

脳内マグネシウムレベルに着目した慢性腎臓病による認知機能障害誘発機構の解明と治療法開発

小菅 康弘¹, 三枝 禎²

¹ 日本大学薬学部薬理学研究室, ² 日本大学松戸歯学部薬理学講座

概要 食生活や生活習慣の急激な変化により, 慢性腎臓病(Chronic kidney disease; CKD)に罹患する患者数は世界的に増大している。CKD の患者では心臓病や脳卒中などの心血管疾患の発症が増加することが明らかにされ, いかにか心血管疾患を予防するかが課題となっている。一方で, 腎機能障害や尿毒症は, 海馬の機能低下が関与する認知症を誘発あるいは増悪する要因となることが注目されている。しかし, そのメカニズムについては不明な点が多く, 有効な治療法がないのが現状である。本研究では, CKD モデルである 5/6 腎摘マウス(CKD マウス)を用いて, マグネシウム(Mg²⁺)摂取が及ぼす影響について検討した。

8 週間 MgCl₂(1%)を経口摂取させた CKD マウス(Mg-CKD 群)と溶媒(飲料水)を接種した CKD マウス(水-CKD 群)との間で, 生存率, 体重, 摂餌量, および摂水量に有意な差はなかった。CKD マウスでは Mg²⁺摂取により血中 Mg レベルが有意に増加したが, 偽手術をしたマウスでは, Mg²⁺摂取による血中 Mg レベルの変動は認められなかった。また, Mg-CKD 群の血中尿素窒素(blood urea nitrogen; BUN)濃度は, 水-CKD 群よりも有意に上昇しており, Mg²⁺摂取による腎機能障害が増悪することが明らかになった。そこで, 記憶・学習において中心的な役割をしている脳部位である海馬の細胞内ストレスレベルの変化について Western blot 法を用いて検討した。その結果, CKD マウスの海馬では, 偽手術をしたマウスの海馬と比較して, 酸化ストレスのマーカーである 4-hydroxy-2-nonenal(HNE)付加物タンパク質および小胞体ストレスマーカーである glucose-regulated protein(GRP)78 の発現レベルが有意に上昇した。これらのストレスマーカーの発現レベルの上昇は Mg²⁺摂取によりさらに増加した。以上の結果から, 高用量の Mg²⁺の持続的な摂取は腎機能障害の悪化を介して CKD 誘発性の海馬機能障害の増悪する要因となることが示唆された。そのため, 薬物や食品の摂取に伴う血清 Mg²⁺濃度の管理が CKD 誘発性の認知症を予防または治療する上で重要であることが明らかとなった。

1. 研究目的

慢性腎臓病 (chronic kidney disease; CKD)は, 慢性に経過する全ての腎臓病を指す。その定義は, ①アルブミン尿, 尿沈渣の異常, 尿細管障害による電解質異常やその他の異常, 病理組織検査による異常, 画像検査による形態異常, 腎移植, ②GFR が 60 mL/分/1.73 m²未満, ①及び②のいずれか, または両方が慢性的に 3 ヶ月を超えて存在する状態を指す¹⁾。我が国での CKD の総患者数は, 1330 万人以上であると推定されており, 透析患者数は約 33 万人にもものぼるため, CKD は新たな国民病の

ひとつであるとも考えられている²⁾。一般的に, 糸球体腎炎や多発性嚢胞腎等の腎臓病が CKD の原因とされているが, 近年, 高血圧や糖尿病, 脂質異常症等の生活習慣病が CKD の発症を高める可能性があることも指摘されている³⁾。また, 腎機能は年齢とともに低下するため, 高齢者では CKD のリスクが増加することも報告されている³⁾。CKD は初期症状に乏しいもの, 進行すると, 夜間尿, 浮腫, 倦怠感, 腎性貧血, あるいは息切れ等の症状が現れることがある。しかし, これらの症状が自覚される時期はす

