タイプの違いや部位に占める割合に違いがあるが、速筋線維はエネルギー解糖系による速い収縮速度を有し、瞬発的パワーを発揮することができ、遅筋線維はミトコンドリアの含有量が多く、酸素を利用した筋持久性に優れた特徴を持つ (Hesse et al., 2010)。

エポン包埋した骨格筋サンプルの準超薄切片を作成し、トルイジンブルー染色液で色付けしたあと、顕微鏡下で観察した (図 3 A-D)。観察を行ったマウス骨格筋のうち、大腿四頭筋は速筋線維と遅筋線維が混合しており、前脛骨筋と長趾伸筋は速筋線維が占める割合が高い。準超薄切片と超薄切片を用いた観察でも大腿四頭筋、横隔膜、大臀筋では異所的石灰化が確認できた。一方、速筋線維優位である前脛骨筋と長趾伸筋は筋変性領域が存在するものの、異所的石灰化が認められなかった。

解剖時に確認できるほど巨大化したリン酸カルシウムの結晶を電子顕微鏡で観察す

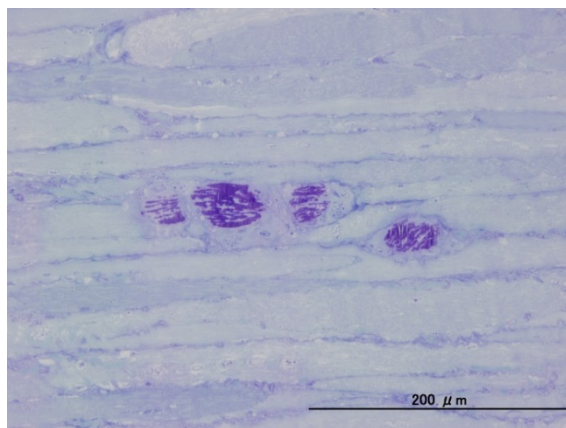
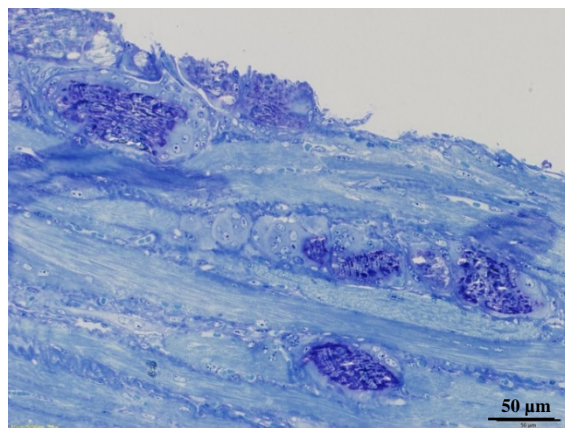
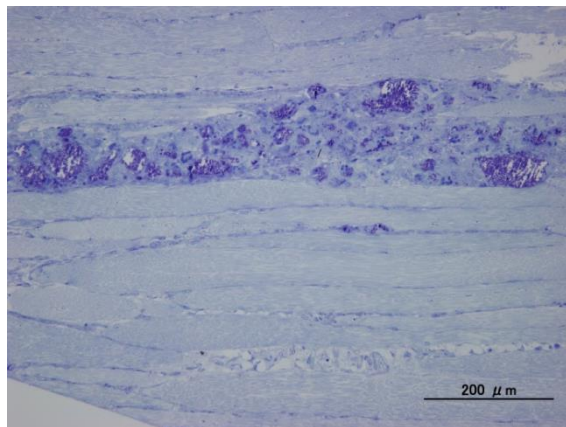
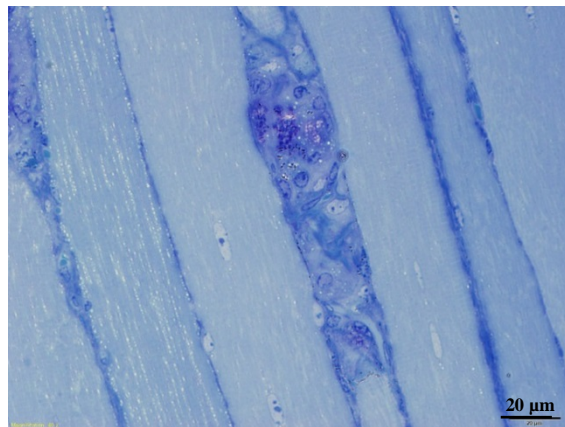
A**B****C****D**

図3 トルイジンブルー染色したmdxマウス骨格筋の準超薄切片像

(A) 30日齢mdxマウスの横隔膜。

(B) 60日齢mdxマウスの横隔膜。

(C) 30日齢mdxマウスの大腿四頭筋。

(D) 60日齢mdxマウスの大腿四頭筋。

筋変性が顕著な若齢(30日齢)と異所的石灰化が顕著に認められる成獣(60日齢)のmdxマウス骨格筋を用いた。濃く染色されている部分が異所的石灰化である。透過型電子顕微鏡観察用の超薄切片を作成するため、準超薄切片を光学顕微鏡で観察し、異所的石灰化や筋変性部位を特定した。

ると、その沈着は筋変性領域に認められ、骨格筋を形成する筋節（サルコメア）が整列する正常筋線維領域には認められなかった（図 4 F）。大きな塊を成しているが、全てがリン酸カルシウムの集合ではなく、多くの変性したタンパク質を含んでいることが分かった。さらに高倍率で確認すると、異所的石灰化部位にある変性タンパク質のほとんどが丸状の形を保ちながらリン酸カルシウムが沈着した構造物であった。この構造物の中にはミトコンドリア内膜の折り畳み構造であるクリステに似た構造が認められたため（図 4E の矢印）、ミトコンドリアであると示唆した（図 4 E）。

初期のリン酸カルシウム沈着を調べるため、異所的石灰化が顕著な部位ではなく、筋変性領域を観察した。すると、変性したミトコンドリアと非常に小さな器官（変性して断裂した筋小胞体の一部）に密度の高いリン酸カルシウムの沈着が確認できた（図 4 A）。リンはカルシウムと非常に強い結合力を有するため、カルシウムが豊富な器官であるミトコンドリアや筋小胞体（特に終末槽、terminal cisterna）が変性すると、器官内でリンとカルシウムが結合し、異所的石灰化の起源になると考えられる（図 4 B）。Bonucci らは活性型ビタミン D 類縁体であるジヒドロタキステロールを用い、実験的にラット心筋に異所的石灰化を起こし、電子顕微鏡で観察している。そこで彼らは、心筋における初期のリン酸カルシウム沈着はミトコンドリアで起こると報告している（Bonucci and Sadun, 1973）。

しかし、ミトコンドリアや筋小胞体の一部にリン酸カルシウムが沈着しただけでは、巨大な異所的石灰化はできない。巨大化した異所的石灰化には無数の変性したミトコンドリア等が含まれていたため、リン酸カルシウムが沈着した変性タンパク質を集合・結合させるために、他の器官の存在が必要であると考えられる。

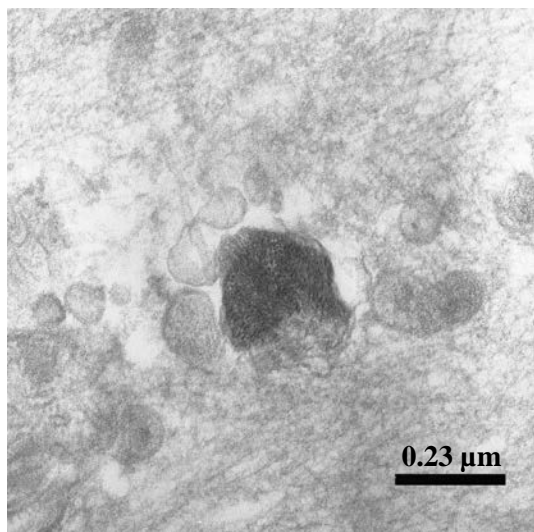
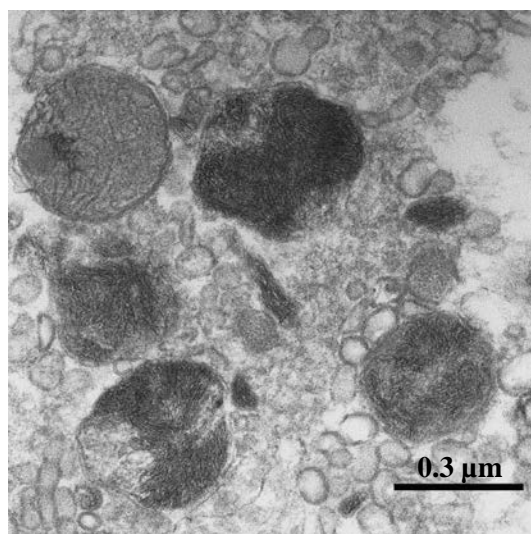
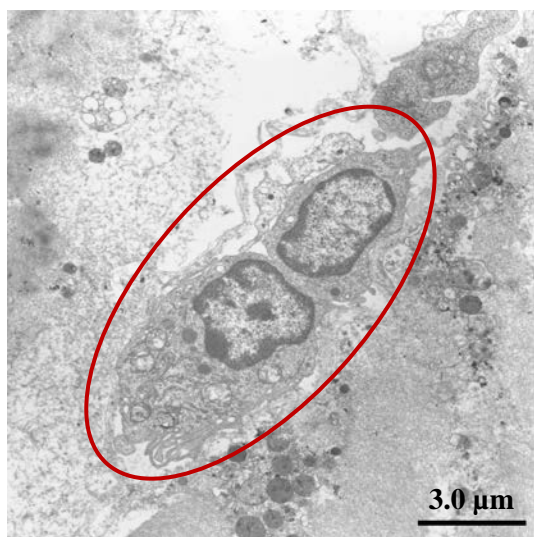
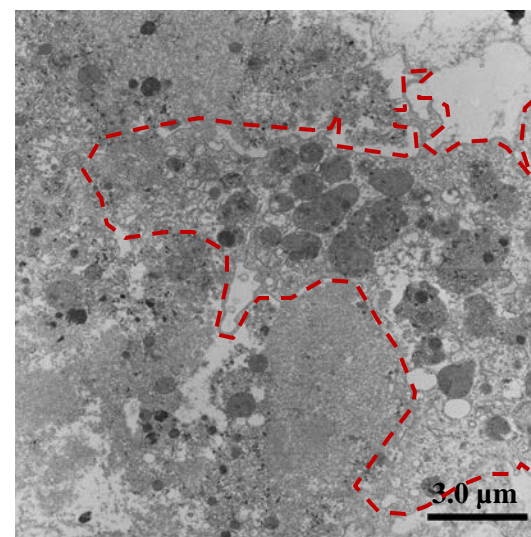
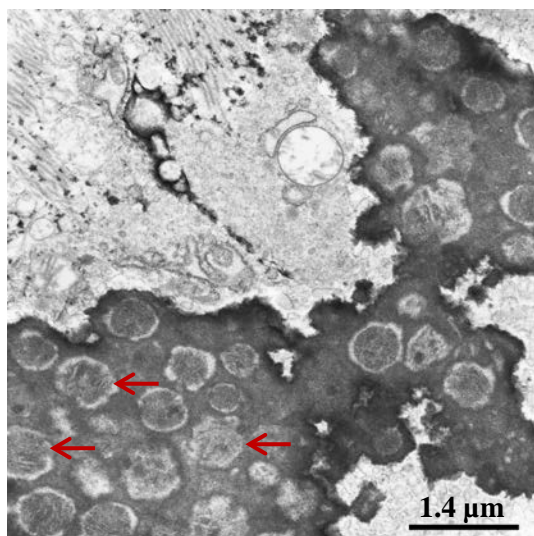
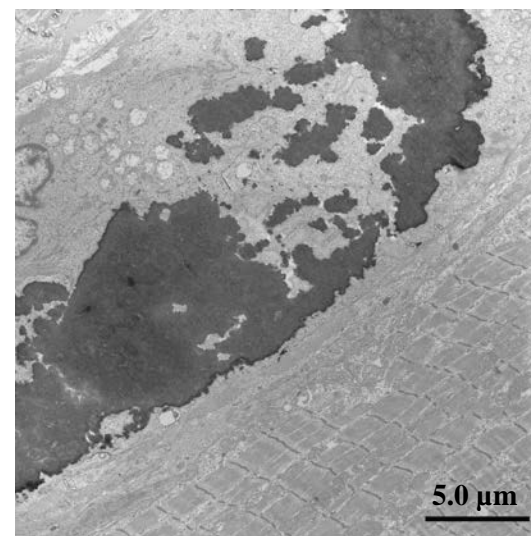
骨格筋内マクロファージは、筋変性部位を貪食する役割を担う。マクロファージは構造的特徴として細胞体を突起状に伸張させており、さらにリソソームを有するため電子顕微鏡下でも識別できる。筋変性領域付近にはマクロファージや好中球が確認でき、い

かにもこれから変性領域を貪食するような像が観察できた（図 4 C）。さらに別の部位では、すでに筋変性領域に浸潤して、変性した細胞を取り込むマクロファージが観察できた。そのマクロファージの中にはすでにリン酸カルシウムが沈着したミトコンドリアや筋小胞体の一部が貪食されていた（図 4 D）。

結果をまとめると、*mdx* マウス骨格筋内異所的石灰化は筋線維内の変性したミトコンドリアや筋小胞体に豊富に含まれるカルシウムが組織内のリンと結合することが起源となる。これら変性タンパク質をマクロファージが貪食して巨大化し、マクロファージが細胞死を起こすことで、異所的石灰化が骨格筋組織内に留まると考えられる（図 4 G）。

高リン食摂取により *mdx* マウス骨格筋の壊死筋線維は増加する

リン食を与えた 90 日齢 *mdx* マウスの大腿四頭筋（大腿直筋）の凍結切片を用いて、壊死筋線維領域の比較を行った。対象とした領域は変性した筋線維であり、通称 Opaque fibers と呼ばれる（Mohri et al., 2009）。その特徴として筋細胞膜が壊れることで細胞内にカルシウムが流入するため、角ばった正常筋に比べると丸く膨張している。Opaque fibers は EBD で識別することが一般的な手法となっているが（Matsuda et al., 1995）、本研究では血液サンプルを実験に使用したため、ほぼ同様な部位を染色する FITC で標識されたマウス抗アルブミン抗体を用いて筋変性領域の定量を行った。なお、異所的石灰化やマクロファージ浸潤領域はこの対象領域には含まなかった。その結果、壊死した筋線維領域はリン摂取量の増加とともに増加した（図 5 A, B）。特に高リン食を摂取した *mdx* マウスでは、グループ壊死領域（筋線維が束になり壊死した領域）が顕著であった（図 5 A）。なお、正常対照マウスにおいてリン過剰摂取による筋線維の壊死は認められなかった。リン摂取量に伴い、*mdx* マウスの筋線維壊死領域が増加したことから、高リン（リン酸）が骨格筋に対して細胞毒性を持つことを示唆した。

A**B****C****D****E****F**

G

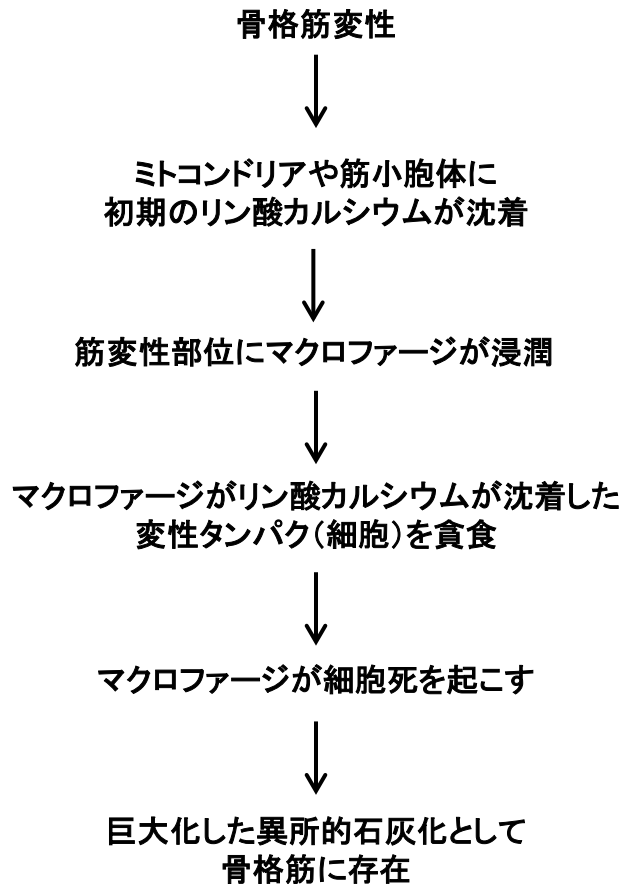
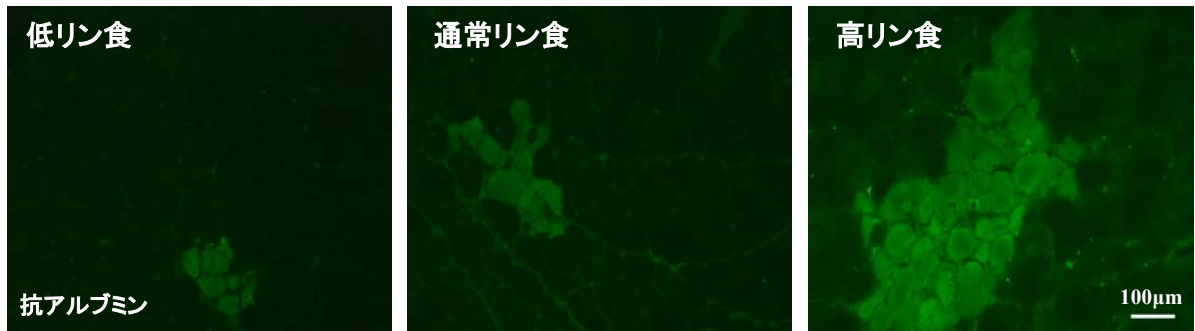


図4 透過型電子顕微鏡を用いたmdxマウス骨格筋内異所的石灰化メカニズム

- (A) 初期の骨格筋内リン酸カルシウム(濃く染色された部位)は、筋崩壊部位の変性したミトコンドリア(丸状の構造物)に沈着した。
- (B) ミトコンドリア以外にも、変性した筋小胞体の一部(微小な構造物)や変性した筋線維にも認められた。
- (C) 変性した筋線維にはマクロファージが浸潤した(赤色で囲んだ細胞)。
- (D) 筋変性領域に浸潤したマクロファージを赤色の点線で示す。すでに多数の変性した細胞を取り込んでいるのが明らかとなった。その中には石灰化した細胞も存在した。
- (E) 巨大化したリン酸カルシウムの沈着(濃く染色された部分)。異所的石灰化の中にはクリステ構造を持つ(赤い矢印)、ミトコンドリアの様な器官を無数に確認することができた。
- (F) 写真下部の筋原線維で満たされた筋線維とは異なり、異所的石灰化の周辺には筋原線維が認められなかった。
- (G) 顕微鏡観察により考えられる異所的石灰化メカニズムの仮説

A



B

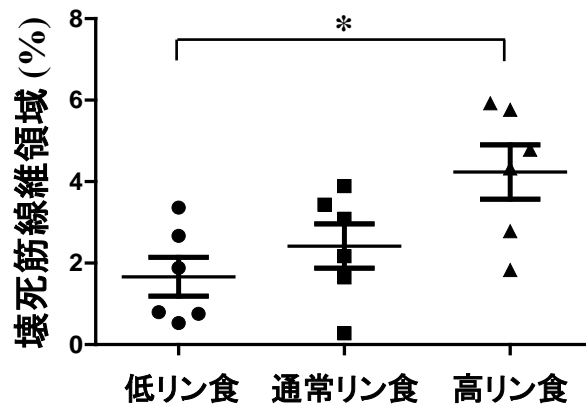


図5 リン食摂取による mdx マウスの壊死筋線維領域の変化

- (A) 90日齢 mdx マウス大腿四頭筋(大腿直筋)の凍結切片をFITCで標識されたマウス抗アルブミン抗体で染色した。変性した筋線維が抗アルブミン抗体で染色された。
- (B) 大腿直筋断面積当たりの壊死筋線維を割合を示した。高リン食摂取では mdx マウスの壊死筋線維領域が有意に増加した。誤差範囲は標準偏差で示した。* $p < 0.05$

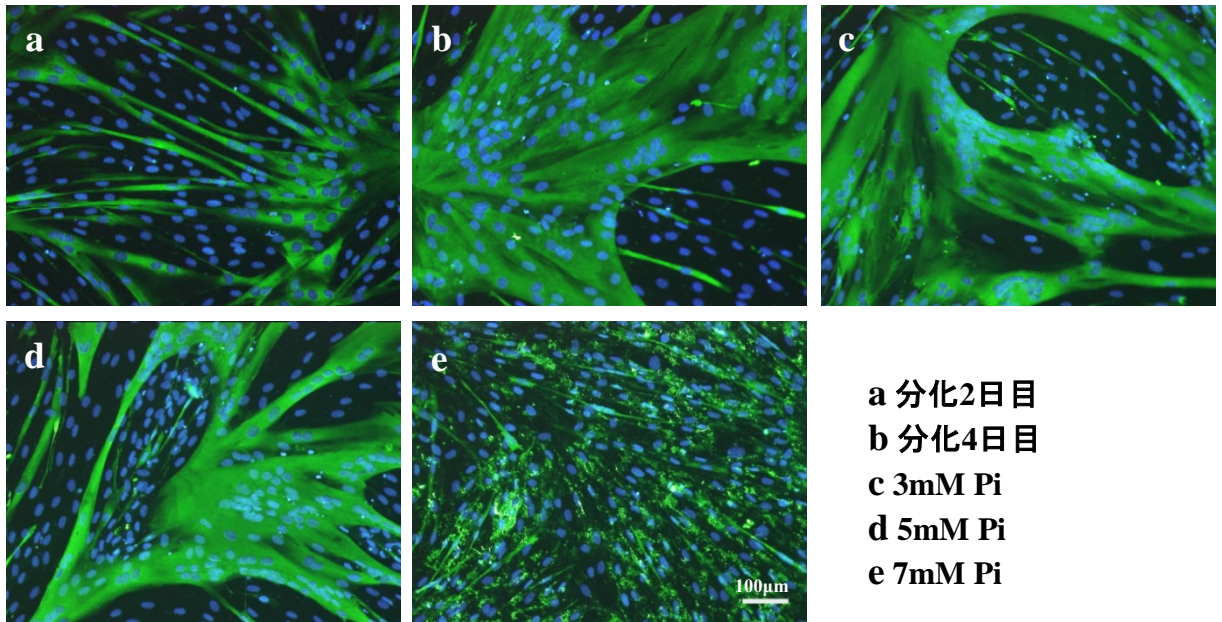
そこで、C2C12 細胞と正常対照マウスの前脛骨筋を用いて、高リン酸投与が骨格筋へ与える影響を検討した。筋分化誘導 2 日目後の C2C12 細胞に最終濃度 1 mM、3 mM、5 mM、7 mM となるように分化培地にリン酸（リン酸二水素ナトリウム二水和物）を加え、さらに 2 日間培養した。その結果、添加したリン酸濃度が増加するにつれて筋細胞の分化が抑制され、高リン酸濃度（7 mM）では MyHC（緑）で染色した筋細胞が培養皿から剥離した（図 6 A-a, B）。ウエスタンブロットを行った結果でも同様にリン酸添加によって MyHC の発現が低下したが、7 mM のリン酸を添加しても MyHC のバンドが検出された（図 6 C）。その理由として高濃度のリン酸添加によって多核の筋管細胞は減少したが、MyHC を発現する単核の筋芽細胞は存在していたため、ウエスタンブロットで検出されたと考えられる。

次に、正常対照マウスの前脛骨筋に 1 mM, 10 mM, または 100 mM リン酸を 50 μ l の生理食塩水とともに注射して筋損傷への影響を確認した結果、4 日後にはリン酸濃度依存的にマクロファージの浸潤が増加し、さらに eMyHC で染色した再生筋が増加した（図 7 A, B）。すなわち、*in vitro*、*in vivo* ともに高リン酸環境が骨格筋を壊死させる要因になることが明らかとなった。

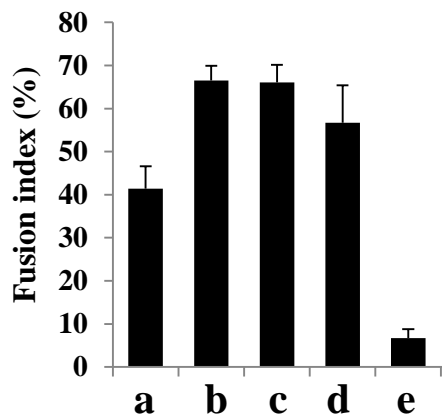
リン摂取量増加による *mdx* マウス骨格筋内 M1 マクロファージの増加

筋線維が壊死し再生する過程において、貪食細胞であるマクロファージは大きな役割を持つ。とりわけ *mdx* マウスは若齢（20 日齢程度）において、筋変性の増加は炎症性（M1）マクロファージが寄与すること、さらに骨格筋内のマクロファージを除去すると、筋変性が抑制されることが報告されている（Wehling et al., 2001）。筋変性が顕著な若齢 *mdx* マウスでは骨格筋内で M1 マクロファージが占める割合が高く、週齢が上がる

