

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 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790800

研究課題名（和文）

近位尿細管特異的 SIRT1 過剰発現マウスの慢性腎臓病抑制効果の検証

研究課題名（英文）

Kidney specific overexpression of Sirt1 protects against chronic kidney disease.

研究代表者

長谷川 一宏 (HASEGAWA KAZUHIRO)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：30424162

研究成果の概要（和文）:

抗加齢遺伝子 Sirt1 の腎臓での作用のうち、特に近位尿細管(PT) Sirt1 に注目し、検討を進めている。我々はナトリウム・リン共輸送体(Npt2) promoter を使用し、近位尿細管特異的 Sirt1 過剰発現マウス (Tg 群) を作成し、これらのマウス(control= WT, Tg)を用い、CKD の内、特に、糖尿病性腎症 (DN, Diabetic Nephropathy) の解析を進めている。DN の発症初期においては(Control マウス)、まず近位尿細管の Sirt1 が低下する。その後、Sirt1 低下が podocyte に波及し、podocyte における Sirt1 の発現も低下する。その結果 podocyte のスリット膜形成分子が低下する。これにより、足突起の癒合・アルブミン尿が生じる。(これらの病態は Sirt1Tg で抑制を認めた)。現在、Sirt1 低下による podocyte 機能異常のメカニズムを解明するため、更に詳細な検討を進めている。

研究成果の概要（英文）:

NAD-dependent deacetylase, Sirt1 confers protective effects in various tissues. Although it has been reported that whole body Sirt1 induction by calorie restriction or specific Sirt1 activators increases insulin secretion or attenuates insulin resistance, the role of kidney Sirt1 in diabetic nephropathy has not been elucidated. We previously reported that our Tg mice with kidney-specific overexpression of Sirt1 protected against AKI (JBC 2010). However, a correlation between renal Sirt1 and CKD is unclear. Here, we explore the role of renal Sirt1 in diabetic nephropathy (DN). WT or Tg mice were rendered DN by the treatment with streptozotocin (STZ). Eight weeks old male WT or Sirt1 Tg mice were subjected to intraperitoneal injection of saline (control) or streptozotocin with 50mg/kg/day for 5 days (WT+Sal, WT+STZ, Tg+Sal, Tg+STZ). After 2 or 6 months, we measured various blood and urine parameters, and kidney histology. WT+STZ mice were presented with prominent albuminuria with podocytes foot process effacement. Sirt1 expression was decreased in proximal tubules as well as podocytes. Among various molecules, tight junction protein claudin-4, a parietal epithelial cell marker, was ectopically upregulated in podocytes. Conversely, these findings were attenuated in Tg+STZ. In

podocytes with the direct transfection of claudin -1, the expressions of slit diaphragm proteins, podocin and synaptopodin were downregulated and albumin permeability was significantly increased. In non-DN state, Sirt1 downregulated claudin -1 expression. Oppositely, in DN, HG-induced Sirt1 downregulation increased the claudin -1 expression leading to the downregulation of slit diaphragm proteins and to the increase in podocytes' albumin permeability. This novel mechanism contributes to albuminuria in DN.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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、近位尿細管、Sirt1

1. 研究開始当初の背景

NAD依存性脱アセチル化酵素遺伝子Sir2の導入が、酵母や線虫において寿命を伸ばすことが明らかとされて以降、Sir2の哺乳類ホモログであるSIRTの解析が進んでいる。哺乳類のSIRTはSIRT1~7、7種類のisoformが存在し、このうちSir2と最も相同性が高いSIRT1は、哺乳類においても、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ことが明らかとなった。

我々は、抗加齢遺伝子Sirt1の近位尿細管特異的過剰発現マウス(Tg)を作成し、急性腎障害抑制作用を報告した(JBC 2010)。一方Sirt1による糖尿病抑制作用が報告されている。

2. 研究の目的

今回、糖尿病性腎症(DN)におけるSirt1の意義についてTgを用い検討した。

SIRTによる脱アセチル化は、数多くの転写因子で報告がある。我々は、腎臓では、特に近位尿細管SIRT1が重要であり、FOXO3aを脱アセチル化する事を初めて明らかにした。続