で CKD がかなり進行している状態であり、透析や腎臓移植が最終的に必要となることも多いのが現状である。

近年、CKD は海馬の機能低下が関与する認知症を誘発・増悪する要因となることが明らかにされている⁴⁾。また、CKD 患者における認知機能障害は CKD が早期の段階より出現し、腎機能が低下するにつれ悪化していくことが報告されている⁵⁾。この CKD 患者の認知機能低下は、コンプライアンスの低下等にも繋がるため、CKD をさらに重症化させる要因ともなる。そのため、CKD に伴う高次脳機能障害の病態メカニズムの解明と治療法の確立は重要な課題である。これまで、CKD による認知機能障害の発症には酸化ストレスが関与することが CKD モデルマウスを用いた研究から明らかにされ、抗酸化薬の Tempol が一定の治療効果を示すことが報告されている⁶⁾。また、我々の研究グループでは、記憶障害が認められる直前の CKD モデルマウスの海馬では、酸化ストレスだけでなく、小胞体の機能不全に起因するストレス(小胞体ストレス)が生じていることを報告している⁷⁾。しかし、臨床レベルで使用可能な治療薬や予防法はないのが現状である。その中で、我々は CKD 患者で極めて高頻度に見られ、重症化にも関与することが報告されている血清マグネシウム値の低下(低 Mg^{2+} 血症)⁸⁾が脳の高次機能に及ぼす影響を検証する必要があるのではないかと考えた。本研究は、CKD モデルマウスとして汎用される 5/6 腎臓摘出マウス(CKD マウス)を用いて、 Mg^{2+} の経口摂取による血清 Mg^{2+} レベルの是正が腎機能および脳内機能に及ぼす影響を生体レベルで明らかにすることを目的として検討を行った。

2. 研究方法

2.1 CKD マウスの作成

C57BL/6JJmslc 雄性マウスを用い、日本エスエルシー株式会社にて、8 週齢時に左腎臓の 2/3 を、9 週齢時に右腎臓を全摘出することで 5/6 腎臓摘出 CKD モデルマウスを作製した⁷⁾。偽処置マウスは、皮膚及び筋肉の切開のみを行った。麻酔には 3 種混合麻酔(塩酸メドミジン 0.3 mg/kg, ミタゾラム 4 mg/kg, 酒石酸ブトルフェノール 5 mg/kg)を使用し、10 mL/kg で投与した。これらのマウスは 10 週齢時に日本大学薬学部実験動物センターに導入し、飼育・実験を行った。なお、本研究は日本大学動物実験委員会の審議を経て承認(API9PHA021-2)を受けて実施した。

2.2 Mg^{2+} 投与法および体重、飲水量、摂餌量の測定

$MgCl_2$ は動物用飲料水で 1% に溶解し、右腎摘出 1 週間後から 8 週間給水ビンにて自由飲水させた。また、対照群には精製水を飲水させた。マウスの体重測定は週に 2 回に行い、投与開始日と各測定日の差を算出した。飲水量は 3.5 日毎に測定し、1 日の平均飲水量を算出した。摂餌量は 6 日毎に測定し、1 日の平均摂餌量を算出した。

2.3 血清の採取および生化学検査

安楽死したマウスから 0.7 mL 以上の血液を採取し、30 分静置後、25°C、1500 G で 15 分間遠心分離し、得られた血清のみをオリエンタル酵母株式会社に送付し、委託検査した⁷⁾。

2.4 Western Blot 法

薬物処置後の脳部位は、既報⁹⁾に従い RIPA buffer [150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl(pH7.6), 2.5% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% Triton-X]を用いて細胞抽出液を作成し、polyacrylamide gel を用いて電気泳動した。終了後に Immobilon™-P Transfer Membrane (Millipore) に転写し、室温で 1 時間ブロッキングを行った。その後、TBST (Tris-buffered saline, 0.5% Tween 20) で洗浄し、各種の一次抗体と 4°C で一晩反応させ、HRP で標識された二次抗体を室温で 1 時間反応させた。終了後、TBST で洗浄し、ECL により発色させた。得られた各バンドは scion image soft ware を用いて解析した。

2.5 組織染色法

薬物投与終了後のマウス腎臓摘出し、4% paraformaldehyde (PFA) に一晩浸漬し固定後、エタノールおよびキシレンにより脱水処理し、パラフィン包埋した。ミクロトームにより作製したパラフィン切片をキシレン及びエタノールにより脱パラフィン処理した後、Hematoxylin Eosin 染色した。

3. 研究結果および考察

はじめに、 Mg^{2+} 投与による CKD マウスの体重変化に及ぼす影響を検証した。投与開始から 8 週間、各群マウスの体重測定を定期的に行い、各個体の投与開始日の体重と比較したマウスの一匹あたりの平均体重増加量は、水を経口摂取させた Sham マウス(Sham-Water 群)、 Mg^{2+} を経口摂取させた Sham マウス(Sham- Mg^{2+} 群)、水を経口摂取させた CKD マウス(CKD-Water 群)、 Mg^{2+} を経口摂取させた CKD マウス(CKD- Mg^{2+} 群)全てで緩やかな増加

