

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 25 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591148

研究課題名（和文） 糖尿病腎症に対するミトコンドリア制御に基づいた新規治療法の探索

研究課題名（英文） New therapeutic strategy for diabetic nephropathy

研究代表者

古家 大祐（KOYA DAISUKE）

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：70242980

研究成果の概要（和文）：

本研究では、サーチュイン1（SIRT1）に着目して、尿細管障害におけるミトコンドリア異常が酸化ストレス・炎症・アポトーシスを介して老化腎症および糖尿病腎症の成因となっているとの仮説のもと、その意義と制御手段を、糖尿病マウスおよびカロリー制限マウスを用いて解明した。①老化腎症が、カロリー制限によるSIRT1の維持がオートファジー機構を維持してミトコンドリア形態の変異と腎障害を改選すること、②レスベラトロールは腎ではサーチュイン非依存性に抗酸化作用を介して腎保護を発揮すること、③カロリー制限によって、糖尿病肥満ラットの腎障害がSIRT1-オートファジー機構の維持によるミトコンドリア形態の正常化により改善することを見い出した。

研究成果の概要（英文）：

Here, we hypothesized that mitochondria dysfunction due to aging- and diabetes-induced sirtuin 1 (SIRT1) down regulation could result in renal inflammation, increased oxidative stress, and finally renal pathologies. Firstly, calorie restriction exerts anti-inflammatory effects and improves the dysregulation of autophagy through the restoration of SIRT1 in the aging kidneys, resulting in the amelioration of renal injuries. Secondly, resveratrol (RSV) ameliorates renal injury and enhanced mitochondrial biogenesis with Mn-SOD dysfunction in the kidney of db/db mice, through improvement of oxidative stress via normalization of Mn-SOD function and glucose-lipid metabolism via AMPK/SIRT1-independent pathway. Thirdly, calorie restriction exerts anti-inflammatory effects and improves the dysregulation of autophagy through the restoration of SIRT1 in the kidneys of WFRs, resulting in the amelioration of renal injuries in type 2 diabetes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
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：代謝学

キーワード：エネルギー、糖代謝異常、糖尿病腎症

1. 研究開始当初の背景

糖尿病により惹起される血管合併症、特に糖尿病腎症の成因に関する研究を推進して

きた。その結果、高血糖に基づく、1)腎糸球体および構成細胞におけるPKC活性化による酸化ストレスの増強、2)血管および構成内皮

細胞の機能障害による酸化ストレスの増強が、腎障害の発症、進展に重要な役割を演じていること、さらに、PKC 阻害薬、テトラヒドロピオブテリン、抗酸化薬(ビタミン E)によって、糖尿病モデル動物の腎障害や内皮機能障害が改善されることを報告してきた。国内外の研究者らも、酸化ストレスと糖尿病腎症を含む血管合併症、老化、動脈硬化に関する研究を行い、抗酸化薬、抗酸化酵素の誘導、Poly(ADP-ribose) polymerase 阻害薬によって、細胞あるいは動物実験モデルにおける糖尿病腎症の発症、進展阻止に有効であるとの報告をしている。しかし、未だ、臨床応用されている抗酸化薬が、ヒト糖尿病腎症の発症、進展に有効であったとの一定した見解は得られていない。近年注目されているカロリー制限やレスベラトロールにより活性化される SIRT1 は、酸化リン酸化反応と PGC1- α を介したミトコンドリアバイオジェネシスに関連する遺伝子を誘導することによって、ミトコンドリア機能を制御している。

2. 研究の目的

老化腎症、および糖尿病腎症に対する新たな治療法の開発を目的として、サーチュインに着目して、尿細管障害におけるミトコンドリア異常が酸化ストレス・炎症を介して糖尿病腎症の成因となっているとの仮説のもと、その意義と制御手段を、糖尿病マウスを用いて解明を試みることにした。

3. 研究の方法

最近、抗老化分子として注目されている SIRT1 機能を中心に、

- (1) 老化腎症がカロリー制限によって改善するか、また、その分子機構は SIRT-1 依存性か否かを検討する。
- (2) 糖尿病腎の尿細管組織のミトコンドリア異常および腎機能障害に対してレスベラトロールの効果があることを検証する。
- (3) SIRT1 活性の変異がミトコンドリア異常、酸化ストレス、炎症に関わるかを、特に、ミトコンドリア形態とオートファジーに着目して、糖尿病モデル肥満ラットを用いて検討する。

