

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17264

研究課題名（和文）細胞老化を介した高脂肪食摂取による慢性腎臓病や腎がん発症機序の解明

研究課題名（英文）In vivo analysis of cellular senescence in chronic kidney disease and renal cancer development

研究代表者

荒谷 紗絵（Aratani, Sae）

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：60844131

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：様々なゲノムストレスは細胞老化の誘導因子であることが知られていた。DNA障害や活性酸素はその因子として知られてきたが、今回老化細胞を一細胞レベルで観察可能なマウスを用いることにより、これらのストレス因子により、腎臓において細胞老化が誘導されることを詳細に解析した。病理学的な所見からは、腎臓の尿細管上皮細胞を中心に細胞老化が出現し、また障害を受け線維化に至っている病変の周囲を中心に出現することが分かり、老化細胞がもたらす炎症刺激が病態に寄与する可能性も考えられた。一方高脂肪食負荷による細胞ストレスと細胞老化の関連については今後さらなる検証が必要であることが課題として残った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで細胞老化の研究は主に培養細胞の系で行われており、本研究は生体内の腎臓で様々な外的ストレスによって、老化細胞が誘導されることを観察し解析できた点にまず特色がある。腎臓において尿細管は最も広範囲を占めるが、様々なストレスにより、近位尿細管上皮細胞が最も細胞老化へと誘導されやすいことが分かった。さらに、このような尿細管の老化細胞は、慢性炎症の発症母地となる可能性が示唆された。このような慢性炎症を引き起こす老化細胞は今後の治療ターゲットになり得ることが考えられ、今後の治療薬開発に貢献する可能性を秘めており、本研究の成果は医療や産業へも貢献できるものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：Previously, we generated a p16-CreERT2-tdTomato mouse model (p16-tdTomato mice hereafter) in which cells with high p16 expression, a prototypical senescent marker, were labeled with tdTomato through the administration of tamoxifen. We investigated different kidney conditions: normal aging kidneys, cisplatin-induced kidney diseases, rhabdomyolysis-induced kidney diseases, high-fat diet feeding model, adenine-induced kidney disease model. In the normal aging process, 20-24-month-old mice showed an accumulation in senescent cells compared to young mice. In kidney disease models, the senescent cells increased following CKD, particularly in proximal tubular epithelial cells (PTECs). RNA-sequence analysis revealed that senescent PTECs collected from the CKD model by FACS showed high inflammatory signaling pathways. These inflammatory cascades are all related to senescence-associated secretory phenotype. The senescent PTECs might be a therapeutic target to prevent CKD progression.

研究分野：腎臓内科

キーワード：慢性腎臓病 細胞老化 外的ストレス DNA障害 活性酸素

## 1. 研究開始当初の背景

人口高齢化に伴い、加齢性疾患の病態解明は、国内外における緊急な課題となった。とくに腎臓は加齢と共に機能低下を来し、腎臓病（慢性腎臓病や腎がん）の発症機序の解明は非常に重要な課題と考えられた。加齢性疾患の病態基盤として細胞老化が注目され、その進展因子にも様々なものがあるが、例えば高脂肪食摂取などは生活習慣の変化に伴い現在注目されている。しかし、老化細胞はさまざまな内的・外的ストレスによって誘導されたとしても、個体内では細胞の数%を占めるのみで、単離し一細胞レベルで解析することは非常に困難であった。つまり腎臓病の中で老化細胞の機能や役割を解析するにあたり、老化細胞を個体内で識別し、一細胞レベルで解析できる動物モデルを確立することも、取り組むべき重要な課題と考えられた。

## 2. 研究の目的

さまざまな腎臓病の発症や進展における細胞老化の役割を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) 老化細胞の同定法

蛍光強度の高い赤色蛍光蛋白質 tdTomato を用いて、個体内の p16 陽性細胞の追跡が可能なマウス“p16-CreERT2tdTomato マウス”を使用した。これは、p16INK4A プロモーター下流に CreERT2 リコンビナーゼ遺伝子を発現した p16-Cre ERT2 マウスと、Cre ERT2 リコンビナーゼ活性依存的に tdTomato を発現する Rosa26-CAG-*Isl*-tdTomato マウスを交配させたものである。p16-CreERT2tdTomato マウスにタモキシフェンを投与すると、Cre ERT2 が核内に移行し、Rosa26 にある lox 配列に挟まれた STOP 配列が除かれ、後ろの tdTomato が発現し、p16 陽性細胞が赤色に蛍光発色する。このマウスを使用し、腎臓病と細胞老化の関わりについて詳細な解析を試みた。

