

平成 29 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15085

研究課題名(和文)慢性腎不全が誘発する脳機能障害における核酸の酸化損傷とその防御機構の関与の解明

研究課題名(英文) Implication of oxidative damage in nucleic acids and its defense mechanisms for development of brain dysfunction which may be caused by chronic kidney disease

研究代表者

中別府 雄作 (Nakabeppu, Yusaku)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：30180350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：認知症の原因1つとして、高齢者で頻発する慢性腎不全による脳内酸化ストレスの亢進が注目されている。これまでに、左腎動脈結紮と右腎の部分摘出による慢性腎不全モデルマウス脳で海馬CA3領域の神経変性が報告されていた。本研究では、この慢性腎不全モデルにおける脳機能障害に核酸の酸化損傷が関わるか、核酸の酸化損傷の防御・修復遺伝子の欠損系を用いて解析した。その結果、この慢性腎不全モデルでは認知機能障害と脳の変性病変のいずれも認めず、さらに防御・修復遺伝子の欠損マウスにおいても慢性腎不全による脳機能障害の亢進は見られなかった。以上より、この慢性腎不全モデルマウスでは脳機能障害は誘発されないと結論した。

研究成果の概要(英文)：Increased oxidative stress in brains of patients with chronic kidney disease (CKD), which frequently occurs in elderly people, has been implicated as one of the causes for dementia. Neurodegeneration of hippocampal CA3 region has been reported in brain of CKD model mouse generated by ligation of left renal artery and partial removal of right kidney. In this study, we examined whether oxidative damage in nucleic acids play a role for developing the brain dysfunction in this CKD model using mice lacking genes for defense and repair of oxidative damage in nucleic acids. As a result, neither cognitive dysfunction nor degenerative lesions of the brain were recognized in this CKD model, and even in mice lacking genes for defense and repair of oxidative damage in nucleic acids, CKD did not enhance brain dysfunction. From the results, we concluded that brain dysfunction is not induced in this CKD model mouse.

研究分野：神経科学

キーワード：認知症 慢性腎不全 MTH1 OGG1 8-オキシグアニン

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者が参加している九州大学久山町研究における認知症の横断・追跡研究を始めとする疫学調査から、我が国の認知症の患者数は高齢者人口の増加とともに確実に増加しており、2012年時点で476万人と見積もられており、今後急増することが予測される。認知症の予防と克服は21世紀の我が国において極めて重要な課題である(引用文献)。

認知症の増加の原因の1つとして生活習慣病(高血圧、糖尿病、メタボリックシンドローム)の急増が指摘されているが、これらは慢性腎臓病(CKD)を合併症として発症することが知られており、CKDの発症率も近年世界中で急増している。このような状況を反映して、CKDが生活習慣病とは独立に認知機能障害の発症、進行と関連することが多くの研究で報告されている(引用文献)。CKDが原因で体液中に滞留する尿毒素が脳機能障害の原因となる可能性が指摘されているが、その実態は未解明である。

連携研究者のグループは、最近マウスをもちいた慢性腎不全モデルを作製し、その腎機能障害、行動解析と脳の病理解析から腎機能障害の悪化に伴い空間記憶・学習能力の低下と海馬における酸化ストレスマーカーとしてグアニンの酸化体8-オキソグアニン(8-oxoG)の蓄積を見出し、抗酸化剤が治療効果を示すことを報告した(引用文献)。一方、研究代表者のグループは、8-oxoGの修復欠損マウスを用いた研究から、脳内酸化ストレスが亢進すると神経細胞のミトコンドリアDNAとミクログリアの核DNAに8-oxoGが高度に蓄積し、重篤な神経変性を引き起こすことを明らかにした(引用文献)。2つのグループの研究成果から、慢性腎不全マウスにおける脳機能障害は、脳内酸化ストレス亢進による8-oxoGの蓄積が原因であることが強く示唆された。

### 2. 研究の目的

本研究では、CKDが脳内酸化ストレスを亢進すると考え、その標的として核酸に注目し、慢性腎不全マウスモデルにおける脳機能障害、特に認知機能障害に核酸の酸化損傷が如何に関わるのかを核酸の酸化損傷の防御・修復遺伝子の欠損系を用いて明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)慢性腎不全マウスモデルの作成：左腎動脈結紮と右腎の部分腎臓摘出(6分の5摘出)による腎不全モデルを作製する。8週齢の雄マウスで手術を行い、8週間経過観察する。