A



B



C

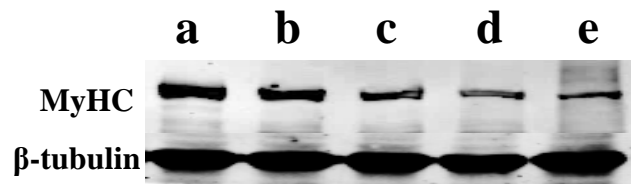
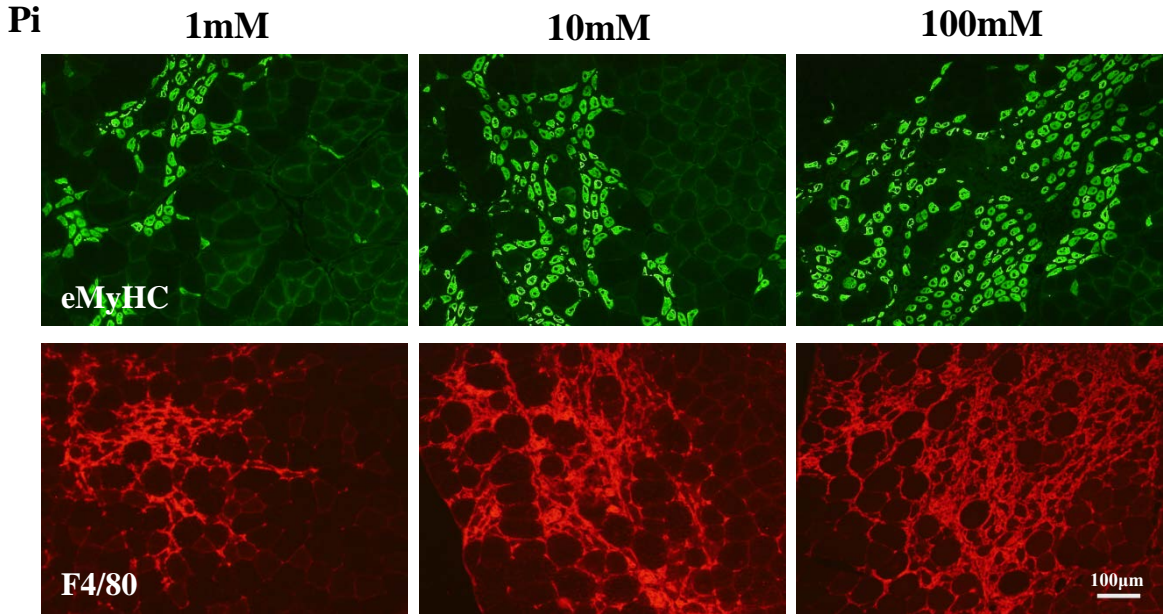


図6 C2C12細胞分化に対するリン酸添加の影響

- (A) ゼラチンコートした培養皿を用い、C2C12細胞を分化誘導してから2日後にリン酸を添加した。4日後にC2C12細胞をホルマリン固定し、MyHC(緑)とHoechst 33258(青)で染色した。添加するリン酸濃度が増加するにつれて筋分化が抑制され、7 mMでは筋管細胞が培養皿から剥離した。
- (B) 各条件における分化誘導4日後の全筋核数中の融合した筋細胞における筋核数の割合(fusion index)を示した。誤差範囲は標準偏差(n = 3)で示した。添加するリン酸濃度が増加するにつれて、fusion indexが低下した。
- (C) 上記の条件で培養したC2C12細胞からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロットを行い、MyHCとβ-tubulinの発現を調べた。

A



B

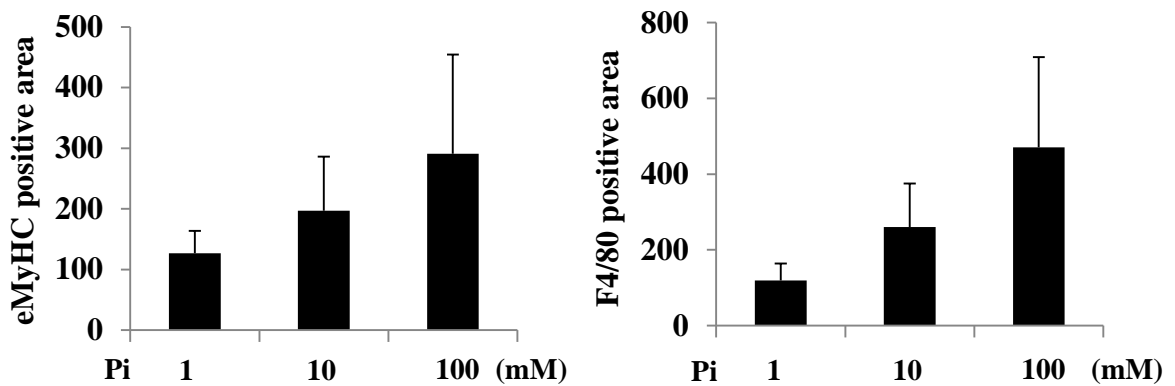


図7 正常骨格筋におけるリン酸の影響

- (A) 正常対照マウスの前脛骨筋にリン酸 (1 mM、10 mM、100 mM) を 50 μ l の生理食塩水 (pH 7.4) に希釈して注射し、4 日後に前脛骨筋を摘出した。凍結切片を作成し eMyHC (緑) と成熟マクロファージの表面抗原である F4/80 (赤) を染色した。
- (B) eMyHC 陽性領域と F4/80 陽性領域を定量した。添加したリン酸濃度依存的に再生筋線維 (eMyHC 陽性) とマクロファージ (F4/80 陽性) が増加したことから、リン酸投与によって筋変性が起こり、マクロファージが増加したことが分かった。誤差範囲は標準偏差 (各群 3 匹ずつ) で示した。

につれ抗炎症性（M2）マクロファージが大半を占め、M1 マクロファージが減少する（Villalta et al., 2009）。

まず、リン食を摂取させた *mdx* マウスの大腿四頭筋（大腿直筋）の全面積における成熟マクロファージの表面抗原である F4/80 が占める割合を比較した。すると、筋線維壊死領域同様、高リン食摂取により *mdx* マウスの筋変性領域は有意に増加し、通常リン食摂取群と比較しても、その領域は約 2 倍に増加した（図 8 A）。さらに F4/80 陽性の成熟マクロファージ領域における M1 と M2 マクロファージの割合を算出した（図 8 B）。90 日齢の *mdx* マウスでは M1 マクロファージの表面抗原である iNOS の陽性領域と M2 マクロファージの表面抗原である CD206 で陽性の抗炎症性マクロファージ領域は同程度であった。しかし、高リン食摂取 *mdx* マウスでは、M1 マクロファージが占める割合が 70%程度に増加しており、M2 マクロファージが占める割合が有意に減少したことから（図 8 C）、炎症が亢進していることが明らかとなった。このことから、高リン食摂取による筋変性の悪化には炎症系マクロファージの増加が寄与していることが示唆された。

異所的石灰化の周辺に局在するマクロファージについても検討した。H&E 染色でも分かるように、異所的石灰化は浸潤細胞に囲まれており、抗 F4/80 抗体で染色すると成熟マクロファージが確認できた。さらにこれらのマクロファージは M1 マクロファージであり、M2 マクロファージの局在はほとんど認められなかった（図 9）。すなわち、骨格筋内に異所的石灰化が起こると炎症性マクロファージが活性化され、筋再生を抑制する一要因になると考えられる。

高リン食摂取による炎症と骨化マーカーの遺伝子発現の増加

リン食を摂取した *mdx* マウスの骨格筋（大腿四頭筋）から分離した mRNA を鋳型に、

IL-6, TNF- α , IL-17, RANKL, GAPDH の RT-PCR を行った。高リン食 *mdx* マウスの骨格筋では、特に炎症サイトカインである TNF- α や慢性炎症のマーカーである IL-17 の遺伝子発現が亢進した（図 10）。この結果は、高リン食摂取によって炎症性マクロファージが有意に増加したことと一致する。これらの遺伝子発現は DMD 患者の骨格筋でも亢進していることが報告されており、炎症の増加が寄与している（Messina et al., 2011; De Pasquale et al., 2012）また、骨化マーカーである RANKL はリン摂取量依存的にバンドを検出したことから（図 10）、異所的石灰化の有無を反映していると示唆した。

高リン食摂取と急性運動ストレスの負の相乗効果による筋変性の悪化

トレッドミルや回転ケージを用いた運動量負荷は、*mdx* マウスの筋変性を増加させる手法として広く用いられている。これまでの研究で、回転ケージを用いた 7 日間の自発的運動量測定では、*mdx* マウスに高リン食を摂取させると 1 日平均運動量が有意に低下した（図 11 A）。3 日間の環境適応を含む合計 10 日間の運動量増加は急性運動ストレスとなり *mdx* マウスの筋変性を増加させると考えられる。前脛骨筋は、回転ケージで運動する際に動員される筋部位であり、さらに通常ケージ内飼育の 90 日齢 *mdx* マウスで前脛骨筋は中心核を有する筋線維は多いものの、大腿四頭筋や腓腹筋と比較すると筋変性領域は顕著ではない。そのため、急性運動ストレスの影響を検討する上で最も適していると考えられる。リン食摂取をした自発的運動群と通常飼育群の前脛骨筋における筋変性領域（壊死筋線維と筋変性、異所的石灰化を含む）と中心核線維数、マクロファージの浸潤領域、再生筋線維を定量した結果、通常ケージ内飼育群と比較すると自発的運動群では全ての評価項目が有意に増加した（表 1）。すなわち、今回実験で設定した 10 日間の自発的運動量の増加は、*mdx* マウスの筋変性を悪化させることが証明された。通常ケージ飼育環境下の高リン食摂取群は、大腿四頭筋と同様に前脛骨筋においても筋

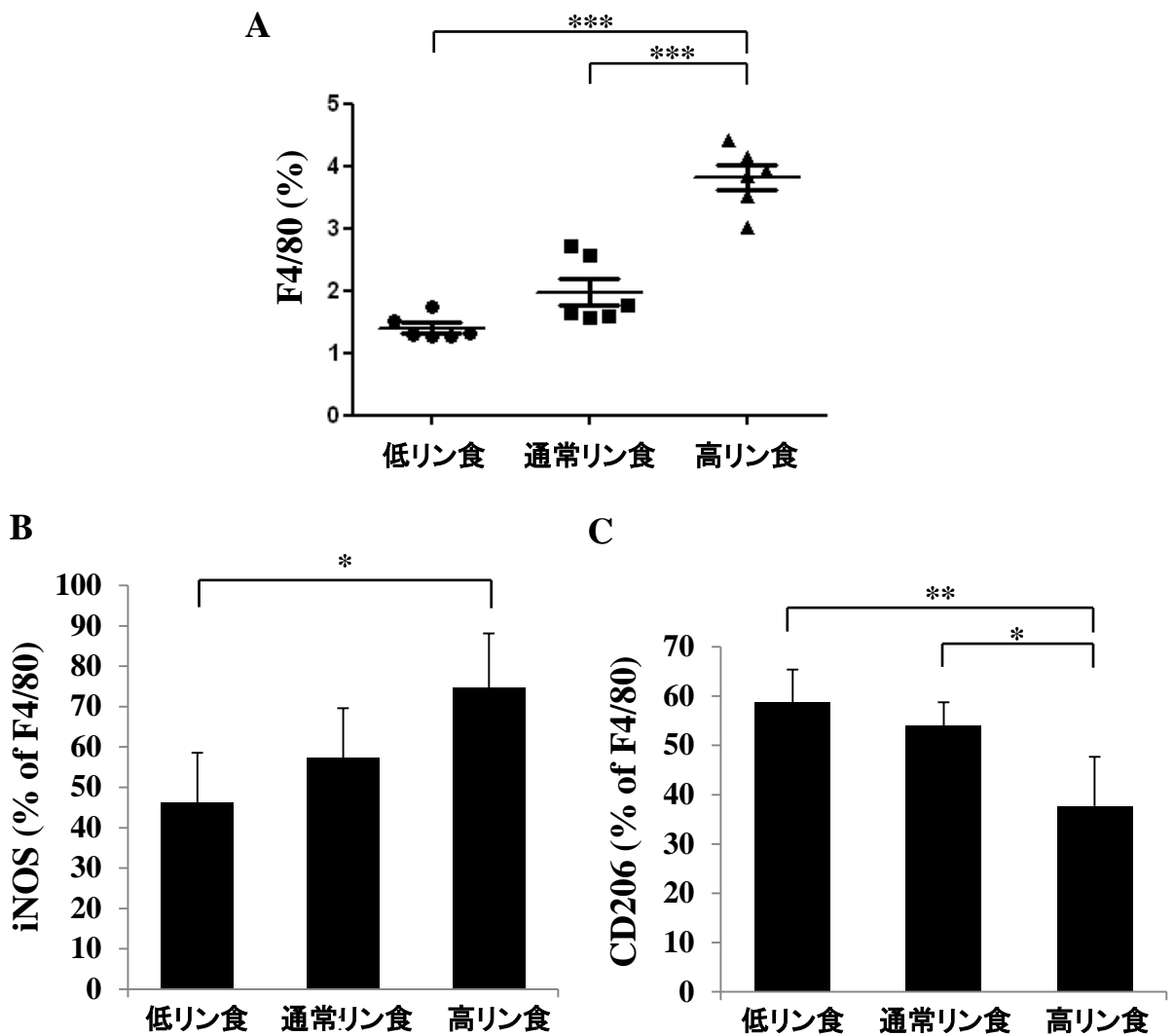


図8 リン摂取によるmdxマウス骨格筋内マクロファージの浸潤領域と表現型の変化

- (A) リン食を摂取した90日齢mdxマウスの大腿四頭筋を摘出した。凍結切片を作成し、大腿直筋断面積におけるF4/80陽性領域の比率を示した。高リン食摂取群ではマクロファージの浸潤が有意に増加した。
- (B) 大腿直筋断面積におけるiNOS陽性のM1マクロファージ浸潤領域の比率を求め、大腿直筋のF4/80陽性領域におけるiNOS陽性領域を示した。高リン食摂取群では炎症性マクロファージ(iNOS陽性)が有意に増加した。
- (C) 大腿直筋断面積におけるCD206陽性のM2マクロファージ浸潤領域の比率を求め、大腿直筋のF4/80陽性領域におけるCD206陽性領域を示した。リン摂取量を制限すると抗炎症性マクロファージ(CD206陽性)が有意に増加した。

誤差範囲は標準偏差で示した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$

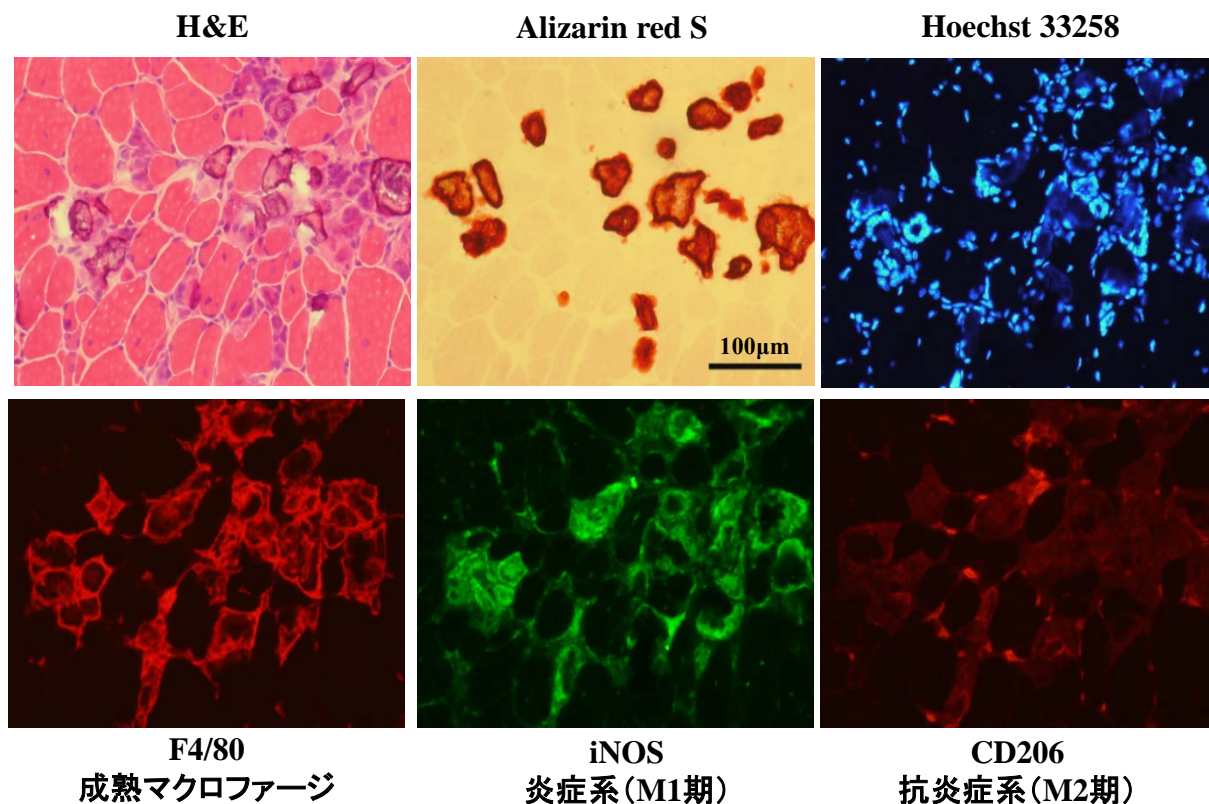


図9 骨格筋内異所的石灰化の周辺に浸潤するマクロファージの種類

*Mdx*マウス大腿四頭筋の連続凍結切片を作成し、H&E染色とalizarin red S染色で異所的石灰化部位を同定した。また連続切片をF4/80、iNOS、CD206で染色し、Hoechst33258で対比染色した。異所的石灰化の周辺はマクロファージの浸潤が顕著であり、iNOS陽性のマクロファージが発現していることが明らかになった。

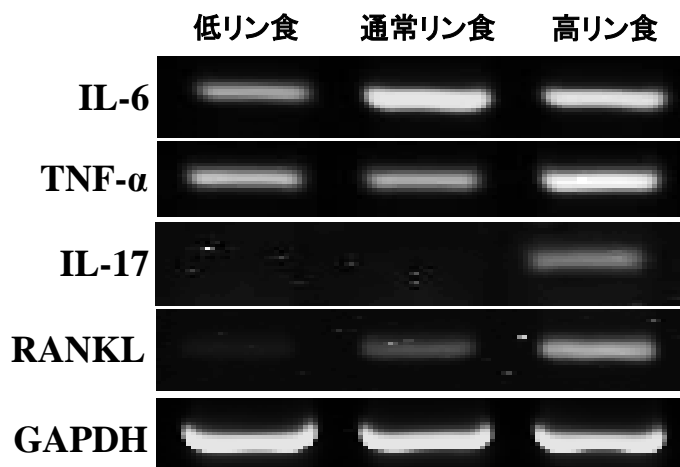


図10 リン食摂取による*mdx*マウスの骨格筋の炎症と骨化マーカーの発現変化

リン食を摂取した*mdx*マウスの骨格筋(大腿四頭筋)から分離したmRNAを鋳型に、RT-PCRによってIL-6, TNF- α , IL-17, RANKLの遺伝子発現量の変化を調べた。尚、GAPDHを内部標準として検出した(各群 $n = 3$)。

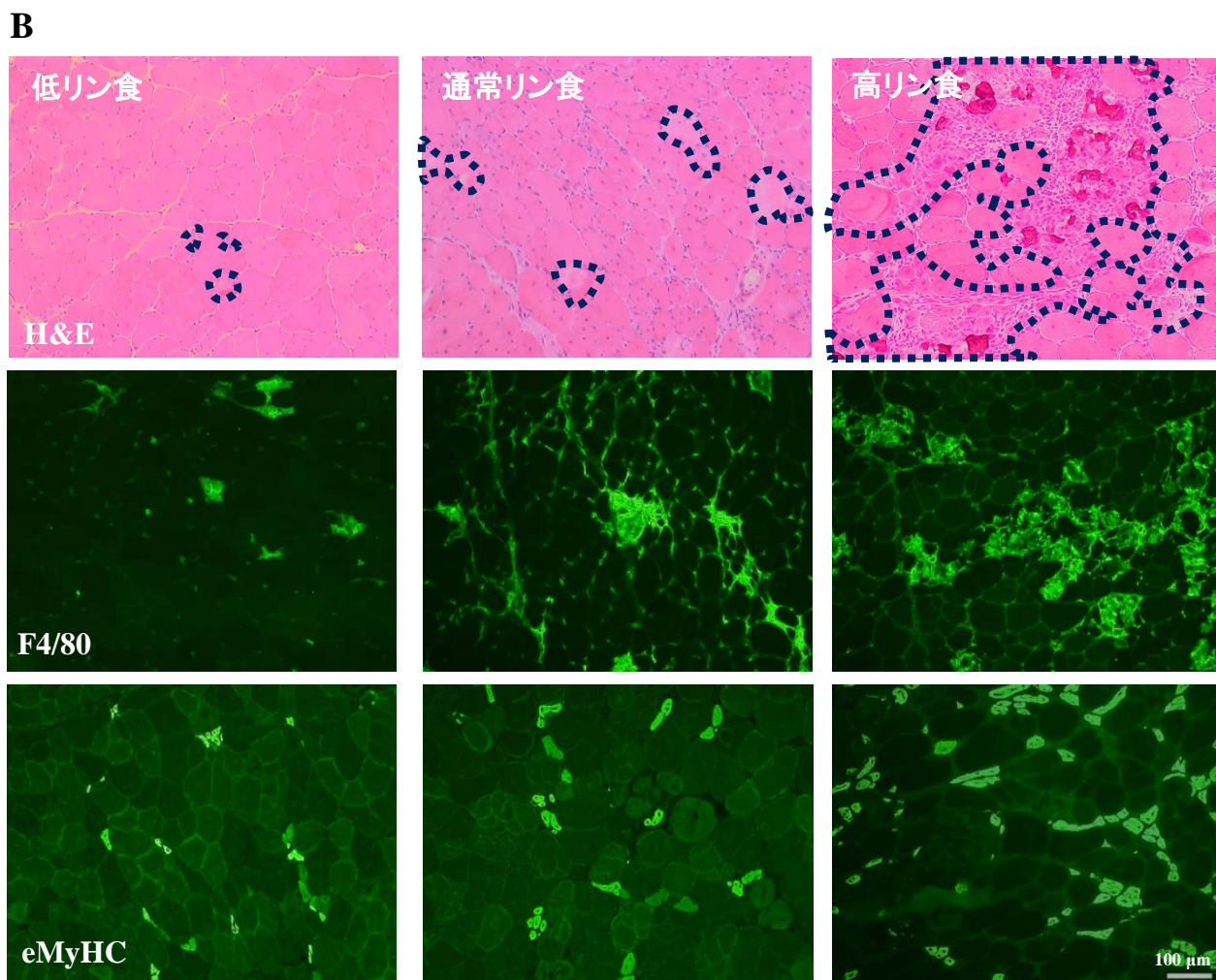
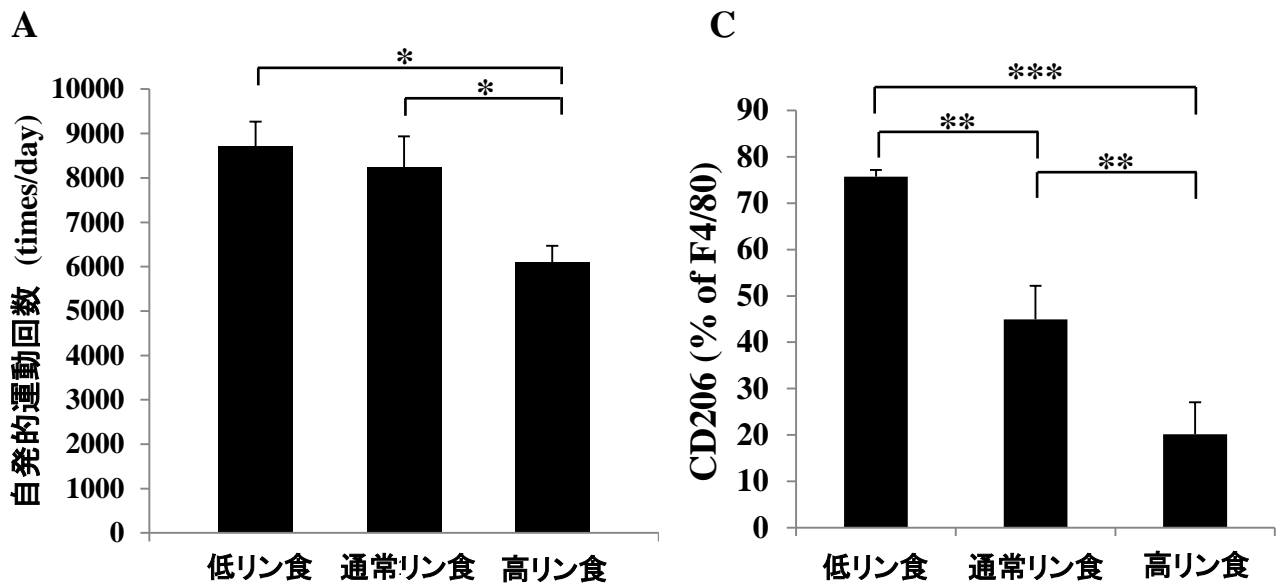


図11 リン摂取が mdx マウスの自発的運動量と運動後の筋変性に与える影響

- (A) 回転ケージを用いた7日間の自発的運動量を示した。高リン食摂取 mdx マウスは1日平均運動量が有意に低下した。低リン食群と通常リン食群では変化がなかった。
- (B) 10日間(3日間の環境順応期間と7日間の自発的運動量測定期間)の運動直後に前脛骨筋を摘出し、運動量増加が筋変性に与える影響をH&E染色、F4/80染色、eMyHC染色で確認した。筋変性領域(壊死筋線維と異所的石灰化)を青色の点線で示した(H&E染色)。
- (C) 運動後の前脛骨筋断面積におけるF4/80陽性領域とCD206陽性領域の比率を示した。骨格筋再生を促進する抗炎症性マクロファージ(CD206陽性)は、低リン食摂取群で有意に増加し、筋変性が顕著であった高リン食群で有意に低下した。