### (2) p16-CreERT2tdTomato マウスの腎臓における老化細胞の同定法

同マウスの腎臓で凍結切片・パラフィン切片を作成し、tdTomato 陽性細胞を同定することで腎臓の老化細胞の局在を同定した。またフローサイトメトリーを用いた解析により、老化細胞を一細胞ごとに単離する。

### (3) 腎機能障害時における老化細胞の機能解析

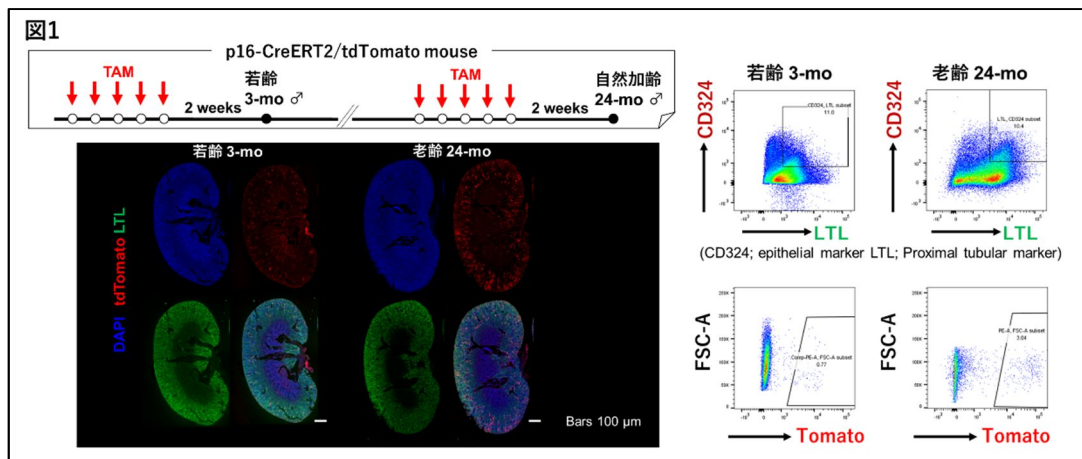
同マウスに腎機能害となるリスク因子を負荷することで病態を誘導するとともに、tdTomato 陽性細胞を上記の方法で同定することにより、病態と老化細胞との関連を解析した。リスク因子として、高脂肪食の負荷（粗脂肪 32%含有餌を 4W、8W、12W 経口投与）、DNA 障害（シスプラチン 10 mg/kg を、Day 1、Day 8、Day 21 に腹腔内投与）、酸化ストレス（グリセオール投与による横紋筋融解症誘導、50%グリセオール 10 mg/kg を、Day 1、Day 7、Day 14 に筋肉注射）、またヒトの慢性腎不全の病態によく似た病理像を呈するアデニン食負荷（Day 1-21）も並行し、まずこれらの外的ストレスがどのように腎臓内で細胞老化を誘導するか検証し、さらに慢性腎不全の病態にどのように寄与するのかを解析した。また自然加齢における腎臓の老化細胞も解析対象とし、病態によって早期に誘導される老化細胞との違いも検証した。いずれのモデルにおいても老化細胞のラベリングは、タモキシフェン（80 mg/kg）を 5 日間連続腹腔内注射にて行った。

## 4. 研究成果

### (1) 腎臓における老化細胞の同定

正常の若年マウス、老齢マウスに解剖の2週間前にタモキシフェンを投与し、老化細胞をラベリングした。凍結切片での tdTomato 蛍光色素の評価、あるいはパラフィン切片では dTomato を mCherry 抗体で染色して老化細胞を同定した(図1)。

tomato 陽性細胞は、腎臓皮質で蓄積する傾向にあり、一方でネフロンの構成要素である糸球体内の細胞には少ない傾向にあった。また FACS を用いても、老化細胞を同定出来ることを確認し、尿細管マーカー (CD324; 上皮細胞マーカー、LTL; 近位尿細管マーカー) を用いることによって、細胞種別に解析可能であった。



