

## マグネシウムがもたらす健康長寿の細胞生物学的機序の解明

山本 毅士

大阪大学大学院医学系研究科腎臓内科学

**概要** 慢性腎臓病(CKD)は、高血圧や糖尿病といった生活習慣病・心不全・悪性腫瘍とともに、サルコペニア(筋肉量減少・筋力低下)を引き起こす疾患の1つである。サルコペニアは、日常生活動作を低下させ、転倒骨折・誤嚥・心血管疾患の増加に深く関わり医療経済を圧迫する要因であるが、その病態解明は進んでおらず有効な対策・治療法が確立していない。オートファジーは、細胞質成分分解の総称であり、細胞恒常性維持に働き疾患に対抗する。

筆者らの検討により、老化や肥満、慢性腎臓病の一部ではオートファジーの役割がより重要になるにもかかわらず、オートファジー-リソソーム系後期段階が停滞し、疾患に十分対抗できないことが判明している。本研究では、リンとマグネシウムという2つのミネラルに着目し、「マグネシウムによるオートファジー調節により高リン毒性は解除できる」という仮説をたて、高リン負荷がサルコペニアに及ぼす影響を解明し、オートファジー不全を解消し筋力低下を抑制する分子(オートファジーを負に制御する因子 **Rubicon** のノックアウト)を模索し、食(マグネシウム)とオートファジーを通じて、筋力維持、ひいては健康長寿につなげることを目的とした。

その結果、①CKDにおけるウレミックサルコペニアにおいて骨格筋のオートファジー活性が上昇し筋力維持に寄与すること、②高リン負荷は、全身の種々の臓器で **Rubicon** を増加させ、オートファジー後期段階の障害をもたらすこと、③全身における **Rubicon** の抑制は高リン負荷による筋力低下を予防すること、④低マグネシウム食は高リン毒性を増悪させるがその充足によって筋力維持につながることを見出した。

本研究は、**Rubicon** を中心に捉え高リン毒性の病態を解明し、それに基づいた対策として食品成分マグネシウムの有効性の確立・提唱まで視野に入れた「食生活と健康」に直結した研究課題であり、急務であるサルコペニア対策、そして超高齢化社会における健康長寿実現に新たな視点と可能性を提供する。

### 1. 研究目的

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

その病態解明は十分には進んでおらず有効な対策・治療法が確立していない。

一般的にサルコペニア発症のメカニズムは、骨格筋細胞内のタンパク分解と産生のバランスの異常の他、筋サテライト細胞や神経筋接合部の異常などがあげられる。その中で、タンパク分解機構には、ユビキチン・プロテアソーム系、オートファジー、カルパイン、カスパーゼがあり、このうちユビキチン・プロテアソーム系の研究が最も進んでいる<sup>1-3)</sup>。一方、オートファジーは、細胞質成分分解の総称であり、細胞恒常性維持に働き疾患に対抗する<sup>4)</sup>。

筆者らの検討により、老化や肥満、CKDの一部ではオートファジーの役割がより重要になるにもかかわらず、オートファジー-リソソーム系の後期段階が停滞し、疾患に十分対抗できないことが判明している<sup>5-8)</sup>。吉森らが2009年に同定した Rubicon は、オートファゴソームとリソソームの融合の抑制を通じてオートファジーを負に制御する稀な制御因子であり、その発現量によりオートファジーは活性調節を受ける<sup>9)</sup>。さらに吉森らは線虫やハエを用いた研究により Rubicon が加齢によって増加し、加齢によるオートファジー低下の主因となること、Rubicon 発現抑制により寿命が延伸し、かつ加齢による活動量低下を抑制することを明らかとした<sup>10)</sup>。

近年、血清リン濃度上昇が心血管疾患や死亡のリスクを増大させることが明らかとなり、リン管理が健康長寿を支える上で重要であることが解明されてきた。筆者らは、CKDにおける高リン腎毒性に着目し、オートファジーがミトコンドリア品質管理を介して腎保護に寄与する<sup>11)</sup>、しかしながら、次第にオートファジー後期段階の障害を起し、オートファジーの保護作用を打ち消してしまうことを見出した(論文投稿準備中)。坂口らは、これまでマグネシウムの基礎・臨床研究を世界に先駆けて行い、1)CKD患者の腎不全進行リスクは血中高リン・低マグネシウム値の患者群で上昇すること、2)高リン負荷による尿細管細胞死が低マグネシウム濃度下で増悪すること<sup>12)</sup>、3)低マグネシウム食はP負荷によるマウス腎障害を悪化させること<sup>13)</sup>、さらに最近、4)マグネシウムがCKD患者の血管石灰化を抑制する<sup>14)</sup>などを報告し、高リン毒性に対するマグネシウムの保護効果を報告してきた。

そこで本研究では、リンとマグネシウムという2つのミネラルに着目し、「マグネシウムによるオートファジー調節により高リン毒性は解除できる」という仮説をたて、高リン負荷がCKD患者のサルコペニアに及ぼす影響を解明し、オートファジー不全を解消し筋力低下を抑制する分子(Rubicon ノックアウトが候補)を模索し、食(マグネシウムが候補)とオートファジーを通じて、筋力維持、ひいては健康長寿実現につなげることを目的とした。

## 2. 研究方法

### 2.1 マウス

骨格筋で Cre リコンビナーゼを特異的に発現するタモキシフェン誘導性 ACTA1-cre/Esr1 マウスと Atg5 flox マウ

スを交配して骨格筋特異的 Atg5 ノックアウトマウス(オートファジー不全)を作成した。同様に、ACTA1-cre/Esr1 マウスと Rubicon flox マウスを交配してタモキシフェン誘導性骨格筋特異的 Rubicon ノックアウトマウスを作製した。近位尿細管特異的 Rubicon ノックアウトマウスは、以前筆者らが以前に作製した<sup>15)</sup>。全身 Rubicon ノックアウトマウスは、以前に吉森らが作製したマウスを用いた<sup>10)</sup>。コントロールマウスはそれぞれ対照となる Atg5 flox, Rubicon flox, 野生型相当のマウスを使用した。雄マウスのみを被験動物として使用した。マウスには水と標準的なマウス用餌(リン・マグネシウムの負荷試験を除く)を自由に摂食させた。それぞれの研究目的に合わせた処置あるいは負荷を行ったマウスを麻酔下で解剖し、採血・採尿を行った。PBS (pH7.4)でマウスを経心的に灌流し筋肉と腎臓を採取した。摘出した筋肉あるいは腎臓をスライスし、4%PFA(パラホルムアルデヒド)で後固定し、パラフィンに包埋するか、OCT コンパウンドで凍結し、筋肉あるいは腎皮質の切片試料とした。切片試料をHE染色(筋)あるいはPAS(Periodic acid-Schiff)染色(腎)し、光学顕微鏡で観察した。

