

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)

研究期間： 2007 ~ 2008

課題番号： 19590963

研究課題名 (和文) 慢性腎臓病に対する抗加齢医療の介入

研究課題名 (英文) Anti-aging therapy against chronic kidney disease

研究代表者

林 晃一 (HAYASHI KOICHI)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号： 80164937

研究成果の概要：

加齢とともに腎組織内マクロファージの浸潤が増加傾向を示し、腎線維化も加齢により増加傾向を示した。一方、寿命と関連する Sirt1 はカロリー制限により腎臓での発現が亢進し、酸化ストレスなどの刺激に対し、カタラーゼ発現を亢進させることにより腎保護的に作用する。さらに近位尿細管 Sirt1 特異的過剰発現マウスではシスプラチンによる腎障害の改善、アポトーシス抑制が見られ、腎臓病における Sirt1 の保護作用が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
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： 慢性腎臓病、加齢、尿細管、Sirt1、

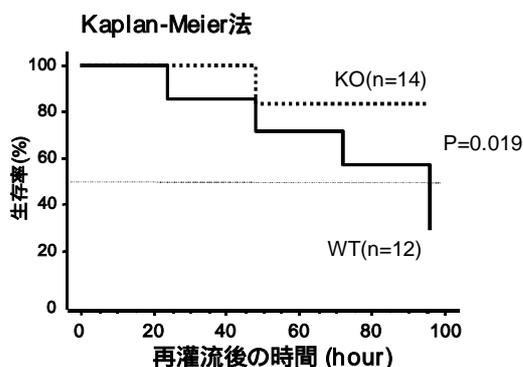
1. 研究開始当初の背景

最近、本邦における70歳以上の高齢者が10人に1人との統計が発表され、日本人の高齢化が着実に進んでいることが裏づけされた。一方、近年の疫学調査の結果、慢性腎臓病の頻度が予想以上に多いことが示され、さらに

年齢とともにGFRの低下が進むことも明らかにされており、今後加齢に伴う慢性腎臓病が増加し、末期腎不全から透析療法を必要とする人口が増加することが容易に想像される。また、以前より存在する慢性腎疾患に対しても、加齢が腎機能を悪化させる。

一般に加齢に伴う腎臓病では、タンパク尿や血尿を伴わない腎萎縮が観察され、両側の腎臓重量は 250-270 g から 80 歳台では 180-200 g に減少する。この現象は循環器系の臓器である心臓では萎縮をきたさないことと対照的である。腎臓病の進展や発現には全身血圧が重要であり、血圧コントロールが腎萎縮を軽減させるが、それ以外にも食事タンパク・食塩摂取が直接あるいは腎血行動態を介して間接的に影響を与えることが知られている。このような因子以外に、代謝の観点からも病態の検討が始められている。近年、カロリー制限を行うと寿命が延長するとの研究が発表されてきており、臓器や細胞の加齢と代謝との関連に注目が浴びてきている。一般にその機序の一環に細胞内代謝系との関連が重要であると推測されている。この点に関して、申請者のグループでは PPAR α ヘテロノックアウトマウスにおいて虚血再灌流モデルを作成し、腎臓病の程度やマウスの生存率を評価したところ、PPAR α ノックアウトマウスの方が腎臓病の程度や生存曲線が改善することを見出し、その機序の一端として Forkhead transcription factor-1 (FOXO-1) が関与することを示唆した(吉岡ら、日本腎臓学会雑誌 48(3); 204, 2006) (図 1)。

図 1. 虚血再灌流マウスモデルにおける生存率



FOXO-1 は細胞周期蛋白である p27kip1 を増加させるが、申請者らは p27kip1 が腎不全において進行抑制に関与することや (Kanda T, Wakino S and Hayashi K, et al, Kidney Int 64;2009-2019, 2003)、FOXO-1 が PPAR と直接蛋白・蛋白結合し PPAR の転写活性を抑制すること (Dowell P, et al, J Biol Chem 278;45485-45491, 2003) が示されている。さらに、申請者らは PPAR が存在すると、エネルギー代謝に関連する種々の因子が作動し、この結果 Akt のリン酸化がインスリンシグナルの改善をもたらす糖の細胞内への取り込みを促進する一方 (Kanda T, Wakino S and Hayashi K, et al, FASEB J 20;169-171, 2006)、酸化ストレスの増加をもたらす、細胞障害の方向に働くことが示唆されている。他方、PPAR リガンドは種々の腎臓病を抑制することが示されており、申請者のグループも肥満ラットの腎臓病抑制作用 (Fujiwara K and Hayashi K, Metabolism 49;1361-1364, 2000) や腎内一酸化窒素産生を刺激すること (Fujiwara K and Hayashi K, Hypertension 33;1470-1475, 1999) を報告しており、これらの結果を総合すると代謝に関連する PPAR を中心とした種々の因子が腎臓病や寿命・加齢に対する影響に関して、いまだ明確な結論が出されていないと言わざるを得ない。すなわち、加齢や代謝を中心とする因子が腎内液性因子の変化をもたらす腎血行動態に影響を与え、腎臓病を進行させる可能性も考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、加齢に伴う腎臓病の進行機序を検討すること、ならびにこの進行を抑制すべく慢性腎臓病への抗加齢医療の介入を行う場