### (2) ストレス因子負荷に伴う腎機能障害と細胞老化

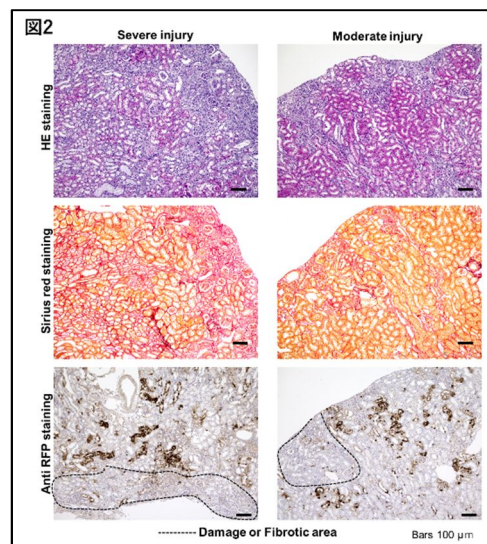
#### (2-1) DNA 障害負荷時

これまでに放射線照射による DNA 障害で糸球体内皮細胞に細胞老化が誘導され、糸球体腎炎への進展へと寄与することを明らかとしてきた。今回は、あらたにシスプラチンによる DNA 障害を与え、腎臓の老化細胞蓄積に寄与するかを評価した。シスプラチン投与 2 か月後の腎機能は、シスプラチン投与群での腎機能障害が認められた(シスプラチン投与群平均 BUN 41.37 mg/dL、非投与群平均 BUN 24.43 mg/dL、p 値 0.014、シスプラチン投与群平均 Cr 0.21 mg/dL、非投与群 平均 Cr 0.07 mg/dL、p 値<0.001)。一方、老化細胞の増加傾向は、投与後 Day 35 の時点から認められた。

#### (2-2) 酸化ストレス障害負荷

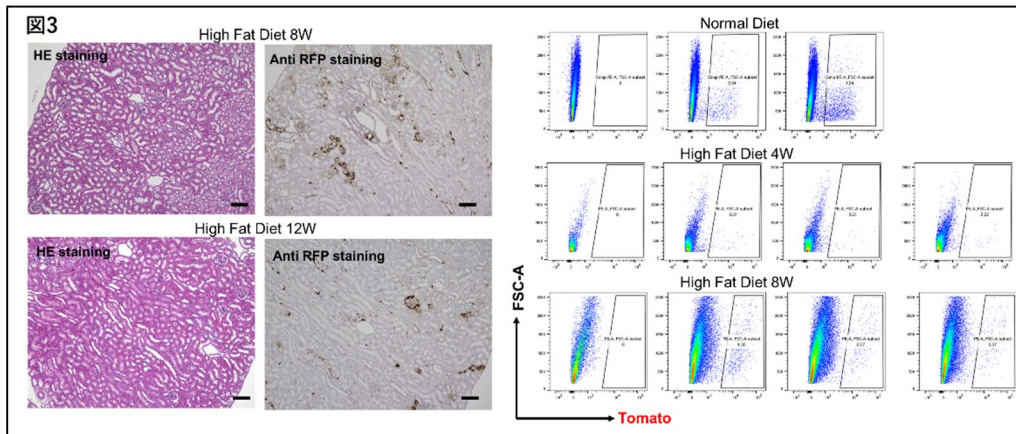
グリセオールの筋肉注射により横紋筋融解症を発症させることが動物モデルとして知られている。筋肉から放出されたミオグロビンは近位尿細管上皮細胞で取り込まれ、活性酸素を発生させ ROS を過剰発生させる。これまでの検証でグリセオール投与による急性腎不全で近位尿細管上皮細胞有意に老化細胞が生じることが分かった(論文投稿中)。

そこでグリセオールの投与回数を増やし、慢性腎臓病(CKD)を誘導させ、その過程で老化細胞が蓄積する経過を観察した。グリセオールの初回注射後 1 か月、グリセオール群で腎機能障害が認められた(グリセオール注射群平均 BUN 36.40 mg/dL、非投与群 23.66 mg/dL、p 値 = 0.011)。また病理所見でも尿細管障害や線維化が認められ、障害を受けた尿細管周囲を中心として老化細胞の蓄積が認められた。



### (2-3) 高脂肪食負荷

高脂肪食の単体投与のみでは有意な腎機能障害の進行は観察期間内には認められなかった。また、フローサイトメトリーなどの検証で、高脂肪食負荷後の明らかな老化細胞の増加は認められなかった。高脂肪食による加齢促進の可能性はこれまでも示唆されており、モデルの確立については再度検討が必要であり、今後の課題とした。