### 2.2 マウスにおけるオートファジー活性の測定

オートファジー研究が急速な発展を遂げている一方で、生体内オートファジーモニター法にはまだ課題が多く、オートファゴソーム数や LC3-II 増加は無条件にオートファジー活性化を示しているわけではなく、オートファジーとリソソームの融合不全やリソソーム機能障害といった後期段階のブロックを示している可能性もある。筆者らはこの注意点をクリアし、マウスに対して解剖の6時間前にリソソーム阻害薬であるクロロキンを投与し、投与ありと投与なしの LC3-II の差を評価する方法を用い、マウス in vivo オートファジーフラックスアッセイを確立した<sup>5)</sup>。本研究では、この評価方法を用いて、マウスのオートファジー活性を評価した。

### 2.3 握力測定 (grip test)

握力測定法は、低侵襲で繰り返し測定可能であることや速筋成分の筋力を反映するという点で重要であるが、従来の握力測定法では、検査慣れ等の因子が測定結果のばらつきを生じさせる問題があった。竹下ひかり研究員らは、この問題を解決する目的で従来法を改変し新規握力測定法を開発し、その信頼性と有効性を従来法との比較により検討し報告している<sup>16)</sup>。本研究では、新規握力測

定法を用いて、実験マウスに対し、2 日間、一日につき 6 回ずつ施行した。

## 2. 4 免疫染色・ウエスタンブロットング・抗体/統計解析

通常に行われる実験方法および統計解析については、当研究室における従来通りの方法を用いた<sup>5, 6, 10, 11)</sup>。

## 3. 研究結果

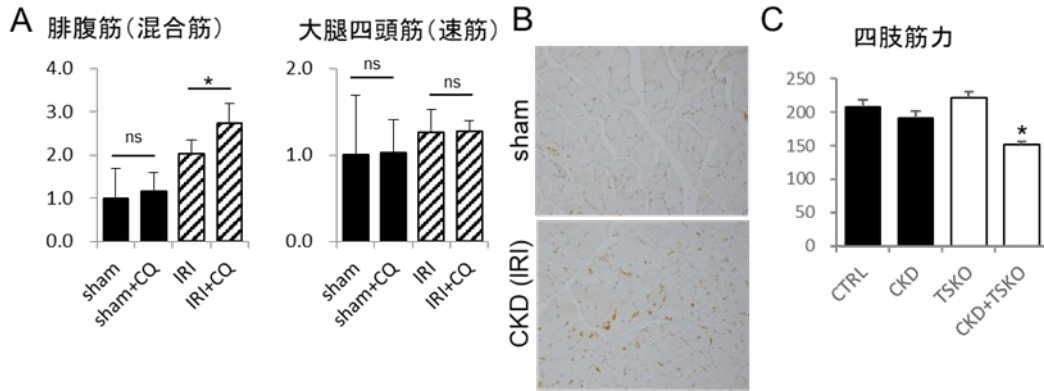
### 3. 1 ウレミックサルコペニアにおけるオートファジーの役割の検討

オートファジーは、自己の細胞質構成成分(タンパク、脂質、細胞内小器官など)をリソソーム内で分解するシステムである<sup>4)</sup>。飢餓時や細胞内小器官が傷害を受けた場合、分解されるべき物質を包み込むように膜が取り囲む(オートファゴソーム)。オートファゴソームはリソソームと融合し(オートリソソーム)、リソソームの加水分解酵素群により内包物が分解され、分解産物は細胞に必要なタンパク合成やエネルギー源として再利用される。オートファジーは、飢餓や種々のストレスに応じて活性化され、飢餓応答や細胞内恒常性維持などを通じて、様々な病態に対抗することが明らかとなっている。特に、骨格筋特異的オートファジー不全マウスは、骨格筋量と筋線維のサイズが有意に小さくなる<sup>17)</sup>。

本研究では、第一に、ウレミックサルコペニアにおける骨格筋オートファジーの活性と役割を解明すべく、実験マウスを用いて検討を行った。5/6 腎摘による CKD マウスが有名で頻用されるが、腎部分切除の手技によりマウスの術後死亡がしばしば生じてしまうこと、生存したマウスにおいても腎不全の程度がばらつくことが多いため、まず、腎不全の程度が安定した CKD マウスモデルを確立するために、片側腎虚血再灌流および 1 週間後対側腎摘出により腎不全状態とした。最適な虚血時間についても検討を行い、野生型マウスを用いた 45 分間虚血再灌流および

対側腎摘モデルにおいて、継続的な腎機能低下および腎間質の線維化を認めた。腎機能障害は全てのマウスでほぼ同程度であり、手技の正確性や再現性の点からも CKD モデル長期観察に適していることを確認した。このようにして確立した CKD モデルマウスにおいて、筋重量・筋力の低下と骨格筋細胞サイズの縮小を認めた。次に、同マウスの下肢筋におけるオートファジー活性を評価した。遅筋(ヒラメ筋)ではオートファジー活性が亢進していたが、速筋(大腿四頭筋)ではクロロキン投与の有無で明らかな変化がなくオートファジー活性は見られなかった(**Fig.1A**)。オートファジー活性を考えるうえで、分解されるべき基質の量と、それを十分に分解できる活性のバランスを意識することが重要である。p62(SQSTM1)はオートファジーの選択的基質のひとつで、p62 陽性タンパク凝集塊の蓄積は、オートファジー活性が不十分であることを意味する<sup>18)</sup>。オートファジー活性が亢進していたヒラメ筋の細胞質には p62 陽性のタンパク凝集塊が散見され、オートファジーの活性化が必要な状態であるにもかかわらず相対的に不十分であることが示唆された(**Fig.1B**)。

続いて、ウレミックサルコペニアにおけるオートファジーの役割を検討すべく、新たにタモキシフェン誘導性骨格筋特異的オートファジー不全マウスを作製した。まずタモキシフェン投与後、同マウス骨格筋において p62 が蓄積し、オートファジーが欠損していることを確認した。このマウスを片側腎虚血再灌流および対側腎摘出により腎不全状態にした CKD モデルとし 1 年齢まで飼育し握力測定と組織の観察を行ったところ、骨格筋特異的オートファジー不全マウスでは筋力低下などサルコペニアの悪化を示唆する所見が得られた。このことは、骨格筋オートファジーがウレミックサルコペニアに対抗して防御的に働くことを示している(**Fig.1C**)。