誤差範囲は標準偏差で示した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$

	筋変性領域			F4/80			eMyHC			中心核線維		
	通常飼育 (n = 7)		自発的運動 (n = 9)	通常飼育 (n = 7)		自発的運動 (n = 9)	通常飼育 (n = 7)		自発的運動 (n = 9)	通常飼育 (n = 7)		自発的運動 (n = 9)
	平均値 (SD)	平均値 (SD)	Δ% 有意差	平均値 (SD)	平均値 (SD)	平均値 (SD)	平均値 (SD)	平均値 (SD)	平均値 (SD)	平均値 (SD)	平均値 (SD)	平均値 (SD)
低リン食	1.42 (1.2)	1.75 (1.6)	+23	1.0 (0.7)	1.4 (0.8)	+46	0.3 (0.4)	1.2 (1.0)	+265 (*)	77.7 (3.8)	80.9 (1.4)	+4.0
通常リン食	1.69 (1.1)	4.16 (4.1)	+147	1.0 (0.7)	3.4 (3.1)	+250 (*)	0.5 (0.4)	1.7 (1.1)	+246 (*)	80.7 (1.8)	83.5 (1.5)	+3.5 (***)
高リン食	3.21 (2.9)	21.6 (12.0)	+571 (***)	1.5 (0.7)	14.2 (9.2)	+831 (***)	0.7 (0.6)	3.9 (2.9)	+489 (***)	81.5 (3.4)	84.8 (2.4)	+4.1 (*)

表1 通常飼育群と10日間の自発的運動群のmdxマウス前脛骨筋の筋病理比較

各群mdxマウスの前脛骨筋を摘出し、凍結切片を作成しH&E染色（筋変性領域と中心核筋線維数）、F4/80染色（成熟マクロファージ染色）、eMyHC染色（再生筋領域）を行った。前脛骨筋断面面積を求め、それぞれの陽性領域が占める割合を算出した。通常飼育に対して、自発的運動による各評価項目の増加率(Δ%)を示し、通常飼育群と自発的運動群の値をt検定で比較した。誤差範囲は標準偏差(SD)を示した。* p < 0.05、

*** p < 0.001

変性部位やマクロファージの浸潤領域が、他のリン食群と比較して増加した（表 1）。その上、運動負荷が加わった高リン食摂取 *mdx* マウスは骨格筋変性が顕著に増加し、前脛骨筋の広域にわたりグループ筋壊死やマクロファージの浸潤を確認した（図 11 B）。高リン食摂取の通常ケージ内飼育群と自発的運動群を比較すると、運動負荷後に筋変性領域は 5.7 倍、マクロファージ浸潤領域は 8.3 倍、eMyHC 陽性領域は 4.9 倍と、10 日間の運動で筋変性が顕著に悪化したことが明らかとなった。

高リン食摂取は筋変性を増加させるが、筋再生には影響しない

高リン食摂取は *mdx* マウスの筋変性を増加させることが明らかとなったが、次に筋再生への影響についても検討した。私はこれまでに正常対照マウスの下腿三頭筋（ヒラメ筋と腓腹筋）に 10 μ M CTX を含む 100 μ l の PBS を筋中すると、高リン食を摂取させた群では 14 日後に骨格筋異所的石灰化が起こることを明らかにした。また、正常対照マウスの前脛骨筋にリン酸を注射した実験では、筋再生は阻害されなかった（図 7 A, B）。そこで、リン食を摂取した 90 日齢 *mdx* マウスの前脛骨筋に CTX を注射し、14 日後に切片を作成し、H&E 染色を用いて筋再生の評価を行った。その結果、全てのリン食群で CTX 投与により実験的に骨格筋を損傷させたため、前脛骨筋のほぼ全ての筋線維が中心核を有していた。また、高リン食群においても筋再生は他のリン食群と変わらなかったことから、高リン食摂取によって筋再生が抑制されることはないと示唆された（図 12）。運動負荷を与えた高リン食 *mdx* マウスの前脛骨筋切片は運動直後だったため炎症が拡大しているが、CTX 投与 14 日後では、筋再生が阻害されていないことが明らかとなった。CTX 投与後の再生筋において、高リン食により異所的石灰化が確認できたが、非投与群と比較して悪化しなかった。

また、最も筋変性が顕著な部位の 1 つである *mdx* マウスの横隔膜を観察すると離乳

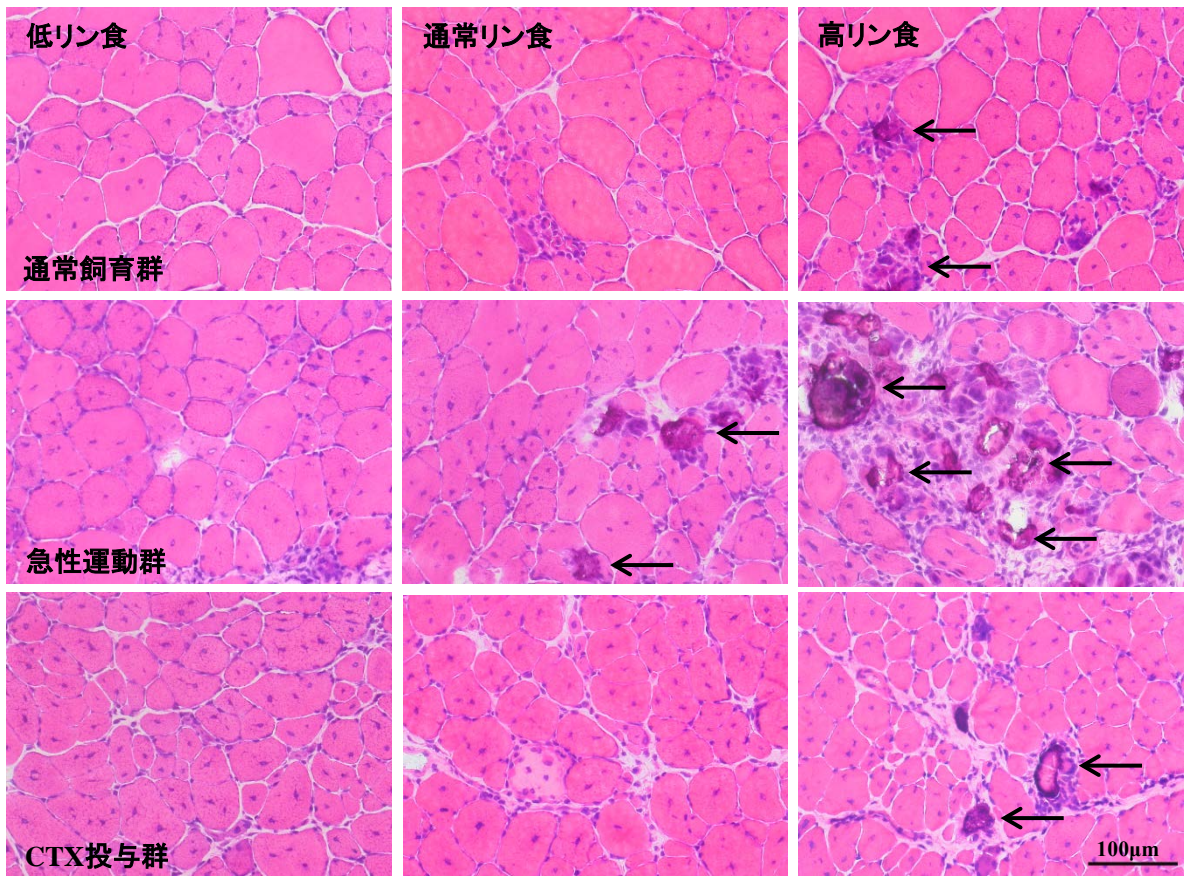


図12 リン摂取が mdx マウスの筋再生へ及ぼす影響

リン食を摂取した mdx マウス前脛骨筋にCTXを投与し、14日後に筋再生への影響を確認した。

上段に通常飼育群、中段に10日間の自発的運動群、下段にCTX投与群を示した。

高リン食摂取群は、他のリン食群同様にCTX投与14日後に骨格筋が再生した。また、非投与群と同様に異所的石灰化が確認できた。異所的石灰化を矢印で示す。

前から筋変性や中心核が認められる。DMD 犬では生まれて間もない頃から横隔膜に筋変性が認められ、さらに異所的石灰化も起こることが報告されている (Nakamura et al., 2013)。高リン食摂取 *mdx* マウスの横隔膜では、他の骨格筋部位同様に異所的石灰化が認められたが、さらにその周辺は Masson Trichrome で青く染色される線維化が亢進していることが分かった (図 13)。すなわち、高リン食摂取により筋変性が増加した *mdx* マウスは、筋再生が起こるが、部分的に異所的石灰化が起こり、その周辺は筋再生が抑制され線維化が進むことが示唆された。

低リン食摂取により *mdx* マウス骨格筋壊死や変性領域は抑制される

私は、これまでに高リン食摂取による *mdx* マウスの骨格筋変性の悪化を明らかにしてきた。低リン食を与えることで *mdx* マウスの骨格筋内異所的石灰化が軽減することを報告した。さらに一度高リン食を与えて増加した異所的石灰化も、その後 30 日間、同個体 *mdx* マウスに低リン食摂取させることで減少することがを明らかにしている。筋張力についても他のリン食群と比べて低リン食群では増加 (改善) 傾向にあった。本研究で用いた特注飼料の最も低いリン含有量が 0.7 g/100 g であったが、低リン食摂取では正常対照マウスと *mdx* マウスの体重低下や筋重量低下はなく、リン摂取制限による成長遅延は認められなかった (図 1 C)。なお、動物実験用マウスの個体維持に用いられる食餌の最少リン含有量は 0.3 g/100 g である (National Research Council, 1995)。

本実験では低リン食摂取が筋ジストロフィー症状へ及ぼす影響についても検討した。低リン食摂取 *mdx* マウスの大腿四頭筋と前脛骨筋における筋線維壊死領域や筋変性領域、マクロファージ浸潤領域は、通常リン食摂取 *mdx* マウスと変わらなかった。RT-PCR の結果では TNF- α の発現は通常リン食群と同等であったが、IL-6 の発現は減少した (図 10)。10 日間の急性運動負荷を与えた *mdx* マウスはリン摂取制限による骨格筋への効果

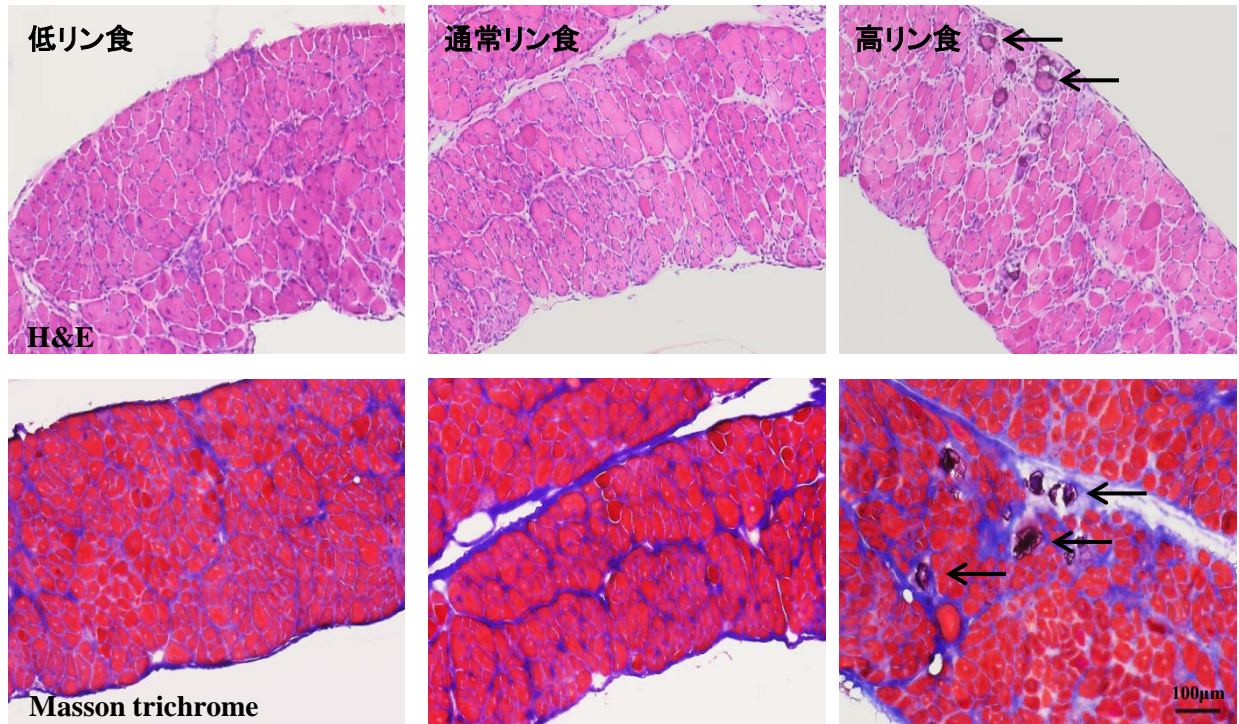


図13 *Mdx*マウスの横隔膜における異所的石灰化と線維化領域

*Mdx*マウス横隔膜の凍結切片を作成し、H&E染色とMasson trichrome染色を行った。高リン食摂取の*mdx*マウス横隔膜には異所的石灰化が認められ、さらに石灰化の周辺はMasson trichrome染色で青色に染色された線維化した領域が亢進していることが分かった。異所的石灰化が起こると、その周辺は筋再生が抑制され、線維化が亢進すると考えられる。異所的石灰化を矢印で示す。

が顕著であり、低リン食摂取では1日平均運動量は減少していないにもかかわらず、運動量が増加していない通常ケージ内飼育群と比較しても筋変性領域やマクロファージの浸潤は変わらなかった（表 1）。もちろん再生筋領域や中心核線維数は増加していたことから運動負荷による影響はあったものの、過度な炎症や筋変性が抑えられた（図 11 B）。その理由として、低リン食摂取による骨格筋内異所的石灰化の減少と抗炎症性（M2）マクロファージが占める割合の増加が考えられる。前述したように通常、90 日齢 *mdx* マウスの前脛骨筋内異所的石灰化やマクロファージの浸潤領域は大腿四頭筋や横隔膜と比較すると顕著ではない。しかし、通常リン食群と高リン食群では急性運動負荷がかかると異所的石灰化や炎症性マクロファージの浸潤領域が増加した。低リン食群では、運動負荷後であっても異所的石灰化はほとんど認められず、さらに炎症領域も拡大しなかった。運動負荷後のマクロファージの占める割合を調べると、リン摂取量が減少するにつれて筋再生を促進する抗炎症 M2 マクロファージの割合が高かった（図 11 C）。これらの結果から、高リン食が細胞死や炎症を引き起こす一方で、低リン食は炎症を抑え、抗炎症性マクロファージを活性化させるメカニズムが存在すると考察した。

リン吸着薬による *mdx* マウスの骨格筋変性への影響

これまでの研究において、低リン食摂取による *mdx* マウスの骨格筋変性の抑制効果を明らかにした。臨床ではリン吸着薬を用いて、腎不全患者や透析患者の血中リン酸濃度を調整することが一般的に行われている。そこで本研究では、塩酸セベラマーであるレナジェル錠を用いて *mdx* マウスへの投与を行った。本来、幼児期や成長期にリン吸着薬を用いることは骨形成阻害につながるため推奨されていない。しかし、*mdx* マウスは離乳時から 60 日齢（成獣マウス）に筋変性のピークが起こる。そのため、離乳時（20 日齢）から 60 日齢まで、食事に粉末状のレナジェルを混合させ、自由摂取させた。食

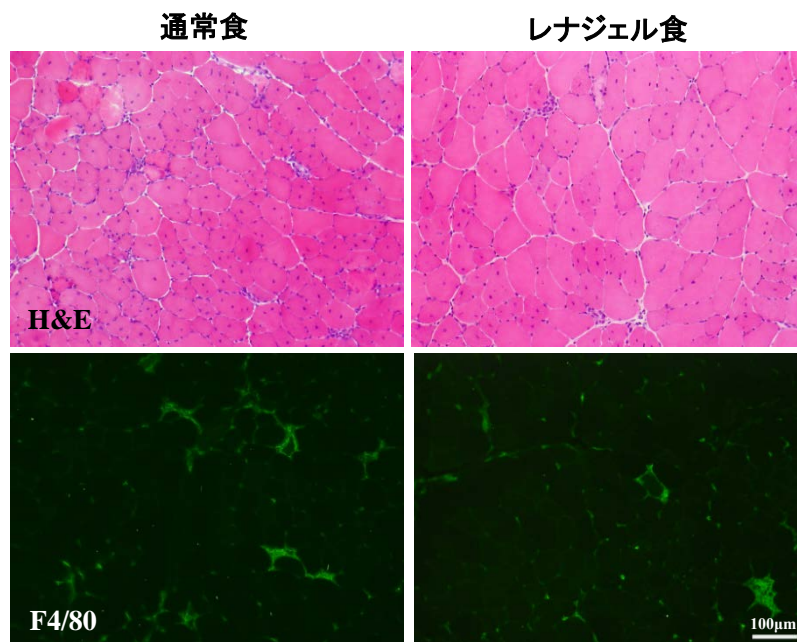
事中レナジェル含有量は先行研究を参考に (LaRusso et al., 2008)、20 日齢から体重が 20 g に達するまでは 0.5%にし、20 g 以上からは 1.0%とした (レナジェル食)。なお、多くの先行研究では成獣マウスやラットに 3.0%のレナジェル混合エサを用いているが (Hauser et al., 2010; Maizel et al., 2013)、本研究ではマウスの発育・発達への影響を考慮し、比較的少ないレナジェルの含有量で実験を行った。

レナジェル食を摂取した 60 日齢 *mdx* マウスの体重増加率は、通常食摂取の *mdx* マウスと変わらなかった (各群 6 匹) (図 14 A)。前脛骨筋の組織切片を用いて骨格筋変性への影響を検討したところ、投与群において中心核線維数は有意に低下しており (図 14 B, C-a)、マクロファージの浸潤も低下傾向にあった ($p < 0.06$) (図 14 B, C-b)。また、変性筋線維領域は通常食群と比較して変わらなかった (図 14 C-c)。レナジェル食 *mdx* マウスの前脛骨筋において、骨格筋異所的石灰化は認められなかった。すなわち、根本的な病気の原因を治療せずとも、リン吸着薬を用いることで骨格筋変性による炎症の拡大を抑制し、その結果、中心核線維が有意に減少したことからも病気の進行を遅延することが分かった。尿毒症モデルラットを用いた先行研究では、塩酸セベラマーが血中 TNF- α を低下させることを報告していることから (Hauser et al., 2010)、塩酸セベラマーが骨格筋内の炎症を抑える効果があると考えられる。リン吸着薬が筋変性に伴う炎症抑制に寄与するかをさらに検討するため、45 日齢で 20 g 以上の成獣 *mdx* マウスに対し、投与量を 1.0%にしたレナジェル食を最長 90 日齢まで与えた。本研究ではすでに通常リン食 *mdx* マウスの骨格筋病理を解析していたため、レナジェル食群のコントロール群として用いた。その結果、前脛骨筋の筋病理解析では、レナジェル食群における壊死筋線維領域 (図 15 A-a)、マクロファージの浸潤領域 (図 15 A-b)、再生筋線維領域 (図 15 A-c) がそれぞれ有意に低下し、その結果、中心核を持つ筋線維数が有意に減少した (図 15 A-d)。さらに大腿直筋の組織切片を用いた解析では、マクロファージ浸潤領域における炎症性マクロファージと抗炎症性マクロファージが占める割合を算出した。

A

	離乳時 (g)	60日 齢 (g)	増加量 (g)
通常食群	8.7±0.8	25.0±1.5	16.3±0.9
レナジェル群	8.7±0.8	24.8±1.9	16.1±1.3

B



C

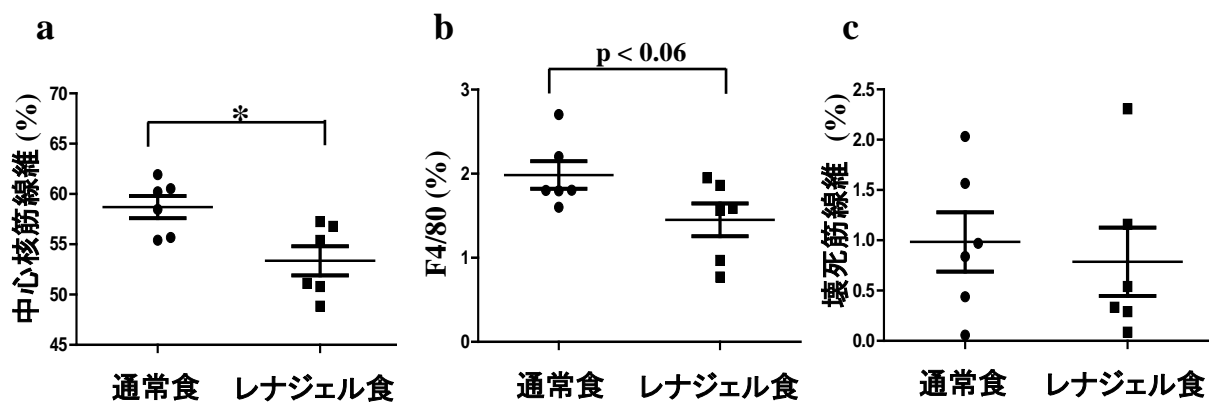
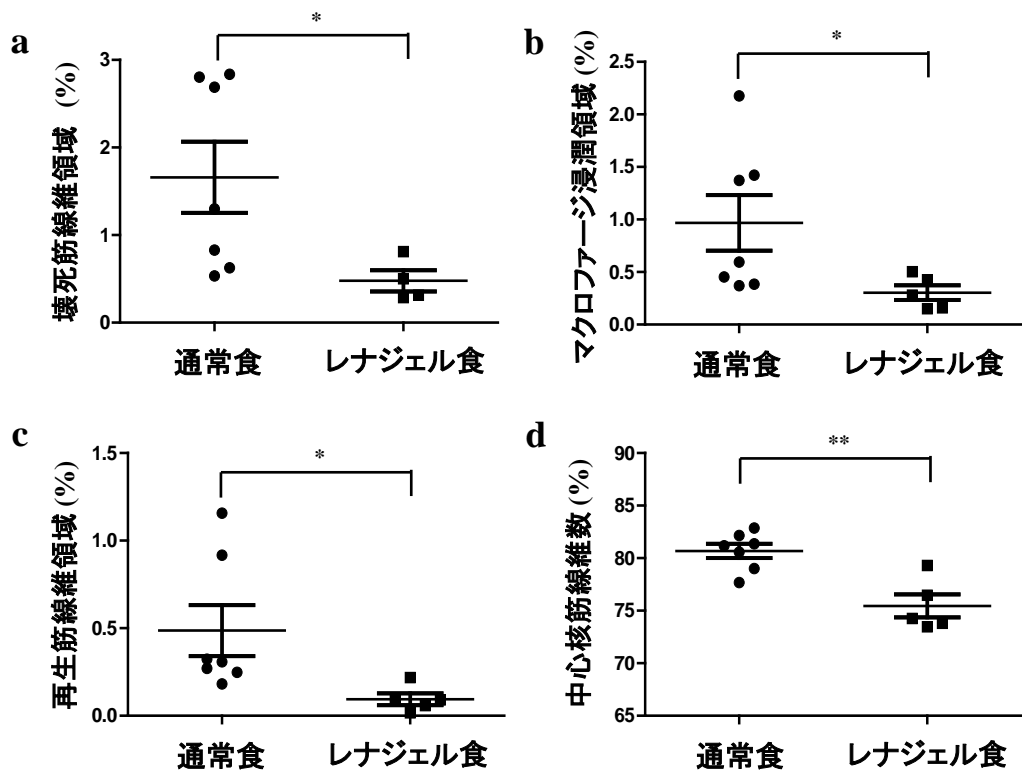


図14 リン吸着薬(塩酸セベラマー・レナジェル)によるmdxマウスの筋変性への影響

- (A) 20日齢から60日まで通常リン食に粉末状レナジェルを添加してmdxマウスに自由摂取させた。20日齢と60日齢の体重と、体重増加率を示した。通常食とレナジェル食では体重に差はなかった(各群 $n = 6$)。誤差範囲は標準偏差で示した。
- (B) 通常食とレナジェル食mdxマウスの前脛骨筋を摘出し、凍結切片を作成し、H&EとF4/80で染色した。
- (C) H&E染色を用いて、全筋線維における(a)中心核を有する筋線維の数を比率で示した。レナジェル食mdxマウスは中心核線維数が有意に低下した。すなわち、投与期間に筋変性が抑制されていたことが分かった。(b)F4/80染色を用い、成熟マクロファージ陽性領域を定量し、前脛骨筋断面積に占める浸潤領域の割合を定量した。マクロファージの浸潤領域は減少傾向にあった($p < 0.06$)。(c)FITCで標識した抗アルブミン抗体を用い、前脛骨筋断面積における壊死筋線維領域の割合を定量した。レナジェル食摂取による壊死線維領域に差は認められなかった。誤差範囲は標準偏差で示した。* $p < 0.05$

A



B

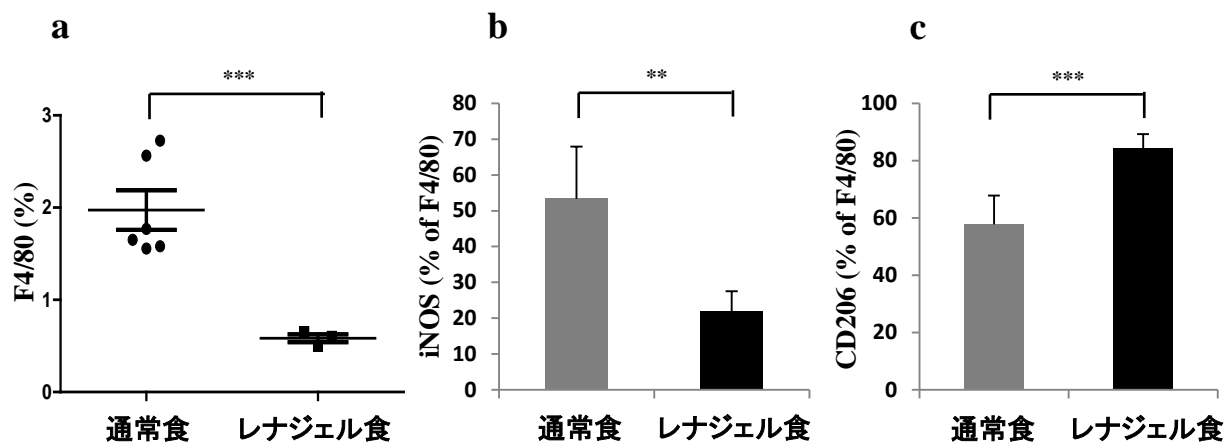


図15 リン吸着薬(塩酸セベラマー・レナジェル)によるmdxマウスの筋変性への影響

- (A) 45日齢から90日まで通常リン食に粉末状レナジェルを添加してmdxマウスに自由摂取させた。前脛骨筋の筋病理を評価した結果(n = 5)、全面積における(a)壊死筋線維領域、(b)マクロファージ浸潤領域、(c)再生筋線維領域、(d)中心核線維数はレナジェル食群で有意に低下した。誤差範囲は標準偏差で示した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$
- (B) 大腿直筋の全面積における(a) F4/80抗体で陽性のマクロファージ浸潤領域は通常食群(n = 7)と比較し、レナジェル群(n = 3)で有意に減少し、(b)そのF4/80陽性領域における炎症性マクロファージ(iNOS陽性)領域はレナジェル群で有意に減少した。一方、(c)大腿直筋のF4/80陽性領域におけるCD206陽性の抗炎症性マクロファージの占める領域は、レナジェル群で有意に増加した。誤差範囲は標準偏差で示した。** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$

