

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16104

研究課題名(和文) CD38抑制によるSirt3活性化を介した糖尿病性腎症の新たな治療法の検討

研究課題名(英文) A new therapeutic target for diabetic kidney disease via Sirt3 activation by CD38 inhibitor.

研究代表者

小倉 慶雄 (OGURA, Yoshio)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：30760409

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は糖尿病腎症の新規治療標的としてミトコンドリア内に局在するサーチュインであるSirt3とNAD+分解酵素CD38に着目し、CD38の抑制がNAD+の増加とSirt3の活性化を通して、腎障害を改善しうるかを解明することを目的とした。糖尿病ラット・高ブドウ糖培養下腎尿細管細胞へのCD38阻害薬(フラボノイド「アピゲニン」)の投与が腎症進展抑制になりうる可能性を示すことができ、成果報告として2018年Redox reports誌に掲載、2019年度日本抗加齢学会研究奨励賞を受賞、アメリカ糖尿病学会を初めとした国際学会で発表し、さらに2020年Aging誌に投稿し、5月受理、後日掲載予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国では糖尿病患者数の増加とともに糖尿病腎症(以下腎症)を有する患者数が増加している。腎症を原因として新規透析療法を導入される患者数は第1位であり、腎症の克服は解決していくべき課題であると考えられる。現在、腎症に対する治療は、血糖・血圧・脂質管理を中心とする包括的治療が推奨されているが、未だ十分であるとはいえず、新規治療の開発が望まれていた。今回我々はCD38とSirt3という今までにない腎症の新たな治療標的に着目し、CD38抑制効果を持つフラボノイドの経口投与によって腎症の進展を抑制できる可能性を見出した。近い将来に、簡便に、我々の腎症改善の効果を期待できうる成果を得たと考えている。

研究成果の概要(英文)：We focused on Sirt3, mainly located in mitochondria and plays an important role in anti-oxidative stress and cellular metabolism, and NAD+-degrading enzyme CD38 as novel therapeutic targets for diabetic kidney disease, and aimed to elucidate whether the inhibition of CD38 could ameliorate renal injury through the increase of NAD+ and the activation of Sirt3. We have shown that administration of a CD38 inhibitor (flavonoid "apigenin") to renal tubular cells in diabetic rats under high glucose culture can inhibit the progression of diabetic kidney disease, and the results have been published in Redox reports 2018, received the Japanese Society of Anti-Aging Research Encouragement Award 2019, presented at the American Diabetes Association meeting and other international conferences, and submitted to Aging 2020, which was accepted in May and will be published later.

研究分野：糖尿病

キーワード：糖尿病腎症 酸化ストレス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我が国では糖尿病患者数の増加とともに糖尿病腎症(以下腎症)を有する患者数が増加している。腎症は慢性腎臓病(Chronic Kidney Disease:CKD)の主たる原疾患であり、腎症を原疾患として新規に透析療法を導入される患者数は、1998 年以降、第 1 位を占めるに至っている(2014 年末 15,809 人)。

加えて透析療法に関する医療費は年々増大していることから、腎症の克服は今後解決していくべき医学的かつ社会的課題であると考えられる。また腎症を含む CKD を有する患者は、末期腎不全のみならず心血管疾患発症の高リスク群であり、心血管疾患の併発が死亡率の増加に寄与している。現代における腎症に対する治療は、末期腎不全への進展と心血管疾患の発症・進展を抑制することを目標に血糖・血圧・脂質管理を中心とする包括的治療が推奨されている。しかし、この包括的治療は未だ十分であるとはいえないため、更なる病態の解明と新規治療法の開発が必要である。加齢(老化)は、糖尿病・CKD を含む老化関連疾患発症・進展の危険因子であると考えられる。細胞の老化にはミトコンドリア機能の低下に起因する酸化ストレスの増強や炎症による種々の細胞障害が関連している。ミトコンドリアは、酸化ストレスなどによる障害を受けると断片化・分裂し、その後オートファジー(マイトファジー)により分解処理されるが、分解後障害部位を有しないミトコンドリアは、生合成(バイオジェネシス)の誘導後、融合することにより、その恒常性が維持されている。従って、糖尿病腎における細胞老化と密接に関連するミトコンドリアの恒常性維持の破綻の機序解明が新規治療の開発に繋がる可能性があると考えられた。

