

## 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 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590915

研究課題名（和文） 時間・代謝制御に基づく腎臓病および高血圧の治療戦略

研究課題名（英文） Therapeutic strategy for chronic kidney disease and hypertension based on time/metabolism regulation.

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（和文）：腎エネルギー代謝の観点から、Sirt1 を近位尿細管で過剰発現するマウスを作成したところ、シスプラチンによる腎障害が抑制され、酸化ストレスやミトコンドリアストレスのマーカーが抑制された。ストレプトゾシン誘発性糖尿病性腎症の発症において、近位尿細管の Sirt1 発現低下が起こり、それに伴い糸球体上皮における claudin-1 の発現増加ならびに蛋白尿が出現した。一方、近位尿細管に Sirt1 を過剰発現させたマウスに、ストレプトゾシン誘発性糖尿病を作製すると、糸球体上皮における Sirt1 の発現は維持され、それに伴い claudin-1 発現亢進の抑制ならびに蛋白尿が抑制され、近位尿細管から糸球体へのシグナル機構の存在が示唆された。

研究成果の概要（英文）：From the point of renal energy metabolism, cisplatin-induced proximal tubular injuries were abrogated by overexpressing Sirt1 specifically in mouse renal proximal tubules. In streptozotocin-induced diabetic mice, sirt1 expression in proximal tubules was suppressed and claudin-1 expression was upregulated in glomerular podocytes, which was accompanied by proteinuria. In diabetic mice overexpressing Sirt1 in proximal tubules, the Sirt1 expression was retained, and the overexpressed claudin-1 was reversed, with reduced proteinuria. These results suggest a signal crosstalk between proximal tubules and glomerular podocytes in diabetic nephropathy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 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：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：慢性腎臓病、高血圧、長寿遺伝子、Sirt、

## 1. 研究開始当初の背景

CKD の進展に関して、代謝の観点からの病態の検討が進められている。最近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。申請者のグループ

では PPAR $\gamma$  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、腎障害の程度やマウスの生存率を評価し、PPAR $\gamma$  ノックアウトマウスでは腎障害の程度や生存曲線が改善することを見出した。さらに、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 ; 204, 2006)。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;2009-19, 2003)、FOXO-1 が PPAR $\gamma$  と直接蛋白・蛋白結合し PPAR $\gamma$  の転写活性を抑制すること (Dowell P, et al, *J Biol Chem* 278;45485-91, 2003) が示されている。さらに、申請者らは PPAR $\gamma$  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のみならず (Kanda T, Wakino S and Hayashi K, et al, *FASEB J* 20;169-71, 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。さらに、最近代謝・寿命と関連する因子である SIRT1 が日内周期リズムを制御する遺伝子 (PER2) を調節すると報告されており (Asher G, et al, *Cell* 134:317-28, 2008)、日内周期リズムと代謝調節との関連が注目される。

血圧や腎臓には、日内周期リズムがあり、夜間睡眠時に仕事量を減らすように調節されている。一方、食塩過剰摂取では、夜間にも Na 排泄が行われ (Fujii T, et al, *Am J Hypertens* 33;29-35, 1999)、腎臓に対する負荷がかかる状況となる。夜間の過剰の仕事は代謝を亢進させ、酸化ストレスなどの産生を昼間・夜間と途絶えることなく産生し、腎臓は常に悪条件に暴露されることとなる。また、高齢者高血圧では CKD を伴うことが多いが、これらの患者では食塩感受性であり、前述と同様に夜間の高血圧や Na 排泄が起こりやすい。さらに、CKD では慢性的虚血が尿細管・間質での繊維化を惹起する可能性が示唆されているが、腎仕事量の減少により虚血に伴う腎障害の程度を緩和することが可能である。最近時計遺伝子がバゾプレッシン V2 受容体や上皮性 Na チャネル (ENaC) 発現の変動に関与すること (Zuber AM, et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 106;16523-8, 2009)、アルドステロンによる上皮性 Na チャネル (ENaC) mRNA 発現が、時計遺伝子である Per1 により修飾されることが報告され (Gumz ML, et al, *J Clin Invest* 119;2423-34, 2009)、時間制御遺伝子と体液調節・CKD との関連が強く示唆される。さらに興味深いことに、T 型 Ca チャネルが日内時計に影響を与えることが報告された (Kim DY, et al, *Eur J Neurosci* 21;1215-22, 2005)。