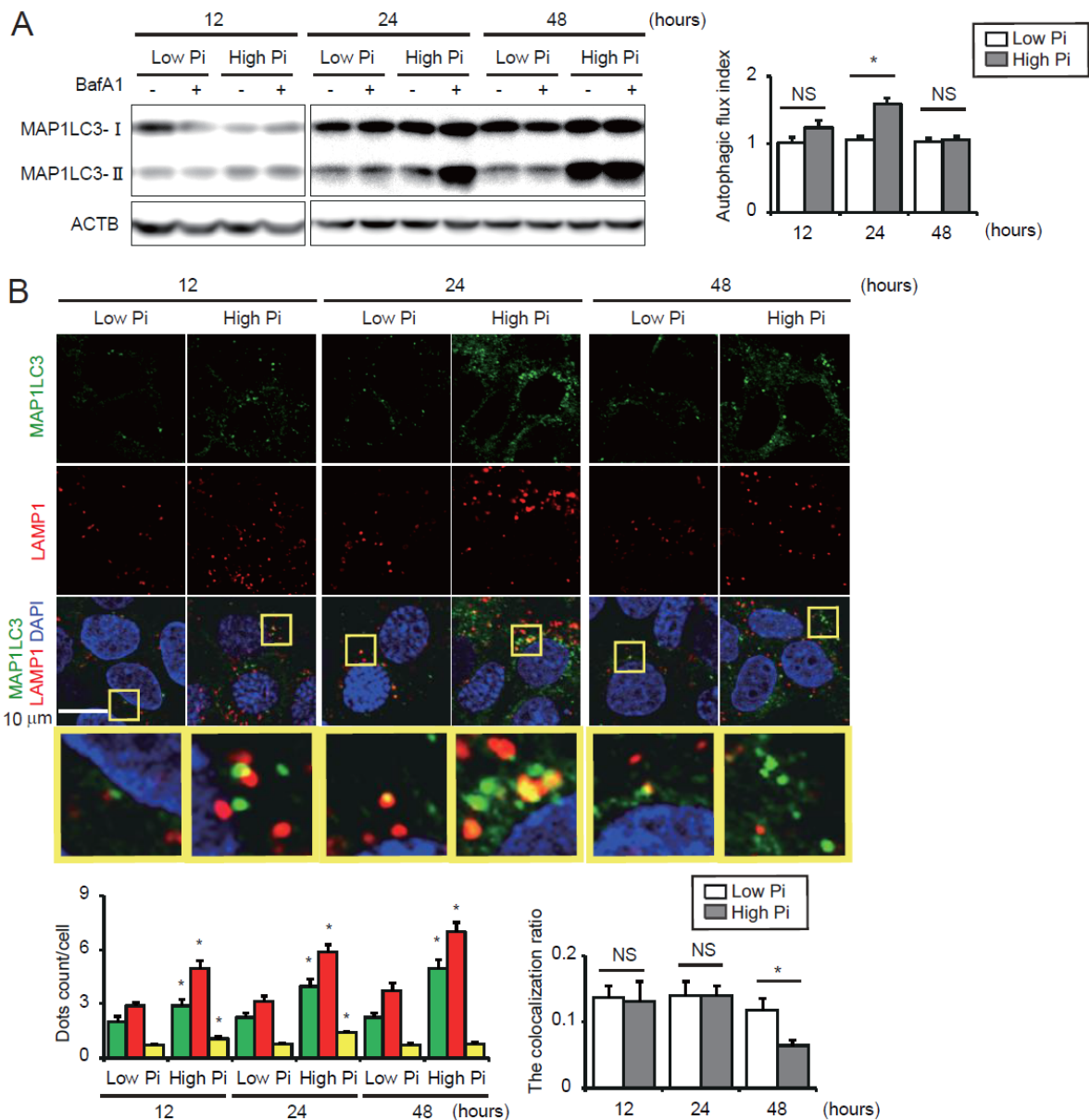
**Fig.1** CKD マウスの下肢筋におけるオートファジー活性

- (A) 腎虚血再灌流 (IRI 45 分) + 対側片腎摘の 4 週間後に腓腹筋(混合筋)および大腿四頭筋(速筋)のオートファジー活性(クロロキンの(CQ)投与の有無による LC3-II の差)を評価。
- (B) 同 CKD モデルヒラメ筋の p62 免疫染色。
- (C) 同 CKD モデルの筋力低下は骨格筋特異的オートファジー不全(TSKO)で増悪する。

### 3. 2 高リン負荷がオートファジーリソソーム系に及ぼす影響の検討

上述の CKD モデルでは、継続的な腎機能低下および間質の線維化を認めたが、なにかしらの尿毒性物質によって筋力低下(ウレミックサルコペニア)を呈するのにも、1 年程度までの飼育を要した。一方で、CKD 患者は個体レベルで、サルコペニアのみならず、認知症・心血管疾患・骨粗鬆症・皮膚萎縮などの老化が実年齢以上に進行した状態となっており、「腎性早老症」という概念が提唱されている。その機序として、CKD において体内に蓄積するリンが腎性早老症を引き起こす可能性、言い換えるとリンが最大の尿毒症物質と考えられている。CKD 患者において高リン血症は頻度の高い合併症であり、総死亡および心血管疾患発症の独立した危険因子である。さらに CKD 進行に伴い腎尿細管におけるリン負荷が増大し、さらなる腎障害進展に寄与する。以上より、筆者らは、CKD における高

リン腎毒性に着目し、片腎摘 高リン負荷 CKD モデルマウスの解析を開始した。まず、近位尿細管のオートファジー(特に、傷害ミトコンドリアを除去するマイトファジー)が亢進しミトコンドリア品質管理を介して腎保護に働くことを報告した<sup>11)</sup>。このように高リン負荷によりオートファジー(マイトファジー)が亢進した腎では、p62 タンパクが増加しており、ここでもやはりオートファジー活性化が必要な状態であるにもかかわらず相対的に不十分であることが示唆された。筆者らが樹立した野生型近位尿細管培養細胞に、リン負荷(2.5 mM)を行い、オートファジー活性(LC3-II)を検討したところ、オートファジーは一旦活性化するものの、長時間のリン負荷ではその活性が消失することが判明した(**Fig.2A**)。免疫染色を用いた評価により、長時間リン負荷にさらされた培養細胞では、次第にオートファジー後期段階のオートファゴソームとリソソームの融合不全を起こしてしまうことを見出した(**Fig.2B**)。



