

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08607

研究課題名(和文)高温環境によるCKD発症の病態解明と細胞老化制御を介した治療標的の探索

研究課題名(英文)Elucidation the pathophysiology of heat-stress induced CKD

研究代表者

佐藤 由香 (Sato, Yuka)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：60846864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：日本のCKD患者で、夏期の血圧低下が、AKIからCKDに進展することが報告されている。また中央アメリカなどで報告された原因不明のCKDは、昇熱ストレスが原因の一つと疑われている。我々は、過去に動物モデルで昇熱ストレスが直接腎障害を起こすことを示した。本研究では、温度管理下で小動物飼育が可能な設備で、長期の高温環境暴露による慢性的な腎障害を検討した。さらに、老化との関連を探求した。慢性的な昇熱暴露により、高齢マウスだけ腎機能が悪化した。若年マウスでも、昇熱ストレス下では腎組織のp16亢進やFOXO3低下など、細胞老化の惹起が確認され、昇熱ストレスが尿細管細胞老化をもたらすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

地球温暖化の影響で、昇熱ストレスによる腎障害は、今後世界の広い地域で問題化することが予想されており、日本も例外ではない。高齢者は熱中症に罹患しやすく重症化しやすいことがわかっており、熱中症による急性腎障害は脱水や横紋筋融解症が主たる原因とされてきた。が、本研究により繰り返す熱暴露が、脱水や横紋筋融解症とは独立して腎障害をもたらす、慢性腎不全に進展することを証明した。また、若年個体でも昇熱ストレスが早期から尿細管細胞の細胞老化の原因となり、CKDを進行させることを示した。

研究成果の概要(英文)：Heat stress can develop kidney injury. The evidence indicates that heat stress is the cause of ‘CKD of unknow origin’ reported from Central America (CKDu). In Japan, it is reported that blood pressure drop in summer caused AKI and developed CKD. We previously demonstrated short term-repeated heat stress directly induced kidney injury with animal models. In this study, we examined CKD exposed long-term heat stress by breeding mice in the temperature-controlled chamber. We also addressed the relation between heat stress and senescence. C58BL/6 mice were exposed 38 environment temperature for 6 hours every day for 6 month. Elderly mice developed chronic kidney failure, while young mice were not decreased renal function. However, p16, which regulated cell cycle arrest and is observed senescence cells, were increased and FOXO3, senescence suppressed gene, were decreased even in young mice Thus, heat stress may cause renal tubular cell senescence which led to irreversible kidney injury.

研究分野：腎臓内科

キーワード：CKD 細胞老化 昇熱ストレス 老化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

複数の国で特定の地域に集積した、原因不明の慢性腎臓病 (CKD) 患者の急激な増加が報告され、(CKDu)として調査・研究が始まっている。暑い環境下での労働作業による熱ストレスが原因の一つと考えられている。日本も夏の気温の上昇に伴い熱中症の発症率・死亡率が特に高齢者で増加しており、今後気温上昇による CKD が増加し、熱ストレスによる CKD の病態解明および治療法の開発を要する可能性が高い。

申請者らは、繰り返し高温暴露することによって CKD に進展するマウスモデルを作成し、CKDu の熱ストレス仮説を証明した。続いて十分な水分摂取下でも体温上昇によって腎障害が起きること、ミトコンドリア障害および酸化ストレス増大が病態であることを報告した。さらに長寿遺伝子 Sirtuin 1 (Sirt1) が熱ストレスにより低下する結果を得て、本病態への老化の関与が示唆された。

### 2. 研究の目的

熱ストレスが Sirt 1 を介して尿細管の細胞老化を招き、その結果腎障害へ進展させるかを検証し、その分子機構を解明し、細胞老化を伴う老化個体では熱ストレスによる腎障害が悪化しやすいかを確認し、Sirt 1 およびその下流経路を標的とした熱ストレス誘因 CKD の新たな治療法を開発する。