傾向を示したが、それらに有意な差は認められなかった。同様に、飲水量の経時変化についても検討した。CKD-Water 群および CKD-Mg²⁺群では、Sham-Water 群と比較して、その飲水量が有意に増加し、CKD に伴う過飲水が認められた。しかし、CKD-Water 群と CKD-Mg²⁺群とでは差は認められなかった。さらに、摂餌量の経時変化についても検討したが、飲水量とは異なり Sham-Water 群、Sham-Mg²⁺群、CKD-Water 群、CKD-Mg²⁺群の検討した全ての群で顕著な差は認められなかった。加えて、生存期間についても検証した。MgCl₂(1%)投与した 8 週間で Sham-Water 群および Sham-Mg²⁺群のマウスで死亡した個体は認められなかったが、CKD-Water 群では 4 例、CKD-Mg²⁺群では 3 例が死亡したものの、その差は有意なものではなかった (Fig. 1)。以上のように、8 週間 MgCl₂ (1%) 投与は、5/6 腎摘 CKD マウスの生存率、体重、飲水量、摂餌量の変化に影響を及ぼさなかった。そこで、MgCl₂(1%) 摂取が CKD モデルの腎機能の検証を血清生化学検査により行った (Table. 1)。その結果、CKD-Mg²⁺群の血清 Mg 値は、CKD-Water 群と比較して、有意に増加したものの、Sham-Water 群および Sham-Mg²⁺群の血清 Mg 値に変化なかった。興味深いことに、CKD マウスでは CKD 患者で認められた血清マグネシウム値の低下 (低 Mg²⁺血症) は認められなかった。また、CKD-Water 群の血清 BUN 値および血清 CRE 値は、Sham-Water 群と比較し有意に増加した。また、CKD-Mg²⁺群の血清 BUN 値は、CKD-Water 群と比較して、有意に増加したが、CKD-Mg²⁺群および CKD-Water 群の血清 CRE 値には、顕著な変化は認められなかった。一方、その他の血清パラメータに顕著な変化は認められなかった。加えて、HE 染色により組織学的な検討を行った。Fig.2 に写真的な光学顕微鏡像を示したように、CKD-Water 群および CKD-Mg²⁺群の糸球体面積は、CKD-Water 群の糸球体面積と比較し、いずれも有意に増加した。しかし、CKD-Water 群と CKD-Mg²⁺群の糸球体面積に顕著な差はなかった (Fig. 2)。これらの結果は、CKD マウスでは Mg の代謝排泄が低下するため血清 Mg 値が上昇し、この上昇により腎機能障害が増悪することが明らかになった。Mg 摂取が、記憶・学習において中心的な役割をしている脳部位である海馬の細胞内ストレスレベルの変化について Western blot 法を用いて検討した (Fig. 3)。

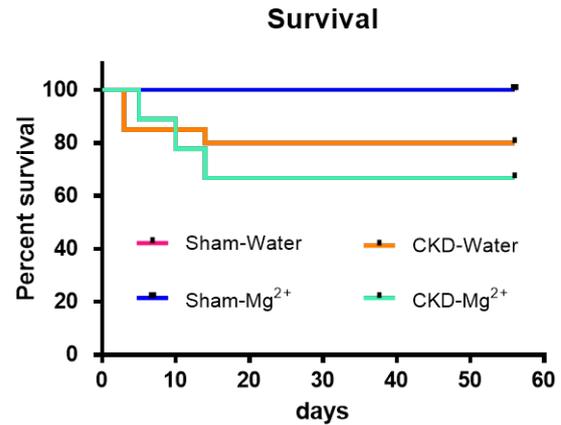


Figure 1. Effect of Mg²⁺ on the survival of CKD mice. Survival curve of CKD mice treated with vehicle or Mg²⁺, analysed by Kaplan-Meier analysis with the Mantel-Cox log-rank test (n = 8-10). MgCl₂ is administered orally by mixing with the drinking water.

Table 1. Levels of serum biochemical parameters in CKD mice and Sham mice.