**Fig.2** 高リン負荷によるオートファゴソームとリソソームの融合不全

野生型近位尿細管培養細胞にリン負荷(2.5 mM)を行い、オートファジー活性(LC3-II)を検討した

(A) 高リン負荷 24 時間ではオートファジーが亢進するが、48 時間ではオートファジーが停滞する。

(B) 高リン負荷により、次第にオートファゴソームとリソソームの融合不全を生じる。

### 3. 3 高リン負荷による Rubicon 増加とサルコペニア

吉森らは、オートファゴソームとリソソームの融合抑制を通じてオートファジーを負に制御する因子 Rubicon を同定していたため、高リン負荷における Rubicon に着目した。筆者らのこれまでの検討により、高リン負荷により腎臓や肝臓において Rubicon のタンパク発現量が増加しオートファジー不全が生じること、近位尿細管特異的に Rubicon をノックアウトすると高リン負荷による腎尿細管障害が改善

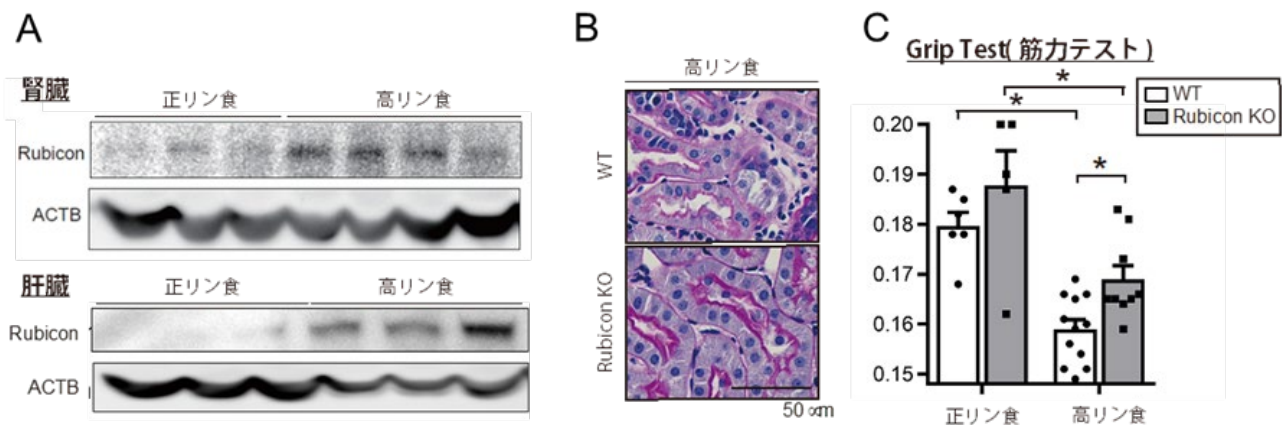
することが明らかとなっている(Fig.3A, B)。そこで続いて、全身 Rubicon ノックアウトマウスと野生型コントロールマウスに対し、8 週齢より高リン負荷(リン 2%)を 3 ヶ月間行い grip test により筋力を評価したところ、高リン負荷により筋力低下が起こること、全身 Rubicon ノックアウトマウスでは筋力低下が緩和されることを見出した(Fig.3C)。実際、全身 Rubicon ノックアウトマウスでは前脛骨筋や腓腹筋の筋肉重量が維持されていた。以上により、全身における

Rubicon 発現抑制が、高リン負荷による筋力低下を抑制できることが判明した。今後、全身 Rubicon ノックアウトマウス数を増やし、心筋と筋(前脛骨筋・長趾伸筋・腓腹筋・ひらめ筋)、腎臓などの臓器障害を評価する予定である。具体的には、筋線維面積(WGA 染色)、線維化(Masson-trichrome, ColI 染色)、炎症(F4/80 染色)、ミトコンドリア機能(COX, SDH 染色)、リソソーム形態・機能(電顕・カテプシン D)評価、mRNA 発現(炎症関連 IL-6、筋肉特異的ユビキチンリガーゼ MuRF-1、Atrogin-1、サルコペニア促進 Myostatin、Activin A、細胞老化 p16、p21 など)の評価を行う予定である。

### 3. 4 骨格筋特異的 Rubicon ノックアウトマウスの解析

高リン負荷において Rubicon ノックアウトがサルコペニア改善に寄与することが判明したため、骨格筋で Cre リコンビナーゼを特異的に発現するタモキシフェン誘導性 ACTA1-cre/Esr1 マウスと Rubicon flox マウスを交配して骨格筋特異的 Rubicon ノックアウトマウスを作成した。コントロールマウスは Rubicon flox マウスを使用した。8 週齢でタモキシフェンを投与し Cre 誘導後(コントロールマウスにも同様にタモキシフェンを投与した)、12 週齢より 3 ヶ月間

2%リンの負荷を施し筋力評価を行った。本実験では、コントロールマウスにおいても高リン負荷による筋力低下が乏しかったため、骨格筋特異的 Rubicon ノックアウトによって筋力低下を緩和する効果は認められず、むしろ骨格筋特異的 Rubicon ノックアウトマウスで筋力の低下傾向を認めた。タモキシフェンによる影響(タモキシフェンによる筋保持効果の可能性)を除外することはできないが、2%リン 3 ヶ月負荷では筋力低下効果が乏しいと判断し、尿ヘリン排泄を低下させより高リン血症に近い状態とするために片腎摘を行った上で高リン負荷とする方法で追加の検証を行った。7 週齢で片腎摘を施行し 1 週間後より 1.29%リン食(コントロールの正リン群は 0.29%リン食)を 1 ヶ月負荷した。マウス数が十分に確保できなかったことも原因の可能性もあるが、本モデルでも高リンによる筋力低下が弱く、骨格筋特異的 Rubicon ノックアウトに筋力低下を緩和する効果は認められなかった。以上の実験により、骨格筋特異的に Rubicon をノックアウトすることが、軽度の筋力低下に対して必ずしも保護的に働くとは限らないことを示している。



**Fig.3** 高リン負荷による Rubicon の増加と Rubicon ノックアウトによる筋力の改善

- (A) 高リン負荷により腎臓・肝臓において Rubicon の蛋白発現が増加する。
- (B) 高リン負荷による腎臓傷害は Rubicon 欠損により改善する。
- (C) 高リン負荷による筋力低下は Rubicon 欠損により改善する。