ニコチンアミドアデニンヌクレオシド(NAD<sup>+</sup>)依存性脱アセチル化酵素(サーチュイン)の中で主にミトコンドリアに存在する Sirt3 はミトコンドリア機能の制御と恒常性維持に重要な役割を果たしている。これまでに Sirt3 の標的ミトコンドリア蛋白として、イソクエン酸脱水酵素 2(Isocitrate Dehydrogenases:IDH2)、Superoxide Dismutase2(SOD2)などが同定されており、いずれも Sirt3 によって脱アセチル化されることで活性化し、抗酸化能を発揮するとされている。

Sirt3 は、NAD<sup>+</sup>依存性酵素であるため、細胞内の NAD<sup>+</sup>量の低下は Sirt3 の活性低下を起因とするミトコンドリア機能低下をきたす。細胞内 NAD<sup>+</sup>量は、NAD<sup>+</sup>を分解する主要な酵素である NAD<sup>+</sup>グリコヒドロラーゼ/ADP リポシルシクラーゼ(CD38)により制御されている。CD38 は肥満や加齢に伴い増加し、NAD<sup>+</sup>を過剰に分解し細胞内 NAD<sup>+</sup>が減少する結果、Sirt3 活性低下を介してミトコンドリア機能が低下し、糖尿病あるいは老化の病態形成に関与することが報告されている。しかし、糖尿病腎症の発症・進展におけるミトコンドリア機能異常および恒常性維持に Sirt3 活性あるいは CD38 による細胞内 NAD<sup>+</sup>量の制御がどのように関与しているかどうかの詳細は未だ十分に解明されていなかった。

### 2. 研究の目的

我々は、糖尿病状態の腎臓において CD38 発現が増加し、NAD<sup>+</sup>の分解亢進による細胞内 NAD<sup>+</sup>の減少に起因する Sirt3 の活性低下をきたした結果、前述のミトコンドリア機能異常と恒常性破綻を介して腎症が発症・進展に繋がっている可能性を考えた。

これまでに、セロリやパセリ、カモミールなどに含まれるフラボノイドであるアピゲニンに CD38 阻害作用があり、NAD<sup>+</sup>量増加をもたらすことが報告されている。糖尿病腎における CD38 の抑制が腎症の発症・進展を改善するかどうかは明らかではない。そこで本研究は、CD38 の抑制が細胞内 NAD<sup>+</sup>量の増加が Sirt3 の活性化を通してミトコンドリアの恒常性を維持し、腎症の抑制効果を発揮し治療標的となり得るかを明らかにすることを目的とした。本研究期間内に、糖尿病腎で発現の増加を認める CD38 の抑制による NAD<sup>+</sup>および Sirt3 活性の増加が腎症の新たな治療標的となりうるかを、

(1) 2 型糖尿病 Zucker diabetic fatty (ZDF)ラットに対する CD38 阻害薬(アピゲニン)の腎症抑制効果、

(2) CD38 阻害薬(アピゲニン)、siRNA による CD38 ノックダウンがヒト近位尿細管細胞株(HK2 細胞)における高ブドウ糖誘導性ミトコンドリア障害を Sirt3 の活性化を介したミトコンドリア恒常性維持により改善することを明らかにすること目標とし、糖尿病腎症に対して、ミトコンドリアの恒常性の維持に着目した研究、さらには CD38 の抑制から NAD<sup>+</sup>増加を介した Sirt3 の活性化を新たな治療標的とした研究成果はこれまでに報告されておらず、本研究は極めて独創的であった。また CD38 の発現および機能亢進による NAD<sup>+</sup>量の低下は、糖尿病を含む老化による代謝障害と密接に関連している可能性がある。すなわち、本研究から得られた知見は糖尿病腎症の抑制のみならず、動脈硬化症を含む老化関連疾患の治療の開発にも応用できると考えている。

### 3. 研究の方法

(1) 20 週齢雄の糖尿病ラットに CD38 活性を抑制するフラボノイドである、アピゲニン 20mg/日あるいは、vehicle として同量の DMSO の腹腔内投与を 4 週間行い、それぞれ以下の各群について評価・解析を行う。

