

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09272

研究課題名(和文) Sirt1とその液性因子NMNを介した尿細管・PEC連関の解明

研究課題名(英文) Sirt1 and NMN mediate the tubular-PEC crosstalk.

研究代表者

長谷川 一宏 (Hasegawa, Kazuhiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：30424162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：早期糖尿病性腎症において近位尿細管Sirt1(サーチュイン)の低下が、「尿細管-糸球体連関」の破綻を介し糸球体障害を来すことを報告した。糖尿病では、近位尿細管Sirt1が低下し、その結果Sirt1由来産物のNicotinamide Mono Nucleotide (NMN)の分泌が減少し、ポドサイトSirt1も低下し、ポドサイトに発現していないtight junctionの構成分子のClaudin1の発現が上昇し、足突起癒合を引き起こし、蛋白尿が出現する事を報告した。これらは尿細管特異的なSirt1Tgマウスで抑制され、尿細管Sirt1の発現保持が糸球体機能維持に繋がる重要性を見出した。

研究成果の概要(英文)：We have recently disclosed that tubular epithelial cells affect the podocyte epigenome through nicotinic acid metabolism in diabetic nephropathy (DN), and we have named this relationship "proximal tubule-podocyte communication". First, we elucidated the details of proximal tubule-podocyte communication. Second, we identified how Sirt1 regulates albuminuria. This means that repeated high glucose stress triggers the initial changes in proximal tubules, which lead to the epigenetically irreversible glomerular damages. Proximal tubular Sirt1 overexpression can rescue these changes. Third, we identified a mediator connecting this communication, nicotinamide mononucleotide (NMN).

研究分野：腎臓内科学

キーワード：近位尿細管

1. 研究開始当初の背景

NAD依存性脱アセチル化酵素遺伝子 Sir2 の哺乳類ホモログである SIRT は7種の isoform が存在する。Sir2 と最も相溶性が高い SIRT1 は、カロリー制限で発現が誘導され(今井眞一郎 Nature 2000)、寿命やストレスに対するタンパクの発現を調節することが明らかとなった。SIRT1 による脱アセチル化は、ヒストンや転写因子へ直接結合して脱アセチル化し、その下流の遺伝子発現調節を行なう。我々は、腎臓では、特に近位尿細管 SIRT1 が重要であり、培養近位尿細管細胞の *In vitro* における細胞保護作用を報告した(長谷川一宏, BBRC 2008)。続いて生体における意義を解明するため、近位尿細管特異的 SIRT1 過剰発現マウス(Transgenic:Tg)(長谷川一宏, JBC 2010)、欠損マウス(Conditional Knockout; CKO)を作製した。これらの解析は、SIRT1 遺伝子改変マウスの既報に示した通り、これまでに既報がなく、極めて新規性が高い。

2. 研究の目的

以上の研究背景を基に、最近、我々は腎臓内 Sirt の糖尿病性腎症における意義を明らかにした(長谷川一宏, Nat Med 2013)。すなわち Sirt1 は近位尿細管、足細胞に発現しているが、糖尿病では、高血糖によりまず近位尿細管の Sirt1 発現が低下し、その結果、Sirt1 由来のニコチン酸代謝産物(nicotinamide mononucleotide; NMN)の分泌が減少する。NMN の減少により足細胞の Sirt1 発現が低下し、epigenetic 制御により tight junction 蛋白 Claudin1 の発現が上昇し、-catenin 経路活性化により Podocin, Synaptopodin などスリット膜やアクチン細胞骨格の構成蛋白発現低下を来し、足細胞の effacement を引き起こして糸球体バリア機能が障害されアルブミン尿が出現することを世界に先駆け発表した。

この研究では、尿細管から糸球体への尿の流れとは逆行する情報伝達経路を発見した。すなわちこれまで細胞連関のメディエーターとしては、炎症関連分子が注目されてきたが、細胞内ニコチン酸代謝の変化に基づく細胞代謝産物をはじめ同定した。更に Epigenome 制御による糸球体スリット蛋白発現変化を示すことで、腎細胞へのストレス刺激暴露の反復によりエピジェネティクスの変化が生じることで障害が固着するという、病変の不可逆性を分子レベルで解明した点も独創的である。

しかしながら、Claudin-1 の病的意義、診断マーカーとしての有用性については不明な点が多く、今回新たに検討を行なった。

3. 研究の方法

我々は、ヒト尿中 NMN 低下を超早期糖尿病腎症バイオマーカーとして確立し、NMN 補充療法を展開したいと考える。上述の通り、DN においては近位尿細管 SIRT1 発現が低下し、