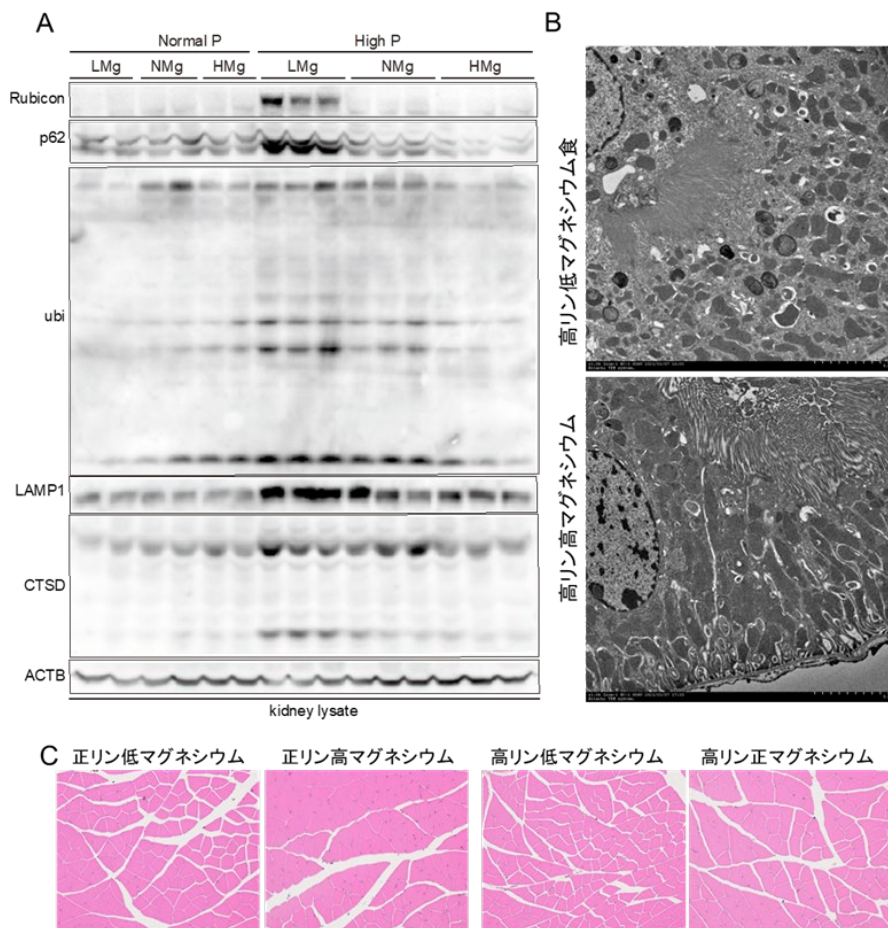


### 3.5 マグネシウムによる高リン毒性解除

低マグネシウム血症は、CKD 患者において最も頻度の高い電解質異常であり、進行した CKD 患者の約 15% に低マグネシウム血症が存在する、また尿蛋白による尿細管障害というありふれた病態自体が低マグネシウム血症のリスクとなり、腎障害進展に向かう悪循環に陥る<sup>19)</sup>。さらに、低マグネシウム血症は CKD 患者の腎機能低下や透析患者の死亡リスク上昇と関連する<sup>12, 13)</sup>。

そこで本研究の最後に、片腎摘野生型マウスに対して、正(リン = 0.29%) or 高リン(リン = 1.29%) × 低(マグネシウム = 0.01%) or 正(マグネシウム = 0.05%) or 高マグネシウム(マグネシウム = 0.2%) 食を与え、腎機能・腎組織障害に加え、筋力測定・筋組織の評価を行った。まず、興味深いことに、高リン低マグネシウム食は Rubicon を著増させ、

オートファゴソームとリソソームの融合不全からオートファゴソーム・p62・ユビキチンの蓄積を起こした。リソソームの数・機能は亢進していた。それに対し、マグネシウムを充足させるとこれらのオートファジー障害と腎尿細管障害・炎症所見が改善した(Fig.4)。高リン低マグネシウム食負荷群では、腎臓におけるオートファジー障害・腎尿細管障害に加え、筋力低下・骨格筋重量・筋線維のサイズ低下が認められたが、マグネシウム補充によってこれらは有意に改善した。マグネシウムの充足により、全身における Rubicon 増加が適切なレベルにまで抑制され、全身の高リン毒性が解除された可能性が推測された。今後、各臓器における Rubicon 発現、オートファジー活性、筋線維化などの評価を追加する予定である。



**Fig.4** マグネシウム充足は、高リン負荷による腎オートファジー不全と筋サイズ低下を軽減する

- (A) 高リン低マグネシウム食は Rubicon を著増させ、オートファゴソームとリソソームの融合不全からオートファゴソーム・p62・ユビキチンの蓄積を起こす。
- (B) 高リン低マグネシウム食による融合不全はマグネシウム補充により改善する。
- (C) 高リン低マグネシウム食による筋サイズ低下はマグネシウム補充により改善する。