ラット群

- 非糖尿病 Zucker Lean(ZL)ラット + vehicle 投与
- ZL ラット+フラボノイド (アピゲニン) 投与
- 2 型糖尿病 ZDF ラット+vehicle 投与
- ZDF ラット+フラボノイド (アピゲニン) 投与

評価項目

- 腎臓における酸化ストレス評価
- 腎組織、機能的評価：腎免疫・組織学的評価・腎機能検査・腎炎症評価・腎 CD38 発現評価
- ミトコンドリア恒常性破綻の解析
- ミトコンドリア蛋白のアセチル化/脱アセチル化の変異
- 腎のミトコンドリア抽出蛋白における NAD<sup>+</sup>/NADH 比

(2)培養近位尿細管細胞における CD38 抑制による NAD<sup>+</sup>増加と Sirt3 の活性化を介した高ブドウ糖刺激によるミトコンドリア障害の改善の検証  
 ヒト培養近位尿細管細胞株(HK2 細胞)+高ブドウ糖負荷 (30mmol/L) を用いた解析

表

対照群のブドウ糖濃度は 5mmol/L に設定する(刺激時間: 48hr)また 5mmol/L および 30mmol/L ブドウ糖培養下細胞にCD38 阻害薬アピゲニンの添加を行った。

	ZLRs	ZLRs+Apigenin	ZDFRs	ZDFRs+Apigenin
体重 (g)	393.8±15.6	379.0±12.0	398.5±49.1	392.3±26.0
HbA1c (%)	3.47±0.05	3.42±0.09	10.4±0.18	9.47±0.57
腎重量(g)	2.53±0.14	2.57±0.12	3.56±0.25	3.38±0.18
尿アルブミン /Cr (mg/gCr)	0.018±0.001	0.010±0.003	1.52±1.00	0.34±0.08
尿 L-FABP/Cr (ug/gCr)	0.47±0.04	0.98±0.85	29.1±1.40	7.61±4.40
尿 8-OHdG/Cr (ng/mgCr)	9.30±1.33	7.30±2.00	43.6±20.9	13.5±4.82

- 酸化ストレス、炎症の評価
- Sirt3 活性の評価;Sirt3 標的アセチル化
- ミトコンドリア蛋白質の解析
- NAD<sup>+</sup>/NADH 比
- CD38 発現の評価ウエスタンブロット
- RT-PCR

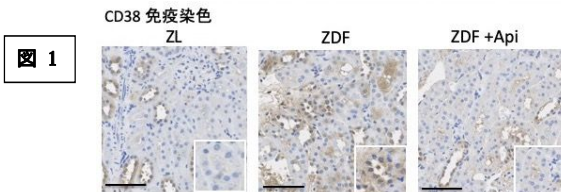
(3)CD38 ノックダウン近位尿細管細胞を用いた解析

CD38 ノックダウン細胞を siRNA により作成し、(2)と同様の評価を行った。

4. 研究成果

(1)20 週齢雄の糖尿病ラットを用いた評価・解析  
 HbA1c 値は、非糖尿病 ZL 群と比較して、ZDF 群において有意な増加を認め、腎重量、尿アルブミンおよび尿細管障害マーカーである L-FABP 排泄量が、ZL 群に比べて、ZDF 群で増加したことから、糖尿病ラットでは腎肥大、アルブミン尿・尿細管障害を呈していることがわかった。

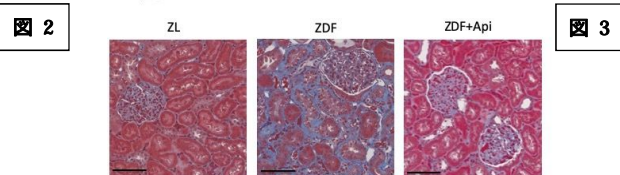
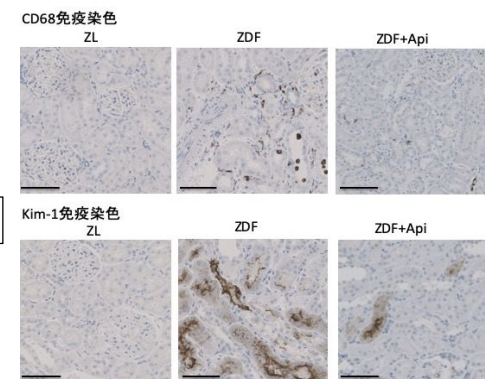
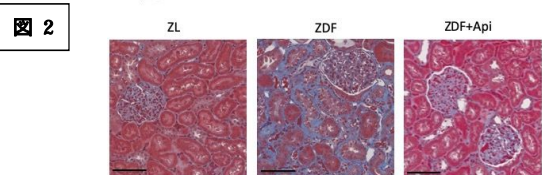
アピゲニン投与 ZDF 群では、糖尿病ラット腎で認められていた L-FABP 増加、アルブミン尿の改善を認めることができた(表参照)。



