

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10980

研究課題名(和文) 横紋筋融解症後腎傷害におけるヘムオキシゲナーゼ-1とオートファジーの役割

研究課題名(英文) The protective role of heme oxygenase-1 and autophagy in the kidney rhabdomyolysis-associated acute kidney injury

研究代表者

清水 裕子 (Shimizu, Hiroko)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：80423284

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)：ヘム代謝の律速酵素であるヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)は横紋筋融解症性急性腎傷害に対して保護効果を示すと報告されている。BTB and CNC homology 1 (Bach1)はヘム依存性の転写因子で、HO-1の発現を制御している。今回我々は、横紋筋融解症ラットモデルの急性傷害腎においてHO-1 mRNAとHO-1タンパクが有意に増加し、ヘム合成の律速酵素であるALAS1のmRNAの発現が抑制されることを確認し、さらに横紋筋融解症性急性傷害腎において、細胞内遊離ヘムの増加に伴い核内Bach1タンパクが核外へ移行し、本研究は腎臓のBach1発現の動態をin vivoで初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We demonstrate that nuclear Bach1 protein was rapidly and significantly decreased in the kidneys of rats with glycerol-associated RM-AKI, followed by an increase in Bach1 protein in the cytosol, which was preceded by the induction of Bach1 mRNA. We detected a significant increase in HO-1 expression and the robust inhibition of ALAS1 expression in the kidneys of glycerol-treated animals, suggesting a significant increase in the free heme concentration in the kidney of glycerol-treated animals. Bach1 is a heme responsive transcription repressor of the HO-1 gene, and our findings suggest that changes in the subcellular distribution of Bach1 may be involved in the induction of HO-1 accompanying heme metabolism in the kidney of the rat RM-AKI model. To the best of our knowledge, this is the first study to show dynamic changes in renal Bach1 expression in vivo, which were associated with heme metabolism.

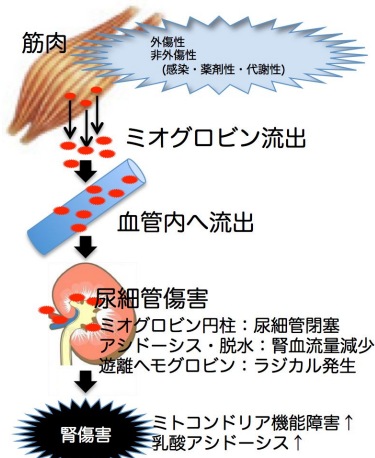
研究分野：医歯薬学

キーワード：集中治療学 急性腎不全 横紋筋融解症 ヘムオキシゲナーゼ-1 Bach1 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

(1) 横紋筋融解症の腎傷害重症化機序の解明はより積極的な治療法の選択につながる

横紋筋融解症は、外傷性、非外傷性(薬剤性、感染性、代謝性など)と病因は様々であるが、地震災害時において、建物の崩壊による圧挫性筋壊死により横



紋筋融解症による腎不全を発症することが多く、災害・救急医療現場では致死的状态に陥る疾患として注目されている。横紋筋融解症の治療法は、早期大量輸液、強制利尿、血液浄化法などがなされているが、災害現場では血液浄化等の医療が困難な場面も想定されるなか、横紋筋融解症による腎傷害に対する積極的な細胞保護療法はまだないのが現状である。

横紋筋融解症では崩壊した筋細胞から遊離したミオグロビンは、鉄-プロトポルフィリン体であり、脂溶性の鉄として活性酸素生成を促進し、腎でのミトコンドリアの機能異常や乳酸アシドーシスを併発し腎傷害をさらに助長する一因と考えられている(図1)。