4. 研究成果

(1) 加齢腎におけるカロリー制限の効果

① 加齢(24 ヶ月齢)マウスの近位尿細管細胞では、ミトコンドリア内の酸化ストレス増大と膨化してクリステの消失を特徴とする形態異常のミトコンドリアが蓄積していた。また、酸化ストレスに関連したミトコンドリア DNA 変異の頻度と腎機能障害の程度(血清シスタチン C の上昇)は強い正相関を示した。これら結果は、尿細管細胞におけるミトコン

ドリアの形態異常と腎機能障害との強い関連性を示しており、加齢に関連したミトコンドリア形態あるいは機能異常の是正が、加齢腎障害の治療手段となる可能性を示すものであった。

加齢腎において低酸素状態が亢進するが、老化腎の尿細管細胞では低酸素刺激に対するオートファジー活性の低下が確認された(図 1)。一方、12 ヶ月間の 40% カロリー制限を加えたマウスにおいては、尿細管細胞での低酸素に対するオートファジー活性が保持され、異常形態のミトコンドリアの蓄積、腎機能障害は有意に改善されていた(図 1)。これらの結果は、加齢腎病変の進展メカニズムとして、低酸素に対する近位尿細管細胞の

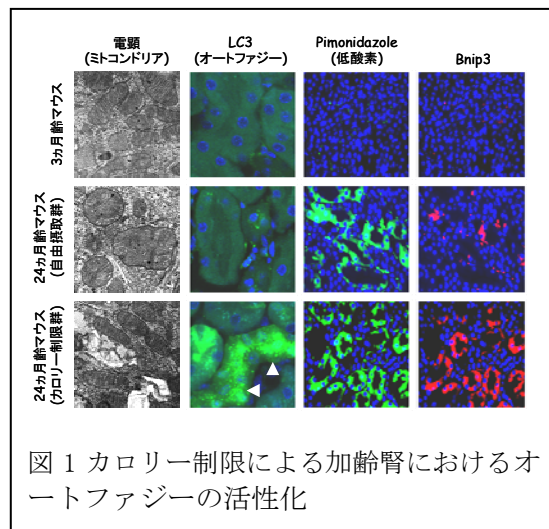


図 1 カロリー制限による加齢腎におけるオートファジーの活性化

ストレス応答、あるいはオートファジー系の変異が重要であることを示唆した。

そこで、オートファジー制御関連分子に関する検討を行った。Bnip3 蛋白は低酸素状態におけるオートファジー惹起に必須な蛋白として知られているが、加齢の尿細管細胞では虚血下でも Bnip3 発現は有意に低下していたが、カロリー制限によってこの発現量の低下が回復した。この結果は、近位尿細管細胞における Bnip3 発現調節が、加齢性腎病変進展に関わる分子メカニズムとして重要な役割を演じていること示唆した。

② Sirt1 の加齢腎への関わり

加齢に伴う腎病変の進展およびカロリー制限によるその抑制メカニズムにおける Sirt1 の関与を検討した。加齢マウス腎において、Sirt1 発現量は有意に減少していた。また、SIRT1 発現量と血清シスタチン C 値およびミトコンドリア DNA 変異の頻度との間に有意な負の相関がみられた。

加齢腎で認められた Sirt1 の発現低下が腎病変に及ぼす影響を検討するため、Sirt1 へ

テロ欠損マウスにおける 12 か月齢での腎病変を検討した。12 か月齢のワイルドタイプマウスでは加齢に伴う変化は認めず、Sirt1 ヘテロ欠損マウスでは 12 か月齢という早期から、24 か月齢マウスと類似した加齢性腎病変を呈し、尿細管細胞での異常ミトコンドリア蓄積、腎機能障害を認めた。さらに、Sirt1