次に腎組織像・mRNA 発現・ウエスタンブロットで CD38 発現を調べた。ZL 群と比較して腎間質・尿細管細胞・糸球体・において CD38 の発現の増強を認めた。腎皮質、抽出したミトコンドリアにおいても CD38 は ZL 群に比べて、ZDF 群での発現の増強を示した。アピゲニンを投与した ZDF 群では、組織像・mRNA 発現・ウエスタンブロット組織像において CD38 の発現を抑制していることが確認された(図 1)。

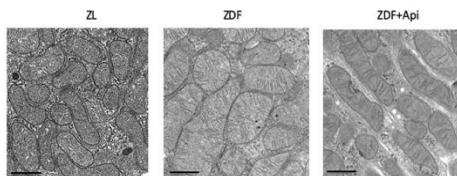
糖尿病ラットの腎臓では尿細管間質の線維化が進行し(図 2)、腎皮質における炎症マーカーである CD68 の免疫染色発現 mRNA 発現、尿細管障害マーカーである Kim-1 の免疫染色発現、mRNA 発現が ZL 群に比べて、ZDF 群で有意な増加を認め、糖尿病ラットの腎臓では尿細管間質障害・線維化を起こしていることが確認された(図 3)。アピゲニン投与 ZDF 群ではこれらの変化が改善されており、アピゲニンが線維化・炎症・尿細管障害を軽減できうる可能性を得た(図 2,3)。電子顕微鏡下における近位尿細管細胞内のミトコンドリアの形態観察を行うと、ZL 群と比較して ZDF 群で、ミトコンドリアの膨化、断片化あるいはクリステの不明瞭化などの形態異常を認めしたが、アピゲニン投与 ZDF 群では一定のミトコンドリア形態異常改善効果を示した(図 4)。

このような形態異常にミトコンドリア酸化ストレスの影響が考えられ、酸化ストレスマーカーである尿中 8-OHdG 排泄量/さらにはミトコンドリア腎皮質から抽出したミトコンドリア DNA 内の 8-OHdG 量を



測定したところ、ZL 群に比べて、ZDF 群で有意な増加を認めたことから、糖尿病状態における酸化ストレスの増強が本実験で用いた ZDF ラットにおいても生じていることが示された(表)。

図 4



このことから糖尿病ラットにおいては腎ミトコンドリア酸化ストレスが増強していたが、アピゲニン経口投与は糖尿病ラットに対して酸化ストレス軽減効果があることが確認できた。

次に我々はミトコンドリアにおける Sirt3 機能を確認した。腎ミトコンドリア内で sirt3 の標的蛋白である SOD2, IDH2 について調べた。SOD2 および IDH2 アセチル化抗体によるウエスタンブロットの結果は、両酵素ともに、ZL 群に比べて、ZDF 群でアセチル化の増強を示した(図 5)。

その一方 Sirt3 発現は ZL 群、ZDF 群で有意差を認めなかった。以上の結果から糖尿病腎では、Sirt3 発現には有意差がないものの、Sirt3 の活性は低下しており、SOD2 および IDH2 のアセチル化が亢進し、ミトコンドリア酸化ストレスが増強した可能性が考えられた。