横紋筋融解症性腎不全の発症のメカニズムがさらに詳細に解明されれば、災害時の医療資源が乏しい状態でも対応可能な、より災害に強い治療法の選択が可能となる。

(2) 酸化ストレスに対するヘムオキシゲナーゼHO-1の保護効果

申請者はこれまでの研究で、ラットの急性虚血再還流後腎不全モデル、薬剤性(ハロタン吸入麻酔薬・四塩化炭素)肝傷害モデル、出血性ショックモデル、ヒト生体肝移植(Morimatsu, H 2012)において、細胞障害には酸化ストレスが関与し、細胞保護作用を持つストレス蛋白HO-1が、傷害臓器に誘導されることを示してきた。また、HO-1誘導を制御する転写調節因子Bach1、Nrf2は酸化ストレスマーカーに成りうる可能性も示唆してきた(図2)。

横紋筋融解症でも、腎に細胞保護作用を持つHO-1が誘導されることはすでに報告され

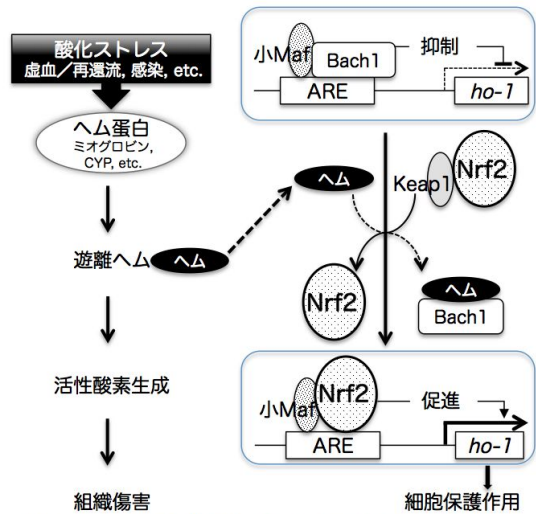


図2. ヘム由来酸化ストレス下でのHO-1発現機序
正常状態ではBach1はAntioxidant response element(ARE)に結合しHO-1の転写を抑制。ストレス下で遊離ヘムが放出されるとBach1はAREから離れ、Nrf2がAREに結合することによりHO-1などの抗酸化タンパクの転写がはじまる。

ているが(Nath KA, 1992)、HO-1発現の機序と意義については未だ報告がない。そこで、横紋筋融解症性腎傷害における腎でのHO-1の発現機序やHO-1の腎保護効果が明確に証明されれば、より積極的な治療法の開発に貢献できると考える。

(3) 選択的オートファジーの役割

オートファジー(自食作用)とは細胞質におけるタンパク質分解経路の一つで、プロテアソーム系と並ぶ重要なタンパク質分解機構として注目されている。オートファジーは飢餓時に誘導され、“タンパク質分解によりアミノ酸を生成し、新たなタンパク質の合成に再利用される”(Nakatogawa H. 2009)。オートファジーは、発生、分化細胞内の恒常性維持などの生理的機能や、発ガン抑制、免疫系・糖尿病抑制などの疾患予防にも関与していることが明らかになってきている(Mizushima N, 2009)。

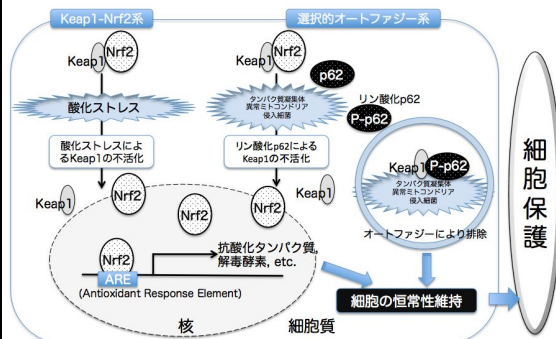


図3. Nrf2-Keap1系と選択的オートファジーの連動
Keap1-Nrf2系は酸化ストレスによりKeap1が不活化されると、Nrf2が活性化され核内に移行し、抗酸化遺伝子の転写が始まる。オートファジー系は細胞内に生じたタンパク質凝集体などを選択的に分解することで細胞の恒常性を維持している。タンパク質凝集体などを認識したリン酸化p62がKeap1と相互作用すると、それらの複合体をオートファジーが認識し排除している。これに伴いKeap1と結合していたNrf2は核内に移行し生体防御遺伝子の転写を活性化する。