## 2. 研究の目的

本研究では、血圧、腎臓における仕事の日内リズムの消失が、腎臓での仕事量を増やし、また代謝の観点では、活性化に伴う酸化ストレスやミトコンドリアストレスなどを低下させることができない状況となり、CKD の進

展を促進させるとの仮説の下で、以下の事項を検証する。

### (1) 腎エネルギー代謝と腎障害の関連

腎エネルギーならびにミトコンドリア代謝が日内周期リズムにより影響を受けているか否か、エネルギー代謝と日内周期リズムが分離可能か、ならびに、カロリー制限による腎エネルギー代謝の日内周期リズムに及ぼす影響を評価する。

### (2) 日内周期リズムと腎障害との関連の検討

人為的、あるいは遺伝子工学的に日内周期リズムを消失させることにより、血圧調節ならびに腎障害が進行するか否か (日内周期リズムが腎臓の安静を生み出すか)、腎機能と日内周期リズムとの関連を評価する。また CKD では日内周期リズムが崩れているか否かを評価する。さらに、腎障害に関連する因子が日内変動を起こすか否かを検討する。

## 3. 研究の方法

腎組織障害として、腎エネルギー代謝の観点からとく尿細管・間質病変が酸化ストレス、ミトコンドリアストレスの結果惹起される可能性が予想されるため、間質線維化 (masson trichrome 染色) や Epithelial mesenchymal transition (EMT, vimentin,  $\alpha$ SMA) の評価を尿 L-FABP 測定とともに行う。さらに組織内繊維化誘発因子としての T 型 Ca チャネル/Rho キナーゼ (Sugano N, Hayashi K, et al, *Kidney Int* 73;826-34, 2008)、血管新生抑制因子としての angiostatin などの発現を検討する。さらに、酸化ストレスのマーカーとして、腎組織における dihydroethidium による評価を行う。

エネルギー代謝の面では、昼間および夜間の生体全体としてのエネルギー消費量の測定を行うと共に、腎臓における ATP、UCP-2 の変化やミトコンドリアの形態・サイズを、昼間および夜間別に評価する。また飢餓遺伝子が日内周期リズムを調節するとの関連性が存在することより (Asher G, *Cell* 前述)、SIRT1、FOXO、PPAR $\gamma$  の日内周期リズムの変化についても検討を行う。最後に、腎における CKD の進展による時計遺伝子 (BMAL、CLOCK、DEC2 など) の RNA 発現の変化を検討する。

時計遺伝子 Clock は種々の下流の時計遺伝子 (Per, Cry, Dec2 など) を制御することが報告されている (Fujimoto K, et al, *Int J Mol Med* 19;925-932, 2007)、本研究では、腎臓における時計遺伝子が細胞の種々のストレスに対する抵抗性に対して、いかなる影響をもたらすかを検討することにより、日内周期リズム遺伝子の CKD における役割を検討することができると思われる。

培養ヒト近位尿細管細胞 (PTEC) に Dec2 の deletion mutant を導入し (Fujimoto K, et al,

Int J Mol Med 19;925-932,2007) 日内周期リズム遺伝子発現を抑制した状態で、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による酸化ストレスやCKDでの uremic toxin の1種である methylglyoxal (MGO)の細胞障害作用を見る。これに伴うアポトーシスの程度を評価することにより、時計遺伝子の腎障害における役割を評価する。

SIRT1は histone deacetylase (HDAC)作用を有するが、その抑制薬である trichostatin A ならびにT型Caチャネル抑制薬によるSIRT1の抑制が時計遺伝子(Dec2、BMAL、Perなど)発現に与える影響ならびに最終的な細胞死への作用を検討する。これに並行して細胞におけるエネルギー代謝としてUCP-2、ATP産生を比較検討し、摂食・寿命系との関連を見る。