Sirt3 は NAD<sup>+</sup>依存性の酵素であることから、Sirt3 活性の低下の機序を探るため細胞内 NAD<sup>+</sup>/NADH 比を調べたところ、ZDF 群では ZL 群と比較して有意に NAD<sup>+</sup>/NADH 比が低下しており sirt3 活性低下を引き起こしている原因を捉えることができた。つまり糖尿病腎では、NAD<sup>+</sup>/NADH 低下に起因した Sirt3 の活性低下が生じている可能性が考えられた。

アピゲニン投与 ZDF 群では非投与群と比較して NAD<sup>+</sup>/NADH 比が増加し、SOD2 および IDH2 のアセチル化が減少していることが確認された(図 5)。Sirt3 の発現には影響がなかったが、アピゲニン投与は糖尿病ラットで生じた NAD<sup>+</sup>/NADH 比低下及び Sirt3 活性低下を是正していることを示した。

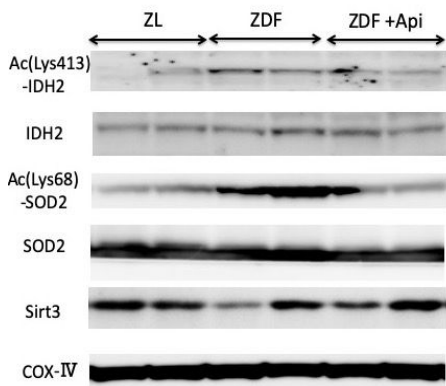


図 5

ここまでのまとめとして、

2 型糖尿病モデルラットの腎臓では尿細管間質障害および線維化を認め、近位尿細管細胞におけるミトコンドリア形態異常およびミトコンドリア酸化ストレスの増強を認めた。

原因としてミトコンドリア酸化酵素(IDH2,SOD2)のアセチル化増加による IDH2,SOD2 活性低下を認め、Sirt3 活性低下が関わっている可能性が示唆され、さらに腎組織中の NAD<sup>+</sup>/NADH 比低下が Sirt3 活性低下を誘導している可能性、さらには NAD<sup>+</sup>分解酵素 CD38 の

発現がこの NAD<sup>+</sup>/NADH 比低下に関与している可能性が考えられた。CD38 抑制作用を持つアピゲニンが、これら 2 型糖尿病モデルラットの腎臓に生じた変化を軽減させる効果を持っていることが確認され、CD38 発現の抑制が腎症改善の新規治療標的となりうる可能性を示した。

(2)培養近位尿細管細胞における CD38 抑制による NAD<sup>+</sup>増加と Sirt3 の活性化を介した高ブドウ糖刺激によるミトコンドリア障害の改善の検証

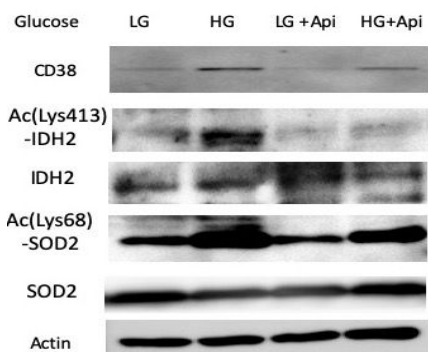
動物だけでなく、細胞で同様の事象が確認できるかどうかを検証するためにヒト尿細管細胞における実験を行った。

高ブドウ糖含有の培養液による培養に対してアピゲニン投与、あるいは CD38 ノックアウトによる検討を行った。

高ブドウ糖培養群では SOD2 および IDH2 アセチル化抗体によるウエスタンブロットの結果は、両酵素ともに、通常培養群に比べて、高ブドウ糖培養群でアセチル化の増強を示した。尿細管細胞においても Sirt3 発現は両群で有意差を認めなかったが、細胞内 NAD<sup>+</sup>/NADH 比を調べたところ、高ブドウ糖培養群で通常培養群と比較して有意に NAD<sup>+</sup>/NADH 比が低下しており、CD38 発現は通常培養群と比較して高ブドウ糖培養群で有意に発現が増加し、糖尿病ラット腎ミトコンドリア蛋白と同様の変化が見られた(図 6)。

アピゲニン投与は高ブドウ糖培養下においても減少させた NAD<sup>+</sup>/NADH 比が増加し、SOD2 および IDH2 のアセチル化が減少していることが確認され、動物に対する投与と同じような結果を得ることができた(図 6)。