また、HO-1発現の調節因子の一つKeap1-Nrf2系は、p62タンパクを介して選択的オートファジーにも連動している(図

3)(Komatsu M. 2010, Kageyama S. 2014)。通常 Nrf2 は Keap1 と結合しユビキチン系タンパク分解機構により不活性化されている。Keap1-Nrf2系ではKeap1が酸化ストレスを認識すると、Nrf2が活性化され抗酸化遺伝子の発現を誘導する。選択的オートファジー系では、p62がタンパク質凝集体などに集積しリン酸化 (P-p62)されると、Keap1-Nrf2の結合を競合的に阻害する。Keap1からはなれ活性化されたNrf2は核内に移行し、HO-1などの抗酸化物質の発現を誘導する。その後、P-p62、Keap1はタンパク質凝集体などと共にオートファジーにより排除、分解され、新たな抗酸化タンパク質の発現に再利用され細胞の恒常性維持に役立っていると考えられる。

横紋筋融解症でも腎のミトコンドリア機能障害とオートファジーの亢進することが報告されたが(Funk JA, 2012)、本モデルにおけるオートファジーの意義はいまだ不明である。オートファジー不全動物の横紋筋融解症性腎傷害モデルでは、腎の不良ミトコンドリア蓄積による細胞傷害により腎機能がさらに憎悪すること予測される。この仮説が証明されれば、横紋筋融解症性腎傷害において、オートファジーを生理的範囲内で亢進させる状態を作れば、腎傷害の軽減につながり、災害、緊急時での治療法の選択肢が増える可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、

- (1) 横紋筋融解症後の腎傷害重症化機序のさらなる解明と、
- (2) 酸化ストレスに対抗するための HO-1、Keap1-Nrf2 システム、オートファジーの役割を検討し、本症の新しい治療戦力を構築する。

3. 研究の方法

(1)50%グリセロール筋注によるラット横紋筋融解症による腎傷害 (rhabdomyolysis-induced acute kidney injury, RM-AKI) モデルにおける HO-1 の発現機序、発現意義について検討する

雄性 Sprague-Dawley ラットを用い、

- A) 24 時間絶飲後 50%グリセロール筋注による横紋筋融解症性腎傷害モデル(Gly モデル)、
- B) 腎特異的に HO-1 を強発現する塩化スズ (SnCl_2) を投与した横紋筋融解症性腎傷害モデル(SnCl_2 +Gly モデル)、
- C) HO 活性阻害剤スズメゾポルフィリン (SnMP) 投与した横紋筋融解症性腎傷害モデル(SnMP+Gly モデル)、

さらに SnCl_2 で HO-1 誘導後 HO 活性を SnMP で阻害した横紋筋融解症性腎傷害モデル (SnCl_2 +SnMP+Gly モデル) を作成。それぞれのモデルにおいて

(1-1) 横紋筋融解症の証明として血中ミオグロビン、クレアチニンキナーゼ(CK)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ(AST)を測定。

(担当：森松・研究協力者 山岡正和・大森恵美子)

(1-2) 腎傷害の程度は、血液生化学検査(血中尿素窒素(BUN)、血中クレアチニン(Cr))、組織学的検討により評価し、HO-1 の発現機序、発現部位と組織傷害の関係を明らかにする。

(担当：森松・山岡・大森)

(1-3) 腎における HO-1 mRNA の発現と、HO-1 の発現を制御しているヘム合成の律速酵素でヘムの上昇により発現が抑制される ALAS1、HO-1 の転写調節因子 Bach1(正常状態では HO-1 遺伝子上流域に結合し HO-1 の発現を抑制)、Nrf2(正常状態では細胞質に Keap1 と結合し存在し、ヘムの増加や酸化ストレスにより活性化され、核内に移行して HO-1 遺伝子上流域に結合し HO-1 の発現を活性化する)、各遺伝子発現を経時的に検討し、HO-1 の発現機序を詳細に検討する。(担当：清水・井上)

