

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590780

研究課題名（和文）

腎臓におけるアンチエイジング：

メカニズムの解明と統合的治療戦略の確立

研究課題名（英文）

Anti-aging on kidney: Elucidation of the mechanism and establishment of the integrated treatment strategy

研究代表者

富田 奈留也（TOMITA NARUYA）

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70314432

研究成果の概要（和文）：本研究では「加齢による腎障害進展には、ミトコンドリア機能低下による血管新生因子の低下が関与している」と仮説を立て研究を行った。本研究の結果として、1. 加齢腎においては酸化ストレス蓄積によるミトコンドリア機能障害が進行している。2. ミトコンドリア機能障害により虚血に対する血管新生因子発現応答性の低下が認められる。3. 血管新生の低下により慢性虚血が進行し、間質線維化が促進する。以上の3点が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We hypothesized in this study that "the decline of the vascularization factor due to the mitochondrial dysfunction participated in renal damage by the aging". As a result of this study, we demonstrated that (1) the mitochondrial dysfunction by the accumulation of oxidative stress progress with aging in the kidney, (2) responsiveness of vascular endothelial growth factor expression for ischemia are decreased by mitochondrial dysfunction, (3) chronic ischemia are progressed by reduction of angiogenesis in the kidney, which caused progression of renal fibrosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：腎臓学

## 1. 研究開始当初の背景

老化とは、医学的には「加齢に伴う不可逆的生理的機能の減退」と定義されている。腎臓に於いても加齢に伴った腎機能低下が、不可逆的な形態学的（腎硬化症）および分子生物学的変化を伴って認められる。近年の人口高齢化に伴い、このような腎硬化症患者は増加の一途をたどっており、高齢者の透析患者

増加が医療経済面からも深刻な課題となりつつある。さらに軽微な腎障害や検尿異常で定義づけられる慢性腎臓病（Chronic Kidney Disease: CKD）が、強力な心血管病危険因子であることが判明している。本邦では一般住民の約 13% が CKD に該当し、その原因としては高血圧、糖尿病、脂質代謝異常症、メタボリックシンドロームなどの生活習慣病や

肥満、喫煙、さらに腎炎等が考えられる。さらにもう一つの大きな原因として加齢を忘れることはできない。加齢がCKD増加に関与していることが明らかとなっている。高齢者のQOLを維持し健康加齢 (successful aging) を達成するためには、加齢による腎機能低下のメカニズムを明らかにし、心血管病及び慢性腎不全の予防及び治療戦略を立案することが重要となる。

加齢に伴う進行性腎障害の責任病変の主体は腎臓間質線維化である。腎線維化の原因の一つに組織の低酸素に対する血管新生能の低下が考えられている。腎臓尿細管では低酸素状態が持続した場合、通常Vascular endothelial growth factor (VEGF) 産生が増加し、間質毛細血管数を増加させ血流を増加させる働きがある。しかし、加齢腎ではこの低酸素に対するVEGF発現が低下し、間質毛細血管数低下を引き起こし、腎間質障害の一因となっていると考えられる。しかし、この加齢腎でのVEGF産生低下の機序は十分には解明されていない。

尿細管上皮細胞はmitochondriaの豊富な細胞であるが、加齢に伴い、酸化ストレスの蓄積などによりmitochondria機能は低下する。Mitochondria機能の一つに低酸素を感知する酸素センサーの機能がある。そこで、「加齢による腎障害進展には、mitochondria機能障害を伴う血管新生能の障害が関与している」と仮説を立て、加齢による腎障害進展過程における間質血管新生障害と尿細管mitochondria機能異常の関連を検討した。

## 2. 研究の目的

加齢による腎障害 (間質線維化) の病態形成における血管新生能の障害機序とmitochondria機能異常の果たす役割を明らかにすることを本研究の目的とする。

具体的には以下の解明を行う。

- (1) 若齢ラットに比較し、老齢ラット腎臓における間質線維化、慢性虚血、血流低下、毛細血管網減少の確認
- (2) 若齢ラットに比較し、老齢ラット腎臓におけるmitochondria DNA障害、機能低下、形態異常の確認
- (3) ヒト尿細管上皮細胞を用いたmitochondria機能低下条件下での低酸素に対するVEGF発現応答の検討

## 3. 研究の方法

(1) 老齢ラット腎臓における間質線維化、慢性虚血、毛細血管網減少の確認：老齢ラット (24ヶ月齢) と若年ラット (4ヶ月齢) を用いた (各群 n=20)。低酸素部位集積物質であるpimonidazoleを静脈内投与後に屠殺し、腎臓を摘出した。間質線維化はMasson染色にて評価した。組織虚血の評価はpimonidazole免疫染色にて評価した。毛細血管網はRat endothelial cell antigen (RECA) 抗体により血管内皮を同定・染色して評価した。VEGF産生は免疫組織染色にて確認した。