いて、近位尿細管特異的SIRT1過剰発現マウスを作成し、FOXO3aの下流分子であるカタラーゼ活性化によるSIRT1の急性腎障害保護作用を明らかにした。他臓器SIRT1はミトコンドリア機能改善作用をもたらす転写因子を制御し、多様な「代謝」作用を引き起こす。膵臓ではUCP2、肝臓ではPPAR α 、PGC1 α 、脂肪ではPPAR γ が活性化される。これらの転写因子の共通点として、高効率のミトコンドリアを増加する作用がある事が知られている。腎臓において最もミトコンドリアの豊富な部位は近位尿細管であり、この点からも腎臓SIRT1は近位尿細管で重要な機能を果たす事が示唆される。以上より、近位尿細管SIRT1に特に注目し、同部位の過剰発現マウスを使用しDNにおける意義について解析を行なった。

3. 研究の方法

WT、TgにSTZ(50mg/kg/日 ip. 5日)および生食(control)投与した。WT+Sal, WT+STZ, Tg+Sal, Tg+STZの4群で6カ月後の所見を比較した。parietal epithelial cell(PEC)、visceral epithelial cell(VECすなわちpodocyte)、近位尿細管(PT)のSirt1発現を、腎臓laser microdissection、real-time PCR、免疫染色で検討した。

4. 研究成果

アルブミン尿が Tg+STZ で有意に抑制された。Sirt1はWT+SalでPT、PEC、VECに発現し、WT+STZで低下した。Tg+STZではpromoter作用部位のPTでSirt1発現がSTZ投与3カ月で既に回復し、さらに6カ月後にはPEC、VECにおいても回復した。

SIRT1の遺伝子改変動物の既報によると、ホモKOマウスは、死亡に至り、ヘテロKOマウスはインスリン抵抗性の形質が報告されている。過剰発現マウスは、いずれも臓器保護の形質が報告されている。全身過剰発現マウスは、カロリー制限と同様の形質を示し、インスリン抵抗性改善の形質を示している。臓器特異的過剰発現マウスとしては心臓、膵臓、血管内皮等の報告があり、いずれも臓器保護作用を示す。一方、腎臓特異的遺伝子改変マウスは、我々が近位尿細管特異的過剰発現マウスの形質を今回解析したところ、慢性腎臓病、特に、DNに対する腎保護作用を明らかにした点で意義があり、現在、この詳細なメカニズムの解析を更に進めている。

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1件)

Hasegawa K, Wakino S, Yoshioka K, Tatematsu S, Hara Y, Minakuchi H, Sueyasu K, Washida N, Tokuyama H, Tzukerman M, Skorecki K, Hayashi K, Itoh H. Kidney-specific overexpression of Sirt1 protects against acute kidney injury by retaining peroxisome function. J Biol Chem. 2010 Apr 23;285(17):13045-56. 査読有り

[学会発表](計5件)

Kazuhiro Hasegawa, Shu Wakino, Koichi Hayashi, Hiroshi Itoh.
"Epigenetic CpG Methylation of Tight Junction Protein, Claudin-1 through Sirt1 and Dnmt1 Controls Albuminuria in Diabetic Nephropathy". 第44回米国腎臓病学会、フィラデルフィア、米国、2011年11月8~13日、口演発表

Kazuhiro Hasegawa, Shu Wakino, Koichi Hayashi, Hiroshi Itoh. "Proximal Tubules Specific Sirt1-Deficient Mice Aggravates Albuminuria in Diabetic Nephropathy by Accelerating De-Differentiation of Podocytes". 第44回米国腎臓病学会、フィラデルフィア、米国、2011年11月8~13日、口演発表

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回日本腎臓病学会、横浜、2011年6月15~17日、口演発表 (優秀演題賞)

Hasegawa K, Wakino S, Hayashi K, Itoh H. Kidney-specific overexpression of Sirt1 protects against chronic kidney disease. 米国腎臓病学会、2010年11月19日、デンバー、口頭発表

長谷川一宏、脇野修、林晃一、伊藤裕、尿細管特異的 Sirt1 マウスの CKD 抑制効果の検証、第54回日本腎臓学会学術総会、2010年6月16日、神戸、口頭発表

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 一宏 (HASEGAWA KAZUHIRO)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：30424162