	Sham-Water n=5	Sham-MgCl ₂ n=5	CKD-Water n=4	CKD-MgCl ₂ n=5
TP (g/dL)	4.7±0.21	4.8±0.089	4.5±0.083	4.7±0.10
ALB (g/dL)	3.0±0.14	3.0±0.075	2.8±0.043	2.9±0.10
BUN (mg/dL)	31.2±2.66	32.3±0.891	64.4±6.53 ^{a,b}	85.7±30.8 ^{a, b, c}
CRE (mg/dL)	0.11±0.012	0.11±0.010	0.24±0.021 ^{a,b}	0.24±0.060 ^{a, b}
UA (mg/dL)	3.5±0.59	3.1±0.28	3.4±0.68	3.4±0.35
Na (mEq/L)	156±1.17	155±1.17	151±0.83	153±1.85
K (mEq/L)	6.2±0.39	5.9±0.37	5.6±0.52	6.8±1.1
Cl (mEq/L)	111±1.10	108±0.400	104±1.79	112±6.32
Ca (mg/dL)	9.3±0.19	9.3±0.21	10.1±0.148	9.6±0.61
IP (mg/dL)	8.0±0.75	8.6±0.48	7.6±0.33	6.0±1.8
Mg (mg/dL)	3.8±0.21	4.1±0.12	4.2±0.23	6.8±2.0 ^{a, b, c}
T-CHO (mg/dL)	78±12	88±6.8	89±7.0	100±12.6 ^c
GLU (mg/dL)	235±32.2	219±22.4	290±27.7	275±43.4
GA (%)	3.5±0.37	3.4±0.58	3.5±0.24	3.6±0.37

The serum biochemical parameters investigated were total protein (TP), albumin (ALB), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (CRE), uric acid (UA), sodium (Na), potassium (K), chlorine (Cl), calcium (Ca), inorganic phosphorus (IP), magnesium (Mg), total cholesterol (T-CHO), glucose (GLU), and glycoalbumin (GA).

海馬の酸化ストレスレベルを解析するために、4-hydroxynonenal (HNE) 付加タンパク質の発現変化を検討した。これまでに報告されているように、CKD-Water 群の HNE 付加タンパク質の発現レベルは、Sham-Water 群と比較し有意に増加した。また、CKD-Mg²⁺群の HNE 付加タンパク質の発現レベルは、CKD-Water 群と比較して、有意に増加した。さらに、HNE 付加タンパク質の発現レベルが増加する細胞の同定を行うため、神経細胞を特異的に染色する蛍光 Nissl 染色液と抗 HNE 抗体を用いた免疫染色を同時に行ったところ、HNE 付加タンパク質を発現した細胞は Nissl 陽性細胞と一致した。そのため、

HNE 付加タンパク質の増加は CKD マウスの海馬神経細胞で生じていることが明らかとなった。

最後に、小胞体ストレスマーカータンパク質のひとつである Glucose Regulated Protein (GRP) 78 の発現レベルを Western blot 法を用いて検討した。ここでも、これまでに報告⁷⁾されているように、CKD-Water 群の海馬での GRP78 の発現レベルは、Sham-Water 群と比較し有意に増加した。

また、HNE 付加タンパク質の発現変化と同様に、CKD-Mg²⁺群の海馬での GRP78 の発現レベルは、CKD-Water 群と比較し、有意に増加した。以上の結果のように、高用量の Mg²⁺摂取は腎機能低下に伴い CKD マウスの海馬でのストレスレベルを増加させることが明らかとなった。

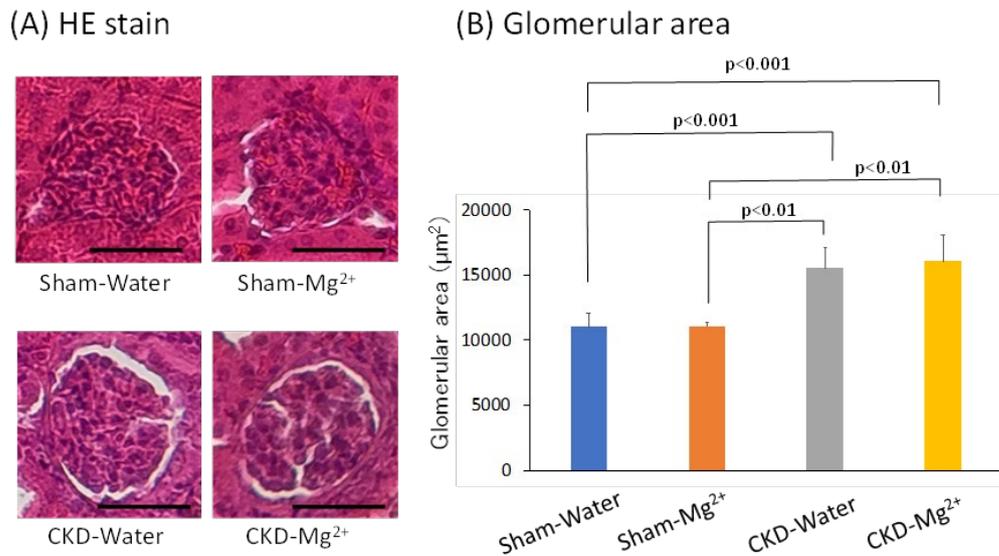


Figure 2. Glomerular mesangial area of the CKD mice after 8 weeks of dietary treatment.