糸球体足細胞に波及し、Claudin-1 発現・アルブミン尿が生じる。この知見をヒトの尿検体で証明し、患者の尿中 claudin-1 および NMN 値の測定を DN 重症度の診断マーカーとして臨床応用させたい。既に倫理委員会の承認・患者への口頭・文書による同意を得て、8 検体の DN (対照:正常)の予備検討を開始している。Sirt1、Claudin-1 抗体を用いたヒト検体における免疫染色のプロトコルを確立し、施行した。染色陽性部位を定量し、臨床学的パラメータ(eGFR, S-Cr, HbA1c, 蛋白尿等)との相関を統計学的に解析した。その結果、尿細管 Sirt1 低下とポドサイト Claudin-1 上昇、ポドサイト Claudin-1 上昇と一日蛋白尿量が相関したため、ヒトでも重要性が示唆される結果を得た。さらに、以下の方法で腎臓内と尿中 NMN の測定を進め、NMN の診断マーカーとしての意義を検討した。

内因性 NMN 濃度の測定ヒト腎生検検体における腎臓内 NMN 濃度の検討内因性 NMN の励起現象を利用し、マウスにおける腎内 NMN 濃度を比較した。糖尿病性腎症を惹起する為、WT、Tg に STZ (Streptozotocin, 50mg/kg/日 ip. 5日)および生食(Saline:Sal)投与した。WT+Sal, WT+STZ, Tg+Sal, Tg+STZ, の4群で6カ月後の所見を比較した。DN による NMN 低下(WT+STZ)を近位尿細管 Sirt1TG マウスが抑制した(Tg+STZ)。以上から、近位尿細管から放出され、糸球体(podocyte)に至る NMN の重要性が示唆された(長谷川一宏, Nature Medicine 2013)。今後は、ヒト腎生検検体において、糖尿病性腎症の進行度と腎内 NMN 濃度の低下の相関について更に検討し、NMN の病勢マーカーとしての意義を確立したい。

ヒト尿中 NMN 濃度の検討も検討する。すなわち、上記の臓器内、組織内濃度に加え、NMN 濃度の測定については、既に細胞レベルでも、Medium や Cytoplasm 共に HPLC による測定系を確立している。この系を利用し、ヒト尿検体における尿中 NMN 濃度の低下と糖尿病進行度(腎生検、特に電子顕微鏡による尿細管基底膜や糸球体基底膜肥厚等)との相関についての解析を行う。

外因性 NMN の近位尿細管から podocyte へ移行の検討も行なう。ヌクレオチドの一種 NMN は蛋白質ではなく、GFP 等の蛍光標識蛋白は使用できず、これまで NMN の蛍光標識方法は報告されていない。我々は ATP・GTP 等のヌクレオチドの体内動態観察に使用される蛍光物質 Mant 基(Methylanthraniloyl 基)に注目し、初めて Mant-NMN 合成に成功した。Mant-NMN を腎動脈から投与したところ、1 時間後に近位尿細管で検出し、2 時間後にポドサイトに到達し、4 時間後に消退する結果を得ており、近位尿細管からポドサイトへの移行が示唆された。今後近位尿細管からの放出機序やポドサイトへの取り込み機序を明らかにし、ヒトへの NMN 補充を行う際の効果的な投与方法の決定につなげていきたい。

ヒト腎生検のマイクロダイセクションによる検討については、レーザーマイクロダイセクション (LSM) 検体を用い、methylation-specific PCR(MSP)法を行い、in vivoでのepigeneticな遺伝子調節についてマウスで結果を得ている。ヒトでも糖尿病性腎症において、Sirt1低下がDnmt1(DNAメチル化酵素1)の活性低下とClaudin-1遺伝子のCpG islandの脱メチル化を生じ、Claudin-1蛋白発現上昇が認められるかを今後証明し、ヒトにおける新規治療標的としての意義を、研究遂行する事で、確立する。

腎生検は、大学病院の腎臓内科として、自ら検体を十分数で確保できる有利な点を生かす計画である。又、我々は、独自のLSMを確立した。既存のLSMは、Cresyl Violet染色のみ検体採取が可能であった。しかし、糸球体や尿細管の細部構造が保たれず、糸球体と糸球体外の分画が限界であった。一方、PAS染色にLSMを施行すると、プレパラートから腎組織が剥離する弱点があったが、本研究の予備検討を進める過程で、我々は新たにpoly-L-lysineを標本にcoatingし、剥離を防ぐ方法の確立に成功した。この方法により、近位尿細管やポーマン囊上皮という個別の細胞毎に採取が可能となった。当LSMの利点を生かした研究計画であり、遂行意義は極めて高いと考える。更に、NMNの補充療法の施行を目指す。NMNのマウスへの腹腔注射が肥満による糖代謝異常出現を抑制する事を、当教室出身者であるワシントン大学吉野博士が明らかにした(Cell Metab, 2011)。NMNのヒトへの投与を実施する上で、吉野博士と討議を行なうスカイプ通信もすでに研究室に常備・活用しており、連携を密にする事で、時間的・経済的口スを省く研究体制が既に、十分構築できており、安全性と実用性を両立し、今後も進めていく。