#### 4. 研究成果

腎組織障害として、腎エネルギー代謝の観点からとく尿細管・間質病変が酸化ストレス、ミトコンドリアストレスの結果惹起される可能性が予想される。まず、エネルギー代謝の面では、Na/P cotransporter II の promoter を用いて Sirt1 を近位尿細管(S1+S2セグメント)に導入し、Sirt1の過剰発現マウスを作成した。このマウスが妥当性を有することを証明するため、Sirt1の免疫組織染色を行ったところ、近位尿細管細胞にのみ発現が亢進していた。酸化ストレス亢進状況をシスプラチン投与によって行ったところ、近位尿細管特異的 Sirt1 過剰発現マウスでは、腎機能として血清クレアチニン値の上昇が抑制され、また、組織所見の障害も明らかに抑制された。さらに、組織内の酸化ストレスマーカーである4-hydroxy-2(E)-nonenal (4-HNE)の産生が低下していた。この変化とともに catalase, peroxisome proteins (PMP70), peroxisome acyl-A oxidase (ACOX-1)や、ミトコンドリアの PPAR- $\gamma$ -cofactor-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ), medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD)の低下が抑制された。一方、カロリー制限による Sirt1 の誘導を行い、シスプラチンによる障害抑制を検討したところ、同様の結果が得られた。

申請者らのグループは、すでに腎尿細管において、Sirt1が腎保護的に作用することを示したが(Hasegawa K, Wakino S, Hayashi K, et al, J Biol Chem 285;13045-56, 2010) この機序の一端として代謝を抑制し過剰な酸化ストレス負荷を除くとの従来の考え方に加えて、腎臓に対する安静周期の形成が腎保護作用に貢献する可能性も十分に推察される。代謝・寿命と関連する因子である Sirt1 が、マウスにおけるストレプトゾシン誘発性糖尿病性腎症の発症において、近位尿細管の Sirt1 発現低下が起こり、それに伴い糸球体上皮における claudin-1 の発現増加ならびに蛋白尿が

出現する。一方、近位尿細管に Sirt1 を過剰発現させたマウスに対して、ストレプトゾシン誘発性糖尿病を作製すると、糸球体上皮における Sirt1 の発現は維持され、それに伴い claudin-1 発現亢進の抑制、ならびに蛋白尿の抑制が観察された。いかにして、近位尿細管での SIRT1 が糸球体上皮に影響を与えるかに関して、その物質同定は現在報告段階にある。今後、Sirt1 ならびに蛋白尿の日内変動との関連を、時計遺伝子群(PER2など)の変動とともに、今後も継続的に検討したい。

#### 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18件)

Hasegawa K, Wakino S, Kimoto M, Minakuchi H, Fujimura K, Hosoya K, Komatsu M, Kaneko Y, Kanda T, Tokuyama H, Hayashi K, Itoh H: The hydrolase DDAH2 enhances pancreatic insulin secretion by transcriptional regulation of secretagogin through a Sirt1-dependent mechanism in mice. *FASEB Journal*, 2013, in press.、査読あり

Tokuyama H, Wakino S, Hara Y, Washida N, Fujimura K, Hosoya K, Yoshioka K, Hasegawa K, Minakuchi H, Homma K, Hayashi K, Itoh H: Role of mineralocorticoid receptor/Rho/Rho-kinase pathway in obesity-related renal injury. *International Journal of Obesity Research* 36(8):1062-1071, 2012, 査読あり

本間康一郎, 脇野 修, 林 晃一, 堀進吾, 伊藤 裕: ROCK阻害薬はFOXO3a活性を上昇させ血管内皮細胞の増殖、遊走、酸化ストレス耐性能を低下させる、未病と抗老化、査読無、21(6): 86-89, 2012

Homma K, Homma Y, Yamaguchi S, Shiina S, Wakino S, Hayashi K, Itoh H: Triglyceride-rich lipoproteins in chronic kidney disease patients undergoing maintenance hemodialysis treatment. *International Journal of Clinical Practice* 66(4):394-398, 2012, 査読あり

Washida N, Wakino S, Tonzuka Y, Homma K, Tokuyama H, Hara Y, Hasegawa K, Minakuchi H, Fujimura K, Hosoya K, Hayashi K, Itoh H: Rho-kinase inhibition ameliorates peritoneal fibrosis and angiogenesis in a rat model of peritoneal sclerosis. *Nephrology Dialysis & Transplantation* 26 (9):2770-2779, 2011, 査読あり