合に、どの機序を作用点とする医療を行うべきかの探索をすることを目的とした。具体的には、加齢に伴う慢性腎臓病の進行機序を評価する目的では、PPAR や FOXO-1、さらにその上流に存在するとされる Sirt-1 などのエネルギー代謝に関連した因子が、その下流に存在するシグナルや酸化ストレスに対してどのような影響を与えるかを検討することとした。

次に、慢性腎臓病に対する抗加齢医療の観点から、カロリー摂取制限によって、加齢による腎臓病の進行が抑制できるか否か、さらに抑制効果を認めたらばどのような機序が関与するかを評価した。

3 . 研究の方法

6-8 週齢の C57BL/J マウスを経時的に 24 週間にわたって観察を行い、腎障害ならびに加齢に関連する項目について変化をきたしているか否かの比較検討を行った。さらに、以後の研究におけるマーカーとすべく細胞代謝による腎臓の形態ならびに組織変化を検討した。

次に、腎組織内マクロファージの浸潤の評価として、ED-1 の免疫組織化学で染色し、画像解析ソフト (SCION Image) により定量化を行った。さらに、腎線維化を Masson-trichrome 染色ならびに α -smooth muscle actin (SMA) で評価した。

さらに、ヒト近位尿細管培養細胞 (HK-2) に Sirt1 を導入し過酸化水素によるアポトーシスについて検討した。

以上の細胞レベルにおける検討に加えて、生体における SIRT1 の機能を検討するため Sirt1 発現を亢進するカロリー制限を施行した。さらに、Na⁺ Pcotransporter 蛋白のプロモーターを用い近位尿細管特異的過剰発現マウスを作製し、酸化ストレスに対する作用を評価した。

4 . 研究成果

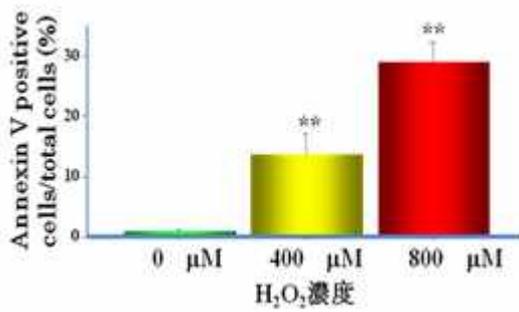
収縮期血圧は加齢につれて軽度の上昇を示したが、有意差を認めなかった。腎機能の変化として血清クレアチニン値を測定したところ、有意な上昇を認めなかった (平均値 0.24 - 0.30 mg/dL)。腎重量は軽度の減少傾向を示したが、24 週間の観察期間では有意差を生じなかった。

次に、腎組織内マクロファージの浸潤の評価として、ED-1 の免疫組織化学で染色し、画像解析ソフト (SCION Image) により定量化を行った。加齢とともに ED-1 陽性細胞が増加傾向を示した。腎線維化を Masson-trichrome 染色ならびに α -smooth muscle actin (SMA) で評価したが、加齢により増加傾向を示した。

加齢に伴う腎障害では腎萎縮ならびに腎機能低下が見られるが、そのひとつの機序の検討として酸化ストレスによる長寿遺伝子シグナルへの影響を検討した。NAD 依存性脱アセチル化酵素遺伝子 Sir2 は酵母、線虫の寿命を伸ばすが、その哺乳類ホモログで最も相同性が高い SIRT1 はカロリー制限に伴い発現が誘導され、寿命やストレスに対するタンパクの発現を調節する。

ヒト近位尿細管培養細胞 (HK-2) に Sirt1 を導入し過酸化水素によるアポトーシスについて検討したところ、過酸化水素の濃度依存性に投与 24 時間後のアポトーシス陽性細胞の増加を認めた (図 2)。