(A) Representative histological photomicrograph of glomeruli by Hematoxylin and Eosin (HE) staining. Scale bar = 50 μm.

(B) Morphometric analysis of glomerular areas in CKD mice and Sham mice. Data are means ± SE. n = 4-5.

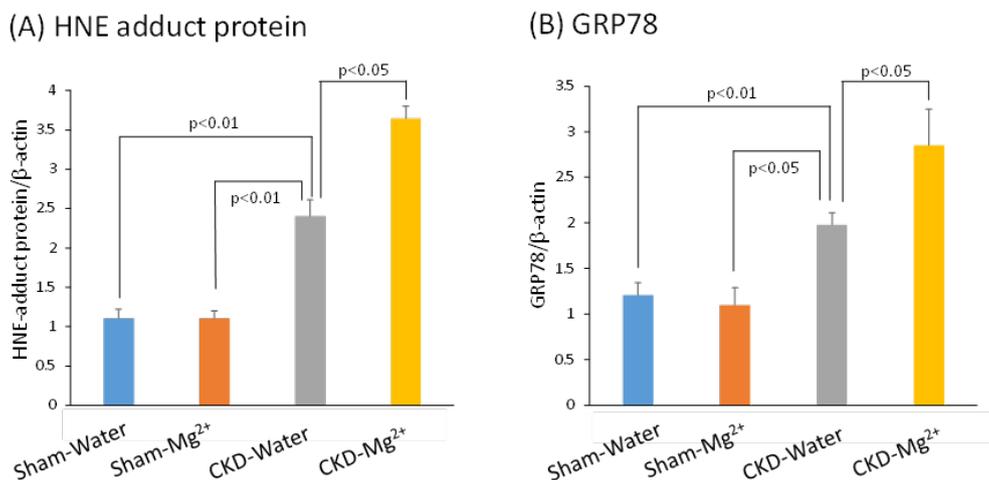


Figure 3. Induction of stress response in the hippocampus of CKD mice.

(A) The amount of HNE-adduct protein was assessed by densitometric analysis, and quantitative data were expressed as the ratio of the band intensity of HNE-adduct protein to the band intensity of β-actin.

(B) The amount of GRP78 was assessed by densitometric analysis, and quantitative data were expressed as the ratio of the band intensity of GRP78 to the band intensity of β-actin. Each value represents the mean ± SD. N = 4-5.

Mg 摂取が、記憶・学習において中心的な役割をしている脳部位である海馬の細胞内ストレスレベルの変化について Western blot 法を用いて検討した (Fig. 3)。海馬の酸化ストレスレベルを解析するために、4-hydroxynonenal (HNE) 付加タンパク質の発現変化を検討した。これまでに報告されているように、CKD-Water 群の HNE 付加タンパク質の発現レベルは、Sham-Water 群と比較し有意に増加した。また、CKD- Mg²⁺群の HNE 付加タンパク質の発現レベルは、CKD-Water 群と比較して、有意に増加した。さらに、HNE 付加タンパク質の発現レベルが増加する細胞の同定を行うため、神経細胞を特異的に染色する蛍光 Nissl 染色液と抗 HNE 抗体を用いた免疫染色を同時に行ったところ、HNE 付加タンパク質を発現した細胞は Nissl 陽性細胞と一致した。そのため、HNE 付加タンパク質の増加は CKD マウスの海馬神経細胞で生じていることが明らかとなった。

最後に、小胞体ストレスマーカータンパク質のひとつである Glucose Regulated Protein (GRP) 78 の発現レベルを Western blot 法を用いて検討した。ここでも、これまでに報告されているように、CKD-Water 群の海馬での GRP78 の発現レベルは、Sham-Water 群と比較し有意に増加した。また、HNE 付加タンパク質の発現変化と同様に、CKD- Mg²⁺群の海馬での GRP78 の発現レベルは、CKD-Water 群と比較し、有意に増加した。以上の結果のように、高用量の Mg²⁺摂取は腎機能低下に伴い CKD マウスの海馬でのストレスレベルを増加させることが明らかとなった。