### 3. 研究の方法

老化促進マウスを用いて、熱ストレス腎障害に進展しやすいか検討する

老化促進マウス Senescence-Accelerated Mouse (SAM) マウスは国内の研究室で近交系マウスの不測の交雑が生じたマウスコロニーから確立された。SAMP-1 は 4 か月齢頃から腎臓の加齢変化を認め、24 か月齢には糸球体硬化及び尿細管萎縮を伴う腎硬化症となる。5~6 か月齢の SAMP-1 マウスで熱ストレス動物モデルを行い、野生型と CKD 進展を比較する。Sirt 1 および、老化促進マウスで上昇していると考えられる老化マーカーの senescence-associated  $\beta$ -galactosidase や p53-p21 経路、p16INK4a-Rb 経路が、熱ストレスでさらに促進しているか検討する。また老化細胞の Senescence-associated secretory phenotype (SASP) 因子が、間質の炎症を惹起しているか確認する。

Sirt1 を介した熱ストレスによる尿細管細胞老化および腎障害の分子機構の解明

Sirt1 の低下により、ミトコンドリア生合成の低下、または細胞エネルギー代謝の低下による ATP 不足が細胞障害に進展するという仮説を立てた。熱ストレス暴露後の腎臓からネフロン部位特異的抗体 (例えば TAL ~ 遠位: Uromodulin) による FCM セルソーティングで尿細管細胞を部位別に採取し、Sirt1 およびミトコンドリア生合成シグナルの測定と、メタボローム解析による代謝変化を評価する。

### 4. 研究成果

#### (1) 新規昇熱ストレスモデルの確立

実際の昇熱ストレスに近いモデル作成のために、ケージごと Heat chamber に入れ、Heat stress 下で飼育可能な小動物用温度調節機能付チャンバーを新たに購入した。既報では餌や飲

水ができない小さいケースにマウスを入れた Heat chamber による実験だったため、38 度の高温環境の Heat chamber と、23 環境の通常ケージへの出し入れを、30 分ごとに 7 回繰り返す（計 7 時間/日）モデルで、6 週間で血清クレアチニンの上昇と腎間質の線維化を得ていた。本研究では、この既報のモデルに基づいて、実際のヒトの夏場の日中の労働作業時間を想定して、38 の高温環境下において 3 時間連続で飼育後に、1 時間の室温 23 °C の通常環境温度 23 での休憩をはさみ、再び 38 の高温環境を 3 時間連続で飼育する(計 7 時間/日)のモデルとした。また、Heat chamber 内で昇熱暴露中も飲水が自由にできるため、旧モデルよりさらに明確に脱水の影響を排除できた。

まずは、オスの若年(8週冷)C57BL/6J 野生マウスで新規モデルの 7 時間の直腸温変化を観察した。Heat chamber の室温が 23 から 38 に上がるのに 25 分、38 に上がった室温が 23 に戻るのに 20 分かかった。前述の 30 分の昇熱暴露を細かく繰り返す旧モデルで、マウスを室温 38 に入れてから 20 分程度でマウス直腸温は 38 まで上昇し、定常状態になることがわかっていたので、Heat chamber 内の温度が 38 に上がった 20 分後(昇熱ストレス開始 45 分)および 35 分後(昇熱ストレス開始後 60 分)に直腸温を測定した。20 分後、35 分後ともに平均 37.6 だった。3 時間の連続した昇熱暴露後には直腸温は平均 38.4 まで上昇し、その後の 23 1 時間の休憩後には、直腸温 35.3 に下がっていることを確認した。3 時間 2 回の昇熱ストレスが終了する 7 時間後には体温は平均 38.4 に上昇しており、既報と比べても十分な昇熱ストレスがかけられていると判断した。

また、昇熱による「急性障害」である Heat stroke を起こさないか、確認した。全てのマウスで Heat stroke の兆候である中枢神経系障害が疑われる行動異常や死亡例は認めなかった。

昇熱ストレスの強度をさらに上げられるか検討するために、38 を 40 にあげて、上記と同じタイムコースで昇熱暴露したが、昇熱暴露開始から 40 分の時点で直腸温は平均 38.6 に上昇し、鼻周囲に発汗を認めた。我々の先行実験で、鼻周囲の発汗があると脱水が強くなり死亡率が上がるデータを得ていたため、40 の暴露は中断した。