図 2. 酸化ストレスによるアポトーシスへの影響



さらに、SIRT1 上昇の意義を検討するため、SIRT1 過剰発現した細胞に過酸化水素を投与したところ、アポトーシスが抑制され（図 3）同時にカタラーゼの発現亢進が見られた（図 4）。

図 3. SIRT1 過剰発現によるアポトーシス抑制

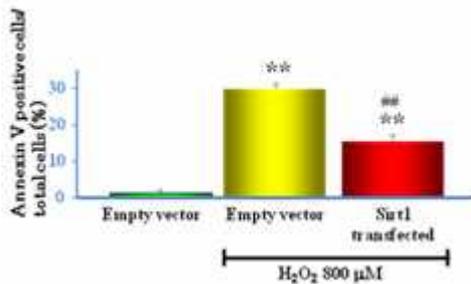
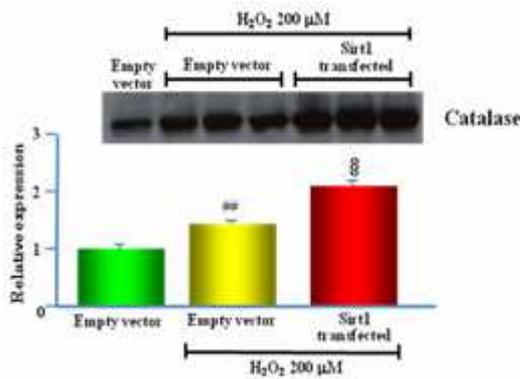


図 4. Sirt1 過剰発現によるカタラーゼ発現の亢進



さらに SIRT1 阻害薬投与のアポトーシス

の誘導について検討したところ、濃度依存性にアポトーシス陽性細胞増加を認めた。細胞内局在では、過酸化水素投与で、核・細胞質ともに Sirt1 の発現が亢進し、Foxo3a は核のみ発現が亢進した。更に、Foxo3a siRNA 投与の影響を検討したところ、過酸化水素投与によるアポトーシス増加が Foxo3a siRNA の併用投与で更に増加した。

次に生体における SIRT1 の機能を検討するため Sirt1 発現を亢進するカロリー制限を施行した。カロリー制限は尿細管の Sirt1 発現を亢進し（図 5）ウェスタンブロットで約 2 倍程度の亢進を認めた（図 6）。一方、糸球体や間質の Sirt1 発現は変化せず、生体における近位尿細管 Sirt1 の重要性が示唆された。

図 5. カロリー制限による尿細管の Sirt1 発現の亢進

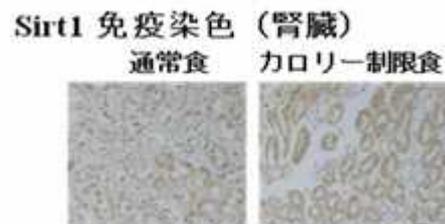
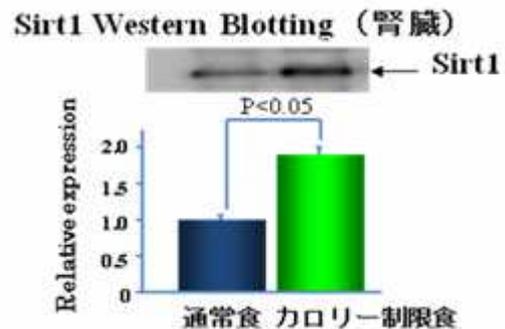
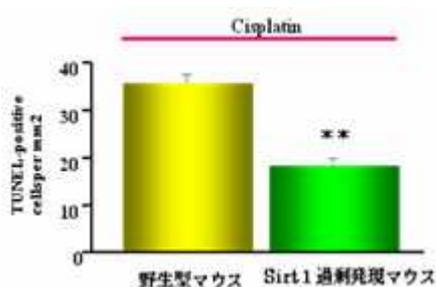


図 6. カロリー制限による腎 Sirt1 発現の亢進



さらに、近位尿細管特異的 Sirt1 過剰発現マウスを作製し、シスプラチンによる腎障害に対する Sirt1 の腎保護作用を検討したところ、Sirt1 の過剰発現部位は近位尿細管 S1+S2 セグメントで過剰に発現していた。シスプラチンの投与により、尿細管障害の改善、アポトーシスの抑制ならびに血清クレアチニン値の上昇抑制が見られた (図 7)。

図 7. Sirt1 過剰発現マウスにおけるアポトーシスの抑制効果



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 5 件)