レナジェル食群では通常リン食群と比較して、F4/80 抗体で陽性のマクロファージ浸潤領域が有意に低下した（図 15 B-a）。また、iNOS 陽性の炎症性マクロファージが占める領域が有意に減少し（図 15 B-b）、抗炎症性マクロファージが占める割合が有意に増加した（図 15 B-c）。これらの結果から、リン吸着薬は骨格筋の炎症を抑え、抗炎症性マクロファージの占める割合が増加することで筋変性の拡大を抑制することが分かった。

今回の実験では投与量を制限したが、成長期のマウスへリン吸着薬を投与することは骨形成への影響が懸念される。DMD 患者において幼児期から筋変性が起こっており、さらに成長期に達するころには骨格筋領域のほとんどが線維化や脂肪化していることから、今後、投与時期や投与するリン吸着薬の種類または投与量などを詳細に検討する必要がある。

研究 1 のまとめ

本研究では、リン食摂取が *mdx* マウスの骨格筋変性に与える影響について検討した。修士課程では、リン摂取量増加とともに骨格筋内異所的石灰化の増加と筋張力や運動量の低下を報告したが、本研究では骨格筋変性についても同様に高リン食摂取により筋線維壊死やマクロファージ浸潤領域は顕著に増加することを明らかにした。また、C2C12 細胞や正常対照マウスの骨格筋を用いた実験において、高リン酸が骨格筋に対して毒性を持ち、細胞死を増加させることが分かった。高リン酸によるアポトーシスの増加は血管内皮細胞などでも報告されている（Park et al., 2011）。しかし、高リン（リン酸）が細胞死を誘導する詳細なメカニズムは分かっていない。

高リン食摂取が *mdx* マウスの筋変性に寄与した明確な原因を特定するまでに至らなかったが、2 つの可能性が考えられる。1 つは、過剰なリンが直接的に筋線維の崩壊に寄与したこと。*Mdx* マウスの骨格筋は膜のアンカー役であるジストロフィンが欠損して

いるため、もともと筋細胞膜が脆弱であり筋細胞壊死を起こす。そのため、過剰なリン摂取で生体内のホメオスタシスが崩れ、過剰なリンが筋細胞内に入り込み筋細胞壊死を増加させたと考えられる。そして、マウスの **DMD** 症状悪化の指標である異所的石灰化が増加したことも、過剰なリンによって骨格筋内のイオンバランスが崩れ、筋崩壊が増加した結果であろう。2つ目は、リンによる **M1** マクロファージの活性化である。筋線維壊死増加に伴う“結果”ではあるが、高リン食摂取 *mdx* マウスの骨格筋はマクロファージ浸潤領域が有意に増加し、その大半が炎症性の **M1** マクロファージであった。リン摂取を制限すると **M1** マクロファージが抑えられ、抗炎症性の **M2** マクロファージが増加したことから、高リン状態が炎症を拡大させる要因であると考えられる（表4）。

骨格筋内異所的石灰化のメカニズムについては、筋変性領域のミトコンドリアや筋小胞体といったカルシウムを抱負に含む器官内でリンがカルシウムと結合し、初期のリン酸カルシウムの沈着が起こることが分かった。また、これらをマクロファージが貪食し、マクロファージが細胞死を起こすことで、巨大化した異所的石灰化が骨格筋内に留まることを明らかにした。さらに、異所的石灰化の周辺には **M1** マクロファージが局在しており、骨格筋内の炎症拡大に寄与していることを示唆した。

一方で、低リン食摂取やリン吸着薬投与によって *mdx* マウスの筋ジストロフィー症状が改善することを明らかにした。特に骨格筋の炎症が抑制され、**M2** マクロファージの占める割合が増加したことが症状の進行を抑制した要因だと示唆した。今後、さらに詳細な検討が必要だが、本実験結果から低リン食摂取やリン吸着薬投与は、**DMD** の補完治療法として十分実現可能であると考ええる。

	低リン食	通常リン食	高リン食
筋変性領域	↓	—	↑
炎症性(M1)マクロファージ	—	—	↑
抗炎症性(M2)マクロファージ	↑	—	↓
異所的石灰化	↓	—	↑
筋再生能	—	—	—
自発的運動量	—	—	↓

表4 リン摂取が mdx マウスの骨格筋に与える影響のまとめ

リン過剰摂取によって mdx マウスの骨格筋症状が重篤化することが明らかとなった。一方で、リン摂取制限をするとこれらの症状は改善した。

通常リン食 mdx マウスの結果を基準として(—)で示し、重篤化した結果を(↑)、改善した結果を(↓)で示した。

研究 2：リン摂取による筋ジストロフィーの骨代謝への影響

概要と目的

骨密度低下による骨折は DMD 患者にとって最も頻度が高く、QOL を低下させる要因である (Pouwels et al., 2014)。DMD は骨に直接的な病気が存在するわけではなく (少なくともジストロフィン欠損とは関係しない)、病気が進行する上で骨格筋が萎縮し、運動量が低下することが骨への負荷を減少させる。骨は成長期に活発に作られ、20 歳代で骨量はある程度一定になる。DMD 患者の多くは、成長期に自力歩行ができなくなり、車椅子等の装具が必要となる。そのため、最も骨が成長する時期に骨へのストレスが低下することで骨変形や骨折のリスクが高くなる。また、骨折しやすい部位としては上腕骨と大腿骨の頻度が高いが、これら主要な部位が骨折することは患者の QOL を大きく低下させる。さらに多くの DMD 男児は骨格筋保護や筋量維持のためグルココルチコイドを服用している (Houde et al., 2008)。長期にわたるステロイド治療は副作用として骨密度の減少や骨折のリスクが増加する。そのため、カルシウムやビタミン D のサプリメントによる介入がなされている (Bianchi et al., 2011)。車椅子による移動が必要となった患者や、寝たきりの患者では骨変性が顕著になり脊柱側弯症の手術が必要となる場合が多いが、手術は患者への負担も大きいため (Cheuk et al., 2013)、骨格筋保護と同時に、骨への介入も非常に重要となる。

正常対照マウスと比較し *mdx* マウスは運動量と筋力が有意に減少することが報告されており (Hayes and Williams, 1996; Landisch et al., 2008; Mangner et al., 2012; van Putten et al., 2012)、骨密度の低下も認められ、脛骨の骨強度や骨形態が正常対照マウスのものと比較し有意に低下している (Novotny et al., 2011; Rufo et al., 2011)。また、*mdx* マウスは実験的に骨折させた後の骨再生が遅れること、そしてその原因に骨折部位に異常なマク

ロファージの浸潤が認められたことが報告されている (Abou-Khalil et al., 2014)。Mdx マウスは筋変性が顕著なため血中 IL-6 値が有意に高く、慢性的に炎症が亢進しており、骨折部位でも骨形成遅延に影響したと考えられる (Rufo et al., 2011)。

一方で mdx マウスは非常に高い筋再生能を有するため、体重や筋重量の極端な減少は認められず、DMD 患者と比較すると骨密度の低下や骨折のリスクは少ないと考えられる (Novotny et al., 2011)。

骨は骨格を形成し、カルシウムを貯蔵する役割を担うため、成長期後に骨量がピークを迎えた後も、その後骨形態や骨密度維持のため活発な代謝が行われる。骨代謝 (骨リモデリング) は骨吸収と骨形成によって巧妙に制御されており、破骨細胞により古い骨が破壊され、骨芽細胞による骨形成によって新生される (Raisz, 1999)。運動不足や加齢、偏食さらに病気や薬の副作用などにより骨吸収と骨形成のバランスが崩れ、骨としての機能が低下することが分かっている。対照的に運動やバランスの良い食事摂取は、骨形成を増加させ、高齢者においても骨密度低下を抑制する。臨床や基礎研究において、骨代謝を評価する指標に骨吸収マーカーと骨形成マーカーが使用される。代表的な骨吸収マーカーとしては、骨コラーゲンが分解して生じるペプチド結合架橋体 (carboxy-terminal collagen crosslinks, CTx, amino-terminal collagen crosslinks, NTx) があり、骨形成マーカーとしては骨芽細胞由来の酵素 (bone specific alkaline phosphatase, BAP or BALP, osteocalcin, OCN) が用いられる。

近年、臨床研究においてリン過剰摂取は男女ともに骨代謝を低下させることが報告されている (Calvo and Tucker, 2013; Calvo and Uribarri, 2013)。特に健康な 20 歳代の女性に短期間、リン含有量の異なる食事を摂取させ骨代謝を測定した実験では、リン含有量が増加するにつれて骨吸収マーカー (NTx) が増加し、骨形成マーカー (BAP) が低下した (Karp et al., 2007)。また、実験動物を用いた研究においても同様に、リン過剰摂取によって骨格形成不良や骨密度と骨強度の低下が報告されている (Huttunen et al., 2006;

Huttunen et al., 2007; Lau et al., 2013)。

結果

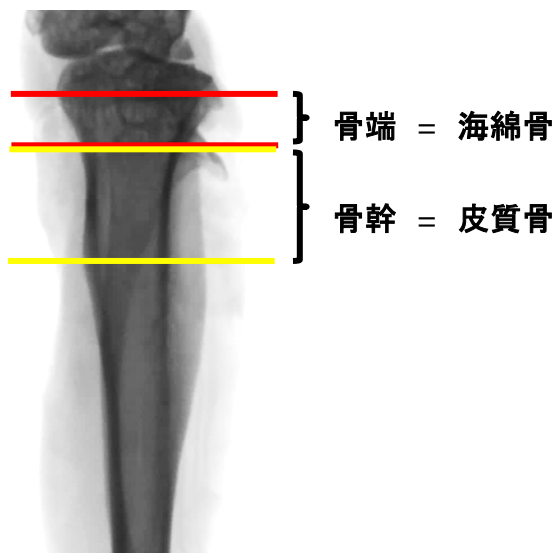
***Mdx* マウスにおける骨密度の低下と骨代謝異常（正常対照マウスとの比較）**

本研究では、リン過剰摂取が正常対照マウスと *mdx* マウス脛骨の海綿骨と皮質骨（図 16）の BMD と骨形態さらに骨代謝マーカーの変化に与える影響を検討した。なお、本研究で用いた正常対照マウスと *mdx* マウスはリン食摂取量に依存せず、体重に差はなかったことから、マウス個体の大きさは考慮しなかった。

通常リン食を摂取した正常対照マウスと比較した場合、*mdx* マウス脛骨の海綿骨 BMD ($p < 0.000008$) と皮質骨 BMD ($p < 0.00005$) は有意に低下した（表 2, 表 3）。*Mdx* マウス脛骨の海綿骨と皮質骨 BMD を評価した先行研究は複数あるものの、結果は一致ではない（Anderson et al., 1993; Novotny et al., 2011; Rufo et al., 2011）。その理由としてマウスの週齢の違い、*mdx* マウスの系統（B10 または B6 マウスのバックグラウンド）の違い、さらに評価する脛骨の領域の違いが考えられる。Novotny らの研究では、本研究とほぼ同様の 12 週齢 *mdx* マウスと正常対照 (B10) マウスの脛骨 BMD を測定しており、結果は一致した（Novotny et al., 2014）。DMD 患者では、筋変性に伴う筋再生能が追い付かず若齢から骨格筋量が低下し、運動量も制限されることから BMD の低下が著しい。しかし、*mdx* マウスは筋変性が顕著なものの、非常に高い筋再生能を有する上、体重量も正常対照マウスと変わらないことから、BMD の低下率は骨部位によっても異なると考えられる（Novotny et al., 2011）。

骨形態計測では、通常リン食 *mdx* マウス脛骨の海綿骨における骨量、骨体積、骨梁幅、骨梁間隔が有意に低下し、骨表面積/体積比と骨パターンファクターが有意に増加

A



B

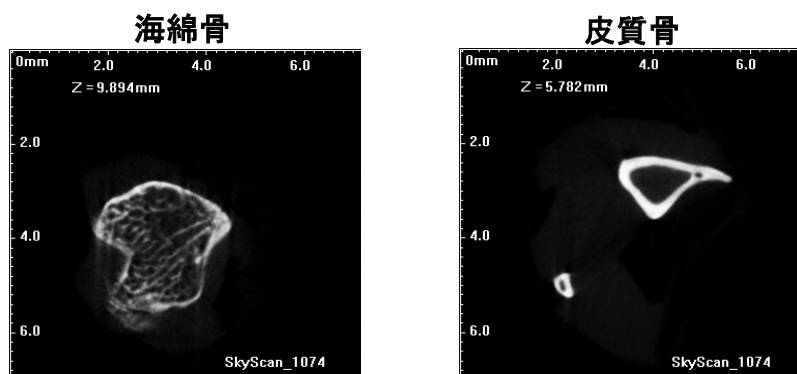


図16 X線μCTスキャナーを用いたマウス脛骨の骨密度と骨形態解析

- (A) マウス脛骨の透過像を示した。骨密度(BMD)の解析領域は、脛骨遠位骨幹端から下へ連続30スライス(海綿骨)と、そのさらに下へ連続100スライス(皮質骨)を対象とした。骨形態解析領域は脛骨遠位骨幹端から下へ連続100スライス(海綿骨)とさらに下へ連続50スライス(皮質骨)を対象とした。
- (B) マウス脛骨の海綿骨と皮質骨のX線画像を示した。画像中の灰色の部分には骨格筋である。

海綿骨

	低リン食正常対照	通常リン食正常対照	高リン食正常対照	低リン食 mdx	通常リン食 mdx	高リン食 mdx
骨密度 (g/cm^3)	0.28±0.01	0.26±0.01	0.24±0.03	0.24±0.01	0.23±0.01	0.18±0.01
骨量 (%)	12.00±0.58	11.26±0.87	10.04±1.32	10.60±0.91	9.63±0.90	7.41±1.08
総体積 (mm^3)	2.69±0.16	2.73±0.17	2.56±0.35	2.81±0.11	2.61±0.24	2.59±0.17
骨体積 (mm^3)	0.016±0.001	0.015±0.002	0.013±0.002	0.016±0.001	0.013±0.002	0.011±0.001
骨表面積 (mm^2)	15.74±1.48	15.42±1.77	13.00±1.93	15.77±1.19	13.45±1.72	11.37±1.44
骨表面積/体積比 (mm^{-1})	0.049±0.002	0.050±0.002	0.051±0.004	0.053±0.003	0.054±0.003	0.060±0.006
骨表面密度 (mm^{-1})	0.006±0.000	0.006±0.000	0.005±0.001	0.006±0.000	0.005±0.000	0.004±0.001
骨梁幅 (mm)	85.34±2.87	84.87±3.47	82.39±4.19	78.35±3.41	77.23±2.68	71.08±3.00
骨梁間隔 (mm)	584.01±79.45	557.29±38.84	459.04±74.17	440.79±33.13	431.97±55.32	420.43±52.54
骨梁数 (mm^{-1})	0.0014±0.0001	0.0013±0.0001	0.0012±0.0002	0.0014±0.0001	0.0012±0.0001	0.0009±0.0002
骨パターンファクター (mm^{-1})	0.012±0.001	0.014±0.001	0.018±0.002	0.016±0.001	0.018±0.002	0.022±0.002

皮質骨

骨密度 (g/cm^3)	0.909±0.017	0.909±0.008	0.887±0.013	0.886±0.014	0.874±0.009	0.857±0.012
骨量 (%)	44.967±1.167	44.203±1.512	43.128±1.175	42.488±0.862	42.128±1.291	38.850±1.501
全骨断面領域 (mm^2)	0.892±0.050	0.861±0.054	0.817±0.082	0.828±0.041	0.785±0.049	0.730±0.038
断面幅 (μm)	164.21±7.96	160.84±6.77	150.45±9.59	149.45±5.46	144.57±4.62	132.92±4.31
皮質骨断面領域 (mm^2)	1.98±0.12	1.95±0.14	1.89±0.17	1.95±0.09	1.86±0.08	1.88±0.12
皮質骨外膜面 (mm)	6.93±0.16	6.79±0.27	6.78±0.42	7.10±0.21	7.00±0.25	6.93±0.23
骨髓腔領域 (mm^2)	1.09±0.08	1.09±0.10	1.07±0.09	1.12±0.06	1.08±0.04	1.15±0.09
皮質骨内外膜面 (mm)	10.86±0.37	10.70±0.34	10.85±0.60	11.08±0.35	10.85±0.44	10.99±0.25
皮質骨内膜面 (mm)	3.93±0.23	3.91±0.09	4.07±0.20	3.98±0.15	3.85±0.23	4.05±0.19

表2 リン食を摂取した正常対照マウスと mdx マウス脛骨の骨密度と骨形態計測

ホルマリン固定したマウス脛骨をX線μCTスキャナー (Skyscan 1074) で連続水平断面画像を撮影した。取得した画像は専用の再構成ソフトウェア (NRecon) で3次元構築した。再構築後の画像は画像解析ソフトウェア (CT-An) を用い、海綿骨と皮質骨の骨密度と骨形態評価に使用した。

正常対照マウス vs *mdx*マウス

正常対照マウス

*mdx*マウス

	LP	NP	HP	LP vs NP	LP vs HP	NP vs HP	LP vs NP	LP vs HP	NP vs HP
海綿骨									
骨密度 (g/cm ³)	***	***	**	ns	**	ns	*	***	***
骨量 (%)	**	**	**	ns	*	ns	ns	***	**
総体積 (mm ³)	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns
骨体積 (mm ³)	ns	*	*	ns	*	ns	ns	***	*
骨表面積 (mm ²)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	***	ns
骨表面積/体積比 (mm ⁻¹)	**	*	*	ns	ns	ns	ns	*	ns
骨表面密度 (mm ⁻¹)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns
骨梁幅 (mm)	***	**	**	ns	ns	ns	ns	**	*
骨梁間隔 (mm)	***	**	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns
骨梁数 (mm ⁻¹)	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	***	**
骨パターンファクター (mm ⁻¹)	***	***	**	ns	***	*	ns	***	**
皮質骨									
骨密度 (g/cm ³)	*	***	**	ns	*	*	ns	**	ns
骨量 (%)	**	*	***	ns	ns	ns	ns	***	**
全骨断面領域 (mm ²)	*	*	*	ns	ns	ns	ns	**	ns
断面幅 (mm)	**	***	**	ns	*	ns	ns	***	**
皮質骨断面領域 (mm ²)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
皮質骨外膜面 (mm)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
骨髓腔領域 (mm ²)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
皮質骨内外膜面 (mm)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
皮質骨内膜面 (mm)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

表3 リン食を摂取した正常対照マウスと*mdx*マウス脛骨の骨密度と骨形態計測

マウス脛骨の海綿骨と皮質骨の骨密度と骨形態計測を行った結果 (表2) を、検定 (正常対照マウスと*mdx*マウス) とTukeyの多重比較検定 (低リン食、通常リン食、高リン食) を用いて比較した。なお、有意差なしはns (non significance) で表記した。

低リン食群をLP (low phosphorus)、通常リン食群をNP (normal phosphorus)、高リン食群をHP (high phosphorus) で略した。誤差範囲は標準偏差で示した。* p < 0.05、** p < 0.01、*** p < 0.001

した（表 2, 表 3）。骨パターンファクターの増加はすなわち凸構造が増加していることを示している。皮質骨においては骨量と全骨断面領域、断面幅が有意に低下した。骨密度や骨形態計測の結果から、90 日齢 *mdx* マウスは特に脛骨の海綿骨密度低下が顕著であることが明らかとなった。*Mdx* マウスにおける海面骨密度の低下は海綿骨量（骨体積）の低下に伴い、骨の網目構造である骨梁が減少したことによると考えられる。これは、骨粗鬆症の典型的な特徴であり、代謝が盛んな海綿骨が大きく影響を受けたと言える（表 2, 表 3）。

骨代謝に關与する骨吸収マーカー（CTx）と骨形成マーカー（BALP）の測定では、通常リン食摂取の正常対照マウスと比較して *mdx* マウスの血中 BALP 濃度に差は認められなかったが、血中 CTx 濃度が有意に増加した（表 5）。これは骨密度低下を支持する結果であり、先行研究においても *mdx* マウスは血中 CTx 濃度が有意に増加していることを報告している（Rufo et al., 2011）。すなわち、成獣 *mdx* マウスは正常対照マウスと比較し、骨吸収が亢進し骨密度が低下していると言える。

また、高リン食摂取群の比較では、*mdx* マウスにおいて骨密度が有意に低下し（海綿骨 BMD $p < 0.005$ 、皮質骨 BMD $p < 0.005$ ）、骨形態計測の結果も通常リン食群間の比較と同様であった（表 2, 表 3）。骨代謝については、血中 CTx 濃度に有意差はなかったが、血中 BALP 値が有意に低下した。低リン食摂取群の比較でも *mdx* マウスの骨密度は有意に低下し（海綿骨 BMD $p < 0.0007$ 、皮質骨 BMD $p < 0.04$ ）、骨形態計測も他の群とほぼ同様の結果であった（表 2, 表 3）。しかし、骨代謝測定では、低リン食正常対照マウスと比較して血中 BALP 濃度と CTx 濃度に有意な差は認められなかった（表 5）。

同様のリン食を摂取した正常対照マウスと *mdx* マウスの比較では、*mdx* マウスは脛骨の骨密度が有意に低下しており、骨吸収が亢進していることが分かった。これらの結果から、正常対照マウスと比較すると *mdx* マウスは筋変性と運動量低下によって骨へのストレスが減少していることが骨密度低下の大きな要因だと考えられる。

BALP (mg/ml)	低リン食	通常リン食	高リン食	検定
正常対照マウス	1500.2±265.7	1499.0±119.7	1464.3±259.6	
<i>mdx</i> マウス	1531.9±434.5	1300.5±287.8	1104.9±174.2	高リン食群間 (**)
CTx (mg/ml)	低リン食	通常リン食	高リン食	検定
正常対照マウス	25.6±7.0	19.3±6.6	21.0±3.3	
<i>mdx</i> マウス	26.9±5.2	26.2±2.6	26.7±13.9	通常リン食群間 (*)

表5 血中骨形成マーカー(BALP)と骨吸収マーカー(CTx)の比較

ELISA法を用いてリン食を摂取した正常対照マウスと*mdx*マウスの血中BALPとCTx値を示した。通常リン食*mdx*マウスは骨吸収が有意に増加した。また、高リン食*mdx*マウスは骨形成が有意に低下した。

誤差範囲は標準偏差で示した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$

高リン食摂取による骨密度と骨代謝低下（リン食群間の比較）

次に同系マウスのリン食摂取 3 群間（低リン食、通常リン食、高リン食）において BMD と骨形態、骨代謝の比較を行い、リン摂取の影響について検討した。前述したように、高リン食摂取によりヒトや実験動物の骨代謝低下が報告されている。また、慢性腎不全モデルマウスでは高リン食摂取によって体重の減少や骨密度の大幅な低下が認められる（Lau et al., 2013）。

正常対照マウスは、高リン食摂取によって海面骨の骨密度が有意に低下し（対低リン食群 $p < 0.009$ ）、皮質骨の骨密度も低下した（対低リン食群 $p < 0.03$ 、対通常リン食群 $p < 0.03$ ）（表 2, 表 3）。高リン食群の海面骨形態計測では、低リン食群と比較し、骨密度、総体積、骨体積、骨梁間隔、骨梁数が有意に低下し、骨パターンファクターは低リン食群と通常リン食群と比較して有意に増加した（表 2, 表 3）。高リン食群の皮質骨形態計測については、断面幅のみ有意に低下した（対低リン食群）。この結果、先行研究と同様に正常対照マウスにおいてリン食摂取増加により骨密度や骨形態の低下が明らかとなった。骨代謝マーカーを測定した結果、正常対照マウスではリン食群で血中 BALP 濃度と CTx 濃度に有意な差は認められなかった（表 5）。尚、低リン食摂取による骨密度や骨形態への影響は認められなかった。

一方、*mdx* マウスは高リン食摂取によって他のリン食摂取群と比較し、海綿骨の骨密度が大幅に低下し（対低リン食群 $p < 0.0001$ 、対通常リン食群 $p < 0.0001$ ）、皮質骨の骨密度も低下した（対低リン食群 $p < 0.005$ ）（表 2, 表 3）。骨形態計測においては、高リン食群の海綿骨は、低リン食群と比較してほとんど全てのパラメータ（総体積と骨梁間隔以外）が、通常リン食群と比較しても同様のパラメータ（総体積と骨梁間隔、骨表面比/体積比、骨表面密度以外）が有意に低下した。また皮質骨においては、骨密度、全骨断面領域、断面幅が有意に低下した。骨代謝マーカーの比較では、血中 CTx 濃度

に差はなかったが、高リン食摂取により血中 BALP 濃度は低下傾向にあった ($p < 0.07$) (表 5)。すなわち、*mdx* マウスは骨吸収が高値であるにも関わらず、高リン食摂取によって骨形成が低下する傾向にあり骨代謝のバランスが崩れ、結果的に骨密度の大幅な減少につながった。主な原因として、運動量の著しい低下が考えられる。自発的運動量測定では、高リン食摂取によって *mdx* マウスの 1 日平均運動量が有意に低下した (図 11 A)。筋張力や運動量が有意に低下している *mdx* マウスは正常対照マウスに比べて、高リン食摂取によってさらに悪化したと言える。そのため、骨芽細胞への機械的ストレスが生じず、骨形成が低下したと考えられる。すなわち、*mdx* マウスは高リン食摂取によって骨の新陳代謝が低下して起こる低回転性骨粗鬆症になることが明らかとなった。