(2) 老齢ラット腎臓におけるmitochondria DNA障害、機能低下、形態異常の確認：Mitochondria酸化障害マーカーである8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) の尿細管への集積も免疫染色にて評価した。さらに、ラット腎の電子顕微鏡組織を作成し、mitochondriaの形態変化を評価した。Mitochondriaの機能評価はcytochrome C (COX) 機能染色にて評価した。

(3) ヒト尿細管上皮細胞を用いたmitochondria機能低下条件下での低酸素に対するVEGF発現応答の検討：ヒト近位尿細管上皮細胞を用いた。Mitochondria DNA欠損 (p0) 細胞を作成し、低酸素 (2% O<sub>2</sub>) 条件下でのVEGF発現をELISAにて検討した。また、mitochondria呼吸鎖阻害薬 (myxothiazol) 存在下での低酸素に対するHIF1活性化、VEGF発現も検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 加齢腎では毛細血管網が減少し、慢性虚血を認めるが、VEGF産生は低下する

老齢ラットは若年ラットに比較して、Masson染色で評価した間質線維化、尿細管間質障害が進展していた。

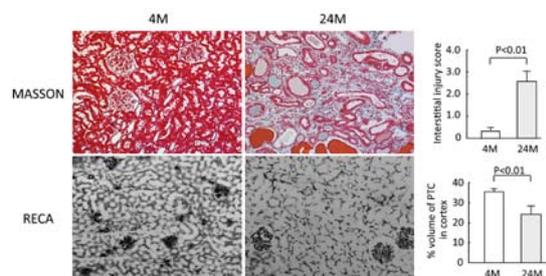


図1. 加齢ラット腎の線維化と毛細血管網

間質線維化スコア (Grade 0-4) は、若年ラットが  $0.4 \pm 0.2$  に対し、老齢ラットは  $2.6 \pm 0.4$

と有意に高かった (図 1 上)。間質毛細血管網は老齡ラットでは若年ラットに比較し、有意に低下していた (図 1 下、RECA 染色陽性面積; 老齡ラット  $22 \pm 4\%$ , 若年ラット  $35 \pm 3\%$ )。Pimonidazole 免疫染色にて評価した組織虚血は、老齡ラットでは皮質部に広範に組織虚血を認めた (図 2 上)。しかし、VEGF 発現は老齡ラット腎尿細管間質では若年ラットに比較し減少していた (図 2 下、VEGF 染色陽性面積; 老齡ラット  $31 \pm 8\%$ , 若年ラット  $82 \pm 5\%$ )。

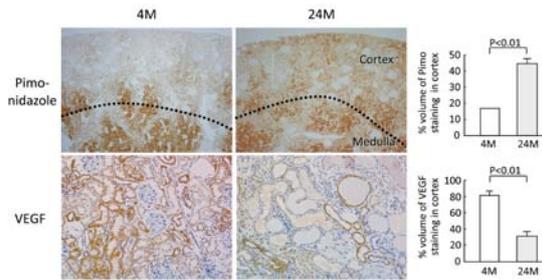
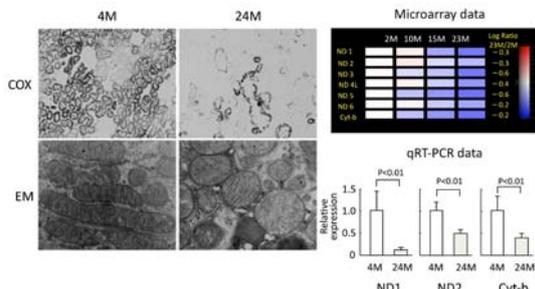


図 2. 加齢ラット腎間質虚血と VEGF 産生

### (2) 加齢腎では mitochondria DNA 障害、機能低下、形態異常を認める

8-OHdG 免疫染色にて評価した組織 mitochondria DNA 酸化的障害の蓄積は、若年ラットではほとんど認め無かったが、老齡ラットでは広範に認めた。Mitochondria 呼吸鎖 IV の機能を反映する COX 機能染色では、老齡ラットでは若年ラットに比較し COX 活性が減少し、mitochondria 機能異常の存在が示唆された。(図 3 左上)。電顕で検討した mitochondria 微細構造は、老齡ラットでは mitochondria の膨化・短小化が認められ、形態変化が生じていた (図 3 左下)。ミトコンドリア DNA でコードされるミトコンドリア呼吸鎖の遺伝子発現も Microarray 解析、



qRT-PCR 解析共に低下していた (図 3 右)。

図 3. 加齢ラットのミトコンドリア障害

### (3) Mitochondria 機能低下時には低酸素に対する VEGF 発現応答の検討

培養ヒト近位尿細管細胞では低酸素培養で VEGF 産生亢進が認められた。この低酸素による VEGF 産生誘導はミトコンドリア呼吸鎖阻害薬 myxothiazol の同時投与により抑制された (図 4)。また、p0 細胞でも、VEGF 発現応答性が低下していた (図 4)。