4. 研究成果

NAD依存性脱アセチル化酵素 Sirt1(サーチュイン)は、カロリー制限で発現が上昇し、長寿や臓器保護に重要な役割を果たす。我々は、腎臓では近位尿細管 Sirt1が重要であり、In Vitroの系で細胞保護作用を報告し(長谷川ら、BBRC 2008) 続いて生体意義を解明する為、近位尿細管特異的 Sirt1 過剰(Transgenic:Tg)発現マウス・(長谷川ら、JBC 2010)・欠損マウス(Conditional Knockout; CKO)を作製した。

更に、我々は、高血圧・腎炎・糖尿病等の病態の異なる腎障害をマウスに惹起し、Sirt1発現変化が最も顕著であった糖尿病性腎症に着目した。Sirt1は、通常は近位尿細管と足細胞(ポドサイト、糸球体の構成細胞)の双方に発現するが、糖尿病では、まず近位尿細管 Sirt1が低下し、その結果 Sirt1由来のニコチン酸代謝産物の Nicotinamide Mono Nucleotide (NMN)の分泌が減少した。NMNの

減少で足細胞 Sirt1も低下し、Epigenetic 制御で本来足細胞に発現していない tight junctionの構成分子の Claudin1の発現が上昇し、足細胞の癒合を引き起こし、蛋白尿が出現する事を報告した(長谷川一宏、Nature Medicine 2013)。これらはTgマウスで増悪し、CKOマウスで増悪を認めた。

この研究で、尿細管から糸球体への尿流と逆行する情報伝達経路(尿細管・糸球体連関と名付けた)を発見した。更に“細胞間連関のメディエーター”として「炎症関連分子」がこれまで注目されてきたが、細胞内ニコチン酸代謝の変化に基づく「細胞代謝産物」(当研究では NMN)をメディエーターとして初めて同定した。更に、Epigenetic制御による糸球体バリア機能の変化を示し、腎細胞へのストレス刺激の反復(当研究では高糖負荷)により、エピジェネティックスの変化で障害が固着する「病変の不可逆性」を腎障害で初めて解明した。

上記の成果を下記に論文報告した。その後、Nat Rev NephrologyのReview Article・新聞掲載・医療ニュースサイトで取り上げられた。更に、アジア太平洋腎臓会議2014年にYIAを受賞し、その後日本腎臓学会の大島賞及び日本心血管内分泌学会の高峰讓吉研究奨励賞も2017年に受賞した。

また、SGLT2阻害剤によるSirt1維持の意義についても論文報告に2018年に行なった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Umino H, Hasegawa K, Minakuchi H, Muraoka H, Kawaguchi T, Kanda T, Tokuyama H, Wakino S, Itoh H. High Basolateral Glucose Increases Sodium-Glucose Cotransporter2 and Reduces Sirtuin-1 in Renal Tubules through Glucose Transporter-2 Detection. Sci Rep. 査読有 2018 May;8(1):6791.doi:10.1038/s41598-018-25054-y.

Minakuchi H, Wakino S, Hosoya K, Sueyasu K, Hasegawa K, Shinozuka K, Yoshifuji A, Tokuyama H, Hayashi K, Itoh H. The role of adipose tissue asymmetric dimethylarginine/dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway in adipose tissue phenotype and metabolic abnormalities in subtotaly nephrectomized rats. Nephrol Dial Transplant. 査読有 2016 Mar;31(3):413-23. doi: 10.1093/ndt/gfv367.

〔学会発表〕(計 2 件)

海野寛之、長谷川一宏、脇野修、伊藤裕 .
Sglt2 阻害剤は、糖尿病性腎症早期の近位尿
細管局所の mitoribosome の増殖を抑制する .
第 60 回日本腎臓学会学術総会 , 2017 年

海野寛之、長谷川一宏、脇野修、伊藤裕 .
Sglt2 の発現調節に Glut2 がシグナル伝達物
質として関与する . 第 59 回日本腎臓学会学
術総会 , 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.keio-emn.jp/research/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

長谷川 一宏 (Hasegawa, Kazuhiro)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・助教
研究者番号 : 30424162

(2)研究分担者

研究者番号 :

(3)連携研究者

研究者番号 :

(4)研究協力者