Hayashi K: L-/T-type Ca channel blockers for kidney protection: ready for

sophisticated use of Ca channel blockers. *Hypertension Research* 34(8):910-912, 2011 (commentary)、査読あり

Hara Y, Wakino S, Tanabe Y, Saito M, Tokuyama H, Washida N, Tatematsu S, Yoshioka K, Homma K, Hasegawa K, Minakuchi H, Fujimura K, Hosoya K, Havashi K, Nakayama K, Itoh H: Rho and Rho-kinase activation in adipocytes contributes to a vicious cycle in obesity that may involve mechanical stretch. *Science Signaling* 4(157):ra3, 2011、査読あり

林 晃一: JATOSサブ解析、循環器内科、査読無、70(4): 400-406, 2011年

林 晃二: CKDの病態とその管理の実際、内科、査読無、107(2): 203-209, 2011年  
本間康一郎、林 晃二、菅野直希、山口慎太郎、脇野 修、堀進吾、伊藤裕: 腎微小循環とCaチャネルサブタイプ、脈管学、査読無、51(1): 133-138, 2011年

林 晃一: 慢性腎臓病とレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系、循環器内科、査読無、69(1): 68-74, 2011年

Havashi K, Saruta T, Goto Y, Ishii M: Impact of renal function on cardiovascular events in elderly hypertensive patients treated with efonidipine. *Hypertension Research* 33(11): 1211-1220, 2010、査読あり

Havashi K, Homma K, Wakino S, Tokuyama H, Sugano N, Saruta T, Itoh H: T-type Ca channel blockade as a determinant of kidney protection. *The Keio Journal of Medicine* 59 (3):84-95, 2010 (Review article)、査読あり

Hasegawa K, Wakino S, Yoshioka K, Tatematsu S, Hara Y, Minakuchi H, Sueyasu K, Washida N, Tokuyama H, Tzukerman M, Skorecki K, Havashi K, Itoh H: Kidney-specific overexpression of Sirt1 protects against acute kidney injury by retaining peroxisome function. *Journal of Biological Chemistry* 285(17):13045-13056, 2010、査読あり

Washida N, Wakino S, Havashi K, Kuwahara T, Itoh H: Brachial-ankle pulse wave velocity predicts silent cerebrovascular diseases in patients with end-stage renal diseases. *Journal of Atherosclerosis & Thrombosis* 17 (2):165-172, 2010、査読あり

林 晃一: カルシウム拮抗薬-Ca チャネルサブタイプと腎保護作用、Therapeutic Research、査読無、31(9):1271-1277, 2010年

林 晃一: カルシウム拮抗薬、Life style Medicine、査読無、4(4):61-66, 2010年

林 晃一、脇野 修、徳山 博文: 高齢者腎疾患と高血圧 (腎硬化症を含む)、Geriatric Medicine、査読無、48 (8): 1041-1045, 2010年

[学会発表](計15件)

徳山 博文、脇野 修、神田武志、鷺田直輝、長谷川一宏、水口 斉、藤村慶子、本間康一郎、林 晃二、伊藤裕: 肥満関連腎症における脂肪腎臓連関の病態生理の解明。第16回日本心血管内分泌代謝学会総会、2012年(11月23日)、東京

脇野 修、藤村慶子、水口 斉、長谷川一宏、徳山 博文、林 晃二、伊藤裕: アンジオテンシン による腎障害に対する Ghrelin の腎保護効果。第35回日本高血圧学会総会、2012年(9月20日)、名古屋。  
林 晃二: Ca拮抗薬の薬剤間差 - T型、L型、N型Ca拮抗薬の腎保護作用 - 。第35回日本高血圧学会総会、シンポジウム、2012年(9月20日)、名古屋。

長谷川一宏、脇野 修、林 晃一、伊藤裕: 近位尿細管 Sirt1 はペルオキシソームストレスを抑制する - Conditional Tg, KOマウスの解析 - 。第55回日本腎臓学会総会、シンポジウム、2012年(6月2日)、横浜