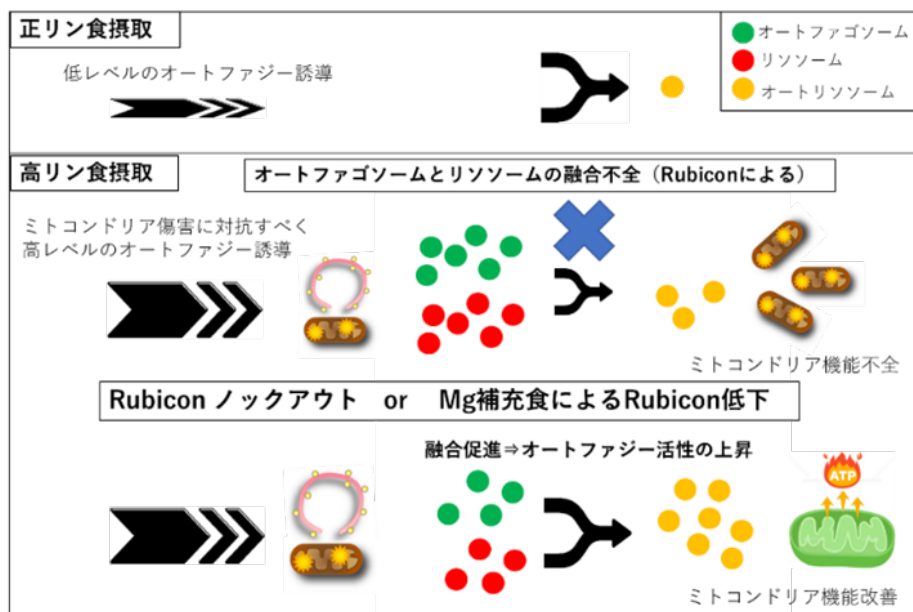


Fig.5 マグネシウム充足は Rubicon 抑制を介したオートファジー活性化により高リン負荷毒性を軽減する

#### 4. 考察

本研究では、①CKD におけるウレミックサルコペニアにおいて骨格筋のオートファジー活性が上昇し、筋力維持に寄与すること、②高リン負荷は、全身の種々の臓器で Rubicon を増加させ、オートファジー後期段階の障害をもたらすこと、③全身における Rubicon の抑制は高リン負荷による筋力低下を予防すること、④低マグネシウム食は高リン毒性を増悪させるが、その充足によって筋力維持につながることを見出した。今後、さらなる詳細な検討、および他の研究グループからの報告も待たねばならないが、本研究で得られた知見は、老化・アンチエイジングに対する波及効果があり、今後さらなる高齢社会を迎えるわが国において社会へのインパクトは極めて大きいものと考えられる。

骨格筋特異的オートファジー不全マウスは、骨格筋量と筋線維のサイズが有意に小さくなる<sup>17)</sup>。加齢に伴う骨格筋オートファジー活性の変化は、報告によってばらつきがあるが、加齢とともに骨格筋の p62 が増加しオートファジー不全が存在することが示唆されている<sup>20)</sup>。また、オートファジーを亢進させる sestrin を強発現すると、加齢や廃用性の筋萎縮が抑制される<sup>21)</sup>。今回の筆者らのデータを裏付けるように、血液透析患者の筋組織においても p62 タンパク量が増加していることが報告されている<sup>22)</sup>。では、CKD

下の骨格筋でオートファジー活性が不十分になってしまうのはなぜだろうか。高リン下では mTOR 経路が活性化することでオートファジー前期段階の抑制が生じ、骨格筋細胞の老化やサルコペニアの悪化につながる事が報告されている<sup>23)</sup>。また、5/6 腎摘による CKD マウスでは AMP/ATP 比が上昇しているにもかかわらず、AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) の活性化が、筋肉や腎臓において抑制されていることが報告されている<sup>24)</sup>。AMPK の活性化はオートファジー前期段階の強力な誘導因子なので、エネルギー欠乏状態の感受性低下がオートファジー不全の原因である可能性がある。

これまでオートファジーを扱った多くの基礎研究では、人工的にオートファジー (オートファゴソーム形成の前期段階) を不全にしたマウス (Atg5 ノックアウト) が使用され、酵母から哺乳類におけるオートファジーの重要な役割が証明されてきたが、筆者らの検討により、老化や高脂肪食負荷肥満・糖毒性により、さらにヒト肥満患者でも、特にオートファジー後期段階の不具合によりオートファジー調節不全 (病態に対抗するために必要な活性が不十分である状態) が生じ、病理病態に寄与していることが判明した。つまりこれまでのオートファジー研究の成果は、空想上のものではなく人々の健康・実臨床に深く関係することを証明してきた<sup>5,6,25)</sup>。吉森保教授は、オートファジーの負の



制御因子 Rubicon を世界で初めて同定し<sup>9)</sup>, 加齢に伴い全身の種々の臓器で Rubicon が増加すること, Rubicon を抑制するとオートファジーが活発化し加齢に伴う老化現象の改善と寿命延伸が見られることを報告した<sup>10)</sup>。今回の筆者らの検討でも, 期待通り, 全身における Rubicon ノックアウトが高リン負荷マウスのサルコペニア改善にも寄与することが判明した。高リン負荷食による Rubicon 発現増加の詳細な機序や臓器による違いを, 現在検討中である。

当初, 骨格筋特異的に Rubicon を阻害することによって, オートファジーの進行を促し, 筋力低下を軽減すると期待したが, 今回の筆者らの検討では必ずしも有効ではなかった。これは, まず高リン負荷による筋力低下の程度が軽微であったことが原因として挙げられる。今回の研究 3.2~3.4 で使用した高リン負荷食は, マグネシウムはマウスにとって十分量が含有されていることから, 想定した高リン毒性を発揮しなかった可能性がある。あるいは, 種差, 性差(雌雄間)・若老齢間の差, 病態やストレス状況, 臓器ごとで Rubicon の役割が大きく異なることが一因かもしれない。例えば, 脂肪細胞では, 他の多くの臓器と異なり, 老化に伴い Rubicon が減少してオートファジー過剰となり, そのことが原因で脂肪細胞機能を低下させ, 糖尿病や脂肪肝などの生活習慣病の原因になりうること, 精巢のセルトリ細胞と呼ばれる支持細胞で Rubicon がオートファジーを抑制し, 精子形成の維持に必須のタンパク質 GATA4 の分解を抑えることで, 精子形成の維持に必須であることを報告している<sup>26,27)</sup>。腎臓に関しては, 筆者らの研究室で作製した近位尿細管特異的 Rubicon ノックアウトマウスは, オートファジーは亢進するものの, 虚血などの急性ストレスに対し, 通常マウスと比較して特に腎が守られるわけではないということ, むしろ, 長期間飼育するとメタボリックシンドロームを呈することがわかっている<sup>15)</sup>。これらの研究から得られた結果は, 「オートファジー活性化=(常に)良いこと」とする考え方が単純すぎることを意味している。おそらく Rubicon はオートファジーが暴走しないようなブレーキの役割を担っていると考えられる。あるいはまた, 腎障害・腎不全の程度, すなわちサルコペニアを促進する尿毒素物質の差こそが, ウレミックサルコペニアの発症進展に大きな影響を与えるため, 骨格筋における Rubicon とオートファジー活性の影響が小さかった(必要以上に生じる分解亢進がむしろ有害であった)可能性も考えられる。実際,

最近の報告では, 複数の CKD モデルマウスと CKD 患者において, Activin A の産生亢進と血中濃度上昇を認め, Activin A の阻害がサルコペニアを抑制することから, Activin A が致命的にウレミックサルコペニアを促進させることが報告され注目されている<sup>28)</sup>。