図 6



(3)CD38 ノックアウト実験の結果では CD38 ノックアウトにおけるヒト尿細管細胞の NAD<sup>+</sup>/NADH 比、SOD2 および IDH2 アセチル化抗体によるウエスタンブロットの結果は、高ブドウ糖培養群においても有意に、NAD<sup>+</sup>/NADH 比が増加し、両酵素ともアセチル化の減少(図 7)を示し、アピゲニン投与と同等の結果を得ることができた。

糖尿病状態の腎尿細管細胞では CD38 の発現が増加し、細胞内の NAD<sup>+</sup>/NADH 比が低下した結果、Sirt3 の活性低下と関連した SOD2 および IDH2 のアセチル化の増加に起因したミトコン

ドリア酸化ストレスの増強が認められた。CD38 阻害による NAD<sup>+</sup>低下の抑制を介した Sirt3 の活性化は抗酸化ストレスを介した腎症に対する治療標的になり得ると考えられた。

今後の課題として、アピゲニンフラボノイドであり CD38 抑制効果を持つことは報告されていたが、特異的ではなく、他の経路で抗炎症効果を発揮するという報告もある。つまり、CD38 を新規治療標的として実証するため、より特異的な阻害を行い、更なる詳細な機序の解明が必要であると考えられる。現在 CD38 の腎特異的遺伝子改変動物の作成や、CD38 特異的阻害薬の使用も考慮して研究を続けている。

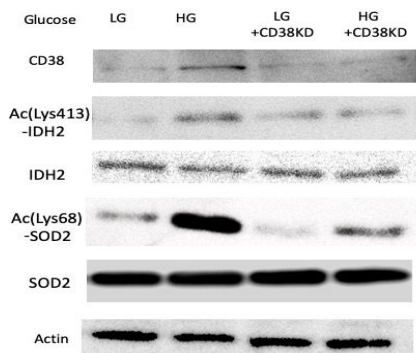


図 7

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ogura Yoshio, Kitada Munehiro, Monno Itaru, Kanasaki Keizo, Watanabe Ai, Koya Daisuke	4. 巻 23
2. 論文標題 Renal mitochondrial oxidative stress is enhanced by the reduction of Sirt3 activity, in Zucker diabetic fatty rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Redox Report	6. 最初と最後の頁 153 ~ 159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1080/13510002.2018.1487174">https://doi.org/10.1080/13510002.2018.1487174</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshio Ogura, Munehiro Kitada, Jing Xu, Itaru Monno, Daisuke Koya	4. 巻 12
2. 論文標題 CD38 inhibition by apigenin ameliorates mitochondrial oxidative stress through restoration of the intracellular NAD <sup>+</sup> /NADH ratio and Sirt3 activity in renal tubular cells in diabetic rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aging (Albany NY)	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小倉慶雄、北田宗弘、門野至、渡邊愛、古家大祐
2. 発表標題 アピゲニンによるCD38抑制はSirt3の活性化を誘導して糖尿病腎尿管細胞保護効果を発揮する
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshio Ogura, Munehiro Kitada, Itaru Monno, Ai Watanabe, Daisuke Koya
2. 発表標題 Renal mitochondrial oxidative stress induced by NAD <sup>+</sup> -dependent Sirtuins inactivation via overexpression of CD38 (NADase) activation inDKD.
3. 学会等名 第78回米国糖尿病学会議 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshio Ogura, Munehiro Kitada, Itaru Monno, Daisuke Koya
2. 発表標題 Overexpression of CD38 (NADase) in diabetic kidney disease results in renal mitochondrial oxidative stress and pathologies via NAD+-dependent Sirt3 inactivation
3. 学会等名 第54回欧州糖尿病学会議（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小倉慶雄、北田宗弘、鈴木妙子、門野至、渡邊愛、古家大祐
2. 発表標題 Sirt3機能低下は糖尿病腎近位尿細管におけるミトコンドリア酸化ストレスの増強に寄与する
3. 学会等名 第60回日本糖尿病学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小倉慶雄、北田宗弘、鈴木妙子、古家大祐
2. 発表標題 糖尿病腎近位尿細管におけるミトコンドリア酸化ストレスの増強はSirt3機能の低下が関与する。
3. 学会等名 第17回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----