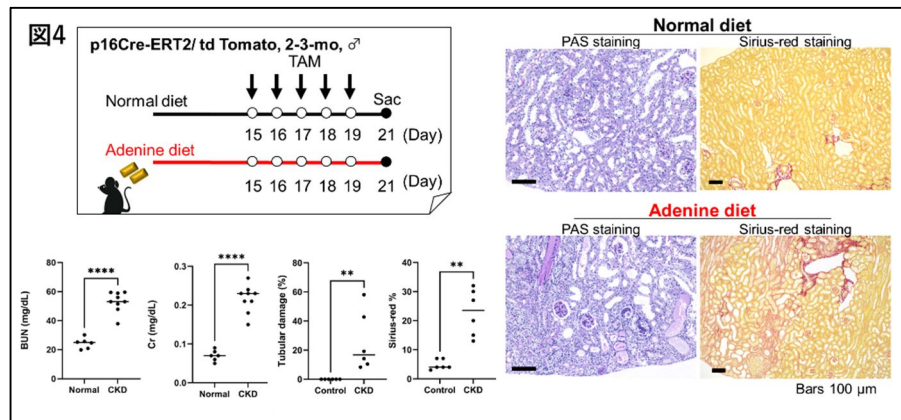
### (2-4) 発がんの有無評価

自然加齢群、またストレス負荷群、いずれの群においても腎がん形成は認められなかった。加齢は発がんの重要なリスク因子ではあるが、そのみでの動物モデルにおける発がん発症には、ゲノムストレスを加えることも検討すべきと考えられた。

### (2-5) アデニン負荷食

アデニン食は約3-4週間の負荷後、ヒトのCKDの病理所見と非常に類似した所見を呈し、CKD評価モデルとして最適と考えられた。

さらに、フローサイトメトリーや



病理切片などの評価からも、CKD誘導後に近位尿細管上皮細胞を中心として、細胞老化が誘導されていることを明らかとした。これらの近位尿細管上皮細胞で、老化細胞と非老化細胞をそれぞれ別に回収し、RNAシーケンスで解析したところ、老化した近位尿細管上皮細胞では、hallmarkでNFκBを介したTNFシグナル、IL6 JAK-STATカスケード、TGFシグナルなどの炎症性カスケードの関連が認められ、慢性炎症の発症母地となっている可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 荒谷 紗絵、中西 真	4. 巻 31
2. 論文標題 グルタミン代謝によるSenolysis制御	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 炎症と免疫	6. 最初と最後の頁 91-95
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Dan Li, Teh-Wei Wang, Sae Aratani, Satotaka Omori, Maho Tamatani, Yoshikazu Johmura, Makoto Nakanishi	4. 巻 -
2. 論文標題 Transcriptomic characterization of Lonrf1 at the single-cell level under pathophysiological conditions.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of biochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvad021.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sae Aratani, Makoto Nakanishi	4. 巻 -
2. 論文標題 Recent Advances in Senolysis for Age-related Diseases.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Physiology (Bethesda).	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 城村 由和、荒谷 紗絵、中西 真	4. 巻 73
2. 論文標題 仮説と戦略 老化細胞を殺して若返る	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 278-282
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 荒谷 紗絵、中西 真	4. 巻 46
2. 論文標題 総説 エピジェネティクスと老化	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 基礎老化研究 (Biomedical Gerontology)	6. 最初と最後の頁 25-33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 荒谷 紗絵、中西 真	4. 巻 61
2. 論文標題 セノリティクスの最先端	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Geriatric Medicine (老年医学)	6. 最初と最後の頁 63-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 荒谷 紗絵、中西 真	4. 巻 17
2. 論文標題 老化細胞除去による腎老化治療	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アンチ・エイジング医学	6. 最初と最後の頁 318-323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 荒谷紗絵、田中陽子、酒井行直、高橋暁子	4. 巻 12
2. 論文標題 老化細胞が分泌する細胞外小胞と腎臓における機能	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 腎臓内科	6. 最初と最後の頁 233-239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鎌田真慈、荒谷紗絵、川上聖司、Teh-Wei Wang、中西真
2. 発表標題 老化細胞のSASP抑制による加齢性疾患改善の検証-炎症は本当に老化を導くのか?-
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒谷 紗絵、Teh-Wei Wang、中西真
2. 発表標題 老化細胞のシングルセル解析を用いた加齢腎と慢性腎臓病の病態解明
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒谷 紗絵
2. 発表標題 リジュベネーションを目指した老化研究 Senolysisによるリジュベネーション
3. 学会等名 第64回日本老年医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中川 雄太, 荒谷 紗絵, 大塚 智之, 大塚 裕介, 保富 亮介, 奥畑 好章, 柏木 哲也, 酒井 行直
2. 発表標題 高齢者の腹膜透析の現状と課題
3. 学会等名 第50回東部腎臓学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荒谷紗絵、菅野哲平、酒井行直、清水章、清家正博、鶴岡秀一
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害薬と抗がん剤併用の肺がん患者における腎機能障害の検討
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荒谷紗絵、酒井行直、住祐一郎、鶴岡秀一
2. 発表標題 Productive agingを目指した超高齢者への腹膜透析導入
3. 学会等名 第71回日本老年病学会 関東甲信越地方会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 南野 徹（分担：荒谷 紗絵，中西 真）	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 460
3. 書名 生物の寿命延長 ～老化・長寿命の基盤研究最前線～	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------