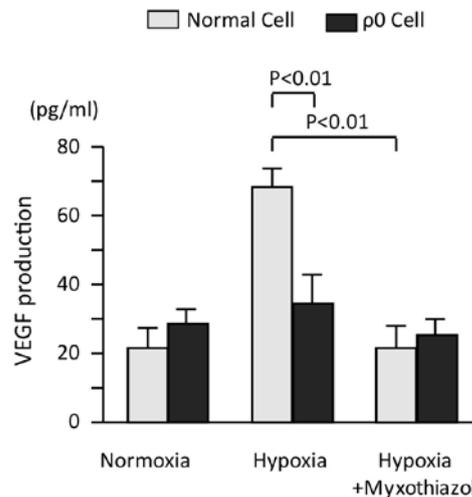


図 4. ミトコンドリア障害時の VEGF 産生

腎臓間質線維化のメカニズムは、尿中のアルブミン・補体成分が尿細管で再吸収され、炎症を惹起する蛋白尿-尿細管障害説を中心に研究がなされてきた。近年、糸球体病変に続く、同一ネフロンの間質血流低下による間質虚血が、腎臓線維化に関与しているという慢性虚血-尿細管障害説が提唱され、それを裏付けるデータも蓄積してきた。我々も IgA 腎症患者の腎組織を用い、慢性腎障害進展には血管新生因子の低下が間質の線維化に関与していることを明らかにした。加齢腎においても間質の血管新生能が低下しているが、そのメカニズムを明らかにした研究はない。本研究では「加齢による腎障害進展には、mitochondria 機能低下による VEGF の低下が関与している」と仮説を立て研究を行った。本研究から、(1) 加齢腎においては酸化ストレス蓄積による mitochondria 機能障害が進行している、(2) Mitochondria 機能障害により虚血に対する VEGF 発現応答性の低下が認められる、(3) 血管新生の低下により慢性虚血が進行し、間質線維化が促進する、以上の3点が明らかとなった。心不全研究領域では mitochondria 機能障害が心筋障害・心不全と関連があるとの研究報告があるが、腎臓領域で mitochondria 機能の面から腎障害・間質線維化を論じた報告はない。間質線維化と血

管新生とは密接な関連があり、mitochondria機能と血管新生の関連についての報告は in vitro の研究を中心になされているが、in vivo での研究はない。本研究により、mitochondria機能障害が加齢による腎障害・腎線維化のメカニズムの一部であることが明らかとなった。今後、抗加齢腎治療薬として mitochondria機能保持を目標とした薬剤創薬への可能性が広がると思われる。

加齢腎における mitochondria の酸化的障害・機能異常は低酸素に対する応答性を低下させ、VEGF 発現の低下、血管新生能の障害を惹起し、結果として虚血進行による尿細管間質障害を引き起こすことが示唆された。

#### 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)

①佐藤稔、柏原直樹、腎老化とバイオマーカー、Anti-aging Science、査読無、2011, 3(2): 170-174.

②Sato M, Fujimoto S, Horike H, Ozeki M, Nagasu H, Tomita N, Sasaki T, Kashihara N. Mitochondrial damage-induced impairment of angiogenesis in the aging rat kidney.査読有、2011, 91(2): 190-202.

[学会発表] (計 7 件)

①佐藤稔、血管新生能からみた加齢による腎間質障害のメカニズム、第 41 回日本腎臓学会西部学術大会、2011/09/30、徳島

②城所研吾、加齢腎における間質繊維化促進機構の解明：血管新生抑制因子アンジオスタチン生成増加を介した内皮機能・血管新生能障害の関与、第 3 回腎疾患と高血圧研究会、2011/07/02、大阪

③城所研吾、ラット加齢腎における血管新生抑制因子アンジオスタチン産生変化、第 54 回日本腎臓学会学術総会、2011/06/16、横浜

④佐藤稔、ラット加齢腎では一酸化窒素産生低下により血管新生抑制因子アンジオスタチン産生が増加している、第 11 回日本抗加齢医学会総会、2011/05/28、京都

⑤城所研吾、一酸化窒素賛成低下はラット腎臓において血管新生抑制因子アンジオスタチン生成を増加させる、第 11 回日本 NO 学会学術集会、2011/05/13、東京

⑥佐藤稔、加齢による腎機能低下のメカニズム：ミトコンドリア機能障害の意義、第 9 回日本抗加齢医学会総会、2009/05/29、東京

⑦富田奈留也、加齢に伴う腎機能障害進展メカニズムの検討～腎機能障害を血管新生から考える～、第 82 回日本内分泌学会学術総会、2009/04/23、前橋

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

なし

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

富田 奈留也 (TOMITA NARUYA)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70314432

##### (2)研究分担者

柏原 直樹 (KASHIHARA NAOKI)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：10233701

##### (3)連携研究者

なし