(1-4) HO-1、Bach1、Nrf2 タンパク質の発現を Western blot 法で検討。(担当：清水・高橋・大森)

以上より横紋筋融解症性腎傷害モデルにおける腎の HO-1 発現機序と腎保護効果を明らかにする。

(2)横紋筋融解症性腎傷害(RM-AKI)におけるオートファジーの意義を検討する

一般的に HO-1 の発現は転写調節因子である Nrf2-Keap1 系により制御され、Nrf2 は p62 タンパクを介してオートファジーにも連動している。

ラット横紋筋融解症モデルにおいて近位尿細管でオートファジーが活性化されることは既に報告されているが、その活性化の詳細な意義については明らかではない。そこで、雄性 Sprague-Dawley ラットを用い

D) 横紋筋融解症における腎でのオートファジーの活性化を、横紋筋融解症性腎傷害モデル(Gly モデル)で確認する。

E) 免疫抑制剤ラパマイシンによりオートファジーを活性化した横紋筋融解症性腎傷害ラットモデル(ラパマイシン+Gly モデル)。

F) クロロキン投与によりオートファジーを阻害した横紋筋融解症性腎傷害ラットモデル(クロロキン+Gly モデル)を作成。各モデル

における以下の項目を検討する。

(2-1) 横紋筋融解症の証明として血中ミオグロビン、CK、AST を測定。(担当：森松・山岡)

(2-2) 腎傷害の程度を、血液生化学検査(BUN, Cr)、組織学的検討により評価する。(担当：森松・山岡・大森)

(2-3) Western blot 法によりオートファジーのモニタリング抗体 LC3, p62 を定量的に検討する。(担当：清水・高橋・大森)

4. 研究成果

[結果]

(1-1) グリセロール投与ラットは横紋筋融解症と急性腎傷害を発症する

グリセロール投与により、CK は投与 1 時間後より急激に上昇し、3 時間後に最高値に達した。CK と同様に AST もグリセロール投与 1 時間後より上昇し、6 時間後に最高値に達した。生理食塩水投与群では CK と AST には変化がなかった。これらの結果はグリセロール投与ラットにおいて、横紋筋融解症が惹起されたことを示した。

次に、BUN と Cr と腎組織学検査にて急性腎傷害を評価した。BUN と Cr はグリセロール投与後 12 時間までは生食群と比較して有意な変化を認めなかった。しかし、グリセロール投与 24 時間後に BUN と Cr は生食群と比較して有意に上昇した。組織学検査でもグリセロール投与 24 時間後の腎組織では尿管管傷害が確認され、傷害尿管管スコアリングにてグリセロール投与による急性尿管管傷害は有意であった。これらの結果はグリセロール投与ラットにおいて、RM-AKI が惹起されたことを示した。

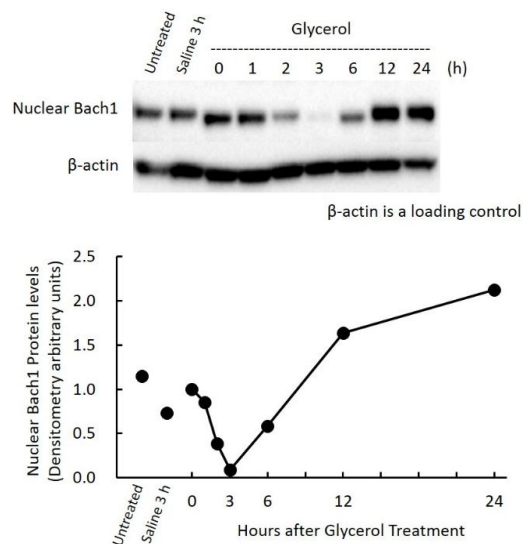
(1-2) RM-AKI ラット腎では、HO-1 が強誘導され、ALAS1 が抑制される