オートファジーの観点から, もうひとつの解明すべき課題は, 骨格筋オートファジーが何を基質にしているかという点である。オートファジーは特定の細胞内小器官を分解することが知られており, 傷害ミトコンドリアを選択的に分解するマイトファジーがよく知られている。CKD 患者のモデル動物の骨格筋細胞では, ミトコンドリアの形態異常や機能障害が報告されている<sup>29)</sup>。マウスから単離したミトコンドリアに尿毒素を添加し, ミトコンドリア機能を調べた報告では, 酸化的リン酸化能の低下や ROS の産生増加, 種々のデヒドロゲナーゼの活性低下を認めた<sup>30)</sup>。尿毒素の中でも特に毒性が高いとされる, インドキシル硫酸を C2C12 細胞に添加し, 代謝変化をメタボローム解析で調べた報告では, 解糖系への遷移, TCA サイクルの低下, ATP 量の減少などのミトコンドリア機能障害を認めている<sup>31)</sup>。さらに, インドキシル硫酸が PGC1 $\alpha$  の低下を介してミトコンドリア傷害をもたらすとの報告もある<sup>32)</sup>。これらの報告は, 骨格筋オートファジーが CKD 状態で傷害されたミトコンドリアを選択的に基質として分解している可能性を想起させる。実際, CKD 患者の骨格筋において, 電顕による観察でマイトファジーが生じていること, LC3 とミトコンドリアが共局在していること, 単離したミトコンドリアにおいて, BNIP3, PINK1, PARKIN などマイトファジー関連分子が増加していることが報告されている<sup>33)</sup>。筆者らは, これまでに CKD 患者でみられる代謝性アシドーシスや高リン負荷の状態において, 腎尿細管でも活発にマイトファジーが生じていることを観察しており<sup>11,34)</sup>, 今後ウレミックサルコペニアや高リン負荷による筋力低下におけるマイトファジーの関与と役割についてさらに追求したいと考えている (Fig.5)。

現在, オートファジーやマイトファジーを亢進させる薬剤の探索・開発が世界的に進められている。筆者は, オートファジーを本来体に備わっている生体恒常性維持機構と捉え, 人々の食生活や運動を通じてオートファジー活性調節を行うことこそが健康長寿の秘訣と考えている。その観点から, 最近, オートファジー障害を解除する食品成

分を探索し、特に魚食に多く含まれるエイコサペンタエン酸(EPA)がオートファジーを回復し腎脂肪毒性を軽減することを見出した<sup>25)</sup>。抗炎症作用があり、副作用が比較的少ないことから、EPAを含む $\omega$ -3脂肪酸のサルコペニアへの作用が期待されており、骨格筋のミトコンドリアへ好影響を及ぼす可能性がある<sup>35)</sup>。そして、マグネシウムもまた伝統的な日本食やにがりに豊富に含まれる。対照的に、現在わが国でも広く流通している加工食品・ファストフード・コンビニ食などでは、食品添加物に用いられる無機リンの消化管吸収率が極めて高くほぼすべて吸収されてしまう一方、精製過程で大半のマグネシウムが失われてしまう、すなわち高リン低マグネシウム食である。実際、厚生労働省『国民栄養調査』によるとマグネシウム推定摂取量の平均値(男性, 50 - 59 歳)は2002年から2019年の間に299 mgから265 mgへ減少し、推奨量である370 mgを大きく下回っている。このように、リン毒性を増強させる典型的な食事が現代社会に広く流布しており、今後改めて、マグネシウムの有効性の確立・提唱を推進していきたい。

本研究では、『マグネシウムがもたらす健康長寿の細胞生物学的機序』の一端を明らかにすることができたが、今後、さらにオートファジー研究が進展し、高リン毒性の本態とマグネシウムによるリン毒性軽減の機序が解明され、CKD患者の予後改善、超高齢化社会における健康長寿に寄与することが望まれる。

本研究の内容の一部は、『マグネシウムは Rubicon 抑制を介したオートファジー活性化により高リン腎毒性を軽減する』“Magnesium attenuates phosphate-induced kidney injury by inhibiting Rubicon and restoring autophagic activity.”として、第64回日本腎臓学会学術総会および第11回分子腎臓フォーラムで発表した。本研究の計画立案・実施にあたっては、大阪大学大学院腎臓内科学の高島義嗣講師に多くのご指導をいただいた。共同研究者は、マウス実験を主に実施した大阪大学大学院腎臓内科学の中村隼大学院生・松田潤医員、筋力測定・サルコペニア研究では大阪大学大学院老年総合内科学の竹下ひかり研究員、マグネシウム研究では大阪大学大学院腎疾患臓器連関制御学の坂口悠介助教、オートファジー研究では大阪大学大学院遺伝学吉森保教授より、それぞれご助言・ご指導をいただいた。この場を借りて深く感謝申し上げます。

## 6. 文献

1. Sakuma K, et al. Molecular mechanism of sarcopenia and cachexia: recent research advances. *Pflugers Arch.* 2017;469(5-6):573-591.
2. Kitajima Y, et al. The ubiquitin-proteasome system in regulation of the skeletal muscle homeostasis and atrophy: from basic science to disorders. *J Physiol Sci.* 2020;70(1):40.
3. Wiedmer P, et al. Sarcopenia - Molecular mechanisms and open questions. *Ageing Res Rev.* 2021;65:101200.
4. Mizushima N, Levine B. Autophagy in Human Diseases. *N Engl J Med.* 2020;383(16):1564-1576.
5. Yamamoto T, et al. Time-dependent dysregulation of autophagy: Implications in aging and mitochondrial homeostasis in the kidney proximal tubule. *Autophagy.* 2016;12(5):801-813.
6. Yamamoto T, et al. High-Fat Diet-Induced Lysosomal Dysfunction and Impaired Autophagic Flux Contribute to Lipotoxicity in the Kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(5):1534-1551.
7. Takabatake Y, et al. Stagnation of autophagy: A novel mechanism of renal lipotoxicity. *Autophagy.* 2017;13(4):775-776.
8. Sakai S, et al. Proximal Tubule Autophagy Differs in Type 1 and 2 Diabetes. *J Am Soc Nephrol.* 2019;30(6):929-945.
9. Matsunaga K, et al. Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol.* 2009;11(4):385-396.
10. Nakamura S, et al. Suppression of autophagic activity by Rubicon is a signature of aging. *Nat Commun.* 2019;10(1):847.
11. Fujimura R, et al. Autophagy protects kidney from phosphate-induced mitochondrial injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;524(3):636-642.
12. Sakaguchi Y, et al. Magnesium modifies the association between serum phosphate and the risk of progression to end-stage kidney disease in patients with non-diabetic chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2015;88(4):833-842.