図 1. 新規昇熱ストレスモデル



### (2) 加齢促進マウスの SAMP-1 の腎臓表現系の確認

加齢促進マウスには SAMP には SMAP1 から 7 があり、出現する臓器障害のフェノタイプが異なるが、腎障害を来すと既報があるのは SAMP-1 である。同マウスを購入し、2 か月齢、4 か月齢、6 か月齢の腎障害を評価した。既報では 4 か月齢頃から腎臓の加齢変化を認めるとされているが、6 か月齢時点でも光学顕微鏡で観察する範囲で、明らかな形態異常は認めなかった。そこで、老化マウスとして、生後 10 ヶ月の高齡 C57BL/6J を使用することとした。

### (3) 若年マウスと高齡マウスの昇熱ストレスに対する反応の比較

8 週齢の若年および 40 週齢の高齡の C57BL/6 の雄マウスに、上記の新規昇熱暴露に連日さらし、6 か月後にサクリファイスを行った。

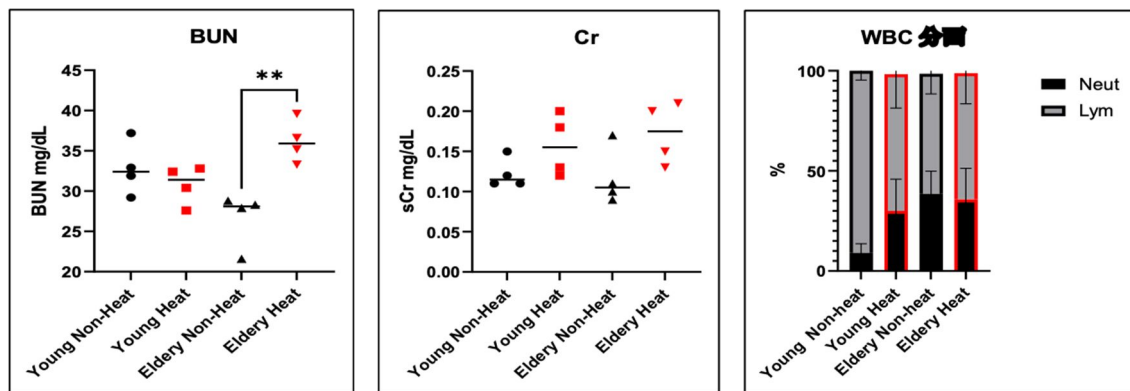
若年マウスと高齡マウスで、昇熱暴露による直腸温の上昇および復温に差はなかった。両群ともに昇熱ストレスを開始してから 1 ヶ月までは、1 日の昇熱暴露終了時 7 時間目の直腸温は

38.3 と(1)に記述したのと同程度であったが、1ヶ月経過後から両群ともに39.0と上昇した。6ヶ月経過後サクリフェイス時は、7時間目の直腸温は若年マウス高年齢マウスともに39.4で、加齢による差を認めなかった。しかし、朝の昇熱暴露開始前の体温の平均が、非暴露群若年マウス36.5、非暴露群高年齢マウス35.6、暴露群若年マウス32.1、暴露群高年齢マウス32.3と、昇熱ストレスの両群で低下していた。昇熱ストレスにより、若年でも高年齢でも基礎体温が低下することが示唆された。

6ヶ月経過後にサクリフェイスし、採血で尿素窒素(BUN)とクレアチニン(Cr)を測定し、腎機能を比較した。若年マウスでは6か月のHeat stress暴露後に腎機能悪化は認めなかったが、高年齢マウスでは腎機能の悪化を認めた。なお、実験期間中の飲水、体重あたりのカロリー摂取量は各群で差を認めなかった。

Heat stressにより免疫反応が変化する報告が最近相次いでおり、末梢血中の白血球数と分画を比較した。好中球数が、高年齢マウスで非暴露群・暴露群ともに若年マウスのコントロール群(非暴露群)より高値であったが、若年マウスの暴露群で好中球数が高年齢マウスと同様に上昇していることが見いだされた。