低リン食摂取による *mdx* マウスの骨密度と骨代謝の改善

高リン食摂取による *mdx* マウス骨密度ならびに骨代謝 (骨形成) 低下が明らかとなった一方、低リン食により *mdx* マウス脛骨の海綿骨密度は通常リン食摂取 *mdx* マウスと比較しても有意に増加した。さらに形態計測パラメータでは海綿骨の骨表面積が有意に増加し、骨形成マーカーも増加傾向にあることから、低リン食摂取によって骨密度や骨代謝は改善する可能性が示唆された。先行研究では、腫瘍性石灰沈着症のモデルマウスにおいて低リン食摂取 (0.1%または 0.3%) により大腿骨 BMD が改善したことを報告している (Ichikawa et al., 2011)。

本研究で用いた低リン食は魚粉や脱脂粉乳を主成分にし、リン含有量は通常リン食に含まれるリン (1.0 g/100 g) の 70%で作成した。過度なリン摂取制限は骨形成を阻害するが、本実験に用いたように通常の 70%ほどのリン摂取であれば、*mdx* マウスの骨代謝異常に対し有効な治療法になることを示唆した。一方、マウスの飼育に必要な食餌中リン最少量は 0.3 g/100 g である (National Research Council, 1995)。実際に先行研究では、

他の疾患モデルマウスを用いて、リン含有量が 0.1%や 0.3%程度の食餌で実験を行っている。成獣の実験動物では、体重減少などの副作用も認められないことから (Ichikawa et al., 2011)、さらに低濃度のリン摂取による *mdx* マウスの骨密度や骨代謝への効果も期待できる。

研究 2 のまとめ

本研究では、正常対照マウスと *mdx* マウスの骨密度と骨代謝の比較を行い、さらに同系マウス間におけるリン食摂取の影響を検討した。これまでに報告があるように、正常対照マウスに比べ *mdx* マウスの骨密度は有意に低下し、さらに海綿骨と皮質骨の骨形態計測においても骨密度低下を明らかにした。また、骨形成マーカーに差はないものの、骨吸収マーカーは有意に増加していた。若齢 (4 週齢) *mdx* マウスは筋変性が特に顕著であり、同じ週齢の正常対照マウスと比較すると骨密度や皮質骨の厚みも有意に低下している。さらに骨の多孔性は増しており、筋変性増加に伴う廃用性オステオペニアであると報告されている (Anderson et al., 1993)。*Mdx* マウスは慢性的に筋変性と筋再生を繰り返しており、筋張力や運動量が顕著に低下している。そのため正常対照マウスよりも骨への負荷がかからず、骨リモデリングのアンバランスが生じた結果、骨密度が低下すると考えられる。

正常対照マウスにおいて高リン食摂取は骨密度や骨形態の低下に寄与することや、特に海綿骨が影響を受けやすいことが分かった。*Mdx* マウスは高リン食摂取によって海綿骨の骨密度や多くの骨形態パラメータが有意に低下した。さらに皮質骨についても高リン食摂取により骨密度等が有意に低下した。骨代謝については、*mdx* マウスは正常対照マウスと比較して骨吸収が高いが、高リン食摂取により骨形成が低下傾向にあることが明らかとなった。自発的運動量の低下を考慮すると、高リン食 *mdx* マウスは運動量低

下により骨芽細胞への機械的ストレスが減ったことが骨密度の大幅な減少につながったのだと考えられる。すなわち、高リン食摂取によって正常対照マウスの骨密度は低下するが、もともと骨密度が低下している *mdx* マウスにおいては、骨症状をさらに重篤化させ、低回転性骨粗鬆症に陥ると考えられる。

研究 3：筋ジストロフィーのリン代謝と腎機能について

概要と目的

私はこれまでの研究において、リン過剰摂取による筋ジストロフィー症状の重篤化を明らかにし、さらに低リン食摂取による筋ジストロフィー症状の改善を報告した。研究 3 では正常対照マウスと *mdx* マウスのリン代謝と腎機能を比較し、未だ明らかにされていない *mdx* マウスの腎機能について詳細に検討するとともに、高リン食摂取による筋ジストロフィー症状の重篤化との関係性を検証することを目的とした。

DMD の腎機能については未だ不明な点が多い。近年、DMD は呼吸管理技術の進歩や心筋保護治療などで平均寿命は延びている。松村らは、刀根山病院（大阪）で 286 名の DMD 患者を対象に実施した調査結果から、今後平均寿命が 40 歳前後まで延びると推測している（Matsumura et al., 2011）。しかし、二次性肺障害や合併症が増加していることや、心機能が比較的保たれた状態でも腎不全で亡くなった患者が 6 名（平均寿命 37.3 歳）いたことを報告している。DMD は骨格筋変性に伴い骨格筋量が低下することから、一般的に臨床で腎機能評価に用いられるクレアチニンでは正確な値を求めることが困難である。そこで、骨格筋量の影響を受けない腎機能マーカーである cystatin C を用いて DMD 患者の腎機能評価を行った結果、加齢に伴い cystatin C の平均値が増加すること、さらに 30 歳以上の患者の 30% でその濃度が高値であったことを報告している（Matsumura et al., 2012）。

Mdx マウスの腎機能について詳細に検討した研究はない。これまでの報告では、血中リン酸濃度が有意に高いことや、尿酸値が高く腎臓重量が低下しており腎機能障害があると推測されている（Brazeau et al., 1992; Kikkawa et al., 2009）。一方で、腎臓に全長ジストロフィンが発現しておらず、ユートロフィンやジストロフィン関連タンパク質

(dystrophin-related proteins, DPR) は正常対照マウスと *mdx* マウスで発現に差はない (Haenggi et al., 2005; Haenggi and Fritschy, 2006; Jarad et al., 2011)。一方、腎機能の指標である cystatin C や血中尿素窒素 (BUN) さらにリン代謝に関与するタンパク質を調べた報告はない。

リン代謝については慢性腎不全 (CKD) を中心に研究が進展しており、近年リン代謝の主要な臓器である腎臓に加え、骨から分泌される FGF-23 と副甲状腺から分泌される PTH の役割が明らかになっている。さらに腎臓内でも、遠位尿細管でリン排泄を行う *klotho* や近位尿細管でリンの再吸収を担う NaPi 2a と NaPi 2c の存在が報告され、リン代謝の詳細なメカニズムが明らかとされつつある (図 17)。FGF-23 は骨細胞によって産生される液性因子であり、NaPi 2a と NaPi 2c の発現を低下させることでリン利尿を促進させ (Gattineni et al., 2009)、腎臓での活性型ビタミン D 産生を抑制する働きを持つ (Quarles, 2012)。さらに FGF-23 は腎臓内で *klotho* と共同して FGF 受容体を介し、リンの排出を担うことが明らかとなった (Kuro-o, 2010)。PTH は血中カルシウム濃度の低下に対して副甲状腺の上皮小体から分泌され、腎臓では FGF-23 と同様に近位尿細管でのリン利尿を促進する (Lanske and Razzaque, 2014)。また、骨では破骨細胞を活性化させて骨吸収を促進し、血中カルシウム濃度を一定に保つ役割を持つ。CKD などの腎機能障害や摂取するリン濃度が高い場合では、腎機能が低下することで尿中へのリン排出が低下し、体内にリンが蓄積するため血中リン酸濃度が上昇する (Razzaque, 2013)。この時、FGF-23 や PTH の合成・分泌によりリン利尿が亢進するが、病気が進行すると FGF-23 や PTH によるリン利尿が限界に達し、高リン血症や二次的副甲状腺ホルモン亢進症を発症するリスクが高まる。

腎機能低下が骨格筋変性や異所的石灰化に与える影響を検討するため、正常対照マウスに通常リン食または高リン食を与え、腹腔内にシスプラチンを投与して腎機能障害を引き起こした (Singh et al., 2012)。シスプラチンはヒトの肺がんや前立腺ガンなどに用

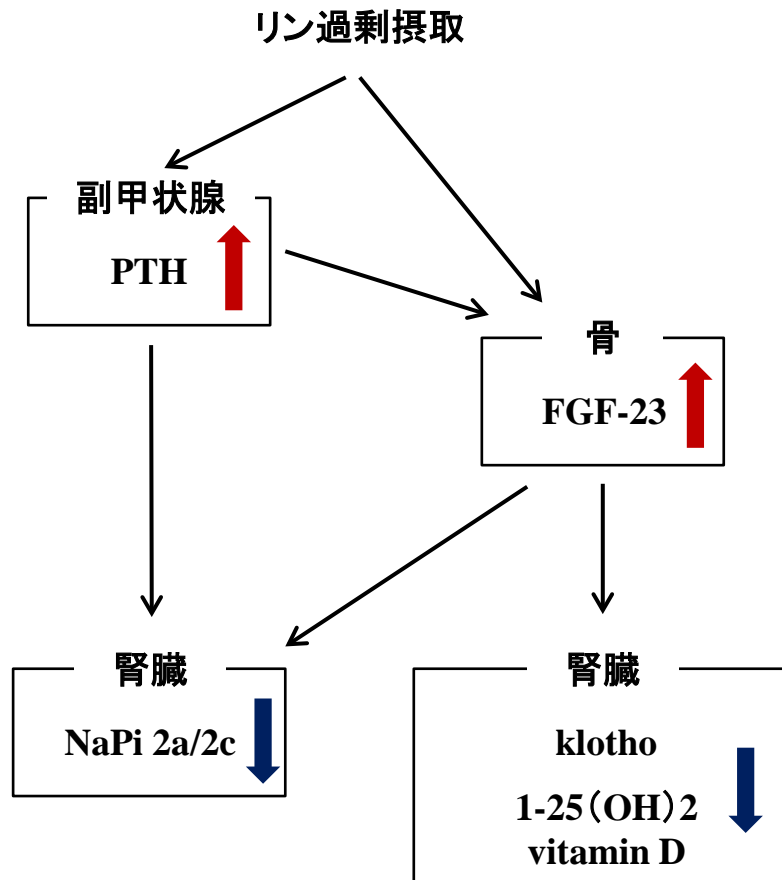


図17 リン過剰摂取によるリン代謝因子の変動

高リン食摂取により、血中リン酸濃度を調整するホルモンであるPTHとFGF-23の分泌が亢進する。これらの作用によって、腎臓内klotho, NaPi 2aと2cさらに活性型ビタミンD(1-25 (OH)2vitamin D)が低下する。

いられていたが、副作用として強い腎障害が認められたため、現在では使用が制限されている抗がん剤である。シスプラチンによる腎毒性の詳細なメカニズムは明らかとなっていないが、DNA 障害や活性酸素種の増加、アポトーシスが関与している報告がある (Gong et al., 1999; Okamura et al., 2004)。さらに酸化ストレスによる炎症の拡大も関与している可能性もある (Mishima et al., 2006)。

結果

高リン食摂取による *mdx* マウスのリン代謝異常

リン過剰摂取が正常対照マウスと *mdx* マウスのリン代謝へ及ぼす影響を調べるため、血清と血漿さらに 24 時間蓄尿サンプルを用いた。血中 IP 濃度は、正常対照マウスと同様に *mdx* マウスでもリン摂取量が増えるにつれ増加傾向にあったが、特に高リン食摂取 *mdx* マウスは同リン食摂取の正常対照マウスや低リン食摂取 *mdx* マウスと比較して有意に増加した (表 6)。血中 Ca 濃度は正常対照マウスではリン摂取量が増えるにつれ有意に減少したものの、*mdx* マウスの減少率に差はなかった (表 6)。血中 IP と Ca は、腎機能が正常であれば一定に保たれるため、*mdx* マウスは腎機能に何らかの障害があることが示唆された。また、リン摂取量に関係なく *mdx* マウスは血中 Ca 濃度が有意に増加していたため、高カルシウム血症を併発していることが分かった。

通常リン食摂取 *mdx* マウスの血中 FGF-23 濃度は、正常対照マウスと比較し有意に増加した (表 6)。先行研究では 60 日齢の *mdx* マウスと正常対照マウスの FGF-23 濃度を比較しているが、*mdx* マウスの FGF-23 値はすでに有意に増加していた (Kikkawa et al., 2009)。また、高リン食摂取によって正常対照マウスも *mdx* マウスと同様に血中 FGF-23 濃度が増加した。さらに血中 PTH 濃度は、通常リン食摂取 *mdx* マウスで同リン食摂取

	Ca (mg/dL)	IP (mg/dL)	PTH (pg/ml)	FGF-23 (pg/ml)	Urinary IP (mg/dL)
低リン食 正常対照	11.4±0.7	12.1±0.8	45.6±9.2	144.5±26.9	149.8±50.9
通常リン食 正常対照	11.1±0.8	12.3±1.0	42.5±11.1	164.6±25.4	210.8±91.1
高リン食 正常対照	10.7±0.7	12.7±1.2	69.3±27.0	513.3±135.2	542.3±328.9
低リン食 <i>mdx</i>	11.9±0.6	12.3±0.9	57.4±25.5	129.6±16.9	150.3±37.6
通常リン食 <i>mdx</i>	11.7±1.0	12.9±1.1	75.5±28.1	192.9±9.3	338.6±237.6
高リン食 <i>mdx</i>	11.5±0.7	13.8±1.6	184.3±76.4	572.5±100.3	493.7±232.8

表6 リン食摂取正常対照マウスと*mdx*マウスの血中Ca、IP、PTH、FGF-23、尿中IP濃度の比較
リン食を摂取した90日齢正常対照マウスと*mdx*マウスの血清と血漿サンプルを用いて、血中Ca、IP、PTH、FGF-23濃度を測定した。さらに24時間蓄尿したサンプルを用いて尿中IP濃度を測定した。
以下にt検定とTukeyの多重比較検定の結果をまとめる。

Ca = 低リン食群 正常対照 vs *mdx* (*), 通常リン食群 正常対照 vs *mdx* (*),
高リン食群 正常対照 vs *mdx* (***), 正常対照 低リン食 vs 高リン食 (**)

IP = 高リン食群 正常対照 vs *mdx* (*), *mdx* 低リン食 vs 高リン食 (**)

PTH = 通常リン食群 正常対照 vs *mdx* (*), 高リン食群 正常対照 vs *mdx* (**),
mdx 低リン食 vs 高リン食 (***), *mdx* 通常リン食 vs 高リン食 (**)

FGF-23 = 正常対照 低リン食, 通常リン食 vs 高リン食 (***), *mdx* 低リン食,
通常リン食 vs 高リン食 (***), 通常リン食群 正常対照 vs *mdx* (*)

Urinary IP = 正常対照 低リン食, 通常リン食 vs 高リン食 (*), *mdx* 低リン食 vs 高リン食 (*)

誤差範囲は標準偏差で示した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$

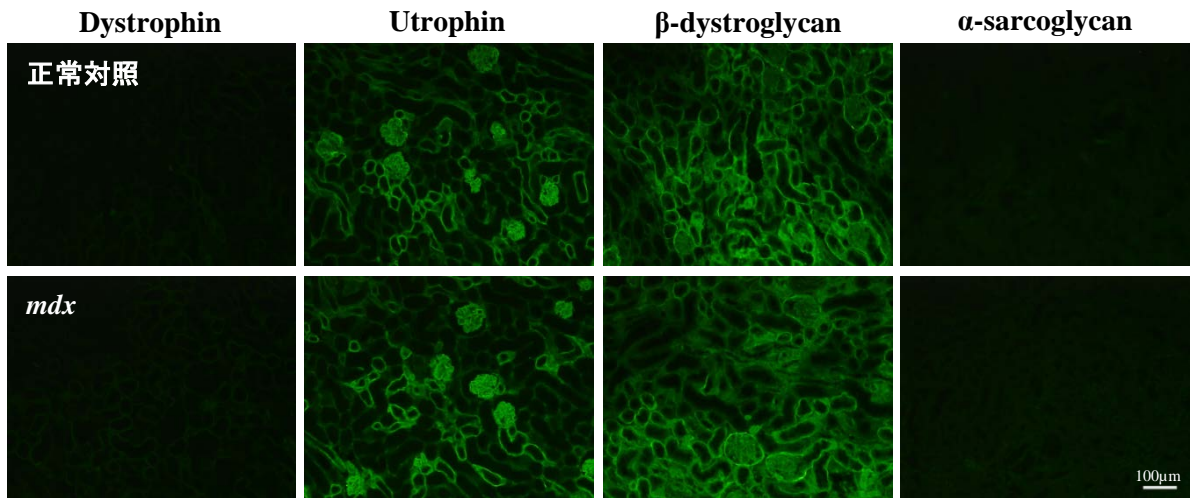
正常対照マウスに比べ有意に増加しており、高リン食負荷によってその差はさらに拡大した（表 6）。すなわち、*mdx* マウスは FGF-23 と PTH が有意に増加しているが、高リン食摂取によって正常対照マウスと同様にそれらの値が増加したことから、FGF-23 や PTH の反応性に問題がないことが分かった。尿中 IP 排出については両マウスともリン摂取量が増えるにつれ増加したため、*mdx* マウスはリン排出能に問題がないことが明らかとなった（表 6）。

腎臓はリン代謝を担う最も重要な臓器だが、正常対照マウスと *mdx* マウスの腎臓における膜タンパクを比較した結果、全長 dystrophin と α -sarcoglycan (DPR) は発現しておらず、utrophin と β -dystroglycan (DPR) は同様に発現した（図 18 A）。さらにリン食摂取の正常対照マウスと *mdx* マウスの腎臓を H&E 染色で観察した結果、どちらのマウスも高リン食群のみに腎盂に異所的石灰化を確認した（図 18 B）。これらの結果から、*mdx* マウスは腎臓の構造的な異常がないことが明らかとなった。

次に腎臓で発現するリン代謝因子である遠位尿細管 *klotho* と近位尿細管 NaPi 2a と NaPi 2c を調べた。先行研究において *klotho* (Lau et al., 2012) や NaPi 2a、NaPi 2c はリン負荷により発現量が低下することが報告されている (Segawa et al., 2009; Bourgeois et al., 2013)。凍結切片を用いた組織免疫染色とウエスタンブロットによる解析では、正常対照マウスならびに *mdx* マウスにおいて、リン摂取量に伴い *klotho* (図 19 A, B) と NaPi 2a、NaPi 2c の発現量は低下した（図 20 A-D）。*Mdx* マウスと正常対照マウス間では、これらのタンパク質発現量に差は認められなかった。

以上の結果において、FGF-23 や PTH は通常リン食 *mdx* マウスで正常対照マウスよりも有意に増加しているにも関わらず、*klotho* と NaPi 2a、NaPi 2c の発現量に差はなかった。本来、FGF-23 が亢進すると、直接腎臓に働きかけリンの再吸収を抑制する。そのため、血中 FGF-23 の増加により NaPi 2a と NaPi 2c の発現量は低下する (Gattineni et al., 2009)。また、遠位尿細管での *klotho* 発現量も低下していないことから、FGF-23 抵抗性

A



B

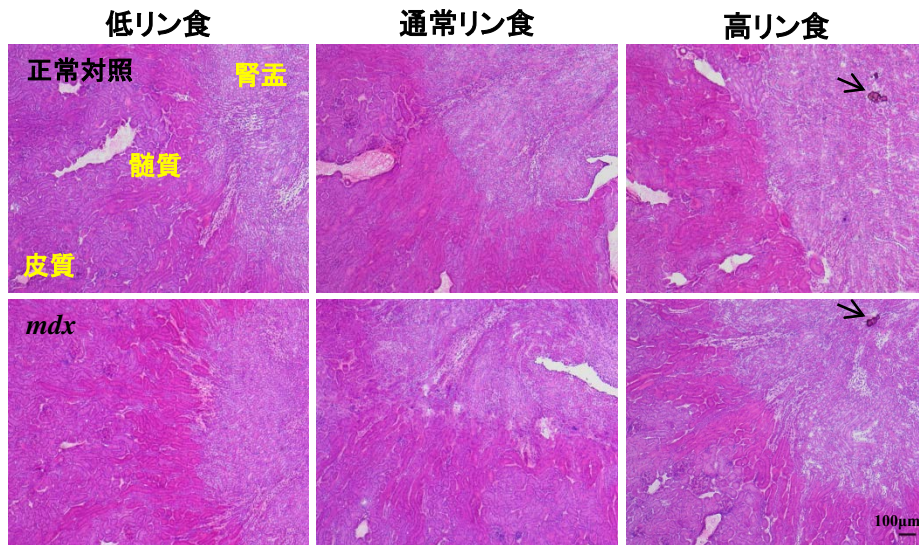
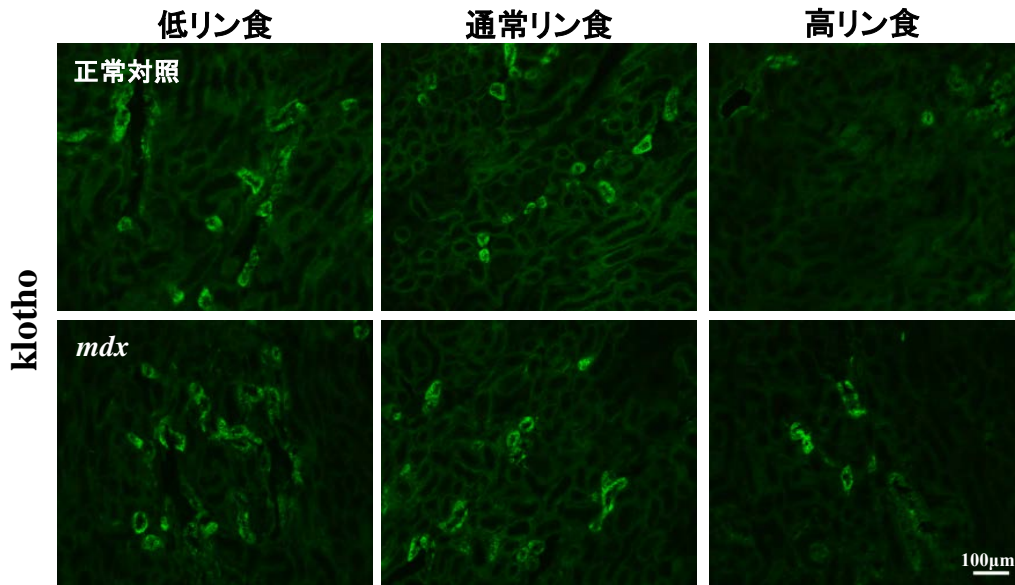


図18 腎臓におけるDPRの発現とリン食摂取による腎臓内異所的石灰化の比較

- (A) 正常対照マウスと*mdx*マウスの腎臓を摘出し、凍結切片を作成した。Dystrophinとutrophin、さらにDPRである β -dystroglycanと α -sarcoglycanの発現を観察した。これらのタンパク質の発現パターンは正常対照マウスと*mdx*マウスで変わらなかった。
- (B) リン食摂取した正常対照マウスと*mdx*マウス腎臓の凍結切片を作成し、H&E染色をした。高リン食摂取により、正常対照マウスと*mdx*マウスの腎盂に異所的石灰化(矢印)を確認した。

A



B

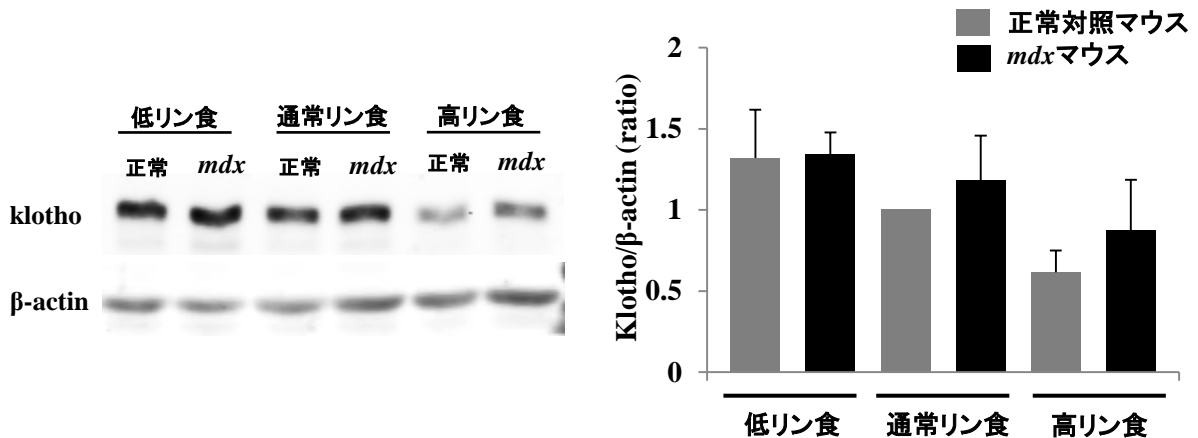


図19 リン摂取による腎臓・遠位尿細管でのklotho発現の変化

- (A) マウスの腎臓を摘出し、凍結切片を作成した。抗klotho抗体を用いて組織内の発現を確認した。正常対照マウスとmdxマウスはリン摂取量が増加するにつれklothoの発現が低下した。
- (B) 腎臓のタンパク抽出を行い、20μgのサンプルをSDS-PAGEで分離し、抗klotho抗体を用いて発現量の定量を行った。内部標準としてβ-actinを検出した。右のグラフは、klothoのシグナル強度をβ-actinのシグナル強度で標準化した値を示した。通常リン食正常対照マウスの値を1として正常対照マウスとmdxマウスともに、リン摂取量が増加するにつれklotho発現量が低下した。通常リン食正常対照マウスの値を1としてグラフ化した。誤差範囲は標準偏差で示した。