次に、ラット腎における HO-1 の遺伝子とタンパク発現を解析した。HO-1 mRNA 発現はグリセロール投与 1 時間後から増加し、6 時間で最高値に達した。HO-1 mRNA の変化と同様に、HO-1 タンパク発現も劇的な増加を認めた。HO-1 mRNA と HO-1 タンパクは生食群ではほとんど発現していなかった。一方、グリセロール投与により、ALAS1 mRNA 発現は低下し、投与 3 時間で最低値に達し、その後回復した。

(1-3) RM-AKI ラット腎では、核内 Bach1 タンパクが減少し、細胞質 Bach1 タンパクは増加する

次に、ラット腎における HO-1 発現を制御するヘム反応性転写抑制因子ある Bach1 タンパクの動態について解析した。グリセロール

投与後、ラット腎細胞の核内 Bach1 タンパク発現は急激に減少し、投与後 3 時間で最低値となり、その後緩やかに回復した。グリセロール群と生食群において、投与 3 時間後の 3 例ずつの比較で、グリセロール群では核内 Bach1 タンパク発現が有意に減少し、生食群と比較して 10%未満となることが確認された ($P < 0.0001$)。一方、核内 Bach1 タンパクとは逆に、細胞質 Bach1 タンパク発現はグリセロール投与後に増加した。細胞質 Bach1 タンパクはグリセロール投与後 6 時間で最高値に達し、その後高値を維持した後に投与後 24 時間に基準値まで低下した。



(1-4) RM-AKI ラット腎では、Bach1 mRNA は増加する

次に、ラット腎における Bach1 遺伝子発現について解析を行った。Bach1 mRNA は生食群ではほとんど発現していなかったが、グリセロール群では投与 3 時間後から有意に増加し、6 時間後に最高値に達し、投与後 24 時間で基準値まで低下した。

(1-5) 腎特異的 HO-1 誘導剤塩化スズ(SnCl₂)の投与は RM-AKI ラットの腎傷害を改善する、HO 活性阻害剤スズメゾポリフィリン(SnMP)投与により腎傷害が増悪する

SnCl₂ 前投与した横紋筋融解症性腎傷害モデル(SnCl₂+Gly モデル)では生食を前投与した Gly モデルと比較して BUN, Cr が改善し、SnMP(HO 活性阻害剤)を前投与した SnMP+Gly モデルは Gly モデルと比較して腎機能は増悪傾向にあった。SnCl₂ 投与後 SnMP 投与した SnCl₂+SnMP+Gly モデルではグリセロール投与による Gly モデルと同レベルまで腎傷害が増悪した。

(2-1) RM-AKI ラット腎では、オートファジー

が活性化される

グリセロール投与による RM-AKI ラット腎では LC3 II の上昇が見られ、オートファジーの活性化が推測された。

(2-2) RM-AKI ラットにオートファジー阻害剤クロロキン投与により腎傷害が悪化する

クロロキン前投与した RM-AKI ラットでは生食前投与した RM-AKI ラットより BUN、Cr が上昇し腎傷害が増悪する傾向が見られた。

[考察]

我々は、グリセロール投与により誘導された RM-AKI ラット腎における核内 Bach1 タンパクの有意な低下とそれに続く Bach1 mRNA と細胞質 Bach1 タンパクの増加を証明した。更に、RM-AKI ラット腎における HO-1 発現の増加と ALAS1 mRNA の低下も確認した。これらの結果は RM-AKI ラット腎において遊離ヘムが増加していることを強く示唆している。今回の研究は *in vivo* で腎臓における Bach1 の動態を明らかにした初めての報告である。