藤村慶子、脇野 修、林 晃一、伊藤裕: アンジオテンシン による腎障害に対する Ghrelin の腎保護効果。第55回日本腎臓学会総会、2012年(6月1日)、横浜

長谷川一宏、脇野 修、林 晃二、伊藤裕: Sirt1 は、Dnmt1 を介した epigenetic 制御で、糖尿病性腎症の claudin-1 CpGメチル化を促進し、アルブミン尿を低下させる。第55回日本腎臓学会総会、2012年(6月1日)、横浜

長谷川一宏、脇野 修、林 晃二、伊藤裕: 尿細管特異的 Sirt1 欠損マウスは、液性因子 NMN 低下を介し糖尿病性腎症のアルブミン尿が増悪する - 。第55回日本腎臓学会総会、2012年(6月1日)、横浜

脇野 修、長谷川一宏、坂巻祐介、久保田英司、林 晃二、伊藤裕: 尿細管特異的 Sirt1 過剰発現マウスを用いた腎障害発症機序についての解析。第34回日本高血圧学会総会、高血圧関連疾患モデル学会合同シンポジウム、2011年(10月22日)、宇都宮

藤村慶子、脇野 修、水口 斉、長谷川一宏、徳山 博文、林 晃二、伊藤裕: アンジオテンシン による腎老化作用に対する Ghrelin の腎保護効果。第34回日本高血圧学会総会、2011年(10月22日)、宇都宮

徳山 博文、脇野 修、神田武志、鷺田直輝、長谷川一宏、水口 斉、藤村慶子、

本間康一郎、林 晃一、伊藤裕：肥満関連腎症における脂肪腎臓連関の病態生理の解明。第34回日本高血圧学会総会、2011年(10月22日)、宇都宮  
藤村慶子、脇野 修、林 晃一、伊藤裕：超音波パルスドプラーによる腎動脈血流速度と腎臓内血管抵抗の臨床的意義についての検討。第54回日本腎臓学会総会、2011年(6月16日)、横浜  
藤村慶子、脇野 修、林 晃一、伊藤裕：アンジオテンシン による腎老化作用に対するGhrelinの腎保護効果。第54回日本腎臓学会総会、2011年(6月15日)、横浜  
長谷川一宏、脇野 修、林 晃一、伊藤裕：尿細管Sirt1過剰発現マウスは、糖尿病性腎症のclaudin-1異所性高発現を改善し、アルブミン尿を低下させる。第54回日本腎臓学会総会、2011年(6月15日)、横浜  
徳山 博文、脇野 修、原 義和、鷲田 直樹、長谷川 一宏、水口 斉、藤村 慶子、本間 康一郎、林 晃一、伊藤 裕：アルドステロン(Ald)/Rho/Rhoキナーゼ経路の肥満関連腎症における役割。第33回日本高血圧学会総会、2010年(10月17日)、福岡  
長谷川一宏、脇野 修、林 晃一、伊藤裕：長寿遺伝子Sirt1近位尿細管特異的過剰発現マウスはペルオキシダーゼを保護し、急性腎障害を抑制する。第53回日本腎臓学会総会、2010年(6月16日)、神戸

〔図書〕(計4件)

長谷川一宏、脇野 修、林 晃一、伊藤裕：血圧・血行力学関連、ADMA。動脈硬化症の新しい診断・治療標的。倉林正彦監修、山岸昌一編集、メディカルレビュー社、2012年(7月) pp115-130  
林 晃一：CKDステージとCa拮抗薬の使い分け。降圧薬 - 俺流処方。伊藤 裕編集、南山堂、2011年(11月) pp93-98  
林 晃一：輸入・輸出細動脈。高血圧ナビゲーター(第3版) 熊谷裕生、小室一成、堀内正嗣、森下竜一 編、メディカルレビュー社、2011年(6月) pp130-131  
林 晃一：第 章、高血圧の optimal medical treatment-Ca拮抗薬の機序とその位置づけ。成功に導くPCI治療戦略。中村正人、編集。南江堂。2011年(4月) pp193-196

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・専任講師  
研究者番号：50265823  
徳山 博文 (TOKUYAMA HIROBUMI)  
慶應義塾大学・医学部・専任講師  
研究者番号：50276250

(3)連携研究者

なし