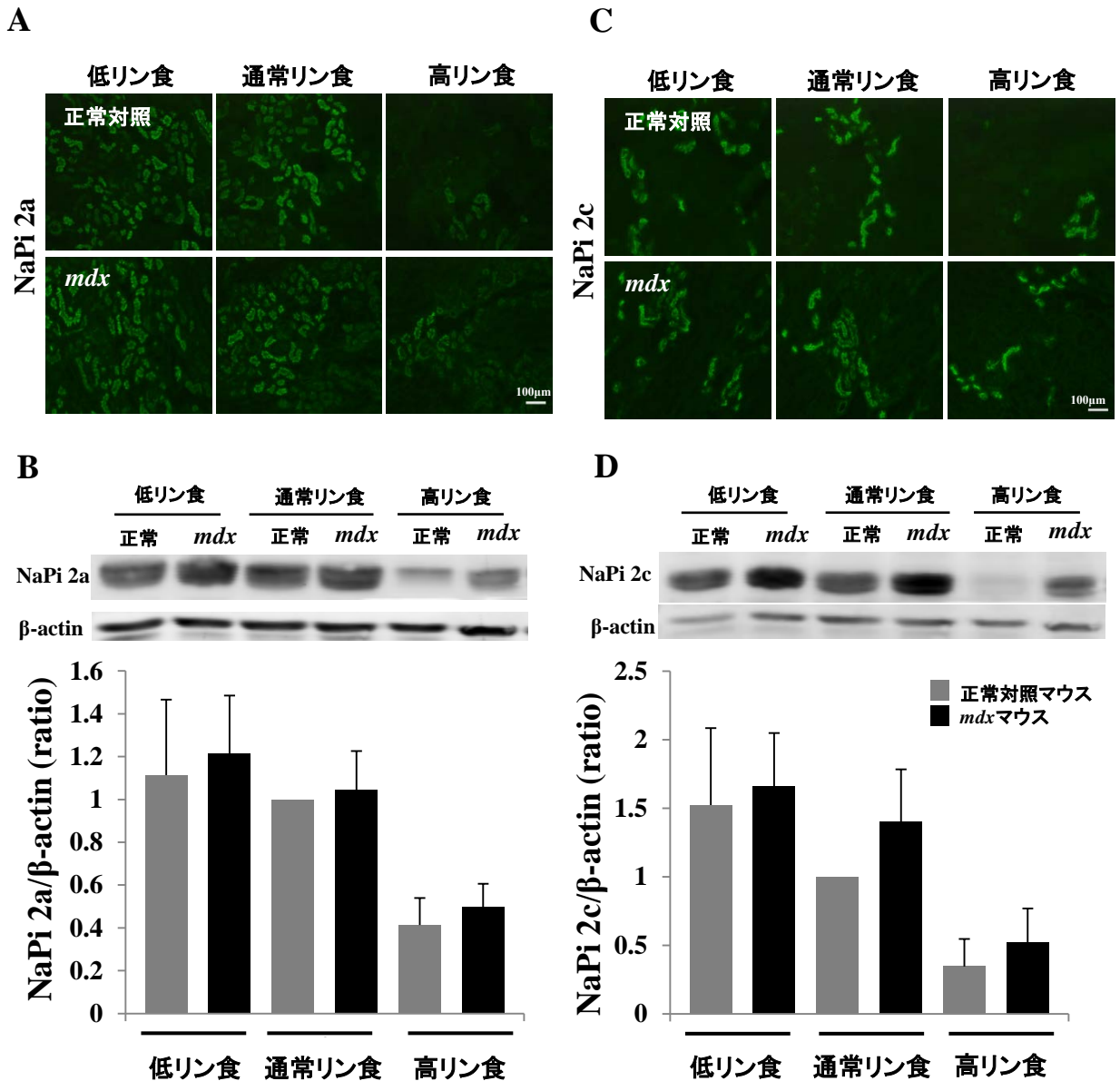


図20 リン摂取による腎臓・近位尿細管でのNaPi 2aとNaPi 2c発現の変化

- (A) 抗NaPi 2a抗体を用いて腎臓内NaPi 2aの発現を確認した。
- (B) 腎臓からBBMVのタンパク抽出を行い、20 μ gのサンプルをSDS-PAGEで分離し、抗NaPi 2a抗体を用いて腎臓内の発現量を定量した。内部標準として β -actinを検出した。右のグラフは、NaPi 2aのシグナル強度を β -actinのシグナル強度で標準化した値を示した。
- (C) 同様に腎臓組織内NaPi 2cの発現を確認した。
- (D) ウェスタンブロット法を用いNaPi 2cの定量を行った。
- 通常リン食正常対照マウスの値を1としてグラフ化した。誤差範囲は標準偏差で示した。

が考えられる。その原因として、*mdx* マウスは腎機能が低下しているため FGF-23 が腎臓で機能しにくいことが挙げられる。その一方で、遠位尿細管で *klotho* と FGF-23 が共役する際に必要な FGF 受容体(fibroblast growth factor receptor, FGFR)の発現が異常である可能性もある。その役割を担う FGFR1c の発現については検討が必要だが、FGFR1 のノックアウトマウスは胎生致死であるため (yamaguchi et al., 1994)、*mdx* マウスの腎臓内 FGFR1c の発現に問題がある可能性は低いと考えられる。

すなわち、*mdx* マウスの腎臓内リン代謝 (*klotho* と NaPi 2a、NaPi 2c) の発現や機能は正常対照マウスと差はなく、さらに PTH や FGF-23 の反応性や尿へのリン排出機能も正常に働いていた。すなわち高リン食摂取により *mdx* マウスの血中 IP 濃度が有意に増加したのは、*mdx* マウスは腎機能が低下しており、リン過剰摂取に対してリン排出が追いつけなかったことが原因であると考えられる。

動物実験において腎機能を測定する際にクレアチニークリアランス (creatinine clearance, Ccr) が用いられることが多い。Ccr は血清中と尿中のクレアチニン濃度を比較することで、腎糸球体による老廃物の排泄力を測定することで腎機能を評価する。しかし、クレアチニン濃度は骨格筋量に影響されるため DMD 患者では低値になる。*Mdx* マウスでは骨格筋壊死が認められるが、骨格筋重量は正常対照マウスと同等か比較的重いことが知られている。そのため、*mdx* マウスの腎機能を測定する指標としてクレアチニンを用いることは不適切だといえる。*Mdx* マウスは正常対照マウスと比較して、血中クレアチニン濃度やクレアチニークリアランスに差は認められなかった (表 6)。そこで *mdx* マウスの腎機能評価においても DMD 患者で用いられる血中 cystatin C 濃度測定を使用した。

その結果、リン摂取量に関わらず *mdx* マウスは cystatin C 濃度が有意に増加しており、腎機能が低下したことが分かった (図 21 A)。低リン食摂取によって腎機能は改善傾向にあった (低リン食摂取正常対照マウスと比較して $p < 0.05$)。一方、高リン食摂取 *mdx*

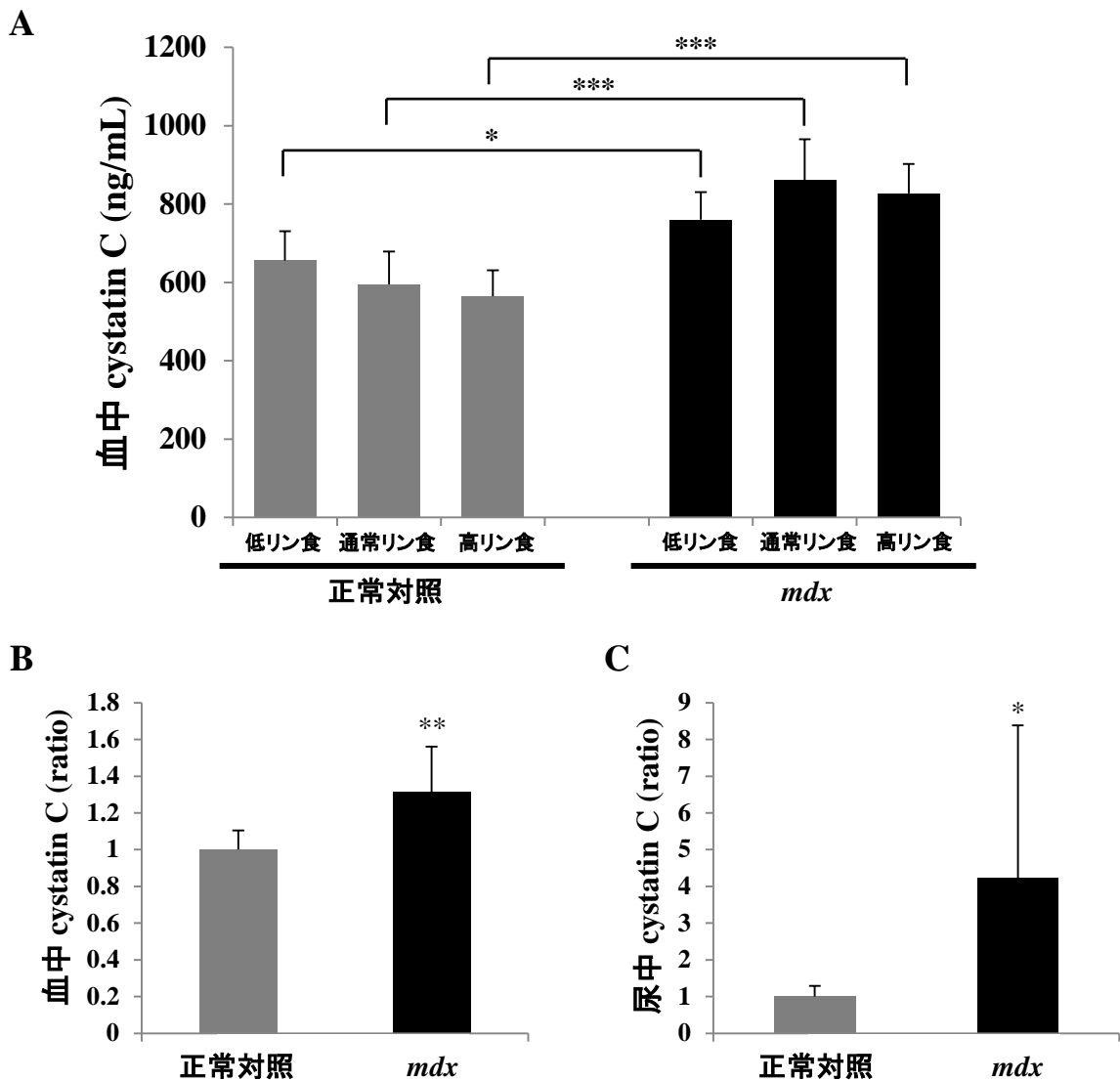


図21 正常対照マウスと*mdx*マウスの血中と尿中cystatin C濃度測定

- (A) リン食摂取した90日齢正常対照マウスと*mdx*マウスの血液(血清)を用い、cystatin C濃度をELISA法で測定した。同じリン食を摂取した正常対照マウスと比較して、*mdx*マウスは血中cystatin C濃度が有意に増加していたことから、腎機能が低下していることが明らかとなった。
- (B) 通常食(CE-2)を与えた90日齢正常対照マウスと*mdx*マウスの血中cystatin C濃度を測定した結果を示した。リン食群と同様に、*mdx*マウスはcystatin C濃度が有意に増加した。正常対照マウスの値を1としてグラフ化した。
- (C) 代謝ケージを用い24時間蓄尿を行った通常食(CE-2)90日齢の正常対照マウスと*mdx*マウスの尿中cystatin C濃度を測定した。正常対照マウスの値を1としてグラフ化した。血中cystatin C濃度同様に、*mdx*マウスでは有意に増加した。

誤差範囲は標準偏差で示した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$

マウスでは cystatin C 濃度は増加しなかった。さらに正常対照マウスでもリン摂取量の増加は cystatin C 濃度に影響しなかった。今回の研究で高リン食摂取は腎機能低下に寄与しなかった理由として、特注リン食のリン含有量が考えられる。すなわち、高リン食 (2.0 g/100 g) は正常対照マウスと *mdx* マウスの腎機能をさらに悪化させるまでに至らなかった。高リン食摂取により *mdx* マウスの血中リン酸濃度は有意に増加したが、C 血中 cystatin C 濃度測定の結果から *mdx* マウスはもともと腎機能が低下しており、リン負荷により血中リン酸濃度が調整できなくなったと考えられる。

Mdx マウスの腎機能低下

これまでに、*mdx* マウスの腎機能が低下する理由について調べた報告はない。では、なぜ原因遺伝子とは直接関係のない腎機能が低下しているのだろうか。そこで、一般的に使用されている実験動物用食餌である CE-2 を摂取させた正常対照マウスと *mdx* マウスの腎代謝機能と腎機能の指標となる血中マーカー (cystatin C と血中 Ca、IP、BUN、UA) を測定した。血中と尿中 cystatin C 濃度を測定した結果では、*mdx* マウスは血中 cystatin C 濃度が有意に増加し (1.3 倍、 $p < 0.01$)、さらに尿中 cystatin C 濃度も有意に増加していた (4.2 倍、 $p < 0.05$)。これらの結果から、やはり *mdx* マウスは腎機能が低下していることが明らかとなった (図 21 B, C)。次に腎代謝機能を比較するため、実験小動物用 X 線 μ CT 装置 Latheta LCT-200 を用い腎臓による造影剤 (イオパミロン 300) の代謝速度をダイナミックスキャンで測定した (図 22 A)。麻酔下のマウスの尾静脈に 100 μ l の造影剤を注射し、CT 装置にセットした後、検体の同一断面 (L2 と L3 の間) を繰り返し断層撮影した (図 22 B, C)。撮影は造影剤注射後、約 1 分半の間に始まり、ほとんどの個体で撮影開始後に腎臓内の CT 値がピークを迎えた。*Mdx* マウスは、腎臓内 CT 値が同様なカーブを示しながらもピークを迎えるのが正常対照よりも遅く、測定した 4

匹中 3 匹は測定終了時の腎臓内の CT 値が高かった (図 22 D)。正常対照マウスは測定した 4 匹の CT 値が測定終了時には、同等の値まで低下した (図 22 D)。この結果から、*mdx* マウスは腎機能が低下しており、正常対照マウスに比べ腎臓での代謝速度が低下していることが示された。また血液生化学検査において、腎臓機能に関係する指標について調べたところ、*mdx* マウスの血中 Ca や BUN が有意に増加しており、血中 IP と尿酸においても高値を示した (表 6)。これらの結果からも、*mdx* マウスは腎機能が低下していることが明らかとなった。

Mdx マウスは高カルシウム血症による脱水が原因で腎機能低下に陥る

これまでの結果をもとに、*mdx* マウスが腎機能障害に陥る原因を調べた。まず、血中 Ca 濃度に着目した。*Mdx* マウスの血中 Ca 濃度は有意に高く、高カルシウム血症であることが明らかとなった (表 6, 表 7)。その主な原因は骨密度と関係していると考えられる。*Mdx* マウスは骨格筋が変性しており、さらに運動量が低下している。そのため骨へのストレスが少なく、不動により低回転性骨粗鬆症であると言える。そのことが大きな原因となり骨密度が低下し、その結果、体内の Ca 貯蔵庫である骨から Ca が溶け出したことで血中 Ca 濃度が有意に増加したと考えられる。

通常、高カルシウム血症に陥ると血中 Ca 濃度を正常に保つため、尿から Ca を排出する。そのため高カルシウム尿症となり、ナトリウムと水の再吸収が抑制されるため浸透圧利尿が起こり、尿量が増加する。さらに尿量の増加に伴い脱水症状が起こる。*Mdx* マウスの 1 日水分摂取量は約 7.5ml で、正常対照マウスと比較しても差はなかったが、24 時間蓄尿量を測定した結果では、尿量は有意に増加した (図 23 A)。さらにヘマトクリット値 (図 23 B) や血中 TP、ALB、BUN が有意に増加していたことから (表 7)、*mdx* マウスは脱水に陥っていることが明らかとなった。なお、*mdx* マウスのヘマトクリ

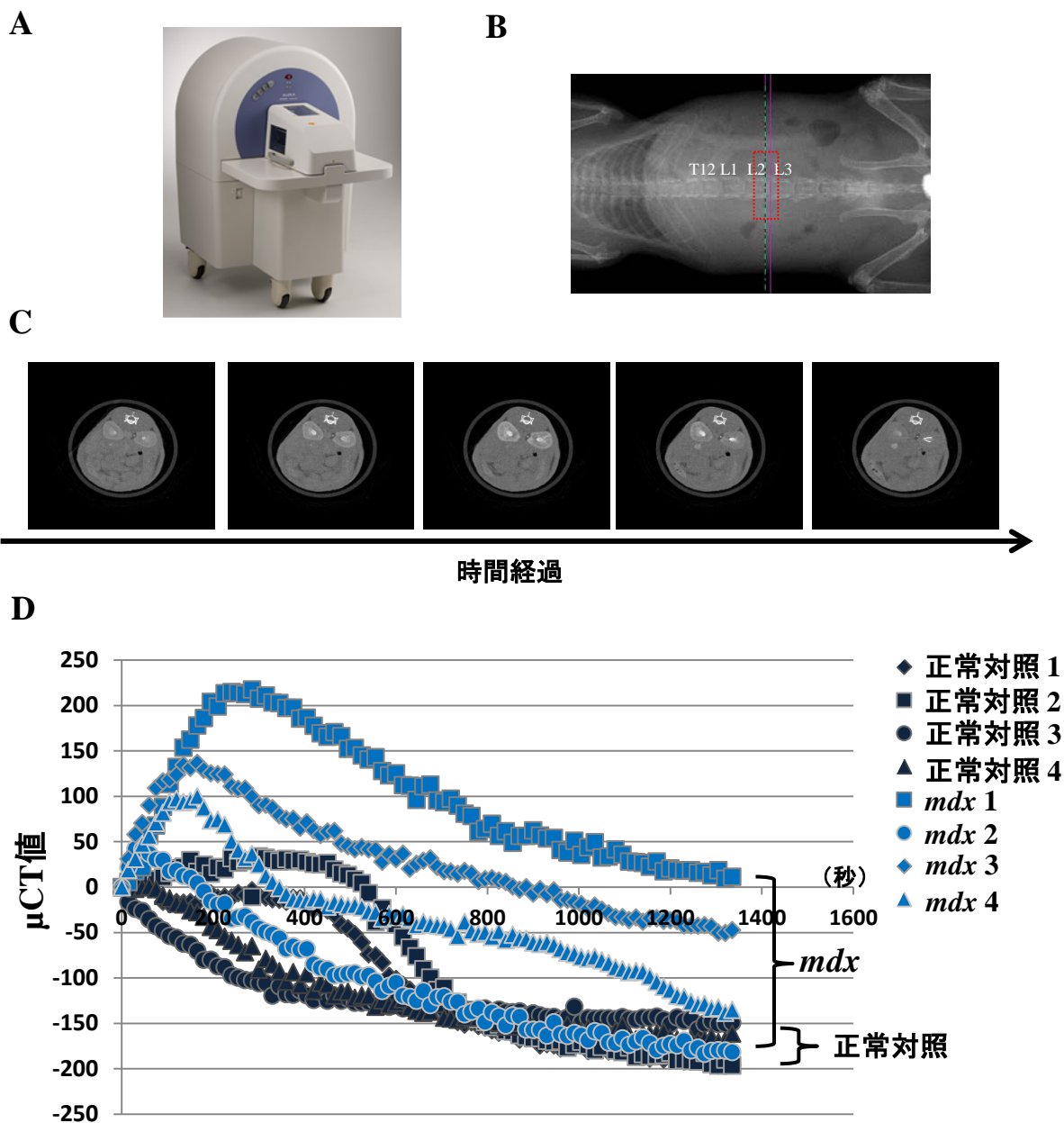


図22 X線μCTスキャンを用いた正常対照マウスと*mdx*マウスの腎代謝機能測定

(A) 実験小動物用X線μCTスキャナー、Latheta LCT-200。

(B) 麻酔下のマウスに100 μlの造影剤(イオパミオン)を尾静脈から注入し、腰椎L2とL3間を繰り返し断層撮影(ダイナミックスキャン)した。

(C) X線μCT画像による腎臓内の造影剤代謝を示した。中央部の左右が腎臓、上部が脊椎である。

(D) 15秒毎に90回撮影した腎臓内の平均CT値を経過時間とともにグラフ化して示した。同量の造影剤を同タイミングで投与したにも関わらず、*mdx*マウスは代謝能が低下していることが分かった。各群4匹を測定に用いた。誤差範囲は標準偏差で示した。

	正常対照	<i>mdx</i>	検定 (p)
TP (g/dL)	4.98 ± 0.20	5.51 ± 0.22	0.0001
ALB (g/dL)	3.10 ± 0.08	3.41 ± 0.17	0.0001
BUN (mg/dL)	26.83 ± 3.01	30.10 ± 3.29	0.03
UA (mg/dL)	4.94 ± 0.63	5.39 ± 0.53	0.12
Ca (mg/dL)	10.82 ± 0.49	12.23 ± 0.33	0.0001
IP (mg/dL)	12.11 ± 0.66	12.68 ± 0.87	0.12
T-CHO (mg/dL)	89.10 ± 9.22	107.30 ± 9.58	0.0004
CRE (mg/dL)	0.126 ± 0.020	0.132 ± 0.020	0.51
U-CRE (mg/dL)	14.04 ± 5.83	14.64 ± 2.88	0.78
Ccr	113.28 ± 49.27	112.79 ± 25.03	0.98

表7 正常対照マウスと*mdx*マウスの血中濃度測定

通常食(CE-2)を与えた90日齢の正常対照マウスと*mdx*マウスを安楽死させ、血液を採取した。化学自動分析装置を用いて血中TP（総タンパク）、ALB（アルブミン）、BUN（血中尿素窒素）、UA（尿酸）、Ca（カルシウム）、IP（無機リン）、T-CHO（総コレステロール）、CRE（クレアチニン）を測定した。さらに24時間蓄尿して採取した尿サンプルを用いてU-CREを測定した。Ccr（クレアチニンクリアランス）はU-CRE濃度を血中 CRE濃度で割り、その割合を比率で求めた。正常対照マウスと*mdx*マウスの値をt検定で統計的有意差を示した。

ット値については先行研究とも一致した (Mosqueira et al., 2013)。脱水が起こると、循環血流量の低下に伴い腎臓の血流量が低下するため、糸球体でろ過する血液量が減り、腎機能低下に陥ることが知られている。従って、*mdx* マウスの腎機能低下も高カルシウム血症による脱水が原因だと示唆した。X 線 μ CT スキャナーを用いた腎臓代謝機能の評価においても、*mdx* マウスは腎臓内造影剤 CT のピークが遅れる傾向にあり、血流が制限していると考えられる (図 22 D)。

腎機能不全と骨格筋内異所的石灰化の関係

近年、腎機能低下に伴う骨格筋量減少は慢性腎不全患者において QOL を低下させる合併症として報告されているが、基本的に腎不全による栄養障害や透析がアミノ酸を排出し筋タンパク質分解が亢進することで筋萎縮が起こると考えられている (Wang and Mitch, 2013)。また、腎機能が低下するとアンジオテンシンが増加することが知られているが、基礎研究においてはアンジオテンシン II が筋衛星細胞の増殖を抑制し、筋再生を遅延させることが報告されている (Yoshida et al., 2013)。しかし、腎機能不全と骨格筋萎縮や筋変性の関係については、未だ不明な点が多い。

そこで本研究では 10 mg/kg のシスプラチンを正常対照マウスに腹腔内投与して腎不全マウスを作製した。これまで報告されているように、シスプラチンを投与すると 72 時間後には血中 BUN が有意に増加していたため (Vaidya et al., 2006)、腎障害を誘発したことを確認した。シスプラチン投与日からマウスを通常リン食と高リン食群に分け、翌日に前脛骨筋に CTX を投与して骨格筋を損傷させた。7 日後に前脛骨筋を摘出し、凍結切片を作成して筋病理を観察した結果、腎不全マウスはリン摂取量に関係なく、骨格筋内に異所的石灰化が起こることが分かった (図 24)。これまでに私は、高リン食を摂取した正常対照マウスに CTX 投与で筋損傷を起こすと異所的石灰化が起こることを

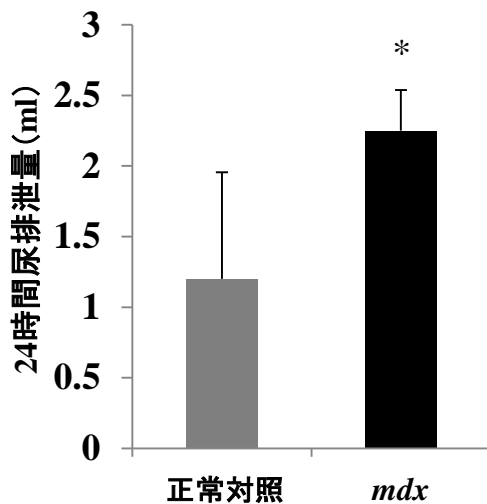
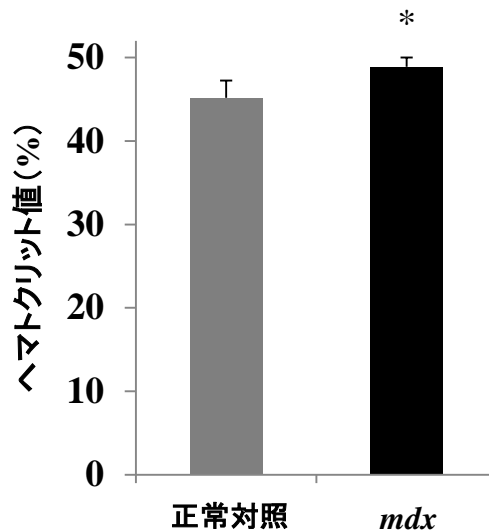
A**B**

図23 正常対照マウスと*mdx*マウスの24時間尿排泄量とヘマトクリット値の比較

- (A) 通常食(CE-2)を摂取した正常対照マウスと*mdx*マウスを代謝ケージ内で飼育し、24時間尿排泄量を測定した。*mdx*マウスは尿量が有意に増加した。
- (B) マウスをイソフルランで麻酔し、ヘパリンコートしたガラス毛细管で眼窩採血を行った。全量における血漿成分量と赤血球量を定量した。その結果、*Mdx*マウスはヘマトクリット値が有意に増加した。