13. Sakaguchi Y, et al. Low magnesium diet aggravates phosphate-induced kidney injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2019;34(8):1310-1319.
14. Sakaguchi Y, et al. A Randomized Trial of Magnesium Oxide and Oral Carbon Adsorbent for Coronary Artery Calcification in Predialysis CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2019.
15. Matsuda J, et al. Metabolic effects of RUBCN/Rubicon deficiency in kidney proximal tubular epithelial cells. *Autophagy*. 2020;1-16.
16. Takeshita H, et al. Modified forelimb grip strength test detects aging-associated physiological decline in skeletal muscle function in male mice. *Sci Rep*. 2017;7:42323.
17. Masiero E, et al. Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metab*. 2009;10(6):507-515.
18. Ichimura Y, Komatsu M. Selective degradation of p62 by autophagy. *Semin Immunopathol*. 2010;32(4):431-436.
19. 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(7):1154-1162.
20. Sakuma K, et al. p62/SQSTM1 but not LC3 is accumulated in sarcopenic muscle of mice. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2016;7(2):204-212.
21. Segales J, et al. Sestrin prevents atrophy of disused and aging muscles by integrating anabolic and catabolic signals. *Nat Commun*. 2020;11(1):189.
22. Aniot J, et al. Muscle wasting in patients with end-stage renal disease or early-stage lung cancer: common mechanisms at work. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2019;10(2):323-337.
23. Sosa P, et al. Hyperphosphatemia Promotes Senescence of Myoblasts by Impairing Autophagy Through Ilk Overexpression, A Possible Mechanism Involved in Sarcopenia. *Aging Dis*. 2018;9(5):769-784.
24. Kikuchi H, et al. Failure to sense energy depletion may be a novel therapeutic target in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2019;95(1):123-137.
25. Yamamoto T, et al. Eicosapentaenoic acid attenuates renal lipotoxicity by restoring autophagic flux. *Autophagy*. 2021;17(7):1700-1713.
26. Yamamuro T, et al. Age-dependent loss of adipose Rubicon promotes metabolic disorders via excess autophagy. *Nat Commun*. 2020;11(1):4150.
27. Yamamuro T, et al. Rubicon prevents autophagic degradation of GATA4 to promote Sertoli cell function. *PLoS Genet*. 2021;17(8):e1009688.
28. Solagna F, et al. Pro-cachectic factors link experimental and human chronic kidney disease to skeletal muscle wasting programs. *J Clin Invest*. 2021;131(11).
29. Takemura K, et al. Mitochondrial Dysfunction in Kidney Disease and Uremic Sarcopenia. *Front Physiol*. 2020;11:565023.
30. Thome T, et al. Uremic metabolites impair skeletal muscle mitochondrial energetics through disruption of the electron transport system and matrix dehydrogenase activity. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2019;317(4):C701-C713.
31. Sato E, et al. Metabolic alterations by indoxyl sulfate in skeletal muscle induce uremic sarcopenia in chronic kidney disease. *Sci Rep*. 2016;6:36618.
32. Enoki Y, et al. Potential therapeutic interventions for chronic kidney disease-associated sarcopenia via indoxyl sulfate-induced mitochondrial dysfunction. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2017;8(5):735-747.
33. Zhang YY, et al. CKD autophagy activation and skeletal muscle atrophy-a preliminary study of mitophagy and inflammation. *Eur J Clin Nutr*. 2019;73(6):950-960.
34. Namba T, et al. Autophagic clearance of mitochondria in the kidney copes with metabolic acidosis. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(10):2254-2266.
35. Tachtsis B, et al. Potential Roles of n-3 PUFAs during Skeletal Muscle Growth and Regeneration. *Nutrients*. 2018;10(3).

# Elucidating the Cellular and Molecular Mechanisms of Magnesium-Mediated Health and Longevity

Takeshi Yamamoto

Department of Nephrology, Osaka University Graduate School of Medicine

## Summary

Chronic kidney disease (CKD) is one of the diseases that cause sarcopenia (loss of muscle mass and muscle weakness), as well as lifestyle-related diseases such as hypertension and diabetes, heart failure and malignant tumours. Sarcopenia reduces activities of daily living and is closely related to an increase in falls, fractures, aspiration and cardiovascular diseases, and is a factor that places pressure on the healthcare economy, but its pathophysiology is not well understood, and effective preventive and therapeutic strategies have not yet been established.

Due to the westernization of diets, the increase in lifestyle-related diseases has become a major problem. Almost all of the inorganic phosphate in "ultra-processed foods" is absorbed, and especially in patients with CKD, excessive phosphate intake is a serious problem because elevated phosphate levels are associated with death, cardiovascular disease, vascular calcification, and progression of renal failure. On the other hand, magnesium is lost in the food processing process. As the effects of imbalance of phosphate and magnesium, phosphate toxicity is enhanced by magnesium-deficiency, but the detailed molecular and/or cellular mechanisms are not clear. We have long studied autophagy, one of the major degradation systems in the cell, and found that autophagy gradually stagnates and is unable to combat diseases in aging and obesity, indicating that regulating autophagy through diets is the key to health and longevity.

In this study, we focused on two dietary minerals, phosphate and magnesium, and hypothesized that high phosphate toxicity can be cancelled by modulating autophagy with magnesium. Therefore, we specifically aimed 1) to explore the effects of high phosphate on autophagy-lysosome pathways and Rubicon; 2) to assess their impacts on the pathogenesis of sarcopenia induced by uremia and/or high phosphate diet by using several genetically modified mice; 3) and to investigate the protective effects of magnesium against phosphate toxicity. We found that 1) autophagy activity in skeletal muscle increases and contributes to the maintenance of muscle strength in uremic sarcopenia in CKD patients, 2) high phosphate diet increases Rubicon in various organs throughout the body and causes autophagy impairment, 3) suppression of Rubicon in the whole body prevents muscle weakness induced by high phosphate diet, and 4) a low-magnesium diet exacerbates phosphate toxicity whereas magnesium sufficiency leads to muscle strength maintenance. In conclusion, we elucidated the essential cellular and molecular mechanisms of magnesium-mediated health and longevity focusing on autophagy, Rubicon, and phosphate toxicity. Our findings will provide novel perspectives and possibilities for the urgent task of preventing sarcopenia and achieving healthy longevity in a super-aged society.