Hasegawa K, Wakino S, Tatematsu S, Yoshioka K, Hara Y, Minakuchi H, Tokuyama H, Washida N, Homma K, Havashi K, Itoh H: Sirt1 protects against oxidative stress-induced renal tubular apoptosis by bidirectional regulation of catalase expression. **Biochemical & Biophysical Research Communications** 372(1):51-56, 2008、**査読の有無：あり**

Yoshioka K, Wakino S, Homma K, Kanda T, Tatematsu S, Hasegawa K, Sugano N, Ito O, Omata K, Saruta T, Havashi K: Renal cytochrome P450 as a determinant of impaired natriuresis by PPAR γ ligands in ovariectomized obese rats. **Obesity** 16(5):965-971, 2008、**査読の有無：あり**

Sugano N, Wakino S, Kanda T, Tatematsu S, Homma K, Yoshioka K, Hasegawa K, Hara Y, Suetsugu Y, Yoshizawa T, Hara Y, Utsunomiya Y, Tokudome G, Hosoya T, Saruta T, Havashi K: T-type calcium channel blockade as a therapeutic strategy against renal injury in rats with subtotal

nephrectomy. **Kidney International** 73 (7):826-834, 2008、**査読の有無：あり**

Kanda T, Wakino S, Havashi K, Plutzky J: Cardiovascular disease, chronic kidney disease, and type 2 diabetes mellitus: proceeding with caution at a dangerous intersection. **Journal of the American Society of Nephrology** 19 (1):4-7, 2008、**査読の有無：あり**

Hasegawa K, Wakino S, Tatematsu S, Yoshioka K, Homma K, Sugano N, Kimoto M, Havashi K, Itoh H: Role of dimethylarginine in vascular injury in transgenic mice overexpressing dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2. **Circulation Research** 101 (2):e2-e10, 2007、**査読の有無：あり**

〔学会発表〕(計 9 件)

本間康一郎、徳山博文、脇野修、立松覚、吉岡恭子、長谷川一宏、原義和、林晃一、伊藤裕：血管内皮細胞機能における Rho/ROCK系の意義と転写因子FOXOの関与の検討。第12回日本心血管内分泌代謝学会、2008年(11月29日) 熊本

長谷川一宏、脇野修、木本眞順美、立松覚、吉岡恭子、本間康一郎、原義和、林晃一、伊藤裕：尿細管SIRT 1はFoxO3a核内移行・カタラーゼ活性化を介し、アポトーシスを抑制する。第12回日本心血管内分泌代謝学会、2008年(11月28日) 熊本

長谷川一宏、脇野修、立松覚、徳山博文、原義和、水口 斉、林晃一、伊藤裕：ADMA分解酵素DDAH2は高脂肪食による膵頭内UCP2上昇を阻止し、膵インスリン分泌を亢進する - トランスジェニックマウスを用いた検討 -。第31回日本高血圧学会総会、2008年(10月11日) 札幌。
長谷川一宏、脇野修、林晃一、伊藤裕：尿細管SIRTのアポトーシス抑制作用。第51回日本腎臓学会、2008年(5月31日) 福岡

水口 斉、脇野修、林晃一、伊藤裕：慢

性腎臓病におけるインスリン抵抗性と尿細管障害。第51回日本腎臓学会、2008年（5月31日）福岡

長谷川一宏、脇野修、木本真順美、立松 覚、吉岡恭子、本間康一郎、原 義和、林 晃一、伊藤裕：ADMA分解酵素DDAH2のインスリン抵抗性に及ぼす影響—トランスジェニックマウスを用いた検討。第11回日本心血管内分泌代謝学会、2007年（11月17日）東京

菅野直希、林 晃一、脇野修、末次靖子、吉澤威勇、原洋一郎、徳留悟朗、細谷龍男：腎障害時の心血管障害におけるT型Caチャンネルとの関連。第30回日本高血圧学会、2007年（10月9日）沖縄。

長谷川一宏、脇野修、木本真順美、立松 覚、吉岡恭子、本間康一郎、原 義和、林 晃一、伊藤 裕：ADMAによる冠動脈硬化作用およびDDAH2の血管保護作用 - DDAH2トランスジェニックマウスを用いた検討—。第30回日本高血圧学会総会、2007年（10月9日）沖縄。

脇野修、吉岡恭子、長谷川一宏、立松覚、原義和、窪田直人、林 晃一、伊藤裕：虚血再還流腎症におけるPPAR γ のForkhead transcription factorを介する作用、第7回日本抗加齢医学会総会、2007（7月20日）年、京都

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

林 晃一（HAYASHI KOICHI）

慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号： 80164937

(2)研究分担者

脇野 修（WAKINO SHU）
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号： 50265823

(3)連携研究者

なし