4. 今後の課題

本研究成果により、代表的な CKD モデルマウスのひとつである 5/6 腎摘出マウスでは血清マグネシウム値の低下 (低 Mg²⁺血症) が生じないため、高用量の Mg²⁺の持続的な摂取は腎機能障害の悪化を誘発し、海馬内の酸化ストレスおよび小胞体ストレスレベルの増加を引き起こすことが明らかとなった。今後、5/6 腎摘出マウス以外のモデルマウスや尿毒症マウスでの高用量 Mg²⁺摂取の影響の解明や低用量の Mg²⁺が及ぼす影響についても解析する必

要があるものの、血清マグネシウム値は CKD 誘発性の海馬機能障害の増悪する要因となることが示唆された。そのため、薬物や食品の摂取に伴う血清 Mg²⁺濃度の管理が CKD 誘発性の認知症を予防、管理または治療する上で重要であることが明らかとなった。

5. 文献

1. エビデンスに基づく CKD 診療ガイドライン 2018
2. 平成 28 年 (2016) 人口動態統計 (確定数) の概況 (厚生労働省)
3. 腎疾患対策検討会報告書 (厚生労働省)
4. Nasser MT et al., Assessment of cognitive dysfunction in kidney disease. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2012;23:1208-1214
5. Zammit AR, et al., Cognitive Impairment and Dementia in Older Adults With Chronic Kidney Disease: A Review. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2016;30:357-366
6. Fujisaki K et al., Cerebral oxidative stress induces spatial working memory dysfunction in uremic mice: neuroprotective effect of tempol. *Nephrol Dial Transplant.* 2014;29: 529-538
7. Kosuge Y et al., Relevance of the hippocampal endoplasmic reticulum stress response in a mouse model of chronic kidney disease. *Neurosci Lett.* 2018 11;677:26-31
8. Oka T et al., Proteinuria-associated renal magnesium wasting leads to hypomagnesemia: a common electrolyte abnormality in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2019;34:1154-1162
9. Kosuge Y et al., S-allyl-L-cysteine selectively protects cultured rat hippocampal neurons from amyloid beta-protein- and tunicamycin-induced neuronal death. *Neuroscience.* 2003;122:885-895.

Elucidation of Cognitive Impairment Induced by Chronic Kidney Disease and Development of Therapeutic Methods Focusing on the Brain Mg²⁺ Contents

Yasuhiro Kosuge¹, Tadashi Saigusa²

¹Laboratory of Pharmacology, School of Pharmacy, Nihon University,

²Department of Pharmacology, School of Dentistry at Matsudo, Nihon University

Summary

Chronic kidney disease (CKD) is characterized by progressive deterioration of renal function. CKD has been recognized as a growing global health problem because of its associated risk of all-cause mortality, cardiovascular disease, and other comorbid diseases. Several clinical studies have demonstrated that CKD is associated with uremic encephalopathy and cognitive impairment. However, the pathological role of CKD in cognitive impairment or dementia is not fully understood. In the present study, the effects of Mg²⁺ intake were investigated in CKD mice.

CKD was induced in male C57BL/6 mice by left nephrectomy and 2/3 electrocoagulation of the right renal cortex. Mice were monitored daily, and body weights and food intake were measured weekly throughout the protocol. Eight weeks after the second renal surgery, the brains were rapidly removed from mice. Blood collected at time of euthanasia was used to measure serum biochemical parameters.

The orally administration of MgCl₂ (1%) did not significantly affect the duration of survival in the CKD mice. There were no significant differences in body weight, food intake and water intake between Mg²⁺-treated CKD mice and vehicle-treated CKD mice. The blood Mg levels in the Mg²⁺-treated CKD mice were significantly higher than those in the vehicle-treated CKD mice. The concentration of blood urea nitrogen (BUN) in Mg²⁺-treated CKD mice were significantly higher than that in CKD mice with vehicle treatment. Western blotting revealed that the expression level of 4-hydroxy-2-nonenal (HNE)-protein adducts, a hallmark of oxidative stress, and glucose-regulated protein 78 (GRP78), a typical ER stress marker, were increased in the hippocampus of CKD mice. These stress levels were climbed under the influence of Mg²⁺ in CKD mice. These results suggest that high Mg²⁺ intake acts as a worsening factor for CKD-induced hippocampal impairment through exacerbated renal impairment.