“遊離ヘム”とは新規合成されたヘムのうちタンパクと複合体を形成していないもの、あるいはヘムタンパクから遊離したヘムのうち HO により処理されていないものである。ヘムはヘムタンパクの基質として必要不可欠の物質であるが、過剰発現した遊離ヘムは細胞膜リン脂質へ作用し、フリーラジカルを発生させ、細胞傷害を引き起こすと考えられている。横紋筋融解症では、遊離したミオグロビンは糸球体でろ過された後に尿細管で再吸収されることが報告されており、RM-AKI ラット腎において増加したと考えられる遊離ヘムはミオグロビン由来であることが予想される。

いくつかの *in vitro* の研究で、Bach1 は HO-1 誘導を抑制していることが示されている。更に、紫外線暴露に関する培養細胞実験にて、細胞内ヘム増加に起因する HO-1 誘導は Bach1 過剰発現により抑制されることが報告されている。つまり、細胞内 Bach1 の変化はヘム誘導性の HO-1 発現に必須であると考えられる。

今回のモデルにおいて、核内 Bach1 タンパクはグリセロール投与後 3 時間で最低値を呈し、それに引き続いて HO-1 mRNA と HO-1 タンパクが強誘導された。核内 Bach1 タンパクの減少は、核内 Bach1 タンパクが MARE 配列から離脱し、核外へ移行したことを示唆しているが、細胞質 Bach1 タンパク上昇の最高値はグリセロール投与 6 時間後であり、3 時間の時間差があった。これは細胞質 Bach1 タン

パクの増加が核外へ移行した Bach1 タンパクを反映していることとは矛盾するものであった。一方、グリセロール投与後 3hr から増加した Bach1 mRNA の変化は核内 Bach1 タンパク減少のタイミングと一致し、細胞質 Bach1 の増加に先行するものと考えて矛盾しないものであった。つまり、細胞質 Bach1 タンパクの増加は核内 Bach1 タンパク減少の代償として新規合成された Bach1 を反映していると考えられた。我々は核外に移行した Bach1 タンパクを細胞質 Bach1 タンパクの直接的な増加として捉えることができなかったが、細胞実験にて核外へ移行した Bach1 タンパクはプロテアソームにてすぐに分解すると報告されている。酸化傷害急性期には HO-1 は保護効果を示すが、HO-1 の遷延性の過剰発現は有害作用をもたらすかもしれない。HO-1 はヘムタンパクを分解し、フリーラジカルの合成を触媒する不安定鉄を産出する。また、いくつかのヘムタンパクはミトコンドリア内でエネルギー産出に関与しており、細胞機能維持に必要であると考えられる。核内 Bach1 タンパク減少後の細胞内 Bach1 の補充は細胞内ヘム代謝関連の恒常性の維持に必須であると考えられる。

[結論]

今回我々は RM-AKI ラットモデルにおいて、初めて Bach1 の動態の変化を証明した。我々の研究結果は RM-AKI の発症機序に細胞内ヘムの増加が関与していることを強く示唆している。今後は、RM-AKI 発症機序をふまえ、当モデルにおけるオートファジーの役割をさらに検討し、新たな治療薬の開発に貢献するためにさらなる研究が必要と考える。

[参考文献]

- Morimatsu H, et al. OXIDATIVE STRESS MOLECULAR MECHANISMS AND BIOLOGICAL EFFECTS. Chapter 6, InTech, 2012.
- Nath KA et. al., J Clin Invest. 1992 Jul;90(1):267-70.
- Nakatogawa H, et al., Nat Rev Mol Cell Biol. 2009 Jul;10(7):458-67. doi: 10.1038/nrm2708.
- Mizushima N, Curr Top Microbiol Immunol. 2009;335:71-84. doi: 10.1007/978-3-642-00302-8_3.
- Komatsu M, et al., Nat Cell Biol. 2010 Mar;12(3):213-23. doi: 10.1038/ncb2021.
- Kageyama S, et al., J Biol Chem. 2014 Sep