誤差範囲は標準偏差で示した。* $p < 0.05$

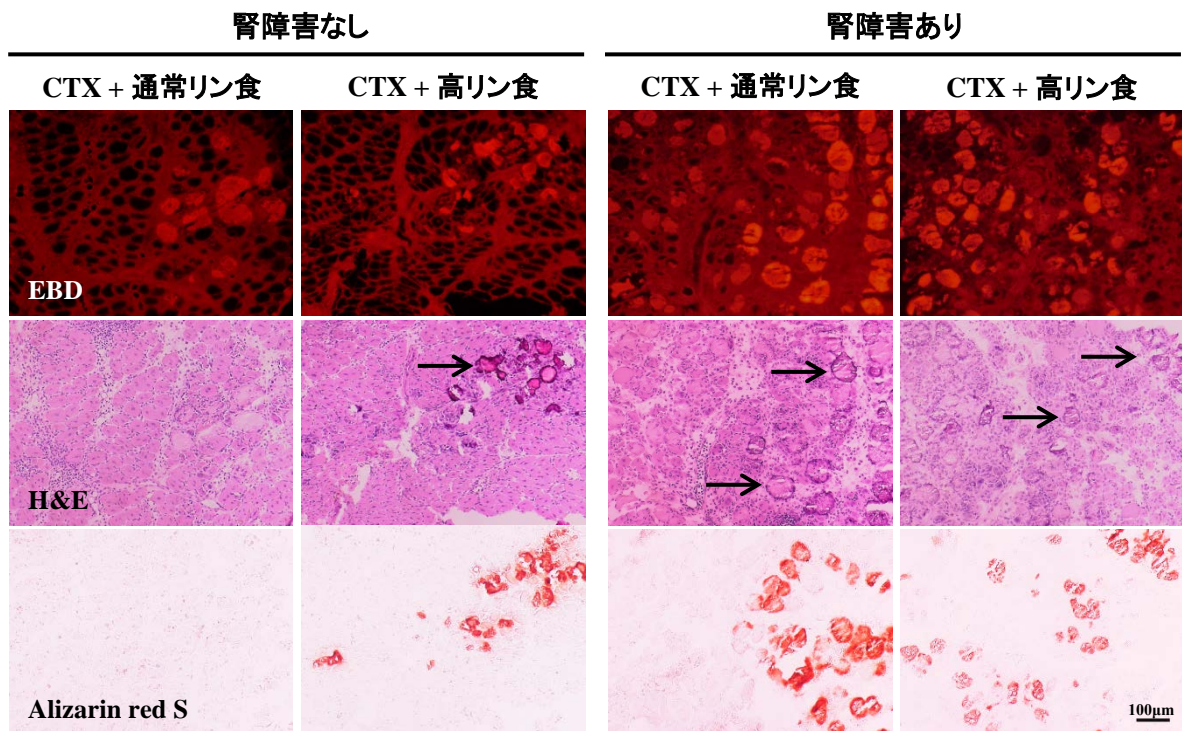


図24 腎障害と骨格筋変性に伴うリン酸カルシウムの沈着

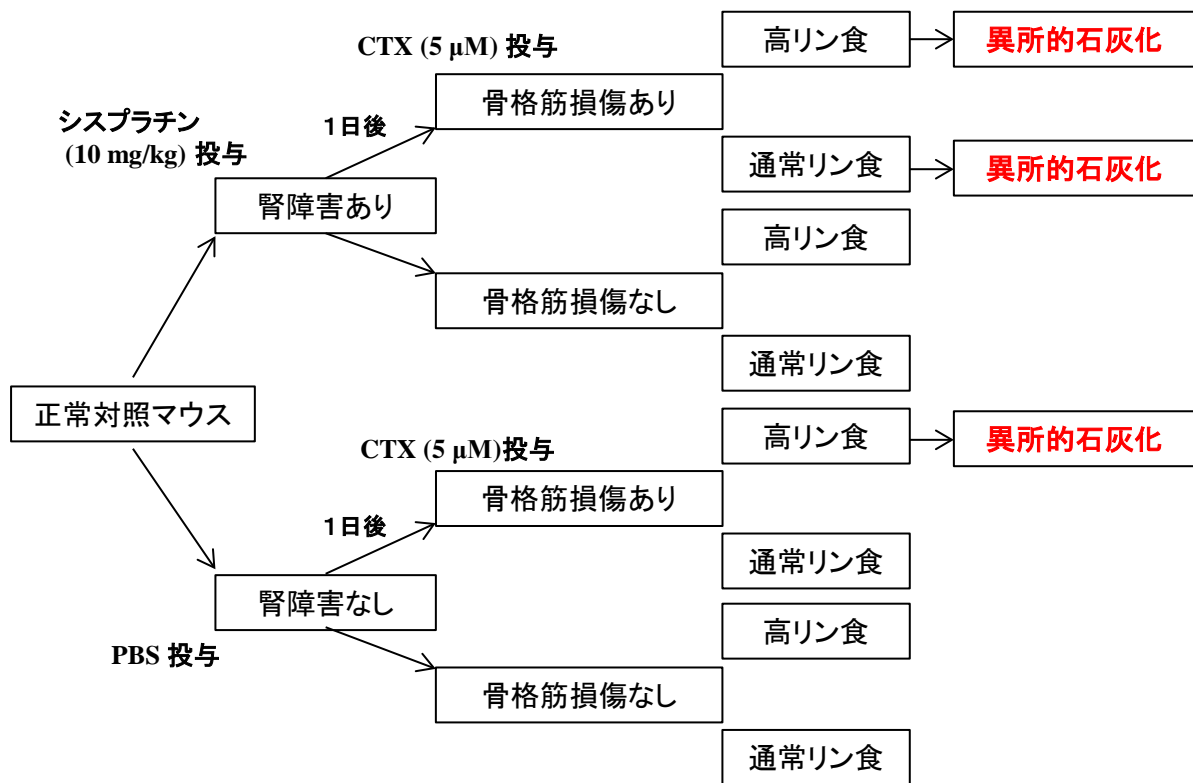
通常飼育した90日齢正常対照マウスに10 mg/kgシスプラチンを腹腔内投与し、腎不全を誘発した。シスプラチン投与日から通常リン食または高リン食を摂取させ、さらに1日後にマウスを麻酔下におき、前脛骨筋に5 μ M CTXを100 μ lのPBSに混合して注入した。腎障害のないコントロール群にはPBSを腹腔内投与し、その後、通常リン食または高リン食を摂取させ、腎不全群同様に前脛骨筋にCTXを投与し骨格筋を崩壊させた。7日後にマウスを安楽死させ前脛骨筋を摘出し、筋病理を観察した。なお、マウス前脛骨筋を摘出する1日前に1% EBDを体重10 gあたり100 μ l投与した。前脛骨筋は凍結切片を作成し、H&Eとalizarin red Sで染色した。

報告しているが、通常リン食では異所的石灰化は起こらなかった。腎機能障害を起こすことで、通常リン食摂取でも骨格筋内にリン酸カルシウムの沈着が確認できたことから、*mdx* マウスにおいて腎機能低下が骨格筋内異所的石灰化の増加に寄与していることが示唆される（図 25）。

研究 3 のまとめ

本研究では、これまで詳細な検討がされていなかった *mdx* マウスの腎機能とリン代謝機能を調べた。その結果、*mdx* マウスは腎機能不全であること、さらにその原因が高カルシウム血症による脱水であることを明らかにした。骨格筋崩壊が顕著な *mdx* マウスは、筋変性に伴い運動量の低下が顕著である。先行研究や研究 2 で明らかとなったように、*mdx* マウスは骨吸収が亢進し骨密度が低下した。骨密度低下の主たる原因は運動量低下であると考えられ、*mdx* マウスは不動症（immobilization）であると言える。さらに骨から Ca が漏れ出したため血中 Ca 濃度が有意に高く、高カルシウム血症に陥り、浸透圧利尿が起こることで尿量が有意に増加した。ヘマトクリット濃度測定の結果からも *mdx* マウスが脱水症状に陥っていたことは明確であり、*mdx* マウスの腎機能低下は脱水が一要因であると考えられる。

ヒトにおける高カルシウム血症による脱水の対処法としては、生理食塩水の点滴が一般的である。先行研究において 12% の NaCl を含有した食餌を与えた *mdx* マウスは初期の筋変性が有意に低下し、血中 CK 値も低下したことから NaCl による筋変性抑制効果が明らかとなっている（Yoshida et al., 2006）。今後、*mdx* マウスの骨格筋保護と高カルシウム血症による脱水の対処法として、生理食塩水の摂水または食塩を含有した食餌による効果の検証が期待される。



また、臨床において腎機能低下による骨格筋萎縮が知られている。本研究では腎機能低下が筋変性や異所的石灰化に影響を及ぼすかを検討した結果、シスプラチン腎毒性によって腎機能が低下した正常対照マウスにおいて、筋損傷後に異所的石灰化が起こることが明らかとなった。*Mdx* マウスは腎機能が低下しており、骨格筋内にリン酸カルシウムが沈着する原因に腎機能低下が寄与していると示唆された。腎機能低下が骨格筋損傷や再生に影響を及ぼすことから、Renal-skeletal muscle relationship (腎臓－骨格筋の関係) が今後の研究テーマとして発展することが大いに期待できる。

総括

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 QOL 向上にとって重要な役割を担う。未だ DMD の有効な治療法は確立されていないが、近年の医療の発展により DMD 患者の寿命が著しく延びている。一方で、幼児期からの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。しかしながら、これまでに DMD 症状に対する、ある特定の栄養素について調べた研究は少ない。そのため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。

そこで本研究では、現代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、モデル動物である *mdx* マウスを用いて検証した。リンは人体にとって必要不可欠な栄養素であるが、欧米化した食生活によって天然食品からの有機リン摂取量、さらに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増加しており、健康へ及ぼす悪影響が懸念されている。

これまでの研究成果として、リン過剰摂取が *mdx* マウスの骨格筋内異所的石灰化を増加させ、筋張力や運動量を有意に低下させることを報告した。本研究では、①*mdx* マウス骨格筋内異所的石灰化のメカニズムの解明、②リン過剰摂取が炎症性マクロファージを増加させ、*mdx* マウスの骨格筋変性を悪化させること、③運動量低下に伴い、骨代謝が低下し低回転性骨粗鬆症に陥ること、④これら DMD 症状が低リン食摂取によって改善すること、⑤腎機能が低下しているため、血中リン酸濃度が増加すること、⑥*mdx* マウスは低回転性骨粗鬆症のため高カルシウム血症なり、さらに脱水症状を併発することで腎機能が低下することを明らかにした（図 26）。さらに⑦腎機能障害を起こしたマウスでは CTX を用いて骨格筋壊死を誘発すると、異所的石灰化が起こる事を見出した。

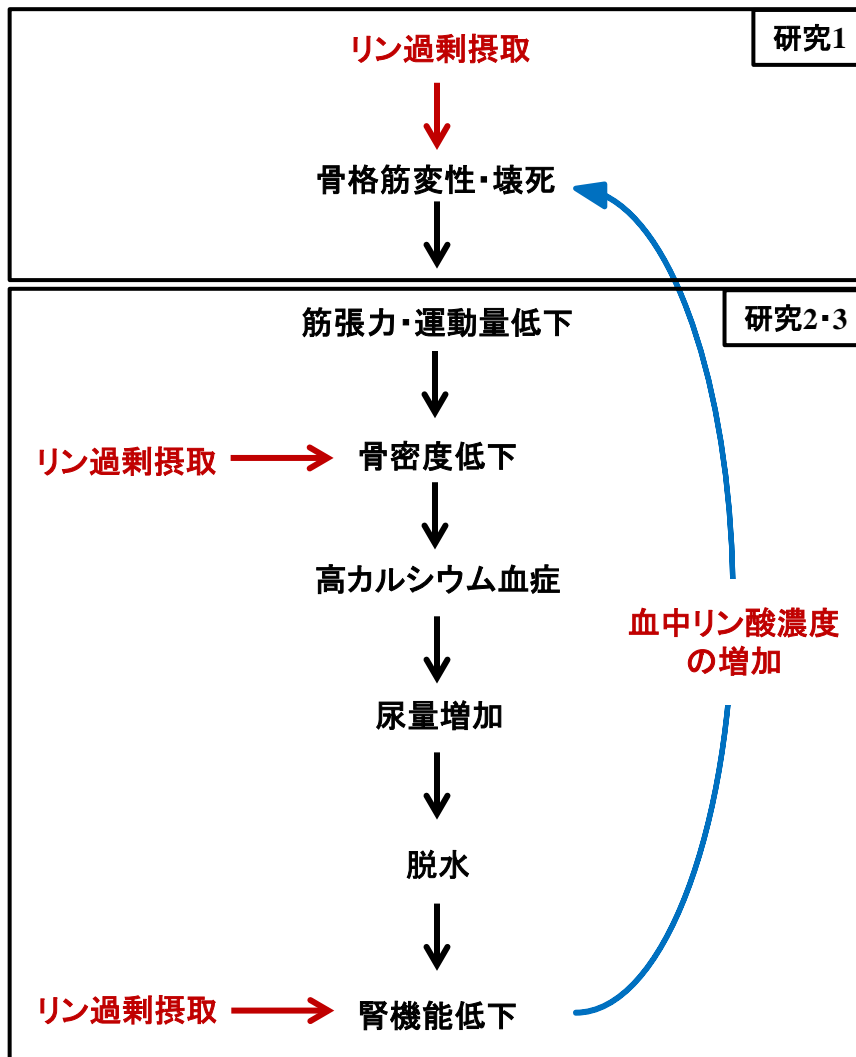


図26 リン過剰摂取による mdx マウスの筋ジストロフィー症状悪化のまとめと

腎臓－骨格筋における相互関係 (renal-skeletal muscle relationship) のモデル

リン過剰摂取は mdx マウスの骨格筋変性と異所的石灰化を悪化させ、筋張力や運動量をさらに低下させた。 Mdx マウスは骨密度が低下しているが、リン過剰摂取によってさらに悪化した。リン過剰摂取により mdx マウスのリン代謝異常を明らかにし、その原因が腎機能低下であることを突き止めた。さらに、腎機能低下は骨密度低下による高カルシウム血症が引き金となり、脱水症状を併発したことが一要因であると示唆された。

腎機能低下が骨格筋に与える影響は明らかになっていない。本研究では、その可能性についても検討した。青色の矢印で示すように、筋ジストロフィーのみならず腎不全患者においても骨格筋変性や筋萎縮が腎機能低下によって引き起こされることを示唆し、

Renal-skeletal muscle relationshipとして提唱する。

本研究は、DMD の補完治療法としてリン摂取制限の可能性を示唆し、DMD 患者や保護者にバランスの摂れた食事やエネルギー摂取は骨格筋保護に非常に重要であることを再認識してもらう“きっかけ”としても意義を持つ。

Mdx マウス骨格筋内異所的石灰化のメカニズムについて

骨格筋内異所的石灰化は *mdx* マウスの筋症状悪化の指標とされており、これまでに異所的石灰化がハイドロキシアパタイト（リン酸カルシウム）であることが報告されている（Kikkawa et al., 2009）。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。高リン食摂取によってリン酸カルシウムの沈着が増加することや、高リン食摂取で一度増加した石灰化はリン摂取を制限することで減少したことから、骨格筋内異所的石灰化は可塑性が高いことが示唆された。透過型電子顕微鏡による異所的石灰化メカニズムの解明では、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や筋小胞体といったカルシウムを多く含む器官に起こることが分かった。そのため巨大化した異所的石灰化を観察しても、ミトコンドリアの様な構造が無数に確認できた。しかし、それだけでは異所的石灰化は巨大化することはないと考えた。観察を続けた結果、筋変性部位周辺には多くのマクロファージが存在し、さらに変性した領域にも浸潤した。これら浸潤したマクロファージは変性タンパクを貪食しており、リン酸カルシウムが沈着した器官も同様に取り込んでいた。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や筋小胞体に初期のリン酸カルシウムが沈着し、それらを浸潤したマクロファージが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すことで、巨大化したリン酸カルシウムの沈着が起こることを明らかとした。

リン過剰摂取は骨格筋変性を悪化させる

高リン環境やリン過剰摂取は細胞毒性があり、“Phosphate toxicity”として報告されているが (Razzaque, 2011; Osuka and Razzaque, 2012)、リン過剰摂取が骨格筋変性に与える影響についてはよく分かっていない。本研究では、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の浸潤を有意に増加させることを明らかにした。さらに、実験に用いた 90 日齢 *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) の割合がほぼ等しいことが報告されている。研究で用いた通常リン食 *mdx* マウスでも同様の結果であったが、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低下した。このことから、リン過剰摂取による細胞毒性で筋変性が拡大し、炎症性マクロファージが増加した結果、慢性的な炎症が筋変性をさらに悪化したことを明らかにした。

リン過剰摂取は骨代謝を低下させ、骨密度を減少させる

Mdx マウスは骨格筋が崩壊と再生を繰り返しており、骨密度の低下の主な原因は、運動量が低下しているため骨へのストレスが減少していることであると考えられる。さらに先行研究では、骨吸収が有意に増加していることが報告されている (Rufo et al., 2011)。本研究によって、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 BMD と皮質骨 BMD が有意に低下していることを明らかにした。さらに骨形態においても同様に *mdx* マウスで有意に低下した。高リン食摂取 *mdx* マウスは低リン食や通常リン食 *mdx* マウスより運動量が有意に低下しており、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低回転性骨粗鬆症に陥ることが分かった。

一方、ヒトや実験動物においてリン過剰摂取は、血中リン酸濃度が増加することで血中 PTH が増加し、骨からカルシウムが溶け出して骨密度が低下することから、*mdx* マウスは運動量低下に加え、リン過剰摂取も骨密度低下に寄与したと言える。

さらに通常リン食 *mdx* マウスは血中 PTH と FGF-23 濃度が有意に増加していることを明らかにした。そのため血中リン酸濃度に差はなかったが、*mdx* マウスはリン代謝が亢進していると言える。また、高リン食摂取によって正常対照マウスの血中 PTH と FGF-23 濃度が有意に上昇し、リンを排泄するメカニズムが働いた。しかし、*mdx* マウスは高リン食によって血中 PTH や FGF-23 が有意に増加しているにも関わらず、血中リン酸濃度が有意に増加したことで高リン酸血症を引き起こした。尿中リン排泄能は正常対照マウスと *mdx* マウスで同様であり、リン摂取量増加に伴い尿中リン濃度が増加した。また、リン代謝因子である腎臓内 *klotho* と NaPi 2a, NaPi 2c の発現量は正常対照マウスと *mdx* マウスで同様であった。すなわち、*mdx* マウスはリン代謝を主に担う PTH や FGF-23、腎臓内 *klotho*, NaPi 2a, NaPi 2c の発現に異常がないことを明らかにした。

低リン食摂取により骨格筋変性や骨密度の低下は改善する

私はこれまでに低リン食（食餌 100 g 当たり 0.7 g リン）は、*mdx* マウスの異所的石灰化を軽減することを報告した。本研究では、低リン食摂取による骨格筋変性やマクロファージ浸潤、さらに骨代謝への影響を検討した。離乳後（20 日齢）からマウスに低リン食を摂取させたが、体重減少や骨格異常などの副作用は認められなかった。高リン食摂取により *mdx* マウスの筋ジストロフィー症状が悪化したが、対照的に低リン食摂取では、壊死筋線維領域は通常リン食群と変わらなかったが、マクロファージの表現型は、成熟マクロファージの浸潤領域のうち筋再生を助長する抗炎症性マクロファージの浸潤が占める割合が増加した。急性運動負荷を与えた *mdx* マウスの前脛骨筋を調べた

結果では、リン摂取を制限することで運動後でも抗炎症性マクロファージが有意に増加した。その結果、低リン食 *mdx* マウスは自発的運動による機械的ストレスを受けても、筋変性悪化が抑制された。筋変性に対するリン摂取制限の効果は、リン吸着薬である塩酸セベラマーを用いた実験でも証明した。リン吸着薬には様々な種類があり、今後、*mdx* マウスへの投与時期や投与量なども再度検討して、臨床応用に繋がるよう詳細な研究が期待される。

低リン食摂取 *mdx* マウスの骨密度や骨形態は、同じ食餌を摂取した正常対照マウスと比較すると有意に低下していたが、通常リン食 *mdx* マウスや高リン食 *mdx* マウスと比較すると改善することが分かった。さらに低リン食摂取によって、*mdx* マウスの骨代謝（骨形成と骨吸収）は正常対照マウスのものと同様にまで改善されたことから、リン摂取制限による骨格への効果が明らかとなった。DMD 患者は脊椎変形が顕著であるが *mdx* マウスでは認められない。しかし、ユートロフィン欠損した *mdx* マウスである *dKO* マウスは脊椎変形が顕著であり、寿命も短い（Deconinck et al., 1997）。今後、*dKO* マウス骨格筋や骨格変形さらに寿命に対して、低リン食摂取の有効性を検証することが期待される。

Mdx マウスは腎機能が低下している

腎臓はジストロフィンを発現していないことやジストロフィン関連膜タンパク質の発現パターン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。しかし、これまでの研究結果から *mdx* マウスは腎機能が低下していると示唆した。そこで、腎機能を測定するため骨格筋量に依存しない血中 cystatin C を用いて比較した結果、*mdx* マウスは 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分かった。低リン食群では cystatin C が減少傾向にあった

ものの、同リン食正常対照マウスの値までは回復しなかった。高リン食摂取によって cystatin C 濃度は変動しなかったが、これは本研究で用いたリン含有量では腎機能を低下するまでに至らなかったと考えられる。すなわち、リン含有量をさらに増加させた場合、正常対照マウスにおいても腎機能が低下すると示唆した。

本研究では主に特注飼料を用いて実験を行ったため、一般的に使用されているマウス食餌 CE-2 を摂取した正常対照マウスと *mdx* マウスの腎機能についても検討した。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ことから、腎機能が低下していることが支持された。さらに X 線 μ CT スキャナーを用いて腎機能測定を行った結果、*mdx* マウスは腎臓での造影剤代謝速度が低下していた。これらの結果、通常飼育の *mdx* マウスは正常対照マウスと比較して腎機能が低下していることが明らかとなった。

Mdx マウスの腎機能低下の原因について

本研究において、初めて *mdx* マウスの腎機能が低下していることが明らかとなった。そのメカニズムについて検討するため、正常対照マウスと *mdx* マウスの血液分析を行い、24 時間飲水量と尿量、ヘマトクリット値を測定した。その結果、*mdx* マウスは血中 TP, ALB, BUN, Ca, T-CHO が有意に増加しており、UA や IP も高値を示した。また、飲水量が変わらないにも関わらず尿量が有意に増加していた。ヘマトクリット値は *mdx* マウスで有意に増加しており、この結果は先行研究とも一致した。

これらの結果をまとめると、*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する。そのため血中 Ca 濃度が増加し、高カルシウム血症を併発する。高カルシウム血症では、浸透圧利尿が起こるため尿量が増加し、尿量の増加に伴い脱水症状が起こる。*Mdx* マウスはヘマトクリット値や血中 TP, ALB, BUN が有意に増加し

ていたことから、脱水に陥っていることが明らかとなった。脱水症状が続くと循環血流量の低下に伴い腎臓の血流量が低下するため、糸球体でろ過する血液量が減り、腎機能が低下する。DMD 患者は高齢になると腎機能が低下することや腎機能障害で死亡する報告があることから (Matsumura et al., 2011; Matsumura et al., 2012)、*mdx* マウスで明らかとなった腎機能低下のメカニズムは DMD 患者においても起こりうると示唆した。

また、腎機能低下を併発しないために、筋ジストロフィー症状を改善する以外にも高カルシウム血症を改善することや、食塩や生理食塩水を用いて脱水を防止することが有効であると考えられる。寿命が著しく延び、さらに QOL が向上している DMD において、腎機能低下という新たな問題を解決するために今後さらなる研究が期待される。

本研究の最後に、腎機能が低下した正常対照マウスの骨格筋に意図的に筋損傷を誘発し、その筋再生過程で異所的石灰化が起こることを突き止めたが、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。筋ジストロフィーのみならず、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、多くの共通点から腎臓と骨格筋の関係を明らかにでき、双方の治療法の確立に寄与すると考えられる。

引用文献

- Abou-Khalil R, Yang F, Mortreux M, Lieu S, Yu YY, Wurmser M, Pereira C, Relaix F, Miclau T (2014). Delayed bone regeneration is linked to chronic inflammation in murine muscular dystrophy. *Journal of Bone and Mineral Research*, vol.29(2), pp.304-15.
- Anderson JE, Lentz DL, Johnson RB (1993). Recovery from disuse osteopenia coincident to restoration of muscle strength in mdx mice. *Bone*, vol.14(4), pp.625-34.
- Barton ER, Morris L, Kawana M, Bish LT, Torsell T (2005). Systemic administration of L-arginine benefits mdx skeletal muscle function. *Muscle Nerve*, vol.32, pp.751-760.
- Bianchi ML, Morandi L, Andreucci E, Vai S, Frasunkiewicz J, Cottafava R (2011). Low bone density and bone metabolism alterations in Duchenne muscular dystrophy: response to calcium and vitamin D treatment. *Osteoporosis International*, vol.22, pp.529-539.
- Biber J, Stieger B, Stange G, Murer H (2007). Isolation of renal proximal tubular brush-border membranes. *Nature Protocols*, vol.2(6), pp.356-9.
- Bonucci E, Sadun R (1973). Experimental calcification of the myocardium. Ultrastructural and histochemical investigations. *The American Journal of Pathology*, vol.71(2), pp.167-92.
- Bourgeois S, Capuano P, Stange G, Mühlemann R, Murer H, Biber J, Wagner CA (2013). The phosphate transporter NaPi-IIa determines the rapid renal adaptation to dietary phosphate intake in mouse irrespective of persistently high FGF23 levels. *Pflügers Archiv*, vol. 465(11), pp.1557-72.
- Brazeau GA, Mathew M, Entikin RK (1992). Serum and organ indices of the mdx dystrophic mouse. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, vol.77(2), pp.179-89.