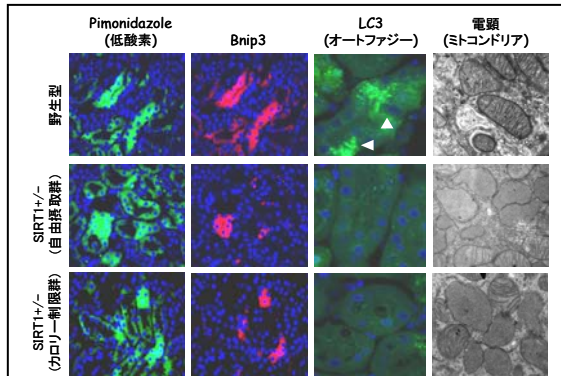


図 2. カロリー制限によるオートファジー活性化における SIRT1 の役割

ヘテロ欠損マウスにカロリー制限を行ったが、加齢に伴うミトコンドリア異常は改善されなかった。また、これらマウス腎尿細管細胞において、異常ミトコンドリア除去機構であるオートファジーの検討を行った結果、Sirt1 ヘテロ欠損マウスでは虚血に対するオートファジー活性が低下し、カロリー制限によっても回復を認めなかった(図 2)。また、12 か月齢の Sirt1 ヘテロ欠損マウスの腎尿細管細胞において、低酸素に伴う Bnip3 発現は有意に減少し、その発現低下はカロリー制限によっても回復を認めなかった(図 2)。これら結果から、加齢に伴う Sirt1 発現の低下によってオートファジー機構が障害されミトコンドリア形態異常に関わっていること、それら変異がカロリー制限による SIRT1 発現の回復によって改善されることが明らかとなった。つまり、カロリー制限によるオートファジー活性に回復に Sirt1 を介する Bnip3 発現が不可欠であることが示唆された 1)。

③ 虚血下のオートファジー系亢進に対する Sirt1 の役割

虚血に暴露された腎尿細管細胞において、Sirt1 が如何に Bnip3 発現を調節してオートファジーを誘導するのかを、培養近位尿細管細胞を用い検討した。マウス近位尿細管細胞を 12 ヶ月間に亘り通常食および 40% カロリー制限食にて飼育したラットから採取した血清を 10% 濃度で 6 時間培養した後、20% O_2 あるいは 1% O_2 下にて 24 時間培養した。その結果、通常食血清にて培養した細胞を 1% O_2 に 24 時間に亘り曝した際には、Foxo3 は一部

が核内に移行したが、LY294002 添加時にはその移行が増強された。また、抗酸化剤 NAC 存在添加時には Foxo3 の核内移行は阻止された。カロリー制限血清にて培養した細胞を 1% O_2 に 24 時間に亘り曝した際には、Foxo3 は核内に移行していた。一方、Sirt1 は、通常およびカロリー制限血清のいずれの条件においても核内に存在していた。カロリー制限血清で培養して 1% O_2 に曝した細胞では、Sirt1、Bnip3、p27Kip1、および LCII 発現の増強がみられたが、通常食血清で培養して 1% O_2 に曝した細胞では、Sirt1 発現は少なく、cleaved PARP および Caspase3 発現は増強していた。それら条件下で Foxo3 のアセチル化と Sirt1 との結合を検討すると、通常食血清で培養した際には Foxo3 はアセチル化され、Sirt1 との結合がみられなかった、一方、カロリー制限血清下では Foxo3 のアセチル化はみられず、Sirt1 と結合していた。つまり、転写因子 Foxo3a 活性はインスリンシグナルによるリン酸化と Sirt1 による脱アセチル化のバランスにより制御されており、カロリー制限食の血清にて培養した細胞においてその活性化が認められ、低酸素条件下での Bnip3 発現誘導に必須であることが明らかとなった。

(2) 2 型糖尿病モデルマウス、db/db マウスを resveratrol (RSV) 0.3% 含有食餌にて 8 週間飼育し、腎機能、腎組織検査とともに、ミトコンドリア Mn-SOD 発現と活性、AMPK-SIRT1 発現を検討した。その結果、図 3 に示すように、糖尿病マウスでみられる糸球体肥大とメサンギウム領域の拡大 (PAS 染色)、細胞外基質ファイブロンネクチンの強発現、マクロファージの浸潤が、RSV 治療によって改善することが見いだされた。次いで、糖尿病マウスの腎における酸化ストレス、特に、ミトコンドリアで起因の酸化ストレス、およびミトコンドリア遺伝子変異は、RSV によって