(2)マウスの行動解析：(1)で作成した慢性腎不全モデルマウスは、術後8週で顕著な空間記憶・学習能力の低下を示すことが報告されている。マウスの空間記憶・学習能力はモリ

ス水迷路テストで、術後5週から7週目に解析する。プローブテストを用いて短期・長期記憶を評価する2日間のプロトコル、作業学習記憶を評価する5日間のプロトコル、可視化プラットフォームを用いて遊泳能力や視力の問題がないことを確認するための3日間のプロトコルを用いた。オープンフィールドテストやロータロッドテスト等で探索行動、不安行動、運動機能等も検討する。

(3)マウス脳の病理解析：マウス脳は4%パラフォルムアルデヒド還流固定後、凍結切片を調製し、各種病理染色、免疫染色等により、神経細胞の変性脱落、ミトコンドリア機能障害、8-oxo-dGの蓄積、細胞死の経路等について解析する。

### 4. 研究成果

(1)まず、C57BL/6Jマウスで左腎動脈結紮と右腎の部分腎臓摘出(6分の5摘出)による腎不全モデルを作製し、解析した。8週齢の雄マウスで手術を行い、8週間経過観察した。慢性腎不全の重症度は、手術から8週間後に採取した血液より血清尿素窒素を指標として確認した。部分腎臓摘出群では血清尿素窒素値が80mg/dL前後まで上昇しており、偽手術群(20mg/dL前後)に比べて腎機能が著しく増悪していることを確認した。

(2)8-oxodGTP分解酵素MTH1と8-オキソグアニン(8-oxoG)の除去修復酵素OGG1の欠損が、慢性腎不全の発症と行動に及ぼす影響を評価するために、オスのMth1/Ogg1ダブルノックアウトマウスと同腹由来の野生型マウスを繁殖、準備し、8週齢の時点で6分の5部分腎臓摘出を行って慢性腎不全モデルマウスを作製し、解析した。部分腎臓摘出群はMth1/Ogg1ダブルノックアウトマウスと野生型マウスともに、偽手術群と比べて有意に腎機能が増悪していることが確認された。また、部分腎臓摘出群では、Mth1/Ogg1ダブルノックアウトマウスと野生型マウスともに血清尿素窒素値が80mg/dL前後で、同程度の腎機能障害が認められた。

(3)認知機能を評価するための行動解析として、手術後4週から8週までにオープンフィールドテスト、モリス水迷路テスト、ロータロッドテストを行った。モリス水迷路テストではMth1/Ogg1ダブルノックアウトマウスと野生型マウスのいずれにおいても偽手術群と部分腎臓摘出群では有意な差は認めなかった。短期・長期記憶を評価するプローブテストで部分腎臓摘出群が偽手術群より仮想プラットフォームに到達する時間が長い傾向があったが、作業学習記憶を評価する5日間のプロトコルではそのような傾向は認められなかった。両群で部分腎臓摘出群の方がオープンフィールドテストの総運動距離が短いことから、部分腎臓摘出群での運動機能低下の影響が考えられた。

(4)行動解析を終えて術後 8 週で摘出した野生型マウスと *Mth1/Ogg1* ダブルノックアウトマウスの脳切片で変性神経細胞を特異的に検出する Fluoro Jade C による染色を行った。その結果、野生型マウスと *Mth1/Ogg1* ダブルノックアウトマウスのいずれの慢性腎不全モデルにおいても変性神経細胞は検出されなかった。さらに、同サンプルを用いて神経変性時に観察される活性化ミクログリアのマーカー (CD68) と活性化アストロサイトのマーカー (GFAP) の蛍光免疫染色を行ったが、海馬、大脳皮質にグリオーシスの所見は認めなかった。

酸化 DNA 損傷に脆弱な *Mth1/Ogg1* ダブルノックアウトマウスを用いても慢性腎不全による脳機能障害の亢進は見られなかったことから、左腎動脈結紮と右腎の部分摘出 (6 分の 5 摘出) による慢性腎不全モデルマウスでは、脳機能障害は誘発されないと結論された。