- Breusegem SY, Takahashi H, Giral-Arnal H, Wang X, Jiang T, Verlander JW, Wilson P, Miyazaki-Anzai S, Sutherland E, Caldas Y, Blaine JT, Segawa H, Miyamoto K, Barry NP, Levi M (2009). Differential regulation of the renal sodium-phosphate cotransporters NaPi-IIa, NaPi-IIc, and PiT-2 dietary potassium deficiency. *The American Journal of Physiology - Renal Physiology*, vol.297(2), pp.350-61.
- Buetler TM, Renard M, Offord EA, Schneider H, Ruegg UT (2002). Green tea extract decreased muscle necrosis in mdx mice and protects against reactive oxygen species. *The American Journal of Clinical Nutrition*. vol.75, pp.749-753.
- Bulfield G, Siller W, Wight P, Moore K (1984). X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *PNAS*, vol.81, pp.1189-1192.
- Calvo MS (1993). Dietary phosphorus, calcium metabolism and bone. *Journal of Nutrition*. vol.123(9), pp.1627-33.
- Calvo MS, Tucker KL (2013). Is phosphorus intake that exceeds dietary requirements a risk factor in bone health? *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1301, pp.29-35.
- Calvo MS, Uribarri J (2013). Public health impact of dietary phosphorus excess on bone and cardiovascular health in the general population. *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol.98(1), pp.6-15.
- Carter GT, Wineinger MA, Walsh SA, Horasek SJ, Abresch RT, Fowler WM Jr (1995). Effect of voluntary wheel-running exercise on muscles of the mdx mouse. *Neuromuscular Disorders*, vol.5, pp.323-332.
- Carvalho SC, Apolinário LM, Matheus SM, Santo Neto H, Marques MJ (2013). EPA protects against muscle damage in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy by promoting a shift from the M1 to M2 macrophage phenotype. *Journal of Neuroimmunology*, vol.264, pp.41-47.

- Chamberlain JS, Metzger J, Reyes M, Townsend D, Faulkner JA (2007). Dystrophin-deficient mdx mice display a reduced life span and are susceptible to spontaneous rhabdomyosarcoma. *FASEB Journal*, vol.21(9), pp.2195-204.
- Chang RF, Mubarak SJ (2012). Pathomechanics of Gowers' sign: a video analysis of a spectrum of Gowers' maneuvers. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. vol.470(7), pp.1987-91.
- Cheuk DK Wong V, Wraige E, Baxter P, Cole A (2013). Surgery for scoliosis in Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2:CD005375.
- Coulton G, Morgan J, Partridge T, Sloper J (1988). The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, vol.14, pp.53-70.
- Davidson ZE, Truby H (2009). A review of nutrition in Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*. vol.22(5), pp.383-93.
- Davidson ZE, Ryan MM, Kornberg AJ, Sinclair K, Cairns A, Walker KZ, Truby H (2014). Observations of body mass index in Duchenne muscular dystrophy: a longitudinal study. *European Journal of Clinical Nutrition*. vol.68(8), pp.892-7.
- Deconinck AE, Rafael JA, Skinner JA, Brown SC, Potter AC, Metzinger L, Watt DJ, Dickson JG (1997). Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell*, vol.90(4), pp.717-27.
- De Pasquale L, D'Amico A, Verardo M, Petrini S, Bertini E, De Benedetti F (2012). Increased muscle expression of interleukin-17 in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*, vol.78(17), pp.1309-14.
- Ebashi S, Toyokura Y, Momoi H, Sugita H (1959). High creatine phosphokinase activity of sera of progressive muscular dystrophy. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, vol.46, pp.103-104.

- Ervasti JM, Kahl SD, Campbell KP (1991). Purification of dystrophin from skeletal muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, vol.266(14), pp.9161-5.
- Fukada S, Morikawa D, Yamamoto Y, Yoshida T, Sumie N, Yamaguchi M, Ito T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Yamamoto H (2010). Genetic background affects properties of satellite cells and mdx phenotypes. *American Journal of Pathology*, vol.176(5), pp.2414-24.
- Gattineni J, Bates C, Twombly K, Dwarakanath V, Robinson ML, Goetz R, Mohammadi M, Baum M (2009). FGF23 decreases renal NaPi-2a and NaPi-2c expression and induces hypophosphatemia in vivo predominantly via FGF receptor 1. *The American Journal of Physiology - Renal Physiology*, vol. 297(2), F282-91.
- Gong JG, Costanzo A, Yang HQ, Melino G, Kaelin WG Jr, Levrero M, Wang JY (1999). The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature*, vol.399(6738), pp.806-9.
- Grady RM, Teng H, Nichol MC, Cunningham JC, Wilkinson RS, Sanes JR (1997). Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne Muscular Dystrophy. *Cell*, vol.90(4), pp.729-38.
- Gross P, Six I, Kamel S, Massy ZA (2014). Vascular toxicity of phosphate in chronic kidney disease: beyond vascular calcification . *Circulation Journal*, vol.78(10), pp.2339-46.
- Hack AA, Ly CT, Jiang F, Clendenin CJ, Sigrist KS, Wollmann RL, McNally EM (1998). Gamma-sarcoglycan deficiency leads to muscle membrane defects and apoptosis independent of dystrophin. *The Journal of Cell Biology*, vol.142(5), pp.1279-87.
- Haenggi T, Schaub MC, Fritschy JM (2005). Molecular heterogeneity of the dystrophin-associated protein complex in the mouse kidney nephron: differential alterations in the absence of utrophin and dystrophin. *Cell and Tissue Research*, vol.319(2), pp.299-313.

- Haenggi T, Fritschy JM (2006). Role of dystrophin and utrophin for assembly and function of the dystrophin glycoprotein complex in non-muscle tissue. *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol.63(14), pp.1614-31.
- Hauser AB, Azevedo IR, Gonçalves S, Stinghen A, Aita C, Pecoits-Filho R (2010). Sevelamer carbonate reduces inflammation and endotoxemia in an animal model of uremia. *Blood Purification*, vol.30(3), pp.153-8.
- Hayes A, Williams DA (1996). Beneficial effects of voluntary wheel running on the properties of dystrophic mouse muscle. *Journal of Applied Physiology*, vol.80(2), pp.670-9.
- Hesse B, Fischer MS, Schilling N (2010). Distribution pattern of muscle fiber types in the perivertebral musculature of two different sized of mice. *Anatomical Record (Hoboken)*, vol.293(3), pp.446-63.
- Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, vol.51(6), pp.919-28.
- Hoffman E, Bronson A, Levin A, Takeda S, Yokota T, Baudy A, Connor E (2011). Restoring dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy muscle progress in Exon skipping and stop codon read through. *The American Journal of Pathology*, vol.179, pp.12-22.
- Houde S, Filiatrault M, Fournier A, Dubé J, D'Arcy S, Bérubé D, Brousseau Y, Lapierre G, Vanasse M (2008). Deflazacort use in Duchenne muscular dystrophy: an 8-year follow-up. *Pediatric Neurology*, vol.38(3), pp.200-6.
- Huttunen MM, Pietilä PE, Viljakainen HT, Lamberg-Allardt CJ (2006). Prolonged increase in dietary phosphate intake alters bone mineralization in adult male rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol.17(7), pp.479-84.
- Ichikawa S, Austin AM, Gray AK, Allen MR, Econs MJ (2011). Dietary phosphate restriction

normalizes biochemical and skeletal abnormalities in a murine model of tumoral calcinosis. *Endocrinology*, vol.152(12), pp.4504-13.

Jarad G, Pippin JW, Shankland SJ, Kreidberg JA, Miner JH (2011). Dystroglycan does not contribute significantly to kidney development or function, in health or after injury. *The American Journal of Physiology - Renal Physiology*, vol. 300(3), F811-20.

Johnsson A, Wennerberg J (1999). Amifostine as a protector against cisplatin-induced toxicity in nude mice. *Acta Oncologica*, vol.38(2), pp.247-53.

Karp HJ, Vaihia KP, Kärkkäinen MU, Niemistö MJ, Lamberg-Allardt CJ (2007). Acute effects of different phosphorus sources on calcium and bone metabolism in young women: a whole-foods approach. *Calcified Tissue International*, vol.80(4), pp.251-8.

Khan MA (1993). Corticosteroid therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Journal of the Neurological Sciences*. vol.120(1), pp.8-14.

Kikkawa N, Ohno T, Nagata Y, Shiozuka M, Kogure T, Matsuda R (2009). Ectopic calcification is caused by elevated levels of serum inorganic phosphate in mdx mice. *Cell Structure and Function*, vol.34, pp.77-88.

Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*, vol.50(3), pp.509-17.

Korff S, Riechert N, Schoensiegel F, Weichenhan D, Autschbach F, Katus HA, Ivandic BT (2006). Calcification of myocardial necrosis is common in mice. *Virchows Archiv*, vol.448(5), pp.630-8.

Kornegay JN, Childers MK, Bogan DJ, Bogan JR, Nghiem P, Wang J, Fan Z, Howard JF Jr, Schatzberg SJ (2012). The paradox of muscle hypertrophy in muscular dystrophy. *Physical*

Medicine and Rehabilitation Clinics of North America. vol.23(1), pp.149-72.

Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima Y (1997). Mutation of the mouse Klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*, vol.309, pp.45-51.

Kuro-o M (2010). Overview of the FGF-23-Klotho axis. *Pediatric Nephrology*, vol.25, pp.583-590.

Landisch RM, Kosir AM, Nelson SA, Baltgalvis KA, Lowe DA (2008). Adaptive and nonadaptive responses to voluntary wheel running by mdx mice. *Muscle Nerve*, vol.38(4), pp.1290-303.

Lanske B, Razzaque MS (2014). Molecular interactions of FGF23 and PTH in phosphate regulation. *Kidney International*, vol. 86(6), pp.1072-4.

LaRusso J, Jiang Q, Li Q, Uitto J (2008). Ectopic mineralization of connective tissue in Abcc6^{-/-} mice: effects of dietary modifications and a phosphate binder--a preliminary study. *Experimental Dermatology*, vol.17(3), pp.203-7.

Lau WL, Linnes M, Chu EY, Foster BL, Bartley BA, Somerman MJ, Giachelli CM (2013). High phosphate feeding promotes mineral and bone abnormalities in mice with chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol.28(1), pp.62-9.

Lau WL, Leaf EM, Hu MC, Takeno MM, Kuro-o M, Moe OW, Giachelli CM (2012). Vitamin D receptor agonists increase klotho and osteopontin while decreasing aortic calcification in mice with chronic kidney disease fed a high phosphate diet. *Kidney International*, vol.82(12), pp.1261-70.

- Liew WK, Kang PB (2013). Recent developments in the treatment of Duchenne muscular dystrophy and spinal muscular atrophy. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*. vol.6(3), pp.147-60.
- Liu J, Okamura C, Bogan D, Bogan J, Childers M, Kornegay J (2004). Effects of prednisone in canine muscular dystrophy. *Muscle Nerve*, vol.30, pp.767-773.
- Luz MA, Marques MJ, Santo Neto H (2002). Impaired regeneration of dystrophin-deficient muscle fibers is caused by exhaustion of myogenic cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol.35(6), pp.691-5.
- Maizel J, Six I, Dupont S, Secq E, Dehedin B, Barreto FC, Benchitrit J, Poirot S, Slama M, Tribouilloy C, Choukroun G, Mazière JC, Drueke TB, Massy ZA (2013). Effects of sevelamer treatment on cardiovascular abnormalities in mice with chronic renal failure. *Kidney International*, vol.84(3), pp.491-500.
- Mangner N, Adams V, Sandri M, Hoellriegel R, Hambrecht R, Schuler G, Gielen S (2012). Muscle function and running activity in mouse models of hereditary muscle dystrophy: impact of knockout for dystrophin and the transcription factor MyoD. *Muscle Nerve*, vol.45(4), pp.544-51.
- Matsuda R, Nishikawa A, Tanaka H (1995). Visualization of dystrophic muscle fibers in mdx mouse by vital staining with Evans blue: evidence apoptosis in dystrophin-deficient muscle. *The Journal of Biochemistry*, vol.118(5), pp.959-64.
- Matsumura T, Saito T, Fujimura H, Shinno S, Sakoda S (2011). A longitudinal cause-of-death analysis of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Rinsho Shinkeigaku*, vol.51(10), pp.743-50.
- Matsumura T, Saito T, Fujimura H, Sakoda S (2012). Renal dysfunction is a frequent complication in patients with advanced stage of Duchenne muscular dystrophy. *Rinsho Shinkeigaku*, vol.52(4), pp.211-7.

- Matsushima Y, Imai T, Watanabe O, Kawahara H, Ohne M, Takai H (1984). Spontaneous calcified tongue lesions in DBA mice. *Jikken Dobutsu*, vol.33(4), pp.539-42.
- Messina S, Vita GL, Aguenouz M, Sframeli M, Romeo S, Rodolico C, Vita G (2011). Activation of NF-kappaB pathway in Duchenne muscular dystrophy: relation to age. *Acta Myologica*, vol.30(1), pp.16-23.
- Mishima K, Baba A, Matsuo M, Itoh Y, Oishi R (2006). Protective effect of cyclic AMP against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine*, vol.40(9), pp.1564-77.
- Mohri I, Aritake K, Taniguchi H, Sato Y, Kamauchi S, Nagata N, Maruyama T, Taniike M, Urade Y (2009). Inhibition of prostaglandin D synthase suppresses muscular necrosis. *The American Journal of Pathology*, vol.174(5), pp.1735-44.
- Mokhtarian A, Lefaucheur JP, Even PC, Seville A (1999). Hindlimb immobilization applied to 21-day-old mdx mice prevents the occurrence of muscle degeneration. *Journal of Applied Physiology*, vol.86(3), pp.924-31.
- Moser H (1984). Duchenne muscular dystrophy: pathogenetic aspects and genetic prevention. *Human Genetics*, vol.66, pp.17-40.
- Mosqueira M, Baby SM, Lahiri S, Khurana TS (2013). Ventilatory chemosensory drive is blunted in the mdx mouse model of Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). *PLoS One*, vol.8(7), e69567.
- Murai I, Sugimoto M, Ikeda S, Kume S (2010). Effects of high potassium chloride supplementation on water intake, urine volume and nitrogen. *Animal Science Journal*, vol.81(1), pp.80-4.
- Nakamura A, Kobayashi M, Kuraoka M, Yuasa K, Yugeta N, Okada T, Takeda S (2013). Initial pulmonary respiration causes massive diaphragm damage and hyper-CKemia in Duchenne

muscular dystrophy dog. Scientific Reports. 2013;3:2183

National Research Council (1995). Nutrient requirements of laboratory animals, fourth revised edition. National Academy Press.

Novotny SA, Warren GL, Lin AS, Guldberg RE, Baltgalvis KA, Lowe DA (2011). Bone is functionally impaired in dystrophic mice but less so than skeletal muscle. Neuromuscular Disorders, vol.21(3), pp.183-93.

Novotny SA, Mader TL, Greising AG, Lin AS, Guldberg RE, Warren GL, Lowe DA (2014). Low intensity, high frequency vibration training to improve musculoskeletal function in a mouse of Duchenne muscular dystrophy. PLoS One, vol.9(8), e104339.

Ohnishi M, Razzaque MS (2010). Dietary and genetic evidence for phosphate toxicity accelerating mammalian aging. FASEB Journal, vol.24(9), pp.3562-71.

Okamura M, Hashimoto K, Shimada J, Sakagami H (2004). Apoptosis-inducing activity of cisplatin (CDDP) against human hepatoma and oral squamous cell carcinoma cell lines. Anticancer Research, vol.24(2B), pp.655-61.

Osuka S, Razzaque MS (2012). Can features of phosphate toxicity appear in normophosphatemia. Journal of Bone and Mineral Metabolism, vol.30, pp.10-18.

Park JW, Yook JM, Ryu HM, Choi SY, Morishita M, Do JY, Park SH, Kim CD, Choi JY, Chung HY, Kim YL (2011). Phosphate-induced apoptosis in human peritoneal mesothelial cells in vitro. American Journal of Nephrology, vol. 34(1):77-86.

Passaquin AC, Renard M, Kay L, Challet C, Mokhtarian A, Wallimann T, Rugg UT (2002). Creatine supplementation reduces skeletal muscle degeneration and enhances mitochondrial function in mdx mice. Neuromuscular Disorders, vol.12, pp.174-182.

- Payne ET, Yasuda N, Bourgeois JM, Devries MC, Rodriguez MC, Yousuf J, Tarnopolsky MA (2006). Nutritional therapy improves function and complements corticosteroid intervention in mdx mice. *Muscle Nerve*, vol.33, pp.66-77.
- Pouwels S, de Boer A, Leufkens HG, Weber WE, Cooper C, van Onzenoort HA, de Vries F (2014). Risk of fracture in patients with muscular dystrophies. *Osteoporosis International*, vol.25(2), pp.509-18.
- Quarles LD (2012). Skeletal secretion of FGF-23 regulates phosphate and vitamin D metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*, vol.8(5), pp.276-86.
- Raisz LG (1999). Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clinical Chemistry*, vol.45(8 Pt 2), pp.1353-8.
- Razzaque M (2011). Phosphate toxicity: new insights into an old problem. *Clinical Science*, vol.120, pp.91-97.
- Razzaque MS (2013). Phosphate toxicity and vascular mineralization. *Contributions to Nephrology*, vol. 180, pp.74-85.
- Ritz E, Hahn K, Ketteler M, Kuhlmann MK, Mann J (2012). Phosphate additives in food-a health risk. *Deutsches Aerzteblatt International*, vol.109, pp.49-55.
- Rufo A, Del Fattore A, Capulli M, Carvello F, De Pasquale L, Ferrari S, Pierroz D, Morandi L, De Simone M, Rucci N, Bertini E, Bianchi ML, De Benedetti F, Teti A (2011). Mechanisms inducing low bone density in Duchenne muscular dystrophy in mice and humans. *Journal of Bone and Mineral Research*, vol.26, pp.1891-903.
- Sacco A, Mourkioti F, Tran R, Choi J, Llewellyn M, Kraft P, Shkreli M, Delp S, Pomerantz JH (2010). Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in mdx/mTR mice. *Cell*, vol.143(7), pp.1059-71.

- Segawa H, Onitsuka A, Furutani J, Kaneko I, Aranami F, Matsumoto N, Tomoe Y, Kuwahata M, Ito M, Matsumoto M, Li M, Amizuka N, Miyamoto K (2009). Npt2a and Npt2c in mice play distinct and synergistic roles in inorganic phosphate metabolism and skeletal development. *The American Journal of Physiology - Renal Physiology*, vol.297(3), F671-8.
- Sharma A, Fish BL, Moulder JE, Medhora M, Baker JE, Mader M, Cohen EP (2014). Safety and blood sample volume and quality of a refined retro-orbital bleeding technique in rats using a lateral approach. *Lab Animal*, vol.43(2), pp.63-6.
- Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook A, Barnard E, Darlison M, Barnard P (1989). The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science*, vol.244, pp.1578-1580.
- Singh AP, Junemann A, Muthuraman A, Jaggi AS, Singh N, Grover K, Dhawan R (2012). Animal models of acute renal failure. *Pharmacological Reports*, vol.64(1), pp.31-44.
- Smythe GM, White JD (2011). Voluntary wheel running in dystrophin-deficient (mdx) mice: relationships between exercise parameters and exacerbation of the dystrophic phenotype. *PLoS Currents*, 3:RRN1295.
- Takeda E, Yamamoto H, Yamanaka-Okumura H, Taketani Y (2012). Dietary phosphorus in bone health and quality of life. *Nutrition Reviews*, vol.70, pp.311-321.
- Takeuchi F, Yonemoto N, Nakamura H, Shimizu R, Komaki H, Mori-Yoshimura M, Hayashi YK, Nishino I, Kawai M, Kimura E, Takeda S (2013). Prednisolone improves walking in Japanese Duchenne muscular dystrophy patients. *Journal of Neurology*. vol.260(12), pp.3023-9.
- Vaidya VS, Ramirez V, Ichimura T, Bobadilla NA, Bonventre JV (2006). Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney injury. *The American Journal of Physiology - Renal Physiology*, vol.290(2), F517-29.

- van Putten M, Hulsker M, Nadarajah VD, van Heiningen SH, van Huizen E, van Iterson M, Admiraal P, Aartsma-Rus A (2012). The effects of low levels of dystrophin on mouse muscle function and pathology. *PLoS One*, vol.7(2), e31937.
- van Ruiten HJ, Straub V, Bushby K, Guglieri M (2014). Improving recognition of Duchenne muscular dystrophy: a retrospective case note review. *Archives of Disease in Childhood*. vol.99(12), pp.1074-7.
- Verma M, Asakura Y, Hirai H, Watanabe S, Tastad C, Fong G, Ema M, Call J, Lowe D, Asakura A (2010). *Fit-1* haploinsufficiency ameliorates muscular dystrophy phenotype by developmentally increased vasculature in mdx mice. *Human Molecular Genetics*, vol.19, pp.4145-4159.
- Villalta SA, Nguyen HX, Deng B, Gotoh T, Tidball JG (2009). Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics*, vol.18(3), pp.482-96.
- Villalta SA, Deng B, Rinaldi C, Wehling-Henricks M, Tidball JG (2011a). IFN- γ promotes muscle damage in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy by suppressing M2 macrophage activation and inhibiting muscle cell proliferation. *The Journal of Immunology*, vol.187(10), pp.5419-28.
- Villalta SA, Rinaldi C, Deng B, Liu G, Fedor B, Tidball JG (2011b). Interleukin-10 reduces the pathology of mdx muscular dystrophy by deactivating M1 macrophages and modulating macrophage phenotype. *Human Molecular Genetics*, vol.20(4), pp.790-805.
- Villanova M, Brancalione B, Mehta AD (2014). Duchenne muscular dystrophy: life prolongation by noninvasive ventilatory support. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*. vol.93(7), pp.595-9.

- Wang XH, Mitch WE (2013). Muscle wasting from kidney failure-a model for catabolic conditions. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 45(10), pp.2230-8.
- Watkins S, Hoffman E, Slayter H, Kunkel L (1988). Immunoelectron microscopic localization of dystrophin in myofibres. *Nature*, vol.333 (6176), pp.863-866.
- Wehling M, Spencer MJ, Tidball JG (2001). A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice. *The Journal of Cell Biology*, vol.155(1), pp.123-31.
- Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, Paushkin S, Patel M, Trotta CR, Hwang S, Wilde RG, Karp G, Takasugi J, Chen G, Jones S, Ren H, Moon YC, Corson D, Turpoff AA, Campbell JA, Conn MM, Khan A, Almstead NG, Hedrick J, Mollin A, Risher N, Weetall M, Yeh S, Branstrom AA, Colacino JM, Babiak J, Ju WD, Hirawat S, Northcutt VJ, Miller LL, Spatrick P, He F, Kawana M, Feng H, Jacobson A, Peltz SW, Sweeney HL (2007). PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature*, vol.447(7140), pp.87-91.
- Wong B, Christopher C (2002). Corticosteroids in Duchenne Muscular Dystrophy: a Reappraisal. *Journal of Child Neurology*, vol.17, pp.183-190.
- Yamaguchi TP, Harpal K, Henkemeyer M, Rossant J (1994). fgfr-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. *Genes & Development*, vol.8(24), pp.3032-44.
- Yoshida M, Yonetani A, Shirasaki T, Wada K (2006). Dietary NaCl supplementation prevents muscle necrosis in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol.290, pp.449-455.

Yoshida T, Galvez S, Tiwari S, Rezk BM, Semprun-Prieto L, Higashi Y, Sukhanov S, Yablonka-Reuveni (2013). Angiotensin II inhibits satellite cell proliferation and prevents skeletal muscle regeneration. *The Journal of Biological Chemistry*, vol.288(33), pp.23823-32.

Zanotti S, Gibertini S, Di Blasi C, Cappelletti C, Bernasconi P, Mantegazza R, Morandi L, Mora M (2011). Osteopontin is highly expressed in severely dystrophic muscle and seems to play a role in muscle regeneration and fibrosis. *Histopathology*, vol.59, pp.1215-1228.

Zdanowicz MM, Slonim AE, Bilaniuk I, O'Connor MM, Moyse J, Teichberg S (1995). High protein diet has beneficial effects in murine muscular dystrophy. *The Journal of Nutrition*, vol.125, pp.1150-1158.

平成 21 年国民健康・栄養調査報告, 厚生労働省

<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyou/dl/h21-houkoku-01.pdf>

謝辞

本研究を遂行するに当たり、様々な方からご指導・ご助力を頂きましたことに深く感謝し、ここに御礼申し上げます。

修士課程からご指導下さりました松田良一教授には、生物学の基礎から研究者としての心得えまで多くのことを伝授して頂きました。様々な機会を与えてくださり、先生の励ましにより成長できたことを心から感謝しております。時に厳しくも、本当に親身になってサポートして下さった松田先生を、恩師として尊敬しております。

国立精神・神経医療研究センターの西野一三先生、埜中征哉先生、小島依子様には透過型電子顕微鏡のご指導を頂きました。同研究機関の今村道博先生には、Utrophin 抗体などの貴重な抗体をご供与頂きました。日立アロカメディカルの東哲男様、木村真輔様には実験小動物用 X 線 μ CT 装置をお貸し頂き、実験にご協力頂きました。大阪大学の老年・腎臓内科学の濱野高行先生、松井功先生には腎臓に関する基礎知識から、実験内容や結果に対するアドバイスを頂きました。徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス部の瀬川博子先生には、貴重な NaPi 2a 抗体と NaPi 2c 抗体をご供与頂きました。

デュシェンヌ型筋ジストロフィー研究・治療開発支援機構(ハッピースマイルクラブ)の中里俊晴様と国立病院機構徳島病院の柏木節子先生には、患者様の前で発表の機会を頂きました。患者様からのお言葉が研究を進めていく原動力となりました。

この5年間、松田研究室の皆様のおかげで非常に有意義な研究生活を送ることができました。特に吉田瑞子先生と野々村禎昭先生にはデュシェンヌ型筋ジストロフィーや *mdx* マウスについて非常に多くのことをご教授頂きました。

最後に、両親や祖父をはじめ、なかなか家族の時間を作れないにも関わらず献身的に応援してくれた妻・慶子と息子に大変感謝しております。この論文を息子・瑛大に贈る。

2014 年 12 月 和田英治