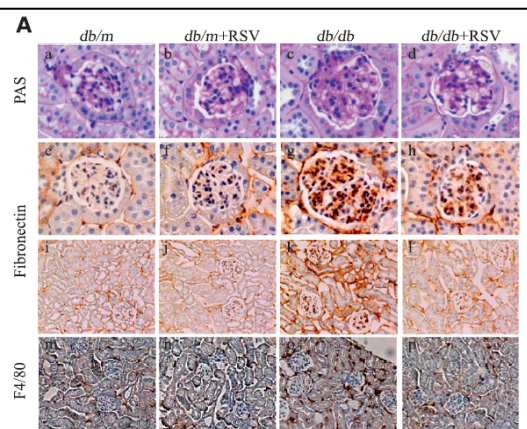


図 3. マウスの PAS 染色、ファイブロンネクチン、マクロファージ免疫染色

改善した。そこで、ミトコンドリア Mn-SOD の関与を検討したところ、糖尿病マウスにおいてその活性が低下しており、RSV によって改善することが見いだされた(図4)。以上の結果から、糖尿病によるミトコンドリア Mn-SOD 活性の低下が、酸化ストレスの増強、腎障害の発症に関わっていること、さらに、その変異が RSV によって改善することが明らかとなった。RSV は、AMPK-SIRT1 活性化作用があることが報告されている。そこで、RSV がカロリー制限模倣薬として効果を発揮したか否かを検討したところ、腎において、RSV は AMPK-SIRT1 非依存性に(図5)、その抗酸化

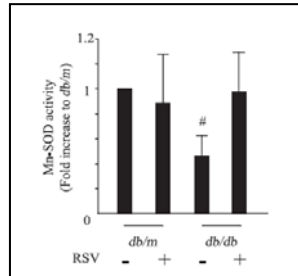


図4. Mn-SOD 活性

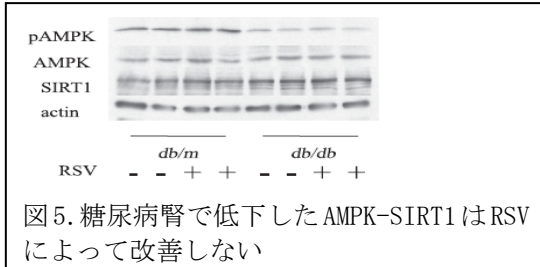


図5. 糖尿病腎で低下した AMPK-SIRT1 は RSV によって改善しない

作用を介してミトコンドリア制御に関わっている可能性が示唆された。AMPK および SIRT1 ノックダウン培養近位尿細管細胞を用いて、RSV による抗酸化作用が、AMPK-SIRT1 非依存性であることを検討した。それぞれの細胞においても H2O2 暴露による酸化ストレスがされたことから、上記の結果は、RSV の抗酸化作用が糖尿病腎症に対して保護的に作用したと考えられた。

(3) 肥満 2 型糖尿病ラットにおける 24 週間のカロリー制限は、尿アルブミン尿増加と腎機能低下、糸球体効果と尿細管間質の繊維化、炎症細胞浸潤を改善した(図6)。その分子機構を検討したところ、通常食の 2 型糖尿病ラ

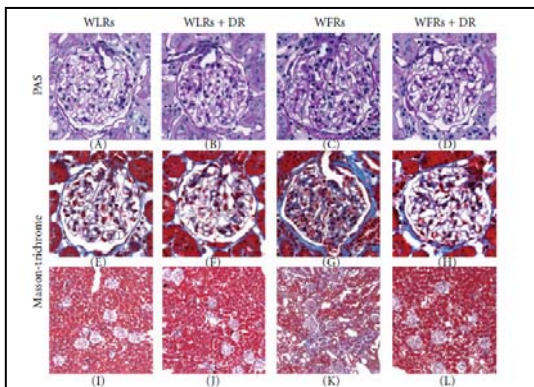


図6. PAS および Masson-Trichrome 染色

ットでは、SIRT1 低下を介する NF- κ B アセチル化、つまり活性化が生じて炎症を惹起していたが、カロリー制限による SIRT1 活性がその変異を改善していることであった。さら