(5)コントロールの野生型と *Mth1/Ogg1* ダブルノックアウトマウスの行動を詳細に比較解析したところ、34-40 週齢と 79-82 週齢のマウスにおいて、*Mth1/Ogg1* ダブルノックアウトマウスはホームケージにおける夜間と 24 時間の運動量が野生型よりも多いことが分かった。*Mth1/Ogg1* ダブルノックアウトマウスは核 DNA への 8-オキシグアニンの蓄積が腹側線条体 (カレハ島を含む側坐核) で野生型と比べて増加しており、野生型と *Mth1/Ogg1* ダブルノックアウトマウスの 2 群の夜間運動量、24 時間運動量と正の相関を認め、MTH1/OGG1 二重欠損は脳の特定領域の神経細胞における 8-オキシグアニン蓄積の亢進をきたし、脳機能に影響を及ぼすことが明らかになった。

#### <引用文献>

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金 (厚生労働科学特別研究事業) 日本における認知症の高齢者人口の将来推計に関する研究分担研究報告書 (研究代表者 二宮利治、課題番号 H26-特別-指定-036)

Khatri M, Nickolas T, Moon YP, Paik MC, Rundek T, Elkind MS, Sacco RL, Wright CB, CKD associates with cognitive decline, *J Am Soc Nephrol* 20:2427-2432, 2009.

Fujisaki K, Tsuruya K, Yamato M, Toyonaga J, Noguchi H, Nakano T, Taniguchi M, Tokumoto M, Hirakata H, Kitazono T, Cerebral oxidative stress induces spatial working memory dysfunction in uremic mice: neuroprotective effect of tempol. *Nephrol Dial Transplant* 29:529-538, 2014.

Z. Sheng, S. Oka, D. Tsuchimoto, N. Abolhassani, H. Nomaru, K. Sakumi, H. Yamada, Y. Nakabeppu, 8-Oxoguanine causes neurodegeneration during

MUTYH-mediated DNA base excision repair. *J Clin Invest* 122, 4344-4361, 2012.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Y. Nakabeppu, E. Ohta, N. Abolhassani, MTH1 as a nucleotide pool sanitizing enzyme: Friend or foe?, *Free Radic Biol Med*, in press, 2017, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.002.

N. Abolhassani, J. Leon, Z. Sheng, S. Oka, H. Hamasaki, T. Iwaki, Y. Nakabeppu, Molecular pathophysiology of impaired glucose metabolism, mitochondrial dysfunction, and oxidative DNA damage in Alzheimer's disease brain, *Mech Ageing Dev* 161:95-104, 2017.

S. Oka, J. Leon, K. Sakumi, T. Ide, D. Kang, F.M. LaFerla, Y. Nakabeppu, Human mitochondrial transcriptional factor A breaks the mitochondria-mediated vicious cycle in Alzheimer's disease, *Sci Rep* 6: 37889, 2016.

中別府 雄作, ゲノムに蓄積した 8-oxoguanine に起因する病態とその防御機構 - 発がんから神経変性まで -, *基礎老化研究* 40: 23-31, 2016.

[学会発表] (計 3 件)

岡 素雅子, 盛 子敬, フリオ レオン, 土本 大介, 作見 邦彦, 中別府 雄作, アルツハイマー病進展における核あるいはミトコンドリア DNA 中に蓄積した 8-oxoguanine の役割, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30-12/2, 横浜.

Yusaku Nakabeppu, Oxidative DNA damage and repair in carcinogenesis and neurodegeneration, International Symposium on Immune Diversity and Cancer Therapy Kobe 2017, 2017/1/26-1/28, Kobe, Japan.

中別府 雄作, アルツハイマー病脳におけるインスリン枯渇とミトコンドリア機能不全に起因する酸化ストレスの分子病態, 第 13 回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム, 2017/3/16-3/17, 奈良.

[図書] (計 1 件)

Y. Nakabeppu, Neurodegeneration caused by accumulation of an oxidized base lesion, 8-oxoguanine, in nuclear and mitochondrial DNA: from animal models to human diseases. in *The Base Excision Repair Pathway: Molecular Mechanisms and Role in Disease Development and Therapeutic Design*, World Scientific Publishing Co., Pte. Ltd. Singapore, 2017.

〔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

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/nfg/index.html>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

中別府 雄作 ( Yusaku Nakabeppu )

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：30180350

### (2)連携研究者

鶴屋 和彦 ( Kazuhiko Tsuruya )

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：20372740

### (4)研究協力者

春山 直樹 ( Naoki Haruyama )