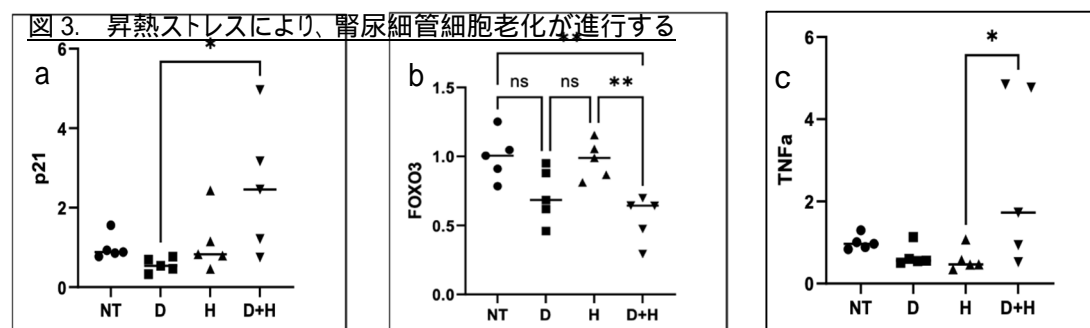
図2. 高年齢昇熱暴露群で腎機能が悪化した。昇熱ストレスにより好中球が増加した。



#### (4) 昇熱ストレスによる腎尿細管細胞老化メカニズムの探求

昇熱ストレスによる腎尿細管細胞の老化が起こっているか調べるため、既報で作成していたDNP投与と昇熱ストレス暴露の腎障害モデルの検体を利用した。昇熱ストレスにより早期に細胞老化が誘導されるか見るために、今回新規作成した6ヶ月を要す老化モデルではなく、1週間暴露の短期モデルを採用した。短期暴露による非治療群(NT)、DNP投与群(D)、昇熱ストレス群(H)、DNP+昇熱ストレス群(D+H)で、腎臓の炎症に関わるmRNAのqPCRをおこなった。

尿細管細胞周期の停止を介した老化に関与するp21が、DNP+Heat群でのみ上昇(図3a)していた。p16はいずれの群でもRNAの増幅が確認できなかった。さらに、老化制御因子のFOXO3が、DNP+Heat群のみで優位に低下していた(図3b)。また老化細胞が分泌するとさ



れる IL-6, TNF を測定した。IL-6 は検体不足で測定不能だったが、TNF が DNP + Heat 群で大きく上昇していた (図 3c)。

#### (5) 虚血性 AKI が昇熱ストレスで悪化するかの検討

新規の長期昇熱ストレスモデルで、若年マウスでは腎障害が顕在化しなかったため、さらなるモデルの改変を計画した。中央アメリカでの CKDu では、若い人にも多く発症していること、病理学的健闘により繰り返す AKI と炎症の持続が病態であると予想されていること、昇熱ストレス以外の脱水や尿路感染症、化学物質などの要素の関与も疑われている。そこで、腎一過性虚血再灌流 (IRI) による急性腎障害 (AKI) に高温環境おいた場合に、腎障害に差を認めるか確かめるため、両側腎動脈を 23 分ずつクランプ後再灌流した後、室温と 35 環境で飼育した場合の腎機能を比較した。マウスの深部温よりも低い環境温としたため、Heat stress 下で体温上昇は認めなかったが、室温 (23 ) で飼育したマウスでは IRI 後 1 週間にわたって体温が術前より低下した。IRI 後 1 週間の時点では、腎機能に差は認めなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	石本 卓嗣  (Ishimoto Takuji)  (00534835)	愛知医科大学・医学部・教授    (33920)	
研究分担者	前田 佳哉輔  (Maeda Kayaho)  (00836306)	名古屋大学・医学部附属病院・助教    (13901)	
研究分担者	小杉 智規  (Kosugi Tomoki)  (90584681)	名古屋大学・医学系研究科・准教授    (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------