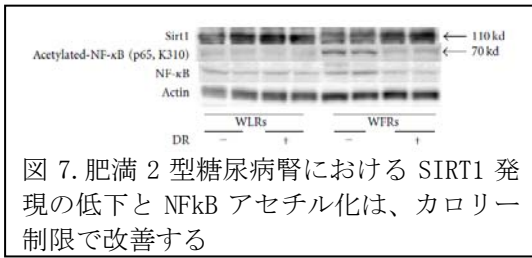


図7. 肥満 2 型糖尿病腎における SIRT1 発現の低下と NF κ B アセチル化は、カロリー制限で改善する

に、通常食を与えた糖尿病ラットミトコンドリア形態異常とオートファジー機構の低下は、カロリー制限によって改善した(図7)。以上の結果から、老化腎症と同様に糖尿病ラットの腎障害は、SIRT1-オートファジー機構の破綻が主たる成因であり、カロリー制限による SIRT1 活性の維持が炎症の抑制とミトコンドリア制御に深く関連していることが見いだされた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- Huber TB, Edelstein CL, Hartleben B, Inoki K, Jiang M, Koya D, Kume S, Lieberthal W, Pallet N, Quiroga A, Ravichandran K, Susztak K, Yoshida S, Dong Z. Emerging role of autophagy in kidney function, diseases and aging. *Autophagy* 8:7, 1-23; July 2012 査読有
- Kume S, Thomas MC, Koya D. Nutrient sensing, autophagy and diabetic nephropathy *Diabetes*. Jan;61(1):23-9. 2012 査読有
- Kanasaki M, Nagai T, Kitada M, Koya D, Kanasaki K. Elevation of the antifibrotic peptide N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline: a blood pressure-independent beneficial effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitors. *Fibrogenesis Tissue Repair*. Nov 30;4:25. 2011 査読有
- Tanaka Y, Kume S, Kitada K, Kanasaki K, Uzu T, Maegawa H, Koya D. Autophagy as a Therapeutic Target in Diabetic Nephropathy *Experimental Diabetes Research* ;2012:628978. 2012 査読有
- Kitada M, Takeda A, Nagai T, Ito H,

- Kanasaki K, Koya D. Dietary restriction ameliorates diabetic nephropathy through anti-inflammatory effects and regulation of the autophagy via restoration of Sirt1 in Diabetic Wistar fatty (fa/fa) rats, a model of type 2 diabetes. *Experimental Diabetes Research* 2011:908185. 2011 査読有
6. Atsumi H, Kitada M, Kanasaki K, Koya D. Reversal of redox-dependent inhibition of diacylglycerol kinase by antioxidants in mesangial cells exposed to high glucose. *Mol Med Report*. Sep-Oct;4(5):923-7. 2011 査読有
7. Koyama T, Kume S, Koya D, Araki S, Isshiki K, Chin-Kanasaki M, Sugimoto T, Haneda M, Sugaya T, Kashiwagi A, Maegawa H, Uzu T. SIRT3 attenuates palmitate-induced ROS production and inflammation in proximal tubular cells. *Free Radic Biol Med*. Sep 15;51(6):1258-67. 2011 査読有
8. Kanasaki K, Koya D. Biology of obesity: lessons from animal models of obesity. *J Biomed Biotechnol*. 2011:197636. 2011 査読有
9. Kitada M, Kume S, Imaizumi N, Koya D. Resveratrol improves oxidative stress and protects against diabetic nephropathy through normalization of Mn-SOD dysfunction in AMPK/SIRT1-independent pathway. *Diabetes*. Feb;60(2):634-43. 2011 査読有
10. Kume S, Uzu T, Horiike K, Chin-Kanasaki M, Isshiki K, Araki S, Sugimoto T, Haneda M, Kashiwagi A, Koya D. Calorie restriction enhances cell adaptation to hypoxia through Sirt1-dependent mitochondrial autophagy in mouse aged kidney. *J Clin Invest*. Apr;120(4):1043-55. 2010 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古家 大祐 (KOYA DAISUKE)
金沢医科大学・医学部・教授