5;289(36):24944-55. doi:
10.1074/jbc.M114.580357.
Funk JA, et.al., Am J Physiol Renal
Physiol. 2012 Apr 1;302(7):F853-64. doi:
10.1152/ajprenal.00035.2011.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Yamaoka M, Shimizu H, Takahashi T, Omori E, Morimatsu H, Dynamic changes in Bach1 expression in the kidney of rhabdomyolysis-associated acute kidney injury. PLoS One, 査読有, 2017 Jul 13;12(7):e0180934,doi:10.1371/journal.pone.0180934.eCollection 2017

Taira J, Nakashima Y, Hoshihara S, Koga S, Sueda S, Komatsu H, Higashimoto Y, Takahashi T, Tanioka N, Shimizu H, Morimatsu H, Sakamoto H, Improvement of heme oxygenase-1-based heme sensor for quantifying free heme in biological samples. Anal Biochem, 査読有, 2015,489:50-52, doi:
10.1016/j.ab.2015.08.004

〔学会発表〕(計 8 件)

Kumada Y, Takahashi T, Shimizu H, Nakamura R, Omori E, Inoue K, Morimatsu H, Carbon Monoxide-releasing Molecule-3 Ameliorates Lung Injury after Hemorrhagic Shock and Resuscitation. Anesthesiology2107 annual meeting, October 22, 2017, Boston Convention and Exhibition Center (Boston, MA, USA)

Takahashi T, Yamaoka M, Shimizu H, Morimatsu H, Significant changes in renal Bach1 expression in rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. 21th International Symposium on Molecular Medicine, October 5, 2017, The New Athens Metropolitan Hotel (Athens, Greece)

中村龍、井上一由、熊田雄太、清水裕子、高橋徹、森松博史、出血性ショック蘇生時に投与した Dexmedetomidine がラット蘇生後肺傷害に与える影響、第 44 回日本集中治療医学会学術集会、2017 年 3 月 9 日、札幌市教育文化会館(北海道札幌市)

Nakamura R, Inoue K, Kumada Y, Shimizu H, Takahashi T, Morimatsu H, The effect of Dexmedetomidine in Lung Induced by Hemorrhagic shock and Resuscitation in Rats. Critical Care Congress, January 22,

2017, Hawaii Convention Center (USA, Hawaii, Honolulu)

Tanioka N, Shimizu H, Takahashi T, Yamaoka M, Morimatsu H, The role of transcription factor Bach1 in rat model of acute liver injury induced by experimental endotoxemia. The European Anesthesiology Congress (ESA), May 30 ~ June 2, 2015, CityCube Berlin (ドイツ、ベルリン)

Nakamura R, Inoue K, Shimizu H, Takahashi T, Morimatsu H, The impact of fluid's choice in early stage of hemorrhagic shock resuscitation on lung injury: Experimental animal study. The European Anesthesiology Congress (ESA), May 30 ~ June 2, 2015, CityCube Berlin (ドイツ、ベルリン)

谷岡野人、清水裕子、高橋徹、山岡正和、森松博史、敗血症によるラット急性肝障害モデルにおける転写因子 Bach1 の動態、日本麻酔学会第 62 回学術集会、2015 年 5 月 29 日、神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

高橋徹、活性酸素の関与とその制御ー抗酸化ストレス蛋白 H0-1 システムの臨床応用への可能性ー、日本麻酔学会第 62 回学術集会(招待講演)、2015 年 5 月 29 日、神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

清水 裕子 (SHIMIZU Hiroko)
岡山大学・医学部・客員研究員
研究者番号：80423284

(2)研究分担者

森松 博史 (MORIMATSU Hiroshi)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：30379797

高橋 徹 (TAKAHASHI Toru)
岡山県立大学・保健福祉学部・教授
研究者番号：40252952

井上 一由 (INOUE Kazuyoshi)
岡山大学・医学部・客員研究員
研究者番号：10624413

(3)研究協力者

山岡 正和 (YAMAOKA Masakazu)
大森 恵美子 (OMORI Emiko)